

山羊地方性鼻内肿瘤 CA 蛋白表达及多克隆抗体制备

张斌¹ 尚佑军^{2*}

1 甘肃省定西市漳县畜牧兽医服务中心

2 中国农业科学院兰州兽医研究所动物疫病防控全国重点实验室

DOI:10.32629/as.v9i5.3992

[摘要] 山羊地方性鼻内肿瘤(enzootic nasal adenocarcinoma, ENA)是由山羊地方性鼻内肿瘤病毒(enzootic nasal tumor virus of goats,ENTV-2)所引起的一种传染性肿瘤。其在全球范围内广泛存在,对山羊产业造成严重的经济损失。为获得山羊地方性鼻内肿瘤病毒衣壳蛋白(Capsid protein,CA)及抗CA蛋白的多克隆抗体,本研究根据GenBank中公布的CA基因序列化学合成CA基因,并连接至pET-30a(+)质粒载体中,构建pET-30a-CA重组原核表达质粒,经测序验证正确后转化大肠杆菌BL21株进行诱导表达,在成功表达重组蛋白后,使用His-tag亲和层析法纯化蛋白。以纯化的CA重组蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。使用ELISA方法检测其抗体效价,用Western blot验证多抗的特异性。结果表明,成功在原核表达系统中表达纯化了CA重组蛋白,原核表达纯化的CA蛋白能够与兔抗CA蛋白多克隆抗体特异性结合。表达的CA蛋白有较好的抗原性,为制备ENTV-2特异性单克隆抗体及建立血清学方法奠定了基础。

[关键词] 山羊地方性鼻内肿瘤; 衣壳蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; ELISA检测; Western blot验证
中图分类号: Q51 **文献标识码:** A

Cap Protein Expression of Goat Enzootic Nasal Adenocarcinoma and Preparation of Polyclonal Antibodies

Bin Zhang¹ Youjun Shang^{2*}

1 National Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences

2 Animal Husbandry and Veterinary Service Center of Zhangxian County, Dingxi City, Gansu Province

[Abstract] Goat enzootic nasal adenocarcinoma (ENA) is a contagious neoplastic disease caused by enzootic nasal tumor virus of goats (ENTV-2). It is widely distributed worldwide and causes significant economic losses to the goat industry. To obtain the capsid protein (CA) of ENTV-2 and polyclonal antibodies against the CA protein, this study chemically synthesized the CA gene based on the sequence published in GenBank and ligated it into the pET-30a(+) plasmid vector. The recombinant prokaryotic expression plasmid pET-30a-CA was constructed and verified by sequencing before being transformed into Escherichia coli BL21 for induced expression. After successful expression of the recombinant protein, the protein was purified using His-tag affinity chromatography. The purified CA recombinant protein was used as an antigen to immunize New Zealand white rabbits for the preparation of polyclonal antibodies. The antibody titer was detected by ELISA, and the specificity of the polyclonal antibodies was verified by Western blot. The results showed that the CA recombinant protein was successfully expressed and purified in the prokaryotic expression system, and the prokaryotically expressed and purified CA protein could specifically bind to rabbit anti-CA polyclonal antibodies. The expressed CA protein exhibited good antigenicity, laying a foundation for the preparation of ENTV-2-specific monoclonal antibodies and the establishment of serological detection methods.

[Key words] Goat enzootic nasal adenocarcinoma; Capsid protein; Prokaryotic expression; Polyclonal antibodies; ELISA detection; Western blot validation

引言

山羊地方性鼻内肿瘤(enzootic nasaladenocarcinoma, ENA)是由山羊地方性鼻内肿瘤病毒(enzootic nasal tumor virus of goats, ENTV-2)引起的一种慢性、进行性、接触性传染病^[1]。临床表现出浆液性鼻液,呼吸困难,体重减轻,因肿瘤组织的增生使得山羊面部甚至颅骨变形及穿孔,眼球突出,剖检可见鼻腔内单侧或两侧类似菜花状肿瘤^[2,3]。该病发病率为1%~5%,死亡率为100%,潜伏期长,自然感染动物的潜伏期从数月数年不等^[4,5]。发病初期无临床症状很难诊断,因此对山羊产业造成严重威胁。^[6-8]

