

水泡性口炎病毒核蛋白基因的表达及初步应用

花群义^{1*} 金宁一² 徐自忠¹ 杨云庆¹ 董 俊¹ 杨晶焰¹ 周晓黎¹

¹(云南出入境检验检疫局技术中心,昆明 650228)

²(解放军军需大学军事兽医研究所,长春 130062)

摘 要 将水泡性口炎病毒编码群特异性抗原的 *N* 基因片段克隆至 pMD18-T 克隆载体质粒中,构建 *N* 基因克隆重组质粒,进行核苷酸序列分析。然后亚克隆插入 pBAD/Thio TOPO 表达载体,经 PCR 限制性内切酶分析、测序鉴定,筛选获得 *N* 基因正向插入、有正确读码框的阳性克隆,成功构建了水泡性口炎病毒 *N* 基因重组表达载体。经 L-Arabinose 诱导表达,可稳定、高效地表达 *N* 蛋白抗原。SDS-PAGE、Western blotting 及间接 ELISA 试验结果表明,表达蛋白为融合蛋白,质量约 63.5 kD,其表达产量约占菌体总蛋白的 16%,相当于 92mg/L。融合蛋白中含有水泡性口炎病毒群特异性的核蛋白抗原,应用表达的 VSV 核蛋白抗原建立了酶联免疫吸附试验,通过对 186 份山羊、豚鼠实验动物人工感染 VSV 的血清样品和参考血清样品的检测,并与微量血清中和试验进行了比较,结果表明:以表达的 VSV 核蛋白为包被抗原的酶联免疫吸附试验是一种特异性强、敏感性高、快速、简单、安全的检测方法,抗原制备成本低。

关键词 水泡性口炎病毒,核蛋白基因,克隆和表达,ELISA

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0130-06

水泡性口炎(Vesicular stomatitis,VS)是由弹状病毒科水泡病毒属的水泡性口炎病毒(VSV)引起的人畜共患的重大动物疫病。该病毒分为印第安纳(Indiana,IN型)和新泽西(New Jersey,NJ型)两个血清型。感染人后出现急性热性类似流感的症状^[1]。牛、猪、马、羊和其它多种野生动物可感染,临床症状与口蹄疫(Foot and mouth disease,FMD)不易区别^[2]。国际兽疫局(OIE)将该病列为动物 A 类传染病,是国际动物贸易中的重要检疫对象。

VSV 为单股负链 RNA 病毒,基因全长 11 163bp,共编码 5 种主要病毒蛋白——糖蛋白(G)、基质蛋白(M)、核蛋白(N)、磷酸蛋白(NS)、病毒 RNA 聚合酶(L)。其中 G 糖蛋白定位在包膜的突起上,由 511 个氨基酸组成,刺激机体产生中和抗体,呈现型乃至株的特异性^[3]。N 蛋白由 422 个氨基酸组成,呈现群特异性,为所有型的 VSV 所共有,诱导产生非中和抗体,与其它弹状病毒无任何交叉反应,它在病毒 RNA 复制和转录调控中起着核心作用^[4]。在病毒感染细胞内,N 蛋白以单体、多聚体和与 NS 蛋白结合体 3 种形式存在^[5]。对于 VS 病毒的核蛋白基因,有报道用真核表达系统,而原核表达 VSV 抗原用于诊断试剂的报道不多,少数报道认为原核表达系统不能高效表达核蛋白^[2]。本文采用 pBAD/TOPO

原核表达系统首次对 VS 病毒核蛋白进行了表达,用表达产物建立快速、特异、敏感、安全、简便的酶联免疫吸附试验(ELISA),为我国水泡性口炎的免疫血清学诊断试剂的制备和 VSV 新型疫苗构建奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

VSV-NJ 型和 VSV-IND 型从美国国家兽医服务实验室(NVSL)引进保存。幼地鼠肾细胞(BHK-21)为本室保存。pMD18-T 载体、*E. coli* JM109 细菌、Trizol RNA 提取试剂盒、限制性内切酶、Taq 酶和 T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;pBAD/Thio TOPO 载体、LMG194 细菌、TOP10 细菌、proBond™protein 纯化试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;proteinG-HRP 为 Omega 公司产品;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体为华美公司产品。VSV 阳性血清、对照血清、参考血清和实验动物山羊和豚鼠人工感染血清由本室保存。

1.2 VSV 核蛋白基因重组质粒的构建

按照参考文献[6]进行 VSV 核蛋白基因重组质粒的构建。

收稿日期 2003-07-14,修回日期 2003-10-18。

基金项目:国家“十五”重大科技攻关项目(No.2001BA804A22)、云南省自然科学基金资助项目(No.2002C0072M)、昆明市科技计划项目(昆科农字 200202003)。

