

# 伪狂犬病病毒 Ea 株 gE 基因主要抗原区 在巴斯德毕赤酵母中的表达\*

覃雅丽 陈焕春\*\* 唐 勇 何启盖 徐引弟

(华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室 武汉 430070)

**摘 要** 伪狂犬病病毒 gE 蛋白是一种重要的诊断抗原,可用于伪狂犬病根除计划中的鉴别诊断。为了获得大量的抗原,将编码 gE 主要抗原区域的基因片段插入毕赤酵母表达载体中,得到的重组表达载体转化 GS115 酵母,通过 C418 抗性筛选得到一株多拷贝的重组酵母,经甲醇诱导表达了截短的 gE 蛋白,并分泌到胞外。Western blotting 分析显示表达的蛋白大小为 33kD。ELISA 结果表明表达蛋白具有良好的抗原性,重组酵母的诱导培养上清不需纯化可直接作为抗原检测 gE 的抗体,这为研制质优价廉的鉴别诊断试剂盒奠定了基础。

**关键词** 伪狂犬病病毒 gE 基因,巴斯德毕赤酵母,表达,酶联免疫吸附试验

**中图分类号** Q939.4 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2002)05-0543-07

伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是危害全球养猪业的最严重的传染病之一。利用基因缺失标志疫苗,并结合血清学鉴别诊断法是欧、美等国家根除伪狂犬病的主要方法<sup>[1]</sup>。在已实施 PR 根除计划的国家中, gE 缺失疫苗以及 gE 抗体血清学鉴别诊断方法使用的最为广泛<sup>[2]</sup>。目前商业化应用的 gE-ELISA 试剂盒多采用纯化的病毒或感染病毒的细胞裂解物作为抗原<sup>[1,3]</sup>,近年来也有采用杆状病毒表达产物制备抗原的报道<sup>[3]</sup>。这些抗原的制备方法都存在操作费时费力,成本高等缺点。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)系统是近年来发展起来的一种新型表达系统,具有发酵工艺成熟、易于扩大工业化、培养基成本低廉、可对外源蛋白进行翻译后修饰加工等优点<sup>[4,5]</sup>,愈来愈受到人们青睐,目前许多诊断用的抗原及治疗用的疫苗都有在 *P. pastoris* 中得到表达<sup>[6-8]</sup>。

为了获得大量的、易于制备的鉴别诊断抗原,本研究将编码 gE 主要抗原区域的基因片段插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中,并在酵母  $\alpha$  因子信号肽的引导下获得了分泌表达,表达物具有抗原性并易于分离纯化,这为进一步研制价格低廉更适合于我国国情的 gE-ELISA 鉴别诊断方法奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株及主要试剂

含 gE 全基因的质粒 pSDM1.78K+ 由本室肖少波博士构建<sup>[9]</sup>, pMD-18T 质粒购自大连宝生物工程公司, Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 购自美国 Invitrogen 公司,包括大肠杆菌

\*“九五”国家科技攻关计划生物技术项目(96-C01-04-03)

\*\*通讯作者

作者简介 覃雅丽(1974-),女,湖南张家界人,在读博士生,主要从事动物病毒的分子生物学研究。

收稿日期 2001-12-12,修回日期 2002-04-15

Top 10F', *P. pastoris* 酵母 GS115(*his4*)及分泌型表达质粒 pPIC9K 等配套质粒。化学发光底物试剂盒为 Pierce 公司产品。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均为大连宝生物工程公司产品。

## 1.2 血清与抗体

gE 单克隆抗体为德国联邦动物研究所 Mettenleiter 博士惠赠,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司。猪抗伪狂犬病病毒 Ea 株和缺失 gE 的 Bartha 株抗血清、辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 均由本实验室制备。

## 1.3 方法

**1.3.1 表达载体的构建**:根据已报道的伪狂犬病病毒 Ea 株 gE 基因的序列<sup>[9]</sup>,及 pPIC9K 质粒的多克隆位点合成一条引物 P5',其中引入了 *EcoRV* 的酶切位点,与文献 [9] 中 P2 引物合用,以 pSDM1.78K+ 为模板可扩增出 gE 基因主要抗原区域(不含 N-端信号肽序列),扩增片段长为 696bp,编码 gE 蛋白的第 39~267 位氨基酸残基。

