

乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株 E 蛋白主要抗原片段的高效表达

葛菲菲¹, 邱亚峰¹, 杨耀武², 陈溥言^{1**}

(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. 中国预防医学科学院病毒研究所, 北京 100052)

High Level Expression of Major Antigenic Segment of Japanese

Encephalitis Virus Strain SA 14-14-2 E Protein

GE Fei-fei¹, QIU Ya-feng¹, YANG Yao-wu², CHEN Pu-yan^{1**}

(1. Key Laboratory of Animal Diseases Diagnosis & Immunology of China's Department of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, 100052, China)

Abstract : Based on a constructed prokaryotic expression plasmid which carries a major antigenic segment of E gene of JEV strain SA14-14-2 in our lab, we expressed the gene in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The segment was chosen based on an analysis provided by a computer software because of its higher antigenic index. The segment was 1113bp, encoding 371 aa. The gene was subcloned into the vector pPICZ-A. The constructed plasmid was transformed into yeast X-33 by electroporation. The recombinant transformants were selected by Zeocin. Induced by the addition of methanol every 24h, the product analyzed by SDS-PAGE was about 44kDa and 50kDa at a yield of 290 mg per liter of culture. The result of Western blotting indicated that the two bands both have specific antigenicity mainly owing to heterogeneous glycosylation. Coating with the supernatant, we can easily discriminate the positive serum from the negative, which should be useful for the production of diagnostic agents and genetically engineered vaccine of JEV.

Key words Japanese Encephalitis virus SA 14-14-2 strain; Major antigenic segment of E protein; *Pichia pastoris*; High expression

摘要: 在本实验室已构建的原核表达载体(含乙脑疫苗株 SA14-14-2 株 E 蛋白基因主要抗原片段)的基础上用巴斯德毕赤酵母系统表达, 该片段长 1113bp, 编码 371 个氨基酸残基, 将其亚克隆入酵母表达载体 pPICZ-A, 以电穿孔法转化酵母 X-33, 用 Zeocin 平板筛选重组子, 经甲醇诱导表达后, SDS-PAGE 和免疫印迹分析表达产物。由于糖基化不同, 所表达产物有两种, 其相对分子质量分别为 44kDa 和 50kDa, 表达量较高, 约为 290mg/L, 经 Western 印迹验证, 有较好的抗原性。在 ELISA 试验中, 我们直接以 PBS 透析后的酵母上清液包被, 能够很明显地区分出乙脑阴阳性血清, 与 RT-PCR 检测的相符率达 95%, 为制备 JEV 的诊断抗原和基因工程疫苗提供了依据。

关键词: 乙脑疫苗株 SA14-14-2 株; E 蛋白基因主要抗原片段; 巴斯德毕赤酵母; 高效表达

中图分类号: R 373.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)02-0117-04

流行性乙型脑炎(简称乙脑)是由蚊虫传播引起人类的中枢神经系统感染的病毒性疾病, 其病死率高(20%~30%), 后遗症较重^[1~4]。在动物中, 猪对 JEV 的感染最普遍, 它与蚊形成了蚊、猪循环传播模式, 血清学检测猪抗体阳性率达 90%以上^[5]。随

着乙脑疫苗的使用, 其发病率已有所下降, 但灭活疫苗缺乏长效免疫, 必须多次加强接种, 有可能导致过敏反应, 而且制备费用较高^[6]。因此, 基因工程表达的 JEV E 蛋白有望成为标准化的诊断抗原。目前, 大肠杆菌类原核表达系统虽然较为成熟, 但其表达

收稿日期: 2004-10-08, 修回日期: 2004-11-22

* 基金项目: 国家自然科学基金(30340013); 广东省科技攻关项目(532014202028)

作者简介: 葛菲菲(1980-), 女, 江苏泰州籍, 博士生, 研究方向为分子病毒学与免疫学。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

产物以包涵体形式存在,无转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,昆虫细胞表达存在不正确糖基化,并且还有产物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抗原。近年建立的毕赤酵母表达系统,避免了上述系统的缺陷,已广泛用于包括多种病毒抗原的外源蛋白的表达。本试验中巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种甲醇酵母,它可以在以甲醇为唯一碳源和能源的培养基中生长,AOX 启动子的强诱导性使它下游的外源基因易于调控,并具有很高的表达率,表达载体上 因子信号肽序列使外源蛋白得以分泌表达,采用 Zeocin 药物抗性基因筛选阳性转化子。为了制备 JEV 基因工程重组疫苗及建立简便、快速的免疫学诊断方法,我们构建了 JEV E 蛋白主要抗原片段^[7]的酵母表达载体并得到了高效表达,其表达产物能很好地区分乙脑阴阳性血清,与 RT-PCR 检测基本相符。