* 通讯作者。Tel 86-871-4613797;Fax 86-871-4615987;E-mail: ziqhua@alipco.com.cn
©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.3 VSV N 基因重组表达载体的构建

1.3.1 VSV N 抗原基因的亚克隆 :为了构建可表达可溶性目的蛋白 ,设计引物时去除目的基因的起始密码子和终止子 ,使目的基因插入 pBAD 载体后表达融合蛋白 ,以提高特异性抗原的免疫原性和稳定性。以含有 VSV N 基因的 pMD-VN5 质粒 DNA 为模板 ,进行目的片段的扩增。经 1% 琼脂糖电泳检测 ,回收纯化的目的片段按说明书连接插入 pBAD/Thio-TOPO 载体 ,转化 TOP10 感受态细菌 ,在含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基上选择培养 24h。

1.3.2 重组表达质粒的鉴定和测序 :从 LB 平板培养基上挑选单个菌落 ,用 pBAD/Thio-TOPO 载体上的 Trx Forward 和 pBAD Reverse 引物做鸡尾酒-PCR 体系法分析鉴定。对应的阳性克隆单个菌落小量培养后提取质粒 ,根据载体和目的基因上的酶切位点 ,用 BamH I 酶切鉴别出正向插入 VSV N 基因的重组质粒。对重组质粒中的插入片段进行序列测定 ,进一步鉴别出正向插入 VSV N 基因和读码框正确的重组子。

1.4 重组表达质粒在 LMG₁₉₄ 细胞中的诱导表达

制备 LMG194 细菌感受态细胞。将重组表达质粒转化入 LMG194 细胞后 ,在含 100 μ g/mL Amp 的 LB 平板上培养 ,挑取单个菌落 ,于 2mL 含 0.2% 葡萄糖和 100 μ g/mL Amp 的 RM 培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡至 $OD_{600} = 1 \sim 2$ 。制备 5 管 10mL 含 100 μ g/mL Amp 的 LB ,每管加入 0.1mL 菌体培养液 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 $OD_{600} = 0.5 \sim 1$,使细菌达到正处于中期对数生长期。从每管中取出 1mL 细菌液 ,12 000r/min 离心 1min ,吸取上清液作备用样品 ,沉淀细菌冻存于 -20 $^{\circ}$ C ,作为基点样品。用 pBAD/Thio 载体作为阳性表达对照 ,用无载体的 LMG194 细胞作为阴性对照 ,同样方法制备基点样品。

用 20% 阿拉伯糖和灭菌水 ,在无菌条件下制备 10 倍序列稀释的溶液 :20%、2%、0.2%、0.02%、0.002% ,分别加入还剩余 9mL 的正处于中期对数生长期的培养物中 ,使阿拉伯糖的最终浓度分别达 0.00002%、0.0002%、0.002%、0.02%、0.2% ,37 $^{\circ}$ C 振荡 4h ,每管取出 1mL 菌液 ,12 000r/min 离心 1min ,吸取上清液作备用样品 ,沉淀细胞 -20 $^{\circ}$ C 冻存 ,作为目的蛋白阿拉伯糖诱导表达的分析样品。

1.5 表达产物的检测

1.5.1 SDS-PAGE 凝胶电泳 :按文献[7]方法进行 10% SDS-PAGE 电泳 ,浓缩胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 10%。将上述制备的基点样品和阿拉伯糖诱导表达样品细菌沉淀物和上清液分别悬浮于 100 μ L 1 \times 和 100 μ L 2 \times SDS-PAGE 样品缓冲液中 ,94 $^{\circ}$ C 加热 5min ,5 000r/min 离心 3min ,取 10 μ L 上样 ,电泳后考马斯亮蓝 R-250 染色 ,检查特异性的目的蛋白条带 ,确定获得最高浓度表达的大约阿拉伯糖浓度。用 20% 蔗糖 TE 缓冲液渗透休克浸出表达的融合蛋白 ,离心后取上清和沉淀分别电泳分析 ,以确定表达产物的可溶性和不可溶性形式存在的比例。

1.5.2 表达产物的免疫印迹分析 :将 SDS-PAGE 凝胶电泳的各蛋白区带转移至硝酸纤维素膜 ,用羊抗 VSV 抗血清为第一抗体、HRP-兔抗羊 IgG 为第二抗体 ,进行 Western blotting 分