ENTV-2病毒粒子呈圆形,直径大约100 nm。病毒可以分为三层结构,最外层是囊膜,表面有大量纤突,直径约9nm;中层为核衣壳,由核糖核酸和衣壳蛋白质构成,形状为正二十面体;最内层为核酸芯髓(约47 nm),主要是基因组核蛋白复合物^[9]。ENTV-2属于 β 反转录病毒属,为线性单股正链RNA病毒,基因组大小约7500 bp,其结构类似于真核细胞内的mRNA^[5],5端为甲基化的帽结构、3端为多聚A,基因组的两端为非编码区,中间编码区由一个相互重叠的Gag、Pro、Pol和Env组成^[6,10]。Gag基因位全长1839 nt,编码的多肽由612个氨基酸残基组成,分子质量预测为69 kDa。Gag编码的多肽一般在病毒合成的蛋白酶的作用下,才能水解并加工成为几种成熟的蛋白:基质蛋白(Matrix proteins, MA)、衣壳蛋白(Capsid protein, CA)和核衣壳蛋白(Nuclear capsid protein, NC)。CA氨基酸序列保守,抗原性强^[9,11,12],根据氨基酸序列预测CA蛋白的分子质量为24 kDa。因此,深入研究CA蛋白对了解ENTV的感染和致瘤机制以及建立诊断方法具有重要意义。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

摇床、离心机、恒温金属浴锅、培养皿、层析柱、SDS-PAGE电泳仪、酶标仪、移液器、一次性加样槽、超净工作台、涡旋振荡器、超声波细胞破碎仪、ELISA 96孔板、水平摇床。

1.2 实验方法

细菌培养、SDS-PAGE电泳、间接ELISA、Western blot。

2 实验操作

2.1 质粒构建

根据Gen Bank中公布的CA基因序列,交由上海生工生物有限公司化学合成CA基因,并连接至pET-30a(+)质粒载体中,构建出pET-30a-CA重组原核表达质粒。

2.2 质粒转接

首先将2.1获得的pET-30a-CA重组原核表达质粒在无菌条件下加入到大肠杆菌BL21株感受态细胞内,在冰上冰浴30min,将冰浴结束的感受态细胞放置42℃的恒温金属浴锅中温浴90s,再次放在冰上冰浴2min。其次在无菌条件下,加入无抗的LB培养液,放置37℃、220r/min摇床培养1h。然后在无菌条件下,将培养好的菌液接种到固态的LB培养基上培养过夜。最后在无菌条件下,挑出单菌落,加入含卡拉霉素的LB培养液中扩大培养。

2.3 重组蛋白表达

将扩大培养的菌液使用控制变量法优化蛋白原核表达的诱导表达的时间和IPTG浓度,获得最佳表达条件,再将最优条件表达的菌液进行超声裂解菌体。离心获取的上清和沉淀,通过SDS-PAGE实验分析表达情况,确定目标蛋白的表达量和可溶性。

2.4 重组蛋白纯化

蛋白纯化采用His-tag亲和层析法。首先将2.3离心收集上清加入镍柱中,在冰浴的条件下,让其充分结合2h,然后用不同浓度咪唑的洗脱液进行洗涤,并收集洗脱液。通过SDS-PAGE电泳分析目的蛋白能在多少浓度咪唑的洗脱液中纯化出来。最后用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。

2.5 多克隆抗体制备

将纯化后的重组CA蛋白按照1:1的比例与弗氏完全佐剂进行乳化,接种到新西兰大白兔背部及臀部皮下,间隔10天后,再将该后的重组CA蛋白与弗氏不完全佐剂进行乳化,进行二次接种,连续接种3次。采集血清检测抗体。

2.6 多克隆抗体效价鉴定

多克隆抗体效价的鉴定采用间接ELISA的方法鉴定。将纯化后的重组CA蛋白稀释成100ng/100ml加入一次性96孔板中在4℃的条件下进行过夜包被。包被结束后用PBST洗涤3次,再加入封闭液在37℃的条件下封闭1h。封闭结束后继续用PBST洗涤3次。将采集的兔血清倍比稀释8个梯度,每个梯度做3个重复,加入检测板中在37℃的条件下反应0.5h。反应结束后,用PBST洗涤3次加入酶标二抗(山羊抗兔IgG)继续在37℃的条件下反应0.5h。反应结束后,用PBST洗涤3次加入底物在37℃的条件下进行显色10min。最后加入终止液读取OD₄₅₀值。

