

犬冠状病毒 S 蛋白主要抗原区基因片断的表达及免疫原性*

乔 军^{1,3}, 夏咸柱^{1**}, 胡桂学², 杨松涛¹, 赵忠鹏¹, 谢之景¹, 黄 耕¹

(1. 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 2. 吉林农业大学动物科技学院, 吉林长春 130118; 3. 塔里木大学动物科技学院, 新疆阿拉尔 843300)

Expression of the Major Antigenic Region Fragment of Spike Gene of Canine

Coronavirus and Immunogenicity of Expressed Products

QIAO Jun^{1,3}, XIA Xian-zhu^{1**}, HU Gui-xue², YANG Song-tao¹, ZHAO Zhong-peng¹,
XIE Zhi-jing¹, HUANG Gen¹

(1. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medicine of PLA, Changchun 130062, China; 2. Department of Animal Science and Technology, Jinlin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Department of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China.)

Abstract: In this study, the major antigenic region of spike (S) gene of *Canine coronavirus* giant panda's isolate (CCV strain DXMV) was expressed in *Pichia pastoris*. The S1 gene fragment encoding major antigenic region of S protein was amplified and cloned into T vector, then subcloned into pPICZ α A for yeast expression. The recombinant pPICZ α AS1 was linearized with *Sac*I and then transformed into competence GS115 cells for expression under the induction of 1% methanol. The positive yeasts were screened by PCR. Expression of S1 protein was identified by SDS-PAGE and Western blot. The results revealed that it had a molecular weight of 106 kDa, which could be specifically recognized by multiclonal antibody against CCV. The expression of recombinant S1 protein amounted to 6.6-8.6% of the total protein of supernatant by gel scanning. After three immunization by the recombinant S1 protein, the neutralizing antibody in sera of mice can range from 1:8 to 1:16, which indicated that the recombinant S1 protein was of its immunogenicity.

Key words: *Canine coronavirus*; Major antigenic region of spike protein; Expression; Immunogenicity

摘要: 应用 *Pichia pastoris* 酵母表达了犬冠状病毒大熊猫野毒株 (CCV DXMV) S 蛋白主要抗原区基因片断。用特异性引物扩增出 CCV DXMV 株 S1 基因片断, 并将其克隆到 pGEM-T 载体中得到 pTS1。用 *Kpn*I 和 *Not*I 双酶切 pTS1 回收目的基因 S1 定向克隆到 pPICZ α A 中, 构建出重组质粒 pPICZ α AS1。将 pPICZ α AS1 用 *Sac*I 内切酶线性化后, 电转化感受态 GS115 酵母细胞, 用 PCR 法筛选阳性重组子。用 1% 的甲醇诱导重组酵母菌, 取培养物上清进行重组蛋白的检测。结果重组酵母菌培养物上清用 SDS-PAGE 电泳可检测到相对分子量为 106kDa 大小的重组蛋白, Western-blot 证实该重组蛋白可以与 CCV 多克隆抗体发生特异性血清学反应。凝胶薄层扫描分析表明, 3 株重组酵母菌在 1% 甲醇诱导 144h 后, 重组蛋白 S1 表达量约占培养物上清总蛋白量的 6.6-8.6% 左右。用重组蛋白 S1 免疫 BALB/C 小鼠 3 次后, 小鼠血清 CCV 中和抗体可达 1:8-1:16, 表明重组 S1 蛋白具有一定的免疫原性。

关键词: 犬冠状病毒, S 蛋白主要抗原区, 表达, 免疫原性

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0616-04

犬冠状病毒 (*Canine coronavirus*, CCV) 感染幼犬能引起急性胃肠炎^[1], 也可引起一些珍稀野生动

物发病^[2-6], 是对养犬业和野生动物保护业危害较大的一种病原。它由四种结构蛋白构成, 即纤突糖蛋

收稿日期: 2004-05-31, 修回日期: 2004-08-10

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.30000123)