JEV 属黄病毒科成员,其基因组为单股正链 RNA,长约 11kb,含单一开放阅读框^[8]。编码一个全长 3432 个氨基酸的多蛋白前体。该多蛋白前体经蛋白酶切割加工,产生 3 个结构蛋白:核衣壳蛋白(C)、膜蛋白(PrM/M)、囊膜糖蛋白(E);7 个非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)。E 蛋白基因大小为 1500bp,编码 500 个氨基酸残基,囊膜糖蛋白 E 是主要的毒粒抗原,参与病毒复制的许多重要过程,包括结合受体、膜融合及毒粒包装等^[6];E 蛋白上有特异性抗体的中和表位,可诱导免疫动物产生中和抗体。目前,针对黄病毒的疫苗也大多为含有 E 蛋白中的抗原表位。

1 材料和方法

1.1 实验材料

酵母 X-33, PET-E 原核表达载体为本实验室杨耀武构建,质粒 pPICZ-A, *EcoR*, *Xba* 和 *Sac* 限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司,PCR 引物由上海博亚公司合成,乙脑阳性血清购自华南农业大学,HRP-SPA 为武汉博士德生物工程有限公司产品,低盐 LB 液体、固体培养基,YPD, YPDSZ⁺ 液体、固体培养基, BMGY, BMMY, 电穿孔仪、电泳仪、电转仪均为 BioRad 公司产品。

1.2 真核表达载体的构建

根据 E 蛋白主要抗原片段的序列,重新设计一

对引物,

p1(5): 5-GAATTCATCCTCCTGCTGTTGGTC-3

p2(3): 5-TCTAGAACGAAGGGGTTCACTGTCAC-3

5 端带有 *EcoR* 位点,3 端带有 *Xba* 位点,以 pET-E 为模板,扩增 PCR 产物,将 pPICZ-A 与 E 蛋白主要抗原片段连接,转化大肠杆菌,铺低盐 LB 平板(含 Zeocin)筛选重组子,用酶切方法鉴定。质粒中外源基因的序列测定由上海博亚生物公司完成。

1.3 电穿孔转化

将 5-10 μ g 重组质粒及载体对照分别用 *Sac* 内切酶线性化,经过酚/氯仿抽提和乙醇/醋酸钠沉淀、洗涤后溶于 10 μ L 灭菌超纯水中,-20 存放备用。制备酵母 X-33 感受态细胞,并与线性化质粒混合后,置冰上 5min,用电穿孔仪电击后(1 500V、25 μ Fa、200 μ s),迅速加 1mL 山梨糖醇(1.0mol/L)混匀,30 温育 1h-2h,涂布于 YPDSZ⁺ 平板上,3-4d 后观察。

1.4 毕赤酵母中外源基因整合的 PCR 检测

从 YPDSZ⁺ 平板上挑取了六个重组质粒的转化子和一个空载体的转化子到 YPDSZ⁺ 液体培养基中,30 震荡培养,离心,弃上清,用 PBS 将菌体洗一遍,100 μ L TE 吹起菌体,100 煮 10min,-20 冻 1h,再 100 煮 10min,12 000r/min 离心 5min,收集上清,用作模板,-20 存放备用。引物为:

p1(5): 5-GACTGGTTCCAA TTGACAA GC-3

P2(3): 5-GCAAA TGGCA TTCTGACA TCC-3

在 DNA 扩增仪上的 PCR 循环反应条件:95 预变性 5min,94 变性 1min,54 退火 1min,72 延伸 4min,30 个循环,72 延伸 10min,冷却至 4,结束反应。在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,观察扩增结果。

1.5 E 蛋白主要抗原片段在毕赤酵母中的表达

将 PCR 鉴定为阳性的重组子转到 BMGY 内,30 震荡诱导培养,当 $OD_{600} = 2 \sim 6$ 时,离心,换 BMMY 培养基,30 振荡诱导培养,每 24h 补加终浓度为 5mL/L 甲醇。取不同时间段的培养液,离心、留上清,置 -70 保存。取 50 μ L,加等量 2 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 5min 后,进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 表达产物的免疫印迹检测

