

猪瘟病毒 E2 基因在 *Pichia pastoris* 中的 表达及其免疫活性的初步研究

韩雪清^{1*} 刘湘涛¹ 张 涌² 谢庆阁¹ 田 波³

¹(中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽病毒病重点实验室,兰州 730046)

²(西北农林科技大学,杨凌 712100) ³(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘 要 将猪瘟病毒的 E2 基因克隆入酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中,酶切线性化后电穿孔导入 *Pichia pastoris* 进行整合,经 G418 筛选得到高拷贝转化子,甲醇诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 结果证实了酵母培养上清液中含有 E2 蛋白。免疫活性研究证明 *P. pastoris* 表达的 E2 蛋白能刺激动物产生抗猪瘟病毒的抗体。

关键词 猪瘟病毒, E2 基因, 毕赤酵母, 表达, 免疫活性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0208-04

猪瘟是严重危害养猪业的主要传染病之一,被国际兽疫局(OIE)列为家畜 A 类传染病。猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是引起猪瘟的病原体,为单股正链 RNA 病毒,分类于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)。CSFV 的 RNA 全长约 12 300 个碱基,由 11~12 个基因组成,其中 E2 基因编码的外膜糖蛋白 gp55 是主要免疫原蛋白,可诱导动物体产生有效的免疫保护。

由于近年来国内外温和性猪瘟日渐增多,用传统的猪瘟弱毒疫苗免疫后经常发生免疫失败现象,急需研制出新的针对温和性猪瘟的疫苗,以进行有效的防制。DNA 疫苗和病毒活载体重组疫苗是近年来引起广泛关注的新型疫苗免疫方法,有研究表明,插入 CSFV E2 基因的这两种疫苗均能引起动物的保护性免疫,但其实用性和安全性距疫苗的应用要求还有差距^[1]。因此,许多国内外学者仍主张以蛋白质为免疫原,用基因的体外表达产物制备亚单位疫苗^[2~4],但尚无成功的亚单位疫苗问世。目前,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。本文介绍的工作是选用避免了上述表达系统缺陷的 *P. pastoris* 系统来表达 E2 基因,其表达的蛋白质能刺激动物体产生较高的特异性抗体。目前还没有用该系统表达 CSFV E2 基因的报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 毒株、菌株与表达系统 :CSFV 标准强毒石门株,引自农业部中国兽药监察所; *E. coli* DH5 α 由本室保存; SMD1168 酵母菌和 pPIC9K 分泌型表达载体由中国科学院微生物研究所田波院士惠赠。

1.1.2 酶与试剂 :限制酶、T4 DNA 连接酶等工具酶均为 Promega 公司产品; G418、YNB 为 Invitrogen 公司产品; Hybond-N 膜为 Amersham 公司产品; CSFV 阳性血清为中国兽药监察所惠赠; 羊抗猪 IgG-HRP 为本室自制; 弗氏佐剂为 Sigma 公司产品; 测试猪瘟病毒抗体水平的诊断试剂系用 C-株猪瘟细胞毒贴附绵羊红细胞制成,由兰州兽医研究所李树春研究员惠赠。其它试剂为国产分析纯。

1.1.3 引物合成 :由大连宝生物公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 E2 基因的克隆和鉴定 参照文献 [5]

收稿日期 2001-09-10, 修回日期 2001-12-28。

基金项目 国家重大基础研究发展规划项目(No. G19990119)。

* 通讯作者。Tel 86-931-8342710, E-mail hanxq8@hotmail.com

1.2.2 E2 基因的改造参照文献 [6] 将要改造碱基设计引入引物中,用该引物通过 PCR 获得改造的基因片段,经测序验证。因除序列两端外,其它部位没有 CCG 和 CGC,故无需改造。

1.2.3 酵母细胞的转化及阳性转化子的筛选与在 *P. pastoris* 中的表达:参照文献 [7、8] 进行。重组酵母表达载体经 *Sal* I 酶切线性化后,电穿孔法转化 SMD1168,经 MD 平板筛选得到 *his*⁺ 克隆,再经不同浓度 G418 的 YPD 平板上挑选高拷贝克隆,接于 BMMY 中甲醇诱导表达。

1.2.4 表达产物的检测与定量:参照文献 [9],用 SDS-PAGE、Western blot 方法确认 E2 基因的表达蛋白,并经紫外分光光度计和薄层扫描检测 E2 蛋白的表达量。

