

类圆环病毒因子 P1 结构蛋白表位肽抗体的制备及应用

温立斌¹, 何孔旺¹, 杨汉春², 刘梦雅³

(1. 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 3. 香港中文大学)

摘要: 旨在制备兔抗类猪圆环病毒因子 P1 的特异性抗体, 对其在病原学方面的应用进行研究。采用人工合成选定的表位肽, 将其与载体蛋白 KLH 偶联后免疫新西兰大白兔制备抗 P1 多克隆抗体, 通过免疫组化对该多抗与 P1 的反应性进行检测。获得了抗 P1 多克隆抗体; 免疫组化结果显示抗体可与 P1 病毒蛋白出现特异性反应。偶联后的 P1 表位肽具有免疫原性, 可用于制备相应的抗体; 制备的抗体特异性良好, 可用于 P1 病原学方面的研究。

关键词: P1; 合成肽; 多克隆抗体

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0083-04

Preparation and Application of Peptide Antibody against Porcine Circovirus-like Agent P1

WEN Li-bin¹, HE Kong-wang¹, YANG Han-chun², LIU Meng-ya³

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Jiangsu 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Chinese University of Hong Kong, China)

Abstract: To generate and investigate rabbit polyclonal antibody against porcine circovirus-like agent P1. The certain epitope peptides were chosen and synthesized, and then coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) to increase antigenicity. New Zealand White Rabbits were immunized with KLH conjugated peptides. The polyclonal antibodies elicited were characterized by ELISA and tested by immunohistochemical techniques in etiological diagnosis of P1. The polyclonal antibodies against porcine circovirus-like agent P1 were generated successfully. Immunohistochemistry showed the antibodies could specifically react with P1 proteins. The synthesized aim peptides can be used to immunized rabbit in order to generate polyclonal antibodies against porcine circovirus-like agent P1. The antibodies prepared can be used as potential tools to study etiological diagnosis of P1.

Key words: P1; Synthesized peptides; Polyclonal antibody

猪圆环病毒 (PCV) 属于圆环病毒科成员, 基因组为单股、环状 DNA。根据致病性、抗原性及核苷酸序列的差异, PCV 被划分成了无致病性的 PCV1 和有致病性的 PCV2 两个基因型^[1, 2]。PCV 是迄今发现的一种最小的动物病毒, 是一种重要的病原微生物, 许多疾病都与 PCV2 相关, 其中临床最常见、危害最严重的是猪断奶后多系统衰竭综合征 (PM-

WS), 该病于 1991 年首发于加拿大, 随后世界其他地方陆续报道。其主要发生于 5~12 周龄的断奶仔猪, 主要表现为进行性消瘦、皮肤苍白、呼吸困难等症状, 猪群的死亡率增加, 体表淋巴结, 特别是腹股沟浅淋巴结肿大^[3]。目前, PMWS 已成为危害我国乃至世界养猪生产的重要免疫抑制性疫病之一^[4, 5]。我们在临床送检的疑似 PMWS 的样品中,

收稿日期: 2011-07-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30972184); 江苏省自然科学基金 (BK2008351)

作者简介: 温立斌 (1967-), 男, 河北宣化人, 副研究员, 博士, 主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

不仅诊断证实 PCV2 具有多种基因型^[6];而且从患 PMWS 的猪血清中还分离到一株类 PCV2 因子(暂定为 P1)与 PCV2 相似,P1 也具有环状 DNA 基因组,但全长仅 648 个核苷酸,除 5'端的部分核苷酸外,其他与 PCV2 相应的核苷酸具有很高的同源性。随后,研究发现构建的 P1 基因组的双拷贝串联分子克隆在体外具有感染性,不仅可在转染的 PK15 细胞中形成胞浆和胞核包涵体,还可导致转染细胞凋亡;用长梅猪和广西巴马小型猪等建立的动物模型结果表明,P1 感染猪在临床上出现类似 PMWS 症状,即部分感染猪出现消瘦和贫血等现象,此外感染猪免疫器官细胞发生凋亡^[7-12]。因此,P1 有可能成为危害我国养猪业健康发展的又一潜在疾病的病原,它的出现和感染对重新认识传统的圆环病毒以及诊断、防制等都带来了新的挑战。

