

毕赤酵母分泌表达 JEV prME 蛋白及其形成病毒样颗粒的免疫原性鉴定

赵鹏, 江雅, 王经满, 范浩杰, 曹瑞兵

南京农业大学 动物医学院 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095

赵鹏, 江雅, 王经满, 等. 毕赤酵母分泌表达 JEV prME 蛋白及其形成病毒样颗粒的免疫原性鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(5): 863–874.

Zhao P, Jiang Y, Wang JM, et al. Secreted expression of Japanese encephalitis virus prME in *Pichia pastoris* and immunogenicity evaluation of the virus-like particles in mice. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 863–874.

摘要: 应用毕赤酵母分泌表达日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) prME 蛋白, 鉴定其表达效果与免疫原性, 以期为 JEV 亚单位疫苗的研制奠定基础。RT-PCR 扩增 JEV SA14-14-2 株 prME 基因, 将其连接到毕赤酵母表达载体 pPICZa-A, 分别获得 pPICZa-prME 和携带 JEV Cap 蛋白 C 末端 19 个 Aa 信号肽的 pPICZa-SprME 质粒。表达载体用 *Pme* I 酶切线性化, 通过电转化转入毕赤酵母 X33 并诱导发酵培养。利用 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定酵母发酵上清中目的蛋白的表达情况。利用 GE 蛋白层析纯化柱纯化目的蛋白, 利用电镜观察纯化前后的目的蛋白, 将不同剂量纯化后的 prME 蛋白与弗氏佐剂混合以及定量纯化后的 prME 蛋白与不同剂量的核酸佐剂混合分别免疫 4 周龄小鼠, 定期采血, ELISA 检测被免小鼠血清的抗体水平, 空斑减少试验测定抗体中和效价。SDS-PAGE 结果表明毕赤酵母可以分泌表达完整的 prME 蛋白, 目的蛋白在 70–100 kDa 之间; Western blotting 结果显示分泌表达的 prME 蛋白具有良好的反应原性, 进一步证明 prME 蛋白在酵母 X33 中以整体的形式分泌表达, 没有发生水解切割。纯化目的蛋白, 根据洗脱时间和体积表明其分子量大于 1×10^6 Da, 因此推断 prME 蛋白可能形成多聚化的颗粒。电镜观察发现直径 30–50 nm 的病毒样颗粒 (Virus like particles, VLPs)。免疫试验结果表明, 纯化后的重组蛋白 10–15 μ g/只接种小鼠在 3 周后抗体达到峰值, 之后逐渐下降, 免疫 7 周后小鼠血清仍可检测到 JEV 抗体。将 prME VLPs 以 10 μ g/只的剂量与不同剂量的核酸佐剂配伍后接种小鼠, ELISA 检测结果表明核酸佐剂可明显增强 JEV prME VLPs 免疫应答, 免疫 4 周后小鼠血清的中和抗体效价为 1:80–1:160。上述结果表明毕赤酵母表达 JEV prME 虽不能发生水解切割, 但仍可形成 VLP 并诱导免疫小鼠产生较高水平中和抗体。

关键词: 日本脑炎病毒, prME 蛋白, 毕赤酵母, 病毒样颗粒, 免疫原性

Received: January 21, 2017; **Accepted:** April 5, 2017

Supported by: Special Funds for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201203082).

Corresponding author: Ruibing Cao. Tel: +86-25-84397619; E-mail: crb@njau.edu.cn

国家公益性行业科研专项 (No. 201203082) 资助。

Secreted expression of Japanese encephalitis virus prME in *Pichia pastoris* and immunogenicity evaluation of the virus-like particles in mice

Peng Zhao, Ya Jiang, Jingman Wang, Haojie Fan, and Ruibing Cao

Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: The study was to express prME protein of Japanese encephalitis virus (JEV) in *Pichia pastoris* and then to evaluate the immunological properties of the recombinant protein in mice, so as to explore a new way for subunit vaccine development of JEV. The JEV prME gene was amplified by RT-PCR with genome RNA of JEV vaccine strain SA14-14-2 and subcloned into pPICZa-A vector, designated as pPICZa-prME. pPICZa-SprME was constructed same as pPICZa-prME besides with the additional 19 Aa signal peptides coding gene of the JEV cap protein C terminal. The linearized expression vector was integrated into the genome of *Pichia pastoris* X33 under the control of the alcohol oxidase (AOX1) promoter and induced with methanol during fermentation expression. The expression of JEV prME protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting, and then it was purified by S-400 High Resolution HiPrep 16/60 Sephacry. The expressed products of *Pichia pastoris* were visualized by electron microscopy. In the immunization test, four groups of four-week old female mice were immunized subcutaneously with different doses purified JEV prME protein with complete Freund's adjuvant at a volumetric ratio of 1:1 and a control group was injected with sterile PBS. 10 µg/dose purified JEV prME protein mixing different doses nucleic acid adjuvant (Naa) was vaccinated in mice as the same mode. SDS-PAGE and Western blotting indicate that JEV prME was not cleaved between prM and E during secreted expression in *Pichia pastoris*. The purified recombinant prME was eluted in the first eluting peak which indicated that its molecular weight about 1×10^6 Da to 20×10^6 Da and may form a multimeric. Both the culture supernatant and the purified protein, examined by electron microscopy, we found to contain JEV virus like particles (VLPs) with diameters of 30–50 nm. The anti-JEV VLPs antibody titration reached peak at 3 wpi and still maintained in mice at 7 wpi inoculated with 10 µg and 15 µg prME. The strong antibody response was observed when the mice immunized with prME mixing nucleic acid adjuvant, which elicited high neutralizing antibody titer among 1:80 to 1:160. In conclusion, although JEV prME protein expressed in *Pichia pastoris* was not cleaved, which formed VLPs and showed efficient immunological properties in mice experiments.