析 ,以检查表达产物是否具有特异性免疫活性。

1.5.3 重组蛋白质的小批量生产、纯化和定量 :制备含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基 ,按 1% 的体积接入二级种子菌液 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4h ,加入确定的阿拉伯糖最佳诱导浓度 ,温度降至 30 $^{\circ}$ C ,继续振荡培养 ,缓慢诱导表达 5h ,收集菌液 4 $^{\circ}$ C 5000r/min 离心 30min ,称量菌体湿重。将菌体按 1:10 (W/V) 悬浮于 TE 缓冲液 ,置冰水浴中 300~400W 反复超声破菌 ,每次 15s ,间隔 15s ,涂片染色镜检至完全裂解菌体 ,4 $^{\circ}$ C 5000r/min 离心 30min ,取上清液为粗提的重组蛋白。按重组蛋白质 Ni-NTA 纯化试剂盒的说明书纯化重组核蛋白。纯化后的重组核蛋白在 Gene QuantPro RNA/DNA Calculator 仪上 ,用紫外分光光度法测定蛋白质的含量 ,并进行 SDS-PAGE 检测。

1.5.4 间接 ELISA 和微量血清中和试验检测比较 :以粗提和纯化的重组蛋白作为包被抗原 ,采用方阵滴定法测定最适包被抗原的浓度 ,通过最佳包被液、最佳封闭液、最佳洗涤液、最佳稀释液、HRP-protein G 最佳工作浓度、最佳反应条件的筛选 ,建立 ELISA 标准化程序。在同样条件下 ,用口蹄疫、蓝舌病、鹿流行性出血热、赤羽病、牛病毒性腹泻-粘膜病阳性血清进行 ELISA 特异性试验。VSV 阳性血清作倍比稀释 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024 做 ELISA 方法的敏感性试验。

微量血清中和试验的细胞用 BHK-21 传代细胞 ,病毒和阳性血清为 VSV-IND 和 VSV-NJ 标准毒株及其阳性血清。先进行毒价测定 ,正式试验用 100TCID₅₀/25 μ L。逐日观察细胞病变 (CPE) 48h 判定结果 ,血清抗体 1:16 以上判定阳性。用 186 份参考血清和实验动物人工感染后抗体动态监测 ,比较二种方法检测结果 ,从而对 ELISA 方法进行评估。

2 试验结果

2.1 目的片段的克隆与鉴定

扩增产物大小约为 1.2kb ,与预期结果相符 ,1% 琼脂糖凝胶电泳图谱上显示均一的 1 条带 ,如图 1。扩增片段回收纯化 ,连接到 pMD18-T 载体上 ,转化 *E. Coli* JM109 感受态细胞 ,获得含有 VSV N 基因 1263bp 片段的阳性克隆。PCR 和核苷酸序列测定鉴定 ,阳性克隆命名为 pMD-VN5。

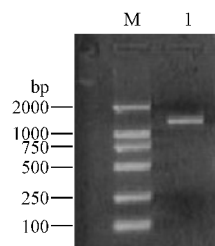


图 1 RT-PCR 产物电泳

Fig.1 Electrophoresis of PCR products

M :DL-2000 marker ; 1 :1263 bp PCR products amplified from VSV

2.2 VSV N 基因的亚克隆及重组表达质粒的构建

重组质粒 pMD-VN5 中的 N 基因经亚克隆 ,插入到载体 pBAD/Thio-TOPO 中 ,获得重组子 ,转化至表达宿主菌 TOP10

和 LMG194 中 ,PCR 鉴定结果如图 2 ,VSV N 基因已插入到载体中。用 BamH I 对阳性重组质粒酶切 ,1% 琼脂糖凝胶电泳 ,分别产生 5161bp、443bp、95bp 的 3 个片段和 4024bp、1232bp、443bp 的 3 个片段两种结果 ,与预期结果一样 ,前者为 VSV N 基因片段正向插入到载体 pBAD/Thio TOPO ,后者为 VSV N 基因片段反向插入到载体 pBAD/Thio TOPO ,结果见图 3。将 VSV N 基因正向插入到载体 pBAD/Thio TOPO 的表达重组质粒克隆 ,命名为 pBAD-VN5。

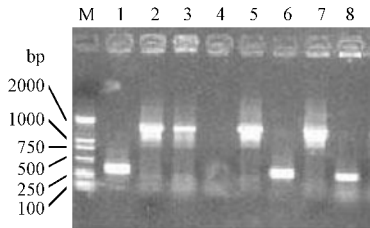


图 2 表达重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 The identification of the recombination plasmid by PCR

M :DL-2000 marker ; 2 3 5 7 :1263 bp PCR products amplified from pBAD-VN5 ; 1 4 6 8 :negative results

2.3 VSV 核蛋白表达重组质粒的序列分析

分析表达重组质粒 pBAD-VN5 核苷酸序列 ,并与 GenBank 中报道的 VSV 编码核衣壳蛋白 N 基因序列比较后发现 ,VSV N 基因的编码序列全长为 1266bp ,编码 422 个氨基酸 ,插入方向和阅读框架正确。该序列在 GenBank 中的登录号为 :AY383716。推测的 VSV N 蛋白的氨基酸序列和表达融合蛋白的氨基酸序列如图 4。N 端是质量为 13kD 的硫氧还蛋白 ,C 端是质量为 3kD 的 V5 epitope 和 6 个组氨酸 ,中间是质量为 47.5 kD 的 VSV 核蛋白 ,整个融合蛋白的质量为 63.5kD。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