上游引物 P5'(24mer) 5'ACCGAT ATCCCGAGTCCCTCGGCC-3'

下游引物 P2'(27mer) 5'TTTGAA TTCTTAGTACCAGTCCAGCGT-3'

扩增条件为 95℃5min 变性后进入循环,循环参数为 95℃1min、55℃1min、72℃1min,35 个循环后 72℃延伸 10 min。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,将 PCR 产物直接克隆于 pMD-18T 载体中,酶切鉴定,阳性质粒命名为 pTE696,用双脱氧测序法进行序列测定。测序验证后,用 *EcoRV* 和 *EcoRI* 双酶切,回收 696bp 的目的片段与经 *SnaBI* 和 *EcoRI* 消化的表达载体 pPIC9K 连接,转化大肠杆菌 Top10F',通过酶切鉴定含目的片段的重组子 p9K696(图 1)。

**1.3.2 酵母的转化**:用 LiCl 制备 GS115(*his4*)酵母感受态,并将线性化的表达质粒在 LiCl 的作用下转化 GS115 感受态细胞。全部涂于 MD 平板,30℃培养 2~3d。

**1.3.3 酵母重组子的鉴定(PCR)**:随机挑取 MD 平板上的酵母菌落,接种于 MD 液体培养基中,30℃ 250r/min 培养 48h,收集菌体,按文献 [10] 中的方法提取酵母总 DNA,以此为模板,用酵母载体上的  $\alpha$  因子引物和 3'引物进行 PCR 扩增。同时以转化了空白载体的酵母重组子作为阴性对照。

**1.3.4 多拷贝重组的筛选**:将 PCR 阳性的菌落用无菌水洗下,测其  $OD_{600}$  值,以  $10^5$  个细胞量涂在不同浓度 G418 的 YPD 的平板上(2mg/mL、4mg/mL),筛选多拷贝重组子。

**1.3.5 重组酵母的表达**:将筛选好的重组酵母接种于 2mL 的 BMGY 中,28℃振荡培养(250r/min)36h。2 000r/min 离心 5min,菌体沉淀用 10mL BMMY 培养基悬浮,28℃继续振荡培养 6d。每隔 24h 取样并补加甲醇至 1%。

**1.3.6 表达产物的检测及鉴定**:SDS-PAGE 及银染方法见文献 [11],上清与等体积的 2×上样缓冲液混合之后,经 12% SDS-PAGE 之后银染分析表达情况,上样量为 30 $\mu$ L/孔。Western-blotting:表达上清经 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜,用 gE 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 进行免疫印迹,最后用化学发光底物检测,X 光片曝光显影记录。

