

狂犬病病毒糖蛋白在酿酒酵母中的表达

赵 慧^{1,2} 郑文岭^{1*} 高 洋¹ 张进芳¹ 彭翼飞¹ 张 宝¹ 马文丽^{1*}

(1. 南方医科大学基因工程研究所 广东 广州 510515)

(2. 华南农业大学资源环境学院 广东 广州 510640)

摘 要: 利用酿酒酵母表达系统表达狂犬病病毒糖蛋白 G, 可获得大量无致病的抗原, 为研究新型狂犬病疫苗提供条件。构建 Tat-G 融合基因, 通过 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点克隆至 pYes2 表达载体中, 醋酸锂法转化酿酒酵母, URA3 筛选鉴定阳性克隆, 阳性重组子经半乳糖诱导 20 h 后, 提取蛋白, SDS-PAGE 和 Western blot 分析鉴定融合蛋白。SDS-PAGE 结果显示糖蛋白基因在酿酒酵母中可能表达为 2 种形式的蛋白, yGI 和 yGII, 分子大小分别为 66 kD 和 56 kD, Western blot 显示在 56 kD 处有特异性条带。结合前人的研究成果, 初步判断狂犬病病毒糖蛋白基因的跨膜 TD 区和膜内编码区对 RV-G 蛋白分子的正确折叠和免疫活性等有至关重要的影响, 从而为进一步提高 yGII 蛋白的表达奠定基础。

关键词: 狂犬病病毒糖蛋白, Tat 肽, 酿酒酵母

Expression of Rabies Virus Glycoprotein Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHAO Hui^{1,2} ZHENG Wen-Ling^{1*} GAO Yang¹ ZHANG Jin-Fang¹
PENG Yi-Fei¹ ZHANG Bao¹ MA Wen-Li^{1*}

(1. Institute of Gene Engineer, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

(2. College of Nature Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: To obtain non-pathogenic rabies virus glycoprotein (RV-G), we expressed RV-G in *Saccharomyces Cerevisiae* (*S. cerevisiae*). In our study, *tat-G* fusion gene was cloned into the expression vector pYes2.0, which allows expression of a foreign gene in the yeast cells under the control of *GAI* promoter. Transformation was performed by using lithium-treated yeast cells and several Ura⁺ -transformants were isolated. According to the relative mobility in SDS-PAGE, we know probably two forms (designated as yGI and yGII) of RV-G analogues produced in *S. cerevisiae*, their molecular weights were estimated as 66 kD and 56 kD, respectively. On the other hand, there was a specific band about 56 kD shown in western blot result. Combining precursors' achievements, we will draw a conclusion that trans-membrane domain (TD) and cytoplasmic domain have a negative regulation on RV-G antigen immunogenicity in *S. cerevisiae*.

Keywords: Rabies virus glycoprotein, Tat peptide, *Saccharomyces Cerevisiae*

* 通讯作者: 郑文岭: Tel: 86-20-62789386; ✉: wenling@fimmu.com

马文丽: Tel: 86-20-62789386; ✉: wenli668@gmail.com

收稿日期: 2009-05-04; 接受日期: 2009-07-22

狂犬病是由狂犬病病毒(Rabies virus, RV)引起的人兽共患传染病,危害极其严重,发病后的致死率大于90%。据2008年1月世界卫生组织统计,全球范围内死于狂犬病的人数达55000余人,其中又以15岁以下的儿童为主要受害人群。目前对狂犬病的预防及治疗方法主要采用注射狂犬病疫苗和狂犬病免疫球蛋白,应用最为普遍的是Vero细胞疫苗,但该疫苗成本较高,不适合全球范围内推广,尤其在一些落后国家仍沿用有较强副作用的组织疫苗^[1]。

