

猪瘟病毒 E2 蛋白 A/D 抗原区基因在酵母中的分泌表达与鉴定*

徐学清¹, 张素芳¹, 郑其升¹, 苏小运¹, 任雪枫¹, 陈溥言^{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)

Secretion Expression of the Gene Encoding Classical Swine Fever Virus E2 A/D

Antigenic Domain in *Pichia pastoris* and Identification of the ProteinXU Xue-qing¹, ZHANG Su-fang¹, ZHENG Qi-sheng¹, SU Xiao-yun¹, REN Xue-feng¹, CHEN Pu-yan^{1**}

(Key lab of Animal Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China)

Abstract: Based on the fact that the envelope glycoprotein E2 which can protect swine from virulent attack of Classical swine fever virus(CSFV) has two structural antigenic domains B/C and A/D, a pair of specific primers was designed to amplify the gene fragment encoding A/D antigenic domain of E2 protein. The 373 bp PCR product was directionally cloned into *Pichia pastoris* secretory expression vector pPICZ_αC under the control of the AOX1 promoter and α-factor secretion signal sequence. After being linearized with restriction endonuclease *Dra* I, the recombinant plasmid was transformed into *Pichia pastoris* by electroporation. Five transformants with high copies were acquired when selected under ZeocinTM and were induced with methanol. SDS-PAGE indicated that the supernatant of the induced *P. pastoris* culture contained the recombinant protein E2 (175.8ug/mL). Western-blot analysis proved that the recombinant protein had good reactimmunity against positive CSFV serum. N-glycosylation analysis of expressed products showed that the recombinant protein was glycosylated in the process of secretion. Our research provided a basis to develop sub-unit vaccine and diagnostic antigen against CSFV.

Key words: CSFV; A/D antigenic domain; *Pichia pastoris*; Expression

摘要: 基于猪瘟病毒主要保护性抗原 E2 囊膜糖蛋白有两个相对独立的抗原结构单位--B/C 抗原区和 A/D 抗原区, 设计一对特异性的引物扩增猪瘟病毒 E2 蛋白的 A/D 抗原区基因, 并将 PCR 产物克隆入含有强启动子 P_{AOX1} 和 α-MF 信号肽序列的巴斯德毕赤酵母表达载体 pPICZ_αC 中, 构建成重组质粒 pPICZ_α-AD, 酶切线性化后电穿孔导入巴斯德毕赤酵母 X₃₃ 菌中, 经 ZeocinTM 筛选得到 5 株高拷贝转化子, 甲醇诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 试验表明酵母培养上清液中含有具有良好反应原性的 E2 蛋白, 蛋白表达量达 175.8μg/mL。N-糖基化分析显示该表达蛋白在分泌过程中发生糖基化。该研究为研制防治猪瘟的亚单位疫苗与诊断试剂盒奠定基础。

关键词: 猪瘟病毒; A/D 抗原区; 毕赤酵母; 表达

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0598-04

猪瘟是由猪瘟病毒引起的猪的一种急性致死性疾病, 具有高度接触传染性, 流行广泛, 发病率高、死亡率高, 危害极大^[1]。猪瘟病毒是黄病毒科瘟病毒属成员^[2], 囊膜糖蛋白 E2 是其主要免疫原蛋白, 可诱导动物体产生有效的免疫保护。养猪发

达国家已利用重组表达的 E2 蛋白建立检测猪群猪瘟抗体的 ELISA 方法。在国内, 尽管兰州兽医所以浓缩的病毒颗粒建立了诊断猪瘟的间接血凝试验、陈玉栋等^[3]建立了检测猪瘟病毒的荧光定量 PCR, 但这些方法都用全病毒获得该抗原, 存在的问题

