

伪狂犬病病毒闽 A 株 gE 基因去信号肽片段在 *Pichia pastoris* 中的表达*

敖敬群¹⁾ 王瑾雯¹⁾ 陈新华²⁾ 王珣章¹⁾** 龙紫新¹⁾ 娄高明³⁾

(¹⁾中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275; ²⁾国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005;

³⁾广东省兽医生物技术重点实验室, 广州 510640)

摘要 伪狂犬病病毒囊膜糖蛋白 E 是一种在伪狂犬病根除计划中具有重要作用的糖蛋白。将伪狂犬病病毒闽 A 株 gE 基因去信号肽片段克隆到巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达载体 pPICZaA 中, 获得的重组表达载体 pPICZaA-FL 电击转化野生型酵母菌 SMD1168 后, 得到多株酵母工程菌 SMD1168/pPICZaA-FL。经高浓度 ZeocinTM 筛选、表型鉴定、工程菌的诱导表达及表达产物的鉴定, 最后得到高效表达 gE 基因去信号肽片段的酵母工程菌 SMD1168/pPICZaA-FL-7。工程菌 72 h 培养上清的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与蛋白质印迹结果显示, gE 基因去信号肽片段表达产物大小约为 80 ku, 比预期的 63.8 ku 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 13.49%, 表达量可达 11.7 mg/L。间接 ELISA 结果表明重组表达产物具有良好的抗原性, 能够有效地区分伪狂犬病病毒 gE 标准阳性与阴性血清。

关键词 伪狂犬病病毒, gE 基因去信号肽片段, *Pichia pastoris* 表达系统, 抗原性

学科分类号 Q786

伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 是引起猪伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 的病原体, 该病在世界许多国家包括我国广泛流行, 给世界畜牧业尤其是养猪业造成了巨大的经济损失。近年来, 伪狂犬病在我国的发病率呈现明显的上升趋势^[1]。PRV 编码的糖蛋白 E (glycoprotein E, gE) 因其独特的生物学特性在伪狂犬病的预防与监测过程中具有重要作用^[2,3]。目前, 欧美各国在伪狂犬病根除计划中均采用 PRV gE 基因缺失疫苗与 gE 抗体血清学鉴别诊断配合使用的策略, 其中 gE 抗体的血清学鉴别诊断主要采用 gE-ELISA。商品化的 gE-ELISA 试剂盒多将体外培养的 PRV 病毒粒子经初步浓缩纯化后作为包被抗原, 这种抗原制备方法需在体外大量培养有感染能力的活病毒, 操作过程繁琐且具有一定的危险性。使用基因工程方法获得 gE 基因的重组表达产物作为抗原, 可降低抗原的制备成本, 并避免直接操作 PRV 带来的潜在隐患。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是近年来新发展起来的一种高效蛋白质表达体系, 兼具原核与真核表达系统的优点——操作简单, 培养费用低廉, 不需要昂贵的仪器设备, 表达量高, 能够对外源基因表达产物进行接近于高等真核生物的翻译后加工修饰^[4,5], 因此在各种重组蛋白的生产上颇受青睐。PRV 闽 A 株是我国分离最早、生物学特

性研究得最为详尽的 PRV 毒株^[6], 其 gE/TK 双基因缺失疫苗已研制成功并通过了国家科技部的成果鉴定, 但目前还没有与之配套的血清学检测方法。本文将其 gE 基因去信号肽片段插入 *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZaA 中, 在酵母 α -factor 信号肽的引导下实现了此片段的分泌表达, 表达产物经简单的透析脱盐处理即可包被酶标板进行 ELISA 反应, 并能有效区分 PRV gE 标准阳性与阴性血清, 为下一步建立 gE-ELISA 血清学检测方法打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 含 PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段的质粒 pMD18-T-FL 由本实验室构建并保存^[7]; *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZaA, 大肠杆菌 TOP10F', 野生型巴斯德毕赤酵母 SMD1168 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂与仪器: 高保真 Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Eco*R I、*Xba* I、DNA 分子质量标

