

• 动物及兽医生物技术 •

## 三种禽病毒抗原的串联表达、纯化及活性鉴定

张素玲, 王孟月, 王彦伟, 吴芃, 逢文强, 田克恭

国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000

张素玲, 王孟月, 王彦伟, 等. 三种禽病毒抗原的串联表达、纯化及活性鉴定. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2066-2075.

Zhang SL, Wang MY, Wang YW, et al. Co-expression, purification and bioassay of three avian viral antigens. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2066-2075.

**摘要:** 为实现多个基因在同一菌株中均一可溶性表达, 简化基因工程亚单位多联多价疫苗中抗原生产的工艺步骤, 本研究选用 I 群 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) Fiber-2 蛋白、鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) VP2 蛋白和减蛋综合征病毒 (EDSV) Fiber 蛋白 3 种来自不同禽病毒的抗原为研究对象, 利用原核表达系统, 通过密码子优化、载体启动子改造和基因串联顺序优化, 获得单一载体/多重转录单元的共表达重组质粒。将共表达重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, 进行 3 个基因的共表达。纯化后的蛋白进行 Western blotting 和蛋白活性检测。结果表明, 目的基因经过密码子优化、载体启动子改造和基因串联顺序的优化后, 获得均一可溶性共表达的 3 种蛋白, 纯化后蛋白纯度大于 80%, Western blotting 分析和琼脂扩散试验表明串联表达的 3 种蛋白具有免疫反应性和抗原活性。文中通过目的基因密码子优化、表达载体启动子改造和基因串联等关键技术的突破, 首次实现了 3 种不同禽病毒抗原的高效、均一、可溶性串联表达和纯化, 为基因工程亚单位多联多价疫苗的研制奠定了基础。

**关键词:** 密码子优化, 启动子改造, 串联表达, I 群 4 型禽腺病毒 Fiber-2 蛋白, 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白, 减蛋综合征病毒 Fiber 蛋白

## Co-expression, purification and bioassay of three avian viral antigens

Suling Zhang, Mengyue Wang, Yanwei Wang, Peng Wu, Wenqiang Pang, and Kegong Tian

National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang 471000, Henan, China

**Abstract:** To achieve uniform soluble expression of multiple proteins in the same *Escherichia coli* strain, and simplify the process steps of antigen production in genetic engineering subunit multivalent vaccine, we co-expressed three avian virus proteins including the fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) Fiber-2 protein, infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 protein and egg-drop syndrome virus (EDSV) Fiber protein in *E. coli* BL21(DE3) cells after optimization of gene codon, promoter, and tandem expression order. The purified proteins were analyzed by Western blotting and agar gel precipitation

**Received:** February 12, 2020; **Accepted:** May 25, 2020

**Supported by:** Special Project of Industrial Cluster in Self-created Zone in Zhengzhou, Luoyang, and Xinxiang Cities (No. 181200211700), Luoyang Heluo Talent Plan (Dr. Kegong Tian).

**Corresponding authors:** Wenqiang Pang. E-mail: pangwq123@hotmail.com

Kegong Tian. E-mail: vetvac@126.com

郑洛新国家自主创新示范区首批创新引领型产业集群专项 (No. 181200211700), 洛阳市河洛英才计划资助。

网络出版时间: 2020-07-01

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200701.1424.001.html>

(AGP). The content of the three proteins were well-proportioned after co-expression and the purity of the purified proteins were more than 80%. Western blotting analysis and AGP experiment results show that all the three co-expression proteins had immunoreactivity and antigenicity. It is the first time to achieve the three different avian virus antigens co-expression and co-purification, which simplified the process of antigen production and laid a foundation for the development of genetic engineering subunit multivalent vaccine.

**Keywords:** codon optimization, promoter optimization, co-expression, FAdV-4 Fiber-2 protein, IBDV VP2 protein, EDSV Fiber protein

目前商业化的禽用疫苗包括灭活疫苗、弱毒活疫苗及亚单位疫苗。相比传统类型的疫苗,亚单位疫苗具有成本低、安全性高、保护效果好等优势,所以越来越受重视,相关疫苗的开发也越来越多<sup>[1-5]</sup>。与单组分疫苗相比,多联多价疫苗操作简便,减少免疫针次,简化免疫程序,提高免疫效率,避免了反复免疫导致的应激等问题。基因工程亚单位多联多价疫苗因其具有安全性高、保护效果好、免疫程序简单、免疫效率高等特点,更利于临床使用。

但是基因工程亚单位多联多价疫苗涉及多种抗原的制备,每种抗原都需要分别经过表达和纯化,这使得生产工艺繁琐复杂,过程难控制,生产成本高,而多基因共表达技术可以有效解决这个问题,且节约生产成本、提高产量,并简化生产工艺。