Keywords: Japanese encephalitis virus, prME protein, *Pichia pastoris*, virus like particles, immunological properties

流行性乙型脑炎是一种由日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 经蚊虫传播引起的人畜共患病^[1]。JEV 与西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV)、登革热病毒 (Dengue virus, DENV) 同为黄病毒科黄病毒属 (Flavivirus) 成员^[2]。猪是 JEV 在自然界的重要储存宿主和扩增宿主, 病毒通常在“蚊-猪-蚊”间循环传播^[3]。

JEV 是引起母猪繁殖障碍的重要病原之一, 可引起怀孕母猪流产、死胎或木乃伊胎, 也可引起公猪睾丸急性炎症。该病在东亚、南亚等地区广泛流行, 不但对养猪业造成了重大的经济损失, 也严重威胁着人类的健康^[4]。流行性乙型脑炎的防控主要通过防蚊灭蚊和疫苗免疫。

JEV 为球形有囊膜病毒, 直径约 40 nm, 其

基因组为单股正链 RNA,长度约为 11 kb^[5]。prM 和 E 蛋白是 JEV 的两个重要的结构蛋白,各含有一个糖基化位点 (N15, N154)^[6]。prM 蛋白是未成熟病毒粒子的一部分,分子量为 18–19 kDa, prM 蛋白在未被宿主细胞弗林蛋白酶水解前,作为分子伴侣协助 E 蛋白进行正确的结构折叠、膜定位和病毒的组装。prM 被弗林蛋白酶水解为 M 蛋白后病毒才成为成熟的病毒粒子^[6-9], M 蛋白参与病毒感染过程,能够诱导机体产生中和抗体^[6, 10-12]。E 蛋白含 500 个氨基酸残基,分子量约为 53 kDa, 囊膜糖蛋白 E 是病毒粒子表面主要的结构蛋白,参与病毒复制的许多过程,包括结合受体、膜融合和病毒颗粒包装等^[7-9], E 蛋白上有中和抗原表位,可诱导免疫保护^[12]。

病毒样颗粒 (Virus like particles, VLPs) 是指由某种病毒的一个或多个结构蛋白自发组装形成的颗粒;在形态上与真正病毒粒子相同或相似,可诱导机体类似病毒感染的免疫应答;且没有病毒核酸而不能自主复制,因此具有很好的安全性^[13-15]。目前,人乳头状瘤病毒 (HPV)^[16] 和乙型肝炎病毒^[17]核衣壳蛋白 VLP 抗原疫苗已得到广泛应用,H9N2 流感病毒^[18]和 Chikungunya 病毒^[19]囊膜蛋白 VLP 抗原疫苗已经研制成功并获得商业化生产。

毕赤酵母真核表达系统,可对表达的蛋白进行加工折叠和翻译后修饰,从而使表达出的蛋白具有生物活性^[7, 20-21]。应用毕赤酵母甲醇氧化酶 (AOX1) 基因启动子,可严格调控外源蛋白的表达。Liu 等报道应用毕赤酵母成功表达出 DENV prME 蛋白,并自发组装形成 VLP,免疫小鼠可有效抵御同型 DENV 的感染致病^[21]。

本研究应用毕赤酵母表达 JEV prME 蛋白,发现该蛋白可以被分泌表达至酵母菌培养液

中,prME 没有发生切割,但仍可自发组装成病毒样颗粒,毕赤酵母表达的 JEV VLPs 免疫小鼠可诱导产生较高水平的中和抗体。本研究为下一步研制流行性乙型脑炎亚单位疫苗提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物、菌株和质粒

4 周龄 SPF ICR 小鼠购自上海西普尔必凯实验动物有限公司。大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10 株、毕赤酵母 X33、JEV SA14-14-2 株、JEV NJ2008 株、BHK 细胞由南京农业大学动物医学院农业部动物疫病诊断与免疫实验室保存。pPICZa-A 表达载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要生化试剂与酶