* 国家“九五”科技攻关项目 (96-C01-04-03) 和国家自然科学基金资助项目 (39600109)。

** 通讯联系人。

Tel: 020-84113964, Fax: 020-84113964

E-mail: wxz@zsu.edu.cn

收稿日期: 2002-12-23, 接受日期: 2003-01-28

准 DL-2000、DL-15 000 购自大连宝生物工程公司. T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司. 限制性内切酶 *Bst*E II 购自 NEB 公司. DAB (3,3'-二氨基联苯二胺)、TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯二胺) 购自 Sigma 公司. ZeocinTM 购自 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. 其余试剂为国产分析纯. 硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司. QIAquick 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司. 酶标板为德国 Greiner 公司产品. 测定 A_{450} 值所用酶联免疫检测仪为 Bio-Rad 公司 Model 550 Microplate Reader.

1.1.3 血清与抗体: 猪抗 PRV 抗血清、HRP 标记的鼠抗猪 IgG 第二抗体由华中农业大学畜牧兽医学院病毒室惠赠. PRV gE 标准阳性与阴性血清由广东省兽医生物技术重点实验室提供.

1.2 方法

1.2.1 引物设计与 PCR 扩增: 根据 PRV 闽 A 株 gE 基因序列^[7] 与表达载体 pPICZαA 的特点设计合成了一对引物. P_1 (5' CG GAATTC GAG GCC CCG AGC CTC TCC GCC 3'), 引入 *Eco*R I 位点; P_2 (5' GC TCTAGA GCG GGG CGG GCA TTC AAC AG 3'), 引入 *Xba* I 位点. 引物间距约 1 674 bp, 包括 PRV 闽 A 株 gE 基因 64~1 734 bp 的去信号肽片段, 由上海生工生物工程有限公司合成. 以 pMD18-T-FL 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序如下: 95℃ 预变性 5 min 后, 按 95℃ 1 min, 65℃ 1.5 min, 72℃ 2 min 进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, QIAquick DNA 凝胶回收 Kit 回收目的 DNA.

1.2.2 重组表达载体 pPICZαA-FL 的构建: PCR 产物经回收并用 *Eco*R I + *Xba* I 双酶切后, 与同样酶切后回收的 pPICZαA/*Eco*R I + *Xba* I 载体大片段进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 Top10F' 感受态细胞, 得到重组表达载体 pPICZαA-FL. 利用 *Eco*R I/*Xba* I、*Eco*R I/*Bst*E II 对 pPICZαA-FL 质粒 DNA 进行双酶切鉴定, 利用 pPICZαA 载体两端的 5'、3' AOX1 引物对其进行序列测定. 具体操作参照文献 [8].

1.2.3 酵母菌的电击转化及转化子的筛选: 重组表达载体 pPICZαA-FL 经 *Sac* I 酶切线性化后, 电

穿孔法转化野生型酵母菌 SMD1168, 转化混合液涂布含低浓度 ZeocinTM (100 mg/L) 的 YPDS 平板, 得到多个酵母转化子. 在含高浓度 ZeocinTM (500 mg/L) 的 YPDS 平板上划线培养筛选高拷贝转化子, 在 MM 与 MD 平板上进行转化子的表型鉴定, 具体操作参见 EasySelectTM *Phicia* Expression Kit 操作手册. 表型鉴定为 Mut⁺ 的高拷贝转化子用于下一步的诱导表达.

1.2.4 工程菌的诱导表达及表达产物的鉴定: 挑取 Mut⁺ 表型的高拷贝转化子于 BMGY 培养基中培养至 A_{600} 在 2~6 之间, 3 000 r/min 离心 5 min, 加 BMMY 培养基悬浮至 A_{600} 为 1, 转至三角锥形瓶, 以 3 层无菌纱布封口, 30℃ 250 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 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清保存于 -80℃ 或立即用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白质印迹分析.

