

虎源猫瘟热病毒 VP2 蛋白基因在毕赤酵母中的表达

杨松涛^{1,2} 夏咸柱^{2*} 乔军² 王铁成² 郑明光¹

(军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)¹ (吉林大学农学部 长春 130062)²

摘要: 克隆了虎源猫瘟热病毒 VP2 蛋白基因并首次在 *Pichia pastoris* 酵母中进行了分泌表达。用特异性引物从虎源 FPV 中扩增出 VP2 基因, 将其克隆到 pGEM-T 载体中, 得到重组质粒 pTVP2 进行测序。用 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切 pTVP2, 回收目的基因 VP2 片段将其定向克隆到 pPICZαA 中, 构建出重组质粒 pPICZαAVP2。将 pPICZαAVP2 用 *SacI* 内切酶线性化后, 电转化毕赤酵母细胞 GS115, PCR 法筛选阳性重组酵母, 并用 1% 甲醇诱导表达。结果在重组酵母菌培养物上清中经 SDS-PAGE 检测到相对分子量约为 32 kD 的重组蛋白, Western-blotting 证实该重组蛋白可以与 FPV 多克隆抗体发生特异性血清学反应, 表明重组 VP2 蛋白具有正确的空间构象, 有望作为虎 FPV 感染的诊断和免疫预防用抗原。

关键词: 猫瘟热病毒, VP2 蛋白基因, 毕赤酵母, 表达

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0029-04

Expression of VP2 Gene of Feline Panleukopenia Virus Isolated from Tiger in *Pichia pastoris* Yeast

YANG Song-Tao^{1,2} XIA Xian-Zhu^{2*} QIAO Jun² WANG Tie-Cheng² ZHENG Ming-Guang¹

(Department of Agricultural Science, Jilin University, Changchun 130062)¹

(Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062)²

Abstract: In this study, the VP2 gene of feline panleukopenia virus (FPV) isolated from tiger was successfully cloned and expressed in *Pichia pastoris* yeast. The VP2 gene was amplified by PCR with a pair of specific primer. Then PCR products was purified and cloned into pGEM-T for sequencing. The interesting gene fragment was recovered after the double enzyme digestion of *EcoRI/NotI*, then subcloned into pPICZαA for secretory expression. The recombinant pPICZαAVP2 was linearized with *SacI* and then transformed into competence yeast GS115 for expression under the induction of 1% methanol. The positive recombinants were screened by PCR method. The expression product was identified by SDS-PAGE and western-blotting. The results showed that there was a molecular weight of 32 kD, which could be specifically recognized by polyclonic antibody against FPV. It revealed that the recombinant VP2 protein had correct three-dimensional structure, which would be used as a antigen protein for the diagnosis and prevention of FPV infection in tigers.

Key words: Feline panleukopenia virus, VP2 protein gene, *Pichia pastoris*, Expression

猫瘟热也称猫泛白细胞减少症、猫传染性肠炎, 是由猫瘟热病毒 (Feline panleukopenia virus, FPV) 引起的一种以高热、呕吐、白细胞严重减少和出血性肠炎为主要特征的高致死性传染病^[1]。在自然条件下, FPV 可感染猫科、鼬科等多种肉食性动物, 虎、豹、狮、水貂、浣熊等野生动物非常易感, 死亡率很高^[2]。血清学调查发现, 该病在我国大部分地区都有流行, 是当前对我国圈养和野生虎等猫科动物威胁极大的病

其它作者: 常爽¹ 黄耕² 苏建青^{1,2} 冯娜^{1,2} 王化磊^{1,2}

* 通讯作者 Tel: 0431-6758799, E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-03-23, 修回日期: 2005-04-25

