

牛流行热病毒糖蛋白 G₁ 抗原表位在毕赤酵母中的表达和抗原性鉴定^{*}

郑福英¹ 蔺国珍¹ 邱昌庆^{1* * *} 原魁章² 宋军英²

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室 兰州 730046)

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 哈尔滨 150001)

摘要 :从包含牛流行热病毒 G 蛋白基因的质粒 pMD-G 中克隆 G₁ 抗原表位区基因 ,亚克隆进表达载体 pPIC9K ,构建重组载体 pPIC9K-G₁ ,线性化后电转化毕赤酵母 GS115 ,通过 G418 压力和 PCR 法筛选阳性重组酵母进行诱导表达。经 SDS-PAGE、脱糖基化分析、Western blot、ELISA、兔体免疫实验和特异性分析 ,表明该基因在 GS115 中表达并进行了适度的糖基化 ,表达蛋白有良好的生物学活性和特异性 ,可作为包被抗原 ,开发 ELISA 诊断试剂盒。

关键词 :牛流行热病毒 ,G₁ 抗原表位 ,毕赤酵母 ,表达 ,鉴定

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)05-0843-05

Expression and Antigenic Characterization of the Epitope-G₁ of Bovine Ephemeral Fever Virus Glycoprotein in *Pichia pastoris*^{*}

ZHENG Fu-Ying¹ LIN Guo-Zhen¹ QIU Chang-Qing^{1* * *} YUAN Kui-Zhang² SONG Jun-Ying²

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture , State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology , Lanzhou Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Lanzhou 730046)

(Harbin Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Harbin 150001)

Abstract :The epitope-G₁ gene , cloned from the pMD-G plasmid including G protein gene of bovine ephemeral fever virus , was subcloned into expression vector pPIC9K to construct pPIC9K-G₁ recombinant plasmid successfully , and the recombinant plasmid linearized was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant *Pichia pastoris* strains were screened by G418 and PCR , and induced by methanol. The expressed products were analyzed by SDS-PAGE , deglycosylation , Western blot , ELISA , immunizing rabbits and specificity experiments. The results indicated that the gene was expressed successfully in GS115 and glycosylated moderately , and the target protein had nicer biological activity and specificity. The protein is able to be used as coating antigen to develop ELISA Kit for diagnosing bovine ephemeral fever.

Key words :Bovine ephemeral fever virus , Epitope-G₁ , *Pichia pastoris* , Expression , Characterization

牛流行热(BEF)是由牛流行热病毒(BEFV)引起的一种急性传染病 ,该病传播迅速 ,流行面广 ,首先发现于 19 世纪中期的东非 ,随后流行于非洲、亚洲和大洋洲许多国家和地区 ,曾在我国多个省份多次爆发流行^[1-3]。该病可导致奶牛产奶量降低、乳质下降、役用牛跛行或瘫痪、部分怀孕母牛流产 ,给养牛业造成重大经济损失。

目前检测 BEFV 血清抗体的通用方法是中和实验 ,但该方法要求较高 ,只能在实验室内进行 ,不能

大范围推广应用 ,对一些牛场并不实用。Zakrzewski 等采用针对 BEFV 糖蛋白 G₁ 抗原位点的单克隆抗体 ,建立了检测 BEFV 特异性抗体的阻断 ELISA 方法。该单克隆抗体只与 BEFV 病毒发生结合反应 ,而与其它相关病毒(如 Berrimah ,Kimberley 病毒等)无交叉反应 ,与病毒中和实验相比 ,敏感性更高 ,操作更简单^[4]。近年来又发展建立了一些基于 PCR 的诊断方法^[5,6] ,目前这些方法还都没有被广泛应用。本研究将 BEFV 糖蛋白上的 G₁ 抗原表位在毕

^{*} 国家奶业重大专项基金资助(No.2002BA518A04)

^{**} 通讯作者 Tel :0931-8342673 , E-mail :cqiu@126.com

收稿日期 :2006-12-11 ,修回日期 :2007-04-20

赤酵母中获得成功表达并进行了鉴定,为研制检测 BEF 血清抗体的 ELISA 试剂盒奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株和质粒

pMD-G 克隆质粒为前期工作构建;pPIC9K、GS115 购自 Invitrogen 公司;JM109 为本实验室保存;pMD18-T Simple Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 酶和主要试剂