基因共表达的载体包括单基因载体和多基因载体<sup>[6]</sup>。单基因载体的每个载体上只携带一个基因,通过单基因载体的多重转化来实现多个基因的共表达。单基因载体多重转化后,可能会出现质粒在复制后发生不均等分配,经过多次增殖后会导致某个质粒丢失而造成蛋白间表达比例失调,多重转化后蛋白表达量下降,在多种抗生素存在的条件下,细胞的生长速率减慢、载体之间可能会出现相互干扰等问题<sup>[6-7]</sup>。在这种情况下,多基因载体的共表达策略可能更为合适。多基因载体能装载多个基因,所以能够利用一个载体实现多个基因在宿主细胞中的同时表达,其中包含单一转录单元的共表达和多重转录单元的共表达。在大肠杆菌中,由于单一载体/多重转录单元

的共表达策略涉及到载体的选择、不同启动子的选择、不同基因在载体上的顺序和表达条件的优化等,其研究比较复杂,目前尚无标准统一的方法可参考使用。

基于先前的研究和报道,为了简化基因工程亚单位多联多价疫苗中抗原生产的工艺步骤,实现多个基因在同一菌株中均一可溶性表达,本研究选用 I 群 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) Fiber-2 蛋白、鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) VP2 蛋白和减蛋综合征病毒 (EDSV) Fiber 蛋白为研究对象,利用原核表达系统,通过密码子优化、载体启动子改造等方法优化目的蛋白的可溶性表达。然后进一步通过调整多个基因片段在单一载体上的顺序实现 FAdV-4 Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白的均一表达。并且对 3 种蛋白的生物学活性进行了分析。本研究对简化多联多价疫苗中抗原生产的工艺步骤、降低生产成本具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

质粒 pET28a 购自 Novagen; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Thermo Fisher。2 $\times$ Easy Taq PCR Super Mix 购自北京全式金生物技术有限公司。DNA 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司。质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。蛋白预染 Marker、兔抗鸡

IgG-HRP 二抗购自 Thermo Fisher。DAB 显色试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。 $\text{Ni}^{2+}$  Sepharose 6 Fast Flow 购自美国 GE Healthcare。FAdV-4 阳性鸡血清为本实验室自制。IBDV 阳性鸡血清和 EDSV 阳性鸡血清购自中国兽医药品监察所。其他化学试剂均为分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 基因的克隆及表达载体的构建

利用表 1 中的 FAdV-fiber2-F/FAdV-fiber2-R、IBDV-VP2-F/IBDV-VP2-R 和 EDSV-fiber-F/EDSV-fiber-R 引物,分别扩增 FAdV-4 *fiber-2* 基因、IBDV VP2 基因和 EDSV *fiber* 基因,经相应的内切酶处理后克隆至 pET28a,获得重组质粒 pET28a-pT7-F-fiber2、pET28a-pT7-I-VP2 和 pET28a-pT7-E-fiber,分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行蛋白表达。

#### 1.3.2 密码子优化

根据同义密码子具有简并性的特点,采取密码子优化策略,依据大肠杆菌密码子偏好性对 FAdV-4 *fiber-2* 基因、IBDV VP2 基因和 EDSV *fiber*

基因进行优化合成。利用表 1 中的 FAdV-im-fiber2-F/FAdV-im-fiber2-R、IBDV-im-VP2-F/IBDV-im-VP2-R 和 EDSV-im-fiber-F/EDSV-im-fiber-R 引物进行目的基因扩增并克隆至 pET28a,获得重组质粒 pET28a-pT7-F-im-fiber2、pET28a-pT7-I-im-VP2 和 pET28a-pT7-E-im-fiber,分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行蛋白表达。

#### 1.3.3 表达载体启动子改造

分别以 pET28a-pT7-F-im-fiber-2、pET28a-pT7-I-im-VP2 和 pET28a-pT7-E-im-fiber 为模板,利用表 1 中含有 T5 启动子序列的引物 pT5-F 和 pT5-R 扩增目的基因片段并克隆至 pET28a,获得重组质粒 pET28a-pT5-F-im-fiber-2、pET28a-pT5-I-im-VP2 和 pET28a-pT5-E-im-fiber,分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行蛋白表达。

#### 1.3.4 表达载体的串联及串联顺序优化

利用表 2 中的引物,分别从 pET28a-pT5-I-im-VP2 和 pET28a-pT7-E-im-fiber 质粒中扩增出 *pT5-I-im-VP2* 片段和 *pT7-E-im-fiber* 片段,利用相应的内切酶处理后,依次克隆入 pET28a-pT5-F-