毒性传染病之一。本研究首次克隆了虎源 FPV 主要保护性抗原 VP₂ 蛋白基因,并在毕赤酵母中实现了分泌表达。

1 材料与方法

1.1 病毒

FPV GT-2 株为本实验室在 2002 年从桂林 1 只病死虎粪便中用猫肾 F81 传代细胞分离而获得,经系统的病毒学鉴定后保存。

1.2 质粒、菌株及主要试剂

毕赤酵母表达载体 pPICZ α A、克隆宿主菌 TOP₁₀、毕赤酵母表达宿主菌 GS115、DEPC、Zeocin 购自 Invitrogen 公司。T4 DNA 连接酶、Taq plus DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。pGEM-T 载体为 Promega 公司产品。辣根过氧化物酶标记的山羊抗猫 IgG 购自 Sigma 公司。FPV 阳性血清由 FPV 细胞培养物超离浓缩后经 4 次免疫健康猫而获得,其中和抗体效价为 1:640。

1.3 引物设计

根据 GenBank 报道的 FPV VP₂ 基因序列,设计合成了一对特异性引物,用于扩增 VP₂ 蛋白基因。上游引物:5' -AACGAATTCAGTGATGGAGCAGTTCAACC-3'; 下游引物:5' -AAAGCGGCCGCTTATGTTCTTAGTAAGTGTACT-3'。为下一步克隆需要,分别在上、下游引物中引入 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点,并加有保护性碱基。

1.4 FPV GT-2 株 VP₂ 基因的扩增与克隆

利用上述特异性引物从 FPV GT-2 株的 F81 传代细胞培养物中扩增 VP₂ 蛋白基因。PCR 采用 50 μ L 的反应体系:模板 1.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 4 μ L, 25 mmol/L 引物各 1 μ L, 5U/ μ L Taq plus DNA 聚合酶 0.3 μ L, 加 dH₂O 使反应体系达 50 μ L。PCR 循环条件为:96 $^{\circ}$ C 预变性 180s, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 35 个循环,最后再延伸 10min。用 TaKaRa 公司的凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。将回收的 VP₂ 基因片断与 pGEM-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109;用内切酶酶切和 PCR 方法筛选阳性重组质粒 pTVP 2,送上海联合基因公司进行测序。

1.5 酵母表达载体 pPICZ α AVP₂ 的构建和鉴定

将测序正确的 pTVP 2 和 pPICZ α A 用 *EcoR*I 和 *Not*I 双酶切后,分别回收目的片段和载体大片段进行连接反应,并转化 TOP₁₀,使用含 Zeocin (25 μ g/mL) 的低盐 LB 平板培养。用限制性内切酶酶切和 PCR 方法获得阳性重组质粒 pPICZ α AVP₂。

1.6 酵母表达质粒 pPICZ α AVP₂ 的转化、重组子及其表型鉴定

pPICZ α AVP₂ 用 *Sac*I 进行线性化,回收线性化片断与冰预冷的感受态酵母菌 GS115 混匀,用 Bio-RAD Gene Pluser 在 375V/cm, 25 μ F、250 Ω 的条件下进行电转化。酵母重组子筛选及其表型鉴定按照 Invitrogen 公司操作手册进行。

1.7 酵母重组子的诱导表达及表达蛋白的检测

选择表型为 Mut⁺ 的重组酵母进行诱导。诱导用的培养基为 BMGY 和 BMMY。先将重组酵母接种到 10mL BMGY 液体培养基中,27 $^{\circ}$ C, 170r/min 摇床培养,当 OD 值为 2~6 之间时,4,000 r/min 离心 10min,弃上清。用 BMMY 稀释沉淀的菌体到 OD 值为 1 左右,27 $^{\circ}$ C, 170r/min 培养 5d,并于诱导表达起始后,每隔 24h 补加 100% 的甲醇溶液使其终浓度为 1%。将培养物上清用超滤离心管除盐和 25 倍浓缩;取浓缩产物 35 μ L 与等体积的 2 \times 上样缓冲液混匀 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min,进行 SDS-PAGE 分析,然后一抗用 FPV