Trizol、PrimeScriptTM RT-PCR kit、Premixed protein marker、*rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I、*Xba* I、*Pme* I、DNA marker 均为 TaKaRa 公司产品;弗氏佐剂、核酸佐剂为 Sigma 公司产品^[22];ZeocinTM 为 Invitrogen 公司产品;鼠源 JEV E 蛋白单克隆抗体 4H1 为本实验室自制;鼠源 JEV prM 单克隆抗体 HZ 由华中农业大学提供;山羊抗小鼠-IgG-HRP 购自优宁维公司;NC 膜、滤纸购自 Promega 公司;SDS、Tris-HCl、30% 丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R-250、TEMED、过硫酸胺、酵母粉、蛋白胨、生物素、酵母氮源培养基、葡萄糖等常用试剂均购自上海生工生物工程有限公司;引物合成、基因测序由上海华大基因有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 JEV prME 基因的克隆与鉴定

用 Trizol 提取 JEV 疫苗株 SA14-14-2 RNA,

按照 Prime-ScriptTM RT-PCR kit 的说明,将 RNA 反转录为 cDNA。根据 GenBank 公布的 SA14-4-2 strain (GenBank Accession No. JN604986) 序列,应用 DNASTAR (Version 4.0) 及 Primer (Version 5.0) 基因分析软件,设计扩增 JEV *prME* 基因引物序列 JE1、JE2 及扩增不含 Cap C 端信号肽的 JEV *prME* 基因引物序列 JE3、JE4 (表 1)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系: *rTaq* DNA 扩增酶 25 μ L,上下游引物各 1.0 μ L, cDNA 为 3.0 μ L,加 ddH₂O 至总体积为 50 μ L。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 结束后,反应产物于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测,观察并记录结果。对扩增产物进行胶回收,并对回收结果进行凝胶检测。

1.2.2 JEV *prME* 酵母表达载体的构建

将胶回收的 PCR 扩增产物 JEV *prME* 基因与 pPICZa-A 质粒用 *Eco*R I、*Xba* I 进行双酶切,将酶切后的 *prME* 基因片段用 T4 DNA 连接酶连接到 pPICZa-A 载体上,再将连接产物转化进大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,挑取单菌落进行重组质粒提取,经双酶切鉴定正确后送上海华大基因有限公司测序。含有编码 *prM* 蛋白前 19 个氨

基酸信号肽的重组质粒命名为 pPICZa-SprME,不含 Cap C 端信号肽基因的重组质粒命名为 pPICZa-prME。

1.2.3 导入 JEV *prME* 基因的毕赤酵母 X33 菌株阳性克隆筛选鉴定

将重组质粒 pPICZa-SprME 和 pPICZa-prME 用 *Pme* I 酶线性化后,回收线性化质粒,采用电转化方法导入到毕赤酵母菌 X-33 中,将质粒与酵母感受态混合放于 0.2 cm 电击杯中 (BIO-RAD),电转条件为 1.5 kV, 5 ms, 25 F, 200 Ω 。将电转化之后的转化菌在酵母培养箱 30 $^{\circ}$ C 静置 3 h 后,涂布于 YPD (1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖, 2% 琼脂粉, 添加 ZeocinTM 100 μ g/mL) 平板,倒置,酵母培养箱 30 $^{\circ}$ C 静置培养 3-5 d。挑取单菌于 YPD 培养液中,加入 1‰ (V/V) Zeocin, 30 $^{\circ}$ C 培养 16-18 h,通过煮-冻-煮的方法提取毕赤酵母 X33 基因组,以基因组 DNA 为模板,应用引物 AOX1F 和 AOX1R 进行 PCR 鉴定,引物序列见表 1,PCR 步骤同 1.2.1。接菌环蘸取阳性菌液在含 200 μ g/mL ZeocinTM YPD 固体培养基划线, 30 $^{\circ}$ C 培养 3-5 d,获得基因阳性重组酵母菌。

1.2.4 JEV *prME* 重组蛋白的诱导表达

用灭菌牙签挑取 Zeocin 抗性 YPD 平板上生长的单菌落,接种于 5 mL 的 BMGY (1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 100 μ mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0), 1.34% 酵母氮源培养基, 4 \times 10⁻⁵% 生物素, 1% 甘油) 液体培养基中,在 50 mL 体积锥形瓶中进行激活培养,瓶口覆盖两层纱布, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡 16-20 h,至 OD₆₀₀ 值约为 2-6,此时酵母菌处于对数生长期。收集菌液, 5 000 r/min 室温离心 5 min,收集沉淀,重悬于 1 mL 的 BMMY (与 BMGY 的区别是不含 1% 甘油,而含有 1% 甲醇) 中,转入 50 mL BMMY 液体培养基中,继

