

法氏囊病病毒 *vp2* 基因在酵母中的分泌表达及鉴定\*贾 赞<sup>1,2</sup>, 张素芳<sup>1</sup>, 周 斌<sup>1</sup>, 徐学清<sup>1</sup>, 曹瑞兵<sup>1</sup>, 赵玉军<sup>2</sup>, 陈溥言<sup>1\*\*</sup>

(1.南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 江苏南京 210095; 2.沈阳农业大学畜牧兽医学院 辽宁沈阳 110161;)

Secretive Expression and identification of *vp2*, the Major Antigenic Protein of Infectious Bursal Disease Virus in YeastJIA Yun<sup>1,2</sup>, ZHANG Su-fang<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, XU Xue-qing<sup>1</sup>, CHAO Rui-bin, ZHAO Yu-Jun<sup>2</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1\*\*</sup>

(1.Key Laboratory of Animal Disease diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095. 2.Department of Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** Here we report that the major antigenic protein VP2 of very virulent *Infectious bursal disease virus* (vvIBDV) was secretively expressed with high level in yeast (*Pichia pastoris*) expression system. Primers were designed to amplify the previously cloned vvIBDV-*vp2* gene from the plasmid pMD18-T-VP2. The amplified 1.4kb *vp2* gene fragment was sub-cloned into the yeast-expressing plasmid pPICZ $\alpha$ -A. The recombinant pPICZ $\alpha$ -A-VP2 was analyzed by restriction enzymes and sequenced, which was then linearized by *Sac* I and transfected into *Pichia pastoris* X-33. After selection with Zeocin<sup>TM</sup>, the phenotype identity, the inductive expression, the SDS-PAGE and the western blot analysis of culture supernatant, an engineering *Pichia pastoris* strain X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2 with which the VP2 protein could be expressed with high level was obtained. SDS-PAGE and Western blot analysis indicated that the expressed product of the VP2 in culture supernatant of X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2 was about 55kDa, a bit larger than expected. Gel scanning and Bradford protein analysis showed that the expressed product was as high as 23mg/ L, or 28% of total proteins in culture supernatant of X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2.

**Key words:** *Infectious bursal disease virus*; *vp2* gene; *Pichia pastoris* expressing system;

**摘要:** 应用 *Pichia* 酵母表达系统高效分泌表达了传染性法氏囊病病毒 *vp2* 基因片段。首先用 Primer5.0 设计 1 对引物 P1、P2, 以插入 IBDV *vp2* 基因的 PMD18-T-VP2 载体为模板, 扩增出带有终止密码子的 1.4 kb 片段, 将此片段正向亚克隆到酵母表达载体 pPICZ $\alpha$ -A 上, 将构建好的重组载体 pPICZ $\alpha$ -A-VP2 用 *Sac* I 内切酶线性化后, 电击转化整合入 *Pichia Pastoris*X-33 酵母菌, 经高浓度 Zeocin<sup>TM</sup> 筛选、表型鉴定、诱导表达及表达产物的鉴定, 得到高效表达 *vp2* 基因的酵母工程菌 X-33/ pPICZ $\alpha$ -A-VP2。工程菌 72h 培养上清的 SDS-PAGE 电泳与免疫印迹结果显示, *vp2* 基因表达产物大小约为 55 kDa, 比预期的 41kDa 大。凝胶薄层扫描结合 Bradford 蛋白质总含量测定结果表明, 表达产物占工程菌培养上清总蛋白的 28%, 表达量可达 23 mg/L。间接 ELISA 结果表明重组表达产物能够有效地区分法氏囊病病毒标准阳性与阴性血清。

**关键词:** 传染性法氏囊病病毒; VP2 基因片段; *Pichia pastoris* 表达系统

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0582-05

传染性法氏囊病 (IBD) 是由鸡传染性法氏囊病病毒 (*Infectious bursal disease virus*, IBDV)