狂犬病病毒归属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)狂犬病毒属(Lyssavirus),核酸是单股负链RNA。该病毒基因组长约12 kb,从3'到5'端依次为编码核蛋白N、磷蛋白P、基质蛋白M、糖蛋白G和转录酶大蛋白L的5个基因,其中糖蛋白G(Rabies virus glycoprotein, RV-G)在囊膜上构成病毒刺突,与病毒致病性相关,是狂犬病病毒的主要抗原,可刺激机体诱生相应抗体和细胞免疫。

目前,国内外研究RV-G的表达多采用大肠杆菌和动植物细胞表达系统,一是因为大肠杆菌表达系统表达量较高,占总蛋白的30%~40%左右,便于对RV-G的结构功能进行研究;其二,动植物细胞表达系统所表达的抗原具有一定的免疫原性,有一定的应用研究价值^[2-4]。相比之下,应用酿酒酵母表达系统研究RV-G抗原比较少,酿酒酵母又称面包酵母或出芽酵母,它作为真核蛋白表达系统,具有以下特点^[5]:酿酒酵母安全无毒,无致病性;有较清楚的遗传背景,容易进行遗传操作;培养条件简单,容易进行高密度发酵;有良好的蛋白分泌能力;有类似高等生物的蛋白质翻译后的修饰功能,避免高成本的蛋白复性后再纯化的过程。用酿酒酵母表达的乙型肝炎疫苗、人胰岛素和人粒细胞集落刺激因子都已成为正式上市的基因工程产品。

本实验采用了酿酒酵母表达系统,通过深入研究发现,RV-G不同于以往的乙肝表面抗原蛋白等,有一定的独特性,该蛋白的不同功能区对RV-G的表达、免疫活性等有重要影响,基于本实验的研究结果,如果能对RV-G基因进行适当改造,有望大大提高RV-G在酿酒酵母中的可溶性表达,那么酿酒酵母表达系统用于狂犬病疫苗的研究将具有更广阔的前景。

Tat蛋白是HIV-1的反式转录因子(Trans-activator),37~72肽段为TAT蛋白转导结构域

PTD(Protein transduction domain, PTD),其中核心序列为11个氨基酸即-YGRKKTTQRR-。大量实验证明该Tat肽段可携带与之融合表达的蛋白高效进入体外培养的细胞,或通过 λ 噬菌体展示于噬菌体表面,携带DNA,接种于小鼠,快速到达机体内各组织,或联合使用纳米材料,包裹DNA和蛋白,增强纳米载药输送系统的穿透能力等^[6]。本实验拟将人工合成Tat PTD核心序列单链,退火后形成双链,通过BamH I与RV-G基因相连,构建为融合基因,其目的是增强后续动物实验中RV-G蛋白的免疫效果。

1 实验方法与材料

1.1 实验材料

狂犬病病毒 CVS-24 标准毒株糖蛋白基因(质粒 pVax-G)由军事医学科学院军事兽医研究所扈荣良研究员惠赠;酿酒酵母 INVScI、酵母表达载体 pYes2 及大肠杆菌 DH5 α 由本研究室保存;各种限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 DNA 聚合酶及各类 Marker 购自大连宝生物工程公司;小鼠抗狂犬病病毒单克隆抗体(1C5)购自 Abcam;羊抗鼠 IgG 购自 Bioworld。其它试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 实验方法

1.2.1 狂犬病病毒糖蛋白表达载体的构建及筛选:表达载体为 pYes2,该载体以 EcoR I 和 Xba I 酶切,回收载体片段。采用 PCR 方法从质粒 pVax-G 中扩增狂犬病病毒糖蛋白 RV-G 基因,上游引物为 5'-CGGGATCCCGTAAATTCCTATTTACACGA-3' (下划线部分为 BamH I 酶切位点),下游引物为 5'-CTTACAGTCCGGTCTCACCCCCACTT-3',反应体积 50 μ L,反应 30 个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s,该片段以 BamH I 酶切回收纯化备用。