收稿日期: 2004-05-21, 修回日期: 2004-07-01

* 基金项目: 国家 863 高技术发展计划资助项目 (2001AA249012)。

作者简介: 徐学清(1978-), 男, 湖北省籍, 硕士研究生, 主要研究方向为动物分子病毒学与分子免疫学。E-mail: aid@njau.edu.cn

** 通讯作者: 陈溥言(1941-), 男, 江苏省籍, 教授, 研究方向为动物传染学与预防兽医学。Corresponding author. Tel: 025-84396028.

是: 完整病毒不易生产、纯化、成本较高, 且存在感染性, 在应用中存在局限性。与完整猪瘟病毒相比, 重组蛋白无感染性, 而且易于大量生产和纯化, 因此用重组表达 E2 蛋白作为检测抗原检测反映猪瘟中和抗体水平则对于猪瘟的防治更有意义。大肠杆菌类原核表达系统虽然较为成熟, 但其表达产物以包涵体形式存在, 无翻译后的糖基化等修饰加工过程, 并且可能还会含有细菌毒素。真核表达系统是最具发展前景的蛋白质产生方式, 目前研究较多的是昆虫细胞表达和哺乳动物细胞表达。昆虫细胞表达时产物成分复杂, 不易纯化和病毒污染等问题, 而哺乳动物细胞表达的成本高、产量低, 不适宜工业化生产疫苗或诊断抗原。因此, 我们选用避免了上述表达系统缺陷的巴斯德毕赤酵母系统进行表达研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 pcDNA3-STE2^[4]、pBluescript II SK、*P.pichia* 表达载体 pPICZ_αC、大肠杆菌 DH5_α、宿主菌 X₃₃、猪瘟兔化弱毒高免血清均由本实验室保存; Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶和各种限制性核酸内切酶均购自于 Takara 公司; 酵母用蛋白酶、N-糖基化酶 Endoglycosidase H、酵母氮碱 (YNB 无氨基酸)、D-山梨糖醇、生物素、抗生素 ZeocinTM 均购自 Invitrogen 公司; DAB 试剂盒、酶标 SPA, 购自武汉博士德公司; 其它试剂均为国产; 用于酵母培养表达的 YPD、YPDS、BMGY 及 BMMY 均按 Easy selectTM *pichia* expression kit 方法配制。

参照 GenBank 公布的 CSFV 兔化弱毒株核苷酸序列, 自行设计并由大连宝生物工程有限公司合成。为了便于基因的克隆及构建表达载体等后续工作, 在上、下游引物 5' 端分别加入 *Sal* I 和 *Pst* I 位点 (引物中划线部分)

上游引物 P1: 5'cgcgctcgaccgatacttgcatcattg 3'

下游引物 P2: 5'aacctgcagcccaacttacagtaga 3'

用于测序及鉴定外源基因整合至 *P.pichia* 酵母基因组的引物:

上游引物 P3: 5'gcaaatggcattctgactcc3'

下游引物 P4: 5'gactggttccaattgacaagc3'

1.2 编码 E2 蛋白 A/D 区特定基因的扩增

以 pcDNA3-STE2 质粒为模板进行 PCR。反应体系如下: ddH₂O 70.5μL, 10 × Buffer 10μL, 25mmol/L MgCl₂ 8.0μL, 2.5mmol/L dNTP 8.0μL, P1、P2 1.0μL; 模板 0.5μL, Taq DNA 聚合酶 0.5μL。

反应程序为: 95℃ 5min; 94℃ 50s, 55℃ 50s, 72℃ 60s, 30 个循环; 72℃ 10min, 4℃ 保存。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用小量胶回收试剂盒回收, -20℃ 冻存备用。

1.3 重组质粒的构建

参照文献^[6]方法将 PCR 产物用 *Sal* I 和 *Pst* I 双酶切回收后插入 pBluescript II SK 质粒, 得到重组质粒 pSK-AD, 再经 *Kpn* I 和 *Sac* II 双酶切定向插入 *P.pichia* 表达载体 pPICZ_αC 中, 得到重组表达质粒 pPICZ_α-AD。