**1.3.7 间接 ELISA 检测表达产物的抗原性**:将 gE696 的表达上清及对照(空白载体重组子的诱导上清)用包被液在酶标板上倍比稀释,4℃包被过夜,分别用  $\alpha$ F 阳性血清(猪抗伪

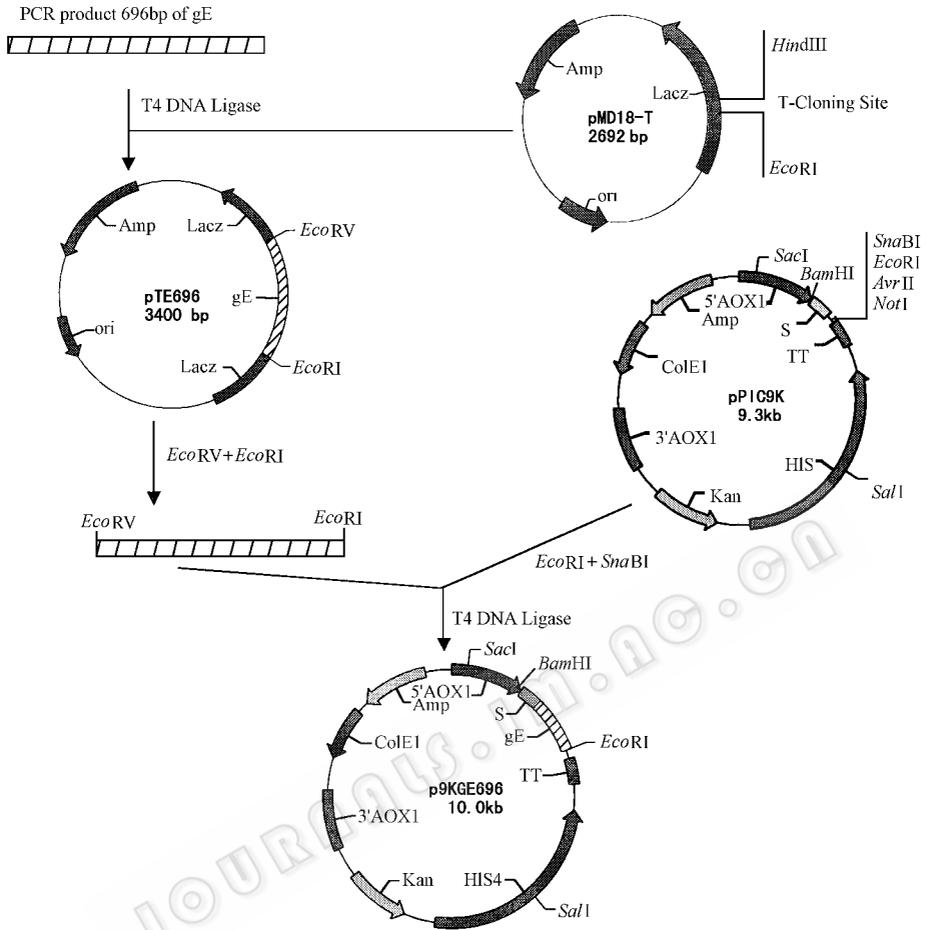


图 1 重组质粒 p9KGE696 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid p9KGE696

狂犬病病毒 Ea 株血清)和 gE 阴性血清(猪抗伪狂犬病病毒 Bartha 株血清)进行检测,稀释倍数为 1:100,二抗为兔抗猪 IgG-HRP(1:6 000),底物为 TMB,用 1% SDS 终止反应,最后用酶标仪读取  $OD_{600}$  值。

## 2 结果和分析

### 2.1 PCR 产物的克隆

按 1.2.1 中的方法以 DM1.78K+ 为模板扩增,图 2 显示在 0.8% 的琼脂扩凝胶出可到一条约 700bp 左右的特异性带,其大小同预期的相当。将该片段切胶回收,直接连入 pMD-18T 载体中,构建的重组质粒 pTE696 经酶切验证,存在正反两种重组子(图 3),测序结果与 pSDM1.78K+ 中 gE 的序列比较完全一致(结果未显示)。

### 2.2 表达质粒 p9KGE696 的构建

用 EcoRV 和 EcoRI 双酶切 pTE696 回收目的片段与 SnaBI 和 EcoRI 消化的 pPIC9K 相连,得到重组质粒 p9KGE696。利用 EcoRI 和 pPIC9K 中位于信号肽上游的 BamHI 消化进

行鉴定, pPIC9K 经消化后切出 280bp 的小片段和 9kb 的大片段, 而插入 gE 基因片段的重组质粒(见图 4 第 2、3 泳道)切出的小片段约为 980bp。证实表达载体构建正确。