M-MLV、Ex 预混酶、EcoRI、NotI、质粒提取试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;氨苄青霉素钠、YNB(酵母氮碱)、D-山梨醇、G418、牛血清白蛋白、生物素等购自上海生工生物工程技术有限公司;牛流行热阴、阳性血清、牛流行热灭活苗为哈尔滨兽医研究所原魁章研究员提供;狂犬病毒阳性血清(来自犬)为本实验室保存;兔抗犬 HRP-IgG(H+L)、兔抗牛 HRP-IgG(H+L)为北京博大泰克生物基因技术有限责任公司产品;DAB 购自美国 Amresco 公司;其它常规试剂均为国产分析纯。

1.3 G₁ 抗原表位基因的克隆

采用 DNA Star 软件,对所测 G 基因序列与 NCBI/GenBank 登载的多个台湾株、澳大利亚株 G 基因序列进行分析,比较其同源性,在最保守区域设计 G₁ 抗原位点区表达引物,上、下游引物之间相距 420bp。上游引物加上 EcoR I 酶切位点,下游引物加上 Not I 酶切位点。

G₁ 上游引物:5' GAA TTC AGA GCT TGG TGT GAA
EcoR I
TAC 3'

G₁ 下游引物:5' GCG GCC GC CCA ACC TAC AAC
Not I
AGC AGA TA 3'

以 pMD-G 质粒为模板,50μL 体系扩增 G₁ 抗原表位基因。94℃ 预变性 5min 后,进行如下程序:94℃ 40s,49℃ 1min,72℃ 40s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。扩增所得片段与 pMD18-T 连接,构建克隆质粒,再通过 PCR 扩增、双酶切鉴定、测序筛选阳性克隆质粒,命名为 pMD-G₁。

1.4 表达载体的构建和阳性酵母菌株的筛选

以 40μL 体系分别双酶切 pMD-G₁ 质粒、pPIC9K 载体,琼脂糖凝胶电泳回收目的片段。然后取载体

片段 1μL、G₁ 基因片段 7μL、T4 DNA 连接酶 1μL、连接液 1μL 混匀,16℃ 连接 48h,转化 JM109,筛选、鉴定阳性表达质粒,命名为 pPIC9K-G₁。将 pPIC9K-G₁ 用 Sac I 单酶切线性化,电转化 GS115 酵母感受态细胞,通过 G418 压力筛选和 PCR(用载体引物)鉴定,筛选阳性高拷贝酵母菌株。

载体引物上游:5' AOX1,5' GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3'

载体引物下游:3' AOX1,5' GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3'

1.5 G₁ 基因在酵母中的表达

将筛选到的阳性高拷贝单克隆酵母菌株在 BMMY 培养液中进行摇瓶诱导表达,每隔 24h 取样 1 次,每次 1mL,同时向培养基中补充甲醇至终浓度为 0.5%,以保证持续的诱导表达,共诱导 72h。将所取样品 12000r/min 离心 10 min 后取上清进行 SDS-PAGE 电泳,确定表达蛋白的表现分子量大小。

1.6 表达产物的纯化和糖基化分析

将 20mL 发酵上清液冻干,再用灭菌双蒸水溶解,调整蛋白浓度为 50mg/mL。取蛋白样品 1mL,用 Sephadex-G200 进行分子筛层析,流速 0.5mL/min,收集目的蛋白洗脱峰。取 20μL 蛋白洗脱液,加入等量 10× Glycoprotein 变性缓冲液煮沸 10min,再加入 5μL 10× G5 缓冲液、5μL Endo H,37℃ 温育 1h 后加等量的上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7 目的蛋白的抗原性分析

取发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳、Western blot 分析;方阵法确定抗原最适包被浓度、血清和酶标二抗的最适稀释度后,将纯化的目的蛋白作为包被抗原,间接 ELISA 检测经中和实验鉴定的 BEFV 10 份阳性血清和 12 份阴性血清,测定 OD₄₉₀ 值并计算其平均值,比较差异,以鉴定表达蛋白的反应原性。同时以脱糖基化后的蛋白样品作为包被抗原,检测上述血清样品,测定 OD₄₉₀ 值,检验糖基化处理对目的蛋白的反应活性有无影响。