作者简介: 乔 军 (1971-), 男, 新疆阿拉尔市人, 博士研究生, 主要从事分子病毒学研究。

** 通讯作者: 夏咸柱 (1939-), 男, 江苏盐城市人, 中国工程院院士, 主要从事动物病毒学研究。

Correspondence author: Tel: 0431-6986748; E-mail: xia_xianzhu@yahoo.com.cn

白(S)、膜蛋白(M)、小膜蛋白(SM)和核蛋白(N)。S糖蛋白暴露于病毒表面,一方面可与细胞表面的病毒受体结合引起细胞融合,另一方面可直接与机体免疫系统接触诱导机体产生中和抗体。因此, S糖蛋白一直是 CCV 诊断和疫苗研究的重要对象^[7]。国外 Horsburgh 等用真核表达系统成功表达了该蛋白,研制出 CCV 亚单位疫苗并申报了欧洲专利^[8],但国内尚未见到相关的报道。本研究应用 RT-PCR 技术扩增出编码 S 蛋白 A、B、C 和 D 四个抗原位点的基因片断,在毕赤酵母中首次实现了其分泌表达,为 CCV 特异性诊断和亚单位疫苗的研究奠定了良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒

CCV DXMV 株是本实验室胡桂学博士从四川某大熊猫保护中心病死的一只大熊猫肝脏中用 CRFK 和 F81 猫肾传代细胞分离而得到的,经系统的病毒学鉴定后保存^[6]。

1.2 质粒、菌株及主要试剂

毕赤酵母表达载体 pPICZ α A、克隆宿主菌 TOP₁₀、毕赤酵母表达宿主菌 GS115、DEPC、反转录酶 SuperScriptTM II RNase H 和 Zeocin 购自 Invitrogen 公司; T₄ DNA 连接酶、Ex TaqTM DNA 聚合酶、各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。pGEM-T 载体、RNasin 为 Promega 公司产品。CCV 阳性血清由 CCV DXMV 株细胞培养物超离浓缩后经 4 次免疫健康犬而获得,其中和抗体效价为 1:128。

1.3 引物设计

根据我们已经测定 CCV DXMV 株 S 蛋白全基因序列 (CenBank 登录号: AY436637),设计了一对特异性引物,用于扩增编码 S 蛋白 A、B、C 和 D 四个抗原表位的 S1 基因片断。上游引物 P1: 5'-CA GGTACCACCATTGTGCTTACATTGTGCC-3'; 下游引物 P2: 5'-GAGCGGCCGCTTAGAATATGTTATG ATAGG-3'。为下一步克隆需要,分别在上、下游引物中引入 Kpn I 和 Not I 酶切位点,并加有两个保护性碱基。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.4 CCV DXMV 株 S1 基因的扩增

总 RNA 用上海生工生产的总 RNA 提取试剂盒提取; RT 和 PCR 反应参照文献^[10]进行。

1.5 酵母表达载体的构建和鉴定

回收 S1 基因片断,并将其与 pGEM-T 载体 16℃连接过夜,转化大肠杆菌 JM109; 用限制性内切

酶酶切和 PCR 方法获得阳性重组质粒 pTS1, 送上海联合基因生物公司进行测序。将测序正确的 pTS1 和 pPICZ α A 用 Kpn I 和 Not I 酶切后分别回收目的片段和载体大片段进行连接反应,转化 TOP10, 使用含 Zeocin (25 μ g/mL) 的低盐平板培养。用限制性内切酶酶切和 PCR 方法获得阳性重组质粒 pPICZ α AS1。

1.6 酵母表达质粒 pPICZ α AS1 的转化、重组子及其表型鉴定

pPICZ α AS1 用 Sac I 进行线性化,回收线性化片断与冰预冷的感受态酵母菌 GS115 混匀,用 Bio-RAD Gene Pluser 在 375V/cm, 25 μ F、250 Ω 的条件下进行电转化。酵母重组子及其表型鉴定按照 Invitrogen 公司操作手册进行。