通过加入阿拉伯糖诱导目的基因表达 ,10% SDS-PAGE 分析结果表明 ,目的基因表达产生约 63.5kD 的特异蛋白条带。按 1% 接入二级种子液 ,37℃ 振荡培养 4h ,以 0.02% 的阿拉伯糖浓度诱导表达 5h 时 ,表达量最高 ,如图 5。而经诱导的对照菌和未经诱导的重组菌没有相应的条带 ,说明 VSV N 基因得到正确表达。用 20% 蔗糖 TE 缓冲液渗透休克浸出表达的融合蛋白 ,离心后取上清和沉淀分别电泳分析 ,重组表达菌株 pBAD-VN5TOP10、pBAD-VN5LMG194 菌体破碎上清和沉淀碎片中均出现了特异性蛋白条带 ,说明表达的融合蛋白在上清和沉淀中均存在 ,融合蛋白可分泌到细胞间质中 ,大部分以可溶性形式存在 ,约占被表达蛋白的 57% 左右。

2.5 表达产物的 Western blotting 检测

对重组表达菌株 pBAD-VN5TOP10、pBAD-VN5LMG194、TOP10、LMG194 的菌体裂解液进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析 ,结果 pBAD-VN5TOP10、pBAD-VN5LMG194 出现一条相对应于它们质量的特异显色条带 ,而 TOP10、LMG194 的菌体裂解液则未出现带 ,如图 6。说明表达蛋白可被相应的抗血清 IgG 所识别 ,具有免疫学活性。

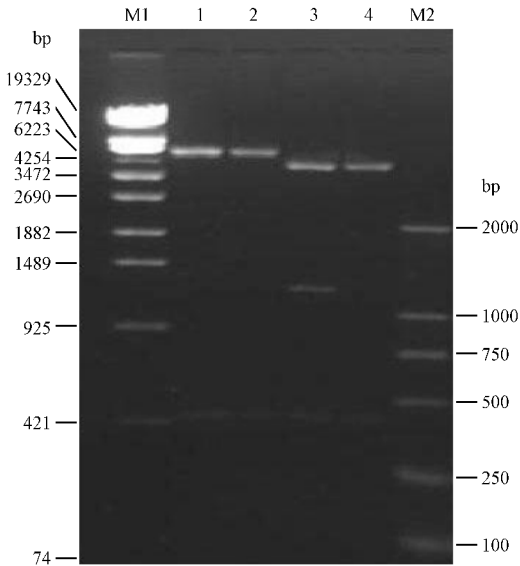


图 3 重组表达质粒 pBAD-VN5 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzyme analysis of pBAD-VN5 with BamH I

M1 :EcoT14I DNA marker ;M2 :DL2000 DNA marker ; 1 2 :VSV N gene forward insert 3 4 :VSV N gene reverse insert

HP-Thioredoxin	
MGSDKIHTL	DDSFDTDLK ADGAILVDFW AHWCPCPKMI APILDEIADE YQGKLTVAKL 60
NIDHNPGTAP	KYGTIRGIPTL LLFKNGEVAA TKVGALSKGQ LKEFLDANLA GSGSGDDDDK 120
LALAPTVKRI	INDSIIQPKL PANEDPVEYP ADYFKNNTNI VLYVSTKVAL NDLRAYVYQG 180
IKSGNPSILH	INAHLYALK GVEGTLDLDRW ISFGRTIGKR EENVKIFDLV KVEELKTALP 240
DGKSDPDRSA	EDDKWLPIYI LGLYRVGRSK VTDYRKLLD GLENGQKVAS TRFESLVEDG 300
LDFFNIEWND	PNFTKIVAAV DMFFHMLKKH ERAPIRYGTI VSRFKDCAAL ATFGLHLSKVS 360
GLSIEELTTW	VLNREVADEL CGMMYPGQEI DKADSYMPYM IDFGLSQKSP YSSVKNPAFH 420
FWGQLAAILL	RSTRAKNARQ PDDIEYTSLT CASLLLSFAV GSSADIEQQF YIGEDKYTTE 480
KDDGLKSDV	PPKGRNVVDW LGWYDDNGGK PTPDMLNFAR RAVNSQLSLR EKTIGYAKV 540
EFDKKGELG	G KPINPLLGL DSRGTHHHH HH..... 632
V5 epitope 6His tag	

