

采用狂犬病毒 G 基因原核表达的 间接 ELISA 方法

李胜利¹, 于向东¹, 王伟杰², 胡益源²

(1. 济源市动物卫生监督所, 河南 济源 459000;

2. 洛阳市动物疫病预防控制中心, 河南 洛阳 471002)

摘要:为获得狂犬病毒 G 基因并在大肠杆菌中进行表达,进而初步建立用于评价狂犬疫苗免疫效果的方法,根据狂犬病病毒 RV(*rabies virus*) ERA 株 G 基因序列设计引物,从病毒中提取出 RNA,经逆转录并扩增得到 RVG 基因;将该基因片段定向克隆到原核表达载体 pET28a(+)中,构建重组质粒 PET-RVG 并转化到大肠杆菌 BL21(DE3)gold 中,经 IPTG 诱导表达并确定表达的最佳条件;Ni 亲和层析柱纯化获得重组 G 蛋白,并以 G 蛋白为抗原建立检测狂犬病毒抗体的间接 ELISA 方法.检测结果表明,经灰度分析纯化后纯度可达 96%.

关键词:狂犬病毒;G 基因;原核表达;间接酶联免疫吸附测定方法;免疫效果评价

中图分类号:R446.6 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.04.006

Construction of indirect ELISA method using *rabies virus* G gene expressed in prokaryotic system

LI Sheng-li¹, YU Xiang-dong¹, WANG Wei-jie², HU Yi-yuan²

(1. Jiyuan Institute of Animal Health Inspection, Jiyuan 459000, China;

2. Luoyang Center for Animal Disease Control and Prevention, Luoyang 471002, China)

Abstract: In order to acquire *rabies virus* G gene and express it in *E. coli* and establish the evaluation method for *rabies virus* immune, according to *Rabies virus* ERA G gene sequence to design primer sequences, RNA was extracted from *rabies virus*, the first strand cDNA was synthesized by reverse transcription. G gene fragments were amplified by PCR. Then the gene fragment was cloned to the prokaryotic expression vector pET28a(+) to construct PET-RVG. The positive recombinant plasmids were transfected into *E. coli* BL21(DE3)gold, with IPTG induced expression and determined the best expression condition. Using Ni affinity chromatography purification with G protein, and the indirect ELISA assay for the detection of *rabies virus* antibodies in serum was established based on the G protein. The results showed that the purity degree was 96%.

Key words: *rabies virus*; G gene; prokaryotic expression; indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); evaluation of immune

0 引言

近年来,由于养犬增多,狂犬病发病和致死人数不断上升,犬只注射狂犬疫苗后能否产生保护性抗体的问题越来越受到人们重视^[1].病毒中和试验是目前检测狂犬病病毒中和抗体水平最客观的方法,小鼠血清中和试验(SNT)和快速免疫荧光抑制试验(RFFIT)虽然能够定量检测狂犬病毒中和抗体的水平,但试验较为复杂,无法在基层普及应用.因此,建立可应用于基层的快速、准确、实用的狂犬病疫苗效力检测方法具有重要意义.

由G基因编码的糖蛋白是狂犬病毒的主要保护性抗原,能刺激机体产生中和抗体,有助于机体抵抗病毒的感染^[2],世界卫生组织(WHO)将G蛋白抗体水平的检测列为疫苗效力检测的参考法,希望最终能够用体外测量抗体的方法替代当前检测疫苗效力的方法.因此,本文拟借鉴WHO的方法,对rabies virus(RV) ERA株G基因进行全基因克隆,并在大肠杆菌中进行表达,以期在此基础上初步建立检测动物血清中RV中和抗体的间接酶联免疫吸附测定(ELISA)方法,为评价疫苗免疫效果提供技术支持.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:100份血清由偃师市动物疫病预防控制中心提供,其中80份为2013年1—6月份在该处使用ERA兽用狂犬病冻干疫苗完成免疫后采集的血清,另外20份为未免疫犬血清;大肠杆菌BL21(DE3)gold和pET-28a(+)由本实验室保存.

RT-PCR试剂盒购自Promega公司;RNase, T4-DNA连接酶, dNTP, BamH I和Hind III限制性内切酶等购自上海生工生物工程有限公司;RNA抽提试剂盒, DNA凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;HRP标记的鼠抗犬IgG由本实验室保存.

根据GenBank公布的RV ERA株狂犬病毒基因序列^[3],用Primer5软件分析设计引物并送华大基因合成:上游引物5'ACAGGATCCATGGTTCCTCAA-GCTCTTT-3';下游引物5'ACAAAGCTTTCACAGT-TCAGTCACACC-3'.

仪器:ABI Veriti 梯度PCR仪,美国ABI公司产;UVIKON 923紫外分光光度计,意大利Bio-Tek

公司产;DHZ大容量恒温摇床,江苏太仓市实验设备厂产;AKTAprime Plus蛋白纯化仪,美国通用公司产;MKII酶标仪,美国热电公司产.