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Restriction enzyme cutting site (Underlined)
FAdV-fiber2-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> CTCCGAGCCCCTAAAAGAAGA	34	<i>Nde</i> I
FAdV-fiber2-R	CGCGGATCCTTACGGGACGGAGGCTGCTGG	30	<i>Bam</i> H I
IBDV-VP2-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> ACAAACCTGCAAGATCAAACC	34	<i>Nde</i> I
IBDV-VP2-R	CGCGGATCCTTACCTTAGGGCCCGATTAT	30	<i>Bam</i> H I
EDSV-fiber-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> AAGCGACTACGGTTGGACCCT	34	<i>Nde</i> I
EDSV-fiber-R	CGCGGATCCTTACTGTGCTCCAACATATGT	30	<i>Bam</i> H I
FAdV-im-fiber2-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> CTGCGTGCTCCGAAACGTCGT	34	<i>Nde</i> I
FAdV-im-fiber2-R	CGCGGATCCTTACGGAACAGAAGCAGCCGG	30	<i>Bam</i> H I
IBDV-im-VP2-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> ACCAACCTGCAGGACCAGACC	34	<i>Nde</i> I
IBDV-im-VP2-R	CGCGGATCCTTAAACGCAGAGCACGGATGAT	30	<i>Bam</i> H I
EDSV-im-fiber-F	GGAATTCC <u>CATATG</u> AAACGTCTGCGTCTGGACCCG	34	<i>Nde</i> I
EDSV-im-fiber-R	CGCGGATCCTTACTGAGACCAACGTAGGT	30	<i>Bam</i> H I
pT5-F	GGA <u>AGATC</u> TTTCATAAAAAATTATTTGCTTTGTGAGCGGAT ACAATTATAATAGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC	79	<i>Bgl</i> I II
pT5-R	CCGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGTGCGAC	30	<i>Xho</i> I

Note: enzyme restriction sites are underlined.

im-fiber2 质粒中, 获得重组质粒 pET28a-F-I-E。按照此方法, 将 3 个基因片段在质粒上的顺序进行互换, 共获得 6 种不同串联顺序的质粒 pET28a-F-I-E、pET28a-F-E-I、pET28a-I-F-E、pET28a-I-E-F、pET28a-E-I-F 和 pET28a-E-F-I。将 6 种不同串联顺序的重组质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行蛋白表达。

### 1.3.5 目的蛋白的诱导表达

蛋白的诱导表达条件为: 37 °C、220 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.5–0.6 时, 用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 28 °C 诱导表达 12 h。同时设置空载体诱导组。表达结束后, 离心收集菌体细胞。按照菌体: 重悬液=1:10 (W/V) 的比例加入 PBS, 充分重悬菌体细胞。超声破碎后, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 分离上清和沉淀。12% SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

### 1.3.6 蛋白的纯化

大量诱导表达后的菌体加 PBS 重悬后, 使用高压均质机进行菌体破碎, 破碎条件为: 压力 80 MPa, 循环破碎 4 次。破碎后的样品, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 h, 收集上清。上清用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后, 利用 AKTA-pure 系统经过装有  $Ni^{2+}$  Sepharose 6 Fast Flow 填料的 XK16/20 柱子纯化。收集的洗脱蛋白用 12% SDS-PAGE 检测。

### 1.3.7 Western blotting 检测

纯化后蛋白和未诱导细胞裂解液上清经过 SDS-PAGE 后, 采用半干法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% (W/V) 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 然后分别加入 1:500 稀释的 FAdV-4 阳性鸡血清、IBDV

阳性鸡血清和 EDSV 阳性鸡血清, 4 °C 孵育过夜。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的兔抗鸡 IgG, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。用 DAB 显色试剂盒显色后, 观察结果。

### 1.3.8 活性检测

纯化后的重组蛋白, 采用 AGP 试验进行 FAdV-4 Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白的效价检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种抗原在大肠杆菌中的单独表达

为了在大肠杆菌中实现 3 种抗原的可溶性共表达, 首先对 3 种抗原在大肠杆菌中的单独表达情况进行了探索和优化。

将 3 种构建正确的表达载体 pET28a-pT7-F-fiber2、pET28a-pT7-I-VP2 和 pET28a-pT7-E-fiber 分别转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中, 用 0.5 mmol/L IPTG 于 28 °C 诱导表达 12 h。结果如图 1A 所示, 与空载体诱导组相比, 含有表达载体 pET28a-pT7-F-fiber2 的菌株, 在 58 kDa 左右, 上清和沉淀中均未见明显条带, 说明 FAdV Fiber-2 蛋白未表达 (第 2 泳道和第 3 泳道), 而 IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白则均主要分布在沉淀中, 在诱导后上清中并没有明显的新增条带, 说明 IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白表达后均主要以包涵体形式存在。初步表达结果说明, 在大肠杆菌中, FAdV Fiber-2 蛋白不表达, IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白表达为包涵体。

表 2 串联质粒构建引物序列

Table 2 Primer sequences of used in tandem vector construction

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Size (bp)	Restriction enzyme cutting site (underlined)
pT5-IBDV-VP2-F	CGAGCTCTCATAAAAAATTTATTTGCTT	28	<i>Sac</i> I
pT5-IBDV-VP2-R	CCCAAGCTTTTAAACGCAGAGCACGGATGAT	30	<i>Hind</i> III
pT5-EDSV-fiber-F	AAATATGCGGCCGCTCATAAAAAATTTATTTGCTT	35	<i>Not</i> I
pT5-EDSV-fiber-R	CCGCTCGAGTTACTGAGCACCAACGTAGGT	30	<i>Xho</i> I

Note: enzyme restriction sites are underlined.