表 1 PCR 所需引物序列

Table 1 Primers for PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
JE1	CGAGAATTCGAAGGCTCAATCATGTGGC
JE2	CTGTCTAGATTAAGCATGCACATTGGTTCGC
JE3	CGCGAATTCATGAAGTTGTCTGAATTTCCAGG
JE4	CTGTCTAGATTAAGCATGCACATTGGTTCGC
AOX1F	GACTGGTTCGAATTCGACAAAGC
AOX1R	GCAAATGGCATCTCTGACATCC

续在 250 mL 体积锥形瓶中振荡培养。每间隔 24 h 加入 250 μ L 100% 甲醇, 进行诱导培养。试验同时设转化空载体 pPICZa-A 的酵母菌株为阴性对照。培养至 96 h 收集样品, 室温 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.5 酵母分泌表达的 JEV prME 蛋白的层析纯化与鉴定

将离心收集的酵母表达上清用 0.22 μ m 无菌滤器过滤, 收集滤液, 用蛋白浓缩柱 (Biomax100, Millipore, Bedford, USA) 浓缩滤液, 3 500 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 25 min。取浓缩液 2 mL, 用蛋白纯化层析柱 HiPrep 16/60 Sephacry (S-400 High Resolution, GE) 纯化, 流速为 15 cm/h, 定时分管收集流出液, 每管 3 mL, 记录对应吸收峰, 再将收集的蛋白纯化液使用蛋白浓缩柱浓缩, SDS-PAGE 鉴定各层析组分。

通过 Western blotting 检验纯化后的重组目的蛋白, 阴性对照为转化的空载体 pPICZa-A 酵母菌表达上清。SDS-PAGE 后 0.33 A 恒流转膜 3 h。用 5% 脱脂奶粉常温封闭 1.5 h, PBST 漂洗 3 次后, 分别加入 1:1 000 稀释的抗 JEV prME 蛋白的鼠源一抗, 室温孵育 2 h; PBST 漂洗 3 次后, 加入 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (二抗), 室温孵育 1.5 h, PBST 漂洗 3 次后用 Western blotting 发光液和曝光机 (均购自南京 Tanon 公司), 观察目的条带并记录结果。

将毕赤酵母表达的 JEV prME 蛋白上清和纯化浓缩上清在 HITACHI-7650 透射电镜下观察并记录结果。使用 BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪 (德国, Eppendorf) 测定纯化浓缩后的 prME 蛋白浓度。

1.2.6 动物免疫实验

为了分析酵母分泌表达 JEV prME 蛋白的免疫原性, 开展了 2 次小鼠免疫实验。

第一次试验将 25 只 4 周龄雌性 ICR 小鼠分成 5 组, 其中 4 组接种不同剂量 (2.5 μ g、5.0 μ g、10.0 μ g 和 15.0 μ g/小鼠) 纯化后的重组 prME 蛋白, 免疫前抗原与弗氏完全佐剂 (Sigma 公司) 以 1:1 的体积混合, 腹腔和背部皮下多位点免疫小鼠。阴性对照组小鼠接种 200 μ L PBS。

第二次动物试验将 25 只 4 周龄雌性 ICR 小鼠分成 5 组, 其中 4 组分别接种纯化后的重组 prME 蛋白 10.0 μ g, 免疫前与不同剂量的核酸佐剂 (Sigma 公司) (0 μ L、1 μ L、5 μ L、15 μ L/小鼠) 配伍, 核酸佐剂的浓度为 50 mg/mL, 腹腔和背部皮下多位点免疫小鼠。阴性对照组小鼠接种 200 μ L PBS。

定期收集小鼠血液, 将血液样品收集到无菌血液收集管中并使其在室温下凝结 2 h, 4 $^{\circ}$ C、4 500 r/min 离心 15 min。采集的血清在 -20 $^{\circ}$ C 下储存, 用于后期 ELISA 检测抗体及测定中和效价。

1.2.7 ELISA 检测小鼠血清样品中 JEV 特异性抗体

应用本实验室建立的 JEV 抗体检测 ELISA, 主要步骤为用纯化的 JEV ED3 蛋白作为检测抗原包被板条, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 将 ELISA 板条用封闭缓冲液 (PBS 加 2% BSA) 封闭, 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 h, 然后用 PBST 洗涤 3 次; 加入 1:100 稀释的小鼠血清样品, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1.5 h; 洗涤 3 次, 加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1.5 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 用 TMB 和磷酸盐缓冲液制备显色液, 依次加入到每个孔中, 37 $^{\circ}$ C 下作用 10 min, 终止显色, 读取 OD_{450} 数值。