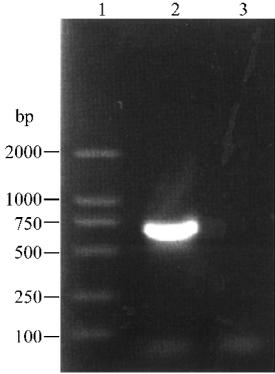


图 2 PCR 产物电泳

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR product

1. DNA marker( DL2 000 );
2. PCR product ;
3. Negative control.

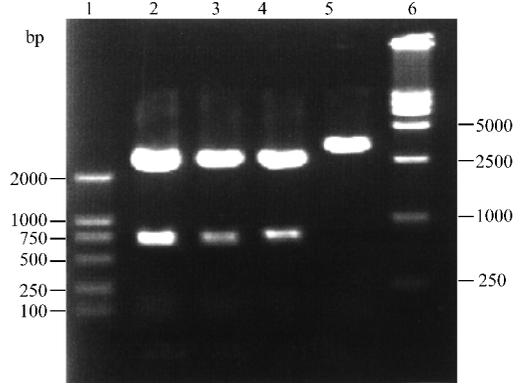


图 3 重组质粒 pTE696 酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pTE696

1. DNA marker( DL2 000 );
2. pTE696(-) EcoRI + EcoRV ;
3. pTE696(+ ) EcoRI + EcoRV ;
4. pTE696(-) EcoRI ;
5. pTE696(+ ) EcoRI ;
6. DNA marker( DL15 000 ).

### 2.3 高拷贝重组子的筛选

通过高浓度的 G418 抗性筛选, 从几百个转化子得到一个可以耐受 4mg/mL G418 的重组酵母, 命名为 GgE696。

### 2.4 表达产物的鉴定

GgE696 经甲醇诱导后每 24h 取样, 用 12% 的 SDS-PAGE 分析甲醇诱导时间对表达量的影响发现, 甲醇诱导的第一天, 即有表达产物出现, 随着表达时间的延长, 表达量也逐步增加, 到第 5 天达到高峰(图 5)。

Western-blot 结果显示, 在分子量约 33kD 处出现一条特异性条带(图 6)。比理论值 26kD 略大, 在表达的这一段 gE 基因中含有 4 个潜在的 N 联糖基化位点, 这可能是由于糖基化造成的分子量增大。

### 2.5 间接 ELISA 检测表达产物的抗原性

用包被液稀释 GgE696 表达上清与 gE 阳性血清(Ea 株抗血清)呈阳性反应,  $OD_{600}$  从  $1:2^6$  开始下降, 但直到  $1:2^{12}$  仍然与 Ea 株抗血清有阳性反应, 而 G9K 的诱导上清与 Ea 株血清呈阴性反应( $OD_{630} \leq 0.2$ )。两者与 Bartha 株抗血清都无特异性结合, 呈阴性反应(结果未显示), 说明 GgE696 表达产物具有良好的抗原

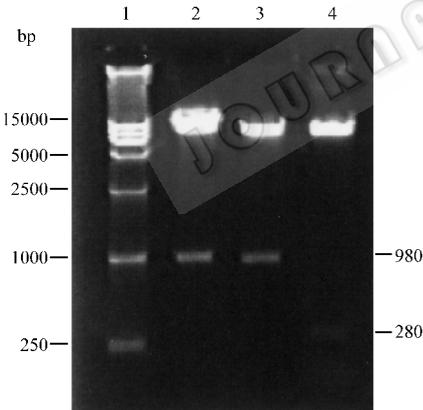


图 4 重组表达载体 p9KGE696 酶切鉴定

Fig.4 Identification of recombinant expression

Plasmid p9KGE696

1. DNA marker( DL15 000 );
2. p9KGE696/ BamHI + EcoRI ;
3. pPIC9K/ BamHI + EcoRI ;
4. pPIC9K/ BamHI + EcoRI.

性,可以区分 gE 阴阳性血清。

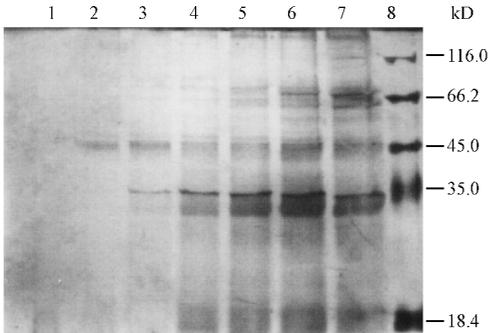


图 5 表达产物的 SDS-PAGE 分析(银染)

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the expression product( silver stain )

1. Expression supernatant of strain C9K ;
- 2~7. Induced supernatant of strain GgE696( 1 ~ 6d ).
8. Protein standard( MBI ).

