



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101418304 B

(45) 授权公告日 2011.08.31

(21) 申请号 200810150305.5

(22) 申请日 2008.07.06

(73) 专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市城关区徐家坪 1 号

(72) 发明人 刘湘涛 尹双辉 孙世琪 田宏
尚佑军 韩雪清 刘艳红

(74) 专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心
62100

代理人 鲜林

CN 1373224 A, 2002.10.09, 全文.

胡惠. 猪瘟病毒 E2 基因的表达及其间接 ELISA 诊断方法的研究. 西北农林科技大学硕士学位论文. 2004, 48-56.

尹双辉. 猪瘟病毒主要抗原蛋白在毕赤酵母和大肠杆菌中的表达. 甘肃农业大学硕士学位论文. 2005, 18-24.

李素. 猪瘟病毒 E2 蛋白及其重复抗原表位的原核表达和特异抗血清制备. 吉林大学硕士学位论文. 2007, 36, 45.

审查员 吕健

(51) Int. Cl.

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1540350 A, 2004.10.27, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法

(57) 摘要

一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法, 包括下述步骤: A. 克隆 E2 基因抗原结构域部分; B. 构建重组表达载体; C. 在 LB 培养基中表达, 获得可溶性的重组 E2 蛋白; D. 亲和层析纯化重组 E2 蛋白; E. pGST-E2 表达蛋白的鉴定, SDS-PAGE 和 Western Blotting 鉴定表达的重组 E2 蛋白; F. 利用重组 E2 蛋白建立检测猪瘟血清抗体间接 ELISA 方法。本发明改良了传统的 LB 培养基, 促进可溶性的 E2 蛋白表达; 解决了猪瘟病毒 E2 抗原在大肠杆菌中主要以包涵体表达的难题, 获得的可溶性 E2 蛋白与完整猪瘟病毒粒子具有相似的免疫学效果, 可作为替代猪瘟病毒粒子的抗原, 建立敏感性、特异、安全和可靠的猪瘟病毒血清抗体的检测间接 ELISA 方法。

1. 一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法,其特征在于,包括下述步骤:

A. 克隆 E2 基因抗原结构域部分

A. 1、设计 1 对特异性寡核苷酸引物 uE 和 dE,从猪瘟兔化弱毒疫苗 C-strain 基因组中扩增 E2 基因的特异性抗原结构域;序列为:

uE :5' -GCGAATTC GGACTCACCCTACATGC-3'

dE :5' -GCCTCGAGTAGCCATCTGTGCTGATTC-3'

A. 2、提取总 RNA,从猪瘟兔化弱毒疫苗 C-strain 中提取核糖核酸 -RNA ;

A. 3、反转录合成 cDNA,以提取的核糖核酸 RNA 为模板,反转录合成 cDNA ;

A. 4、PCR 扩增 E2 基因,用 A. 1 所述的 1 对特异性寡核苷酸引物,进行聚合酶链式扩增反应扩增;

B. 构建重组表达载体;

C. 在改良的 LB 培养基中表达,获得可溶性的重组 E2 蛋白;

D. 亲和层析纯化重组 E2 蛋白;

E. pGST-E2 表达蛋白的鉴定,十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 和免疫印迹法 Western Blotting 鉴定表达的重组 E2 蛋白;

F. 利用重组 E2 蛋白建立检测猪瘟血清抗体间接 ELISA 方法;

上述步骤 C 所述改良的 LB 培养基成分为:蛋白胨 0.8%;氯化钠 0.9%;酵母提取物 0.6%,葡萄糖 0.1%加无离子水,调 pH = 7.4 ;

所述步骤 C 在改良的 LB 培养基中表达 E2 蛋白的诱导温度为 20-16°C,诱导时间 12-16 小时,诱导剂 IPTG 浓度为 0.10mmol/ml。

2. 根据权利要求 1 所述的一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法,其特征在于所述步骤 C 在改良的 LB 培养基中表达 E2 蛋白的诱导温度为 16°C,诱导时间 16 小时。

一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及作为抗原的 E2 蛋白的制备方法,具体说是一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原蛋白的方法。