样品经 SDS-PAGE 后,用电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,以猪乙脑阳性血清为一抗,参照文献^[9]的方法进行蛋白免疫印迹检测。

1.7 用表达产物进行 ELISA 检测

由于本试验中表达的外源蛋白较纯且呈分泌表达,所以我们直接将表达上清用 PBS 进行透析,在 GeneQuant pro RNA/DNA Calculator 定量后就用于抗原包被,对由常州康乐猪场提供的 22 份猪的待检血清进行了 ELISA 检测,每孔以 10pmol 的 E 蛋白主要抗原片段包被板子,将待检血清和猪的阴性血清同时以 1:50,1:100,1:200,1:400 进行倍比稀释,以 HRP-SPA 作为二抗,最后加入底物 OPD 显色,以 2mol/L 的 H_2SO_4 终止,同时将这 22 份血清样对应的组织病料用 RT-PCR 进行检测,所用引物即为本研究中用于扩增 E 蛋白主要抗原片段的引物。

2 结果

2.1 E 蛋白主要抗原片段的 PCR 结果

经琼脂糖凝胶电泳检测,有一条大小为 1.1kb 左右(1131bp)的电泳带,与预期大小相符。

2.2 重组表达载体的鉴定

用 *EcoR* 和 *Xba* 双酶切消化,经琼脂糖凝胶电泳检测,可见两条大小分别为 3.6kb 和 1.1kb 左右的片段(图 1),与预期结果相符。将该重组表达载体命名为 pPICZ-E,经测序,外源基因的阅读框和方向正确。

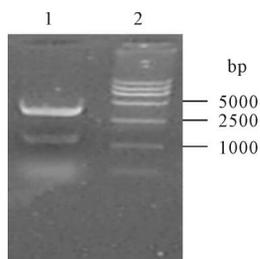


图 1 表达载体 pPICZ-E 的双酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme identification of pPICZ-E
1, pPICZ-E digested by *EcoR* and *Xba*; 2, Marker (DL2000)

2.3 电转化后 PCR 的鉴定结果

在挑取的六个转化子中有两个可扩增出预期大小 1.7kb 的片段,而阴性对照扩增出预期大小约 0.6kb 的条带(pPICZ-A 自身带有的),表明外源基因已稳定地整合入毕赤酵母细胞中(图 2)。

2.4 E 蛋白主要抗原片段在酵母中的表达

将已鉴定好的两个阳性克隆 pPICZ-E/X-33 进行诱导表达 48h 后,取表达上清直接进行 SDS-PAGE,同时以 pPICZ-A/X-33 为参照,电泳结果见图 3,阳性转化子的表达上清在 44kDa,50kDa 处各有一条带,而 pPICZ-A/X-33 上清没有相应的蛋

白条带。

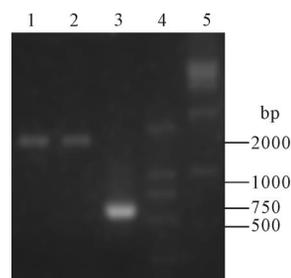


图 2 电转化后 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of transformants by PCR
1/2, Identification of pPICZ-E/X-33 by PCR; 3, Identification of pPICZ-A/X-33 by PCR; 4, Marker (DL2000); 5, Marker.

2.5 E 蛋白主要抗原片段的免疫印迹检测

用猪乙脑阳性血清进行蛋白印迹,显示出两条蛋白带,其分子量约为 44kDa 和 50kDa(图 4),表明这两条糖基化程度不同的蛋白均具有较好的抗原性。

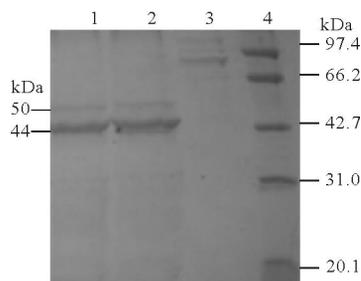


图 3 表达的 JEV E 蛋白主要抗原片段的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the expressed major antigenic segment of E protein by SDS-PAGE

