

研究报告

口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 在谷氨酸棒状杆菌中的表达及优化

崔思楠^{1,2}, 金陵鹏^{1,2}, 闵远乐^{1,2}, 王浩^{1,2}, 王一凡^{1,2}, 谢佳康^{1,2}, 刘秀霞^{*1,2}, 白仲虎^{1,2}

1 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

崔思楠, 金陵鹏, 闵远乐, 王浩, 王一凡, 谢佳康, 刘秀霞, 白仲虎. 口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 在谷氨酸棒状杆菌中的表达及优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5427-5438.

CUI Sinan, JIN Lingpeng, MIN Yuanle, WANG Hao, WANG Yifan, XIE Jiakang, LIU Xiuxia, BAI Zhonghu. Expression and optimization of the structural protein VP1 of foot-and-mouth disease virus in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5427-5438.

摘要:【背景】口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的感染牛、羊和猪等偶蹄动物的主要疫病之一。口蹄疫病毒的结构蛋白 VP1 包含多个能够引起机体免疫反应的主要位点, 因此 VP1 是研究亚单位疫苗的方向靶标。谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)作为安全生产菌株, 是医药用蛋白生产的优势细胞工厂。【目的】利用 *C. glutamicum* 作为受体菌株表达外源蛋白的优势实现 VP1 的外源表达。【方法】根据 VP1 结构蛋白的基因序列、相应功能和 *C. glutamicum* 的密码子偏好性设计并合成 VP1 基因, 与 pXMJ19 载体连接构成重组质粒 pXMJ19-VP1。 *C. glutamicum* CGMCC 1.15647 菌株用于表达 VP1-6×his 蛋白, 并对蛋白表达元件启动子、5'非翻译端(5'UTR)、目的蛋白自身 N 端等进行优化, 同时对培养条件等进一步优化, 采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 技术检测 VP1 蛋白的表达情况。最后应用间接酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定本研究中生产的 VP1 的免疫活性。【结果】SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果表明 VP1 蛋白能在 *C. glutamicum* CGMCC 1.15647 菌株成功表达, 将 P_{tac} 启动子替换为合成型启动子 P_{H36} 能提高蛋白产量。在此基础上, 通过插入不同的 5'UTR 序列和 VP1 蛋白 N 端氨基酸的改变能进一步提高蛋白产量并可利用 CspB 信号肽实现分泌表达。发酵试验表明, VP1 摇瓶发酵培养最优条件为 30 °C、24 h。ELISA 试验表明, 本研究中的 VP1 可与阳性血清特异性结合。【结论】本研究在谷氨酸棒状杆菌中成功表达 FMDV 的 VP1 蛋白, 并通过优化蛋白表达元件的方法进一步提高了产量, 为开发新型 FMD 免疫诊断试剂和安全高效的亚单位疫苗奠定了良好的基础。

关键词: 谷氨酸棒状杆菌; 口蹄疫病毒; 结构蛋白 VP1; 蛋白表达元件; 发酵优化

资助项目: 国家自然科学基金(22078128)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22078128).

*Corresponding author. E-mail: liuxiuxia@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-03-28; Accepted: 2023-05-25; Published online: 2023-10-18

Expression and optimization of the structural protein VP1 of foot-and-mouth disease virus in *Corynebacterium glutamicum*

CUI Sinan^{1,2}, JIN Lingpeng^{1,2}, MIN Yuanle^{1,2}, WANG Hao^{1,2}, WANG Yifan^{1,2},
XIE Jiakang^{1,2}, LIU Xiuxia^{*1,2}, BAI Zhonghu^{1,2}

1 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Engineering Research Center for Bioactive Products Processing Technology of Jiangsu Province, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Foot-and-mouth disease (FMD) caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV) is one of the major diseases that infect cloven-hoofed animals such as cattle, sheep, and pigs. The structural protein VP1 of FMDV contains multiple sites that can cause host immune response, serving as a target for the research and development of subunit vaccines. As a safe production strain, *Corynebacterium glutamicum* is an elite cell factory for the production of pharmaceutical proteins. [Objective] To realize the heterologous expression of VP1 in *C. glutamicum*. [Methods] According to the gene sequence and function of VP1 and the codon preference of *C. glutamicum*, we designed and synthesized the VP1 gene and then ligated it with pXMJ19 to create the recombinant plasmid pXMJ19-VP1. *C. glutamicum* CGMCC 1.15647 was used to express VP1 protein. The protein expression elements [e.g., the promoter, 5' untranslated region (5'UTR), and N-terminus] of VP1 protein and the culture conditions were optimized. SDS-PAGE and Western blotting were employed to determine the expression of VP1. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the immunocompetence of VP1 produced in this study. [Results] SDS-PAGE and Western blotting showed that VP1 was successfully expressed in *C. glutamicum* CGMCC 1.15647. Replacing P_{tac} promoter with the synthetic promoter P_{H36} increased the protein yield. On this basis, the protein yield can be further increased by insertion of the 5'UTR sequence and mutation of the N-terminal amino acid of VP1. CspB signal peptide can be used to achieve secretory expression. Fermentation experiments showed that the optimum conditions of shake flask fermentation were 30 °C and 24 h. The results of ELISA suggested that VP1 could specifically bind to the positive serum. [Conclusion] The VP1 protein of FMDV was successfully expressed in *C. glutamicum* CGMCC 1.15647, and optimizing protein expression elements increased the protein yield, which laid a foundation for the development of immunodiagnostic reagents and safe and efficient subunit vaccines for FMD.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; foot-and-mouth disease virus; structural protein VP1; protein expression element; fermentation optimization

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是一种由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起且常见于牛、羊和猪等偶蹄动物的高传染性疾病^[1]。FMDV属于RNA病毒^[2]，一

部分基因编码形成的衣壳蛋白被自身的蛋白酶水解后可形成VP1-VP4。VP1基因编码的一部分氨基酸可形成口蹄疫病毒环，有研究表明口蹄疫的病毒环可分离出来形成合成肽，免疫原

性较强^[3]。VP1 的 GH 环是重要的抗原位点, 因此针对 VP1 抗原决定簇的研究是口蹄疫亚单位疫苗和一些新型疫苗研究的热点^[4]。有研究者利用大肠杆菌作为底盘菌株实现 FMDV 结构蛋白的外源表达, 但并不能实现分泌表达, 且产物中存在内毒素^[5], 增加了下游纯化工艺复杂性和疫苗制造成本。

谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 是一种在土壤中分离出来的无芽孢革兰氏阳性菌, 是一种公认的安全菌株^[6]。因其可高密度培养^[7], 无内毒素和宿主内蛋白的干扰^[8], 胞内能形成二硫键使蛋白形成正确的结构^[9], 以及具有完善的蛋白分泌体系从而能将表达后的蛋白正确地分泌到胞外以简化下游的纯化工艺^[10], 近些年作为受体菌株广泛应用在天然产物或非天然产物的生产中^[11]。

蛋白质的形成包括 3 个阶段: 转录、翻译和翻译后修饰。5'非翻译端(5'UTR)存在对转录及翻译过程有重要影响的调控元件^[12], 如 G-四聚体、5'帽子结构等^[13], 对于维持 mRNA 结构及 RNA 剪接和加工有重要作用^[14]。因此 5'UTR 能影响蛋白质的最终表达量^[15-16], Zhou 等研究发现 5'UTR 可以促使 mRNA 形成“发卡式”二级结构进而提高 mRNA 稳定性和蛋白表达强度^[17-18]。与此同时, 蛋白自身 N 端也会加快核糖体富集, 提高翻译起始速率, 增加蛋白表达量^[19]。

本研究根据 FMDV 结构蛋白 VP1 氨基酸序列以及谷氨酸棒状杆菌密码子偏好性设计合成基因序列 VP1, 以实现 VP1 抗原在谷氨酸棒状杆菌中的可溶分泌表达, 并对蛋白表达元件进行优化进一步提高 VP1 的表达产量, 旨在为生产口蹄疫亚单位疫苗抗原提供一种低成本的表达体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

Escherichia coli JM109 和 *Corynebacterium glutamicum* CGMCC 1.15647 为实验室保存。Cg- Δ clpC 为 clpC 蛋白酶敲除菌株, Cg- Δ clpS 为 clpS 蛋白酶敲除菌株, Cg-pXMJ19、Cg- Δ clpC-pXMJ19 和 Cg- Δ clpS-pXMJ19 为含有 pXMJ19 质粒菌株, Cg-P_{H36}-pXMJ19、Cg-P_{H36}- Δ clpC-pXMJ19 和 Cg-P_{H36}- Δ clpS-pXMJ19 为含有启动子 P_{H36} 的 pXMJ19 质粒菌株。Cg-VP1、Cg- Δ clpC-VP1 和 Cg- Δ clpS-VP1 为含有 pXMJ19-VP1 质粒的蛋白表达菌株, Cg-CspB-VP1 为含有 pXMJ19-CspB-VP1 质粒的蛋白表达菌株, Cg-P_{H36}-VP1、Cg-P_{H36}- Δ clpC-pXMJ19 和 Cg-P_{H36}- Δ clpS-pXMJ19 为含有启动子 P_{H36} 的 pXMJ19-VP1 质粒的蛋白表达菌株, Cg-P_{H36}-5'UTR-(1-4)-VP1 为含有加入 5'UTR 序列后的 pXMJ19-VP1 质粒的蛋白表达菌株, Cg-P_{H36}-N.M-(1-4)-VP1 为含有 VP1 N 端序列突变后 pXMJ19-VP1 质粒的蛋白表达菌株。

1.1.2 质粒

pXMJ19 为表达载体, 含组成型 tac 启动子, 本实验室保存^[20]。pXMJ19-VP1 为 pXMJ19 含 VP1 编码基因, pXMJ19-CspB-VP1 为 pXMJ19-VP1 含 CspB 信号肽, P_{H36}-VP1 为 pXMJ19-VP1 启动子更换为 P_{H36}, P_{H36}-N.M-(1-4)-VP1 为 pXMJ19-VP1 的 VP1 N 端氨基酸突变, P_{H36}-5'UTR-(1-4)-VP1 为 pXMJ19-VP1 的 SD 序列前加入不同的 5'UTR 序列。表 1 为构建质粒时所用到的引物。

1.1.3 主要试剂、仪器和培养基

DL2000 DNA Marker、DL10000 DNA Marker、限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Eco*R I 和

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study.

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'→3')
P _{H36} -VP1-F	GGGGAATATTAACGGGCCAGGGTGGTTCGCACCTTGGTTGGTAGGAGTAGCATGGGATCCA TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
P _{H36} -VP1-R	GCCCCGTTAATATTCCTCCGTTTAGGGCACCAGATAGAGGTACCCAGCTTTTGCAGCTCATTT CAGAATATTTGCCAGAACCG
P _{H36} -5'UTR-1-VP1-F	CCCAAGCTTGACACTAAGTTATTACATTTATTATATGATTGGTTAGGACCACCTCACACAAA GGAGGACAACCTAATGCTGAC
P _{H36} -5'UTR-1-VP1-R	CCGGAATTCTTAGTGGTGTATGGTGTATGGTGTAGGCAGCGGGCG
P _{H36} -5'UTR-2-VP1-F	CCCAAGCTTGACACTAAGTTATTACATTTATTATATGATTGGTTAGGACCCGACCACCAAAA GGAGGACAACCTAATGCTGAC
P _{H36} -5'UTR-2-VP1-R	CCGGAATTCTTAGTGGTGTATGGTGTATGGTGTAGGCAGCGGGCG
P _{H36} -5'UTR-3-VP1-F	CCCAAGCTTGACACTAAGTTATTACATTTATTATATGATTGGTTAGGACGTAGGTTATAAAAAG GAGGACAACCTAATGCTGAC
P _{H36} -5'UTR-3-VP1-R	CCGGAATTCTTAGTGGTGTATGGTGTATGGTGTAGGCAGCGGGCG
P _{H36} -5'UTR-4-VP1-F	CCCAAGCTTGACACTAAGTTATTACATTTATTATATGATTGGTTAGGACGTCCGGTATCAAAG GAGGACAACCTAATGCTGAC
P _{H36} -5'UTR-4-VP1-R	CCGGAATTCTTAGTGGTGTATGGTGTATGGTGTAGGCAGCGGGCG
P _{H36} -N.M-1-VP1-F	AATGCTGCCTAACGTGCGCGGAGACTTGCAG
P _{H36} -N.M-1-VP1-R	CACGTTAGGCAGCATTAGTTGTCCTCCT
P _{H36} -N.M-2-VP1-F	AATGCTGAGTAACGTGCGCGGAGACTTGCAG
P _{H36} -N.M-2-VP1-R	CACGTTACTCAGCATTAGTTGTCCTCCT
P _{H36} -N.M-3-VP1-F	ACCAACCGTCGCGGAGACTTGCAGGTGC
P _{H36} -N.M-3-VP1-R	TCCGCGACGGTTGGTCAGCATTAGTTG
P _{H36} -N.M-4-VP1-F	ACCAACCCTCGCGGAGACTTGCAGGTGC
P _{H36} -N.M-4-VP1-R	TCCGCGAGGGTTGGTCAGCATTAGTTG

