

风疹病毒 E1 抗原特异性片段在酵母系统中重组表达及应用

李秀义 高冬梅 张守柱 潘继文 温 和

摘要 目的 利用真核系统对 E1 蛋白进行表达并纯化, 建立一种以重组 E1 蛋白为包被抗原的风疹病毒抗体 ELISA 检测方法。方法 通过生物信息学预测 E1 优势抗原表位, 根据真核系统表达的特点进行序列优化, 全基因合成获得风疹病毒 E1 优势片段核酸序列, 构建真核表达载体, 在真核系统内进行诱导表达并纯化, 用 Western blot 证实 E1 蛋白的抗原性。建立 ELISA 检测系统, 并初步检测 100 份临床血清标本。结果 SDS-PAGE 证实重组 E1 蛋白在酵母中高表达, Western blot 证实该 E1 蛋白具有良好的抗原性, 成功建立了检测 IgM 间接 ELISA 方法, 对临床血清标本的初步检测显示该试剂盒具有较好的敏感性和特异性。结论 本 ELISA 检测试剂有较高敏感性和较强的特异性, 可进一步开发用于检测风疹病毒的早期感染的试剂盒。

关键词 风疹病毒; E1 蛋白; 酵母表达

中图分类号 R 392-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1210-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.009

风疹病毒(rubella virus, RV) 的主要危害在于孕早期(前 3 个月) 感染可导致胎儿严重的出生缺陷, 即先天性风疹综合征(congenital rubella syndromes, CRS)^[1-3]。RV 有 3 个结构蛋白 C、E2 和

E1, 其中 E1 是主要的膜蛋白, 为免疫显性^[4-5]。Bosma et al^[6] 和 Starkey et al^[7] 研究发现, E1 蛋白上 195~296aa 区域是 E1 蛋白的主要抗原区域, 其相应氨基酸序列高度保守, 提示 E1 蛋白的此特异片段可作为特异诊断抗原用于 RV 抗体检测。目前血清学特异性抗体检测是我国孕妇产前致畸因子筛查的主要手段, 新发 RV 感染的血清学诊断主要依赖于 RV-IgM 抗体的检测^[8]。课题通过生物信息学预测获得 E1 蛋白优势抗原表位序列进行全基因合成, 在毕赤酵母中表达, 为研发特异性强和灵敏度高的国产 RV-IgM 抗体 ELISA 试剂盒提供基础, 以改善试剂长期依赖进口的局面。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 质粒 pGAPZαA、*E. coli* XL1-blue、毕赤酵母 KM17 和 JM109 由合肥市第一人民医院检验科免疫室留存。

1.1.2 血清 100 份由合肥市 CDC 提供的经酶联免疫捕获法(珠海海泰制药有限公司) 检测 IgM 可疑阳性血清, 300 份合肥市第一人民医院正常体检经检测(同上) IgM 阴性血清。

1.1.3 实验试剂 限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I、T4DNA 连接酶、PCR Marker、Taq DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂和琼脂糖凝胶电泳 DNA 纯化回收试剂均购自北京道普生物科技有限公司; 化学发光试剂(ECL) 购自美国 Pierce 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

2019-05-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81101273); 合肥市科技局科技计划项目(编号: 2010-014)

作者单位: 安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院) 检验科, 合肥 230061

作者简介: 李秀义, 男, 副主任检验技师, 硕士研究生;

温 和, 女, 副主任检验技师, 副教授, 责任作者, E-mail: 2488207025@qq.com

high level. After the application of DDP combined with rapamycin, the migration ability and invasive ability of the three cell lines decreased significantly ($P < 0.01$), moreover, the survival rate of the three cell lines was decreased significantly, so did the IC_{50} ($P < 0.01$). Western blot showed that rapamycin significantly down-regulated the expression of PI3K, AKT and mTOR proteins in PANC-1 and BxPC-3 cells, inhibited the phosphorylation of PI3K, AKT and mTOR, decreased p-mTOR protein expression, but its effect on the expression of mTOR protein in SW1990 was weaker. **Conclusion** Rapamycin can reduce the migration and invasion of pancreatic cancer cells, increase the sensitivity of pancreatic cancer to cisplatin, and reverse the resistance of cisplatin. This process is achieved by inhibiting the expression and phosphorylation of mTOR signaling pathway related proteins.