培养上清的 SDS-PAGE 及蛋白质印迹操作参见文献 [8], 凝胶的快速银染法及 Bradford 蛋白质总含量测定方法参见文献 [9].

1.2.5 表达产物的抗原性测定: 工程菌诱导 72 h 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 PRV gE 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 1:5, HRP-标记的鼠抗猪 IgG 稀释倍数为 1:8 000, 间接 ELISA 反应程序参照文献 [10, 11] 略加修改, 显色底物为 TMB, 室温显色 10 min 后用 1 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 读取 A_{450} 值.

2 结 果

2.1 重组表达载体 pPICZαA-FL 的构建

以含 PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段的 pMD18-T-FL 质粒 DNA 为模板, 按 1.2.1 中方法进行 PCR 扩增后, 电泳结果显示 PCR 产物大小约为 1 700 bp (图略), 与预期大小一致. 将此 PCR 扩增产物经 *Eco*R I + *Xba* I 双酶切后, 插入到表达载体 pPICZαA 的 *Eco*R I、*Xba* I 酶切位点之间, 得到重组表达载体 pPICZαA-FL. *Eco*R I/*Xba* I、*Eco*R I/*Bst*E II 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正确.

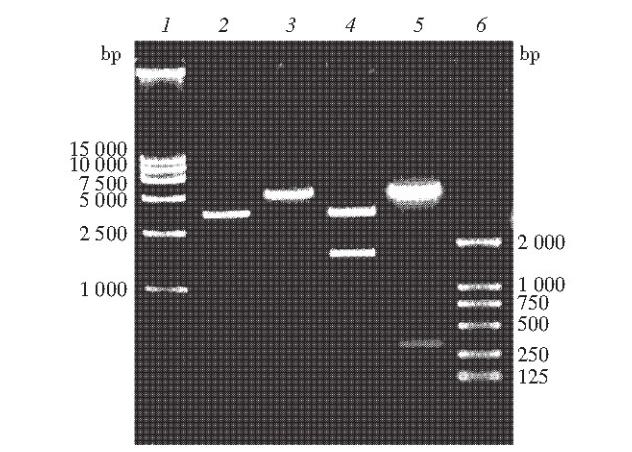


Fig. 1 Characterization of recombinant expression vector pPICZαA-FL by restriction enzyme digestion
1: DL-15 000 marker; 2: pPICZαA/*EcoR* I (3 593 bp); 3: pPICZαA-FL/*EcoR* I (5 213 bp); 4: pPICZαA-FL/*EcoR* I + *Xba* I (3 523 bp, 1 690 bp); 5: pPICZαA-FL/*EcoR* I + *BstE* II (4 930 bp, 274 bp); 6: DL-2 000 marker.

2.2 酵母工程菌 SMD1168/pPICZαA-FL 的获得
重组表达载体 pPICZαA-FL 转化野生型酵母菌 SMD1168 后在低浓度 YPDS Z⁺ 平板上得到多个转化子, 经高浓度 YPDS Z⁺ 平板筛选与表型鉴定后, 得到数个表型为 Mut⁺ 的高拷贝转化子, 将这些转化子命名为 SMD1168/pPICZαA-FL.

2.3 工程菌的诱导表达及表达产物的鉴定
工程菌 SMD1168/pPICZαA-FL 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, 与对照菌株 SMD1168/pPICZαA 相比, 各工程菌的培养上清在 97 ku 与 66 ku 之间均有多条差别带出现 (图 2). 取其中两个工程菌株的培养上清进一步利用猪抗 PRV 抗血清进行蛋白质印迹分析, 两者在约 80 ku 处均出现一条特异性的反应带 (图 3). 对比蛋白质印迹与 SDS-PAGE 结果, 可判定 gE 基因去信号肽片段在各工程菌中都可表达, 其中在 7 号菌株培养上清 (图 2 中第 5 泳道, 图 3 中第 3 泳道) 中的表达量要高于其他菌株. PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段内存在 4 个潜在的 N-糖基化位点, 而酵母的翻译后糖基化修饰过程正好以 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.