1.2 方法

1.2.1 病毒RNA提取 参照分子克隆实验指南中的异硫氰酸胍—酚—氯仿抽提分离RNA的方法^[5],从狂犬病犬脑组织中提取RNA.

1.2.2 G基因RT-PCR扩增、载体构建与序列分析 RT-PCR扩增目的基因,反转录条件为42℃, 60 min. 扩增条件为95℃热变性10 min,按94℃变性45 s, 58℃退火45 s, 72℃延伸90 s进行35个循环,最后72℃延伸10 min. 产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳分析,回收目的DNA片段,分别用BamH I和Hind III双酶切回收片段和pET28a(+),回收的目的基因片段和载体大片段用T₄DNA连接酶15℃连接过夜,连接产物转化BL21(DE3)gold,用Kan抗生素(终浓度为30 μg/mL)LB琼脂平板筛选,经酶切鉴定命名为PET-RVG,送上海生工公司进行测序.

1.2.3 G基因的表达、纯化及鉴定 将重组表达菌PET-RVG按1:1000接种,30℃培养过夜,再加入等体积培养基,于30℃振荡培养1 h加入IPTG,使终浓度为0.5 mmol/L,30℃下进行诱导表达,并分别在2 h, 3 h, 4 h时取1 mL菌液煮沸裂解进行SDS-PAGE分析.表达产物电泳后,转膜、封闭,然后用犬抗RV多抗为一抗、HRP标记的鼠抗犬IgG为二抗进行Western-blot分析^[5].

按照最佳表达条件表达1 L,先用Ni亲和层析柱进行初步纯化,再用DEAE介质对其纯化,最后再用Ni亲和层析柱纯化.

1.2.4 以重组G蛋白为抗原建立检测RV抗体的间接ELISA方法 操作步骤按F. Cliquet等^[7-8]建立的方法进行,用0.05 mol/L CB(pH=9.6)对G蛋白进行稀释,按100 μL/孔于酶免微孔板中加样,同时用含1% BSA, pH=7.4的PBST稀释HRP标记的鼠抗犬IgG酶标物,进行棋盘交叉试验,以P/N值最大者为最适条件.对100份犬血清进行检测.

2 结果与讨论

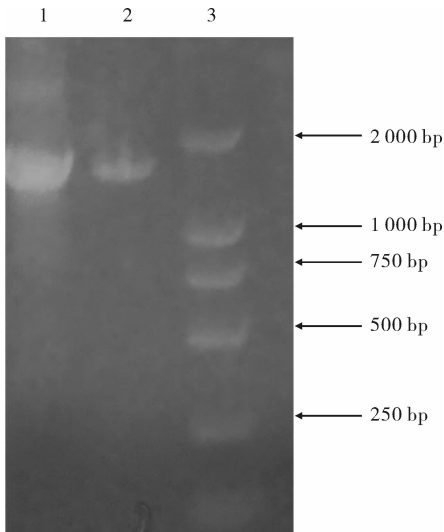
2.1 PCR扩增产物的鉴定

RVG基因片段的PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳结果见图1.由图1可见,在相对分子质量1575 bp处有1条目的条带,与预期大小相符,扩增

产物经测序证明是正确的.

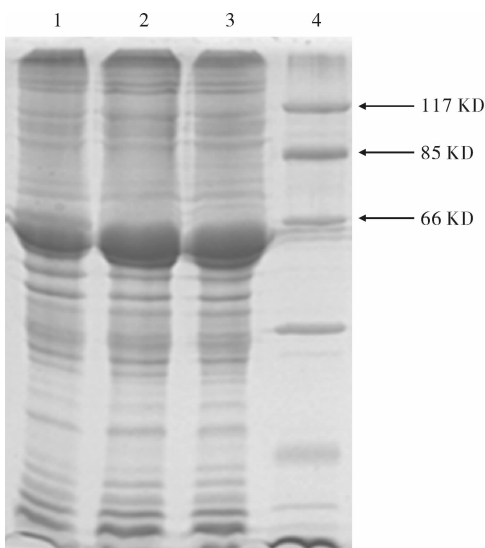
2.2 目的蛋白的诱导表达

阳性菌株在 30 ℃, 0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导 4 h 后 SDS-PAGE 电泳分析结果见图 2. 由图 2 可见, 上清中表达量较高. 纯化产物经 SDS-PAGE 电泳后转移至 NC 膜上进行免疫学反应, Western-blotting 检测结果见图 3. 由图 3 可见, 在 59 KD 处出现了 1 条特异性条带. 这表明, 所纯化的蛋白产物能被狂犬阳性血清所识别, 具有免疫学活性.