## 2.2 3种抗原表达条件的优化

为了使3种抗原在大肠杆菌中可溶性表达,对表达条件进行了优化。

首先是进行目的基因的密码子优化。将3个目的基因序列进行密码子优化后,将获得的构建正确的重组载体 pET28a-pT7-F-im-fiber2、

pET28a-pT7-I-im-VP2 和 pET28a-pT7-E-im-fiber, 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。按照相同的条件进行目的蛋白的诱导表达。表达完成后,菌体裂解上清和沉淀经 SDS-PAGE 分析,如图 1B 所示。从图 1B 可以看出,FAcV Fiber-2 蛋白明显表达,但以包涵体的形式存在于沉淀中。

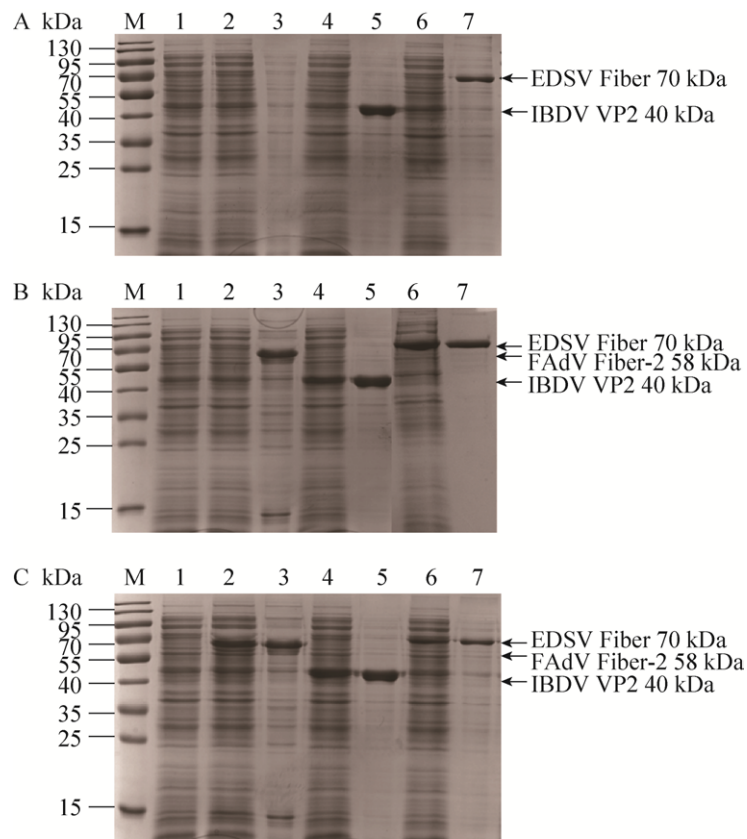


图 1 优化前后重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant proteins before and after optimization. (A) Analysis of the expression of the three proteins before optimization. M: protein molecular marker; 1: uninduced cell lysate; 2: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT7-F-fiber2 bacterial lysates; 3: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT7-F-fiber2 bacterial lysates; 4: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT7-I-VP2 bacterial lysates; 5: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT7-I-VP2 bacterial lysates; 6: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT7-E-fiber bacterial lysates; 7: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT7-E-fiber bacterial lysates. (B) Analysis of the expression of the three proteins after codon optimization. M: protein molecular marker; 1: uninduced cell lysate; 2: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT7-F-im-fiber2 bacterial lysates; 3: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT7-F-im-fiber2 bacterial lysates; 4: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT7-I-im-VP2 bacterial lysates; 5: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT7-I-im-VP2 bacterial lysates; 6: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT7-E-im-fiber bacterial lysates; 7: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT7-E-im-fiber bacterial lysates. (C) Analysis of the expression of the three proteins after promoter optimization. M: protein molecular marker; 1: uninduced cell lysate; 2: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT5-F-im-fiber2 bacterial lysates; 3: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT5-F-im-fiber2 bacterial lysates; 4: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT5-I-im-VP2 bacterial lysates; 5: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT5-I-im-VP2 bacterial lysates; 6: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-pT5-E-im-fiber bacterial lysates; 7: sediment of BL21(DE3)/pET28a-pT5-E-im-fiber bacterial lysates.

相同表达条件下, IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白均在上清中出现相应条带, 以部分可溶性形式存在, 约占总可溶性蛋白的比例分别为 7.5% 和 8.1%。结果表明, 密码子优化后, FAdV Fiber-2 蛋白以包涵体形式在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达, IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白部分可溶性表达。

为了进一步优化 3 个蛋白的可溶性表达量, 在密码子优化的基础上, 分别对表达载体的启动子进行了改造, 将 T7 启动子更换为 T5 启动子。构建正确的质粒 pET28a-pT5-F-im-fiber2、pET28a-pT5-I-im-VP2 和 pET28a-pT5-E-im-fiber 分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 并以相同的条件进行蛋白的表达, 结果如图 1C 所示。从图中可以看出, FAdV Fiber-2 蛋白可溶性表达量明显增加, 约为总可溶性蛋白的 5.9%。IBDV VP2 蛋白可溶性表达未有