阳性血清、二抗用辣根过氧化物酶标记的兔抗猫 IgG 进行 Western-blotting 分析。

2 结果

2.1 FPV GT-2 株 VP 2 基因的扩增与克隆

经 1% 琼脂糖凝胶电泳, FPV GT-2 株 PCR 产物大小约为 768 bp, 与预期值相符。将其克隆到 pGEM-T 载体中进行测序, 所测序列已经被 GenBank 收录。

2.2 酵母真核表达载体 pPICZαAVP 2 的鉴定

重组子 pPICZαAVP₂ 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 可得到 3,600 bp 和 768 bp 两个片段; 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切线性化均得到 4,368 bp 大小的核酸片断 (图 1)。以重组子 pPICZαAVP₂ 为模板, 进行 PCR 扩增, 可得到 768 bp 大小的核酸片段, 表明该重组质粒构建正确。

2.3 Mut⁺ 表型重组酵母菌的筛选及 PCR 鉴定

电转化感受态 GS115, 转化菌经 MDH/MMH 平板筛选, Mut⁺ 表型酵母菌用于 PCR 鉴定。用植物基因组 DNA 小量提取试剂盒提取酵母基因组 DNA, 用 VP 2 基因测序特异性引物进行 PCR 扩增筛选鉴定重组酵母, 筛选得到 10 株重组酵母菌 (图 2)。

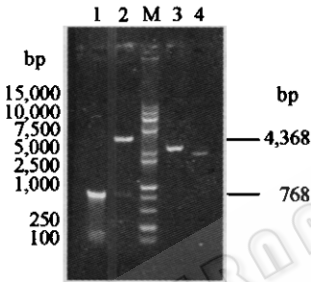


图 1 pPICZαAVP₂ 酶切与 PCR 鉴定结果

M L-15000+2000, 1 pPICZαAVP₂ 的 PCR 扩增片段, 2 pPICZαAVP₂/*EcoR*I + *Not* I, 3 pPICZαAVP₂ 重组质粒, 4 pPICZαA 空质粒

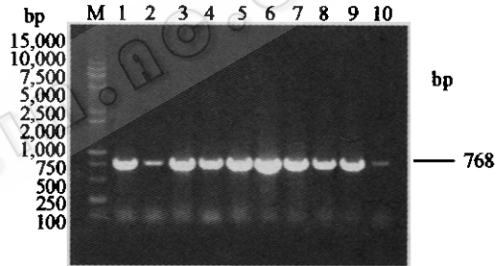


图 2 阳性重组酵母的 PCR 筛选结果

M L-15000+2000, 1~10 重组酵母基因组的 PCR 扩增

2.4 重组蛋白 VP 2 的 SDS-PAGE 及 Western-blotting 检测

10 株重组酵母菌经 1% 甲醇诱导 5d 后, 收集培养基上清用 Millipore 公司生产的超速离心管除盐和浓缩后进行 SDS-PAGE 分析, 结果发现有 2 株重组酵母培养基上清中可

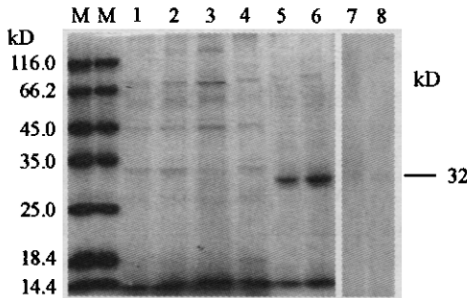


图 3 pPICZαAVP₂ 转化菌 GS115 表达产物 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析

M 标准分子量蛋白, 1, 2~4 诱导的非重组酵母, 3 诱导的正常酵母 GS115, 5, 6 诱导的阳性重组酵母, 7, 8 Western-blotting 分析

检测到分子量为 32 kD 大小的目的蛋白, 与预期值相符 (图 3 中 5, 6 道), 且诱导 120h 时重组蛋白表达量达到最高。Western-blotting 分析发现, 2 株重组酵母表达的重组蛋白均可与 FPV 多克隆抗体发生特异性血清学反应 (图 3 中 7, 8 道)。