Key words mTOR inhibitors; pancreatic cancer; mTOR pathway; resistance

1.2 方法

1.2.1 全基因合成 由 Pubmed 的 Nucleotide 数据库得到风疹病毒编码结构蛋白 C、E2、E1 的 24s mRNA 亚基因组序列共 3 382 bp (GenBank: X05259.1) 编码的蛋白质为 992 aa。其中编码 E1 蛋白序列为氨基酸 581~992 aa(共 412 aa)。本实验拟研究 E1 蛋白主要抗原区域 195~296 aa。据此设计目的片段(2 464~2 769 bp 共 306 bp)的 DNA 序列,同时考虑与质粒 pGAPZ α 重组时必须有 DNA 序列的相应限制性内切酶,在设计目的片段 DNA 序列时在两条链上分别加上内切酶 EcoR I 和 Xba I 的酶切位点(pGAPZ α 亦含此两酶的酶切位点),因此设计 DNA 序列为:正链:5'-CTAGACAGGTC-CCGCCCCACCCTGGGGACCTGGTCGAGTACATTAT-GAATTACACCGCAACCAACAGTCCCCGGTGGGGC-CTCGGGAGCCCGAATTGTCATGGCCCCGATTGGGC-CTCCCCGGTTTGCCAACGCCACTCCCCTGACTGCTC-GCGGCTTGTGGGGGCCACGCCAGAGCGTCCCCGGC-TGCGCCTGGTCGACGCCGATGACCCCCTGCTGCC-ACTGCCCCGGGGCCCGGCGAGGTGTGGGTACGCC-TGTCATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGCGGACTCC-ACATACGTGCTGGACCGTACG-3'(下划线标注为 Xba I 酶切位点);负链:5'-AATTCGTACGGTCCAGCACGTATGTGGAGTCCGCACTTGGCGCCTGAGAG-CCTATGACAGCGTGACCCACACCTCGCCGGGCCC-GGGGGCAGTCCGACAGGGGGTTCATCGGCCGTCG-ACCAGGCCGAGCCGGGACGCTCTGGCGTGGCCC-CCACAAGCCGCGAGCAGTCAGGGGAGTGGCGTTG-GCAAACCGGGGAGGCCCAATCGGGGCCATGACAA-TTCGGGCTCCCGAGGCCCCACCGGACTGTTGGTT-GCCGCTGTAATTCATAATGTACTCGACCAGGTCCC-CAGGTCGGGCGGGACCTGT-3'(下划线标注为 EcoR I 酶切位点)。将以上设计的两条 DNA 单链送上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 pGAPZ α -E1 特异片段的重组 将合成的两条 DNA 单链经变性、退火,生成 DNA 双链,以内切酶 EcoR I 和 Xba I 将质粒 pGAPZ α 进行双酶切;通过 T4 DNA 连接酶将目的 DNA 序列和线性化的 pGAPZ α 载体连接,构建重组质粒。

1.2.3 pGAPZ α -E1 转化大肠杆菌 JM109 及鉴定 采用氯化钙法制备感受态大肠杆菌 JM109,将重组质粒转化至感受态细菌中,取少量涂于含抗生素 Zeocin(质粒 pGAPZ α 含编码 Zeocin 的基因,可作为重组是否成功的选择标记)的 LB 琼脂平板皿上,

干燥后,倒置,存放于 37 °C 的培养箱中过夜,次日,观察是否出现菌落。挑选单一菌落,在含抗生素的 LB 培养液中培养扩增,之后提取质粒 DNA,以内切酶 EcoR I 和 Xba I 酶切重组质粒进行鉴定,将酶切鉴定正确的质粒,进行 DNA 测序分析。

1.2.4 将重组质粒 pGAPZ α -E1 转化至毕赤酵母 提取重组成功的质粒并用 Avr II 线性化,纯化线性化后的质粒,电转入毕赤酵母 KM17 细胞中,之后涂布于含抗生素 Zeocin 的固态培养基平板上,30 °C 培养,至单菌落出现。

1.2.5 重组酵母的鉴定、目的蛋白的表达、纯化及鉴定

1.2.5.1 重组酵母的鉴定、目的蛋白的表达、纯化 挑取重组阳性的菌落发酵,收集上清液经 SDS-PAGE 分析,观察是否在 11 ku 处(根据氨基酸序列,以软件预测蛋白的分子量为 11 ku)出现目的蛋白的表达,利用 Ni²⁺-NTA 树脂柱对表达的重组蛋白进行纯化并鉴定。