1.4 pPICZ_α-AD 质粒转化酵母菌及高拷贝整合菌株的筛选

参照 Easy selectTM *pichia* expression kit 的说明用 *Dra* I 单酶切线性化 pPICZ_α-AD 表达质粒 4μL 约 10ug 转入含 80μL 山梨醇重悬感受态细胞。充分混匀, 在 0.2cm 的石英电转杯中, 以 1.5kV、20μF、200Ω 的条件电转化, 涂 YPDS 平板, 后将阳性转化子依次接种至含高浓度的 ZeocinTM 素的 YPDS 选择平板, 以在高浓度 ZeocinTM 素上正常生长的菌落为高拷贝整合菌株。

1.5 菌落 PCR 鉴定目的基因的整合

在高浓度 ZeocinTM 素下培养 24h 的酵母培养物的基因组的提取参照文献^[7], 用煮沸-冻融-煮沸法进行。取上清为模板, 用引物 P3、P4 进行 PCR 扩增, 鉴定整合至酵母基因组中的目的基因。

1.6 PCR 阳性菌株的诱导表达

参照 Easy selectTM *pichia* expression kit 的说明选 6-10 个 PCR 阳性菌株诱导表达, 分别于 48h、72h、96h 取培养物 1.5mL 于离心管中 12000g 离心 10min, 分别收集上清, -20℃ 保存备用。

1.7 表达产物 SDS-PAGE 和免疫学鉴定

取上清直接进行 SDS-PAGE, 进行薄层扫描和转印到硝酸纤维素膜上, 用猪瘟兔化弱毒高免血清进行 Western-blot 分析。

1.8 糖蛋白的 N 糖基化分析

在 30uL 发酵上清中加入 2.0 uL N-糖基化酶 Endoglycosidase H, 总反应体系为 50uL, 37℃ 作用 10h 后进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 目的基因的扩增和克隆质粒 pSK-AD 的酶切鉴定

PCR 产物琼脂糖电泳后在 DL2000 DNA 分子量标准的 250bp、500bp 条带之间出现了一条明显的条带, 大小接近 400bp, 符合预期设计的 373bp

大小的片段(图未显示)。扩增片段命名为 AD; 重组质粒 pSK-AD 经 *Sal*I 和 *Pst*I 双酶切处理后, 琼脂糖上电泳显示(图 1), 在 DL2000 DNA 分子标准 200bp、500bp 之间出现符合预期设计的 373bp 大小的目的片段和大于 2000bp 的载体。

2.2 重组表达载体 pPICZ α -AD 双酶切鉴定结果

扩增序列加上在两个载体多克隆位点延伸的 55bp, 该质粒经用 *Kpn*I 和 *Sac*II 双酶切双酶切处理后, 如图 2 所示在琼脂糖电泳中出现 427bp 条带, 实际结果为在 DL2000 DNA 分子标准 500bp 附近出现符合预期设计大小的目的片段和大于 2000bp 的载体。

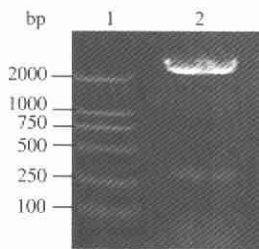


图 1 pSK-AD 的酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of pSK-AD

1, DNA molecular weight marker(DL2000); 2, Restriction digestion of pSK-AD by *Pst*I and *Sal*I.

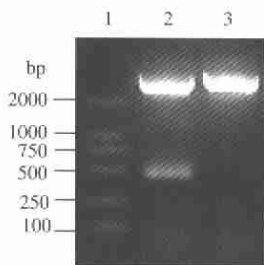


图 2 pPICZ α -AD 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPICZ α -AD

1, DNA molecular weight marker (DL2000); 2, pPICZ α -AD digested by *Kpn*I and *Sac*II; 3, pPICZ α -C digested by *Kpn*I and *Sac*II.

