

口蹄疫病毒 3ABC 基因截短体在毕赤酵母中的表达及鉴定

郑敏^{1,2,3}, 金宁一², 李昌², 鲁会军², 马鸣潇¹, 沈国顺¹,
霍晓伟¹, 马海利¹, 陈晓月¹, 屈勇刚¹

(1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062;
3. 广西动物疫病预防控制中心, 南宁 530001)

摘要 将长为 525 bp 的口蹄疫病毒 3ABC 基因截短体克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 构建了重组表达质粒 pPIC9K-3ABCt. 用 *Bgl* II 线性化后, 电转化毕赤酵母菌 GS115, 经表型筛选, PCR 鉴定, 获得阳性重组菌(GS115/pPIC9K-3ABCt). 然后进行诱导表达, 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达产物. 结果表明, 重组菌株成功分泌表达了分子量为 40000, 具有免疫反应活性, 且呈二聚体形式的目的蛋白. 在 96 h 时表达量达到最高峰, 占分泌总蛋白的 18%, 达到 23.4 mg/L. 为进一步研制口蹄疫免疫和感染动物鉴别诊断试剂奠定了基础.

关键词 口蹄疫病毒(FMDV); 3ABC 基因; 毕赤酵母; 分泌表达; 诊断抗原

中图分类号 Q78; O629; S85.165 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)01-0104-05

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)引起的偶蹄动物的最烈性传染病之一. 与发达国家通常采取的捕杀政策不同, 发展中国家普遍采用免疫的方法来控制该病. 因此, 如何快速、可靠地区分免疫动物和感染动物, 对于口蹄疫的防治以及国际贸易具有重要意义. 20 世纪 90 年代以来, 各国研究者通过对 2C, 3A 和 3ABC 等 FMDV 非结构蛋白的研究, 发现针对 3ABC 和 3B 的血清抗体水平可以作为区分免疫动物和感染动物的指标^[1~4]. 为了提高检测方法的特异性, Shen 等^[5]利用合成的一系列短肽进行筛选, 从 2C 和 3ABC 中鉴定出 12 个可以诱导产生抗体的肽段, 并发现这些肽段主要集中在 3A 基因第 70 ~ 140 位氨基酸和 3B 基因第 1 ~ 60 位氨基酸的两个区域, 表明上述区域是研制检测抗原的候选基因.

毕赤酵母表达系统是当前成熟的真核表达系统之一, 具有表达量高、稳定性好、便于高密度发酵、适度糖基化以及表达产物生物活性好等优点, 在基因工程疫苗及药物的研制中显示出其特有的优越性^[6,7]. 本文探讨了 FMDV 3ABC 基因截短体在毕赤酵母表达系统中分泌表达的可行性, 从而为研制 FMD 鉴别诊断试剂盒奠定了基础.

1 实验部分

1.1 菌种、载体和酵母表达系统试剂

酵母菌(*Pichia pastoris* GS115/*His*⁻⁴)和分泌型真核表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 JM109 为本室保存的样品; 携带 FMDV P3 区全长基因的质粒 pGEM-P3 由本室构建^[8]; 酵母完全培养基(YPD)、选择培养基(MD)、甲醇选择培养基(MM)、诱导培养基(BMGY)和甲醇诱导培养基(BMMY)按 Invitrogen 公司说明书配制.

1.2 工具酶和主要限制性内切酶

限制性内切酶 *Eco*R I、*Not* I、*Bgl* II、T4DNA 连接酶, AMV 反转录酶, Taq 酶, DNase I 和 DNA

收稿日期: 2007-06-13.

基金项目: 吉林省科技厅重大科研项目(批准号: 20040202-1)和国家“八六三”计划(批准号: 2006AA0A204)资助.