背景技术

[0002] 猪瘟 (CSF) 是由猪瘟病毒 (CSFV) 引起的是严重威胁养猪业,具有重要经济意义的烈性病毒性疾病之一,被国际兽疫局 (OIE) 列为 A 类 15 种传染病之一,在我国也被列为一类传染病,可导致各生长阶段猪的死亡,给养猪业造成了巨大经济损失。CSFV 是有囊膜的 RNA 病毒,基因组长约 12.3kb,含一个大的开放式阅读框架 (ORF),翻译成一条约含 3898 个氨基酸残基的多聚前体蛋白,其中 C、Erns、E1、E2 为结构蛋白。猪瘟病毒 E2 蛋白作为病毒粒子囊膜上的主要结构糖蛋白之一,是抗猪瘟中和抗体主要诱发者,是猪瘟病毒的主要保护性抗原。近年来,证实了 E2 分子存在 4 个独特的抗原结构域 A、B、C、D,位于 E2 N 末端的 690 位~866 位氨基酸处。A 区位于 766 位~866 位氨基酸处,A 区又分为三个功能区 A1、A2 和 A3,A1、A2 亚区相连,位于 A 区 C 端的 795 位~851 位之间,是 E2 蛋白的中心部位,为一段保守区,A1 亚区能诱导产生中和抗体;A3 亚区靠近 B、C 区,位于 766~813 位之间,无保守性,也不诱导产生中和抗体;B 区位于 690~773 位之间,C 区位于 690 位~800 位之间,两者均为非保守区,是诱导产生中和抗体的主要部位;D 区位于 766~800 位之间,既不保守也不诱导产生中和抗体。功能上,A1 亚区、B 区与 C 区与 CSFV 的中和过程有关,是中和性抗原域,A2、A3 亚区、D 区不参与病毒的中和,是非中和抗原域。由于大肠杆菌表达的外源性蛋白常以无活性的包涵体的形式存在,需要通过变性、复性等过程才能部分恢复重组蛋白的生物学活性,更重要的是这个过程根本不可能使重组蛋白达到与天然蛋白相一致的生物学功能。这就严重限制了重组蛋白在科学研究中的应用。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是利用带有 GST 标记原核表达载体,通过改善诱导表达条件获得可溶性的重组 E2 蛋白,纯化后的 E2 蛋白作为抗原建立检测猪瘟病毒血清抗体间接 ELISA 方法,而提供一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法。

[0004] 本发明的技术问题通过下述技术方案解决:

[0005] 一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法,包括下述步骤:

[0006] 1、一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法,其特征在于,包括下述步骤:

[0007] A. 克隆 E2 基因抗原结构域部分:

[0008] A. 1、设计 1 对特异性寡核苷酸引物 uE 和 dE;

[0009] A. 2、提取总 RNA,从猪瘟兔化弱毒疫苗中提取核糖核酸 -RNA;

[0010] A. 3、反转录合成 cDNA,以提取的核糖核酸 RNA 为模板,反转录合成 cDNA;

[0011] A. 4、PCR 扩增 E2 基因,用所述的 1 对特异性寡核苷酸引物,进行聚合酶链式扩增反应扩增;

[0012] B. 构建重组表达载体;

[0013] C. 在改良的 LB 培养基中表达,获得可溶性的重组 E2 蛋白;

[0014] D. 亲和层析纯化重组 E2 蛋白;

[0015] E. pGST-E2 表达蛋白的鉴定,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 和免疫印迹法 Western Blotting 鉴定表达的重组 E2 蛋白;

[0016] F. 利用重组 E2 蛋白建立检测猪瘟血清抗体间接 ELISA 方法。

[0017] 上述步骤 C 所述改良的 LB 培养基成分中含有蛋白胨 0.8%;氯化钠 0.9%;酵母提取物 0.6%,葡萄糖 0.1% g 加无离子水,调 pH = 7.4

[0018] 所述步骤 C 在改良的 LB 培养基中表达 E2 蛋白的诱导温度为 20-14℃,诱导时间 12-20 小时,诱导剂 IPTG 浓度为 0.10mmol/ml。

[0019] 所述步骤 C 在改良的 LB 培养基中表达 E2 蛋白的诱导温度为 16℃,诱导时间 16 小时。

[0020] 血清学检测 CSFV 抗体是猪抗体水平监测的主要手段,也是诊断猪瘟的重要工具。猪瘟病毒 E2 基因抗原结构域编码的蛋白与完整的 CSF 粒子相比,具有无感染性、易于大量生产和纯化等明显的优势。而改善诱导表达条件获得的可溶性的 E2 蛋白,亲和层析纯化后的 E2 抗原可与猪瘟阳性血清发生反应特异性很强,纯化后的重组 E2 蛋白可直接作为检测用抗原建立 ELISA 方法,应用在临床的猪瘟病毒血清抗体的检测试验中。

[0021] 本发明制备的可溶性的 E2 蛋白具有良好生物学活性,将其与高效的大肠杆菌表达系统及 ELISA 技术相结合,能建立检测猪瘟病毒血清抗体的间接 ELISA 方法,具有与国外同类产品相当的敏感性和特异性,其单份样品的成本仅为进口试剂盒的 1/5,采用本方法纯化的可溶性 E2 抗原与完整 CSFV 病毒粒子具有相同的特异性,完全可以替代其作为血清抗体检测用抗原;在血清样品稀释液中添加的空载体重组菌裂解液,可以有效地阻断因样品血清中存在大肠杆菌抗体而产生的非特异性反应,克服了因大肠杆菌污染而导致的假阳性;检测猪瘟病毒血清抗体的间接 ELISA 方法适合检测猪体内抗猪瘟病毒血清抗体水平,效果良好。本发明检测猪瘟病毒血清抗体的间接 ELISA 方法为临床猪瘟的科学免疫提供可靠的参考依据。