1.7 酵母重组子的诱导表达及表达蛋白的检测

选择表型为 Mut⁺ 的阳性重组子进行诱导。诱导用的培养基为 BMGY 和 BMMY。先将酵母重组子接种到 10mL BMGY 液体培养基中, 27℃, 170r/min 摇床培养, 到 OD_{600nm} 值为 2-6 之间时, 4000r/min 离心 10min, 弃上清。用 BMMY 稀释菌体到 OD 值为 1 左右, 27℃, 170r/m 进行 144h 培养, 并于诱导表达起始后, 每隔 24h 补加 20% 的甲醇溶液使其终浓度为 1%。将培养物上清用 Millipore 公司生产的超滤离心管除盐和 25 倍浓缩; 取浓缩产物 35 μ L 与等体积的 2 \times 上样缓冲液混匀 100℃煮沸 5min, 用 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析; 然后一抗用 CCV DXMV 株免疫犬多价血清、二抗用辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG 进行 Western-blot 分析。用双波长非点扫描仪对上述 SDS-PAGE 凝胶电泳的蛋白带进行扫描。

1.8 重组蛋白 S1 的浓缩及其动物免疫试验

将工程酵母菌在 BMMY 培养基中培养 144h 后, 离心收集培养物上清将其装入透析袋中, 先在 PBS 中 4℃透析 24h, 再用 PEG20000 进行 10 倍浓缩, 然后上 Sephadex G-25 柱除盐, 分装于灭菌的青霉素瓶中进行冷冻干燥浓缩, 用 Bradford 染料结合法测定总蛋白含量。12 只体重为 20~28g BALB/C 鼠分为 2 组, 每组 6 只, 一组为免疫组, 另一组为对照组。免疫前用灭菌生理盐水适当稀释干燥浓缩的重组蛋白与等量弗氏完全佐剂乳化, 按 50 μ g/只皮下注射免疫组 BALB/C 鼠, 间隔 15d, 以等量弗氏不完全佐剂注射, 共免疫 3 次。对照组按相同程序注射灭菌生理盐水。在第 3 次免疫 15d 后, 进行眼眶采血, 分离血清, 按文献^[11]进行 CCV 中和抗体的测定。

2 结果

2.1 CCV DXMV 株 S1 基因的扩增

经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, CCV DXMV 株 RT-PCR 产物大小约为 2415bp, 与预期结果相符。

2.2 酵母真核表达载体 pPICZ α AS1 的构建与鉴定

重组子 pPICZ α AS1 分别用 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切, 可得到 3600bp 和 2415bp 两个片段; 用 *Xho* I 和 *Not* I 酶切线性化可得到 6015bp 大小的核酸片段 (图 1)。以重组子 pPICZ α AS1 为模板, 用 PCR 进行扩增, 可得到 2415bp 大小的核酸片段, 表明该重组质粒构建正确。

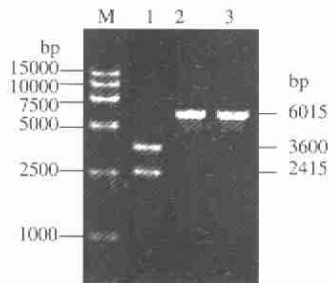


图 1 pPICZ α AS1 酶切鉴定结果

Fig.1 Identification of pPICZ α AS1 by enzyme digestion

M, D, L-15000; 1, pPICZ α AS1/*kpnI*+*Not* I; 2, pPICZ α AS1/*Xho* I; 3, pPICZ α AS1/*Not* I.

2.3 Mut⁺表型重组酵母菌的筛选及 PCR 鉴定

电转化感受态酵母菌 GS115, 转化菌经 MDH/MMH 平板筛选, 挑选 Mut⁺表型酵母菌用于 PCR 鉴定。用玻璃珠法提取酵母基因组 DNA, 用 S1 基因测序用的内侧特异性引物进行 PCR 扩增来筛选鉴定重组子, 结果筛选得到了 3 株重组酵母菌 (图 2)。

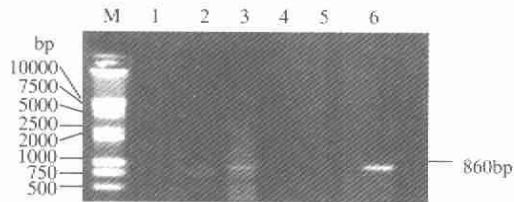


图 2 阳性酵母重组子的 PCR 鉴定结果

Fig.2 Identification of positive yeast by PCR

M, D, L-15000+2000; 1/4/5, Negative unrecombinant yeasts; 2/3/6, Positive recombinant yeasts.