1.2.5.2 Western blot 检测重组蛋白的抗原性 纯化的重组 E1 蛋白常规进行 SDS-PAGE。用半干湿法将凝胶上蛋白电转移至 NC 膜,加封闭液室温封闭 2 h,PBS 洗膜后,分别加急性 RV 感染者混合血清(1:800 稀释)与正常人混合血清(1:800 稀释)室温作用 1 h,然后再用 PBS 洗膜,加 HRP 标记的羊抗鼠二抗室温作用 1 h,PBS 振洗后,最后通过化学发光法(按试剂使用手册)检测抗原抗体反应。

1.2.6 以重组蛋白作为包被抗原建立 ELISA 检测方法

1.2.6.1 确定重组抗原包被浓度、血清稀释度 将重组蛋白抗原用包被液依次稀释为 1:1(10 μ g/ml)、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32,每个稀释度 6 孔,将阳性血清和阴性血清用包被液依次稀释为 1:1、1:25、1:50、1:100、1:200、1:400,每个稀释度设复孔,实验步骤为:包被-封闭-加入血清-加入 HRP-鼠抗人 μ 链单克隆抗体-加底物-加入终止液,同时设置空白对照孔,测量 A_{450/630} 的值。以重组 RV 蛋白抗原包被稀释度为横坐标,阳性血清和阴性血清与空白对照 A_{450/630} 的差值之比 P/N = (待测样品 A_{450/630} 值 - 空白对照 A_{450/630} 值) / (阴性对照 A_{450/630} 值 - 空白对照 A_{450/630} 值) × 100% 为纵坐标作图,选取 P/N 值最大时重组 RV 蛋白抗原的浓度为包被稀释度,阴性血清 A_{450/630} 值开始缓慢下降时的稀释度为待测血清稀释度。

1.2.6.2 HRP-鼠抗人 μ 链单克隆抗体工作浓度的

确定 将 30 份急性 RV 感染者混合血清(阳性血清) 及 30 份正常人混合血清(阴性血清) 进行预实验 然后将 HRP-鼠抗人 μ 链单克隆抗体倍比稀释 1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000 ,在确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度的情况下 ,测量其 $A_{450/630}$ 的值 阳性值在 1.0 左右、阴性值在 0.2 左右时的 HRP-鼠抗人 μ 链单克隆抗体稀释度为其工作浓度。

1.2.6.3 Cut-off 值的确定 用建立的 ELISA 方法检测 300 份 RV IgM 阴性血清 ,对 $A_{450/630}$ 值进行频数分布分析 ,确定阴性均值(\bar{x}) 及标准差(sd) ,以 $\bar{x} \pm s$ 计算 Cut-off 值。

1.2.6.4 重组目的蛋白诊断 RV 的灵敏性、特异性和符合率 利用意大利索林公司的化学发光定量试剂检测前述的 100 份待测血清进行确认 ,然后利用合肥市第一人民医院检验科免疫室初步建立的重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂和一种国产 ELISA 试剂同时检测(操作按说明书进行) 上述血清。计算不同试剂的检测结果 ,并以索林化学发光定量试剂为金标准 ,计算并比较不同试剂之间的灵敏度和特异性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。计数资料及等级资料的比较采用 χ^2 检验 , $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pGAPZ α A-E1 重组质粒酶切及表达鉴定结果

重组 pGAPZ α A-E1 经 EcoR I 和 Xba I 酶切 ,1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示 ,出现一条大小与 E1 扩增条带迁移率相同的电泳带 ,其酶切图谱与预期一致 利用通用引物对重组质粒进行测序分析 ,结果与所合成的序列完全一致 ,见图 1A。纯化的重组 E1 蛋白经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳检测 ,约 11 ku 处见明显的特异性单一条带 ,与预期一致。见图 1B。

2.2 SjE1 蛋白质免疫印迹分析 纯化蛋白能够被急性 RV 感染者混合血清识别而不被正常人血清识别 ,见图 2。

2.3 重组 RV 蛋白最适包被液浓度、待测血清与酶标二抗的稀释度 当随着重组 RV 蛋白抗原浓度减少和血清稀释度的增大 ,血清的 $A_{450/630}$ 值不断减少 ,当重组 RV 蛋白抗原包被稀释度为 1 : 16(浓度为 0.625 μ g/ml) ,血清稀释倍数为 1 : 100 时 ,阳性血清的 $A_{450/630}$ 值在 1.0 左右 ,且阴性值低 ,P/N 值高 ,据此确定重组 RV 蛋白抗原包被液的浓度为 0.625 μ g/ml ,血清稀释倍数为 1 : 100。HRP-鼠抗人 μ 链

