

乙型肝炎病毒 E 结构域蛋白表达、纯化与胶体金的制备

陈沙彬 梅建华 雷永良 刘敏

摘要: **目的** 分离乙型肝炎病毒临床株, 制备高纯度 E 蛋白抗原, 制作用于乙型肝炎病毒抗体检测的胶体金快速检测试纸条。**方法** PCR 扩增乙型肝炎病毒 E 蛋白基因、使用原核表达系统进行融合表达、Ni-柱亲和纯化, 透析复性后多点皮下免疫动物获得兔抗乙型肝炎病毒 E 蛋白的多克隆抗体, 免疫印迹法检测该抗体与重组蛋白结合的特异性。对抗体处理后, 制备快速检测乙型肝炎病毒的胶体金试剂。**结果** 成功克隆出乙型肝炎病毒 E 蛋白基因并表达该蛋白, 纯化后免疫印迹显示在蛋白分子量 53kDa 左右显出 1 条目的条带 (JEV E 蛋白); 酶联免疫法检测多克隆抗血清的效价达到 1:12800, 与阴性血清不发生特异性反应。**结论** 成功对乙型肝炎病毒 E 蛋白基因进行了克隆表达, 制备的胶体金试剂能检测出乙型肝炎患者血清中的抗体, 操作简便快速, 具有临床推广意义。

关键词: 乙型肝炎病毒;E 蛋白;胶体金

Expression, purification and preparation colloidal gold of Japanese encephalitis virus E structure protein

CHEN Sha-bin*, MEI Jian-hua, LEI Yong-liang, LIU Min.

* *Lishui Center for Disease Control and Prevention, Lishui, Zhejiang 323000, China*

Abstract: Objective To separated JE virus clinical strains, prepared high purity E protein antigen, and make colloidal gold for JE virus antibody detection.

Methods The Japanese encephalitis virus E protein gene was amplified by RT-PCR and cloned into the prokaryotic expression vector to express the recombinant JEVE protein. The recombinant protein was purified by Ni column and refolded by dialysis

*基金项目: 丽水市2012年公益性技术应用项目 (2012JYZB08)

作者简介: 陈沙彬 (1981—), 女, 浙江丽水人, 汉族, 本科, 技师, 主要研究方向: 微生物检验学。Email:912744992@qq.com

bag.

And the rabbit polyclonal antibody was obtained by multipoint subcutaneous immunization. The specificity of the recombinant protein and polyclonal antibody was analyzed by Western blot . The rapid detection of JE virus colloidal gold reagent was prepared after antibody processing, **Results** Japanese encephalitis virus E gene have been successfully cloned and expressed. Prokaryotic expression vector can expressed recombinant protein with a molecular weight of 53 kDa. The results of western blot confirmed that the recombinant protein was JEVE gene. ELISA showed polyclonal antiserum titer reaching up to 1: 12800, And do not specificity reaction with negative serum **Conclusions** The JEVE gene has been successfully cloned and expressed effectively, and the prepared colloidal gold reagent can detect the antibody in the serum of JE patients. This method is simple rapid, and has clinical significance. **Key words:** Japanese encephalitis virus; E protein; colloidal gold

流行性乙型脑炎（Japanese encephalitis virus, JEV，以下简称乙脑），是由蚊虫传播的一种急性、人畜共患的自然疫源性疾疾病。蚊虫、鸟类、蝙蝠、家畜均可感染。蚊虫可携带病毒过冬，并经卵传代，为重要储存宿主。乙脑是由乙型脑炎病毒导致的脑实质炎症，为主要病理改变的急性中枢神经系统传染病。蚊虫叮咬宿主后，乙型脑炎病毒进入蚊虫体内繁殖，随后移行入唾液腺，大量分泌到唾液中，叮咬易感宿主时可导致传播。乙脑的病死率和致残率高，是威胁人群特别是儿童健康的主要传染病之一^[1]，现已成为严重的公共卫生问题。加强监测和诊断是预防的关键。

JEV 的 E 糖蛋白在病毒与敏感细胞结合过程中起着重要的作用。其中的 E-244 区域进化保守，其发夹结构二聚体在病毒神经毒力发挥中起重要的调控作用，足以使实验鼠致死，该蛋白能促进中枢神经系统病毒扩散和炎症快速进展。该区域是治疗和预防的关键^[2, 3]。

我国是乙脑高流行区，农村发病率高于城市。李萍等研究儿童乙脑抗体阳性率高达 99.36%^[4]。丽水属于亚热带山区，农村多，医疗资源有限，使用金标试剂快速检测意义重