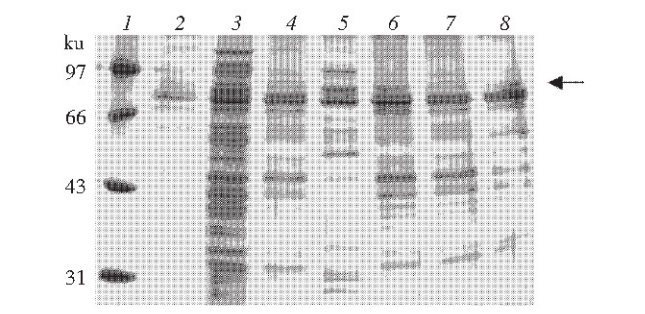


Fig. 2 SDS-PAGE of culture supernatant of SMD1168/pPICZαA-FL
1: protein molecular mass standards; 2: culture supernatant of SMD1168/pPICZαA; 3~8: culture supernatant of different SMD1168/pPICZαA-FL.

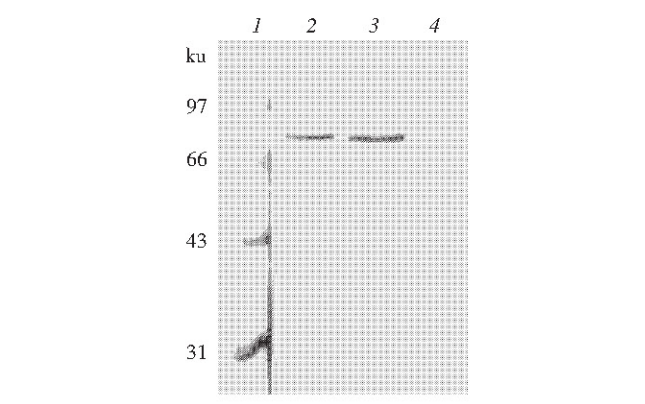


Fig. 3 Western-blot of culture supernatant of SMD1168/pPICZαA-FL
1: protein molecular mass standards; 2, 3: culture supernatant of different SMD1168/pPICZαA-FL; 4: culture supernatant of SMD1168/pPICZαA.

用日本岛津 CS 双波长薄层扫描仪对凝胶进行薄层扫描, 结果显示 gE 基因去信号肽片段表达产物占工程菌 SMD1168/pPICZαA-FL-7 72 h 培养上清总蛋白的 13.49%, 结合 Bradford 蛋白质总含量测定结果, 可知其表达量为 11.7 mg/L.

2.4 重组表达产物的抗原性测定
工程菌 SMD1168/pPICZαA-FL-7 诱导 72 h 的培养上清对去离子水透析过夜后, 用包被液按照 1:10~1:2 560 的比例倍比稀释, PRV gE 标准阳性与阴性血清按 1:5 稀释, 同一抗原稀释度下标准阳性与阴性血清反应 A₄₅₀ 值的比值与差值见

表 1. 反应结果表明, 当抗原按 1 : 10~1 : 320 稀释时, 阳性与阴性血清反应 A_{450} 值之比均大于 2.1, 能够有效地区分 PRV gE 标准阳性与阴性血清, 说明该重组表达产物具有较好的抗原性. 当抗

原按 1 : 40 稀释时阳性与阴性血清反应 A_{450} 值的差值与比值均达到最大, 此时抗原包被量约为 29.25 ng/孔.