重组酶、T4 DNA 连接酶、Primer STAR Max DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒, 康为世纪生物科技有限公司; 质粒测序由安升达测序公司提供; 蛋白标准品, 翌圣生物科技(上海)有限公司; HRP-conjugated 6×His (His), Proteintech 公司; ELISA 试验中一抗, 睿信生物科技有限公司。

PCR 仪, 朗基科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司; 蛋白纯化仪, 通用电气公司; 超净工作台, 苏州净化设备厂。

LBB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 脑心浸出液 10.0, NaCl 10.0; LBHIS 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 脑

心浸出液 10.0, 异烟肼 4.0, 甘氨酸 25.0, NaCl 10.0, 吐温-80 1 mL。

1.2 方法

1.2.1 培养条件

大肠杆菌培养条件: LBB 培养基, 37 °C、220 r/min 摇床培养; 谷氨酸棒状杆菌培养条件: LBHIS 培养基, 30 °C、220 r/min 摇床培养。大肠杆菌培养体系中氯霉素的质量浓度为 30 µg/mL; 谷氨酸棒状杆菌培养体系中氯霉素的质量浓度为 10 µg/mL。

1.2.2 VP1 表达载体的构建

以猪 O 型口蹄疫病毒的结构蛋白 VP1 为目的基因, 从 NCBI 官网上获取 VP1 的核苷酸序

列(登录号为 7ENO_1)^[20], 本研究中的 VP1 是通过 linker (该 linker 为 15 bp 的核苷酸序列: 5'-GGCGGCGGCGGCTCG-3') 连接得到的 4×VP1, 对其编码序列进行密码子优化(参考 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032)。基因合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 添加 5' (*Hind* III)和 3' (*Eco*R I)。将基因通过 5' (*Hind* III)和 3' (*Eco*R I)酶切连接克隆至表达载体 pXMJ19, 获得重组基因表达质粒 pXMJ19-VP1。将连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 在带有氯霉素抗性的 LBB 固体培养基上培养 12 h 后选择单菌落, 送至苏州安升达生物技术有限公司测序并得到测序正确的质粒。

1.2.3 VP1 表达菌株的构建

将已经构建好的质粒 pXMJ19-VP1 电击转化 *C. glutamicum* 感受态细胞, 得到表达菌株 Cg-VP1, 在 30 °C 条件下利用 LBHIS 培养基培养 48 h, 对生长出来的单菌落进行菌落 PCR 验证, 同时为更好地反映 VP1 的生长表达情况, 设置 Cg-pXMJ19 为空白对照组。

1.2.4 VP1 的表达

将 Cg-pXMJ19 和 Cg-VP1 分别接种于 10 mL 的氯霉素抗性 LBB 培养基中, 在 30 °C、220 r/min 条件下培养过夜, 之后以 2% 的接种量转接入 10 mL 的氯霉素抗性 LBB 培养基中, 继续培养 24 h 后于 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体进行蛋白质分析。

1.2.5 生长曲线的测定

将蛋白质表达菌株接种到 10 mL 的氯霉素抗性 LBB 培养基中, 30 °C、220 r/min 条件下培养过夜, 转接至 50 mL 新鲜的 LBB 培养基中, 使初始 OD_{600} 为 0.2。30 °C、220 r/min 条件下培养 48 h, 每 4 h 取一次样并测定 OD_{600} 。

1.2.6 蛋白表达元件优化

将 *C. glutamicum* 内源基因启动子的 5'非翻

译端(5'UTR)序列经突变后插入到 pXMJ19-VP1 质粒的 SD 序列(5'-AAAGGAGGACAACTA-3') 前端, 得到 pXMJ19-5'UTR-1-VP1 质粒-pXMJ19-5'UTR-4-VP1 质粒。其中 5'UTR 序列是设计在 PCR 上游引物中, 通过 PCR 扩增得到带有 5'TUR 序列的 VP1 片段。分别将 VP1 蛋白 N 端第 3 位氨基酸突变为脯氨酸(CCU)、丝氨酸(UCA)和第 5 位精氨酸(AGG)、脯氨酸(CCU)得到 pXMJ19-N.M-1-VP1 质粒-pXMJ19-N.M-4-VP1 质粒。其中的氨基酸突变是通过突变引物进行环形 PCR 实现。

1.2.7 蛋白表达鉴定

取 VP1 表达产物(定量 OD_{600} 为 10.0)于 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗菌体 2 次, 并用 PBS 重悬菌体, 利用超声破碎仪破碎(工作 1 s, 停歇 2 s, 共计 9 min)。取全菌液制成相应的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。使用组氨酸(His)单抗进行 Western blotting 定性分析。

1.2.8 蛋白纯化及 ELISA 检测蛋白活性

通过镍亲和层析纯化工程菌表达的 VP1。发酵结束后收集 300 mL 发酵液, 7 500 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 将菌体沉淀用 150 mL 的 buffer A 重悬, 进行高压匀浆破碎(700 Pa 破碎 20 min)。将破碎完成后的破碎液 7 500 r/min 离心 5 min, 取上清进行纯化。将进样泵 A2、B1 放入无菌水中, 进行泵洗(流速: 10 mL/min, 压力: 1.5 MPa)。流速调为 1 mL/min, 清洗上样杯。将压力调为 0.35 MPa, 接镍柱, 并冲洗 5 个柱体积。将 A2 泵放入 A 液, B1 泵放入 B 液, 冲洗 5 个柱体积进行平衡。基准电压调零, 蛋白样品通过进样杯, 上样于预先平衡好的纯化柱。上样完成后, 使用 A 液冲洗柱子。10% 的 B 液清洗镍柱上的杂蛋白, 收集 1 mL 流川液, 使用 40% 的 B 液将目标蛋白洗脱, 并连续收集 12 管 1 mL 的洗脱液。用 100% B 液冲洗

镍柱, 收集 1 mL 洗脱液。收集完毕后, 换 20% 乙醇洗至基线平。

结构蛋白 VP1 抗体结合活性通过间接法 ELISA 测定, 将纯化后的 40%B 液洗脱收集的蛋白样品和 100%B 液洗脱后收集的蛋白样品稀释 10 倍, 每孔 100 μ L 上样, 每个样品对应一个复孔。有 2 个孔只加 100 μ L 洗涤液, 另留 2 个完全空白孔。上样结束后将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中包被过夜。将包被过夜的酶标板用 ELISA 洗涤液洗板 3 次, 洗涤后加入一抗孵育液, 每孔 100 μ L, 盖上盖板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温恒湿箱中孵育 40 min。孵育结束后用 ELISA 洗涤液洗板 5 次, 洗板结束后加入二抗孵育液, 每孔 100 μ L, 随后将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min。二抗孵育结束后用 ELISA 洗涤液洗板 10 次, 洗板结束后每孔加入 100 μ L 显色液, 盖上盖板, 用锡箔纸将酶标板包住, 放至 37 $^{\circ}$ C 培养箱避光显色 10 min, 显色结束后, 立即向酶标板中加入 ELISA 终止液终止显色, 每孔 50 μ L。