[0022] 1、本发明改良了传统的 LB 培养基,在减少 LB 相应成分的基础上增加了葡萄糖,配制了 iLB 液体培养基,在与低温诱导条件共同作用下,有效减少包涵体的形成,促进可溶性的 E2 蛋白表达;

[0023] 2、本发明解决了猪瘟病毒 E2 抗原在大肠杆菌中主要以包涵体表达的难题,获得的可溶性 E2 蛋白与完整猪瘟病毒粒子具有相似的免疫学效果,可作为替代猪瘟病毒粒子的抗原,建立敏感性、特异、安全和可靠的猪瘟病毒血清抗体的检测间接 ELISA 方法。

具体实施方式

[0024] 反转录合成 cDNA 后,采用聚合酶链式反应 (PCR) 技术和用上、下游引物 (uE、dE) 扩增抗原蛋白基因 E2 主要抗原区。PCR 产物经纯化、回收后、酶切,与 pGEX4T-1 表达载体连接,BL21 (Star) 感受态细胞,重组质粒命名为 pGST-E2。IPTG 诱导表达和亲和层析纯化重组

E2 蛋白,建立间接 ELISA 血清抗体诊断方法,用于猪瘟病毒血清抗体检测。具体步骤为:

[0025] 1. 克隆 E2 基因抗原结构域部分

[0026] 1) 设计表达引物

[0027] 设计 1 对特异性寡核苷酸表达引物 uE 和 dE,同时在 5 端分别增加限制性内切酶位点,序列为:

[0028] uE :5' -GCGAATTC GGACTCACCCTACATGC-3' EcoR I

[0029] dE :5' -GCCTCGAGTAGCCATCTGTGCTGATTC-3' XhoI I

[0030] 2) 提取总 RNA :使用组织裂解液 (TRIZOL 试剂) 从感染了猪瘟兔化病毒疫苗株的兔脾脏组织毒提取总 RNA。

[0031] 3) 反转录合成 cDNA :取所提取的 RNA $5\sim 10\mu\text{L}$,加入 $20\mu\text{L}$ 反转录体系中,内含 $1\times\text{RT buffer}$ (50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM KCl , 8mM MgCl_2 , 10mM DTT), dNTP (each 10mM), 引物 dE 50pmol , AMV RTase 10U , RNase inhibitor 20U 。在 42°C 下水浴 1h,然后煮沸 5min,置 -20°C 备用。

[0032] 4) PCR 扩增 E2 基因 :取 $5\mu\text{L}$ 反转录产物加入 $50\mu\text{L}$ PCR 反应体系中,内含 $1\times\text{PCR buffer}$ (10mM Tris-HCl , 50mM KCl , 1.5mM MgCl_2 pH8.3) 0.2mM dATP , dCTP, dGTP, 0.19mM dTTP , 0.01mM , 250nM 特异性引物 uE/dE。PCR 循环参数为 94°C 40 秒, 55°C 30 秒, 72°C 50 秒,第一循环 94°C 5 分钟,最后一循环 72°C 延伸 10 分钟。35 个循环完成扩增反应。

[0033] 2. 重组表达载体的构建和鉴定 :LB 液体和固体培养基,抗性及浓度均为 Amp+ $100\mu\text{g/mL}$ 。PCR 扩增的 E2 片段用 DNA 片段回收 Kit 纯化回收。限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 过夜双酶切 PGEX4T-1 载体和 E2 片段,纯化回收酶切后的产物。按照载体和目的片段的合适摩尔比 (载体:目的片段 $\approx 1:3$) 混合后用 T4 DNA 连接酶 16°C 连接过夜,连接产物转化 DH5a 感受态细胞,在 LB 平板培养 $12\sim 18\text{h}$ 。挑取单克隆,增菌后提取质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,鉴定得到的阳性重组质粒转化表达菌株 BL21 (Star) 感受态细胞,重组质粒命名为 pGST-E2。

[0034] 3. pGST-E2 在 LB 培养基中的试表达 :挑取 5 个单克隆菌株,接种到 5 个 5mL LB 液体培养基试管中, 220r/min , 37°C 过夜振荡培养;然后分别从 5 管中取 $50\mu\text{L}$ 菌液到新的 5 个 LB 液体培养基试管中, 250r/min $3\sim 4\text{h}$ 至 $\text{OD}_{600} \approx 0.5\sim 0.6$, 在其中的 4 个管中加入 IPTG 的终浓度分别为 0.1mol/L 、 0.25mol/L 、 0.5mol/L 、 1.0mol/L , 剩余 1 管作为阴性对照, 37°C 200r/min 振荡培养 $4\sim 6\text{h}$ 。