联系人简介: 金宁一, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事病毒基因结构与功能研究. E-mail: ningyij@yahoo.com

Marker(DL2000)均购自 TaKaRa 公司; 酵母氮碱(YNB)购自 Difco 公司, *D*-山梨醇购自 Sigma 公司; Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司; 低分子量蛋白 Marker 购自 Pharmacia 公司; 碱性磷酸酶标记羊抗豚鼠 IgG, NBT 和 BCIP 购自 Promega 公司; HRP 标记羊抗兔 IgG, DAB 和 OPD 购自鼎国公司; 抗 FMDV 3ABC 蛋白兔血清、FMDV 感染豚鼠血清和 FMD 基因工程疫苗免疫豚鼠血清由本室制备并保存^[9].

1.3 重组表达载体 pPIC9K-3ABCt 的构建

根据已测定的 3ABC 序列设计一对引物, 由上海生工生物有限公司合成. 上游引物: 5'-CCGAAT-TCGCAAACATAGTGATCA-3', 下游引物: 5'-CCGCGGCCGCTCAACAGG CTTGGTG-3', 分别含 *EcoRI* 和 *NotI* 位点(下划线表示). 采用 PCR 方法从 pGEM-P3 中扩增出 525 bp 的 3ABC 基因截短体, PCR 产物经 *EcoRI* 和 *NotI* 消化后, 与用同样消化的 pPIC9K 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109, 通过酶切、PCR 和测序等方法鉴定为阳性克隆, 命名为 pPIC9K-3ABCt.

1.4 电穿孔转化及 PCR 方法筛选重组子

将 pPIC9K-3ABCt 和 pPIC9K 质粒对照, 经 *Bgl* II 线性化处理, 在 1500 V, 20 μ F, 200 Ω 的条件下转化到 *Pichia pastoris* GS115 酵母感受态中, 取 400 μ L 铺于 MD 平板上, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d. 挑选生长良好的单菌落接种于 2 mL YPD 培养基中过夜后, 取 3 μ L 新鲜的菌液进行 PCR 测定. 所用引物为 α -factor 和 3'AOX1 测序引物分别为 5'-CTACTATTGCCAGCATTGC-3'和 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'.

1.5 鉴别 His⁺Mut⁺ 和 His⁺Mut⁻ 表型

挑取筛选到的重组子单菌落影印接种到 MD 和 MM 平板上, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d. 在 MD 平板上生长迅速, 而在 MM 平板上生长较缓慢的即为预期的 His⁺Mut⁺ 表型菌株.

1.6 重组酵母的诱导表达及其表达产物的检测与鉴定

挑取单菌落接种于 5 mL YPD 培养基中, 于 28 $^{\circ}$ C, 以 250 r/min 的速度振荡过夜后, 以体积分数 2% 接种于 50 mL BMGY 培养基中, 于 28 $^{\circ}$ C, 在以 250 r/min 的速度振荡下培养至 OD₆₀₀ = 2.0 ~ 6.0. 离心收集菌体, 用 10 mL BMMY 培养基重悬, 于 28 $^{\circ}$ C, 在以 250 r/min 的速度振荡下诱导培养 6 d, 并于诱导表达起始后, 每隔 24 h 补加甲醇至总体积的 0.5%, 同时取少量培养液的上清液, 以确定表达的最佳时间. 诱导结束后, 离心, 分别收集沉淀和上清液. 上清液用质量分数为 70% 的饱和硫酸铵沉淀, 离心弃去上清液, 蛋白沉淀用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液溶解, 经透析浓缩后用于检测. 用 SDS-PAGE 和 Western blot 对表达产物进行检测和鉴定.

1.7 重组酵母的 RT-PCR 鉴定

用 Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂盒提取 1.6 节中收集的菌体沉淀的总 RNA, 具体操作按说明书进行. 将提取的 RNA 先用 DNase I 处理 30 min, 去除残存基因组 DNA 对后面扩增的影响. 用 1.3 节中设计的引物进行 RT-PCR, 同时设计不经过 RT 直接进行 PCR 扩增作为对照.