2 结果与分析

2.1 表达 VP1 的菌株构建及验证

为获得能够表达 VP1 的谷氨酸棒状杆菌菌株, 首先构建 pXMJ19-VP1 质粒。为验证 pXMJ19-VP1 质粒转化入谷氨酸棒状杆菌, 对转化后生长的平板单菌落进行菌落 PCR 验证, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1A 所示, 条带大小与 4 \times VP1 条带相符。为观察谷氨酸棒状杆菌表达 VP1 后对生长情况的影响, 对重组菌株 Cg-VP1 和 Cg-pXMJ19 进行生长曲线的测定, 结果显示, 在生长前期 Cg-VP1 的生长速度略低于对照组, 但 VP1 总体对生长影响较小(图 1B)。Cg-VP1 发酵 24 h 后取样进行蛋白质表达分析, Western blotting 分析结果如图 1C 所示, 在 35 kDa 处有条带, 与 VP1 的理论大小相符, 但 Western blotting 条带较浅, 表明表达量较低。

2.2 VP1 表达元件的优化结果

为进一步提高 VP1 的表达量, 对表达载体的启动子、5'UTR 区、VP1 蛋白 N 端的氨基酸

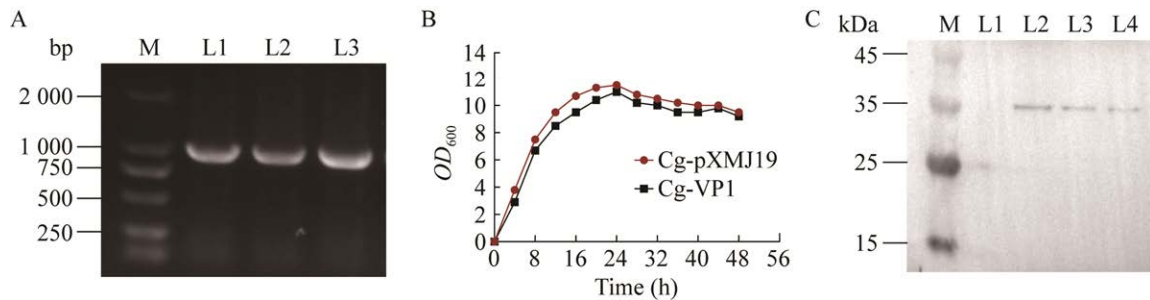


图 1 VP1 对 *Corynebacterium glutamicum* 生长的影响及 VP1 在 *Corynebacterium glutamicum* 中的表达
A: Cg-VP1 菌株菌落 PCR 验证结果. M: DNA Marker; L1-L3: 3 个生物学重复. B: 重组菌株 Cg-VP1 和 Cg-pXMJ19 生长曲线的测定结果. C: Cg-VP1 表达的 Western blotting 分析结果. M: Protein Marker; L1: Cg-pXMJ19 发酵的阴性对照; L2-L4: 3 个样品重复

Figure 1 Effect of VP1 on the growth of *Corynebacterium glutamicum* and expression of VP1 in *Corynebacterium glutamicum*. A: The results of PCR verification of Cg-VP1 strain. M: DNA Marker; L1-L3: Three replicates of the sample. B: Results of the growth curves of recombinant strain Cg-VP1 and Cg-pXMJ19. C: Western blotting analysis results of Cg-VP1 expression. M: Protein Marker; L1: Blank control; L2-L4: Three sample replicates.

序列进行了优化(图 2A)。本研究中采用的 P_{H36} 启动子是合成型启动子, 相较于天然启动子, 能更有效地与 RNA 聚合酶结合, 有更好的蛋白表达优势。为构建合成型启动子表达质粒 P_{H36} -VP1, 对原有的 pXMJ19-VP1 质粒进行环形 PCR, P_{H36} (96 bp) 通过引物 P_{H36} -VP1-F 和 P_{H36} -VP1-R 扩增将原有的 P_{tac} 启动子替换, 经同源重组后转化入 *E. coli* JM109 并测序验证。将菌落 PCR 和测序结果均正确的 P_{H36} -VP1 转化进入 *C. glutamicum* 进行发酵表达验证, SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果表明 P_{H36} 启动子的表达效果更好(图 2B)。

有研究表明, 5'UTR 可影响 mRNA 二级结构, 进而影响 mRNA 稳定性^[16], 本研究在 VP1 前端插入 4 个不同的 5'UTR 序列(这几种 5'UTR 主要区别在于 C 端 10 bp 核苷酸序列); 通过 (1-4)-VP1-F 和 (1-4)-VP1-R 引物扩增得到带有 4 种不同 5'UTR 序列的 VP1 片段, 经酶切连接后转化入 *E. coli* JM109 并测序验证。将菌落 PCR 和测序结果均正确的 P_{H36} -(1-4)-VP1 质粒转化进入 *C. glutamicum* 进行生长曲线测定(图 2C) 和表达验证, SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果如图 2D 所示。从 Western blotting 结果中可以看到, 插入 5'UTR 后的重组质粒表达效果有所提升。其中, 5'UTR-2 表达量提高 3.2 倍, 最为显著, 但 5'UTR 对生长情况的影响并不明显。

有研究结果表明, 突变蛋白 N 端氨基酸序列会对 mRNA 折叠产生影响, 进而影响翻译起始速率^[21], 进而影响蛋白的最终产量。因此, 本研究对 N 端进行特定位点的氨基酸突变。针对 VP1 N 端的第 3 个和第 5 个氨基酸分别进行突变, 采用环形 PCR 利用引物对 N.M-1-VP1-F/R、N.M-2-VP1-F/R、N.M-3-VP1-F/R 和 N.M-4-VP1-F/R 分别针对 3T (P)、3T (S)、5V (P) 和 5V (R) 的突变扩增得到质粒线性化产物, 后经同源重

组得到 P_{H36} -N.M-1-VP1、 P_{H36} -N.M-2-VP1、 P_{H36} -N.M-3-VP1 和 P_{H36} -N.M-4-VP1 质粒。转化入 *E. coli* JM109 并测序验证。将菌落 PCR 和测序结果均正确的 P_{H36} -N.M-1-VP1、 P_{H36} -N.M-2-VP1、 P_{H36} -N.M-3-VP1 和 P_{H36} -N.M-4-VP1 质粒转化进入 *C. glutamicum* 进行生长曲线测定(图 2E) 和表达验证, SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果如图 2F 所示。从 Western blotting 结果可以看到, N 端突变后的重组质粒表达效果显著, 蛋白产量提高 2.5 倍左右。与此同时, N 端突变对生长情况的影响并不明显。