1.2.8 微量空斑减少试验测定小鼠血清样品中 JEV 特异性中和抗体水平

将 56 °C 灭活的血清样品 10 倍稀释后再进行倍比稀释, 与 50 PFU/0.25mL 的 JEV NJ2008 株混合后温育, 37 °C 作用 1.5 h, 分别加入到长满 BHK 单层细胞的 24 孔板中, 37 °C 孵育 1.5 h 后弃去混合液, 然后加入 0.8 mL 1:1 体积的 1% 琼脂糖和 2×DMEM (含有 4% FBS 和 2% 双抗), 37 °C CO₂ 培养箱中孵育, 每天观察 1 次; 3-4 d 后出现空斑, 在 24 孔板中加入结晶紫染色液并在室温下静置 12 h 固定。然后小心地弃去琼脂糖单层覆盖层, 观察并记录结果。中和抗体效价计算方法为抑制 50% 或更多的噬斑形成的最高小鼠血清稀释倍数的倒数。

2 结果与分析

2.1 JEV prME 酵母表达载体双酶切鉴定及转化酵母阳性克隆的筛选

以 JEV SA-14-14-2 株 RNA 为模板 RT-PCR 扩增得到大小约为 2 kb 的 JEV *prME* 基因克隆到 pPICZa-A 载体中, 将构建的表达 JEV *prME* 蛋白的载体 pPICZa-SprME 和 pPICZa-prME 分

别用 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切鉴定 (图 1A), 表明成功构建表达载体。应用 AOX1 检测引物 PCR 扩增鉴定经电转化后长出的毕赤酵母菌 X33 单菌落, PCR 结果约为 2 400 bp, 与理论值相符 (图 1B), 表明获得 JEV *prME* 基因转化阳性毕赤酵母菌株。

2.2 JEV prME 基因转化阳性毕赤酵母菌株的诱导表达鉴定

将收获的 JEV *prME* 基因转化阳性毕赤酵母菌发酵液离心取上清, 过滤后 4 °C 保存备用。SDS-PAGE 鉴定基因转化阳性毕赤酵母菌表达产物, 结果表明 pPICZa-prME/X33 和 pPICZa-SprME/X33 表达上清比 pPICZa-A/X33 表达上清均有一条增加的条带, 分子量介于 70-100 kDa 之间 (图 2)。JEV *prME* 蛋白的理论大小为 72 kDa, 与表达产物分子量相近, 表明毕赤酵母表达 *prME* 蛋白没有发生酶解切割。多次发酵比对发现 pPICZa-SprME/X33 表达上清中目的蛋白的含量明显高于 pPICZa-prME/X33, 因此尽管 pPICZa-A 表达载体带有信号肽编码基因, JEV *Cap* 末端 19 个 Aa 的信号肽序列促进了 *prME* 蛋白的分泌表达。

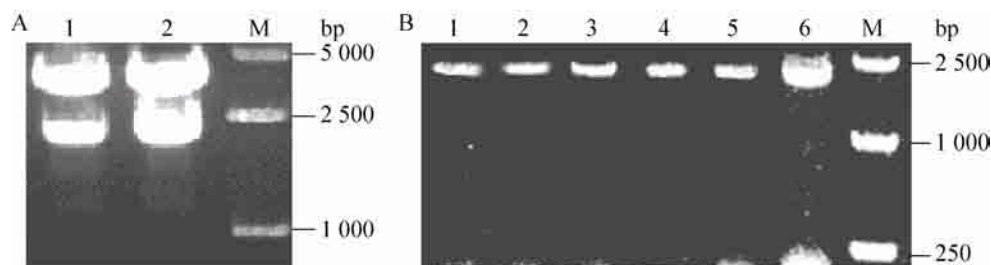


图 1 JEV *prME* 酵母表达载体双酶切及转化毕赤酵母菌鉴定

Fig. 1 Identification of JEV *prME* expression vector and the positive *Pichia pastoris*. M: DNA molecular marker. (A) Digestion of JEV *prME* expression vector. 1: pPICZa-prME digested with *EcoR* I and *Xba* I; 2: pPICZa-SprME digested with *EcoR* I and *Xba* I. (B) Identification of *prME* gene in yeast by PCR. 1-3: PCR products of pPICZa-prME/X33; 4-6: PCR products of pPICZa-SprME/X33.

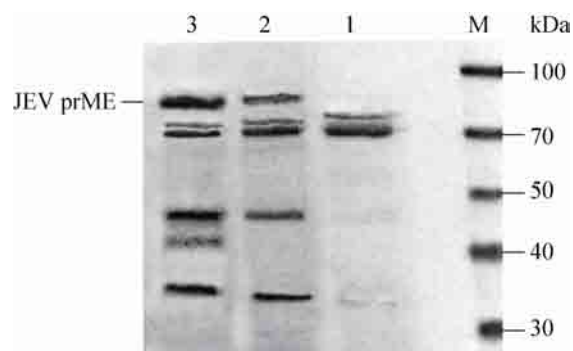


图 2 酵母表达重组蛋白分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of *Pichia pastoris* expressed recombinant protein. M: protein molecular marker; 1: pPICZa-A/X33 expression supernatant; 2: pPICZa-prME/X33 expression supernatant; 3: pPICZa-SprME/X33 expression supernatant.