本研究通过人工合成的先期预测的 P1 表位肽,与载体蛋白偶联后免疫兔,用以制备高特异性抗 P1 的多克隆抗体,并应用于免疫组化试验中,对 P1 病原进行了研究。

1 材料和方法

1.1 分子克隆和细胞

P1 双拷贝串联的 pSK 分子克隆由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室构建、保存。无 PCV1、PCV2、支原体和反转录病毒污染的 PK-15 细胞由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室传代、保存。

1.2 试验动物

新西兰大白兔购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场。

1.3 其他主要试剂

匙孔血蓝蛋白(KLH) Sigma 产品;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂为 Giffico 产品;LipofectamineTM 2000 转染试剂为 Invitrogen 产品;SABC-AP 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 类猪圆环病毒因子 P1 抗原表位的分析

采用生物信息软件和互联网服务器,通过推断的结构蛋白 VP2 序列,根据对其亲水性、可塑性、可及性及抗原性等多参数预测的结果,本研究拟用 80~92 位 13 个氨基酸,即 SPNPSPTTPVTSH,作为欲合成的多肽序列。具体预测过程参见文献[13]。

1.5 多肽的合成及偶联

预测的 P1 表位肽由南京金斯瑞生物科技有限公司采用标准的逐步固相合成程序合成,获得的合成肽经常规 HPLC 柱纯化,纯度为 85%。然后采用

戊二醛连接法与载体蛋白 KLH 偶联。

1.6 兔抗 P1 合成肽抗体的制备

选取约 6 周龄雄性健康新西兰白兔 2 只作为免疫动物,体重约 2 kg。共进行 4 次免疫,即初次免疫和 3 次加强免疫。初次免疫,取 0.5 mg 多肽-KLH 偶联物,经弗氏完全佐剂充分乳化后,于兔背部皮下多点注射。2 周后第一次加强免疫,免疫原用不完全福氏佐剂充分乳化,剂量、途径同前;以后每隔 3 周加强免疫 1 次。免疫前、第 2 次加强免疫后 2 周以及第 3 次加强免疫后 2 周,每只兔子耳静脉分别采血,检测抗体效价,符合要求后心脏采血,分离血清,无菌分装,-80℃保存。用常规间接 ELISA 法测定分离血清效价,包被抗原为合成肽,450 nm 波长下测定,血清抗体效价为 S/N≥2.1 的血清最高稀释度。

1.7 转染

将 PK-15 细胞传代入 24 孔细胞培养板,待细胞密度达到 85% 细胞融合时,用无血清的 OPTI-MEM I Medium 漂洗,然后加入用 OPTI-MEM I Medium 稀释的 P1 DNA 分子克隆(0.8 μg/孔)和 LipofectamineTM 2000 脂质体复合物。在 CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 5 h 后,更换 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 营养液,继续培养 72 h 用于观察和检测,同时设未转染和转染空载体的 PK-15 细胞作为对照。

1.8 免疫组化染色

按生产厂商提供的使用说明进行,大体步骤如下:用 PBS 洗涤细胞 2 次后,加入 4% 多聚甲醛固定 60 min;PBS 洗涤后,加入 3% 冰乙酸室温浸泡 20 min,以灭活内源性酶。蒸馏水洗涤 2 次,滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,弃液体,滴加适当稀释的兔抗 P1 合成肽抗体,37℃ 孵育 2 h 后,用 0.01 mol/L TBS 洗涤 3 次,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 20 min,用 0.01 mol/L TBS 洗涤 3 次,滴加试剂 SABC-AP,37℃ 20 min,用 0.01 mol/L TBS 洗涤 5 次,用 0.01 mol/L TBS 稀释的 BCIP/NBT 显色 10~30 min;自来水充分冲洗,镜检。