2.3 VP1 受体菌株的优化

为进一步提高 VP1 的表达量, 在前期研究的基础上, 选择两种蛋白敲除菌株 Cg- Δ clpC 和 Cg- Δ clpS 进行研究^[22]。表达质粒选择本研究中经优化的 pXMJ19- P_{H36} -5'UTR-2-VP1。首先进行生长曲线测定, 如图 3A 所示, 与原始的菌株 *C. glutamicum* 相比, 敲除菌株的生长情况受到一定程度的影响。但 Cg- P_{H36} - Δ clpS-pXMJ19-5'UTR-2-VP1 和 Cg- P_{H36} - Δ clpC-pXMJ19-5'UTR-2-VP1 的蛋白表达量有一定程度的提高(图 3B), 结果表明两种蛋白酶敲除菌株更有利于 VP1 的表达。如图 3B Western blotting 灰度分析结果所示, Cg- Δ clpC 敲除菌株蛋白产量较原始菌株提高约 2.1 倍。与此同时, 本研究尝试在 pXMJ19- P_{H36} -5'UTR-2-VP1 质粒基础上, 通过插入 CspB 信号肽实现分泌表达, 由于分泌表达量较低, 只能通过 Western blotting 检测, 灰度分析结果与胞内表达结果一致, 敲除菌株 Cg- Δ clpC 同样可以提高分泌表达量(图 3C)。

2.4 菌株生长条件的优化

为测定在不同温度下 pXMJ19-VP1 系列质粒的生长情况和 VP1 蛋白表达情况, 设置 3 个温度梯度(16、30、37 °C)进行发酵试验, 在 3 种不同的温度条件下, 生长情况如图 4A 所示,

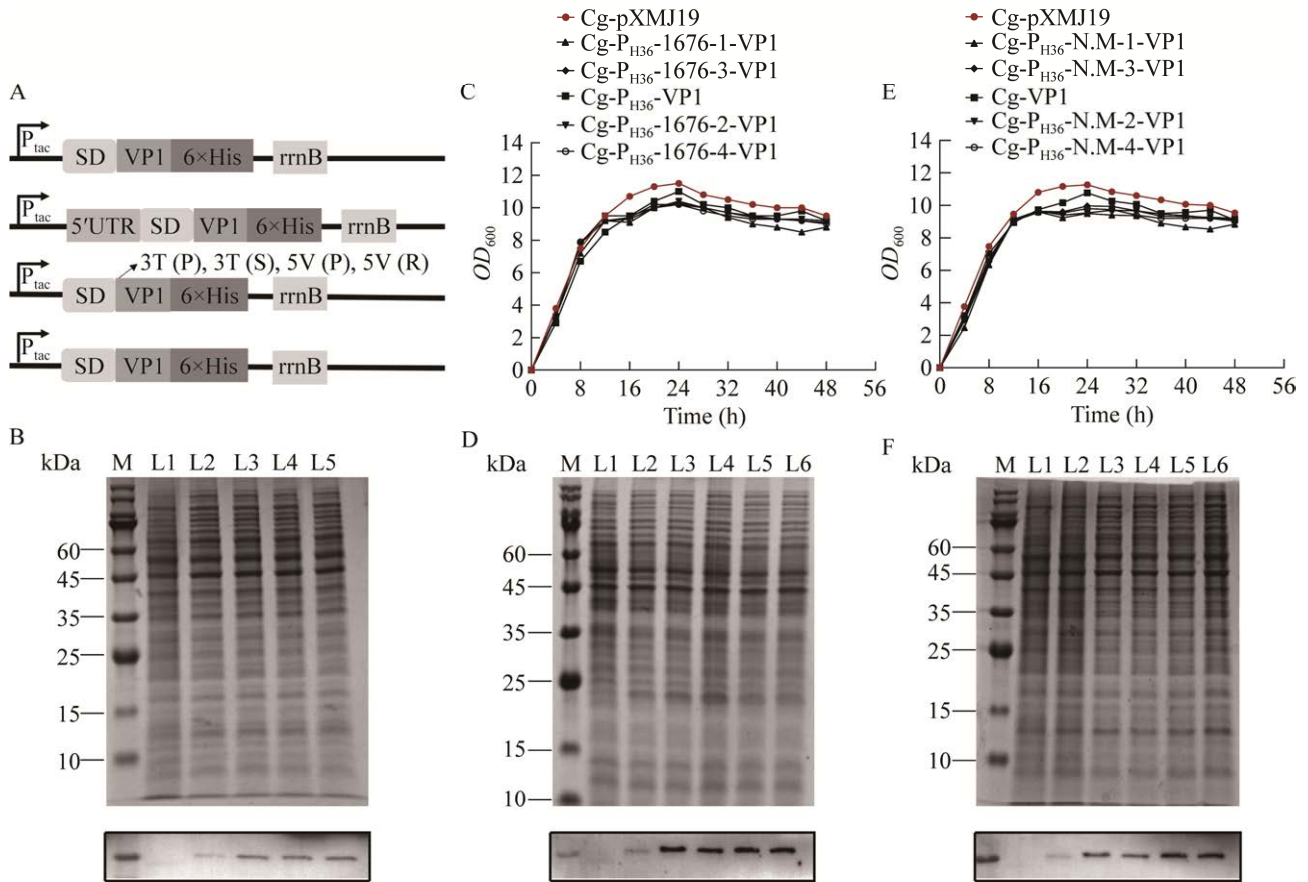


图 2 表达元件优化后对 *Corynebacterium glutamicum* 生长和 VP1 表达的影响 A: 蛋白表达元件优化示意图. SD: Sine-Dalgarno; rrnB: 终止子; P_{tac} : 组成型 tac 启动子; P_{H36} : 合成启动子. B: 启动子优化后的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果. L3-L5: Cg- P_{H36} -VP1 的 3 个样本重复. C: 5'UTR 序列优化后的菌株生长曲线测定结果. D: 5'UTR 序列优化后的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果. L3: Cg- P_{H36} -5'UTR-1-VP1; L4: Cg- P_{H36} -5'UTR-2-VP1; L5: Cg- P_{H36} -5'UTR-3-VP1; L6: Cg- P_{H36} -5'UTR-4-VP1. E: VP1 N 端序列优化后的菌株生长曲线测定结果. F: VP1 N 端序列优化后的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果. L3: Cg- P_{H36} -N.M-1-VP1; L4: Cg- P_{H36} -N.M-2-VP1; L5: Cg- P_{H36} -N.M-3-VP1; L6: Cg- P_{H36} -N.M-4-VP1. B、D、F: M: Marker; L1: 阴性对照 Cg-pXMJ19; L2: 阳性对照 Cg-VP1