为了进一步鉴定酵母表达产物的特异性，分别应用 JEV E 蛋白单克隆抗体 4H1 和 prM 蛋白单克隆抗体 HZ 对表达产物进行免疫印迹鉴定 (图 3)。阳性对照 JEV NJ2008 株 BHK 细胞毒分别在 53 kDa 和 20 kDa 位置出现特异条带，而酵母表达产物均在 72 kDa 附近出现特异条带，进一步表明毕赤酵母表达蛋白没有发生酶解切割。

2.3 毕赤酵母分泌表达 JEV prME 蛋白的层析纯化与鉴定

根据 SDS-PAGE 鉴定结果发现，pPICZa-SprME/X33 表达的目的蛋白含量明显高于 pPICZa-prME/X33，所以后期选取 pPICZa-SprME/X33 表达上清用于目的蛋白的纯化和动物免疫试验。将 pPICZa-SprME/X33 表达上清用 100 kDa 规格蛋白浓缩柱离心、浓缩 5 倍。将浓缩的酵母表达产物用 S-400 High Resolution HiPrep 16/60 Sephacry 层析柱纯化 (图 4A)，收集各吸收峰的层析产物，SDS-PAGE 鉴定纯化产物 (图 4B)，发现表达产物主要存在于第

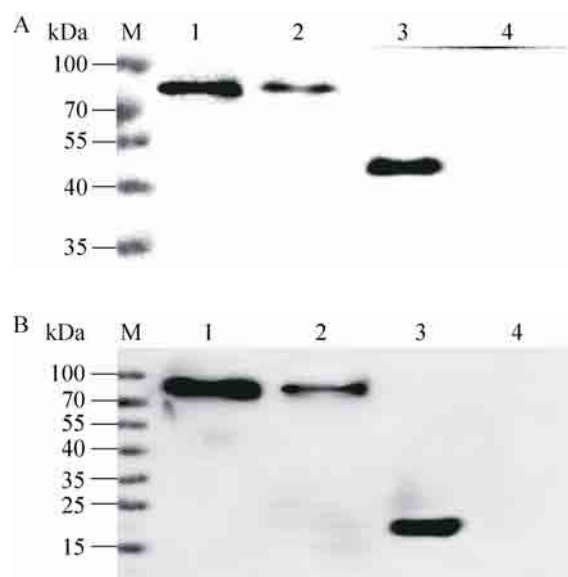


图 3 Western blotting 鉴定酵母表达重组蛋白

Fig. 3 Western blotting analysis of *Pichia pastoris* expressed recombinant protein. M: protein molecular marker. (A) JEV envelope protein specific mAb 4H1 as the detection antibody. 1: pPICZa-SprME/X33 expression supernatant; 2: pPICZa-prME/X33 expression supernatant; 3: BHK cell supernatant infected with JEV NJ2008; 4: pPICZa-A/X33 expression supernatant. (B) JEV prM protein specific mAb HZ as the detection antibody. 1: pPICZa-SprME/X33 expression supernatant; 2: pPICZa-prME/X33 expression supernatant; 3: BHK cell supernatant infected with JEV NJ2008; 4: pPICZa-A/X33 expression supernatant.

一流出峰，该流出峰对应的层析产物大小理论值为 $1 \times 10^6 - 20 \times 10^6$ Da，远大于 prME 单体的分子量 72 kDa，表明酵母表达的 JEV prME 蛋白可自发组装成多聚体。

BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪测纯化浓缩后的 JEV prME 蛋白浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，由于该浓度为样品浓缩后所得，根据浓缩倍数推算，最初 pPICZa-SprME/X33 表达的目的蛋白浓度约为 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