2 结果与分析

2.1 免疫表位肽-KLH 后抗体的效价

从表 1 检测结果可知,免疫前两只兔子的抗 P1 表位肽抗体效价皆小于 1:1 000(对照 A_{450nm} 为 0.071);随着免疫次数的增加,抗体效价不断升高,从第 2 次和第 3 次加强免疫(也就是第 3 次和第 4 次免疫)后 2 周的抗体效价来看,两只兔子的抗 P1 抗体效价都达到了 1:512 000 以上,说明合成的表

位肽具有良好的免疫原性。

表 1 ELISA 检测表位肽免疫效果

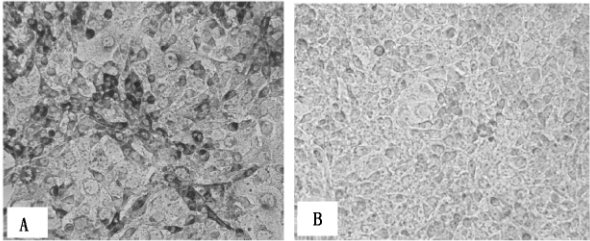
Tab. 1 Antibody titer produced by epitope peptide by ELISA

血清稀释度 Dilution	初免前 Pre-immunization Serum absorbance		第 3 次免疫后 Antiserum absorbance after 3rd immunization		第 4 次免疫后 Antiserum absorbance after 4th immunization	
	兔 A	兔 B	兔 A	兔 B	兔 A	兔 B
1:1 000	0.068	0.096	2.604	2.801	3.077	3.274
1:2 000	0.065	0.093	2.624	2.848	2.865	2.891
1:4 000	0.062	0.090	2.516	2.794	2.706	2.754
1:8 000	0.059	0.087	2.155	2.631	2.375	2.469
1:16 000	0.067	0.095	1.544	2.292	2.210	1.963
1:32 000	0.056	0.084	1.311	1.981	1.728	2.155
1:64 000	0.053	0.081	0.680	1.398	1.032	1.602
1:128 000	0.050	0.078	0.414	1.001	0.606	1.136
1:256 000	0.047	0.075	0.246	0.558	0.401	0.750
1:512 000	0.044	0.072	0.163	0.388	0.273	0.485

2.2 免疫组化检测结果

用 P1 双拷贝串联分子克隆转染 PK-15 后,用制备的 P1 表位肽抗体进行免疫组化试验的结果表明,抗体能与 P1 蛋白发生特异性反应,表现为在转染 P1 分子克隆的细胞中出现呈色反应,多数在细胞浆,少数在细胞核可出现蓝紫色阳性反应,而在转染空载体或空细胞对照的细胞中未出现颜色反应(图 1)。

此外,研究表明将表位肽抗体稀释 40 倍,进行免疫组化试验效果较好,此时阳性细胞染色与背景着色反差较大。



A. 转染 P1 分子克隆; B. 空白对照。
A. P1 molecular clone; B. Mock.

图 1 制备的表位肽抗体免疫组化结果

Fig.1 PK-15 cells were immunochemically stained with peptide antibody against P1

3 讨论

类猪圆环病毒因子 P1 是新近发现的,最初是发现了 P1 的完整基因组。随着研究的深入,P1 究竟是游离的核酸还是实体,成为研究的主要问题。先期研究表明,P1 的双拷贝串联分子克隆转染细胞后,电镜可观察到在细胞浆和细胞核中形成的包涵体,说明可表达病毒蛋白^[8]。然而电镜技术需专门人员,操作较繁琐,观察及结果判定也需要一定经