将纯化的目的蛋白与弗氏完全佐剂等体积混匀,颈部皮下免疫 5 只体重 2.5kg 健康新西兰白兔,接种抗原量 200μg/只,2 周后同等剂量蛋白(与等体积弗氏不完全佐剂混合)加强免疫 1 次。同时以牛流行热灭活苗免疫 5 只试验兔,1mL/只,间隔 2 周再免疫 1 次,第 2 次免疫后 1 周、2 周、3 周分别耳静

脉采血分离血清,间接 ELISA 法检测抗体效价,鉴定目的蛋白是否能刺激机体产生抗体,即是否具有免疫原性。

1.8 目的蛋白的反应特异性分析

以纯化的目的蛋白作为包被抗原,间接 ELISA 法检测 8 份狂犬病病毒 RV 与 BEFV 同属弹状病毒科的阳性血清,验证是否有交叉反应。

2 结果

2.1 表达载体的构建和阳性酵母菌株的筛选

以 pMD-G 阳性质粒为模板,扩增 G_1 表位基因。通过构建克隆质粒、双酶切目的片段和表达载体,连接、转化、鉴定,成功构建了 pPIC9K- G_1 表达载体。经测序分析,目的基因 420bp,与预期结果一致(图 1)。以通过 G418 压力筛选后的重组单克隆酵母菌株 DNA 为模板,以 pPIC9K 载体引物进行 PCR 扩增,得到约 912bp 的片段(包含载体片段 492bp,目的片段 420bp),与预期大小相一致(图 2)。

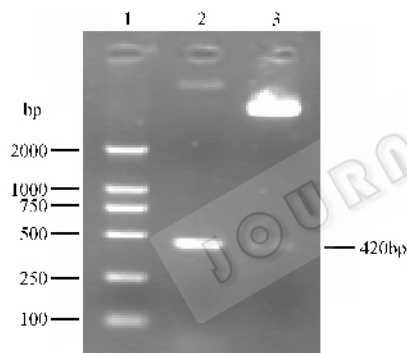


图 1 pPIC9K- G_1 的 PCR 和酶切鉴定

1 2kb DNA Marker, 2 pPIC9K- G_1 质粒 PCR 产物, 3 pPIC9K- G_1 质粒双酶切产物/*EcoRI* + *NotI*

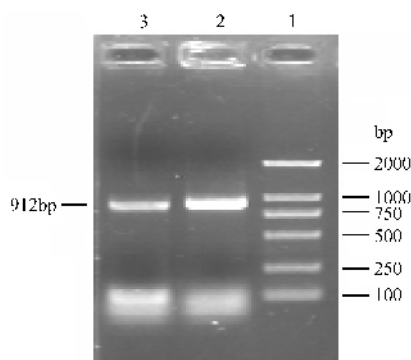


图 2 GS115/pPIC9K- G_1 PCR 鉴定

1 2kb DNA Marker, 2-3 GS115/pPIC9K- G_1 PCR 产物

2.2 重组酵母菌株的诱导表达

在 BMMY 培养基中,表达菌经终浓度 0.5% 的

甲醇诱导 48h 后,经 SDS-PAGE 电泳,观察到发酵上清中出现约 26.0kD 的蛋白条带,诱导 24h 的发酵液中没有明显的蛋白条带(图 3)。

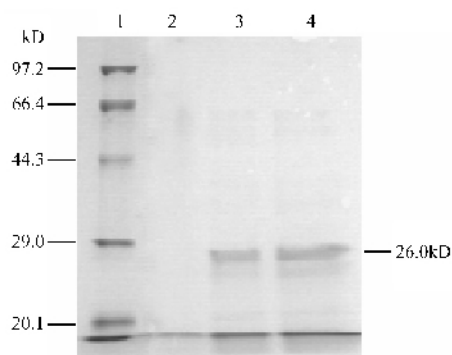


图 3 GS115/pPIC9K- G_1 不同 pH 值条件下的摇瓶发酵上清液 SDS-PAGE 电泳

1 低分子量蛋白 Marker, 2-4 甲醇诱导 24h、48h、72h 的 GS115/pPIC9K- G_1 发酵上清液

2.3 表达产物的纯化和糖基化分析

发酵上清液经分子筛层析纯化后色素和蛋白得到很好的分离,表达蛋白脱糖基化后进行 SDS-PAGE 电泳,观察到 26.0kD 左右的蛋白条带变为约 15.54kD 的蛋白带,与理论值相当(图 4)。