图 4 表达的融合蛋白推测的氨基酸序列

Fig.4 The deduced amino acid sequence of VSV N fusion protein expressed

2.6 重组基因表达产物的纯化和定量

诱导培养后收获的菌体反复超声破菌 20 次后 ,离心取上清液为粗提物 ,沉淀经 SDS-PAGE 已无目的蛋白 ,说明超声破菌 20 次已经完全获得了目的蛋白。粗提的重组蛋白质经 Ni-NTA 纯化后 ,进行 SDS-PAGE 分析 ,几乎只有一条质量为 63.5kD 的蛋白质条带 ,与直接用菌体进行 SDS-PAGE 出现的重组表达产物条带的质量大小一致 ,证实经 Ni-NTA 亲和层析纯化后重组核蛋白得到很好纯化 ,如图 7。用紫外分光光度法测定其在 280nm 波长的光密度值 ,计算所纯化蛋白的纯度及浓度 ,重组蛋白的获得率为 0.96mg/g 湿菌 ,相当于 92mg/L 菌液 ,同样方法测定粗提物的总蛋白 ,推算出重组融合蛋白占菌体总蛋白比例的 16% 左右。

2.7 间接 ELISA 的建立及初步应用评估

通过各种反应条件的筛选 ,建立了 ELISA 程序 :用包被液 (0.05mol/L pH 9.6 CB) 将提纯的 VSV 核蛋白重组抗原配制成终浓度为 10μg/mL ,抗原包被于 96 孔酶标板 ,50μL/孔 ,4℃ 过夜 ,洗涤液 0.01mol/L pH 7.4 PBS ,0.05% Tween-20 ,

PBST 洗 3 次 ;用封闭液(3% 明胶或 10% 灭能鸡血清 PBST)
于 37℃ 封闭 2h ,100μL/孔 洗涤液(PBST)洗 3 次 ,加用稀释液
(1% 明胶或 5% 鸡血清 PBST)作 1:10 稀释的被检血清、阳性
血清、阴性血清 ,50μL/孔 ,每份血清加 2 孔 ,37℃ 湿盒感作
45min ,PBST 洗 3 次 ;加用稀释液作 1:6000 稀释的蛋白 G-
HRP 50μL/孔 ,37℃ 湿盒感作 45min ,PBST 洗 4 次 ;加底物液
(TMB) 100μL/孔 ,37℃ 暗盒中显色 30min ,加入终止液(4mol/L
H₂SO₄)50μL/孔 ,于酶标仪 450nm 下测定 OD 值。阳性血清的
平均 OD 值与阴性血清的平均 OD 值之比大于或等于 2 时 ,
可以判定结果。被检血清的平均 OD 值/阴性血清的平均
OD 值 ≥2 为阳性 ,≤1.5 为阴性 ,1.5 ~ 2 之间需重做。

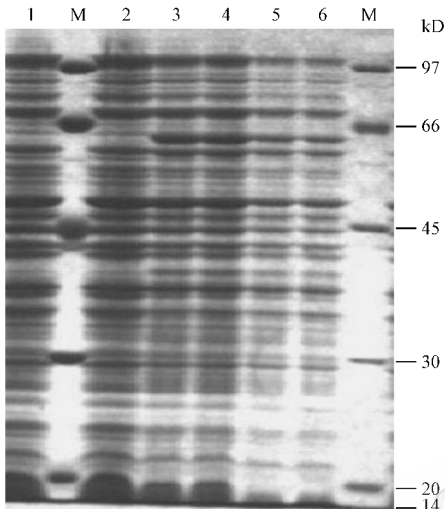


图 5 重组表达质粒 pBAD-VN5 在 *E. coli* LGM194 中
表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of product of pBAD-VN5
expression in *E. coli* LGM194

1 pBAD-VN5 expression in LGM194 ; 2 LGM194 3 ~ 6 pBAD-VN5
induced expression in LGM194 using 0.2% , 0.02% , 0.002% ,
0.0002% , respectively ; M protein molecular weight marker

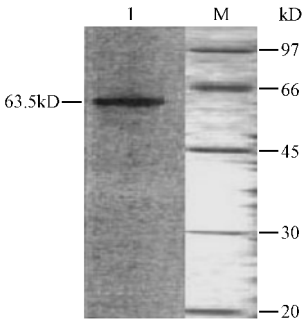


图 6 VSV N 蛋白表达产物的 Western-blot 分析

Fig.6 Western blot of the fusion N protein
expressed in *E. coli* LGM194

M protein molecular weight marker ;

1 pBAD-VN5 induced expression in LGM194

在同样条件下 ,用 VSV 阳性血清、口蹄疫、蓝舌病、鹿流
行性出血热、赤羽病、牛病毒性腹泻-粘膜病阳性血清进行
ELISA 特异性试验 ,如图 8。结果表明 ,表达的重组蛋白只与