Table 1 Result of ELISA reaction between expression product of gE fragment exclusive of signal peptide and PRV gE standard positive and negative serum

	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1 280	1 : 2 560
C+/C	2.1915	2.2554	2.3088	2.2804	2.2056	2.1610	1.8678	1.6125	1.5756
(C+) - (C)	0.616	0.639	0.657	0.653	0.645	0.649	0.571	0.501	0.491

C+/C and (C+) - (C) refers to the the ratio and difference of A_{450} value between positive and negative serum respectively.

3 讨 论

PRV gE 为典型的 I 型膜糖蛋白, 具有 5 个潜在的 N-糖基化位点, 已确定在其氨基酸序列中存在 6 个表位抗原, 其中 5 个位于 N 端第 52~238 位氨基酸处^[12]. 研究发现, 不同的猪个体之间, gE 表位抗原特异性的抗原抗体反应相差较大. 因此, 在建立 gE-ELISA 时, 有学者提倡使用 gE 全蛋白作为抗原, 以避免因不同猪个体间抗原抗体反应的差异而带来的检测误差^[3]. 目前国内外均有人尝试 PRV gE 基因在杆状病毒表达系统、酵母表达系统及原核表达系统中的表达, 但只在杆状病毒表达系统中有表达成功的报道^[13,14], 表达量普遍不高, 难以在实际应用中发挥作用. 为了保证 PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段在 *Pichia pastoris* 表达系统的高效表达, 在实验设计时, 我们选用了蛋白酶 A 缺陷型的 SMD1168 菌株, 在 BMMY 诱导培养基中添加了 Casein, 从而减少了蛋白酶对表达产物的降解, 去除了 gE 基因本身的信号肽编码区, 以确保表达产物能够在酵母 α -factor 信号肽的引导下顺利地分泌到细胞外. 最终我们得到的酵母工程菌诱导 72 h 后, gE 基因去信号肽片段的表达量达 11.7 mg/L, 是目前报道的 PRV gE 基因表达量最高的成功范例. 为了进一步提高 gE 基因的表达量, 我们曾经尝试用质粒 pPICZ α -FL 再转化工程菌 SMD1168/PICZ α -FL-7 以期获得更高拷贝高表达量的转化子, 但未成功. 分析 gE 基因本身的组成结构, 该片段的 G+C 含量达 74.2%, 不含有可诱导转录过程提前终止的高 A+T 含量区域, 但在第三位密码子的使用上强烈偏好于 G/C, 有 97% 的密码子第三位碱基为 G/C^[15]. 这种高 G/C 组成的密码子在其他生物中不很常见, 对于其

在异源系统中的高效表达可能是一障碍.

Pichia pastoris 表达系统因其操作简单、发酵工艺成熟、生产条件易于扩大等优点而在重组蛋白的生产上备受青睐. 本文利用该系统成功地完成了 PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段的表达, 表达产物不用纯化, 仅经简单的透析脱盐处理即可用于包被酶标板进行 ELISA 反应, 能够有效地区分 PRV gE 阳性与阴性血清, 具有良好的抗原性. 符合伪狂犬病诊断抗原生产操作简单、成本低廉、抗原性好的要求, 为下一步建立 gE-ELISA 鉴别诊断方法打下了坚实基础.

参 考 文 献

1 李凯伦, 郑文波. 动物重点疫病防治技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 35~41

Li K L, Zhen W B. Technique of Control for Major Veterinary Disease. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2001. 35~41

2 van Orischoot J T, Houwers D J, Rziha H J, et al. Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein E of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. J Virol Methods, 1988, 22 (2~3): 191~206

3 Jacobs L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. Arch Virol, 1994, 137 (3~4): 209~228

4 Hollenberg C P, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8 (5): 554~560

5 Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, et al. Recombinant protein in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol, 2000, 16 (1): 23~52

6 白新盛, 卢景良. 畜禽重大疫病生物技术防制研究. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 195~198

Bai X S, Lu J L. Study of Biocontrol Technique of Major Veterinary Disease. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1998. 195~198