大，金标法与传统金标准检测结果一致率高^[5,6]。

1 材料与方法

1.1 质粒、毒株及试剂 原核表达质粒 pET-28a，克隆菌株 *E.coli* TG1、表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3)均由浙江理工大学实验室惠赠；JEV 毒株由本实验室 vero 细胞培养，BCA 牛血清白蛋白购自上海泛柯实业有限公司，BCA 测定蛋白浓度试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司，山羊抗兔二抗购自天津三箭生物科技有限公司；Ni-NTA 蛋白纯化柱购自默克公司。上下游引物由上海生工生物工程公司合成，PCR 产物由上海桑尼生物科技有限公司测序。RNA 纯化提取仪购自西安天隆科技公司。逆转录试剂盒、T 载体、T4 连接酶购自 takara 公司。凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司，抗人血清购自上海丰寿生物科技有限公司，乙脑病患者血清由本实验室保存。

1.2 pET-28a-EIII蛋白的原核表达、纯化与鉴定 上游引物：5'-CGCTCGAGTTAAGCATGCATTGGTCGCTAA-3'（下划线为 *Xho* I 酶切位点），下游引物：5'-CGGAATTCTTTAATCGTTGTCTGGGAATGGGCAATCGTGAC-3'（下划线为 *EcoR* I 酶切位点）。RNA 提取仪提取 JEV 核酸，逆转录试剂盒合成第一链 cDNA，使用 Taq 酶进行 RT-PCR 反应，1% 琼脂糖电泳，凝胶回收目的片段。克隆到 pMD 19-T 载体，转化至 *E.coli* TG1 感受态细胞，涂板于含 30 μ L x-gal（20 mg/mL）和 30 μ L IPTG（24 mg/mL）的琼脂糖平板，通过蓝白斑筛选白色单菌落，摇床培养，提取质粒，PCR 和双酶切鉴定。对 pMD19-T-E 与表达载体 pET-28a 同时进行 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切，pMD 19-T-E 酶切产物割胶回收小片段，pET-28a 酶切产物回收大片段，将两者进行连接反应，（连接反应体系包括 1 μ L 连接酶、1 μ L 回收的 E 基因、4 μ L 回收的 pET-28a、水 4 μ L），重组质粒转化于 BL21(DE3) 感受态细胞，提取质粒再次进行 PCR 和双酶切鉴定，阳性菌株送往上海生物工程公司测序并保存。重组菌接种至卡那霉素培养基中，含 pET-28a 空载体的 BL21 菌为阴性对照，使用 IPTG 诱导表达，菌液 PBS 洗涤后超声破碎，离心上清加入等体积 2 \times loading buffer，沉淀加入 30 μ L PBS 和 30 μ L 2 \times loading buffer，100 $^{\circ}$ C 金属浴 10min，SDS-PAGE 电泳鉴定。以含有 EDTA、4M 尿素的洗涤液（pH 8.0）洗涤菌液，以 8M 尿素溶解蛋白，过滤后

上镍离子亲和层析柱，用咪唑浓度分别为10mM、20mM、50mM、100mM、150mM、200mM、250mM、500mM洗涤Ni柱，收集每一步洗脱液SDS-PAGE电泳鉴定，使用His-tag小鼠单克隆抗体通过Western blot鉴定。使用透析袋4℃磁力搅拌透析过夜。24h后将JEV蛋白冻干成粉末。以牛血清白蛋白为标准品，JEV蛋白浓度由Bradford染料和酶标仪A₅₉₅值测定。

1.3 抗体制备 取 1mg JEV 蛋白加入无菌 PBS 和弗氏完全佐剂各 500 μL 乳化后注射新西兰兔，1 次/周，4 周后取兔血清为 JEV 抗体，-80℃保存备用，取注射前的兔血清为阴性对照。使用兔血清为一抗，山羊抗兔为二抗，将纯化的融合蛋白、诱导表达菌、未诱导表达菌转至聚丙烯酰胺（PVDF）膜，进行 Western blot 检测。将得到的多克隆抗血清与阴性对照用酶联免疫吸附试验（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay , ELISA）测定其效价，取 0.2 ml 抗血清备用。加生理盐水 0.3 ml，逐滴加入饱和 (NH₄)₂SO₄ 0.5 ml，振荡混匀，4℃静置 1 h。10000 rpm/min 离心 20 min，弃上清，重复该步骤三次。加生理盐水 0.5 ml 混匀重悬。在生理盐水中 4℃透析 12~24 h。后转入 0.2 M pH 9.0 硼酸缓冲液透析 12~24 h。 -20℃保存备用。