1.8 特异性检测

以 1.6 节透析浓缩获得的重组蛋白作为检测抗原, 采用 Western blot 法分别检测 FMDV 感染豚鼠血清以及 FMD 基因工程疫苗免疫豚鼠血清, 考察重组蛋白用于感染和免疫动物鉴别诊断的可行性.

2 结果与讨论

2.1 重组表达载体 pPIC9K-3ABCt 的构建及鉴定

重组质粒经酶切和 PCR 扩增鉴定, 酶切及 PCR 扩增片段均与目的基因大小一致, DNA 测序结果显示其序列和读码框架皆正确. 3ABCt 基因序列如下:

1	ATG	ATC	CGC	GAG	ACT	CGC	AAG	AGA	CAG	CAG	ATG	GTG	GAT	GAT	GCA	GTG	48
1	M	I	R	E	T	R	K	R	Q	Q	M	V	D	D	A	V	16
49	AAC	GAG	TAC	ATT	GAG	AAG	GCA	AAC	ATC	ACC	ACG	GAT	GAC	AAG	ACT	CTT	96
17	N	E	Y	I	E	K	A	N	I	T	T	D	D	K	T	L	32
97	GAC	GAG	GCG	GAA	AAG	AAC	CCT	CTG	GAG	ACC	AGC	GGT	GCC	ACC	ACT	GTT	144
33	D	E	A	E	K	N	P	L	E	T	S	G	A	T	T	V	48
145	GGT	TTC	AGA	GAG	AAA	ACT	CTC	CCG	GGA	CAC	AAG	GCG	AGT	GAT	GAC	GTG	192

49	G	F	R	E	K	T	L	P	G	H	K	A	S	D	D	V	64
193	AAC	TCC	GAG	CCC	GCC	AAA	CCC	ATG	GAA	GAA	CAA	CCA	CAA	GCT	GAA	GGA	240
65	N	S	E	P	A	K	P	M	E	E	Q	P	Q	A	E	G	80
241	CCC	TAC	ACC	GGT	CCA	CTC	GAG	CGT	CAA	AAA	CCT	CTG	AAA	GTG	AGA	GCC	288
81	P	Y	T	G	P	L	E	R	Q	K	P	L	K	V	R	A	96
289	AAG	CTC	CCA	CAG	CAG	GAG	GGG	CCC	TAC	GCT	GGT	CCG	ATG	GAG	AGA	CAG	336
97	K	L	P	Q	Q	E	G	P	Y	A	G	P	M	E	R	Q	112
337	AAA	CCG	CTG	AAA	GTG	AAA	GTG	AAA	GCC	CCG	GTC	GTT	AAG	GAA	GGA	CCT	384
113	K	P	L	K	V	K	V	K	A	P	V	V	K	E	G	P	128
385	TAC	GAA	GGA	CCG	GTG	AAG	AAA	CCT	GTC	GCT	TTG	AAA	GTG	AAC	GCA	AAG	432
129	Y	E	G	P	V	K	K	P	V	A	L	K	V	N	A	K	144
433	AAC	TTG	ATC	GTC	ACT	GAG	AGT	GGT	GCT	CCC	CCG	ACT	GAC	TTG	CAA	AAG	480
145	N	L	I	V	T	E	S	G	A	P	P	T	D	L	Q	K	160
481	ATG	GTC	ATG	GGT	AAC	ACC	AAG	CCT	GTT	GAG	GCG	GCC	GCG	AAT	TAA		525
161	M	V	M	G	N	T	K	P	V	E	A	A	A	N	*		175

2.2 重组酵母菌株的筛选及鉴定

pPIC9K-3ABCt 经 *Bgl* II 酶线性化后转化 *Pichia pastoris* GS115 酵母感受态, 在 MD 平板上长出 57 个 His⁺ 转化子. 所有转化子经 PCR 方法鉴定, 结果筛选出 50 个阳性菌株. 对这 50 个菌株在 MM 和 MD 培养基上鉴定其表型, 结果均为 His⁺ Mut^s.