VSV-NJ 和 VSV-IN 两个血清型的阳性血清发生特异性反应 ,
不与其它病毒的血清抗体发生反应。应用 ELISA 和微量血
清中和试验对人工感染的豚鼠(VSV-NJ)、山羊(VSV-NJ 和
VSV-IN)血清进行检测比较 ,如表 1。二种检测方法的结果
非常一致 ,敏感性基本相同。从 50mL 经阿拉伯糖诱导的 LB
培养菌液中提取的抗原 ,可包被 40 块 96 孔酶标板 ,抗原的
制备简单、方便和有效。

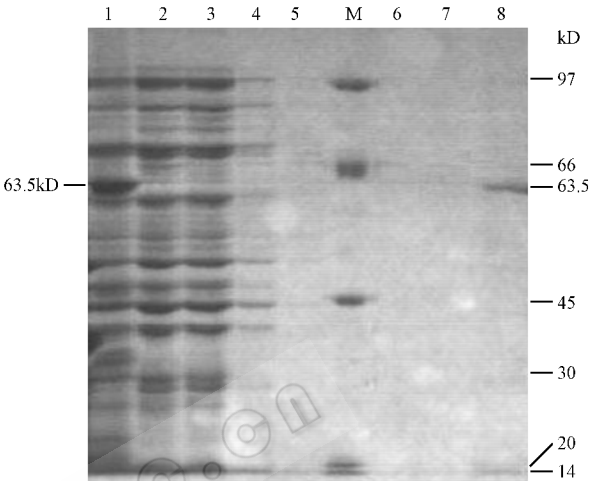


图 7 VSV N 蛋白表达产物 Ni-NTA 纯化的 SDS-PAGE

Fig.7 Purified VSV N recombinant fusion protein
with Ni²⁺ affinity resins

M protein molecular weight marker ; 1 pBAD-VN5 induced expression in
LGM194 ; 2 LGM194 ; 3 pBAD-VN5 expression in LGM194 ; 4 flow-
through ; 5 wash 1 ; 6 eluate 1 ; 7 eluate 2 ; 8 eluate 3

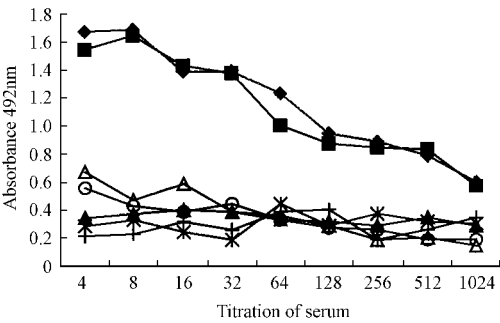


图 8 间接 ELISA 的特异性试验

Fig.8 The specificity assay of ELISA using
recombinant N antigen

—◆— VSV-NJ ; —■— VSV-IN ; —▲— FMD-O ;
—*— BLU-16 ; —|— AK ; —○— BVD ; —△— EHD-1 ;

对 186 份血清作了 ELISA 检测评估 ,其中 43 份为人工感
染豚鼠(VSV-NJ)血清、36 份为山羊(VSV-NJ 和 VSV-IN)血清 ,
均为阳性结果 ;107 份血清为本室保存的参考血清样品 ,2 份
为阳性 ,105 份为阴性 ,与中和试验的结果(73/186 份阳性)相
比 ,符合率为 96%。

表 1 ELISA 试验和微量血清中和试验结果比较
Table 1 Evaluation of serum samples from field origin and infected experimental with VSV-NJ and VSV-IN using ELISA and SN procedures

Serum samples	The highest dilution of serum with positive result		
	ELISA	SN-NJ	SN-IN
GP3-1	NR	NR	NR
GP12-2	128	64	NR
GP7-3	1024	512	NR
GP16-8	1024	512	16
GONJ-0	NR	NR	NR
GONJ-1	NR	16	NR
GONJ-2	64	32	16
GONJ-3	128	64	16
GONJ-4	512	256	32
GONJ-8	512	512	NR
GOIN-0	NR	NR	NR
GOIN-1	NR	NR	32
GOIN-2	32	16	128
GOIN-3	128	16	512
GOIN-4	512	16	1024
GOIN-8	128	16	512

NR negative result

3 讨 论

目前,VS 最常用的诊断方法是病毒中和试验(VN)、补体结合试验(CF)和酶联免疫吸附试验(ELISA)三种方法^[8-10]。VN和CF两种方法较复杂、麻烦、耗时、不安全、需在生物安全三级(P3)实验室内进行,有时产生非特异性反应,对血清样品的质量要求高(如抗补体、细胞毒),应用受到限制^[11-12]。用VSV纯化的完整病毒粒子作为包被抗原建立的ELISA方法,病毒的繁殖和纯化烦琐复杂、成本高,有散毒的危险,也不能区别疫苗免疫和自然感染动物^[13]。从完整VS病毒中提纯G蛋白为抗原进行ELISA,虽提高了试验的安全性,但成本更高,并且在G蛋白纯化过程中难免有其它病毒蛋白的污染,使其在鉴别诊断重组G蛋白疫苗免疫和自然感染动物中造成一些非特异性反应^[14]。应用VSVN蛋白基因重组杆状病毒感染昆虫细胞来表达N蛋白作为抗原,分别建立了ELISA和e-ELISA,但是成本仍然较高^[2,15]。