2.7 多克隆抗体特异性鉴定

多克隆抗体特异性的鉴定采用Western blot的方法鉴定。将纯化的重组CA蛋白进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后,先将PVDF膜在甲醇下激活1min,随后按顺序组装好“三明治”结构,放置在电转膜仪上4℃、100V转膜1h。转膜完成后,把PVDF膜置于5%的脱脂奶粉封闭液中,在室温摇床上封闭2h。封闭完成后,再用TBST对PVDF膜洗涤3次,每次洗涤10min。以制备的兔抗CA蛋白多克隆抗体作为一抗,在4℃摇床上,孵育PVDF膜过夜。一抗孵育结束,再次用TBST洗涤PVDF膜3次。之后用山羊抗兔IgG作为二抗,在室温摇床上,孵育PVDF膜2h。二抗孵育完毕,用TBST洗涤PVDF膜3次。最后用ECL显色液均匀覆盖PVDF膜显色1min,放置在ECL显影仪上进行曝光拍照。

3 实验结果

3.1 质粒转接

将上海生工生物有限公司构建的pET-30a-CA质粒,通过热激发转接到大肠杆菌BL21株感受态细胞中,获得重组CA蛋白菌液。

3.2 CA蛋白表达

将获得重组CA蛋白菌液分别在浓度为0.1mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L的IPTG条件下

诱导表达中, 4h后收集1ml菌液, 通过SDS-PAGE电泳, 结果得出0.1mmol/L IPTG诱导表达量最高(图1)。然后在0.1mmol/L IPTG诱导浓度下, 诱导4h、6h、8h以及过夜收集1ml菌液, 通过SDS-PAGE电泳, 结果得出6h诱导表达量最高(图2)。将1ml 0.1mmol/L IPTG、6h诱导的菌液进行超声破碎, 收集上清和沉淀, 通过SDS-PAGE电泳, 分析得出重组CA蛋白主要在上清中表达(图3)。

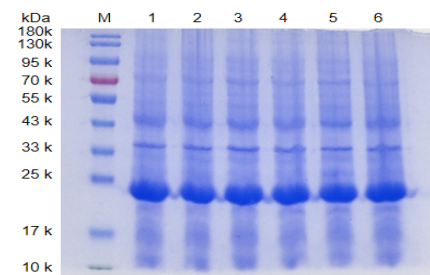


图1、不同IPTG诱导浓度对CA蛋白诱导的影响
M: 广谱蛋白Marker 1-6分别用浓度为0.1mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L的IPTG诱导表达

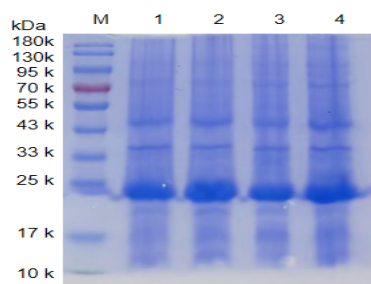


图2、不同诱导时间对CA蛋白诱导的影响
M: 广谱蛋白Marker 1: 4h诱导 2: 6小时诱导 3: 8小时诱导 4: 过夜诱导

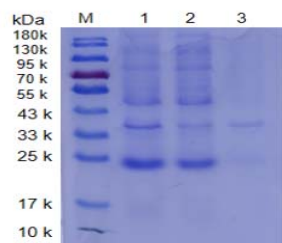


图3、CA重组蛋白表达形式分析
M: 广谱蛋白Marker 1: 诱导后的CA菌液上清 2: 诱导后的CA菌体破碎上清 3: 诱导后的CA菌体破碎沉淀

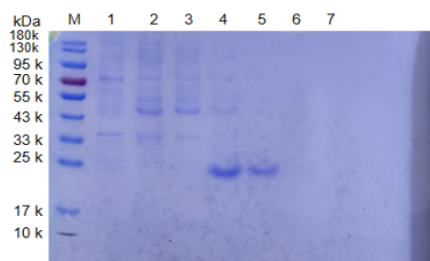


图4、CA蛋白纯化图
M: 广谱蛋白Marker 1: 流穿液 2: 洗杂液 3: 用20mmol/L咪唑洗脱液洗脱结果 4: 用50mmol/L咪唑洗脱液洗脱结果 5: 用100mmol/L咪唑洗脱液洗脱结果 6: 用200mmol/L咪唑洗脱液洗脱结果 7: 用500mmol/L咪唑洗脱液洗脱结果