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测和 Western blot 鉴别

重组菌用甲醇诱导 96 h 后, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测. 结果表明, 用重组酵母菌培养上清液在目的蛋白 19000 处无明显条带, 而在略大于 40000 处有明显条带, 阴性对照菌在该处则没有明显条带[图 1(A)].

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后, 通过半干式电转仪转印到 NC 膜上, 进行 Western 出率 blot 分析. 结果显示, 表达产物中 40000 的外源蛋白能被抗 FMDV 3ABC 蛋白兔血清识别, 出现强特异性显色带, 提示目的蛋白获得分泌表达, 且主要可能以二聚体的形式存在, 并保持良好的免疫反应活性[图 1(B)]. 凝胶扫描分析结果表明, 表达水平最高的为 2 号菌(泳道 4), 其分泌的目的蛋白占上清液中可溶蛋白的 14% 左右.

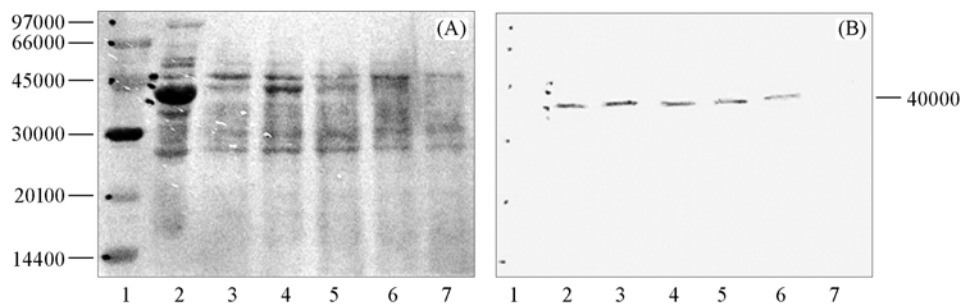


Fig. 1 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) of the expressed products

Lane: 1. protein molecular weight markers; 2. *E. coli* BL21 (DE3) /pET28-3ABCt; 3—6. GS115/pPIC9K-3ABCt (supernatant); 7. GS115/pPIC9K.

2.4 重组酵母的 RT-PCR 鉴定结果

提取 pPIC9K-3ABCt 阳性菌株和 pPIC9K 转化菌的总 RNA, 经 DNase I 处理后, 分别进行 RT-PCR. 凝胶电泳结果(图 2)表明, pPIC9K-3ABCt 转化菌 RT-PCR 测定产物有分子量为 525 bp 的目的条带, 而 pPIC9K 转化菌 RT-PCR 产物无该目的条带. 该结果进一步证实目的基因获得正确转录.

2.5 诱导时间对 3ABCt 表达的影响

将 2 号菌按原始培养条件, 以体积分数为 0.5% 的甲醇进行诱导表达, 观察诱导时间对目的蛋白表达的影响. 结果表明, 在甲醇诱导后, 随着时间的延长, 表达产物含量也随之增加, 直至延长到 96 h 时达到高峰, 表达量占总蛋白的 18%, 产量达到 23.4 mg/L. 但随时间延长到 120 h, 目的蛋白占总蛋白的含量不再增加, 而且略有下降(图 3).

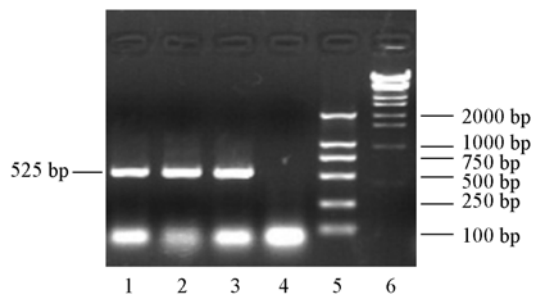


Fig. 2 RT-PCR analysis of GS115/pPIC9K-3ABCt

Lanes: 1—3. GS115/pPIC9K-3ABCt; 4. GS115/pPIC9K; 5. DNA marker DL2000; 6. DNA marker λ -EcoRT14.

