

兔出血症病毒衣壳蛋白基因在毕赤酵母中的表达

Expression of Capsid Gene of Chinese Isolate of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in *Pichia pastoris*

严维巍¹, 崔治中^{2*}, 王永坤¹

YAN Wei-Wei¹, CUI Zhi-Zhong^{2*} and WANG Yong-Kun¹

1. 扬州大学畜牧兽医学院动物医学系, 扬州 225009

2. 山东农业大学动物科技系, 泰安 271018

1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

摘 要 将 RHDV VP60 基因插入酵母转移载体 pPICZ B 中转化毕赤酵母菌 GS115 株, 经筛选获得染色体基因组中整合入 VP60 基因的重组酵母菌。以甲醇诱导培养后经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测表达产物, 在 60kD 处出现一特异蛋白条带, 表明 RHDV 的衣壳蛋白得到了成功表达。血凝试验表明, 表达的重组蛋白具有血凝特性, 可以凝集人“O”型红细胞, 血凝价达 2⁸, 同时, 该血凝性可被抗 RHDV 的高免血清所抑制。经电镜观察, 重组酵母表达的衣壳蛋白可以在酵母菌体内自聚成大小约 40nm, 和天然 RHDV 病毒子在物理形态上类似的病毒样颗粒(VLPs)。该病毒样颗粒与兔抗 RHDV 高免血清作用后可被凝集成团, 表明该 VLPs 与天然 RHDV 在抗原性上也极为相似。

关键词 兔出血症病毒, 衣壳蛋白基因, 毕赤酵母, 表达, 病毒样颗粒

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0135-04

Abstract The capsid protein (VP60) gene of RHDV was subcloned into the *Pichia* expressin vector pPICZ B to express the VP60 protein intracellularly. The recombinant plasmid was initially transformed into a *E. coli* strain TOP10 F'. After verification of the construct by sequencing, the recombinant plasmid was linearized by *Sac* I in the 5' *AOX1* region and then transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 using the *Pichia* EasyComp Kit. After selecting and verifying for the insertion of VP60 gene in the genome, two clones of *Pichia* transformants were select for expression test. The recombinant clones were first inoculate with BMGY in baffled flask at 28 ~ 30°C in a shaking incubator (250 ~ 300 r/min) until culture reaches an $OD_{600} = 2 \sim 6$, then re-suspend the cell pellet to an OD_{600} of 1.0 in BMMY medium to induce expression for 5 days by methanol at a concentration of 0.5% in a 1 liter baffled flask covered with 2 layers of sterile gauze. Collect the cell pellets and break it by acid-washed 0.5 mm glass beads. The expression of recombinant *Pichia* strains was detected by SDS-PAGE and Western analysis with a polyclonal serum which showed a specific protein band of 60kD. Theses results indicates that the recombinant VP60 produced in *Pichia* was antigenically similar to the viral polypeptide. Electron microscopic observation of the recombinant *Pichia*-derived protein revealed the presence of virus-like particles similar in size and appearance to native virus capsids. In the haemagglutination test, the recombinant VLPs, like the native RHDV, also agglutinated human blood type O erythrocytes and could be inhibited by the anti-RHDV polyclonal serum.

Key words Rabbit haemorrhagic disease virus, capsid protein gene, expression, *Pichia pastoris*, VLPs

Received: June 5, 2004; Accepted: October 26, 2004

This work was supported by Grant from the Found of National Natural Science (No.30400320).

* Corresponding author. Tel:86-538-8241560; E-mail:cuizz@sdau.edu.cn

国家自然科学基金项目资助(No.30400320)。

兔病毒性出血症(RHD)是一种在世界范围内广泛流行的兔的烈性传染病,其病原为兔病毒性出血症病毒(RHDV),属杯状病毒科兔病毒属,为无囊膜病毒,其核衣壳仅由一种 60kD 的主要结构蛋白(VP60)组成^[1]。迄今为止,由于 RHDV 在体外组织细胞的培养方法尚未建立,所以目前广泛使用的疫苗为组织灭活苗,鉴于这种疫苗的种种弊端,当今世界各国的科研工作者纷纷开展对 RHDV 基因工程苗的研制,相继在大肠杆菌、杆状病毒、痘病毒、酿酒酵母中表达了 VP60 蛋白^[2-4]。

毕赤酵母(*Pichia pastoris* yeast)是近年发展起来的一种新型表达宿主,由于其独特的优越性,已在多种基因工程表达蛋白质中得到了广泛应用,但国内外至今尚未见应用于 RHDV VP60 蛋白表达的报道。本研究在毕赤酵母中成功表达了编码该 VP60 蛋白的基因,为将来进一步获取低廉、安全的新一代 RHDV 基因工程苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株以及抗体