Figure 2 Effects of optimized expression elements on *Corynebacterium glutamicum* growth and VP1 expression. A: Schematic diagram of optimization of protein expression element. SD: Sine-Dalgarno; rrnB: Terminator; P_{tac} : Constitutive tac promoter; P_{H36} : Synthetic promoter. B: The SDS-PAGE and Western blotting analysis results of the promoter optimization. L3-L5: Three biological replicates. C: Determination of strain growth curve after optimizing 5'UTR sequence. D: The SDS-PAGE and Western blotting analysis results of the 5'UTR optimization. L3: Cg- P_{H36} -5'UTR-1-VP1; L4: Cg- P_{H36} -5'UTR-2-VP1; L5: Cg- P_{H36} -5'UTR-3-VP1; L6: Cg- P_{H36} -5'UTR-4-VP1. E: Determination of strain growth curve after optimizing VP1 N-terminal sequence. F: The SDS-PAGE and Western blotting analysis results of the VP1 N-terminal optimization. L3: Cg- P_{H36} -N.M-1-VP1; L4: Cg- P_{H36} -N.M-2-VP1; L5: Cg- P_{H36} -N.M-3-VP1; L6: Cg- P_{H36} -N.M-4-VP1. B, D and F: M: Marker; L1: Cg-pXMJ19; L2: Cg-VP1.

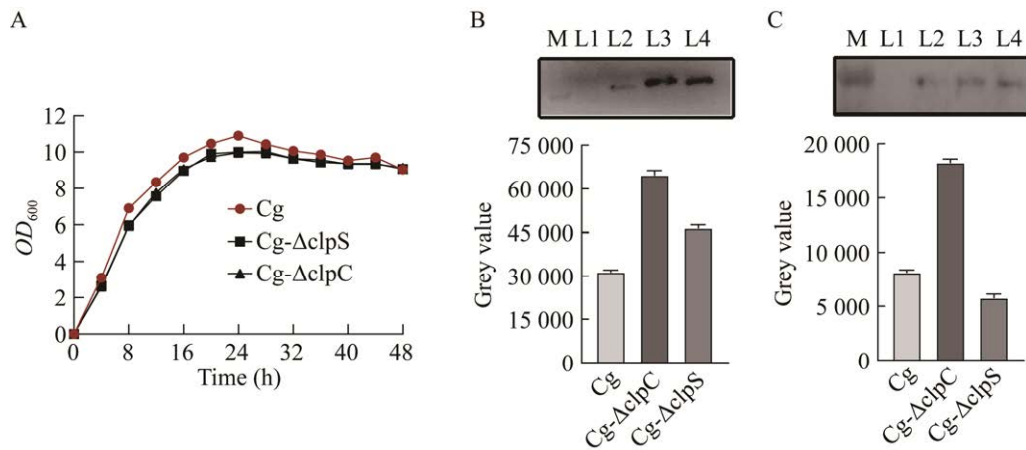


图 3 受体菌株对生长情况及蛋白表达的影响 A: 不同受体菌株的生长曲线测定结果. B: 不同受体菌株胞内表达 Western blotting 和灰度分析结果. M: Marker; L1: Cg-pXMJ19; L2: Cg-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L3: ΔclpS-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L4: ΔclpC-P_{H36}-5'UTR-2-VP1. C: 不同受体菌株分泌表达的 Western blotting 和灰度分析结果. M: Marker; L1: Cg-CspB-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L2: ΔclpS-CspB-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L3: ΔclpC-CspB-P_{H36}-5'UTR-2-VP1

Figure 3 Effect of different strains on growth and protein expression. A: Determination results of growth curve of different strains. B: Results of Western blotting and grey analysis of different strains. M: Marker; L1: Cg-pXMJ19; L2: Cg-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L3: ΔclpC-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L4: ΔclpS-P_{H36}-5'UTR-2-VP1. C: The Western blotting and grey analysis results of the different strains. M: Marker; L1: Cg-CspB-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L2: ΔclpC-CspB-P_{H36}-5'UTR-2-VP1; L3: ΔclpS-CspB-P_{H36}-5'UTR-2-VP1.

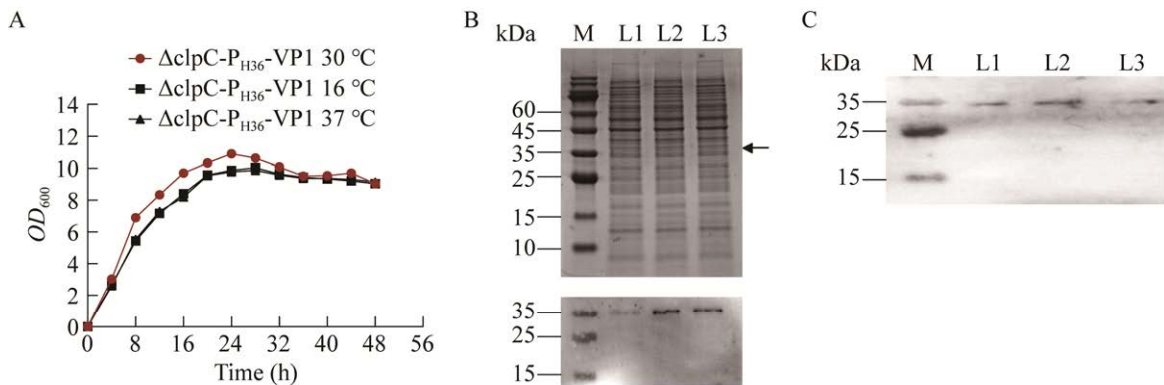


图 4 温度对菌株生长及蛋白表达的影响 A: 不同温度条件下菌株生长曲线的测定结果. B: 不同温度条件下胞内表达 VP1 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果. M: Marker; L1: 16 °C; L2: 30 °C; L3: 37 °C. C: 不同温度条件下分泌表达的 Western blotting 分析结果

Figure 4 Effect of temperature on strain growth and protein expression. A: Determination results of growth curve of the strains under the different temperature conditions. B: The SDS-PAGE and Western blotting analysis results of the intracellular expression under the different temperature conditions. M: Marker; L1: 16 °C; L2: 30 °C; L3: 37 °C. C: The Western blotting analysis results of the secretory expression under the different temperature conditions.