[0035] 4. pGST-E2 表达蛋白的鉴定 :

[0036] 1) SDS-PAGE 鉴定重组 E2 蛋白 :取 1mL 重组菌到 Ep 管中, 10000r/min 离心 1min , 弃掉上清,加入 $100\mu\text{L}$ Tris pH6.8, 100°C 煮 5min , 10000r/min 离心 15min 。配制 15% 的 SDS-PAGE 蛋白质电泳凝胶,每个样品加 $10\mu\text{L}$ 上清,加入标准蛋白 Marker $5\mu\text{L}$, 80v 浓缩胶, 120v 分离胶,胶块考马斯亮蓝染色,脱色后观察到了 E2 蛋白成功表达。

[0037] 2) Western Blotting :结果表明,重组 E2 蛋白可以被猪瘟阳性血清识别,具有良好的特异性。

[0038] 3) 重组 E2 抗原与完整猪瘟病毒抗原生物学活性的比较

[0039] 间接 ELISA 法 :分别将纯化的重组 E2 抗原和充分灭活的猪瘟病毒抗原以适当浓度包被 96 孔 ELISA 平板。

[0040] 按照标准的间接ELISA操作程序,利用事先制备的2份已知猪瘟抗体阳性血清(P)和已知无猪瘟特异性抗体的2份阴性血清(N)作为第一抗体,分别作1:20稀释,与两种抗原作用,每份血清作2孔,以辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG作为第二抗体,TMB作为底物,酶标仪OD450波段读结果,见表一。

[0041] 表一:重组E2抗原和猪瘟全病毒抗原活性比较

[0042]

OD450						
重组 E2 抗原			全病毒抗原			
血清	N	P	P/N	N	P	P/N
1	0.21	1.20	5.71	0.19	1.32	6.95
	0.20	1.19	5.95	0.20	1.31	6.55
2	0.19	1.21	6.37	0.21	1.31	6.24
	0.18	1.20	6.67	0.20	1.29	6.45

[0043] 根据间接ELISA常用的结果判断公式:

[0044] 阳性血清OD值/阴性血清OD值>2.1(即P/N>2.1),可知重组E2抗原和全病毒抗原具有几乎相同的与猪瘟病毒抗体阳性血清反应原性,重组E2抗原完全可以替代全病毒抗原用于猪瘟病毒血清抗体的检测。

[0045] 5. pGST-E2表达蛋白的大量表达及纯化

[0046] 1) 重组菌的大量表达:LB培养基成分中含蛋白胨8.0g;氯化钠9.0g;酵母提取物6g,葡萄糖1g加无离子水至1L,调pH=7.4,将重组菌1%的接种量接到1L LB,37℃震荡增菌至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$,然后分别在37℃诱导4h、30℃诱导8h、20℃诱导12h、16℃诱导16h和14℃诱导24h;5000r/min,离心10min,用缓冲液1×PBS收集菌体,振荡混匀;分别超声破菌,冰浴条件下,工作4s,间歇6s,50cycles,超声三次;4℃,15000r/min离心30min。保留上清样品和沉淀样品,进行15%的SDS-PAGE蛋白质电泳凝胶鉴定重组E2蛋白的表达形式,见表二。

[0047] 表二:E2蛋白诱导的表达条件

[0048]

诱导温度 (°C)	IPTG (mmol/ml)	诱导时间 (h)	蛋白表达	蛋白形式	
				LB	iLB
37	0.10	4	是	包涵体	包涵体
30	0.10	8	是	包涵体	包涵体
20	0.10	12	是	微量可溶	30%可溶
16	0.10	16	是	40%可溶	80%可溶
14	0.10	24	否	无蛋白表达	

[0049] 从表一可知,E2 重组蛋白的最佳表达条件为 :iLB,16°C,IPTG 浓度为 0.10mmol/ml

[0050] 2) 亲和层析纯化融合蛋白:将离心后的上清样品上样到谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱上,在 4°C 条件下,重复 3~4 次,用 1×PBS(150mmol/LNaCl,32mmol/LNa₂HPO₄,4mmol/LNaH₂PO₄,pH7.3)洗杂蛋白,然后用含有 15mmol/L还原型谷胱甘肽(GSH)的 50mmol/L Tris.Cl pH8.0 洗融合蛋白,整个洗脱过程中用蛋白指示剂监测洗脱情况,并且预留穿透的样品和洗脱后融合蛋白通过 SDS-PAGE 蛋白质电泳观察结果。