Pichia pastoris 酵母表达转移质粒载体 pPICZ B、大肠杆菌 TOP10F' 及酵母菌 GS115 株购自 INVITRO-GEN 公司,含 RHDV WX84 株衣壳蛋白 VP60 基因重组质粒 pGEM-T-VP60 由严维巍等构建^[5],RHDV WX84 株及其兔高免血清由扬州大学畜牧兽医学院预防兽医学教研室保存。

1.2 分子生物学试剂

NBT/BCIP 染色试剂盒、山羊抗兔 IgG 酶标抗体等购于上海华美生物工程公司;Yeast extract、Yeast Nitrogen Base(YNB,无氨基酸)、D-Sorbitol、L-Histidine、D-Biotin、D-Glucose、Glycerol 和 Methanol 购自 INVITROGEN 公司;Peptone 及 Lyticase 购自 Sigma 公司。

1.3 VP60 基因重组酵母转移载体的构建

将 pGEM-VP60 重组质粒以 *Bgl* II 酶切后回收 VP60 基因,并与经 *Bsm*BI 酶切处理的质粒 pPICZ B 连接,以氯化钙法转化大肠杆菌菌株 TOP10F',经限制性酶切鉴定筛选得到阳性克隆 pPICZb-VP60,并且经序列测定其阅读框架也正确。

1.4 酵母转化及 PCR 鉴定

提取重组酵母转移载体经 *Sac* I 线性化后,采用 *Pichia* EasyComp 试剂盒参照厂商说明书转化酵母菌 GS115 株,用含 Zeocin 的 YPDS 平板筛选阳性重组酵母。挑单个酵母菌于 5mL YPD 培养基中培养过夜,参照产品说明书,抽提 DNA 后进行 PCR

扩增,反应结束后取 PCR 产物进行电泳,观察实验结果。PCR 引物及反应条件如下:

5' AOX 1 引物: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAA-GC-3';

3' RHDV P3 引物: 5'-GCAAATGGCATTCTGACA-TCC-3'

反应条件: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 2min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。

1.5 MDH、MMH 平板鉴定重组菌表型

挑取单个重组酵母菌落接种于 MDH 平板上, 28℃ 培养 2 d 后再将同一重组酵母分别接种于新鲜制备的 MDH 和 MMH 平板上, 28℃ 培养 2 d,对比酵母重组子在两种平板上的生长情况。

1.6 重组基因的诱导表达及表达产物的收获与制备

挑取单个重组酵母菌落接种于 25 mL BMMG 培养基中,于 250 mL 的锥形瓶中 28℃ ~ 30℃ 250 ~ 300r/min 振荡培养 16 ~ 18h,使其 OD_{600} 达到 2 ~ 6,收获酵母菌,用 BMMY 培养基悬浮稀释至 $OD_{600} = 1$,于 28℃ ~ 30℃ 以甲醇诱导培养 4 d。其间,每隔 24h 加无水甲醇至终浓度为 0.5%。离心收集菌体,于每 mL 样品中加入 100μL 酵母裂解液(NaH_2PO_4 50mol/L, EDTA 1mmol/L, PMSF 1mmol/L, 5% 甘油, pH = 7.4),再加入等体积的玻璃珠,置旋涡混合器上剧烈振荡 30s,其后冰浴 30s,重复 8 次,离心取上清液待检。

1.7 重组酵母菌菌体裂解物的凝胶电泳及 Western-blotting 检测

按常规方法制备 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。将 1.6 处理好的样品(以非重组酵母转移载体转化酵母为阴性对照)取 20μL 上样,采用 Hoefer 公司 miniVE 的电泳装置电泳,完毕后,取下凝胶,一块胶以考马斯亮蓝染色;另一块胶则用 Hoefer 公司 miniVE 转印装置,将其转印于 NC 膜上,应用兔抗 RHDV 高免血清按常规方法进行 Western-blot 反应^[6]。

1.8 重组酵母菌表达产物的血凝和血凝抑制试验

1.8.1 重组酵母菌表达产物的血凝试验:试验采用人“O”型红细胞进行,用前以 pH6.5 0.85% PBS 液洗涤,洗涤后的红细胞以生理盐水制成 2% 悬液;取 25μL 1.6 处理好的待检样品于圆底微量血凝板中作 2 × 倍比稀释后,加入等体积 2% 红细胞悬液,振荡均匀,置 25℃ 作用 30min 后观察结果。同时以非重组酵母转移载体转化酵母为阴性对照,以 RHD 病兔肝或脾组织匀浆液上清为阳性对照。

1.8.2 重组酵母菌表达产物的血凝抑制试验:根据 1.8.1 所测各表达产物(包括对照)的血凝价,将其稀释成含 8 个 HA 单位的溶液。于微量血凝板第一孔中加入 0.025mL 血清,然后以生理盐水倍比稀释至第 12 孔,加入 0.025mL 内含 8 个 HA 单位的表达产物稀释液于每一孔中,将血凝板置 25℃作用 30~60min,于每孔中加入 2% 浓度的人“O”型红细胞 0.025mL,25℃静置 30~60min 后观察结果。