1.4 胶体金制备 取 0.01%氯金酸水溶液 100 mL 加热煮沸，搅拌并加入 1.25 mL 1 %柠檬酸三钠水溶液，10min 后可见溶液颜色转为红色，待稳定后冷却至室温，用 0.2 mol/L K₂CO₃ 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0，加入 0.1% PEG 20000、0.5% BSA、0.5% Tween-20、0.1% NaN₃，4℃保存备用。在电磁搅拌下，逐滴加入纯化的抗原蛋白，并加入终浓度为 1%的牛血清白蛋白(BSA)，使用间接标记法进行固定、包埋与标记，将金标抗原(Au-JEV-Ag)预包被在玻璃纤维膜上，干燥后取硝酸纤维膜覆于其后端，硝酸纤维素膜对照线喷洒兔多克隆抗体，检测线喷洒成品抗人血清二抗，干燥备用。用 JEV 和乙脑病患血清验证胶体金试剂的检测效果。

2 结果

2.1 PCR 扩增、双酶切鉴定 pMD 19-T 基因全长 2692bp，在约 1500bp 处显示目的基因条带，泳道 1 的 PCR 扩增结果以 cDNA 为模板，与预期值相符，如图 1 所示。pET-

28a 表达载体基因双酶切后位点长 5344 bp。对质粒载体的双酶切验证该结果。下图 a 中第三泳道为 10×loading buffer 对照。

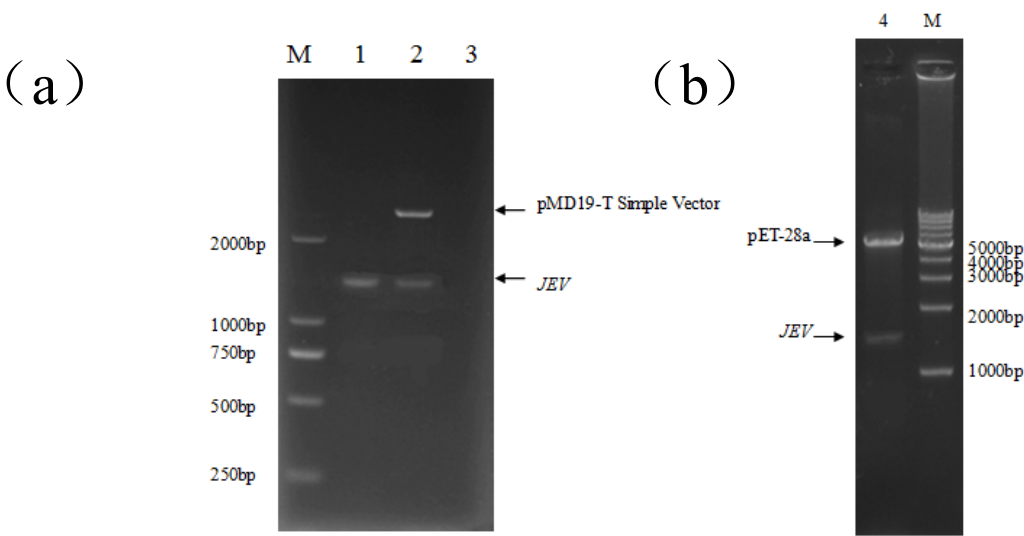
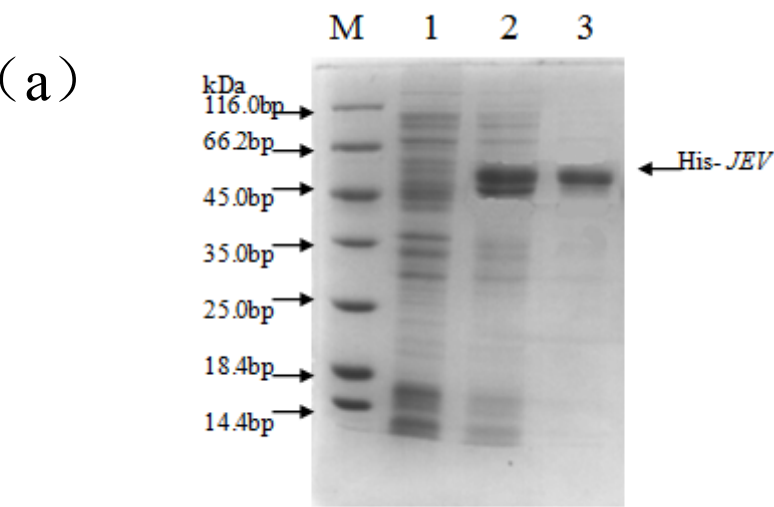