引起的幼龄鸡和火鸡的一种急性、高度接触性传染病。本病的危害性主要表现在两个方面: 一方面是

收稿日期: 2004-05-08, 修回日期: 2004-06-25

\* 基金项目: 国家 863 课题资助 (项目号: 2002AA245051)

作者简介: 贾赞 (1975-), 男, 河南省籍, 硕士研究生, 研究方向动物分子病毒学。

\*\* 通讯作者: 陈溥言 (1942-) 男, 江苏省籍, 教授, 从事动物传染病与分子病毒学研究。E-mail: aid@njau.edu.cn

引起幼龄鸡发病和死亡, 特别是近年来超强毒株 (vvIBDV) 的出现使雏鸡死亡率大大增加<sup>[1]</sup>; 另一方面是雏鸡早期感染本病, 引起免疫抑制, 导致鸡群抵抗力下降, 对其它疫病的易感性增高和对其它疫苗的免疫应答能力降低。直接和间接的给世界各国的禽养殖业带来了巨大损失。

传染性法氏囊病病毒 (*Infectious bursal disease virus*, IBDV) 属于双股双节段 RNA 病毒亚科, 禽双 RNA 病毒属, 基因组由两个双链 RNA 节段 A 和 B 组成。其主要病毒结构蛋白有 4 种, 分别为 VP1、VP2、VP3 和 VP4<sup>[2]</sup>。其中 VP<sub>2</sub> 具有一个不连续的构象依赖性的中和抗原决定簇, 是 IBDV 的宿主主要保护性抗原<sup>[3]</sup>。自 IBDV 发现至今, 新的变异株、强毒株、超强毒株不断出现, 分子结构的改变导致病毒致病力的改变及宿主对疫苗应答的改变, 使得传统的疫苗已不能控制其流行。国内有人用大肠杆菌、杆状病毒表达 IBDV VP2 以及构建活载体疫苗等进行基因工程苗的研究, 由于表达量不高、保护率低、难以工业化生产等缺点, 国内目前还没有基因工程疫苗用于传染性法氏囊病的预防。本研究用 *Pichia Pastoris* 酵母表达系统表达了 IBDV VP2 蛋白并测定了其免疫活性, 为保护好、适于工业化生产的基因工程亚单位疫苗的研制创造了条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

含 IBDV 强毒株 vp2 基因的质粒 pMD18-T-VP2、*E.coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保存, *Pichia pastoris* 受体菌 X-33 (*His<sup>-</sup>Mut<sup>+</sup>*)、表达载体 pPICZ $\alpha$ -A 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 高保真 Taq DNA 聚合酶, DNA 分子质量标准 DL-2000、DL-15000 均购自大连宝生物工程公司; Zeocin<sup>TM</sup> 购于 invitrogen 公司; 配制培养基用酵母抽提物、水解乳蛋白、YNB、干酪素 (Casein)、生物素等分别购自英国 OXIOD 公司、Uniphath 公司与 Sigma 公司。硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司。IBDV VP2 多抗鸡阳性血清由本实验室保存。HRP 酶标羊抗鸡 IgG 购自深圳晶美公司。其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

### 1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据 IBDV 标准强毒株 52/70 株基因组核苷酸序列与表达载体 pPICZ- $\alpha$ -A 的特点设计合成了一对引物: P1 (5'-GCTGAATTCTCCATCCCGGACGAC ACC-3'), 引入 *EcoR* I 位点; P2 (5'-CTGTCTAGAT

TAAGGAG CGGCGGGTGGGAA-3') 引入 *Xba* I 位点。引物间距约 1396bp, 由大连宝生物工程公司合成。以 pMD18-T-VP2 质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后, 按 95 $^{\circ}$ C 1min, 56 $^{\circ}$ C 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 2min 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒回收目的 DNA。