1 和 2 表示 PCR 扩增产物; 3 表示 DNA Marker

图 1 RVG 基因片段的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳结果



1 表示诱导 2 h; 2 表示诱导 3 h; 3 表示诱导 4 h; 4 表示 Marker

图 2 目的蛋白 SDS-PAGE 电泳结果(12%)

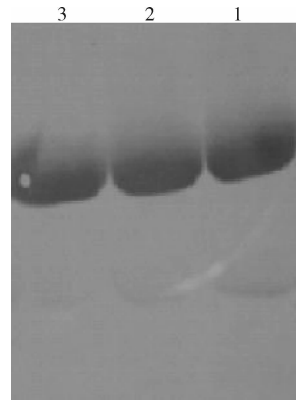
2.3 表达产物纯化

诱导表达产物经过 Ni 亲和纯化、DEAE 离子交换、再 Ni 亲和纯化的组合纯化后, SDS-PAGE 电泳分析结果见图 4. 由图 4 可以清晰地看出在分子量约 59 KD 处有明显的目的蛋白条带, 表达产物主要以上清表达, 纯度可达 96%.

2.4 间接 ELISA 条件的确定

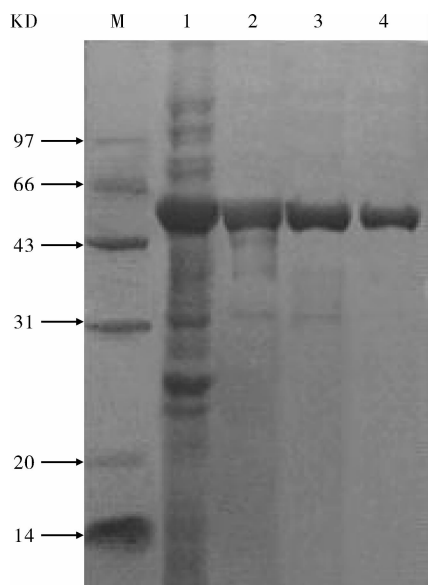
采用间接 ELISA 方法, 在不同酶标抗体稀释浓度下检测狂犬病毒抗体的结果见表 1.

间接 ELISA 检测结果显示, 当酶标抗体的稀释倍数为 6 000 倍时, 阳性血清的检测 OD 值在 2.0 左右, 阴性 OD 值为 0.023, 故最佳 ELISA 酶标二抗稀



1 表示诱导 2 h; 2 表示诱导 3 h; 3 表示诱导 4 h

图 3 Western-blotting 检测结果



M 表示蛋白质相对分子质量标准; 1 表示纯化前破菌上清; 2 表示 Ni 柱第 1 次纯化后; 3 表示 DEAE 柱纯化后; 4 表示 Ni 柱第 2 次纯化后

图 4 蛋白纯化结果

表1 不同酶标抗体稀释浓度下狂犬病毒抗体的间接ELISA检测结果

抗原包被稀释度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	酶标抗体稀释浓度						阴性 OD 值
	1/1 000	1/2 000	1/4 000	1/6 000	1/8 000	1/10 000	
0.25	1.945	1.904	1.834	1.727	1.751	1.339	0.024
0.50	1.953	1.968	2.011	2.251	2.034	1.876	0.023
0.75	1.946	1.954	1.971	2.034	1.97	1.833	0.044
1.00	1.834	1.861	1.903	1.964	1.833	1.764	0.065
1.50	2.045	2.077	2.046	2.067	1.912	1.906	0.085
2.00	2.111	2.121	2.257	2.203	2.217	2.146	0.141

释倍数为6 000倍。由表1可见,当CA19-9抗原包被稀释度为0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,酶标二抗的稀释倍数为6 000倍时, P/N 比最高,故ELISA最佳抗原包被量为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 100份临床血清检测结果

采用本方法和市售试剂盒对100份血清样品的检测结果对比见表2。

表2 100份血清样品的检测结果

检测份数	血清来源	市售试剂盒	本方法
71	80份免疫过的犬血清中的71份	+	+
26	20份未免疫和6份免疫过的犬血清	-	-
0		-	+
3	80份免疫过的犬血清中的3份	+	-

注:+,阳性结果;- ,阴性结果。

由于血清抗体达到保护水平时中和抗体效价为0.5 IU/mL,笔者采用的商品化狂犬病毒抗体检测试剂盒在血清中抗体滴度 <0.06 EU/mL检测为阴性;血清中抗体滴度 ≥ 0.06 EU/mL检测为阳性。由表2可知,本研究建立ELISA方法和市售试剂盒同时检测了100份血清标本,2种方法的检测符合率约为97%。