3.3 CA蛋白纯化

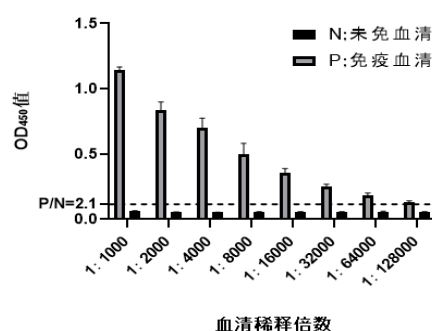
将收集的超声上清液加入层析柱中, 在冰浴的条件下让His

标签充分与填料结合2h, 之后进行流穿、流穿结束后用洗杂液进行洗杂, 洗杂结束后用20mmol/L、50mmol/L、100mmol/L、200mmol/L、500mmol/L咪唑的洗脱液进行洗脱并收集流穿液、洗杂液及洗脱液, 进行SDS-PAGE电泳, 结果得出在50mmol/L咪唑洗脱液与100mmol/L咪唑洗脱液中洗脱出目的蛋白(图4)。将目的蛋白用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行浓度检测, 测出CA蛋白浓度为0.4mg/ml。

3.4 多克隆抗体的制备

对接种完3次乳化重组CA蛋白的新西兰大白兔进行采集血清, 得到兔抗CA蛋白多克隆抗体血清。

图5 多克隆抗体血清效价分析图



血清稀释倍数

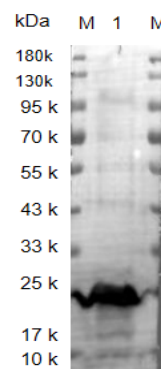


图6、多克隆抗体Western blot试验分析结果
M: 广谱蛋白Marker 1: 重组CA蛋白与多克隆抗体结果

3.5 多克隆抗体效价的测定

将未接种CA蛋白前采集的血清作为阴性对照和采集的兔抗CA蛋白多克隆抗体血清倍比稀释至1:128 000. 加入到重组CA蛋白包被的一次性96孔检测板中, 用酶标仪测定抗体效价。结果显示其制备的兔抗CA蛋白多克隆抗体在稀释到1:128 000倍时, P/N值>2.1(图5), 得出兔抗CA蛋白多克隆抗体的效价高。

3.6 多克隆抗体特异性的测定

Western blot试验分析结果显示, 出现大小为24 kDa的条带(图6), 兔抗CA蛋白的多克隆抗体能与重组CA蛋白发生特异性反应, 表明制备的多克隆抗体特异性良好。

4 讨论

ENT发病特征是山羊鼻道筛骨上皮细胞发生肿瘤性转化, 该病一年四季均可发生, 多呈散发, 潜伏期长, 致死率高, 养殖场一旦出现将会长期危害羊群, 使该病在防控层面受到极大的挑战

[3,7,8]。除了澳大利亚和新西兰以外,大部分国家均有该病的报道,近年来,我国陕西、安徽、四川、重庆、福建、广西、广东和内蒙古等多地报道该病存在,严重影响了我国山羊产业的健康发展^[6,13,14]。从2006在湖南某羊场ENT发生并呈地方流行性^[15];2011年四川某山羊养殖基地发生该病,确诊为山羊地方性ENT,并首次报道了ENT的病原^[16];2013年1月至7月四川省攀枝花市某羊场发生ENT^[17]。山羊地方性ENT具有明显的接触传染性,且发病者多数为成年羊。由于该病毒无法体外培养,限制了ENTV-2致病分子机理和免疫特性方面的研究。^[18]目前,针对此病暂时还没有有效的药物和疫苗来控制其发生和流行,羊群一旦出现该病,难以清除,只能淘汰并且会造成长期危害^[19]。

因此,本次研究通过用不同浓度IPTG诱导剂在不同时间的条件下诱导原核表达质粒pET-30a-CA后得到重组CA蛋白,进行可溶性分析后发现重组CA蛋白以上清的形式表达。将纯化后的重组CA蛋白免疫接种新西兰大白兔后,获得兔抗CA蛋白多克隆抗体。经过间接ELISA方法测定兔抗CA多克隆抗体在稀释到1:128 000倍时,P/N值>2.1,表明兔抗CA蛋白多克隆抗体效价很高。经Western blot验证,兔抗CA蛋白多克隆抗体可与重组CA蛋白结合,表明具有较好的特异性。由此得出CA蛋白有较好的抗原性,为进一步研究制备ENTV-2特异性单克隆抗体及建立血清学方法奠定了基础。

[参考文献]

[1] M D L H, A O, C C, et al. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats[J]. Current topics in microbiology and immunology, 2003, 275: 201-23.