### 1.3 重组质粒 pICZ $\alpha$ -A-VP2 构建

PCR 产物经回收并用 *EcoR* I + *Xba* I 双酶切后, 与同样酶切后回收的 pPICZ  $\alpha$  A/*EcoR* I + *Xba* I 线性载体进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 得到重组表达载体 pPICZ  $\alpha$  A-VP2。利用 *EcoR* I/*Xba* I 对 pPICZ  $\alpha$  A-VP2 重组质粒进行双酶切鉴定, 利用 pPICZ  $\alpha$  A 载体两端的 5'、3' AOX1 引物对其进行测序。具体操作参照文献<sup>[4]</sup>。

### 1.4 整合酵母与筛选鉴定

1.4.1 电转化及表型鉴定: 按 invitrogen 公司说明书制备毕赤酵母 X-33 感受态细胞。大量提取重组酵母表达质粒, *Sac* I 线性化并纯化回收, 取 10.0 $\mu$ g 与新鲜制备的 80 $\mu$ L 感受态细胞混匀, 冰浴 5 min, 用 Bio Rad Gene Pulser 电击仪进行电脉冲转化, 参数为: 电压 1500V, 电容 25 $\mu$ F, 电阻 200  $\Omega$ , 温度 0 $^{\circ}$ C, 电击时间 5 msec。电击结束后, 立即加入 1.0 mL 预冷的 1.0 mol/L 山梨醇, 30 $^{\circ}$ C 温育 1~2 h, 取 100  $\mu$ L 涂布于含 100 $\mu$ g/mL Zeocin 的 YPDS 固体选择培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~4d, 转化子出现。将 MM 与 MD 平板划线分成多个小格, 用灭菌牙签细挑 YPDS 上生长的具 Zeocin 抗性的单菌落, 先点 MM 平板, 再点 MD 平板, 置于 30 $^{\circ}$ C 培养 2-3d, 通过观察生长速度鉴定其表型。

1.4.2 筛选高拷贝转化子: 将具有 Zeocin 抗性的最初转化子菌落, 通过影印法依次转移到含 Zeocin 浓度为 250, 500, 700, 1000  $\mu$ g/mL 的 YPDS 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~4 d, 逐级筛选目的基因高拷贝重组菌株。筛选到高拷贝重组菌株 18 个。

1.4.3 基因扩增鉴定: 取单菌落的一半放到 eppendorf 管中, 加入 50  $\mu$ L TE (pH8.0), 采用煮-冻-煮法制备酵母菌染色体 DNA, 以此为模板按原 PCR 条件扩增 IBDV VP2 基因, 并用 5'AOX1 和 3'XOA1 引物扩增 AOX1 基因, 同时制备未整合酵母菌染色体 DNA 作阴性对照。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。表型鉴定为 *Mut<sup>+</sup>* 的高拷贝转化子用于下一步的诱导表达。

### 1.5 工程菌的诱导表达及表达产物的鉴定:

以 X-33 为空白对照, 空质粒转化子为阴性对照,

挑取 Mut<sup>+</sup>表型的高拷贝转化子于 BMGY 培养基中培养至 A<sub>600</sub> 为 2-6, 3000r/min 离心 5min, 加 BMMY 培养基悬浮至 A<sub>600</sub> 为 1, 转至三角锥形瓶, 30℃ 280 r/min 培养 72 h, 每隔 24 h 添加甲醇至终浓度为 0.5%, 72 h 后取样, 于 12000 r/min 离心 15 min, 取上清保存于 -80℃ 或立即用于 SDS-PAGE 及免疫印迹。培养上清的 SDS-PAGE 及免疫印迹按参考文献<sup>[4]</sup> 操作及 Bradford 蛋白质总含量测定方法参见文献<sup>[5]</sup>。