1/2, Supernatant of pPICZ-E/X-33; 3, Supernatant of pPICZ-A/X-33; 4, Protein marker

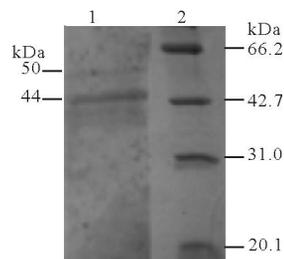


图 4 表达的 JEV E 蛋白主要抗原片段的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of the expressed major antigenic segment of E protein

1: Supernatant of pPICZ-E/X-33; 2: Protein marker

2.6 ELISA 检测结果

以待检血清的 OD 值与阴性血清的 OD 值之比大于等于 2 者判定为阳性,用此方法共检出 19 份阳性血清;RT-PCR 结果以能扩增出约 1.1kb 的片段为阳性,共检出 18 份阳性病料。这两种方法检出的阳性率利用 SPSS 软件分析,结果表明两者差异不

显著。

3 讨 论

JEV 属黄病毒科成员,黄病毒具有单股 RNA,球形,有包膜,直径约为 40nm,通常靠媒介传播,已确定 JE 病毒特异性及交叉反应性中和表位位于包膜蛋白上,囊膜糖蛋白 E 是主要的毒粒抗原。E 蛋白氨基酸序列具有高度保守但有局部区域的多变性,这一特性可用单克隆抗体来进行分组和分型。E 蛋白是毒粒表面最重要的成分,由它形成的表面抗原决定簇,具有血凝活性和中和活性。E 蛋白与病毒的毒力、宿主范围、组织嗜性、膜融合、保护性免疫、血凝反应和血清特异性有关。

本实验室是根据计算机软件分析,选取了一段抗原决定簇指数较高的区域作为 E 蛋白的主要抗原片段,由于毕赤酵母表达系统具有糖基化适中、内源性蛋白分泌少、营养要求低及生长密度高等优点,已有多种病毒糖蛋白在该系统中成功表达。所以我们在该系统中表达了 JEV E 蛋白的主要抗原片段并能获得较高的产量,并且其表达上清只要经 PBS 透析后即可用来作为诊断抗原。此外,通过 SDS-PAGE 和免疫印迹结果表明,所表达产物显示两条反应条带,可能为不同程度的糖基化所致。Huecas 等^[10]报道毕赤酵母表达的产物有 4 种不同程度的糖基化现象。Scorer 等^[11]用毕赤酵母分泌表达 HIV env gp120 蛋白时,发现表达产物为多达几十种不同程度糖基化的蛋白,它们的分子量为 30.0 ~

200.0 kDa 不等。因此,我们已成功地为快速大量制备 JEV 的诊断抗原和基因工程重组疫苗打下基础。

参考文献

- [1] Woan R C, Robert B T, Rebaca R R H. Genetic Variation of Japanese encephalitis virus in Nature[J]. J. Gen Virol. 1990. 71:2915.
- [2] Konish E, Pincus S, Paoletti E *et al.* Avipoxvirus-vectored JEV vaccine[J]. Vaccine, 1994, 12(7):633.
- [3] 陈焕春. 规模化养猪场疫病控制与净化[M]. 北京:中国农业出版社, 2000, 187.
- [4] 黄庆生, 马文煜, 姜绍諄, 等. 逆转录-半套式-聚合酶链反应在乙脑早期诊断中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1998, 14(4):258.
- [5] 赵书广, 中国养猪大成[M]. 北京:中国农业出版社, 2001, 936.
- [6] 吴玉水, 马文煜, 朱忠勇. 日本脑炎病毒基因疫苗研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(5):512-514.
- [7] 杨耀武, 齐香荣, 陈德胜, 等. 流行性乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株 E 蛋白基因在原核细胞中的高效表达及其表达产物的抗原性分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5):31-35.
- [8] 谢 飞, 兰风华, 朱忠勇. 人血浆因子 v 蛋白免疫印迹分析及其临床应用[J]. 中国实验诊断学, 2002, 6(2):98-99.
- [9] J 萨姆布鲁克, E. F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1999. 845-888.
- [10] Huecas S, Villalba M, Gonzalez E, *et al.* Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*[J]. Eur J Biochem, 1999, 261(2):539-545.
- [11] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J, *et al.* The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gene, 1993, 136(1-2):111-119.