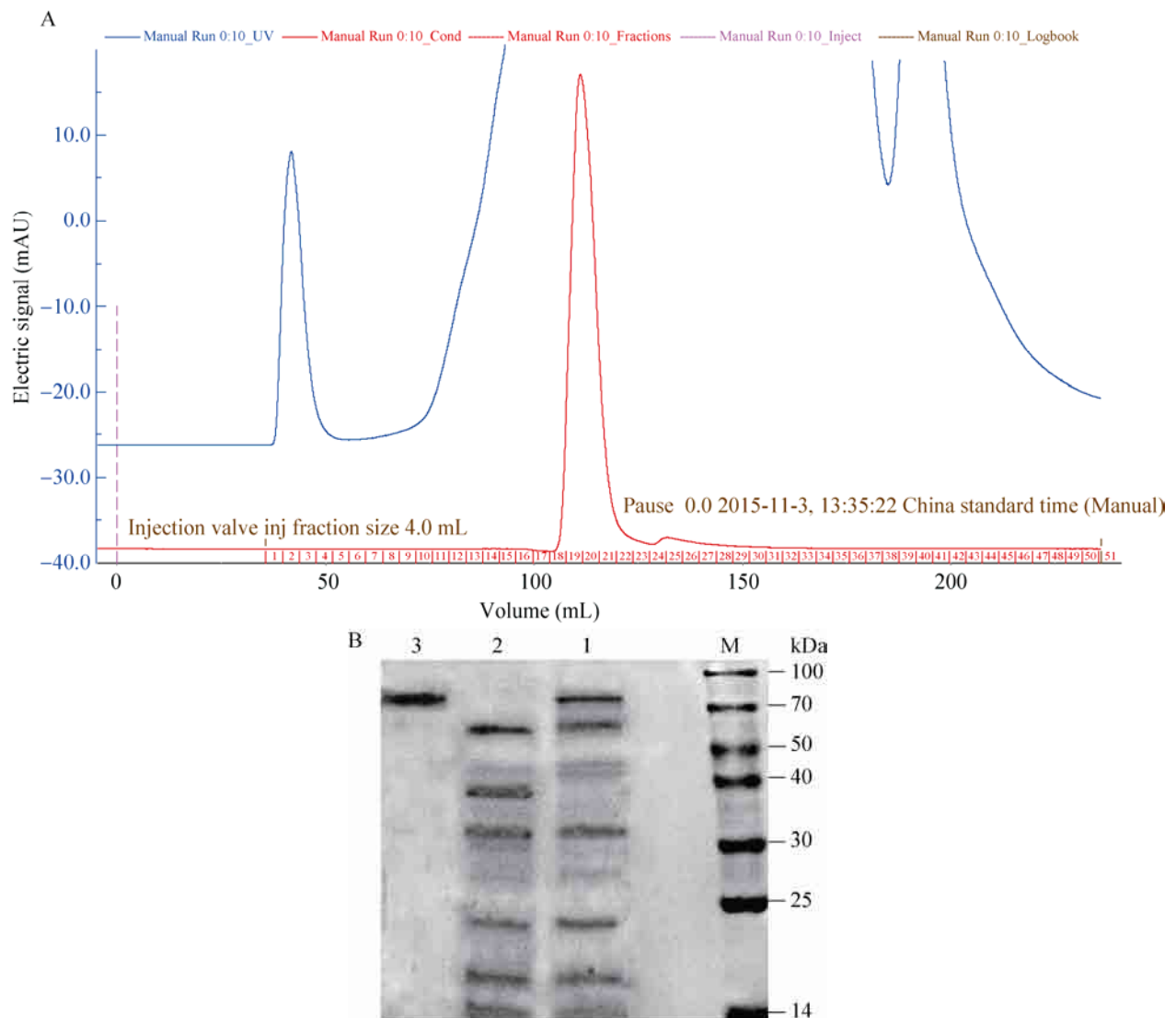


图 4 层析纯化 JEV prME 表达产物的鉴定

Fig. 4 Analysis *Pichia pastoris* expressed products by chromatography. M: protein molecular marker. (A) The peak map of chromatography elution peak. (B) SDS-PAGE analysis of the protein in elution peak. 1: pPICZa-SprME/X33 expression supernatant; 2: sample of the second elution peak; 3: sample of the first elution peak.

2.4 毕赤酵母分泌表达 JEV prME 蛋白透射电镜观察结果

毕赤酵母表达上清液直接负染后电镜观察, 可看到直径在 30–50 nm 之间的病毒样颗粒 (图 5A), 纯化浓缩后的表达产物在透射电镜下观察, 可看到较多蛋白颗粒 (图 5B)。因此, 尽

管毕赤酵母 X33 分泌表达的 prME 蛋白没有发生类似哺乳动物细胞表达体系中的 pr-M-E 之间的酶解切割, 仍可自发组装成病毒样颗粒。

2.5 毕赤酵母表达 prME VLPs 免疫小鼠的抗体应答特征

将不同剂量纯化后的毕赤酵母表达的 prME

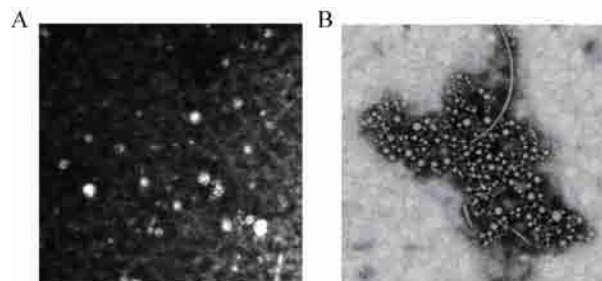


图 5 透射电镜观察毕赤酵母分泌表达 JEV prME 蛋白
Fig. 5 Identification of *Pichia pastoris* expressed JEV prME protein by transmission electron microscopy (TEM). (A) pPICZa-SprME/X33 expression supernatant. (B) Purified and concentrated *Pichia pastoris* expressed JEV prME protein.