### 1.6 表达产物的初步 ELISA 应用

工程菌诱导 72h 后, 培养上清对去离子水透析过夜除去缓冲液中的盐离子。用包被液倍比稀释, 4℃ 包被过夜, 次日与 IBDV VP2 标准阳性与标准阴性血清进行间接 ELISA 反应。血清稀释倍数为 1:10, HRP 标记的羊抗鸡 IgG 稀释倍数为 1:8000, 间接 ELISA 反应程序参照文献<sup>[6,7]</sup> 略加修改, 显色底物为 OPD, 室温显色 10min 后用 1mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 读取 A<sub>450</sub> 值。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体 pPICZ $\alpha$ -A-VP2 的构建

以含 IBDV 全长 vp2 基因片段的 pMD18-T-VP2 质粒 DNA 为模板, 按<sup>[1,2]</sup> 中方法进行 PCR 扩增后, 电泳结果显示 PCR 产物大小约为 1400 bp (图 1), 与预期大小一致。将 EcoR I + Xba I 双酶切的载体 DNA 与 PCR 产物连接, 用 Zeocin 抗生素筛选获得重组质粒, 命名为 pPICZ $\alpha$ -A-VP2。EcoR I /Xba I 酶切鉴定结果(图 1), 与序列测定结果(结果未显示)表明插入片段大小、方向均正确。

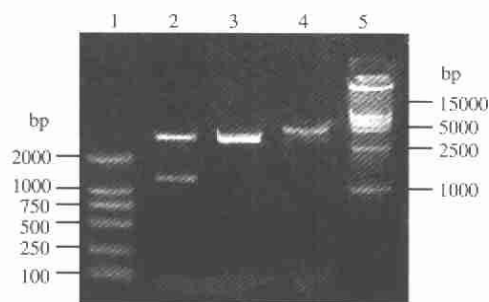


图1. 重组表达质粒 pPICZ $\alpha$ -A-VP2 的酶切鉴定

Fig.1 Characterization of recombinant expression vector pPICZ $\alpha$ -A-VP2 by restriction enzyme digestion

1, DL-2000 Marker; 2, pPICZ $\alpha$ -A-VP2 digested by EcoR I and Xba I; 3, pPICZ $\alpha$ -A digested by EcoR I; 4, pPICZ $\alpha$ -A-VP2 digested by EcoR I; 5, DL-15000 Marker.

### 2.2 酵母菌转化子 X-33/pPICZ $\alpha$ -A-VP2 的筛选与鉴定

电转化后在低浓度 YPDS Z<sup>+</sup> 平板(含 100 $\mu$ g/mL Zeocin) 可长出数十至上百个转化菌落, 再经 MM/MD 培养筛选出甲醇诱导快速生长型的 Mut<sup>+</sup> 表型菌, 并将 Mut<sup>+</sup> 表型菌落依次点种于高浓度的 YPDS Z<sup>+</sup> 平板 (250~1 000  $\mu$ g/mL Zeocin) 来确定高拷贝转化子。将获得的 18 个高拷贝转化子命名为 X-33/pPICZ $\alpha$ -A-VP2。另以提取的酵母菌整合转化子的 DNA 为模板, 用原引物进行 PCR 扩增, 可得到约 1400bp 左右的片段(图略), 以引物 5' AOX1、3' AOX1 扩增 AOX1 基因均可见 2000bp 左右的片段, 结果 18 个转化子全部是阳性, 而 X-33 空酵母菌基因组阴性对照扩增出 600 bp 左右的片段(图略)。表明筛选到的转化子的 VP2 基因均整合入酵母菌染色体 AOX1 基因。