7 姜高明, 敖敬群, 杨 林, 等. PRV 闽 A 株 gE 基因去信号肽片段的克隆与序列测定. 中国兽医学报, 2001, 21 (6): 568~570

Lou G M, Ao J Q, Yang L, et al. Chinese J Vet Sci, 2001, 21 (6): 568~570

- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880~897
- 9 Ferderick 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
Ferderick M A, Robert E K, Seidman J G, *et al.* Translated by Yan Z Y, Li M F. Short Protocols in Molecular Biology. Beijing: Science Press, 1998. 332~363
- 10 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1998. 114
Shen G X, Zhou R L. Modern Immunological Techniques. Beijing: Higher Education Press, 1998. 114
- 11 朱立平, 陈学清主编. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000. 237~265
Zhu L P, Chen X Q. Protocols for Immunology. Beijing: People's Military Medical Press, 2000. 237~265
- 12 Morenkov O S, Fodor N, Sobko Y A, *et al.* Immunological characterisation of glycoprotein E of Aujeszky's Disease virus. Virus Res, 1997, **51** (1): 65~79
- 13 Kimman TG, Leeuw Q, De Kochan G, *et al.* An indirect double-antibody sandwich enzyme-linked immunoassay (ELISA) using baculovirus-expressed antigen for the detection of antibodies to glycoprotein E of pseudorabies virus and comparison of the method with blocking ELISAs. Clin Diagn Lab Immunol, 1996, **3** (2): 167~174
- 14 方六荣, 陈焕春, 肖少波, 等. 伪狂犬病病毒 gE 基因在昆虫细胞中的高效表达. 生物工程学报, 2001, **17** (4): 449~451
Fang L R, Chen H C, Xiao S B, *et al.* Chinese J Biotechnol, 2001, **17** (4): 449~451
- 15 Petrovskis E A, Timmins J G, Post L E, *et al.* Use of lambda gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins. J Virol, 1986, **60** (1): 185~193

Expression of gE Gene Fragment Deleted Signal Peptide of Pseudorabies Virus Fa Strain in *Pichia pastoris* *

AO Jing-Qun¹⁾, WANG Jin-Wen¹⁾, Chen Xin-Hua²⁾,
WANG Xun-Zhang¹⁾ **, LONG Qing-Xin¹⁾, LOU Gao-Ming³⁾

¹⁾ State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

²⁾ Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China;

³⁾ Key Laboratory for Veterinary Biotechnology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract The envelope glycoprotein E is a major glycoprotein of pseudorabies virus, which exerts important effect in pseudorabies eradication campaign. The gE gene fragment deleted signal peptide of PRV Fa strain was inserted into *Pichia pastoris* expression vector pPICZαA, the resulted recombinant expression vector transformed SMD1168 competent cells and obtained engineering *Pichia pastoris* strain SMD1168/pPICZαA-FL. After high concentration ZeocinTM screening, phenotype identification, inductive expression, SDS-PAGE and Western blot analysis of culture supernatant, an engineering *Pichia pastoris* strain SMD1168/pPICZαA-FL-7 in which gE gene fragment deleted signal peptide was expressed in high levels was obtained. SDS-PAGE and Western blot indicated that expression product of gE fragment deleted signal peptide in culture supernatant of SMD1168/pPICZαA-FL-7 was about 80 ku, a little larger than expected. Gel scanning and Bradford protein analysis results showed that expression product reached 11.7 g/L, or 13.49% of total culture supernatant protein in SMD1168/ pPICZαA-FL-7.

Key words pseudorabies virus, gE gene fragment deleted signal peptide, *Pichia pastoris* expression system, antigenicity

* This work was supported by grants from The National 9th Five Years Plan Key Special Research Programs of China (96-C01-04-03) and The National Natural Sciences Foundation of China (39600109).

** Corresponding author. Tel: 86-20-84113964, Fax: 86-20-84113964, E-mail: wxz@zsu.edu.cn

Received: December 23, 2002 Accepted: January 28, 2003