2.4 重组蛋白 S1 的 SDS-PAGE 及 Western-blot 检测

3 株重组酵母菌经 1% 甲醇诱导 144h 后, 收集培养基上清用 Millipore 公司生产的超滤离心管除盐和浓缩后进行 SDS-PAGE 分析, 结果发现在培养基上清中可检测到分子量为 106 kDa 大小的目的蛋

白 (图 3 中 1-3 道)。用 CCV DXMV 株多克隆抗体对酵母表达产物进行 Western blot 分析, 发现表达的重组蛋白可以和 DXMV 株多克隆抗体发生特异性血清学反应 (图 3 第 7 道箭头所示)。凝胶薄层扫描分析表明, 3 株重组酵母菌在 1% 甲醇诱导 144h 后, 重组 S1 蛋白表达量分别占培养物上清总蛋白量的 8.6%、6.8% 和 6.6% 左右。

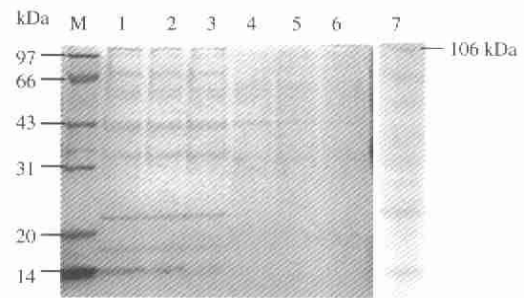


图 3 pPICZ α AS1 转化菌 GS115 表达产物 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 分析

Fig.3 Analysis of SDS-PAGE of expressed S1 protein and its Western-blot

M, Low molecular protein (97, 66, 43, 31, 20, 14 kDa); 1-3, Induced positive recombinant yeast; 4, Uninduced positive recombinant yeast; 5, Induced unrecombinant yeast; 6, Induced normal yeast GS115; 7, Western-blot analysis;

2.5 重组蛋白动物免疫试验

6 只经重组蛋白 S1 免疫的 BALB/C 鼠, 其血清中 CCV 中和抗体分别在 1:8-1:16 之间, 而对照组 CCV 中和抗体为阴性。结果表明, 表达的重组蛋白 S1 具有一定的免疫原性。

3 讨论与小结

CCV 是目前冠状病毒血清 I 群中研究很少的病毒, 对其 S 蛋白主要抗原位点的研究尚未见到报道。猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 是与 CCV 同属冠状病毒 Group 1 的病毒, 与 CCV 抗原关系极近, 目前对其 S 蛋白抗原位点的研究较多。Correa 和 Delmas 等通过试验证明, TGEV S 蛋白上有 A、B、C、D 4 个抗原位点, 并且 4 个位点都位于 S 蛋白 N 端的 543 个氨基酸残基之内^[12,13]。Falima 等通过应用单克隆抗体竞争试验发现, S 蛋白存在三种水平的抗原结构, 即抗原位点、抗原亚位点和抗原决定簇^[14]。A 位点又可分为 Aa、Ab 和 Ac 3 个亚位点, A 位点缺失可导致 S 蛋白丧失诱导中和抗体的能力。氨基酸残基 534、591 和 543 位对 Aa、Ab 和 Ac 亚单位的形成分别起关键作用, 而氨基酸残基 586 位同时影响 Aa、Ab 亚位点的形成^[14], 这表明 A 位点具有