[2] YAPENG H, QI Z, JING W, et al. Full-length genome sequence analysis of enzootic nasal tumor virus isolated from goats in China[J]. Virology journal, 2017, 14(1): 141.

[3] SANTANA D C B, PAULA L M, CLEBER H L, et al. Detection of enzootic nasal tumor virus (ENTV) in a sheep flock in southern Brazil[J]. Tropical animal health and production, 2019, 51(7): 2095-8.

[4] MAHER S N, GAMAL Y S, BOTTROS Y C R, et al. Molecular detection of mixed infection with peste des petits ruminants and retroviruses in Egyptian sheep and goats[J]. Tropical animal health and production, 2023, 55(2): 102-104.

[5] 江锦秀, 林裕胜, 张靖鹏, et al. 山羊地方性鼻内肿瘤病毒ENTV-2FJ株的分离纯化和全基因组序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(02): 313-24.

[6] 李鹏飞, 高桂琴, 周广青. 山羊地方性鼻内肿瘤病毒

TaqMan荧光定量RT-PCR检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(05): 2259-66.

[7] 林曦, 郝先谱, 赵振华等. 山羊鼻内腺瘤和腺癌的病理学研究[J]. 畜牧兽医学报, 1995, (05): 456-61.

[8] 张国俊, 冯迎春, 颜其贵. 山羊和绵羊地方性鼻内腺瘤研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(11): 101-4.

[9] 何亚鹏. 山羊地方性鼻内肿瘤病毒陕西株序列分析及Gag和Su蛋白多克隆抗体的制备[D], 2017.

[10] WALSHSR, GERPEMCR, WOOTTONSK. Construction of a molecular clone of ovine enzootic nasal tumor virus[J]. Virology Journal, 2016, 13(1).

[11] 付胜. 山羊地方性鼻内肿瘤的病理学研究及其病原全基因组序列分析[D], 2023.

[12] 冯迎春, 颜其贵, 郭万柱. 山羊地方性鼻内肿瘤病毒ENTV-SC株基因组cDNA文库的构建及生物信息学分析[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(02): 126-30.

[13] 侯宏艳, 朱德建, 张丹俊. 山羊地方性鼻内肿瘤病毒gag基因克隆及分析[J]. 中国草食动物科学, 2018, 38(02): 53-5.

[14] LIY, NIUJ, LIU Y. Genomic Sequencing and Analysis of Enzootic Nasal Tumor Virus Type 2 Provides Evidence for Recombination within the Prevalent Chinese Strains[J]. Veterinary Sciences, 2024, 11(6).

[15] 雷红宇, 苏建明, 宁玲忠. 一起山羊地方性鼻内肿瘤的调查与诊断[J]. 动物医学进展, 2006, (02): 112-4.

[16] 刘菲, 冯迎春, 颜其贵. 四川一起山羊地方性鼻内肿瘤疫情的诊断[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(06): 83-6.

[17] 余远迪, 韦雷飞, 黄秀君. 4例山羊鼻内肿瘤的诊断[J]. 动物医学进展, 2014, 35(04): 129-31.

[18] LIP, YIN H, CAO X, et al. Development and Application of a TaqMan-Based qPCR Assay for Detecting ENTV-2 in Goats[J]. Genes, 2025, 16(5).

[19] ZHAI S-L, LV D-H, XU Z-H, et al. A Novel Enzootic Nasal Tumor Virus Circulating in Goats from Southern China[J]. Virus es, 2019, 11(10): 956.

作者简介:

张斌(1993--), 男, 汉族, 甘肃漳县人, 兽医师, 从事动物疫病防控工作。

*通讯作者:

尚佑军(1971--), 男, 汉族, 甘肃舟曲人, 研究员, 主要从事动物疫病诊断与免疫防治技术研究。