明显提升, 约为总可溶性蛋白的 7.4%, 但包涵体含量减少。EDSV Fiber 蛋白可溶性表达量则降低, 约占可溶性蛋白的 6.3%。

通过上述表达条件的优化, 分别得到了 3 种抗原最适的可溶性表达方式, 即选择可溶性表达 FAdV Fiber-2 蛋白的 pET28a-pT5-F-im-fiber2 质粒、能够可溶性表达 IBDV VP2 蛋白且包涵体含量较少的 pET28a-pT5-I-im-VP2 质粒和 EDSV Fiber 可溶性表达量较高的 pET28a-pT7-E-im-fiber 质粒进行串联表达载体的构建。

### 2.3 3 种抗原串联表达及优化

将含有 6 种不同串联顺序重组载体 (图 2) 的 *E. coli* BL21(DE3) 同时培养, 并用相同的诱导条件, 诱导目的蛋白表达。破碎后样品上清用 12% SDS-PAGE 检测结果见图 3。结果显示, 不同串

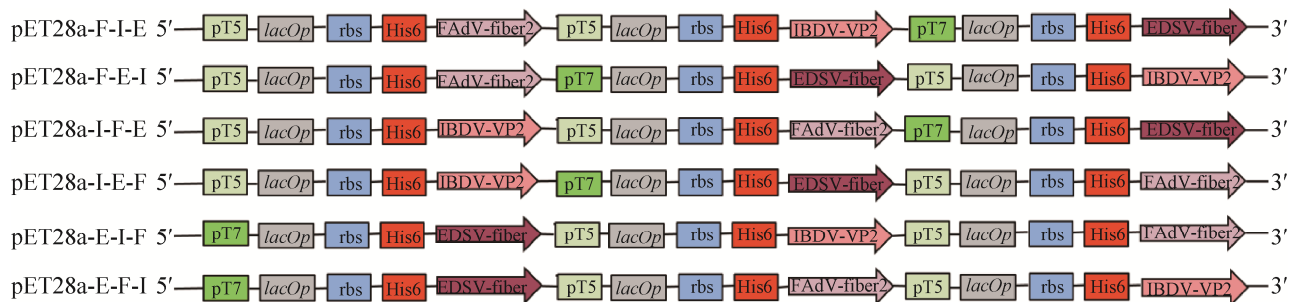


图 2 串联表达质粒的构建

Fig. 2 Construction of the tandem expression recombinant plasmids.

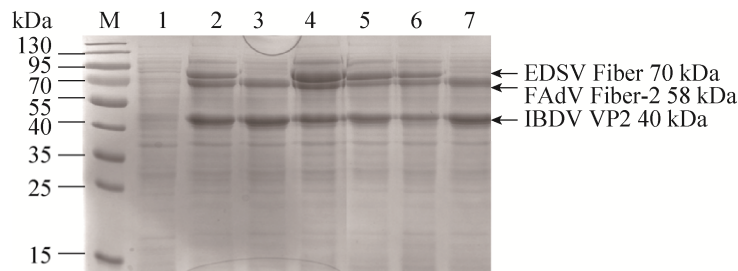


图 3 共表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the tandem expression proteins. M: protein molecular marker; 1: uninduced cell lysates; 2: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-F-E-I bacterial lysates; 3: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-F-I-E bacterial lysates; 4: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-E-I-F bacterial lysates; 5: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-E-F-I bacterial lysates; 6: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-I-E-F bacterial lysates; 7: supernatant of BL21(DE3)/pET28a-I-F-E bacterial lysates.

联顺序中 FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白的可溶性表达情况差异比较明显。其中,含有串联表达重组载体 pET28a-F-E-I、pET28a-E-I-F、pET28a-E-F-I 和 pET28a-I-E-F 的菌株能够实现 3 种蛋白同时可溶性共表达(第 2、4、5、6 泳道),含有串联表达重组载体 pET28a-F-I-E 和 pET28a-I-F-E 的菌株仅能实现 FAdV Fiber-2 蛋白和 IBDV VP2 蛋白的同时可溶性表达(第 3、7 泳道)。

使用灰度扫描软件对上清中 3 种可溶性表达蛋白进行分析,分析结果显示,第 6 泳道中,3 种蛋白的比例接近 1:1:1,说明含有串联表达重组载体 pET28a-I-E-F 的菌株,能够获得的可溶性表达相对较多,且比例接近目的蛋白。

综上所述,含有 pET28a-I-E-F 质粒的表达菌,能够实现 FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白的均一可溶性串联表达。

#### 2.4 串联表达蛋白的纯化

对含有串联表达质粒 pET28a-I-E-F 的 BL21 (DE3) 进行扩大培养,菌体收集破碎离心后上清液进行纯化。

FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白 N 末端均带有 6×His 标签,利用 Ni<sup>2+</sup> Sepharose 6 Fast Flow 填料能够同时将 FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白吸附。50 mmol/L 咪唑清洗杂蛋白后,用 500 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白,获得 3 种目的蛋白的混合物。纯化后的蛋白样品经过 12% SDS-PAGE 检测,结果见图 4。从图可以看出,FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白能够同时结合于镍柱。经过灰度扫描分析,纯化后 3 种蛋白的比例为 1:1:0.9,纯度约为 90%。透析除咪唑后,BCA 蛋白定量显示蛋白总浓度为 1.35 mg/mL。因此,纯化后,FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白浓度分别约为 0.41 mg/mL、0.41 mg/mL 和 0.38 mg/mL。