图 1 (a) 目的基因的 RT-PCR 扩增和克隆质粒鉴定 (b) 表达质粒鉴定

M. DNA Ladder Mix; 1. PCR 产物; 2. pMD19-T-JEV 的双酶切; 3. 10×loading buffer 对照; 4. pET-28a-E 的双酶切

2.2 基因测序、蛋白表达纯化、蛋白浓度测定 经测序并使用 BLAST 比对表明获得乙脑病毒 E 蛋白基因片段。使用 IPTG 诱导表达在 53kDa 处可见特异性目的条带。超声裂解重组菌，经电泳表明目的蛋白主要以包涵体形式存在，使用 200mM 梯度浓度咪唑洗涤，250mM 浓度洗脱为最佳提取组合。BSA 定量兔多克隆抗血清的浓度为 1 mg/ml。



(b)

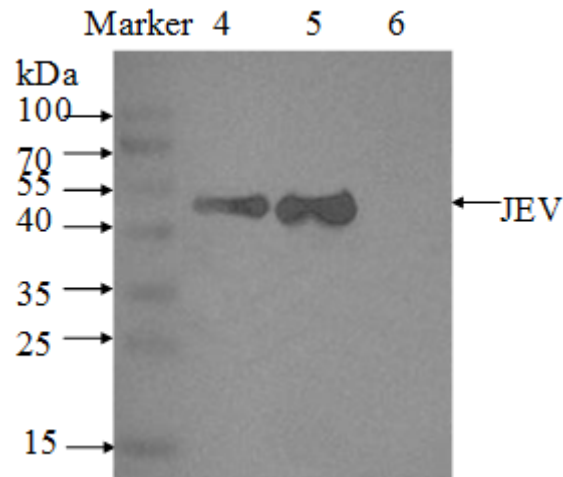


图 2 E 蛋白表达与纯化电泳检测 (a) 和免疫印迹检测 (b)

1.pET-28a 空载体；2.超声后的沉淀；3.纯化的 JEV 蛋白；4.纯化后的 JEV 蛋白；5. 超声后的沉淀；6. pET-28a 空载体

2.3 Elisa 测定多克隆抗体效价

使用纯化的蛋白包被，将自制的兔多克隆抗体倍比稀释作为一抗，辣根标记的山羊抗兔作为二抗，稀释倍数为 1:100~1: 51200，加入阴性对照，检测仪测定 OD 值。结果显示多克隆抗血清的效价达到 1:12800。