[0051] 3) 蛋白质浓缩

[0052] 洗脱后的 E2 重组蛋白在浓缩管 3200r/min,离心浓缩,4°C 条件下浓缩至体积为 1mL,取样留做鉴定,其余的样品液氮速冻后,保存在 -70°C 低温冰箱。

[0053] 6. 猪瘟病毒血清抗体间接 ELISA 方法的建立

[0054] 6.1 抗原包被

[0055] 用碳酸盐缓冲液(0.05mol/L NaCO₃/NaHCO₃, pH9.6)将抗原稀释至工作浓度(13.75 μg/ml),每孔 50 μl,4°C 过夜。以洗涤缓冲液 1×PBST(0.01mol/L PBS 加 0.05% Tween20, pH7.4)洗涤 4 次,每孔 230 μl,最后一次弃净孔内液体,每孔加入 50 μl 封闭液(0.5%明胶,5%蔗糖,10%马血清的 PBST)37°C 封闭 40 分钟,洗涤 4 次,拍干。风机吹干或真空干燥后,每块立即与 4 袋 1g 用干燥剂一起放入铝箔真空袋内,包装机真空包装,4°C 保存。

[0056] 6.2 加入待检和标准阴、阳性对照血清:

[0057] 用血清稀释液对阳性和阴性对照血清做 1:20 稀释,每孔加入 50 μL,阴阳性对照血清各做两孔;同时待检血清样品用血清稀释液做 1:20 稀释,密封,37°C 结合 45 分钟。同时设两孔不加任何血清样品的空白对照;

[0058] 6.3 洗板:

[0059] 弃去孔内液体,然后将 25×PBST 洗涤液用灭菌水或超纯水稀释成 1×PBST,每孔加入 220~300 μL 洗板,重复 4 次,最后一次弃净孔内液体。

[0060] 6.4 加入酶结合物:

[0061] 浓缩酶标记抗体用酶结合物稀释液做 1:100 稀释,每孔加入 50 μL,密封,37°C 结合 45 分钟。注意:(从加入第一孔时开始计时间;并且现用现配,配置好的工作溶液不易储存超过 6 小时)。

- [0062] 6.5 重复步骤 6.3 洗板。
- [0063] 6.6 加入底物：
- [0064] 将底物溶液 A 和 B 以 1 : 50 的体积比混匀,每孔加入 50 μ L,轻轻震荡混匀,密封,37 $^{\circ}$ C 或室温避光作用 15 分钟。
- [0065] 6.7 终止反应：
- [0066] 每孔加入 50 μ L 终止液,轻摇混匀,测定吸光度 OD450nm。
- [0067] 6.8 结果计算：
- [0068] 试验成立条件:阳性对照、阴性对照血清孔各有两个值,需计算平均吸光度值,阳性标准血清 OD450 \geq 0.60,阴性标准血清 OD450 \leq 0.25,且阳性对照血清 OD450/ 阴性对照血清 OD450 \geq 2.10 判定为试验成立。
- [0069] 计算公式:比值 = 血清样品 OD450/ 阴性对照血清 OD450 \geq 2.10
- [0070] 6.8.2 结果判定
- [0071] 比值 \geq 2.10 血清样品猪瘟病毒抗体判定为阳性；
- [0072] 比值 $<$ 2.10 血清样品猪瘟病毒抗体判定为阴性。
- [0073] 本实施方式所用试材等来源：
- [0074] 1、毒株和血清样品:由中国农业科学院兰州兽医研究所采集保存。
- [0075] 2、引物合成和测序:由 Takara 公司合成。
- [0076] 3、Sigma 公司:酶标仪、辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG、底物 TMB、诱导剂 IPTG、核酸电泳和蛋白电泳所用试剂。
- [0077] 4、Takara 公司:组织总 RNA 提取试剂盒、扩增用单核苷酸 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、高保真的 Taq 酶、限制性核酸内切酶 (EcoRI、XhoI)、T4 DNA 连接酶。
- [0078] 5、安玛西亚:琼脂糖 4B 填料、还原型谷胱甘肽、超滤浓缩管和咪唑。
- [0079] 6、深圳金灿华有限公司:96 孔板、血清管。
- [0080] 实施例 1
- [0081] 1. 克隆 E2 基因抗原结构域部分
- [0082] 1) 设计表达引物
- [0083] 设计 1 对特异性寡核苷酸表达引物 uE 和 dE,同时在 5 端分别增加限制性内切酶位点,序列为：
- [0084] uE :5' -GCGAATTC GGACTCACCCTACATGC-3' EcoRI
- [0085] dE :5' -GCCTCGAGTAGCCATCTGTGCTGATTC-3' XhoI
- [0086] 2) 提取总 RNA:使用组织裂解液 (TRIZOL 试剂) 从感染了猪瘟兔化病毒疫苗株的兔脾脏组织毒提取总 RNA。
- [0087] 3) 反转录合成 cDNA:取所提取的 RNA 5~10 μ l,加入 20 μ l 反转录体系中,内含 1 \times RT buffer (50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM KCl, 8mM MgCl₂, 10mM DTT), dNTP (each 10mM), 引物 dE 50pmol, AMV RTase 10U, RNase inhibitor 20U。在 42 $^{\circ}$ C 下水浴 1h,然后煮沸 5min,置 -20 $^{\circ}$ C 备用。
- [0088] 4) PCR 扩增 E2 基因:取 5 μ l 反转录产物加入 50 μ l PCR 反应体系中,内含 1 \times PCR buffer (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂ pH8.3) 0.2mM dATP, dCTP, dGTP, 0.19mM dTTP, 0.01mM, 250nM 特异性引物 uE/dE。PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 40 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒,