2.3 菌落 PCR 检测目的基因整合的结果

阳性菌落的 PCR 产物应该是 593bp 加上目的片段应略大于 1000bp, 琼脂糖电泳显示, 在 DL2000 DNA 分子标准 1000bp 附近出现预期条带, 说明经电转化, 目的基因已经成功的整合入毕赤酵母基因组内(图未显示)。

2.4 表达产物 SDS-PAGE 和免疫学鉴定结果

诱导 48h 样品经 SDS-PAGE 电泳不见条带, 而诱导 72h 的样品 SDS-PAGE 电泳条带(图 3), 在 20-30kDa 均有一条带, 大于 E2 的推导分子 20.1kDa, 但在 Western-blot 中结果有明显的杂交带

而对对照组杂交呈阴性, 说明酵母细胞表达产物能与猪痘抗血清特异性结合(图 4), 薄层扫描表明蛋白表达量达 175.8 μ g/mL。

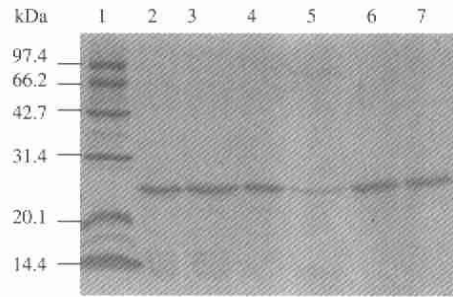


图 3 PCR 阳性酵母株的诱导表达结果

Fig.3 Analysis of the PCR positive strain by SDS-PAGE induced with methanol for 72 hours

1. Middle MW protein marker; 2-7. Different strain of PCR positive induced with; methanol for 72 hours

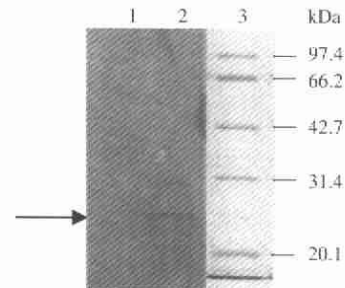


图 4 PCR 阳性酵母株的 Western-blot 分析

Fig.4 Western-blot of product induced by PCR positive strain 1, Western-blot of supernatants from *Ppasteris* strain X33; 2, Western-blot of product induced by a PCR positive strain; 3, Middle MW protein marker

2.4 糖蛋白的 N-糖基化分析结果

糖蛋白经 N-糖基化酶 Endoglycosidase H 作用后 SDS-PAGE 检测显示蛋白质明显比以前小(图 5), 并与理论上计算的蛋白质大小一致, 说明酵母表达的糖蛋白已发生糖基化。

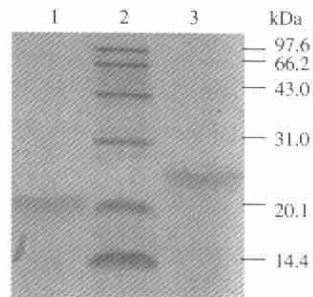


图 5 表达产物的 N-糖基化分析

Fig.5 Analysis of N-glycosylation for expressed products

1, SDS-PAGE analysis of supernatants from recombinant strains after digested with Endoglycosidase H; 2, Middle MW protein marker; 3, SDS-PAGE results of supernatants from recombinant strain.

3 讨论

巴斯德毕赤酵母表达体系是近年来发展最快的极具潜力的真核表达系统, 已成功地应用于多种异源蛋白的商业化生产^[8,9]。表达载体质粒 pPICZ_α 含有甲醇诱导型启动子—乙醇氧化酶启动子 P_{AOX} 和 α-MF 信号肽序列。P_{AOX1} 可有效防止外源基因表达产物对酵母生长可能产生的细胞毒性, α-MF 信号肽序列可在蛋白质分泌到胞外的过程中被有效切除, 加之巴斯德毕赤酵母仅分泌很低水平的自身蛋白, 这将更有利于重组蛋白的分离与纯化。酵母能够识别所表达的蛋白的 Asn—Xaa—Thr/Ser 序列, 使蛋白质在合成过程中, 进入内质网后在小腔内进行初步糖基化作用, 然后在高尔基复合体内对糖蛋白上的寡聚糖核作进一步的修饰与调整, 并进行分拣, 直至将糖基化的蛋白质送往分泌粒导致分泌至蛋白的分子量比理论计算值大。在猪瘟兔化弱毒株的 E2 蛋白的 88, 116, 121 位存在三处 N—糖基化位点, 实验中所表达的蛋白质大于按氨基酸计算大小的理论值可以理解所表达的蛋白被糖基化的结果。事实上蛋白质的 N-糖基化分析证实了所表达的蛋白的确发生了糖基化。