大多数外源蛋白在大肠杆菌胞内不能正确折叠获得天然空间结构和生物功能,一般以无活性的包涵体形式存在,需先将包涵体溶解后进行重组蛋白复性,这些复杂操作极大地增加了获得高活性纯品的难度和成本^[7]。VSV的核蛋白是病毒颗粒的主要结构蛋白,也具有免疫保护作用^[8,9]。为制备诊断抗原和重组疫苗的研究建立条件,本研究将核蛋白基因片段重组至pBAD/Thio-TOPO载体的arapBAD启动子下游附近,构建了高效表达核蛋白的重组表达质粒载体。该硫氧还蛋白融合蛋白表达系统表达的目的蛋白与天然产物在构象及生物活性等方面没有区别,融合蛋白以可溶形式存在于细胞间质中,可通过蔗糖快速休克渗透压冲击法而有选择地释放,从而大大简化纯化程序,避免了包涵体处理这一棘手问题^[7]。本研究融合蛋白以可溶性形式存在的比例约占被

表达蛋白的57%左右,与细菌培养的条件如温度、时间等密切相关。用不同浓度的阿拉伯糖在同样条件下进行诱导表达,用SDS-PAGE和Western blot证实,表达的融合蛋白和原病毒核蛋白的质量分别为63.5kD和47.5kD左右。阿拉伯糖的最佳浓度为0.02%。经转印后,与相应的抗血清发生特异性反应而显色。有报道认为,融合蛋白也能识别其中的非目的蛋白部分,可能会导致抗体与融合蛋白中的非目的部分发生交叉反应而影响检测结果,因而应将多克隆抗体中能识别非目的蛋白的部分去除^[16],本试验没有发现上述情况。用表达产物作为抗原进行间接ELISA检测该病毒抗血清以及其它相似病毒抗血清,结果表明,表达产物均能与该病毒的所有血清型抗血清发生良好反应,而与其它相似病毒抗血清不能发生反应,说明表达产物为该病毒的特异性核蛋白。

用粗提和纯化的表达重组抗原进行ELISA,均可获得满意的结果,但Ni-NTA亲和层析纯化后重组核蛋白作包被抗原,可降低一些本底反应。表达产物包被的酶标板在4℃可以存放2个月,在-20℃可保存6个月以上。用10%鸡血清或3%明胶作封闭液,以1:5000的HRP-protein-G可获得良好效果。在对人工感染VSV-NJ和VSV-IN阳性血清检测中发现,没有产生干扰和降低敏感性的现象,VSV-NJ和VSV-IN两型间发生交叉反应,用VSV-NJ的核蛋白表达抗原可检测两型的抗血清。由于中和抗体是针对VSV表面的糖蛋白(G蛋白),VSV-NJ和VSV-ING蛋白变异较大,氨基酸同源性较低,中和试验具有型特异性。而核蛋白较保守,其诱导的抗体为非中和抗体,可用ELISA检测出来,ELISA具有群特异性。因此,在需要作定型时,ELISA方法还不能取代中和试验。但是,ELISA具有快速、安全和简单等特点。因此,本试验生产的重组核蛋白抗原可以代替完整病毒作为ELISA检测用的标准抗原,这为用ELISA快速检测大规模的血清样品以诊断和监测此病打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Rodriguez LL. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. *Virus Res* 2002, **85**(2):211-219

[2] Katz JB, Shafer AL, Eernisse KA. Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. *J Virol Methods*, 1995, **54**(2~3):145-157

[3] Llewellyn ZN, Ou X, Chang GJ *et al.* Genetic analysis of vesicular stomatitis virus-New Jersey from the 1995 outbreak in the western United States. *Am J Vet Res*, 2000, **61**(11):1358-1363

[4] Alvarado JF, Dolz G, Herrero MV *et al.* Comparison of the serum neutralization test and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to vesicular stomatitis virus New Jersey and vesicular stomatitis virus Indiana. *J Vet Diagn Invest*, 2002, **14**(3):240-242

[5] Green TJ, Macpherson S, Qiu S *et al.* Study of the assembly of vesicular stomatitis virus N protein: role of the P protein. *J Virol*, 2000, **74**(20):9515-9524