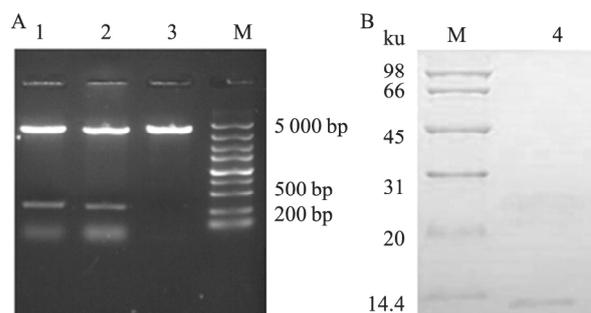


图1 pGAPZ α A-E1 重组质粒酶切及表达鉴定结果

A: pGAPZ α A-E1 重组质粒酶切核酸电泳图; 1: 重组 pGAPZ α A-E1 质粒经 EcoR I 和 Xba I 酶切结果; 2: 重组 pGAPZ α A-E1 质粒经 EcoR I 和 Xba I 酶切结果; 3: pGAPZ α A-E1 被 EcoR I 酶切结果; M: DNA 分子量标准品; B: 重组 E1 蛋白电泳图; M: 蛋白质分子量标准品; 4: 纯化蛋白



图2 重组 E1 蛋白质免疫印迹分析

1: 正常人血清; 2、3: 不同急性风疹病毒感染混合血清

单克隆抗体的稀释度仍为 1 : 2 000。

2.4 Cut-off 值的确定 30 份正常体检 RV(-) 抗血清标本检测结果如下: $A_{450/630}$ 平均值为 0.21 ,标准方差是 0.088 ,故阴阳性临界值 = $\bar{x} \pm 2sd = 0.21 + 2 \times 0.088 = 0.386$,为了应用方便将临界值定为 0.4。在上述的实验条件下 ,血清标本作 1 : 100 的稀释 , $A_{450/630}$ 值 ≥ 0.4 即可判断为阳性 ,否则为阴性。

2.5 重组目的蛋白诊断 RV 的灵敏性和特异性 以索林公司的化学发光定量分析为金标准 ,自制重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂与某种国产试剂的敏感性和特异性结果分别为 95.29%、94.33% 和 88.24%、80.00% ,重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂明显优于某种国产试剂(表 1、2)。经 χ^2 检验 ,重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂与某种国产试剂比较 ,灵敏性差异无统计学意义($\chi^2 = 2.08$, $P = 0.146$) ,特异性差异无统计学意义($\chi^2 = 0.50$, $P = 0.500$)。见表 3。

表1 自建重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂盒的灵敏度和特异性(例)

项目	索林化学发光(金标准)		合计
	阳性	阴性	
自建重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂盒			
阳性	81	1	82
阴性	4	14	18
合计	85	15	100

表2 某一种国产 ELISA 试剂盒的灵敏度和特异性(例)

项目	索林化学发光(金标准)		合计
	阳性	阴性	
某一种国产 ELISA 试剂盒			
阳性	75	3	82
阴性	10	12	18
合计	85	15	100

3 讨论

RV 为披膜病毒科风疹病毒属的惟一成员,其核酸是一单正链 40s 的 RNA。基因组包含 3 个 UTR 和 2 个长且不重叠的 ORF,3'-端的 ORF 转录 24 s mRNA,后者翻译成多聚蛋白前体 p110,经宿主细胞的蛋白酶水解加工,形成膜表面蛋白 E1、E2 和衣壳蛋白 C。其中 E1 蛋白是主要的膜蛋白,含有主要的抗原表位^[9],激发体液免疫和细胞免疫反应的抗原性最强^[6];在第 76、177、209 位包含三个 N-联糖基化位点,对维持 E1 蛋白固有的折叠、构象稳定以及抗原表位在 E1 上正确表达起重要作用。