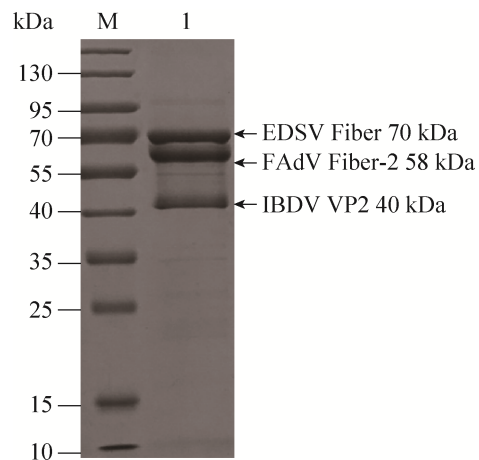


图 4 纯化后重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified proteins. M: protein molecular marker; I: purified proteins.

#### 2.5 3 种抗原的鉴定与活性分析

将纯化后的蛋白用 PBS 缓冲液透析除去咪唑,进行免疫反应性鉴定和活性分析。

将透析后的蛋白和未诱导组破碎后的样品上清进行 SDS-PAGE,然后转移至 PVDF 膜,分别使用 FAdV-4 阳性鸡血清、IBDV 阳性鸡血清和 EDSV 阳性鸡血清作为一抗,HRP 标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗,用 Western blotting 分析,结果见图 5。如图 5 所示,PVDF 膜上分别出现了相对分子质量约为 58 kDa、40 kDa 和 70 kDa 的目的条带,表明串联表达的 FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白均正确并且具有免疫反应性。

将透析后蛋白分别与 FAdV-4 阳性鸡血清、IBDV 阳性鸡血清和 EDSV 阳性鸡血清进行 AGP 试验,结果显示,FAdV Fiber-2 蛋白效价为 1:64,IBDV VP2 蛋白效价为 1:64,EDSV Fiber 蛋白效价为 1:32。结果说明纯化后的 3 种禽病毒抗原均具有天然的抗原活性。已有研究表明,IBDV VP2 蛋白按照 AGP 效价 1:16 及以上配制疫苗免疫后,攻毒保护率可达 90%–100%<sup>[3-4]</sup>。FAdV Fiber-2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白的 AGP 效价与攻毒保护率之间也具有一定的相关性(相关研究结果尚未发表)。

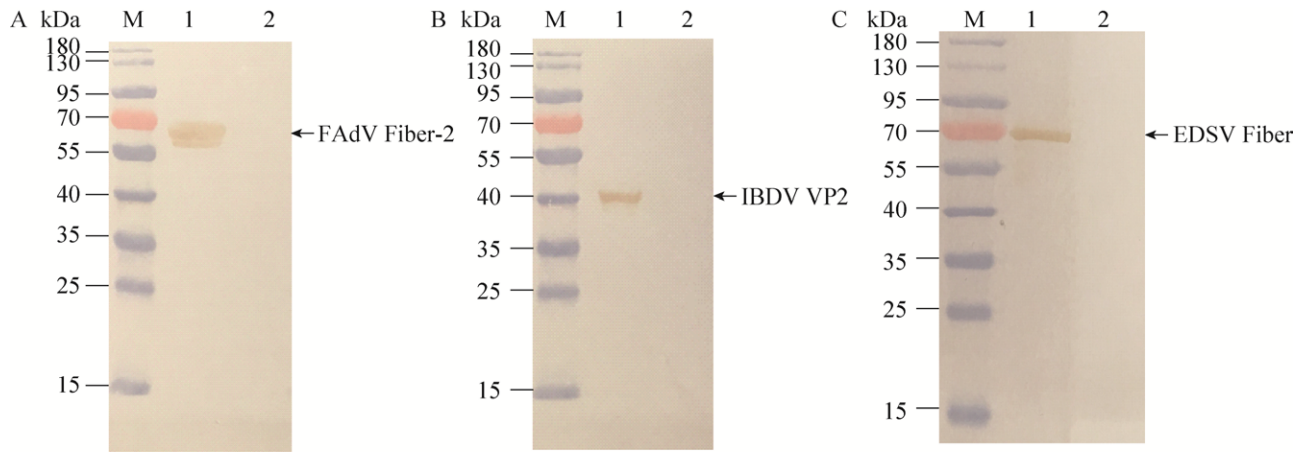


图5 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of the purified proteins. (A) The positive chicken serum of FAdV-4. M: protein molecular marker; 1: purified proteins; 2: negative control. (B) The positive chicken serum of IBDV. M: protein molecular marker; 1: purified proteins; 2: negative control. (C) The positive chicken serum of EDSV. M: protein molecular marker; 1: purified proteins; 2: negative control.