合成 Tat 单链,正义链 5'-ATGTATGGCAGGAAGAAACGTAGACAGCGACGAAGAGGTTCTGATG-3',反义链 3'-TACATACCGTCCTTCTTTGCATCTGTCGCTGCTTCTCCAAGACTACCTAG-5' (下划线部分为 BamH I 酶切位点),退火成双链,退火条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 80 $^{\circ}$ C 5 min, 75 $^{\circ}$ C 5 min, 70 $^{\circ}$ C 5 min, 65 $^{\circ}$ C 10 min, 55 $^{\circ}$ C 10 min, 0 $^{\circ}$ C 10 min, 37 $^{\circ}$ C 10 min, 25 $^{\circ}$ C 10 min。将该双链与上述 PCR 纯化片段 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

采用 PCR 方法从连接产物中扩增获得 Tat-G

融合基因, 上游引物为 5'-GGAATTCCCCACCATG GGTATGGCAGGAAG-3'(下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物为 5'-GCTCTAGAGCTTACAGT CCGGTCTCACCC-3'(下划线部分为 *Xba* I 酶切位点), 30 个循环: 94°C 30 s, 58°C 15 s, 72°C 90 s, 该 PCR 片段经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切回收后与 pYes2 载体连接构建为 pYes2-tat-G 质粒载体。

转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 以氨苄抗性筛选鉴定重组载体。

1.2.2 pYes2-tat-G 质粒载体对酿酒酵母的转化及鉴定: 以常规的醋酸锂法转化。将所构建的 pYes2-tat-G 载体转化于酵母 INVSc1, 以尿嘧啶营养缺陷型(SC-U)培养基筛选, 以常规的酵母质粒提取方法提取阳性克隆的质粒, PCR 鉴定。

1.2.3 Tat-G 融合基因在酿酒酵母中的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳: 将酵母阳性克隆转接至 15 mL 液体 SC-U 培养基(含 2%葡萄糖)中, 30°C 过夜培养, 测 $OD_{600} = 3$, 取 6.67 mL 培养物于 10 mL 离心管中, 4°C 3000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加 1 mL~2 mL SC 诱导培养基(含 2%半乳糖)重悬菌体, 并转移至 50 mL 诱导培养基中 30°C 诱导表达 20 h, 测 $OD_{600} = 5.36$, 取 3 mL 离心去上清, 加酸洗玻璃珠(Sigma)及蛋白提取液(50 mmol/L 磷酸钠 pH 7.4, 1 μ mol/L EDTA, 5% 甘油, 0.1% PMSF)169 μ L, 使菌体最终 $OD_{600} = 100$, 振荡 30 s, 冰上放置 30 s, 重复 10 次, 离心, 取上清即完成蛋白提取。

1.2.4 Western blot 分析: 以 10%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 狂犬病毒的小鼠单克隆抗体(1C5)1:2500 和辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 1:5000 进行 Western blot 鉴定。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增、鉴定及克隆

狂犬病毒糖蛋白 G 基因全长 1575 bp, 去除信号肽序列 57 bp 后基因大小为 1518 bp, Tat 长 51 bp, 与 G 基因连接后的融合基因 Tat-G 全长 1569 bp, 结果见图 1。Tat-G 融合基因经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切回收纯化。pYes2 载体经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切后, 载体片段大小约为 5800 bp。

2.2 pYes2-tat-G 质粒载体的鉴定

pYes2 与 Tat-G 融合基因连接转化大肠杆菌, 以扩增 Tat-G 融合基因的引物进行 PCR 鉴定, 电

泳结果中出现 1619 bp 的特异性条带即为目的基因, 对应的菌落即为阳性克隆, 阳性克隆提取质粒, 以 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切进一步鉴定, 排除假阳性可能, 实验结果见图 2。该克隆质粒测序结果与 pVax-G 质粒中目的基因序列一致。

2.3 酵母阳性克隆子的鉴定

pYes2-tat-G 质粒转化酿酒酵母, SC-培养基筛选出阳性克隆, 提取该阳性酵母克隆质粒, PCR 扩增鉴定, 结果见图 3, 上述阳性克隆的质粒转化大肠杆菌, 进一步 PCR 确证, 实验结果见图 4。