1.2.5 免疫学检测 选用 Sigma 公司成品弗氏佐剂,参考弗氏佐剂免疫程序,第一次用完全弗氏佐剂按 1:1 (V/V) 与表达产物乳化,免疫健康家兔 8 只,每只免疫 E2 抗原蛋白 500 μ g,设空白对照 4 只。22d 后用不完全弗氏佐剂乳化进行第二次免疫,每只兔免疫剂量仍为 500 μ g。第二次免疫 7d 后采血测其抗体水平。

2 结果

2.1 E2 基因克隆鉴定

经 RT-PCR 得到完整的 E2 基因,测序后证明正确。见图 1。

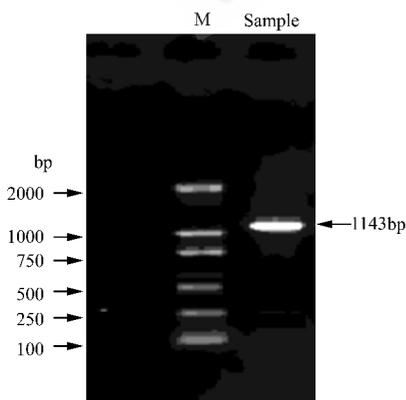


图 1 PCR 扩增 E2 基因的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR E2

2.2 E2 基因的改造

为使 E2 能在 *P. pastoris* 中高效表达,根据酵母密码子的选择偏向对 E2 的密码子进行优化,E2 基因中的 CCG 和 CGC 在酵母表达的蛋白基因中使用频率非常低,通过 PCR 方法将其突变为 CGT。为确保酵母表达的 E2 蛋白能顺利分泌到胞外上清液

中,我们将 E2 基因编码的跨膜区(TMR)截去 15 个疏水性氨基酸(见附图 1)。

2.3 E2 重组 *P. pastoris* 表达载体的构建

通过 PCR 方法在 E2 基因的 5' 端引入 *Eco*R I 酶切序列,在其 3' 端引入 *Not* I 酶切序列,用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后与 pPIC9K 连接,构建成重组酵母表达载体 pPIC9K-E2,目的基因前有 α -Factor 的信号肽序列,见图 2。

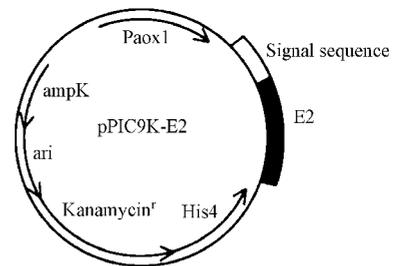


图 2 重组酵母表达载体 pPIC9K-E2 的结构图

Fig.2 Schematic representation of the pPIC9K-E2 recombinant transfer vector

2.4 多拷贝酵母重组转化子的筛选

通过同源重组整合到酵母基因的转化子可在 MD(不含 *his*) 上生长,而非转化子不能生长,这是因为受体菌 SMD1168 为组氨酸缺陷型,而载体上虽然带有组氨酸基因,但没有酵母复制子,载体的组氨酸基因只有整合进酵母基因组中才能表达。经 MD 表型鉴定,皆为甲醇利用正常型。由于 pPIC9K 载体含有细菌 Kanamycin 基因,它能使酵母细胞对 G418 产生抗性,对 G418 抗性的程度大致取决于 Kanamycin 基因的整合数,因此,可以通过不同浓度的 G418 筛选来获得多拷贝的转化子。我们在含 0.2mg/mL G418 的 YPD 平板(2 块)上选到 25 个转化子,又将其在含不同浓度(3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL)的 G418 平板上选出 2~3 高拷贝克隆。提取酵母菌 DNA,用 PCR 扩出目的条带并测序证明 E2 基因整合到重组酵母菌的转化子的基因组中(测序结果略)。

2.5 E2 在酵母菌中的分泌型表达

选取高拷贝重组转化酵母菌(8 号、21 号)及转有空质粒 pPIC9K 的对照菌株分别在摇瓶中进行甲醇诱导表达,72~96h 后离心收集培养上清液。样品经 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,可以看到 56kD 处有一表达条带(图 3),大小与 E2 的推导分子量一致。Western blot 结果在 56kD 处有明显的杂交带而对照菌杂交呈阴性,说明酵母细胞表达产物能与猪瘟抗血清特异性结合。表达的 E2 蛋白占酵母培养原液总蛋白的 7%,含量为 0.25g/L。对照菌培养液