上述结果说明串联表达和纯化后的 FAdV Fiber-2 蛋白、IBDV VP2 蛋白和 EDSV Fiber 蛋白均具有免疫反应性和抗原活性，可以作为基因工程亚单位多联多价疫苗研究的候选抗原。

### 3 讨论

在大肠杆菌中共表达多个基因已有很多研究，主要包括酶与辅酶共表达，获得具有催化活性的蛋白酶；功能相关蛋白质的共表达；增加外源蛋白质的可溶性的共表达等<sup>[8]</sup>。有研究采用多重转录单元表达系统，将商业化质粒进行改造，使每个基因都带有独立的启动子、核糖体结合位点、终止子等表达调控元件，各个基因的表达相对独立，实现了在大肠杆菌中由单一质粒介导的多基因高效共表达<sup>[9]</sup>。以串联表达技术为基础，基因工程亚单位多联多价疫苗，可以通过一次发酵和纯化，同时获得多种抗原。该技术在生产上可以减少生产工序，降低生产成本，对基因工程亚单位多联多价疫苗的产业化具有十分重要的意义。

本研究为了简化基因工程多联多价疫苗中所含抗原的生产工艺，获得均一的可溶性抗原，利

用多重转录单元共表达系统，共表达 3 种禽类病毒抗原。FAdV Fiber-2 蛋白<sup>[1, 10]</sup>、IBDV VP2 蛋白<sup>[11-13]</sup>和 EDSV Fiber 蛋白<sup>[14-15]</sup>是亚单位疫苗研发主要的靶蛋白。靶蛋白的可溶性表达成为了疫苗研发的关键问题。为了获得可溶性的蛋白，首先对上述 3 种抗原单独表达进行了研究。初步表达结果显示，3 种抗原基因片段在大肠杆菌中不表达或表达为包涵体。目前解决大肠杆菌表达外源蛋白形成包涵体问题的常用方法包括使用不同的表达菌株<sup>[16]</sup>、基因片段的密码子优化<sup>[17-18]</sup>和使用促溶性标签<sup>[12, 19-21]</sup>等。这些方法的使用很大程度上解决了包涵体表达的问题。因此本文通过基因片段密码子优化和载体启动子改造的方法对 3 种抗原片段单独表达条件进行了优化，并且成功获得了能够单独可溶性表达 3 种抗原的最适载体。在此基础上，进一步对 3 个基因片段的串联表达进行了研究。由于单基因载体多重转化共表达策略和单一载体/单一转录单元共表达策略均会出现共表达的基因表达水平不一的问题，难以控制多个基因表达水平的一致性<sup>[22-23]</sup>，所以本研究选用单一载体/多重转录单元共表达策略进行 3 种禽病毒抗原的共表达，并且优化了 3 个基因在同一



载体上的串联顺序,期望能够控制3种抗原在同一菌株中表达水平的均一性。结果显示,3个基因在同一载体上不同的串联顺序对可溶性蛋白表达的均一性有影响,可能是因为3个基因片段来自于不同的病毒,其在大肠杆菌中的可溶性表达能力有区别,虽然经过单独表达的优化,当将其串联到一起,每个基因前的启动子之间可能会相互干扰,导致不同蛋白的表达速度有别于单独表达时的速度,从而出现可溶性表达量不均一的现象。本研究通过不同串联顺序的优化,最终实现了3个不同基因的均一表达,并且纯化后获得了3种禽病毒抗原均能与相应的阳性鸡血清反应。我们之前的研究已经表明,纯化后的IBDV VP2蛋白免疫鸡后,攻毒保护率为100%<sup>[4]</sup>,FAdV Fiber-2蛋白和EDSV Fiber蛋白也均能够刺激鸡体产生保护性抗体(相关研究结果尚未发表)。大量的研究报道也证明了FAdV Fiber-2蛋白、IBDV VP2蛋白和EDSV Fiber蛋白均具有免疫原性<sup>[1, 3, 10-14]</sup>。