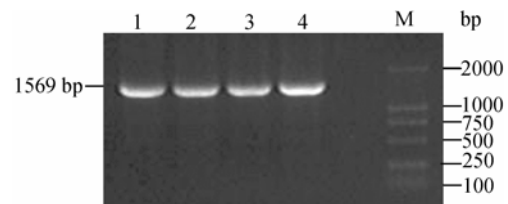


图 1 Tat-G 融合基因的 PCR 结果

Fig. 1 PCR products of Tat-G fusion gene

注: 1~4: tat-G 融合基因的 PCR 产物; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1~4: PCR products of Tat-G fusion gene; M: DL2000 DNA marker.

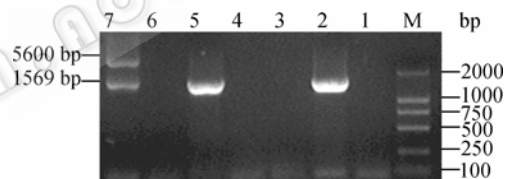


图 2 大肠杆菌转化子的 PCR 鉴定及重组载体的酶切验证
Fig. 2 PCR result of *E. coli* transformant and restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

注: 1~6: 菌落 PCR 鉴定, 其中 2 和 5 泳道对应的菌落为阳性克隆子; 7: 阳性克隆子的质粒提取后的 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切鉴定图谱; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1~6: PCR result of *E. coli* transformant, lane 2 and lane 5 are positive clones; 7: Recombinant plasmid digested with *EcoR* I and *Xba* I; M: DNA marker.

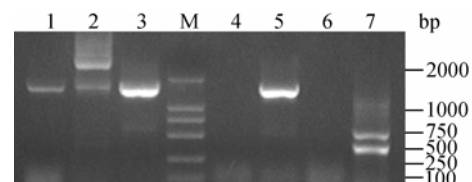


图 3 重组酵母质粒鉴定

Fig. 3 PCR result of plasmid from recombinant yeast clones

注: 1~7: 酵母质粒提取后的 PCR 鉴定, 其中 1、3、5 对应的为阳性克隆, 2、4、6 为阴性克隆。

Note: 1~7: PCR result of plasmid from recombinant yeast clones: 1, 3 and 5 are positive clones; 2, 4 and 6 are negative clones.

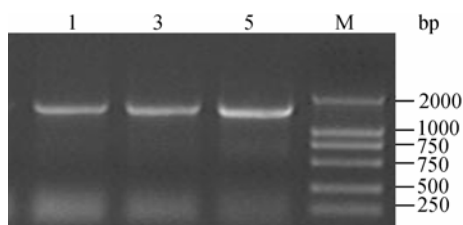


图4 大肠杆菌菌落 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of *E. coli* transformants

注: 1、3、5 为阳性克隆。

Note: The result of PCR shown 1,3,5 are positive clones.

2.4 重组蛋白的表达鉴定

重组酿酒酵母经半乳糖(2%)诱导 20 h 后, 提取蛋白质进行 SDS-PAGE, 设诱导前的酿酒酵母蛋白提取物为阴性对照, 实验结果见图 5。

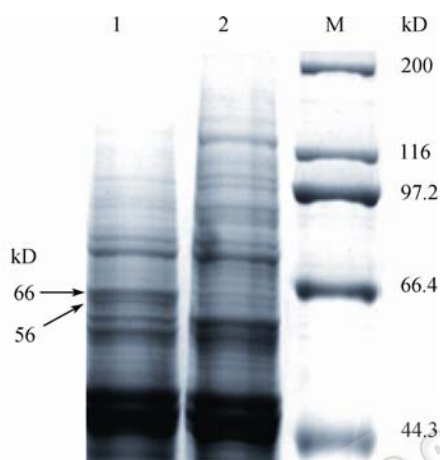


图5 tat-G 融合基因表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expressed tat-G fusion protein

注: 1: 重组酿酒酵母诱导 20 h 的蛋白图谱; 2: 重组酿酒酵母诱导前的蛋白图谱; M: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Recombinant transformant induced with galactose for 20 h; 2: Recombinant transformant before induction with galactose; M: Protein marker.