复杂的空间构象。B 抗原位点在 97-144 氨基酸内, 依赖于细胞内糖基化, 也具有复杂的空间结构。C 抗原位点是连续的线状结构, 其中 50-51 氨基酸是形成该位点的关键氨基酸。D 位点位于残基 378-392 位区域, 至少有 2 个抗原决定簇, 第 358 位甘氨酸残基对 D 位点的构象影响较大。糖基化对 A、B 两位点的形成是必须的, 而 C 和 D 位点不依赖糖基化^[15]。根据 TGEV S 蛋白单克隆抗体对 S 蛋白主要抗原位点定位与糖基化位点的相关性分析, 我们推测 CCV DXMV 株 S 蛋白 Aa、Ab、Ac、B1、B2 五个抗原亚位点的形成可能分别与 N 端 537-539、557-559、566-568、14-16、94-96 位糖基化位点密切相关。在本试验中, 我们对推测的编码 CCV DXMV S 蛋白 A、B、C 和 D 位点的基因片断在毕赤酵母中实现了分泌表达, 并且通过动物免疫试验证实表达的重组蛋白具有一定的免疫原性。

酵母表达系统是一种低等的真核表达系统, 尽管它相比于原核表达系统具有完整的蛋白表达和加工修饰功能(如糖基化), 相比于杆状病毒和哺乳动物细胞表达系统又具有快速、简单、成本低等优点, 但我们在试验中发现, 影响酵母分泌表达外源蛋白量的因素很多, 除受限于表达载体本身之外, 还与培养基 pH 值、甲醇浓度、诱导方式及目的基因内在因素有关。在本试验中表达的重组 S1 蛋白表达量总体来说还是偏低, 纯化较为困难。因此, 优化表达条件进一步提高重组蛋白表达量使其实用化是我们下一步研究的重点。

参考文献

- [1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社. 1997, 671-703.
- [2] Tennant B J, Gaskell R M, Jones R C, *et al.* Studies on the epizootiology of canine coronavirus[J]. *Veterinary Record*, 1993, 132: 7-11.
- [3] Mainka S A, Qiu X, He T, *et al.* Serologic survey of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), and domestic dogs and cats in the Wolong Reserve, China[J]. *J Wildlife Dis*, 1994, 30: 86-89.
- [4] 何爱华, 杜胜芳, 林桂华, 等. 首次从腹泻熊猫粪便中检出冠状病毒简报[J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, 4(3): 4.
- [5] 高凤山, 胡桂学, 夏咸柱, 等. 联合 PCR 诊断大熊猫犬瘟热和犬冠状病毒的混合感染[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25: 91-93.
- [6] 胡桂学, 高凤山, 高玉伟, 等. 大熊猫犬冠状病毒的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(2): 202-207.
- [7] Pratelli A, Elia G, Decaro N, *et al.* Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus type I[J]. *J Virol Methods*. 2004, 117: 61-65.
- [8] Horsburgh B C, Brown T D. Cloning, sequencing and expression of the S protein gene from two geographically distinct strains of canine coronavirus[J]. *Virus Res*, 1995, 39: 63-74.
- [9] Horsburgh B C. Canine coronavirus subunit vaccine[P]. Europe: EP0510773, 2003.
- [10] 乔 军, 孟庆玲, 夏咸柱, 等. 犬瘟热、犬冠状病毒联合 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 西南农业学报, 2002, 15: 93-95.
- [11] 范志强, 夏咸柱, 武银莲, 等. 检测犬冠状病毒中和抗体的方法与应用[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20: 357-360.
- [12] Correa I, Jimenez G, Sune C, *et al.* Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus[J]. *Virus Res*, 1988, 10: 77-94.
- [13] Delmas B, Rasschaert D, Gtodet M, *et al.* Four major antigenic site of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1313-1323.
- [14] Falima G, Willewp A, Correa C, *et al.* Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis virus S glycoprotein[J]. *J Virol*, 1991, 183: 225-238.
- [15] Simpkins R A, Weinau P A, Bias J, *et al.* Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV[J]. *Am J Vet Res*, 1992, 53: 1253-1258.