本研究通过目的基因密码子优化、表达载体启动子改造和基因串联等关键技术的突破,首次实现了3种来自不同禽病毒抗原的高效、均一、可溶性串联表达和纯化,简化了基因工程亚单位多联多价疫苗中抗原生产的工艺步骤,共表达蛋白纯化后经Western blotting和活性检测证明3种蛋白均具有免疫反应性和天然的抗原活性,为基因工程亚单位多联多价疫苗的研制奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Schachner A, Marek A, Jaskulska B, et al. Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS). *Vaccine*, 2014, 32(9): 1086–1092.
- [2] Harakuni T, Andoh K, Sakamoto R, et al. Fiber knob domain lacking the shaft sequence but fused to a coiled coil is a candidate subunit vaccine against egg-drop syndrome. *Vaccine*, 2016, 34(27): 3184–3190.
- [3] Rong J, Cheng TP, Liu XN, et al. Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, 2005, 23(40): 4844–4851.
- [4] Pang WQ, Zhao KK, Xue JJ, et al. Purified recombinant VP2 protein can provide complete protection to very virulent infectious bursal disease virus challenge as a subunit vaccine. *J Vaccines Immun*, 2015, 1(1): 39–42.
- [5] Wang XL, Tang QX, Chu ZL, et al. Immune protection efficacy of FAdV-4 surface proteins fiber-1, fiber-2, hexon and penton base. *Virus Res*, 2018, 245: 1–6.
- [6] Kerrigan JJ, Xie Q, Ames RS, et al. Production of protein complexes via co-expression. *Protein Express Purif*, 2011, 75(1): 1–14.
- [7] Romier C, Ben Jelloul M, Albeck S, et al. Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallograph Sect D: Biol Crystallogr*, 2006, 62(10): 1232–1242.
- [8] Busso D, Peleg Y, Heidebrecht T, et al. Expression of protein complexes using multiple *Escherichia coli* protein co-expression systems: a benchmarking study. *J Struct Biol*, 2011, 175(2): 159–170.
- [9] He ZH, Wang Y, Zhao J, et al. Construction of a vector suitable for the tandem coexpression of multiple genes by a single plasmid. *China Biotechnol*, 2011, 31(1): 40–45 (in Chinese).  
何彰华, 王洋, 赵珺, 等. 一种多基因串联共表达载体的构建. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(1): 40–45.
- [10] Chen L, Yin LJ, Zhou QF, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant fiber-2 protein in protecting SPF chickens against fowl adenovirus 4. *Vaccine*, 2018, 36(9): 1203–1208.
- [11] Pitcovski J, Gutter B, Gallili G, et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, 2003, 21(32): 4736–4743.
- [12] Jiang DW, Liu YC, Wang AP, et al. High level soluble expression and one-step purification of IBDV VP2 protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(6): 901–908.
- [13] Wang M, Pan Q, Lu Z, et al. An optimized, highly

- efficient, self-assembled, subvirus-like particle of infectious bursal disease virus (IBDV). *Vaccine*, 2016, 34(30): 3508–3514.
- [14] Fingerut E, Gutter B, Gallili G, et al. A subunit vaccine against the adenovirus egg-drop syndrome using part of its fiber protein. *Vaccine*, 2003, 21(21/22): 2761–2766.
- [15] Li Y, Sun ZH, Jiang Y, et al. Secretary expression and antigenicity analysis of C-terminal of fibrin protein on egg drop syndrome virus. *Progr Mod Biomed*, 2010, 10(24): 4664–4668 (in Chinese).  
李莹, 孙志豪, 姜艳, 等. 减蛋综合征病毒纤维蛋白 C-末端的分泌表达及抗原性分析. *现代生物医学进展*, 2010, 10(24): 4664–4668.
- [16] Jiang YS, Li JB, Gao M, et al. Optimized expression, preparation of human papillomavirus 16 L2E7 fusion protein and its inhibitory effect on tumor growth in mice. *Chin J Biotech*, 2015, 31(4): 566–576 (in Chinese).  
姜云水, 李剑波, 高孟, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 L2E7 融合蛋白的优化表达、制备及其对肿瘤生长的抑制作用. *生物工程学报*, 2015, 31(4): 566–576.
- [17] Cai HY, Li Y, Zhang H, et al. Effects of gene design on recombinant protein expression: a review. *Chin J Biotech*, 2013, 29(9): 1201–1213 (in Chinese).  
蔡海莺, 李杨, 张辉, 等. 基因设计对重组蛋白表达的影响研究进展. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1201–1213.
- [18] Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Express Purifi*, 2008, 59(1): 94–102.
- [19] Qi YH, Zou ZR, Zou HY, et al. Intrinsic prokaryotic promoter activity of SUMO gene and its applications in the protein expression system of *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2011, 27(6): 952–962 (in Chinese).  
亓燕红, 邹竹荣, 邹华英, 等. SUMO 基因的内在原核启动子活性及其在大肠杆菌蛋白表达系统中的应用. *生物工程学报*, 2011, 27(6): 952–962.
- [20] Chen Y, Guo RP, Huang SF, et al. Prokaryotic expression, protein purification and functional verification of human homotypic fusion and vacuole protein sorting complex subunit. *Chin J Biotech*, 2020, 36(1): 133–142 (in Chinese).  
陈玉, 郭仁朋, 黄赛飞, 等. 人同型融合和蛋白质分选复合体亚基的原核表达、蛋白纯化及功能验证. *生物工程学报*, 2020, 36(1): 133–142.
- [21] Lei RY, Qiao YH, Yan JD, et al. Soluble expression of recombinant human BMP6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(3): 452–459 (in Chinese).  
雷荣悦, 乔玉欢, 闫继东, 等. 重组人 BMP6 在大肠杆菌中可溶表达、纯化及活性分析. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 452–459.
- [22] Kim KJ, Kim HE, Lee KH, et al. Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein complexes. *Protein Sci*, 2004, 13(6): 1698–1703.
- [23] Lee HY, Khosla C. Bioassay-guided evolution of glycosylated macrolide antibiotics in *Escherichia coli*. *PLoS Biol*, 2007, 5(2): e45.

(本文责编 陈宏宇)