RV 的检测方法有:病毒分离、血清学诊断和分子生物学检测等技术^[1]。病毒分离培养是金标准,但在疾病早期阳性率低、周期长,只适用于病原学研究;分子生物学检测快速、灵敏,但成本高易污染不适合临床筛查;血清学诊断方法适用于 RV 感染的实验室诊断和大规模临床调查^[10],其技术主要有:ELISA、免疫荧光分析^[11]和化学发光免疫分析^[12-13]等。国内 RV 抗体筛查主要通过 ELISA 方法^[14]检测血清中 RV 的 IgM、IgG 抗体。国产试剂品牌较多,结果差异较大,缺乏统一的标准;进口试剂虽然灵敏度高、特异性强,但价格昂贵。随着对 RV 蛋白的结构、功能和免疫学特性的深入研究和分析,应用蛋白质工程技术,根据研究者的意愿在基因水平上切割、拼接和修饰,重组表达 RV 特异性抗原,这样既可保留天然抗原的特异性和主要生物学活性,又可去除或减少非特异性反应,提高 ELISA 检测 RV 抗体的特异性^[15]。Nedeljkovic et al^[16]研究发现 E1

糖蛋白在病毒感染细胞时引发免疫反应和强烈的抗体亲和力成熟;Bosma et al^[6]和 Starkey et al^[7]分析发现 E1 蛋白上 195~296 aa 区域是 E1 蛋白的主要抗原区域,其相应核苷酸序列高度保守。提示 E1 蛋白的此特异片段可作为特异诊断抗原用于 RV 抗体检测。目前对 RV 诊断抗原的研究普遍存在两方面的问题:① 大多采用原核表达体系^[15],生成的 E1 蛋白抗原均以包涵体的形式存在,不能对表达蛋白进行有效的翻译后修饰,生物学特性与天然蛋白存在较大差异,检出率和特异性都比较低,同时存在复性困难,不易纯化和难以大规模生产;② 用真核系统表达的 RV 蛋白,多为对 E1 蛋白片段的完整表达,抗原活性更接近天然蛋白,但完整 E1 蛋白上带有许多非抗原表位,用于临床检测或疫苗时会带来非特异性反应。

由于原核表达系统及完整病毒基因真核表达存在以上问题,本实验将 RV 的 E1 蛋白的 195~296 aa 对应的优势序列进行全序列基因合成,并在真核系统表达,成功获得了高质量的重组 E1 蛋白,抗原性好。将重组表达的 E1 蛋白作为包被抗原建立 RV-IgM 抗体间接 ELISA 检测方法,并与索林公司的化学发光试剂和某种国产 ELISA 试剂同时检测血清标本。索林化学发光试剂作为金标准,分别计算重组 RV 抗原、国产试剂检测的特异度和灵敏度, χ^2 检验结果显示,与国产试剂比较,重组 RV 抗原试剂具有较高的灵敏度和较强的特异性,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验所获得的重组抗原与原核表达及完整病毒基因真核表达重组抗原相比有着明显的优势,其特异性和敏感性相对较高,而且此法操作简单、方便、成本较低,有利于市场开发。

本研究基因工程全合成的 E1 优势抗原表位在酵母中可以高表达,获得的高纯度 E1 蛋白的抗原性和特异性比较强,利用其建立的 IgM 间接 ELISA 方法,其敏感性和特异性相对较高,可开发试剂盒用于检测风疹病毒的早期感染。

表3 自建重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂盒和某一种国产 ELISA 试剂盒灵敏度和特异性比较(例)

项 目		自建重组 RV 蛋白抗原 ELISA 试剂盒			
		+	+	-	-
某一种国产 ELISA 试剂盒	索林化学发光(金标准)	+	-	+	-
	+	72	1	3	2
	-	9	0	1	12
	-				