1.9 重组酵母菌表达产物的透射电镜观察

1.9.1 重组酵母菌表达产物的直接电镜观察:将 1.6 处理好的 GS115 株表达产物样品以 pH6.4 2% 磷钨酸负染色 10min,以 PHILIPS TECNAI12 透射电镜直接观察病毒。

1.9.2 重组酵母菌表达产物的免疫电镜观察:将 100μL 1.6 处理好的待检样品与等量 RHDV 兔抗高免血清于 37℃作用 1h 后,12 000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀以 50μL 去离子水重新悬浮,取 30μL 同 1.9.1 法进行负染电镜观察。

2 结 果

2.1 重组酵母的转化及鉴定

挑选具 Zeocin 抗性的重组子用 AOX I 和 VP60 序列作为引物进行 PCR 扩增检测。结果显示 pPICZb-VP60 转化的重组酵母菌各分别扩增出一条 1.0kb 和 1.3kb 的条带,示 VP60 基因已成功整合到酵母基因组中。

2.2 重组菌表型的鉴定

重组酵母菌在 MDH、MMH 平板上生长无明显差别,表明所得重组酵母菌皆为 MUT⁺。

2.3 重组酵母菌表达产物的凝胶电泳

诱导表达产物,经电泳、考马斯亮蓝染色后,胞内表达的菌体裂解物与非重组酵母转移载体转化酵母菌体裂解物未见有明显区别的条带存在。

2.4 重组酵母诱导表达产物的检测

取表达产物进行 Western-blot 检测,可在胞内表达的重组菌裂解样品中检测到一条 60kD 的蛋白条带,为 VP60 蛋白带(见图 2)。而非重组酵母转移载体转化酵母裂解样品未见该蛋白条带,表明重组 VP60 蛋白具有与天然衣壳蛋白相似的免疫学活性。同时,可见另一条分子量较小的条带,提示在酵母细胞的裂解过程中表达产物出现了一定程度的降解、断裂,或者该蛋白在酵母中表达时可能出现提前中止的情况。

2.5 重组酵母菌表达产物的血凝和血凝抑制试验

经检测,1.6 处理所得的待检样品具有明显的

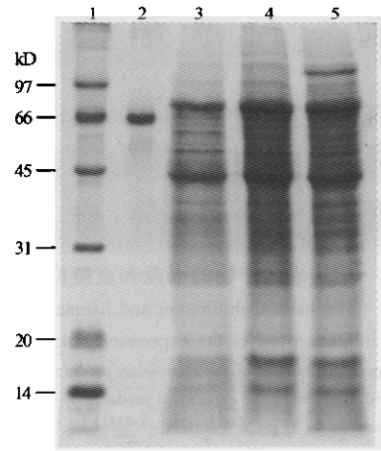


图 1 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression products
1: molecular weight standard; 2: BSA(66kd); 3: lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* pPICZb; 4: lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* pPICZb-VP60; 5: lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* GS115/PPICZ/lac Z.

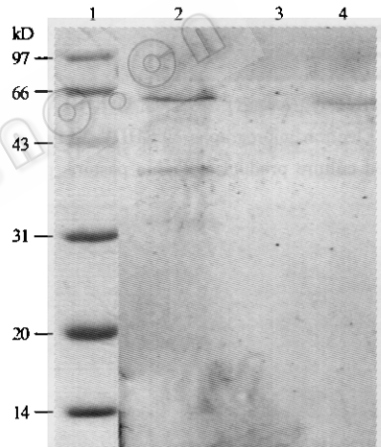


图 2 重组蛋白与兔抗 RHDV 高免血清的 Western-blot

Fig. 2 Western blot analysis of the expression products
1: molecular weight standard; 2: lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* pPICZb-VP60; 3: lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* pPICZb; 4: lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* pPICZb-VP60.

血凝性,可以凝集人“O”型红细胞,血凝价为 2⁸,同时,上述表达产物的血凝特性可被抗 RHDV 的高免血清所抑制,表明该表达产物与天然 RHDV 具有十分相似的生物学活性。