2.5 重组蛋白的 Western blot 分析

采用狂犬病病毒糖蛋白小鼠单克隆抗体(1C5, Abcam)和羊抗鼠 IgG-HRP 进行 Western 印迹, 鉴定分析融合蛋白 Tat-G, 其中 1C5 小鼠单克隆抗体可与狂犬病病毒 CVS 毒株的糖蛋白 G 发生特异性反应。反应结果见图 6。

3 讨论

狂犬病病毒糖蛋白是诱导机体产生中和性抗体的主要蛋白。该基因由 1575 bp 组成, 依据其功能分为: 第 1~57 位核苷酸为信号肽编码区(Signal

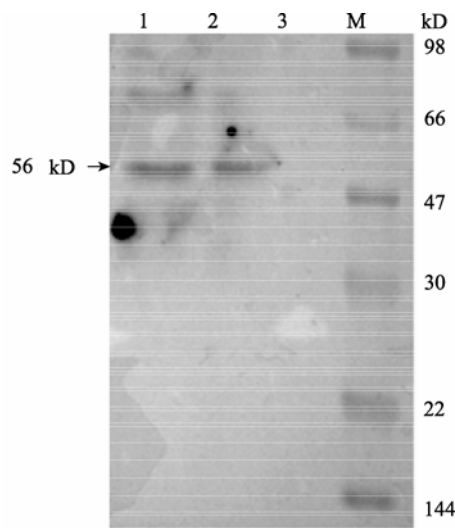


图6 tat-G 融合蛋白的 Western blot 结果

Fig. 6 Western blot analysis of the expression product

注: 1~2: 重组酵母诱导后蛋白的 Western blot 结果, 在约 56 kD 处有特异性条带; 3: 诱导前蛋白的 Western blot 结果, 在 56 kD 处无特异性结果。

Note: 1~2: Specific bands of recombinant transformant induced with galactose are shown at about 56 kD; 3: The results of recombinant transformant before induction in Western blot.

sequence, SS), 第 58~1374 位核苷酸为膜外编码区(Ectodomain), 第 1375~1440 位核苷酸为跨膜编码区(Trans-membrane domain, TD), 第 1441~1575 位核苷酸为膜内编码区(Cytoplasmic domain), 其中关于 TD 区在蛋白折叠中的作用存在争议。Rath A 等^[7]就此问题重点研究了 SS 区和 TD 区对 RV-G DNA 疫苗免疫效果的影响。他们设计了 4 种表达基因结构, 分别为 rGVR(-SS, -TD)、rGVRt(-SS, +TD)、rGVRs(+SS, -TD)和 rGVRst(+SS, +TD), 同时外源基因上游均设计有人组织纤维蛋白溶酶原激活剂信号肽序列(+TPA SS), 启动子为 CMV。将这 4 种 DNA 疫苗分别注射小鼠后发现, rGVRt DNA 疫苗能诱导的免疫反应最强, 小鼠体内产生的抗体滴度最高; 其次为 rGVRs, 最小为 rGVRst, 这说明在动物细胞表达系统中, TD 区在蛋白质正确折叠中发挥重要的正向调节作用; 相比而言由于 rGVRst 基因结构中存在过多的疏水结构(TPA SS、内源性 SS 和 TD), 导致 RV-G 表达量大大降低, 进而导致诱导产生的抗体滴度水平低下。

基于上述原因, 在本实验设计中, 我们采用了去除 SS 的 rGVRt 基因而保留 TD 区, 以降低内源性因素对 RV-G 表达量的影响。

成熟的狂犬病毒糖蛋白为 505 个氨基酸, 理论蛋白质分子量约 67 kD, 但因不同的表达系统对外源蛋白有不同的糖基化过程, 因而所表达的实际蛋白大小也有所不同, 大致介于 56 kD~66 kD, 均小于理论值。并且大肠杆菌表达系统所表达的 RV-G 无糖基化, 无法引起动物免疫反应^[8], 而酵母以及动植物细胞表达系统存在糖基化过程, 所产生的抗原均可引起体内免疫反应^[8], 同时又因糖基化程度不一, 诱导的免疫反应和抗体滴度水平不同。