是未经诱导的,故菌体蛋白很少,一经诱导,菌体蛋白和目的基因蛋白同时表达,电泳条带较多。

2.6 表达产物的免疫原性鉴定

用 E2 表达蛋白二次免疫实验家兔后采血,测

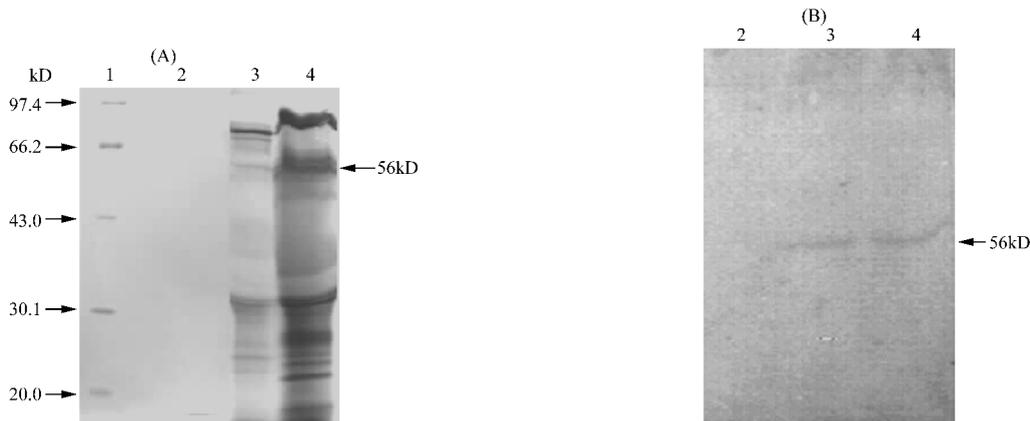


图 3 E2 基因在毕赤酵母中表达的 SDS-PAGE 电泳(A)及 Western-blot(B)结果

Fig.3 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of E2 expressed in *Pichia pastoris*

1. Protein molecular weight marker; 2. The protein expressed in *P. pastoris* transformed with pPIC9K; 3, 4. The protein expressed in *Pichia* transformed with pPIC9K-E2

3 讨 论

P. pastoris 表达系统为 80~90 年代发展起来的极具潜力的真核表达系统,具有其它系统所不具备的优点:①有强启动子(AOX)可严格调控外源蛋白表达;②可在蛋白质转译后加工修饰,使蛋白具有活性;③表达量最高可达 12g/L;④培养成本低廉,利于工业化生产,适合于动物类疫苗的大量生产之用。国外现已成功表达了数百种以上外源蛋白,但遗憾的是该系统并非适合所有基因的表达^[10]。我们的研究工作表明 CSFV E2 基因适于该表达系统,并且是分泌型表达,有利于下游的蛋白纯化。我们所获得的重组体连续表达 5 代未发现 E2 基因丢失,证明 SMD1168 可稳定表达 E2 基因。

综上所述,我们已成功地得到了 CSFV E2 基因在 *P. pastoris* 中表达的活性蛋白,该蛋白既能与猪瘟阳性血清结合,又能明显刺激家兔产生抗猪瘟病毒的特异性抗体,其抗体滴度相当于用 5 头剂猪瘟弱毒疫苗免疫的抗体水平,按兰州兽医研究所李树春研究员提供的检测标准,血清抗体滴度达 1:16 以上均可抗野毒感染。用我们表达的 E2 蛋白免疫的抗体水平最高达 1:256,据此推测,也能够抗野毒感染。遗憾的是猪瘟病毒毒价测定复杂,需要动物头数很多,周期长,未能做攻毒实验。但本研究结果为我们进一步研究猪瘟基因工程亚单位疫苗打下了基础,下一步的研究工作将是对 E2 基因的全面改造

其抗体水平 8 只兔血清猪瘟抗体均为阳性,其血凝效价为 1:128~1:256,而对照组 4 只家兔血清均为猪瘟抗体阴性,表明该酵母表达产物能诱导动物体产生抗猪瘟病毒的抗体。

和优化表达条件,以及对本动物的免疫保护实验。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHOU P C(周鹏程),LU Y(陆宇),CHEN J G(陈建国) *et al.* Molecular cloning and expression of the Chinese classical swine fever virus (shimen strain) and preliminary studies of its DNA vaccine. *Acta Microbiologica sinica* (微生物学报) 2000, **40**(3): 243~250
- [2] YU X L(余兴龙),TU C C(涂长春),LI H W(李红卫) *et al.* Construction of eukaryotic expression plasmids of CSFV E2 gene and the study on DNA vaccine. *Virologica sinica* (中国病毒学) 2000, **15**(3): 264~271.
- [3] Hammond J M, McCoy R J, Jansen E S *et al.* Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine*, 2000, **18**(1~12): 1040~1050
- [4] Ruggli N, Moser C, Mitchen D *et al.* Baculovirus expression and affinity purification of protein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187. *Virus Genes*, 1995, **10**(2): 115~126
- [5] HAN X Q(韩雪清),LI H W(李红卫),LIU X T(刘湘涛) *et al.* Sequence analysis of major protective antigen E2 (gp55) gene of Chinese hog cholera lapinised virus directly from rabbit spleen tissue (c-strain). *Acta Veterinaria et zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 2001, **32**(1): 52~57
- [6] Shiping Zhang, Geoffrey Zubay, Emanuel G. Low-usage in *Escherichia Coli* yeast fruit fly and primates. *Gene*, 1991, **105**: 61~72
- [7] David R H, James M C. *Pichia protocols*. New Jersey, Humana Press Inc, 1998
- [8] Barr K A, Hopkins S A, Sreekrishna K. Protocol for Efficient Secretion of HAS Developed from *Pichia pastoris*. *Pharm Eng*, 1992, **12**