3 讨论

猫瘟热病毒属细小病毒科细小病毒属。该病毒粒子呈对称 20 面体, 直径 18 nm ~ 26nm, 无囊膜。病毒衣壳由 VP1、VP2、VP3 3 种蛋白组成, 内含约有 5,000nt 的线性单链 DNA 分子^[3,4]。基因组有 2 个主要的 ORF: NS ORF 和 S ORF, 前者的产物为基因组复制和转录所必需, 后者则编码 VP1、VP2 和 VP3。其中 VP2 不但是具有血凝活性的物质, 而且也是该病毒的主要保护性抗原^[5]。目前应用于肉食动物的细小病毒疫苗主要有灭活苗和弱毒苗^[6-9]。他们的应用虽然在很大程度上控制了肉食兽细小病毒病的大规模流行, 但一些局部地区仍时有发生^[10]。究其原因, 可能和疫苗株与流行野毒株抗原性存在一定差异有关^[11-14]。试验中, 对虎源 FPV VP₂ 的主要抗原 VP₂ 蛋白片段在毕赤酵母中实现了分泌表达, 并且 Western-blotting 分析证实表达的 VP₂ 重组蛋白能与抗 FPV 阳性血清发生特异性反应, 表明该重组蛋白具有正确的空间构象。

毕赤酵母是一种较为理想的真核表达系统, 它不但具有原核生物生长快、表达量高、操作简便等特点, 而且也具有真核生物细胞翻译后加工和修饰的功能, 表达的蛋白更接近天然蛋白的空间结构。在本试验中, 表达载体 pPICZ α A 采用的 AOX1 启动子具有强诱导性, 有利于外源基因的高效表达。同时外源基因附加信号肽后可使表达蛋白分泌到细胞外, 易于目的蛋白的纯化。然而, 在本试验中 10 株重组酵母只有 2 株实现了分泌表达, 可见影响酵母分泌表达外源蛋白量的因素很多。因此, 有必要进一步探索和优化表达条件以提高重组蛋白的表达量, 以为下一步利用酵母表达的 VP₂ 蛋白进行虎 FPV 感染特异性诊断及 FPV 亚单位疫苗的研究奠定良好的基础。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 (第二版). 北京: 科学出版社, 1997. 1155 ~ 1158.
- [2] Parrish C R. *Baillieres Clin Haematol*, 1995, **8** (1): 57 ~ 71.
- [3] 张英. 中国病毒学, 1996, **11** (3): 193 ~ 200.
- [4] 许树林, 沈秀丽. 黑龙江畜牧兽医, 1997, **2**: 38 ~ 40.
- [5] Carison J, Rushlow K, Maxwell I, *et al.* *J Virol*, 1985, **55**: 574.
- [6] Chenneils D L. *Vet Rec*, 1980, **107**: 25 ~ 27.
- [7] Chapek M L, McClaughry L E, Wilkins L M. *Mod Vet*, 1990, **61**: 261 ~ 263.
- [8] Lloyd-Evans L P. *Vet Rec*, 1980, **106** (21): 445.
- [9] Appel M J, Carmichael L E, McGregor D D, *et al.* *Mod Vet Pract*, 1980, **61** (12): 983 ~ 985.
- [10] Biek R, Zarnke R L, Gillin C, *et al.* *J Wildl Dis*, 2002, **38** (4): 840 ~ 845.
- [11] Mengeling W L, Paul P S, Bunn T O, *et al.* *J Gen Virol*, 1986, **7** (12): 2839 ~ 2844.
- [12] Gamoh K, Shimazaki Y, Senda M, *et al.* *Vet Rec*, 2003, **153** (24): 751 ~ 752.
- [13] Nakamura M, Nakamura K, Miyazawa T, *et al.* *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, **10** (6): 1085 ~ 1089.
- [14] Govindasamy L, Hueffer K, Parrish C R, *et al.* *J Virol*, 2003, **77** (22): 12211 ~ 12221.