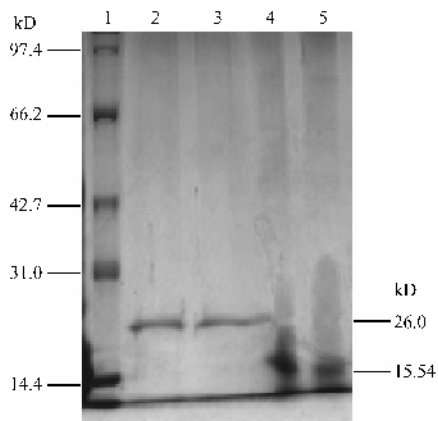


图 4 目的蛋白的纯化和糖基化分析

1 低分子量蛋白 Marker, 2-3 纯化的目的蛋白, 4-5 脱糖基化后的蛋白样品

2.4 目的蛋白的生物学活性分析

酵母发酵上清液经 SDS-PAGE 电泳、Western blot 转印后出现明显的显色带(图 5),大小约为 26.0kD。经方阵滴定确定最适抗原包被量为 $5\mu\text{g}/\text{孔}$,血清和酶标二抗的最佳稀释度分别为 1:100 和 1:1000。将目的蛋白包被酶标板,按常规间接 ELISA 方法操作,测得 BEFV 10 份阳性血清的 $OD_{490\text{nm}}$ 值平均为

1.113 ± 0.265 ,12 份阴性血清的 OD_{490} 值平均为 0.237 ± 0.027(表 1),脱糖基化后的蛋白样品包被酶标板检测上述血清,测得 10 份阳性血清的 OD_{490} 值平均为 1.077 ± 0.254 ,12 份阴性血清的 OD_{490} 值平均为 0.224 ± 0.030(表 2)。

兔体免疫实验结果表明,牛流行热灭活苗组免疫后第 1、2、3 周采集的血清样品,经间接 ELISA 测得的 OD_{490} 值平均分别为 0.601 ± 0.094、0.998 ± 0.132 和 1.225 ± 0.252 ;重组蛋白免疫组血清样品测得的 OD_{490} 值平均分别为 0.576 ± 0.079、0.823 ± 0.141 和 1.012 ± 0.185。两组均产生了高滴度的抗体,但重组蛋白组的抗体效价稍低于灭活苗组。

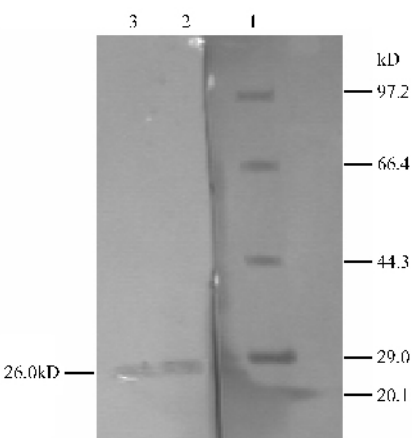


图 5 GS115/pPIC9K- G_1 表达蛋白的 Western blot 分析
1 低分子量蛋白 Marker, 2-3 目的蛋白样品

表 1 目的蛋白抗原(脱糖基化前)间接 ELISA 检测 BEFV 阴、阳性血清结果												
	OD_{490} 值											平均 OD_{490} 值
阳性血清	1.622	1.215	0.767	0.935	1.104	1.437	0.896	0.940	1.229	0.987		1.113 ± 0.265
阴性血清	0.277	0.237	0.254	0.212	0.197	0.201	0.214	0.229	0.241	0.272	0.260	0.237 ± 0.027

表 2 目的蛋白抗原(脱糖基化后)间接 ELISA 检测 BEFV 阴、阳性血清结果												
	OD_{490} 值											平均 OD_{490} 值
阳性血清	1.557	1.224	0.705	0.910	1.081	1.285	0.841	0.902	1.247	1.019		1.077 ± 0.254
阴性血清	0.261	0.205	0.264	0.241	0.177	0.193	0.208	0.211	0.199	0.259	0.255	0.224 ± 0.030