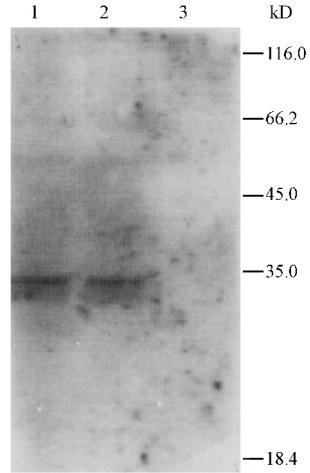


图 6 表达产物的 Western-blot 分析

Fig.6 Western-blot analysis of expression product

- 1 2. supernatant of strain GgE696 ;
- 3 , supernatant of stain C9K.

### 3 讨论

gE 基因是伪狂犬病病毒的一种免疫原性基因,可以刺激机体产生抗体,同时它也是病毒的一种重要的毒力基因并与病毒的神经嗜性有关<sup>[12,13]</sup>。gE 基因的缺失不影响病毒在细胞中增殖。这是 gE 基因缺失的标记疫苗和 gE 抗体的鉴别诊断方法用于伪狂犬病根除计划的理论基础<sup>[1,2,12,13]</sup>。gE 糖蛋白是一典型的 I 型膜蛋白,gE 蛋白已经确定的 6 个抗原决定簇中,有 5 个位于 N 端胞外区 52 ~ 283 位氨基酸残基中<sup>[14,15]</sup>。除了在哺乳动物细胞外,gE 全基因难以在其他异源宿主中表达,如大肠杆菌和杆状病毒<sup>[3]</sup>,在本研究中也曾尝试在 *P. pastoris* 中表达 gE 全基因,但是未获成功(结果未显示)。既然 gE 抗原决定簇主要集中在 N 端胞外区,那么这一基因片段的表达产物也可以作为诊断抗原,试验证明无论是在大肠杆菌,还是杆状病毒系统都可表达该区域,并且表达产物具有抗原性<sup>[3,12]</sup>,但是在大肠杆菌中表达的 gE 蛋白形成不可溶的包涵体,而杆状病毒表达由于培养基昂贵,也不适用于抗原大量生产。为了寻求高质量低成本的诊断抗原,我们选用了 *Pichia pastoris* 系统。

尽管许多蛋白质都可在 *P. pastoris* 中得到高效表达,如破伤风毒素 C 片段的表达量高达 12g/L<sup>[16]</sup>,但并非所有的外源蛋白都可以在 *P. pastoris* 中高效表达。外源蛋白的性质、发酵条件、内源性蛋白酶的降解、基因拷贝数以及密码子的偏爱等都影响着外源蛋白的表达量<sup>[5,8]</sup>。本研究最初在大量的重组子中没有检测到目的基因的表达,后来通过 G418 筛选得到一株高拷贝的重组子 GgE696,才检测到 gE696 的表达,这说明 gE696 在

*P. pastoris* 中最初的表达量很低以至于难以检测,当提高基因的拷贝数,表达量也得以提高。不同的转化方式产生多拷贝的几率不一,据报道原生质体法产生多拷贝重组子的几率最高、电转化法次之、化学转化法(LiCl 和 PEG)最低<sup>[17]</sup>。然而,由于原生质体法操作繁琐,实际应用中使用的并不多,最理想的方法就是电转化,操作简单又能获得较多的多拷贝的重组子,只是需要特殊的仪器。本研究由于条件所限,采用的是方便快捷的 LiCl 法,虽然该方法产生多拷贝重组子的几率小,但是因为采用了 pPIC9K 作为表达载体,可以通过 G418 抗性的高低筛选多拷贝的重组子<sup>[18]</sup>,大大简化了筛选的工作量,也得了一株高拷贝的重组酵母。