72℃ 50 秒,第一循环 94℃ 5 分钟,最后一循环 72℃ 延伸 10 分钟。35 个循环完成扩增反应。

[0089] 2. 重组表达载体的构建和鉴定:LB 液体和固体培养基,抗性及浓度均为 Amp+100 μ g/mL。PCR 扩增的 E2 片段用 DNA 片段回收 Kit 纯化回收。限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 过夜双酶切 PGEX4T-1 载体和 E2 片段,纯化回收酶切后的产物。按照载体和目的片段的合适摩尔比(载体:目的片段 \approx 1:3)混合后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,连接产物转化 DH5a 感受态细胞,在 LB 平板培养 12~18h。挑取单克隆,增菌后提取质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,鉴定得到的阳性重组质粒转化表达菌株 BL21(Star) 感受态细胞,重组质粒命名为 pGST-E2。

[0090] 3. pGST-E2 在 LB 培养基中的试表达:挑取单克隆菌株,接种到 5mLLB 液体培养基试管中,220r/min,37℃ 过夜振荡培养;然后取 50 μ L 菌液到新的 LB 液体培养基试管中,250r/min 3~4h 至 OD₆₀₀ \approx 0.5~0.6,在管中加入 IPTG 的终浓度为 0.1mol/L,并留 1 管作为阴性对照,37℃ 200r/min 振荡培养 4~6h。

[0091] 4. pGST-E2 表达蛋白的鉴定:

[0092] 1) SDS-PAGE 鉴定重组 E2 蛋白:取 1mL 重组菌到 Ep 管中,10000r/min 离心 1min,弃掉上清,加入 100 μ L Tris pH6.8,100℃ 煮 5min,10000r/min 离心 15min。配制 15% 的 SDS-PAGE 蛋白质电泳凝胶,每个样品加 10 μ L 上清,加入标准蛋白 Marker 5 μ L,80v 浓缩胶,120v 分离胶,胶块考马斯亮蓝染色,脱色后观察到了 E2 蛋白成功表达。

[0093] 2) Western Blotting:结果表明,重组 E2 蛋白可以被猪瘟阳性血清识别,具有良好的特异性。

[0094] 3) 重组 E2 抗原与完整猪瘟病毒抗原生物学活性的比较

[0095] 间接 ELISA 法:分别将纯化的重组 E2 抗原和充分灭活的猪瘟病毒抗原以适当浓度包被 96 孔 ELISA 平板。

[0096] 按照标准的间接 ELISA 操作程序,利用事先制备的 2 份已知猪瘟抗体阳性血清(P)和已知无猪瘟特异性抗体的 2 份阴性血清(N)作为第一抗体,分别作 1:20 稀释,与两种抗原作用,每份血清作 2 孔,以辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 作为第二抗体,TMB 作为底物,酶标仪 OD450 波段读结果。

[0097] 根据间接 ELISA 常用的结果判断公式:

[0098] 阳性血清 OD 值/阴性血清 OD 值 $>$ 2.1(即 P/N $>$ 2.1),可知重组 E2 抗原和全病毒抗原具有几乎相同的与猪瘟病毒抗体阳性血清反应原性,重组 E2 抗原完全可以替代全病毒抗原用于猪瘟病毒血清抗体的检测。

[0099] 5. pGST-E2 表达蛋白的大量表达及纯化

[0100] 1) 重组菌的大量表达:LB 培养基成分中含蛋白胨 8.0g;氯化钠 9.0g;酵母提取物 6g,葡萄糖 1g 加无离子水至 1L,调 pH=7.4,将重组菌 1% 的接种量接到 1L LB,37℃ 震荡增菌至 OD₆₀₀=0.5~0.6,然后在 16℃ 诱导 16h;5000r/min,离心 10min,用缓冲液 1 \times PBS 收集菌体,振荡混匀;超声破菌,冰浴条件下,工作 4s,间歇 6s,50cycles,超声三次;4℃,15000r/min 离心 30min。保留上清样品和沉淀样品,进行 15% 的 SDS-PAGE 蛋白质电泳凝胶鉴定重组 E2 蛋白的表达形式。