由于我们的目的是要将表达产物用于检测猪血清中猪瘟疫苗抗体水平的高低。因此, Western-blot 试验的成功给了我们非常大的鼓舞。该肽段在经过 SDS-PAGE、再经电转移到 NC 膜上后, 已经处于变性状态, 仍然具有和抗猪瘟血清反应的能力, 这说明由毕赤酵母表达的肽段上存在一定数量的线性 B 细胞抗原表位。虽然已经证明, 病毒粒子的 E2 蛋白上, 具有很多构象型 B 细胞抗原表位, 然而, 也已经有了试验证明 E2 蛋白上存在线性 B 细胞抗原表位, 例如, 从 829 位到 837 位 (TAVSPT-TLR), 这个小肽段由于其在猪瘟病毒各毒株间的保守性而被认为具有一定的诊断价值^[10]。由于 E2 蛋白上的表位是固定的, 由线性 B 细胞表位所激发机体形成的抗体应该是和由构象型 B 细胞表位激发机体形成的抗体是成一定比例的, 一定程度上, 测定出由该种表位所产生的抗体, 也就了解了整个机体

对于 E2 蛋白、进而对于猪瘟疫苗所产生的抗体水平, 并且所选取的 A/D 区基因片段的原核表达产物已由苏小运等人证实有很好的反应原性^[11], 而根据 Christian 等^[12]中外实验结论, 酵母表达的 E2 蛋白将会是 ELISA 检测试剂盒的更佳的包被抗原, 因此, 这个多肽的成功表达对于研制监测猪瘟抗体水平的 ELISA 检测试剂盒具有巨大价值。

参考文献

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 第 4 版, 北京: 中国农业出版社, 2001, 147-153.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1997, 652-664.
- [3] 陈玉栋, 张楚瑜, 邹俊焯, 等. 建立快速定量检测猪瘟兔化弱毒苗的荧光定量 PCR 技术 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(2): 124-128.
- [4] 余兴龙, 涂长春, 李红卫, 等. 猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的构建及基因疫苗的研究 [J]. 中国病毒学, 2000, 15(3): 264-271.
- [5] 杨仁全. 猪瘟病毒 E2 糖蛋白抗原结构域的原核高效表达及表达产物提取 [D]. 南京: 南京农业大学, 2001, 34-35.
- [6] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1998, 237-325.
- [7] 剧海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较 [J]. 天津医药, 2003, (356): 270-272.
- [8] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review [J]. Yeast, 1992, 8: 423-488.
- [9] Barr K A, Hopkins S A, SreenishnAk. Protocol for efficient secretion of HAS developed from Pichia pastoris [J]. Pharm Eng, 1992, 12: 48-51.
- [10] Min Lin, Fang Lin, Mallery M, et al. Deletion of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibodies WH303 and N terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum [J]. Virology, 2000, 74: 11619-11625.
- [11] 苏小运, 缪德年, 许立华, 等. 猪瘟兔化弱毒 E2 蛋白 A/D 区的高效表达和蛋白纯化及其应用 [J]. 中国病毒学, 2003, 18: 164-168.
- [12] Moser C, Ruggli N, Tratschin J D, et al. Detection of antibodies against classical fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2 [J]. Vet Microbiol, 1996, 51: 41-52.