表 3 间接 ELISA 特异性结果										
RV 阳性血清号	1	2	3	4	5	6	7	8		平均 OD_{490} 值
OD_{490} 值	0.239	0.284	0.265	0.273	0.263	0.259	0.242	0.221		0.256 ± 0.020

2.5 目的蛋白的反应特异性分析

目的蛋白作为包被抗原,测得 8 份 RV 阳性血清的 OD_{490} 值平均为 0.256 ± 0.020(表 3),与所测 12 份 BEFV 阴性血清的 OD_{490} 值接近,说明不存在交叉反应。

3 讨论

本研究的目的是表达 BEFV 的特异性蛋白,这种蛋白要能与 BEFV 阳性血清特异性结合,而与其它病毒血清无交叉反应,据此该蛋白可以作为包被抗原,建立检测血清抗体的 ELISA 方法,开发 ELISA 试剂盒,跟踪检测疫苗免疫后的抗体消长规律和发病前后的抗体水平。G 蛋白抗原基因上的 G_1 抗原表位为 BEFV 所特有^[7,8,9],因此我们选取该抗原表位基因进行克隆表达。本文选择克隆的 G_1 抗原区

基因片段为 420bp,编码 140 个氨基酸,在 G 基因中的氨基酸序列位置为 390 ~ 529 位,包括了完整的 G_1 表位基因区。该区含有 3 个糖基化位点,在毕赤酵母表达系统中能进行适度的糖基化,以保证抗原决定簇的构象尽量与天然相符,该区域避开了蛋白转膜区,即强疏水区,使该基因更容易获得表达。

经 SDS-PAGE 电泳、Western blot 鉴定,说明 G_1 基因在毕赤酵母 GS115 中获得了表达,蛋白大小约为 26.0kD,比理论值 15.54kD 明显偏大;对蛋白样品脱糖基化处理后进行 SDS-PAGE 电泳,观察到约 26.0kD 的蛋白条带变为约 15.54kD 的蛋白带,说明目的蛋白确实进行了糖基化。将脱糖基化前、后的目的蛋白分别作为抗原,检测相同 BEFV 血清样品,所得数据说明糖基化处理对目的蛋白的反应活性影响不大。

Western blot 和 ELISA 试验表明表达蛋白有良好的反应原性,兔体免疫实验说明该蛋白能刺激机体产生抗体,有免疫原性。以上结果均证明所表达的蛋白有良好的生物学活性。

作为诊断抗原还必须有特异性。与牛流行热病毒相关的 Berrimah、Kimberley 病毒等在国内未见报道,已报道的国内存在并感染牛的弹状病毒只有 BEFV 和 RV。用表达的目的蛋白作为抗原,间接 ELISA 方法检测 8 份 RV 阳性血清, OD_{490} 平均值与检测 BEFV 阴性血清测得的 OD_{490} 平均值接近,说明无交叉反应,表现出良好的特异性。所以该蛋白可以作为包被抗原,建立检测 BEF 血清抗体的 ELISA 方法,开发 ELISA 试剂盒。

参考文献

[1] Walker P J. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2005,

292:57~80.

[2] Hsieh Y C, Chen SH, Chou CC, *et al.* Journal of Veterinary Medical Science, 2005, **67**(4):411~416.

[3] Yeruham I, Sharir B, Yadin H, *et al.* Veterinary Record, 2003, **152**(3):86~88.

[4] Zakrzewski H, Cybinski D H, Walker P J. Journal of Immunological Methods, 1992, **151**:287~289.

[5] Stram Y, Kuznetsova L, Levin A, *et al.* Journal of Virological Methods, 2005, **130**(1-2):1~6.

[6] Hsieh Y C, Chen S H, Chou C S, *et al.* Journal of Virological Methods, 2005, **129**(1):75~82.

[7] Hsieh Y C, Wang S Y, Lee Y F, *et al.* The Journal of Veterinary Medical Science, 2006, **68**(6):543~548.

[8] Kongsuwan K, Cybinski D H, Cooper J, *et al.* Journal of General Virology, 1998, **79**(Pt11):2573~2581.

[9] 殷震,刘景华.动物病毒学(第二版).北京:科学出版社, 1997. pp.795~799.