[0101] 2) 亲和层析纯化融合蛋白:将离心后的上清样品上样到谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱上,在 4℃ 条件下,重复 3~4 次,用 1 \times PBS(150mmol/LNaCl,32mmol/LNa₂HPO₄,4mmol/L

LNaH₂PO₄, pH7.3) 洗杂蛋白, 然后用含有 15mmol/L 还原型谷胱甘肽 (GSH) 的 50mmol/L Tris. Cl pH8.0 洗融合蛋白, 整个洗脱过程中用蛋白指示剂监测洗脱情况, 并且预留穿透的样品和洗脱后融合蛋白通过 SDS-PAGE 蛋白质电泳观察结果。

[0102] 3) 蛋白质浓缩

[0103] 洗脱后的 E2 重组蛋白在浓缩管 3200r/min, 离心浓缩, 4℃ 条件下浓缩至体积为 1mL, 取样留做鉴定, 其余的样品液氮速冻后, 保存在 -70℃ 低温冰箱。

[0104] 6. 猪瘟疫病毒血清抗体间接 ELISA 方法的建立

[0105] 6.1 抗原包被

[0106] 用碳酸盐缓冲液 (0.05mol/L NaCO₃/NaHCO₃, pH9.6) 将抗原稀释至工作浓度 (13.75 μg/ml), 每孔 50 μL, 4℃ 过夜。以洗涤缓冲液 1×PBST (0.01mol/L PBS 加 0.05% Tween20, pH7.4) 洗涤 4 次, 每孔 230 μL, 最后一次弃净孔内液体, 每孔加入 50 μL 封闭液 (0.5% 明胶, 5% 蔗糖, 10% 马血清的 PBST) 37℃ 封闭 40 分钟, 洗涤 4 次, 拍干。风机吹干或真空干燥后, 每块立即与 4 袋 1g 用干燥剂一起放入铝箔真空袋内, 包装机真空包装, 4℃ 保存。

[0107] 6.2 加入待检和标准阴、阳性对照血清:

[0108] 用血清稀释液对阳性和阴性对照血清做 1 : 20 稀释, 每孔加入 50 μL, 阴阳性对照血清各做两孔; 同时待检血清样品用血清稀释液做 1 : 20 稀释, 密封, 37℃ 结合 45 分钟。同时设两孔不加任何血清样品的空白对照;

[0109] 6.3 洗板:

[0110] 弃去孔内液体, 然后将 25×PBST 洗涤液用灭菌水或超纯水稀释成 1×PBST, 每孔加入 220 ~ 300 μL 洗板, 重复 4 次, 最后一次弃净孔内液体。

[0111] 6.4 加入酶结合物:

[0112] 浓缩酶标记抗体用酶结合物稀释液做 1 : 100 稀释, 每孔加入 50 μL, 密封, 37℃ 结合 45 分钟。注意: (从加入第一孔时开始计时间; 并且现用现配, 配置好的工作溶液不易储存超过 6 小时)。

[0113] 6.5 重复步骤 6.3 洗板。

[0114] 6.6 加入底物:

[0115] 将底物溶液 A 和 B 以 1 : 50 的体积比混匀, 每孔加入 50 μL, 轻轻震荡混匀, 密封, 37℃ 或室温避光作用 15 分钟。

[0116] 6.7 终止反应:

[0117] 每孔加入 50 μL 终止液, 轻摇混匀, 测定吸光度 OD_{450nm}。

[0118] 6.8 结果计算:

[0119] 试验成立条件: 阳性对照、阴性对照血清孔各有两个值, 需计算平均吸光度值, 阳性标准血清 OD₄₅₀ ≥ 0.60, 阴性标准血清 OD₄₅₀ ≤ 0.25, 且阳性对照血清 OD₄₅₀/ 阴性对照血清 OD₄₅₀ ≥ 2.10 判定为试验成立。

[0120] 计算公式: 比值 = 血清样品 OD₄₅₀/ 阴性对照血清 OD₄₅₀ ≥ 2.10

[0121] 6.8.2 结果判定

[0122] 比值 ≥ 2.10 血清样品猪瘟疫病毒抗体判定为阳性;