### 2.3 工程菌的诱导表达及表达产物的鉴定

工程菌 X-33/p PICZ $\alpha$ -A-VP2 经甲醇诱导培养, 收集诱导 72 h 的培养上清进行 SDS-PAGE。结果显示, 与对空载体转化对照菌株 X-33/pPICZ $\alpha$ -A 和宿主菌 X-33 相比, 各工程菌的培养上清在 43.0 kDa 与 66.2 kDa 之间均有条带出现(图 2), 与理论上 VP2 蛋白(41 kDa) 大小不太相符合, 但是取其中两个工程菌株的培养上清进一步用鸡抗 IBDV 阳性血清进行蛋白质印迹分析, 两者在约 55kDa 处均出现一条特异性的反应带(图 3)。所以对比蛋白质印迹与 SDS-PAGE 结果, 可判定 vp2 基因片段在各工程菌中都可表达, 其中在 1、3、4 号菌株培养上清(图中第 1、3、4 泳道)中的表达量要高于其他菌株。IBDV vp2 基因片段内存在 3 个潜在的 N-糖基化位点, 而酵母的翻译后糖基化修饰过程以 N-糖基化为主, 推测其表达产物比理论分子质量略大是翻译后 N-糖基化修饰的结果。

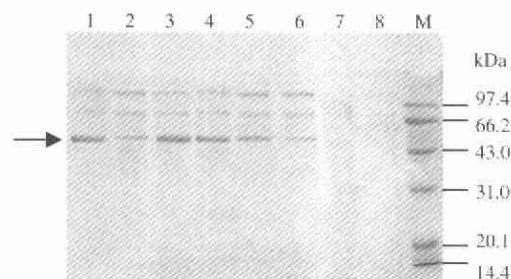


图2 X-33/pPICZ $\alpha$ -A-VP2 表达上清的 SDS-PAGE 分析  
Fig.2 SDS-PAGE of culture supernatant of X-33/pPICZ $\alpha$ -A-VP2

1-6, culture supernatant of different X-33/ pPICZ $\alpha$ -A-VP2; 7, culture supernatant of X-33; 8, culture supernatant of X-33/ pPICZ $\alpha$ -A; M, protein molecular mass standards

用双波长薄层扫描仪对凝胶进行薄层扫描, 结果显示 VP2 基因片段表达产物占 X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2 工程菌 72 h 培养上清总蛋白的 28%, 结合 Bradford 蛋白质总含量测定结果, 可知其表达量为 23 mg/L, 属于高效表达。

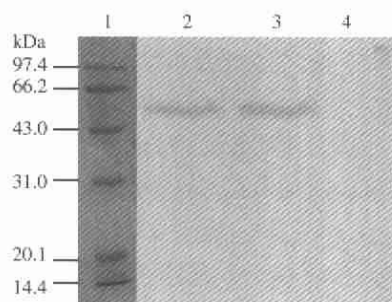


图 3 X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2 表达上清的 Western-blot 分析  
Fig.3 Western-blot of culture supernatant of X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2

1, Protein molecular mass standards; 2, 3, Culture supernatant of different X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2; 4, Negative culture supernatant of X-33/pPICZ  $\alpha$  A.

#### 2.4 重组表达产物的抗原性测定

重组工程菌 X-33/pPICZ  $\alpha$  A-VP2 诱导 72 h 的培养上清对 PBS 透析过夜后, 用包被液按照 1:10~1:2560 的比例倍比稀释, IBDV 标准阳性血清与阴性血清按 1:20 稀释, 不同的抗原稀释度下表达产物与标准阳性与阴性血清反应时的  $A_{450}$  值及二者间的比值(表 1)。反应结果表明, 当抗原按 1:10~1:2560 稀释时, 阳性与阴性血清反应  $A_{450}$  值之比 (P/N) 均大于 3, 能够有效地区分 IBDV 标准阳性与阴性血清, 说明该重组表达产物特异性较好。当抗原按 1:160 稀释时阳性与阴性血清反应  $A_{450}$  的比值(P/N)达到最大。

表 1 间接 ELISA 检测表达产物和 IBDV 标准血清的反应性  
Table1 Detection of expression product of *vp2* fragment and IBDV and standard serum using Indirect ELISA

	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
Positive serum	1.47	1.38	1.34	1.30	1.23	1.17	1.08	0.87	0.53
Negative serum	0.41	0.36	0.32	0.27	0.24	0.23	0.22	0.19	0.14
P/N	3.59	3.83	4.19	4.81	5.12	5.09	4.91	4.58	3.79