由于 *P. pastoris* 内源性的分泌蛋白少,培养基成份简单,如果能将外源蛋白分泌到培养基中将大大地简化重组蛋白的纯化。外源蛋白自身天然的信号肽,酵母  $\alpha$  因子信号肽以及 pH01 信号肽引导重组蛋白在 *P. pastoris* 中成功地分泌表达的例子都有报道<sup>[4-8]</sup>,本研究利用酵母  $\alpha$  因子信号肽成功的将伪狂犬病病毒 gE 蛋白的主要抗原区(30~238 位氨基酸残基)在 *P. pastoris* 中分泌表达,表达量虽然还有待进一步地提高,但是重组蛋白的抗原性好,另外由于酵母培养基中杂蛋白少,诱导培养上清可以不经纯化直接包被酶联板,用以检测猪血清中 gE 的抗体。并且重组酵母中 gE 基因表达盒不是以质粒的方式存在,而是整合在宿主的染色体上,遗传稳定性好,易于放大生产,这将大大地降低鉴别诊断试剂盒的成本,更适合于在全国范围内推广应用的需要。目前,利用该重组蛋白作为抗原的 gE-ELISA 试剂盒正在研制中。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] van Oirschot J T, Howwers D J, Rziha H J, et al. *Journal of Virological Methods*, 1988, **22** :191~206.
- [ 2 ] Elbers A R W, Braamskamp J, Dekkers L J M, et al. *Vet Quart* 2000, **22** :103~107.
- [ 3 ] Kimman T G, Leeuw O, Kochan G, et al. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1996, **3** (2) :167~174.
- [ 4 ] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W G. *Biol Technology*, 1993, **11** :905~910.
- [ 5 ] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, et al. *Gene*, 1997, **190** :55~62.
- [ 6 ] Lal S K, Tulasiram P, Jameel S. *Gene* 1997, **190** :63~67.
- [ 7 ] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J, et al. *Gene*, 1993, **136** :111~119.
- [ 8 ] Hollenbery C P, Gellissen G. *Current Opinion in Biotechnology* 1997, **8** :554~560.
- [ 9 ] 肖少波, 陈焕春, 方六荣, 等. *畜牧兽医学报* 2002, **33** (2) :174~179.
- [ 10 ] Holm C, Meeks-Wagner D W, Fangman W L, et al. *Gene*, 1986, **42** :169~173.
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 12 ] Mettenleiter T C. *Veterinary Research* 2000, **31** :99~115.
- [ 13 ] Jacobs L. *Archives of Virology*, 1994, **137** :209~228.
- [ 14 ] Jacobs J, Melon R H, Gielkens A L J, et al. *Journal of General Virology*, 1990, **71** :881~887.
- [ 15 ] Fuchs W, Rziha H J, Lukacs N, et al. *Journal of General Virology*, 1990, **71** :1141~1151.
- [ 16 ] Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P, et al. *Biotechnology*, 1991, **9** :455~460.
- [ 17 ] Romanos M. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6** :527~533.
- [ 18 ] Scorer M A, Clare J J, McCombie W R, et al. *Biotechnology*, 1994, **12** :181~184.

## Expression of Major Antigenic Domain of Glycoprotein E of Pseudorabies Virus Ea Strain in *Pichia pastoris* \*

Qin Yali Chen Huanchun Tang Yong He Qigai Xu Yindi

(Laboratory of Animal Virology, College of animal sciences and veterinary medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** : Glycoprotein E of Pseudorabies Virus is known to be an important diagnostic antigen in pseudorabies eradication campaign. In order to obtain the antigen in large quantity, the truncated gE gene encoding the major antigenic domains of gE was expressed and secreted in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. The truncated gE gene was amplified by PCR from pSK1.78K + plasmid harboring gE full length DNA. The gE fragment was then inserted into pPIC9K vector and fused with the  $\alpha$ -factor signal sequence to construct an expression plasmid p9KGE696. After transforming p9KGE696 into GS115 cell by LiCl method, the transformants were screened by G418 for multi-copy recombinants. By using methanol as inducer the truncated gE protein was secreted into culture medium. Western-blotting analysis showed that the molecular mass of the expression product was a 33kD. ELISA indicated that the recombinant protein had good antigenicity and could be used as diagnostic antigen in the serological detection of gE antibodies in swine.

**Key words** Pseudorabies virus, gE, *Pichia pastoris*, Expression, ELISA

\* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-C01-04-03)

### 致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了使您的科研成果尽快得到交流,本刊2003年每册增加到144面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期更短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿!欢迎订阅!欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部