与 30 °C 相比, 在 16 °C 和 37 °C 的条件下, 生长速度受到不同程度的影响, 同样的蛋白表达情况也受到影响, 发酵验证后的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果如图 4B、4C 所示。其中图 4B 为胞内表达, 图 4C 为分泌表达。可以看到, 最佳生长条件及蛋白生产最适温度为 30 °C。

2.5 蛋白纯化及 ELISA 检测 VP1 活性结果

为测定结构蛋白 VP1 的四乘串联表达量, 利用镍柱洗脱纯化并用间接法 ELISA 检测。由于蛋白表达量较低, 无法应用双硫代巴比妥酸法(bicinchoninic acid, BCA)检测, 将蛋白标准品梯度稀释后作为纯化后蛋白产量测定的依据, 利用如图 5A 所示的 SDS-PAGE 做灰度分析, 得到如图 5B 所示的标准曲线, 经计算 300 mL 的发酵液得到重组蛋白 0.261 mg。

有研究利用间接 ELISA 的方法测试 VP1 抗体结合活性^[23]。为测定本研究中 VP1 的生物学活性, 设置 2 个只添加洗涤液空白对照组和

2 个完全空白对照组。试验组为 40% B 液洗脱后收集的蛋白及 100% B 液洗脱后收集的蛋白。可从图 5C 中看到蛋白样品试验组与两组对照组相比有明显的颜色变化, 表明本研究中获得的 VP1 可与猪 O 型口蹄疫病毒阳性血清中的抗体发生特异性结合。

3 讨论与结论

在我国, FMD 为国家强制免疫类疾病, 目前已经商品化的疫苗主要有 FMD 灭活疫苗和多肽疫苗两种^[24]。灭活的全病毒疫苗存在一定的病毒灭活不彻底、病毒逃逸等危险, 从而需要开发一种更安全的疫苗。FMDV 的 VP1 蛋白暴露在病毒表面的 G 环上, 具有较强的免疫原性, 是 FMDV 疫苗研制中的主要结构蛋白。研究发现, 在 O 型 FMDV 的 5 个抗原位点中, 有 3 个位于 VP1 结构蛋白上, 能够诱导机体产生体液免疫应答^[20]。

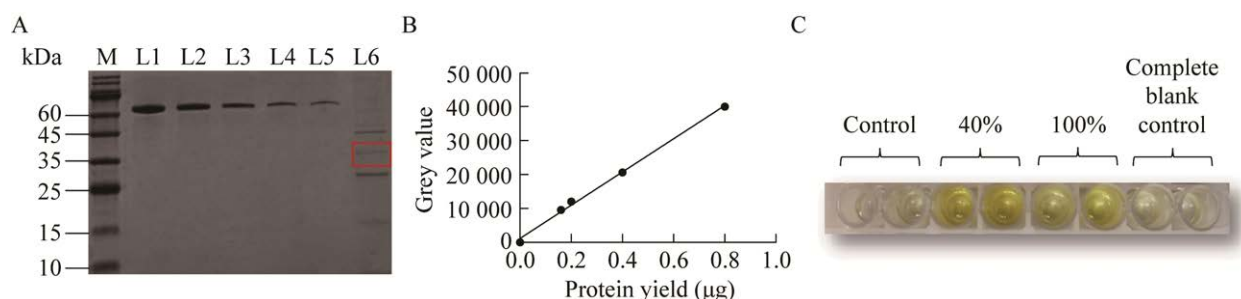


图5 VP1 蛋白产量及活性检测结果 A: 纯化后蛋白定量 SDS-PAGE 分析. M: Marker; L1-L5: 不同浓度蛋白标准品, 其中 L1 为 200 µg/mL, L2 为 100 µg/mL, L3 为 50 µg/mL, L4 为 25 µg/mL, L5 为 20 µg/mL; L6 为 VP1 纯化产物. B: SDS-PAGE 灰度分析后标准曲线. C: 从左到右依次为: 洗脱液空白对照组(2 个孔), 40% B 液洗脱后收集的蛋白样品(2 个孔), 100% B 液洗脱后收集的蛋白样品(2 个孔), 完全空白对照组(2 个孔)

Figure 5 Results of yield and activity of VP1 protein. A: The purified protein was analyzed by quantitative SDS-PAGE. M: Marker; L1-L5: Different concentration protein standard, L1: 200 µg/mL, L2: 100 µg/mL, L3: 50 µg/mL, L4: 25 µg/mL, L5: 20 µg/mL; L6: VP1 purified product. B: Standard curve after SDS-PAGE gray analysis. C: From left to right is: Eluent blank control group (two holes), protein samples collected after 40% B solution elution (two holes), protein samples collected after 100% B solution elution (two holes), completely blank control group (two holes).

谷氨酸棒状杆菌在表达外源蛋白质上有很大的潜力, 相较于酵母细胞等真核生物, 其培养时间更短, 培养条件相对简单, 成本较低; 相较于传统的大肠杆菌表达系统, 作为革兰氏阳性菌的 *C. glutamicum* 不会产生内毒素^[25], 更适合生产医药用、食品级蛋白产品; 与同为革兰氏阳性菌的枯草芽孢杆菌相比, *C. glutamicum* 因其有较好的胞外分泌能力, 减少胞内蛋白酶的影响从而更大程度上确保蛋白质正确折叠^[26], 保证蛋白质活性。

本研究为了在谷氨酸棒状杆菌中表达 VP1 结构蛋白, 利用基因工程手段将 FMDV 的 VP1 结构蛋白进行串联表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定, 由 3 个 linker 串联而成的 4×VP1 能在 *C. glutamicum* 中成功表达。其次通过蛋白表达元件、受体菌株和发酵条件等优化, 进一步提高 VP1 的表达量。综上所述, 本研究成功地实现了 VP1 结构蛋白在谷氨酸棒状杆菌中的分泌可溶表达, 并提高了蛋白表达量, 300 mL 发酵液最终纯化得到 0.261 mg 蛋白。此系统同样可以应用到其他异源蛋白的生产, 如重链抗体的重链可变结构域(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)、传染性牛鼻气管炎病毒糖蛋白 D (glycoprotein D protein, gD)等^[22]。

本研究还存在一些需要进一步探索的问题, 比如进一步扩大发酵培养体系, 以及优化更多的发酵条件如溶氧量、pH 和碳源等。另外, 本研究对蛋白表达元件的优化是基于 P_{H36}-VP1 分别进行的, 可以进一步对元件进行组合优化。此外, 本研究成功验证了 VP1 与猪 O 型口蹄疫病毒阳性血清抗体特异性结合的能力, 但尚未进一步验证其免疫活性。这些未解决的问题同样具有重要意义, 亟待研究人员进一步探索。