### 3 讨论

甲醇毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是近年发展起来的真核表达系统<sup>[7]</sup>, 它是一种甲基营养型酵母, 在缺乏葡萄糖、甘油等碳源时, 可利用甲醇作为唯一碳源而生长。其醇氧化酶(AOX1) 启动子受甲醇的严格控制, 可调控外源蛋白质的高效表

达。其既具有原核表达系统的高表达量、可大规模培养和成品低廉的优点, 又具有真核表达系统可进行蛋白翻译后修饰、加工和折叠<sup>[8-10]</sup>等优点, 使得甲醇毕赤酵母在表达外源活性蛋白中倍受青睐, 而得到广泛应用。迄今为止, 此系统已成功地表达了 200 多种蛋白。

本试验以分泌表达的形式成功地在毕赤酵母系统中表达了 IBDV *vp2* 基因, 经过对培养条件的初步优化获得了稳定表达目的蛋白的重组菌株, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析显示, 重组阳性菌株表达的 VP2 蛋白比理论上的 42kDa 偏大, 约有 55kDa 左右, 但经过 Western-blot 结果分析和间接 ELISA 结果证明, 表达的 VP2 蛋白能够被 IBDV 阳性血清识别。后经过对 VP2 蛋白的氨基酸序列分析, 发现在其序列中有三个 N-糖基化位点, 推测其表达产物比理论分子量稍大是翻译后 N-糖基化修饰的结果。根据薄层扫描和 Bradford 比色, 笔者测得的 VP2 蛋白的表达量占总蛋白含量的 28%。笔者将在此基础上继续摸索适合表达 IBDV *vp2* 基因的条件, 包括甲醇浓度、温度、湿度、pH 值及摇床转速等, 以期进一步提高 IBDV VP2 蛋白表达量。

伴随着养鸡业的集约化发展, 传染性法氏囊病早已成为危害养鸡业的主要传染病, 特别是变异株、超强毒株的不断出现, 使该病防制的难度加大, 传统的疫苗已不能控制其流行。因此, 急需免疫原性好、安全性高的新型疫苗问世。国内有人用大肠杆菌、杆状病毒表达 IBDV *vp2* 以及构建活载体疫苗等进行基因工程苗的研究, 但存在表达量不高、保护率低、难以工业化生产等缺点, 国外 Fahey<sup>[11]</sup> 在 1991 年用酵母表达了 IBDV *vp2* 基因, 动物试验证明得到了很好的保护效果。本试验应用新型的甲醇分泌性酵母细胞表达系统表达了 IBDV VP2 基因, 从而为基因工程亚单位疫苗和诊断试剂的研制奠定了坚实基础。

#### 参考文献

- [1] Van Den Berg T P, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain[J]. *A vian Disease*, 1991, 20: 133-143.
- [2] 曹勇长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强传染性法氏囊病毒宿主保护抗原的分子特征[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18 (6): 521-526.
- [3] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, et al. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1303-1312.

- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880-897.
- [5] Federick M A, Robert E K, Seidman J G, *et al.* 颜子颖, 黎孟枫, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998.332-363.
- [6] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 北京: 高等教育出版社 [M], 1998. 114.
- [7] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24 (1): 45-66
- [8] 姚斌, 张春义, 王建华, 等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母[J]. *中国科学*, 1998, 28 (3): 237-243.
- [9] Clear J J, Rayment F B, Sreekrish K, *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene[J]. *BioTechnology*, 1991, 9: 455-460.
- [10] Marc W T. High2yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*[J]. *Yeast*, 1999, 15: 1087-1096.
- [11] Fahey K J, Chapman A J, Macreadie I G, *et al.* A recombinant subunit vaccine that protects progeny chickens from infectious bursal disease. *A vian Pathology*, 1991, 20: 447-460.