狂犬病毒糖蛋白G在病毒外膜上形成突起,是狂犬病毒识别宿主细胞的主要结构,也是诱导产生中和抗体的主要成分^[9]。成熟的狂犬病毒糖蛋白具有膜外区,穿膜区及膜内区,其中膜外区是决定狂犬病毒抗原特性和生物学特性的重要部分。病毒间的差异同样表现在与病毒GP抗体的特异反应中^[10]。扈荣良等^[11]研究表明一些狂犬病街毒在GP抗原结构上与疫苗株有明显不同,疫苗免疫的失败和疫苗株与街毒之间抗原差异的程度有关。因此,本研究通过基因工程的方法扩增出糖蛋白全基因,试图通过全长表达降低抗原差异造成的漏检。采用侯丹丹等^[12]建立的优化方法,利用大肠杆菌表达的重组糖蛋白作为包被抗原,根据电泳结果采用灰度

分析显示,纯度达到96%。用其制备的ELISA检测试剂,与商品化试剂阴性检测符合率100%,证明狂犬糖蛋白全长的原核表达不会产生非特异性反应造成假阳性。

对照试剂盒采用了真核表达的狂犬病毒糖蛋白G作为包被,从试验结果也看出,本试验方法和商品化试剂在免疫后动物狂犬中和抗体检测结果上3份有差异,本试剂未检出,可能是因为原核表达不能进行有效糖基化,使某些糖基化位点产生的中和抗体漏检。因此,在进一步研究中考虑采用酵母表达狂犬病毒糖蛋白G,比较糖基化对中和抗体检测的影响,同时利用中和试验对3份有争议血清进行金标准确证明。

3 结论

本研究运用基因工程的方法扩增出糖蛋白全基因,将该基因片段定向克隆到原核表达载体pET28a(+)并转化到大肠杆菌BL21(DE3)gold中,经IPTG诱导表达后用Ni亲和层析柱纯化,获得重组G蛋白。根据电泳结果经灰度分析,结果显示,其纯度达到96%。以G蛋白为抗原建立检测狂犬病毒抗体的间接ELISA方法,检测了100份血清标本,在血清中抗体滴度 ≥ 0.06 EU/mL时,可检测为阳性的商品化试剂总符合率约为97%,其中阴性符合率100%,不易产生假阳性,可用于评价狂犬疫苗免疫效果。

参考文献:

- [1] 唐家琪.自然疫源性疾病[M].北京:科学出版社,2005:358.
- [2] Tuffereau G, Leblois H, Bénéjean P. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice[J]. Virology, 1989, 172:206.
- [3] 白鹤鸽,古漓,王树声.中国狂犬病毒疫苗株(3aG)糖蛋白基因的核酸和氨基酸序列的测定和分析[J].广

- 西医学,1992,14(3):162.
- [4] Chomezynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Analytical biochemistry*, 1987, 162(1):156.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998:888-898.
- [6] 蒋成淦. 酶免疫测定法[M]. 北京:人民卫生出版社,1984.
- [7] Cliquet F, MOiler T, Mutinelli F, et al. Standardization and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns[J]. *Vaccine*, 2003, 21:2986.
- [8] Cliquet F, McElhinney L M, Servat A, et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus specific antibodies from vaccinated dogs and cats[J]. *J Viro Methods*, 2004, 117(1):1.
- [9] Benmansour A, Leblois H, Coulon P, et al. Antigenicity of rabies virus glycoprotein[J]. *J Virol*, 1991, 65(8):4198.
- [10] Perrin P, Versmisse P, Delagneau J F, et al. The influence of the type of immunosorbant on rabies antibody EIA; advantage of glycoprotein over whole virus[J]. *J Biol Stand*, 1986, 14:95.
- [11] 扈荣良, 张余峰, 刘晔, 等. 狂犬病动物抗体水平检测和监测[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(3):293.
- [12] 侯丹丹, 王云龙, 张怡青, 等. 麻疹病毒 N 蛋白原核表达纯化条件的优化[J]. *郑州轻工业学院学报:自然科学版*, 2013, 28(6):31.

(上接第 23 页)

- saccharides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40:2033.
- [6] Benjakul S, Lertittikul W, Bauer F. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93:189.
- [7] Osada Y, Shibamoto T. Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems[J]. *Food Chemistry*, 2006, 98:522.
- [8] Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127:1023.
- [9] 章银良, 张陆燕, 周文权, 等. 不同温度对酪蛋白-木糖模式美拉德反应产物抗氧化的影响[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(4):211.
- [10] 章银良, 周文权. 均匀试验优化酪蛋白-木糖美拉德反应产物的抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2013, 34(1):27.
- [11] 孙涛, 陈春红, 朱云, 等. 基于与葡萄糖美拉德反应的低聚壳聚糖衍生物的抗氧化性能[J]. *食品科学*, 2011(3):14.
- [12] 章银良. 食品与生物试验设计与数据分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2010.
- [13] Yen G, Hsieh P. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products[J]. *J Sci Food Agric*, 1995, 67:415.