REFERENCES

- [1] 邱孝高, 肖昭彭. 口蹄疫流行病学的研究及应用[J]. 中国动物保健, 2000, 2(5): 32-33.
QIU XG, XIAO ZP. Study and application of epidemiology of foot-and-mouth disease[J]. China Animal Health, 2000, 2(5): 32-33 (in Chinese).
- [2] DIAZ-SAN SEGUNDO F, MEDINA GN, STENFELDT C, ARZT J, de LOS SANTOS T. Foot-and-mouth disease vaccines[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 206: 102-112.
- [3] LI ZY, LIU JX. The Current state of vaccines used in the field for foot and mouth disease virus in China[J]. Expert Review of Vaccines, 2011, 10(1): 13-15.
- [4] JAMAL SM, NAZEM SHIRAZI MH, OZYORUK F, PARLAK U, NORMANN P, BELSHAM GJ. Evidence for multiple recombination events within foot-and-mouth disease viruses circulating in West Eurasia[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67(2): 979-993.
- [5] 王占云, 冯俊林, 王智, 程俊峰, 孙文慧, 孙玉环. 口蹄疫疫苗的研究进展[J]. 猪业科学, 2014, 31(1): 48-49.
WANG ZY, FENG JL, WANG Z, CHENG JF, SUN WH, SUN YH. Research progress of foot-and-mouth disease vaccine[J]. Swine Industry Science, 2014, 31(1): 48-49 (in Chinese).
- [6] WOO HM. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 180: 43-51.
- [7] ROLAND F. Beyond amino acids: use of the *Corynebacterium glutamicum* cell factory for the secretion of heterologous proteins[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 258: 101-109.
- [8] LIU XX, ZHAO ZH, ZHANG W, SUN Y, YANG YK, BAI ZH. Bicistronic expression strategy for high-level expression of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(10): 1118-1125.
- [9] DANIELS R, MELLROTH P, BERNSEL A, NEIERS F, NORMARK S, von HEIJNE G, HENRIQUES-NORMARK B. Disulfide bond formation and cysteine exclusion in Gram-positive bacteria[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(5): 3300-3309.
- [10] LIU XX, ZHANG W, ZHAO ZH, DAI XF, YANG YK, BAI ZH. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4): 541-551.
- [11] BECKER J, ROHLES CM, WITTMANN C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*

- for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 122-141.
- [12] CAPELL A, FELLERER K, HAASS C. Progranulin transcripts with short and long 5' untranslated regions (UTRs) are differentially expressed via posttranscriptional and translational repression[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(37): 25879-25889.
- [13] 杜芳芳, 马骏杰, 杨泽伟, 赵雪莲, 刘东宇, 杨秀芹. 5'UTR 在基因表达调控中的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(8): 60-67.
- DU FF, MA JJ, YANG ZW, ZHAO XL, LIU DY, YANG XQ. Research progress of 5'UTR on the gene expression regulation[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(8): 60-67 (in Chinese).
- [14] 刘晓倩. 人博卡病毒结构蛋白 5'UTR 调控 mRNA 生成及可变翻译的研究[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院武汉病毒研究所)博士学位论文, 2019.
- LIU XQ. 5'UTR of human bocavirus capsid transcripts regulates its mRNA biogenesis and alternative translation[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese).
- [15] XIAO J, PENG B, SU ZW, LIU AK, HU YJ, NOMURA CT, CHEN SW, WANG Q. Facilitating protein expression with portable 5'-UTR secondary structures in *Bacillus licheniformis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(5): 1051-1058.
- [16] DVIR S, VELTEN L, SHARON E, ZEEVI D, CAREY LB, WEINBERGER A, SEGAL E. Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(30): E2792-E2801.
- [17] ZHOU SH, DING RP, CHEN J, DU GC, LI HZ, ZHOU JW. Obtaining a panel of cascade promoter-5'-UTR complexes in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(6): 1065-1075.
- [18] TULLER T, ZUR H. Multiple roles of the coding sequence 5' end in gene expression regulation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(1): 13-28.
- [19] XU KD, TONG Y, LI Y, TAO J, LI JH, ZHOU JW, LIU S. Rational design of the N-terminal coding sequence for regulating enzyme expression in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(2): 265-276.
- [20] SUN MM, GAO AX, LEDESMA-AMARO R, LI A, WANG RB, NIE JQ, ZHENG P, YANG YK, BAI ZH, LIU XX. Hypersecretion of OmlA antigen in *Corynebacterium glutamicum* through high-throughput based development process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(8): 2953-2967.
- [21] MENG LH. Enhancement of heterologous protein production in *Corynebacterium glutamicum* via atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 339: 22-31.
- [22] DONG H, LU YL, ZHANG Y, MU SY, WANG N, DU P, ZHI XY, WEN XB, WANG XX, SUN SQ, ZHANG YM, GUO HC. A heat-induced mutation on VP1 of foot-and-mouth disease virus serotype O enhanced capsid stability and immunogenicity[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(16): e0017721.
- [23] VERMA M, CHOI J, COTTRELL KA, LAVAGNINO Z, THOMAS EN, PAVLOVIC-DJURANOVIC S, SZCZESNY P, PISTON DW, ZAHER HS, PUGLISI JD, DJURANOVIC S. A short translational ramp determines the efficiency of protein synthesis[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5774.
- [24] 张芳源, 杜文琪, 杨大为, 李桂梅, 单虎. 口蹄疫病毒 VP1 蛋白的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2022. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20221124.006.
- ZHANG FY, DU WQ, YANG DW, LI GM, SHAN H. Prokaryotic expression of foot-and-mouth disease virus VP1 protein and development of indirect ELISA for antibody detection[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2022. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20221124.006 (in Chinese).
- [25] 侯立婷, 陈瑾, 乔绪稳, 于晓明, 侯继波, 郑其升, 李耀年. 猪 O 型口蹄疫病毒细菌样颗粒疫苗的制备与免疫原性鉴定[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(2): 217-227.
- HOU LT, CHEN J, QIAO XW, YU XM, HOU JB, ZHENG QS, LI JN. Design and immunogenicity evaluation for the bacteria-like particle vaccine against swine type O foot-and-mouth disease virus[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(2): 217-227 (in Chinese).
- [26] 彭枫, 刘秀霞, 陈静, 杨艳坤, 白仲虎. 不同表达模式组合对谷氨酸棒状杆菌中脑钠肽蛋白表达的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(8): 1-7.
- PENG F, LIU XX, CHEN J, YANG YK, BAI ZH. The effect of different expression patterns on B-type natriuretic peptide expression in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(8): 1-7 (in Chinese).