2.6 特异性检测结果

以初步纯化和浓缩的重组 3ABCt 蛋白作为检测抗原, 用 Western blot 法分别检测其与 FMDV 感染豚鼠血清以及 FMD 基因工程疫苗免疫豚鼠血清的反应性。结果显示, 3ABCt 蛋白可以与 FMDV 感染豚鼠血清发生反应, 并出现明显的目的条带, 而与不含 3ABC 成分的 FMD 基因工程疫苗免疫豚鼠血清不发生反应(图 4)。表明所制备的重组 3ABCt 蛋白具有良好的反应特异性。

在现代 FMD 疫苗加工过程中, 2C, 3A, 3B 和 3C 等 FMDV 非结构蛋白(NSP) 会被去除, 因此免疫动物体内不会产生针对 NSP 的抗体, 只会诱导产生针对病毒衣壳蛋白的抗体。而当动物感染 FMDV 并出现病毒复制后, 无论表现为临床或者亚临床症状, 动物都会出现两种抗体, 一种是对衣壳蛋白的抗体, 一种是对 NSP 的抗体。

因此, 将基因工程表达的重组 3ABC, 3AB 或 3B 蛋白作为诊断抗原, 用于 FMD 免疫与感染动物的鉴别诊断的思路已被国内外多个实验室证明是完全可行的^[4, 10~12]。与 Shen 等^[5]选择 3B 作为进一步的研究对象不同, 为了提高检出率以及操作方便, 本研究表达了 3A 基因 N 端 70 位到 3C 基因 N 端 20 位近 170 个氨基酸的肽段, 并用于 FMDV 的检测, 初步的研究结果表明思路是可行的。这与文献[13]的结论相同。

目前, 制备的重组 3ABC 和 3AB 均是利用大肠杆菌和杆状病毒作为表达系统。然而这两种系统即有各自的优点, 也有明显的不足之处。原核系统表达量高, 但表达的重组蛋白以包涵体形式存在, 必须经过复杂的变性复性过程, 才能作为诊断抗原使用, 而且背景较高; 杆状病毒表达系统非特异性反应较小, 但表达量低, 而且成本极高。相比之下, 毕赤酵母表达系统具有外源蛋白分泌表达, 表达量高, 便于高密度发酵以及表达产物生物活性好等优点。本研究成功地构建了表达 FMDV 3ABC 基因截短体的毕赤酵母表达载体, 并筛选获得了表达目的蛋白的阳性重组酵母菌, 表达的目的蛋白可达到分泌总蛋白的 18%, 达 23.4 mg/L, 通过 Western blot 证实了该重组蛋白具有良好的免疫学活性和特异性, 为进一步研制 FMDV 鉴别诊断试剂盒奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rodriguez A., Dopazo J., Salz J. C., et al. Arch. Virol. [J], 1994, **136**: 123—131
- [2] Lubroth J., Brown F. Res. Vet. Science [J], 1995, **59**: 70—78
- [3] MacKay D. K. J., Forsyth M. A., Davies P. R., et al. Vet. Q. [J], 1998, **20**: 1—9
- [4] Sorensen K. J., de Stricker K., Dyrting K. C., et al. Arch. Virol. [J], 2005, **150**: 805—814
- [5] Shen F., Chen P. D., Walfield A. M., et al. Vaccine [J], 1999, **17**: 3039—3049

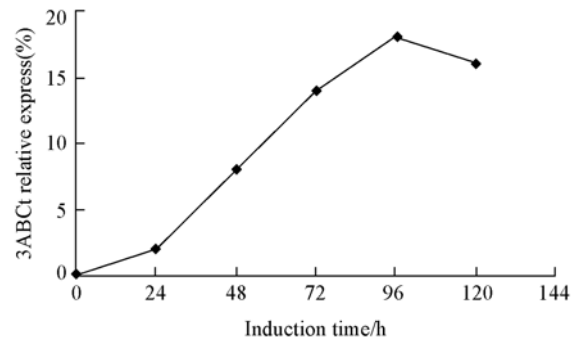


Fig. 3 Influence of induction time on the 3ABCt expression via methanol with volume fraction of 0.5%