[6] Hua QY(花群义), Jin NY(金宁一), Xu ZX(徐自忠) *et al.* Cloning and Sequence Analysis of N gene encoding vesicular stomatitis

- [7] Maniatis T ,Frisch EF ,Sambrook MD. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor , New York. 1989
- [8] Huang SC ,Pan Z ,Kurien BT *et al.* Immunization with vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein induces autoantibodies to the 60 kD Ro ribonucleoprotein particle. *J Invest Med* ,1995 **43**(2): 151 – 158
- [9] Takacs AM ,Banerjee AK. Efficient interaction of the vesicular stomatitis virus P protein with the L protein or the N protein in cells expressing the recombinant proteins. *Virology* ,1995 **208**(2):821 – 826
- [10] Charan S ,Hengartner H ,Zinkernagel RM. Antibodies against the two serotypes of vesicular stomatitis virus measured by enzyme-linked immunosorbent assay : immunodominance of serotype-specific determinants and induction of asymmetrically cross-reactive antibodies. *J Virol* ,1987 **61**(8) :2509 – 2514
- [11] Alonso A ,Martins MA ,Gomes MP *et al.* Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection , typing , and subtyping of vesicular stomatitis virus. *J Vet Diagn Invest* ,1991 , **3**(4) :287 – 292
- [12] Workman T ,Shen D ,Woodard L *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to vesicular stomatitis virus. *Am J Vet Res* ,1986 **47**(7) :1507 – 1512
- [13] Hernandez DA ,Salman MD ,Webb PA *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to vesicular stomatitis virus in cattle in an enzootic region of Mexico. *Am J Vet Res* ,1992 **53**(4) :440 – 443
- [14] Afshar A ,Dulac GC ,Wright PF *et al.* Application of indirect ELISA for detection of bovine antibodies against vesicular stomatitis viruses. *J Vet Diagn Invest* ,1993 **5**(1) :26 – 32
- [15] Afshar A ,Shakarchi NH ,Dulac GC. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine , ovine , porcine and equine antibodies to vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol* ,1993 **31**(7) :1860 – 1865
- [16] Guzman LM ,Belin D ,Carson MJ *et al.* Tight regulation , modulation and high-level expression by vectors containing the Arabinose PQAD promoter. *J Bacteriol* ,1995 **177** :4121 – 4130

Expressing of N Gene Encoding Nucleocapsid Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Elementary Application in ELISA

HUA Qun-Yi^{1*} JIN Ning-Yi² XU Zi-Zhong¹ YANG Yun-Qing¹

DONG-Jun¹ YANG Jing-Yan¹ ZHOU Xiao-Li¹

¹(Technology Center of Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Kunming 650228 ,China)

²(Military Veterinary Institute , Quartermaster University of PLA , Changchun 130062 ,China)

Abstract The gene encoding the nucleocapsid (N) protein of vesicular stomatitis virus (VSV-NJ) was subcloned from pMD-VN5 , and inserted into pBAD/Thio TOPO vector. The recombinant plasmid was identified by restriction analysis and PCR. It was sequenced to confirm the correct sequences and the correct junctional orientations of the inserted N gene. The results of SDS-PAGE and Western immunoblotting revealed that the N protein was expressed in *Escherichia coli* LGM194 in a high level and the recombinant fusion protein , which contained a N-terminal HP-Thioredoxin and a C-terminal polyhistidine tag. It had a molecular mass of approximately 63.5 kD and immunologically reactive activity. The recombinant protein was characterized and tested in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format for potential application in the serodiagnosis of vesicular stomatitis using 186 serum samples from experimentally infected goats and guinea-pigs with VSV-NJ and VSV-IN , and from field origin and reference serum samples. The sensitivity and specificity of the ELISA were compared with those of the standard microtiter serum neutralization (MTSN) tests. The ELISA and MTSN test results were highly correlated for detection of VSV antibodies. The ELISA was as sensitive as the SN assay in detecting positive serum to VSV. The correlation between SN titers and ELISA titers was statistically significant. These data suggest that the recombinant fusion N protein of VSV could be used as a recombinant test antigen for the serodiagnosis of vesicular stomatitis. The ELISA based on the recombinant nucleocapsid protein may offer the best combination of rapidity , sensitivity , simplicity , economy , and laboratory biosafety of any of the methods yet developed for VSV serodiagnosis. This study lay on foundation for the development of the diagnosis methods in serology for VSV.

Key words vesicular stomatitis virus , nucleocapsid (N) protein gene , expression , ELISA

Received : 07-14-2003

This work was supported by the Tenth Five-year Key Program of the State Science and Technology (No. 2001BA804A22) and the Grant from Natural Science Foundation of Yunnan Province (No. 2002C0072M).

* Corresponding author. Tel 86-871-4613797 ; Fax 86-871-4615987 ; E-mail : ziqhua@yahoo.com.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>