[0123] 比值 < 2.10 血清样品猪瘟疫病毒抗体判定为阴性。

- [0124] 实施例 2
- [0125] 重复实施例 1 的方法, 只是步骤 5 大量诱导表达的诱导温度为 20℃, 诱导时间 12h。
- [0126] CSFV 抗体检测方法 E2 核苷酸序列表
- [0127] Organization Applicant
- [0128] -----
- [0129] Street :徐家坪 1, 盐场路
- [0130] City :兰州
- [0131] State :甘肃
- [0132] Country :P. R. China
- [0133] PostalCode :730046
- [0134] PhoneNumber :0931-8342706
- [0135] FaxNumber :0931-8342052
- [0136] EmailAddress :yinshuanghuikangri@163.com
- [0137] <110>OrganizationName :中国农业科学院兰州兽医研究所
- [0138] Application Project
- [0139] -----
- [0140] <120>Title :一种制备用于检测猪瘟疫病毒血清抗体的可溶性 E2 抗原的方法
- [0141] <130>AppFileReference :G. Swensvoort, 1989. Topographical and Functional Mapping of Epitopes on Hog Cholera Virus. J. Gen. Virol, 70 :2865-2876.
- [0142] <140>CurrentAppNumber :
- [0143] <141>CurrentFilingDate :__-__-__
- [0144] Sequence
- [0145] -----
- [0146] <213>OrganismName :猪瘟疫病毒兔化弱毒疫苗株 (HCLV) E2 基因
- [0147] <400>PreSequenceString :
- [0148] gaagattaca ggtacgcaat atcgtcaacc gatgagatag ggctacttgg ggccggagggt
- [0149] 60
- [0150] ctcaccacca cctggaagga atacaaccac gatttgaac tgaatgacgg gaccgtcaag
- [0151] 120
- [0152] gccagttgcg tggcaggttc ctttaaagtc acagcactta atgtggtcag taggaggtat
- [0153] 180
- [0154] ttggcgtcat tgcataagaa ggctttaccc acttccgtga cattcgagct cctgttcgac
- [0155] 240
- [0156] gggaccaacc catcaactga ggaaatggga gatgacttca ggtccgggct gtgcccgttt
- [0157] 300
- [0158] gatacgagtc ctgttgtaa gggaaagtac aatacgacct tgttgaacgg taatgctttc
- [0159] 360
- [0160] tatcttgtct gcccaatagg gtggacgggt gtcataagat gcacagcagt gagcccaaca

[0161] 420
[0162] actctgagga cagaagtggg aaagaccttc aggagagaca agccctttcc gcacagaatg
[0163] 480
[0164] gattgtgtga ccacatagt ggaaaatgaa gatttattct attgtaagtt ggggggcaac
[0165] 540
[0166] tggacatgtg tgaagggc
[0167] 558
[0168] <212>Type :DNA
[0169] <211>Length :558
[0170] SequenceName :E2
[0171] SequenceDescription :
[0172] Feature
[0173] -----
[0174] Sequence :E2 :
[0175] <221>FeatureKey :CDS
[0176] <222>LocationFrom :1
[0177] <222>LocationTo :558
[0178] OtherInformation :CSFV E2 gene
[0179] CDSJoin :Yes

专利名称(译)	一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性E2抗原的方法		
公开(公告)号	CN101418304B	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	CN200810150305.5	申请日	2008-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	刘湘涛 尹双辉 孙世琪 田宏 尚佑军 韩雪清 刘艳红		
发明人	刘湘涛 尹双辉 孙世琪 田宏 尚佑军 韩雪清 刘艳红		
IPC分类号	C12N15/40 C12N15/70 C07K14/08 G01N33/53		
代理人(译)	鲜林		
审查员(译)	吕健		
其他公开文献	CN101418304A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种制备用于检测猪瘟病毒血清抗体的可溶性E2抗原的方法，包括下述步骤：A.克隆E2基因抗原结构域部分；B.构建重组表达载体；C.在LB培养基中表达，获得可溶性的重组E2蛋白；D.亲和层析纯化重组E2蛋白；E.pGST-E2表达蛋白的鉴定，SDS-PAGE和Western Blotting鉴定表达的重组E2蛋白；F.利用重组E2蛋白建立检测猪瘟血清抗体间接ELISA方法。本发明改良了传统的LB培养基，促进可溶性的E2蛋白表达；解决了猪瘟病毒E2抗原在大肠杆菌中主要以包涵体表达的难题，获得的可溶性E2蛋白与完整猪瘟病毒粒子具有相似的免疫学效果，可作为替代猪瘟病毒粒子的抗原，建立敏感性、特异、安全和可靠的猪瘟病毒血清抗体的检测间接ELISA方法。

OD450						
重组 E2 抗原			全病毒抗原			
血清	N	P	P/N	N	P	P/N
1	0.21	1.20	5.71	0.19	1.32	6.95
	0.20	1.19	5.95	0.20	1.31	6.55
2	0.19	1.21	6.37	0.21	1.31	6.24
	0.18	1.20	6.67	0.20	1.29	6.45