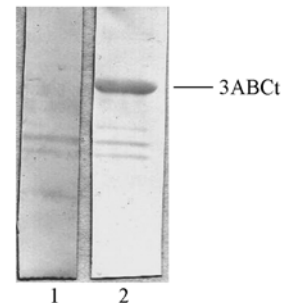


Fig. 4 Results of specificity evaluation

Lanes: 1. reaction with vaccinated guinea pig sera; 2. reaction with infected guinea pig sera.

- [6] ZHAO Bo(赵博), JIN Ning-Yi(金宁一), WANG Rui-Lin(王瑞林), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(3): 424—427
- [7] LI Chang(李昌), JIN Ning-Yi(金宁一), WANG Hong(王宏), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(8): 1493—1496
- [8] ZHENG Min(郑敏), JIN Ning-Yi(金宁一), ZHANG Hong-Yong(张洪勇), *et al.*. Chinese Journal of Virology(病毒学报)[J], 2005, **26**: 2061—2065
- [9] ZHENG Min(郑敏). Cloning, Expression of Multi-genes of Foot-and-Mouth Disease Virus(FMDV) and Immunogenicity of Genetic Engineering Vaccines Against FMDV[D], Changchun: College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, 2005
- [10] XUE Qing-Hong(薛青红), LIU Xiang-Tao(刘湘涛), ZHANG Yan-Ming(张彦明), *et al.*. Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)[J], 2002, **42**: 539—542
- [11] CAO Yi-Mei(曹轶梅), LIU Zai-Xin(刘在新), LU Zeng-Jun(卢曾军), *et al.*. Chin. J. Vet. Sci.(中国兽医学报)[J], 2004, **24**: 31—34
- [12] ZHU Cai-Zhu(朱彩珠), YOU Yong-Jin(尤永进), GE Yan(葛艳), *et al.*. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology(中国兽医科技)[J], 2005, **35**(1): 14—16
- [13] Sun T., Lu P., Wang X.. Journal of Virological Methods[J], 2004, **119**: 79—86

Expression and Identification of FMDV 3ABC Truncated Gene in *Pichia Pastoris*

ZHENG Min^{1,2,3}, JIN Ning-Yi^{2*}, LI Chang², LU Hui-Jun², MA Ming-Xiao¹, SHEN Guo-Shun¹,
HUO Xiao-Wei¹, MA Hai-Li¹, CHEN Xiao-Yue¹, QU Yong-Gang¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. The Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China;

3. Guangxi Center for Animal Disease Control and Prevention, Nanning 530001, China)

Abstract Foot-and-mouth disease virus(FMDV) is an important pathogen worldwide; consequently, an important goal is the developments of diagnostic methods. To acquire an optimal diagnostic antigen allows one to distinguish vaccinated animals from infected animals, a recombinant expression plasmid pPIC9K-3ABCt was constructed by inserting of FMDV 3ABC truncated gene(525 bp) into yeast expression vector pPIC 9K. Secondly, plasmid pPIC9K-3ABCt was linearized by *Bgl*II, and transformed into GS115 cells by electroporation. Positive clones were selected with MD/MM plates and confirmed by PCR and RT-PCR. Finally, expression product of 3ABCt was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The results show that the induced recombinant *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-3ABCt could secret 3ABC protein mainly in dimer form into culture supernatant, which had good immunoreactivity and antigen specificity and its molecular weight output was about 40000. Expression of 3ABCt protein reached peak at 96 h after induction, maximum expression was accumulated up to 18% of the total supernatant protein, and production was about 23.4 mg/L.

Keywords Foot-and-mouth disease virus (FMDV); 3ABC Truncated gene; *Pichia pastoris*; Secretory expression; Diagnostic antigen

(Ed.: H, J, Z)