2.6 重组酵母菌表达产物的直接电镜观察

在电镜下可见有形态特征与天然 RHDV 完全相似的病毒样颗粒,大小约 40nm,无囊膜,周围排列有 RHDV 典型的呈辐射状排列的十个规律的突出物。

2.7 重组酵母菌表达产物的免疫电镜观察

电镜下可见病毒粒子经抗体凝集后聚集成病毒团,表明 2.6 观察所得病毒粒子为表达的 VP60 蛋白自聚而成的 RHDV 病毒样颗粒。

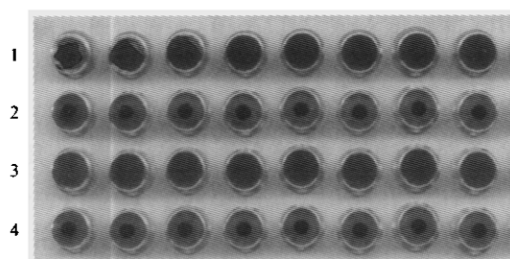


图3 重组表达产物的血凝和血凝抑制试验

Fig. 3 The haemagglutination and haemagglutination inhibition test of the expression products

1: the haemagglutination test of the expression products; 2: the haemagglutination inhibition test of the expression products by anti-RHDV serum; 3: positive control; 4: negative control.

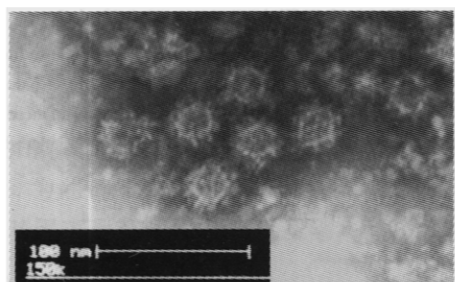


图4 重组酵母菌表达产物形成的 RHDV 病毒样颗粒

Fig. 4 Electron micrographs of RHDV VLPs from lysates of induced culture product of *Pichia pastoris* pPICZb-VP60



图5 RHDV VLPs 免疫电镜观察

Fig. 5 Results of immunoelectron microscopy of RHDV VLPs using anti-RHDV serum

3 讨论

兔出血症 (Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD) 是由兔出血症病毒 (Rabbit Hemorrhagic Disease virus, RHDV) 所致的兔的一种急性、高度传染性、高度致死性的疾病, 根据 RHDV 的形态学、生物化学和分子生物学特性, 国际病毒分类委员会最近将其归类于嵌杯样病毒科兔病毒属。该病毒为单股正义 RNA 病毒, 基因组由 7437 个核苷酸组成, 拥有 2 个开放阅读框架, 分别编码多个蛋白, 其中衣壳蛋白是 RHDV 的唯一结构蛋白, 称为 VP60, 与诱导抗病毒感染的免疫反应直接相关。目前广泛使用的 RHDV

疫苗为组织灭活苗, 虽然其长期以来一直具有良好的免疫效果, 但具有其自身所不可避免的种种缺点。由于兔出血症病毒在体外组织细胞的培养方法尚未建立, 所以, 近年来, 人们对 RHDV 疫苗的研究便主要着眼于基因工程苗的研制, 其既能起到免疫预防作用, 又能很好地解决组织灭活苗所带来的生物安全性问题。基于此, 本研究以毕赤酵母表达系统表达了中国株 RHDV VP60 基因, 以期探索一条制备 RHDV 新型疫苗的途径。

从电泳照片可看出, 在预计表达产物所在的位置, 非重组性酵母同样存在一条含量较高的蛋白条带, 导致不能辨别重组酵母的表达情况, 但是结合血凝试验却可以发现, 重组酵母的菌体裂解物获得的表达产物的血凝价也较高, 由此可以推断, VP60 基因在重组酵母中也得到了一定量的表达。虽然许多外源蛋白在毕赤酵母中都可高效表达, 但实际上也不全是如此。如 Tetanus Toxin Fragment c 的表达量可高达 12g/L, 而 Mouse serotonin Receptor 的表达量只有 0.001g/L。影响外源蛋白表达水平的差别主要在两方面, 一是外源基因本身序列的内在特性, 另一方面, 表达时的培养条件对表达量也有显著影响。此外, 不同的外源蛋白的表达有自身的特点。针对某一种蛋白, 需要进行优化实验来确定最适表达条件。本实验在摇瓶培养和诱导的情况下, 对在毕赤酵母胞内表达 RHDV VP60 蛋白进行了初步探讨。在此所取得的结果之上, 我们将进一步在表达条件的优化上进行摸索并积累经验, 并尝试发酵培养, 为真正实现 RHDV 基因工程苗的产业化奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Studdert MJ. Rabbit haemorrhagic disease virus: a calicivirus with differences. *Aust Vet J*, 1994, 71(8):264-6
- [2] Thiel HJ, König M. Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol*, 1999, 69(1-2):55-62
- [3] Clarke IN, Lambden PR. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt2):291-301
- [4] Boga JA, Martin Alonso JM, Casais R, Parra F. A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt9):2315-2318
- [5] Yan WW(严维巍), Cui ZZ(崔治中), Wang YK(王永坤). Cloning and sequencing of the capsid protein gene of rabbit hemorrhagic disease virus. *Virological Sinica* (中国病毒学), 2003, 18(2):129-133
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989