验,实验室及临床应用不易推广,因此需要一种简便易行的鉴定病毒蛋白方法。一般来说,抗体的制备是研究抗原以及抗原抗体相互作用的重要环节。目前,利用原核表达纯化目的蛋白质作为抗原以免疫动物是获得蛋白质抗体的常用方法;此外,用合成多肽的办法获得目的抗原的抗体也是一种快捷而有效的方法。抗原表位是指抗原分子表面具有的特殊立体构型和免疫活性的化学基团,对于抗原表位的研究一直是免疫化学的重要部分,也是一项困难的工作。以前常用 x-射线晶体衍射、多维核磁共振等方法来研究,当今随着生物信息学的发展,利用相关软件及数据库等可以预测抗原表位,尽管目前表位预测也局限在连续性位点,但表位预测在分子生物学领域仍具有重要意义。

由于抗原表位肽相对分子质量小等原因,其免疫原性非常低,需要与载体蛋白进行偶联来提高其免疫原性。载体蛋白为一种自身就能引发免疫反应的大分子,载体蛋白的选择基于其免疫原性、溶解性及偶联基团等方面。最普遍使用的载体是匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。鉴于 KLH 具有较强的免疫原性,BSA 则在一些免疫检测试验中作为阻断剂限制了它的使用,因而本研究将合成肽与 KLH 的偶联作为抗原制备抗 P1 的抗体,偶联原理是顺丁烯二酰亚胺理论,即将多肽中的半胱氨酸残基与载体蛋白偶联。我们在表位肽的 N 端加了一个半胱氨酸从而偶联在 KLH 蛋白表面。当然,虽然合成肽与载体蛋白偶联可增加免疫原性,但也会产生一定的抗 KLH 抗体。所以,在间接 ELISA 检测中,包被抗原可选用多肽-BSA 或多肽而不用多肽-KLH,以避免 KLH 对结果的干扰。本研究直接用合

成的多肽作为包被抗原,获得了较好的检测效果。

免疫组化的结果表明,当 P1 分子克隆转染特定细胞后,可表达蛋白,与制备的表位肽抗体发生特异性反应,表现为多数在细胞胞浆、少数在细胞核中出现呈色反应,此结果与先前的电镜观察结果相符^[8]。

总之,本研究表明人工合成的类圆环病毒因子 P1 结构蛋白多肽与载体蛋白偶联后具有良好的免疫原性,制备的抗体具有良好的反应特性,可用于 P1 病原检测试剂的开发研制,将对 P1 的生物学意义、组织定位以及特定表位结构蛋白的功能等研究起重要的推动作用。

参考文献:

- [1] Allan G, Meehan B, Todd D *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome[J]. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467–468.
- [2] Meehan B M, McNeilly F, Todd D *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 2171–2179.
- [3] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review[J]. *J Vet Diagn Invest* 2000, 12: 3–14.
- [4] Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases[J]. *Anim Health Res Rev* 2005, 6: 119–142.
- [5] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J]. *中国畜牧兽医* 2004, 31(5): 41–43.
- [6] Wen L, Guo X, Yang H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China[J]. *Vet Microbiol* 2005, 110: 141–146.
- [7] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建[J]. *江苏农业学报* 2007, 23: 579–582.
- [8] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析[J]. *畜牧兽医学报* 2008, 39: 941–944.
- [9] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 和 P2 诱导 PK-15 细胞凋亡的研究[J]. *华北农学报* 2008, 23(6): 84–86.
- [10] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. TUNEL 法检测类猪圆环病毒 2 型因子 P1 诱导猪免疫器官细胞凋亡研究[J]. *华北农学报* 2008, 23(增刊): 88–91.
- [11] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响[J]. *内蒙古农业科技* 2009(2): 46–48.
- [12] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析[J]. *中国农业科学* 2010, 43(2): 411–416.
- [13] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白二级结构与 B 细胞表位预测[J]. *华北农学报* 2009, 24(5): 45–49.