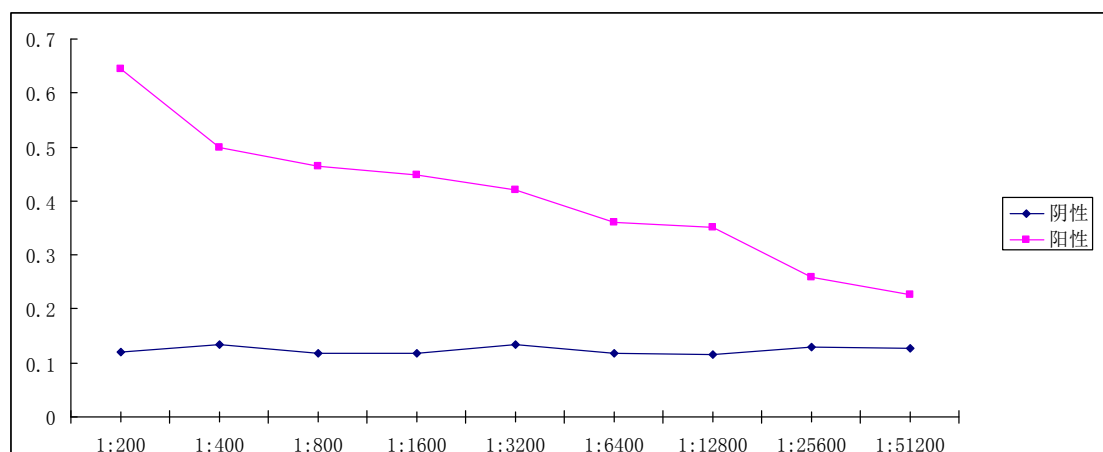


图 3 多克隆抗体的效价测定

2.4 胶体金试纸条检测乙脑病人血清验证试纸条效果将健康人的血清滴加于检测试纸条

上，未见明显检测线条带，将临床确诊的乙脑病人的血清滴加于试纸条上可见特异性条带，质控成立。

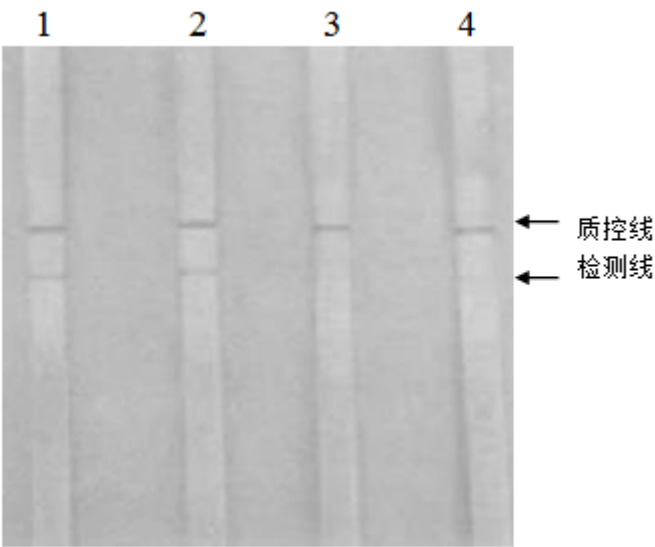


图 4 胶体金试纸条检测效果

1. 乙脑病患张某血清； 2. 乙脑病患李某血清； 3. 疟疾病患姚某血清； 4. 健康人血清；

3 讨论

基层医疗机构面向广大乙脑病患者，有充足的检测标本来源，可以充分利用此条件，以新发病患者提取的病毒核酸为模板进行基因克隆。乙脑病毒 E 蛋白是发病的关键蛋白，克隆检测该蛋白有重要意义。将其整合进入 T 克隆载体复制后继而整合表达载体，成功表达融合蛋白，使用组氨酸标签纯化，咪唑洗涤并脱盐制作新发感染病例毒株抗原，提纯的抗原免疫动物获得多克隆抗体。Western blot 检测在 53kDa 处可见特异性条带，表达的 E 蛋白能与 JEV 多抗特异性结合，抗原抗体结合反应性强^[7]。本实验使用自制的提纯抗原，结合胶体金试剂，待测标本中如果有乙脑病毒 E 蛋白抗体，将与金标抗原结合，在检测线处结合抗人血清显色。该抗原试剂纯度达到金标要求，有较高的检测灵敏度和特异性。本研究对抗体的进一步纯化，为制作高效的胶体金检测试纸条打下基础，可以进一步探索 E 蛋白偶联受体调节信号转导途径和在细胞感染中发挥的作用^[8]。使用自制的试纸条验证乙脑患者，显示预期结果。

基层医疗机构面对患者往往要求检测快速高效，目前国内还没有简单、快速的成品试

剂，本研究产品可以检测乙脑病毒抗体的快速检测试纸条。应用本发明试纸条检测，操作简单、方便、快速，不需特殊仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨，易于推广，适合基层，适合于现场检测和早期诊断。

参考文献:

- [1] Britton PN, Khandaker G, Booy R, et al. The causes and consequences of childhood encephalitis in Asia[J]. Infect Disord Drug Targets. 2014(5):
- [2] Yun SI, Song BH, Kim JK, et al. A molecularly cloned, live-attenuated Japanese Encephalitis Vaccine SA14-14-2 Virus: A Conserved Single Amino Acid in the ij hairpin of the viral E glycoprotein determines neurovirulence in mice[J]. PLoS Pathog. 2014, 10(7).
- [3] 梅匀安, 袁庄川, 韩秀杰, 等. 日本脑炎病毒prM蛋白的表达及免疫原性分析[J]. 畜牧与兽医, 2014, 13(09):76-80.
- [4] 李萍, 梁明祥, 惠军胜. 宝鸡市5034名儿童脊髓灰质炎、麻疹、风疹和乙脑IgG抗体水平分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(09): 1080-1081.
- [5] Wang X, Zhang Q, Hao F, et al. Development of a colloidal gold kit for the diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus Infection[J]. Biomed Res Int. 2014, 2014(14):1-6.
- [6] 黄素文, 王建峰, 朱海, 等. 淡水小龙虾过敏原胶体金快速检测试纸条的研制[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (10): 1414-1417.
- [7] 于纪棉, 王建峰, 张玉琳, 等. 大鼠脂肪因子Vaspin基因的克隆与原核表达[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 14(02): 164-166.
- [8] Li T, Liu L, Zhang L, et al. Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, culex quinquefasciatus[J]. Sci Rep, 2014, 29(4): 1-9.