本实验采用了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表达系统来研究 RV-G 的表达情况。从实验结果图 5 可见, 在 55 kD~66 kD 区间, 诱导前后的蛋白表达有两条明显差异带, 一条略大, 约 66 kD, 另一条略小, 约 56 kD。Western blot 显示在 56 kD 处有特异性条带出现, 该结果可能验证了 Sakamoto S 等的研究。Sakamoto S 等人^[9]的研究发现, RV-G 基因在酿酒酵母中表达可能会产生两种形式的抗原: 一种是 yGI 蛋白, 约 66 kD, 为成熟蛋白的完整大小, 占酵母总蛋白的 1%, 另一种 yG II, 约 56 kD, 占 RV-G 蛋白总量的 1%, 两种蛋白经 C 端水解后, yGI 蛋白降低为 56 kD 大小蛋白, 与 yG II 相当, 由此推测 yG II 可能缺失 TD 区和膜内编码区(Cytoplasmic domain)。两种抗原在免疫活性方面也存在区别: yGI, 只能与多克隆抗体发生免疫反应, 无法识别单克隆抗体, 更无法诱导体内免疫反应; yG II 不仅可被单克隆抗体识别, 还可以诱导体内的免疫反应。

由此可见, 本实验研究中 Western blot 结果可信, 在 56 kD 处的条带极有可能为 yG II 蛋白的特异性反应。但由于该抗原量低, 免疫活性弱, 因而在实验过程中适当延长了 X 光片的曝光时间, 以致在 56 kD 以外的区间出现了一些非特异条带。另外, 本实验结果从另一角度证明了 TD 区和膜内编码区可能对酿酒酵母中 RV-G 的免疫活性和蛋白的折叠有负向调节作用, 这与 Rath A 等人^[7]的研究结果相反。分析原因可能是因为在不同的表达系统中, G 蛋白中

各自的功能区在该蛋白的糖基化、折叠等过程中发挥不同的作用, 如在酿酒酵母中, TD 区和膜内编码区可能就会影响 yGI 蛋白中抗原位点的暴露, 从而影响了它与单克隆抗体的结合。因此我们认为 RV-G 基因的表达结构不能一概而论, 需要根据表达系统选择相应的功能区结构, 该实验结果为进一步研究 RV-G 在酿酒酵母中的表达提供了研究基础。

参 考 文 献

- [1] Manning SE, Rupprecht CE, Fishbein D, *et al.* Human rabies prevention --- United States, 2008. *MMWR Recomm Rep*, 2008, **57**(RR-3): 1-28.
- [2] Yokomizo AY, Jorge SAC, Astray RM, *et al.* Rabies virus glycoprotein expression in drosophila S2 cells. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnology Journal*, 2007, **2**(1): 102-109.
- [3] Li J, Faber M, Papaneri A, *et al.* A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. *Virology*, 2006, **356**(1-2): 147-154.
- [4] Saxena S, Sonwane AA, Dahiya SS, *et al.* Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. *Veterinary Microbiology*, 2009, **136**(1-2): 36-44.
- [5] Nielsen J, Jewett MC. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2008, **8**(1): 122-131.
- [6] Torchilin VP. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**(4-5): 548-558.
- [7] Rath A, Choudhury S, Batra D, *et al.* DNA vaccine for rabies: Relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response. *Virus Research*, 2005, **113**(2): 143-152.
- [8] Ashraf S, Singh PK, Yadav DSK, *et al.* High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *Journal of Biotechnology*, 2005, **119**(1): 1-14.
- [9] Sakamoto S, Ide T, Tokiyoshi S, *et al.* Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine*, 1999, **17**(3): 205-218.