参考文献

- [1] Claus C, Bergs S, Emmrich N C, et al. A sensitive one-step Taq-Man amplification approach for detection of rubella virus clade I and II genotypes in clinical samples [J]. *Arch Virol* ,2017 ,162 (2) :477 - 86.
- [2] Cozza V, Martinelli D, Cappelli M G, et al. Further efforts in the achievement of congenital rubella syndrome/rubella elimination [J]. *Hum Vaccin Immunother* 2015 ,11 (1) :220 -4.
- [3] Khandaker G, Zurynski Y, Jones C. Surveillance for congenital rubella in Australia since 1993: Cases reported between 2004 and 2013 [J]. *Vaccine* ,2014 ,32 (50) :6746 - 51.
- [4] Zhu Z, Cui A, Wang H, et al. Emergence and continuous evolution of genotype 1E rubella viruses in China [J]. *J Clin Microbiol* , 2012 ,50 (2) :353 -63.
- [5] Chen M H, Frolov I, Icenogle J, et al. Analysis of the 3' cis-acting elements of rubella virus by using replicons expressing a puromycin resistance gene [J]. *J Virol* 2004 ,78 (5) :2553 - 61.
- [6] Bosma T J, Best J M, Corbett K M, et al. Nucleotide sequence analysis of a major antigenic domain of the E1 glycoprotein of 22 rubella virus isolates [J]. *J Gen Virol* ,1996 ,77 (Pt10) :2523 - 30.
- [7] Starkey W G, Newcombe J, Corbett K M, et al. Use of rubella virus E1 fusion proteins for detection of rubella virus antibodies [J]. *J Clin Microbiol* ,1995 ,33 (2) :270 -4.
- [8] 苏秋东, 郭敏卓, 邱丰, 等. 风疹病毒多表位诊断抗原的制备与评价 [J]. *病毒学报* 2016 (3) :249 - 55.
- [9] Zhu Z, Rivaille P, Abernathy E, et al. Evolutionary analysis of rubella viruses in mainland China during 2010 - 2012: endemic circulation of genotype 1E and introductions of genotype 2B [J]. *Sci Rep* 2015 ,5:7999.
- [10] Enders M, Bartelt U, Knotek F, et al. Performance of the Elecsys rubella IgG assay in the diagnostic laboratory setting for assessment of immune status [J]. *Clin Vaccine Immunol* ,2013 ,20 (3) :420 -6.
- [11] 谭玉华, 于婷, 李奕辉, 等. 时间分辨荧光免疫法风疹病毒 IgG 抗体定量测定试剂盒的研制与性能评价 [J]. *国际检验医学杂志* 2014 ,35 (4) :472 -4.
- [12] 陈其霞, 王婷婷, 安静娜, 等. 1 种新的国产风疹病毒 IgG 抗体化学发光检测试剂的性能评价 [J]. *现代预防医学* ,2015 ,42 (14) :2608 - 10.
- [13] Helden J V, Grangeot-Keros L, Vauloup-Fellous C, et al. Evaluation of fully automated assays for the detection of Rubella IgM and IgG antibodies by the Elecsys (®), immunoassay system [J]. *J Virol Methods* ,2014 ,199:108 - 15.
- [14] 陈其霞, 罗岚, 王婷婷, 等. 国产风疹病毒免疫球蛋白 M 抗体检测试剂与进口试剂的性能比较 [J]. *华西医学* ,2017 (1) :67 -9.
- [15] 孙卫国, 杨栗坤, 刘艳华, 等. 风疹病毒糖蛋白 2 - 核蛋白优势抗原表位原核可溶性融合表达与血清学诊断研究 [J]. *中国卫生检验杂志* 2016 (16) :2351 -4.
- [16] Nedeljkovic J, Jovanovic T, Oker-Blom C. Maturation of IgG avidity to individual rubella virus structural proteins [J]. *J Clin Virol* , 2001 ,22 (1) :47 - 54.

Recombinant expression and application of rubella virus E1 antigen specific fragment in yeast system

Li Xiuyi, Gao Dongmei, Zhang Shouzhu, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061)

Abstract Objective To express and purify E1 protein by eukaryotic system, and to establish the ELISA detection method for rubella virus antibody with recombinant E1 protein as coating antigen. **Methods** The E1 dominant antigen epitopes were predicted by bioinformatics. The nucleic acid sequence of the rubella virus E1 dominant fragment was obtained by whole gene synthesis according to the expression characteristics of eukaryotic system, and the eukaryotic expression vector was constructed. The expression of E1 protein was induced in eukaryotic system and purified. The antigenicity of E1 protein was confirmed by Western blot. ELISA detection system was established, and 100 clinical serum samples were preliminarily detected. **Results** SDS-PAGE results confirmed that the recombinant E1 protein was highly expressed in yeast. Western blot results confirmed that the E1 protein had good antigenicity. A method for detecting IgM by indirect ELISA was successfully established. The kit had both the good sensitivity and specificity showed by the results of preliminary detection of clinical serum samples. **Conclusion** Our self-built ELISA detection system has the high sensitivity and specificity, and it can be used to detect the early infection of rubella virus.

Key words rubella virus; E1 protein; yeast expression