[9] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989

[10] QU L J (瞿礼嘉) *et al.* *Current Biotechnology :An Introduction (现代生物技术导论)* 1st ed. Beijing , High Education Publishing House , 1998

Study on the Expression of E2 Gene of Classical Swine Fever Virus in *Pichia pastoris* and the Immunological Activity of Its Expression Product

HAN Xue-Qing^{1*} LIU Xiang-Tao¹ ZHANG Yong² XIE Qing-Ge¹ Tian Bo³

¹(Lanzhou Veterinary Research Institute , CAS , Lanzhou 730046 , China)

²(Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China)

³(The Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract E2 gene of classical swine fever virus (CSFV) was cloned into secretory pPIC9K *Pichia pastoris* expression vector. After being linearized by digestion , the vector was transformed into *Pichia pastoris* by electroporation to integrate with the genome , the transformants with high copies were screened by G418 and were induced to express with methonal. The results of SDS-PAGE and Western blot demonstrated that the supernatant of the induced *P. pastoris* culture contained protein E2. The results of the study on the immunological activity indicated that the protein E2 expressed in *P. pastoris* can elicit animal bodies to produce antibodies against protein E2.

Key words classical swine fever virus , E2 gene , *Pichia pastoris* , expression , immunological activity

Received 09-10-2001

This work was supported by project of the State Key Basic Research and Development Program (No. G19990119).

* Corresponding author. Tel : 86-931-8342710 ; E-mail : hanxq8@hotmail.com

安捷伦推出小鼠 cDNA 微阵列试剂盒

安捷伦日前宣布 推出小鼠 cDNA 微阵列试剂盒 (G4104) 其中 cDNA 克隆序列由 Incyte Genomics 认证。通过这套微阵列试剂盒 研究人员可以在一次微阵列实验中 对 8500 多个小鼠基因进行大规模的基因差异表达筛选。

安捷伦的小鼠 cDNA 微阵列采用双色标记 方便研究人员在一次实验中对“ 疾病 ” 样本和“ 对照 ” 样本上同时进行基因差异表达分析。传统的单色标记技术需两次分别的微阵列标记、杂交及后继分析步骤 而新的方法则减少了传统单色标记技术中固有的偏差。此外 所有安捷伦 cDNA 微阵列都以方便使用的试剂盒形式供应 其中包括 4 个微阵列、杂交缓冲液、操作手册和 CD 中则包括微阵列上可供杂交分析的基因的完整资料。

安捷伦生物研究解决方案副总裁兼总经理 Barney Saunders 说：“ 许多制药和生物技术公司利用基因剔除小鼠及其它小鼠模型研究人类疾病和开发新药 在这一方面 他们已经进行了大量的投资。安捷伦新推出的具有优质 Incyte 基因资源的小鼠 cDNA 微阵列试剂盒将保护这些公司的投资 为这些公司提供高度可靠的小鼠 cDNA 微阵列数据 帮助他们做出更加明智的研究决策。”

安捷伦小鼠 cDNA 微阵列试剂盒是安捷伦在短短 6 个月的时间内推出的第三个 cDNA 试剂盒。安捷伦此前已经推出了 Human 1 cDNA 和 Human 2 cDNA 微阵列试剂盒 这两种试剂盒也由 Incyte Genomics 提供基因资源。所有这三个试剂盒都含有微阵列 以安捷伦 SurePrint 技术精密地打印制作。安捷伦微阵列打印在标准的“ 1X3 ” 载玻片上 可以使用安捷伦的 48 载玻片 DNA 微阵列扫描仪 (G2565AA) 或其它扫描仪进行扫描。

如需进一步了解安捷伦科技公司的详细情况 请访问网址 : www.agilent.com。

(安东娜 供稿)