VLPs 与弗氏完全佐剂等体积混合后单次免疫 4 周龄 ICR 小鼠, ELISA 检测采集血清中 JEV 特异性抗体水平。结果表明 (图 6A), prME VLPs 诱导抗体产生具有抗原剂量相关性; 10–15 $\mu\text{g}/\text{只}$ 接种小鼠在 1 wpi 即可发现 JEV 抗体转阳, 3 wpi 达到高峰, 随后抗体水平逐渐下降, 但在 7 wpi 仍为 JEV 抗体阳性; 2.5–5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 接种小鼠产生的抗体应答不显著, 没有出现高峰。为了探讨核酸免疫佐剂对酵母表达 prME VLPs 免疫小鼠效果的影响, 将纯化后的 prME VLPs 以 10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量与不同体积的核酸佐剂配伍后免疫小鼠, ELISA 检测结果表明核酸佐剂可明显增强小鼠对 prME VLPs 免疫应答 (图 6B)。为了分析 prME VLPs 免疫小鼠是否诱导 JEV 中和抗体, 选取接种剂量为 prME 10 $\mu\text{g}+15 \mu\text{L}$ 小鼠 4 wpi 血清, 通过微量空斑减少试验检测 JEV 中和抗体水平, 结果显示免疫 4 周后小鼠血清的 JEV 中和抗体效价为 1:80–1:160 (图 6C), 表明毕赤酵母表达的 prME VLPs 可有效诱导 JEV 中和抗体的产生。

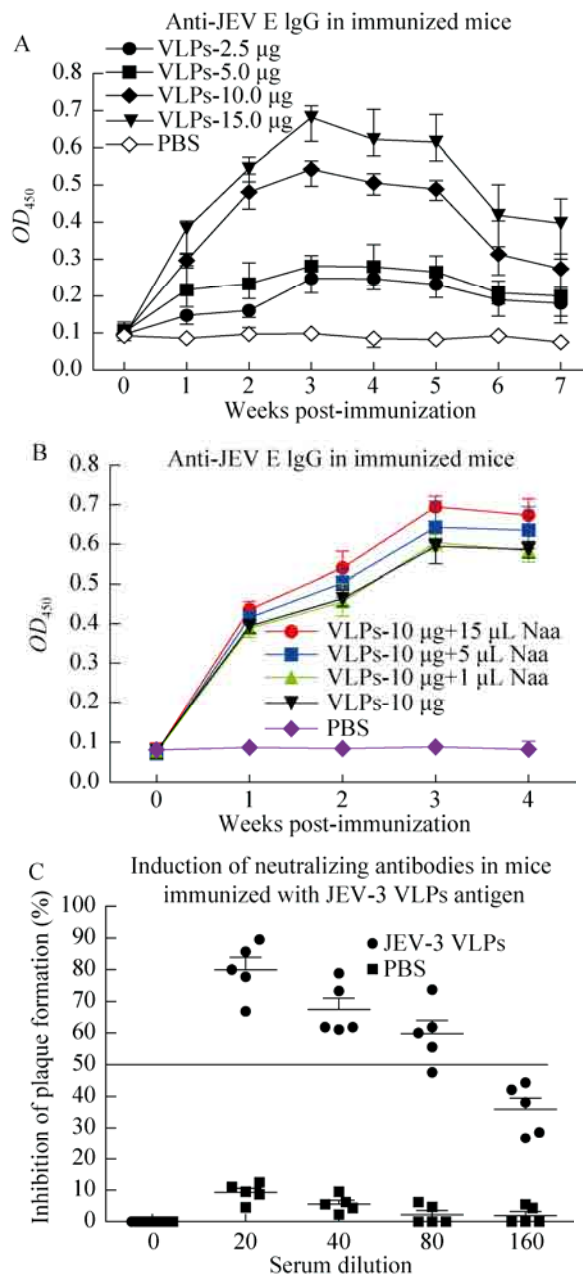


图 6 酵母表达 JEV prME 蛋白小鼠免疫试验结果
Fig. 6 Immunological properties of *Pichia pastoris* expressed JEV prME protein in mice. (A) JEV specific antibody kinetics in the immunized mice was detected by ELISA. (B) Mice immunized with JEV VLPs mixing different doses of nucleic acid adjuvant (Naa). (C) The neutralizing antibody titer in the inoculated mouse serum at 4 wpi.

3 讨论

本研究实现了 JEV prME 蛋白在毕赤酵母 X33 中的分泌表达, 纯化浓缩后的目的蛋白含量约为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。尽管毕赤酵母分泌表达的 JEV prME 蛋白没有发生类似哺乳动物细胞中表达产物 prM 与 E 之间的酶解切割, 但 JEV prME 蛋白在毕赤酵母分泌表达过程中仍可自发组装成病毒样颗粒。酵母分泌表达的 JEV prME VLPs 诱导免疫小鼠产生了较高水平的 JEV 特异性中和抗体。从而为研制新型的流行性乙型脑炎亚单位疫苗提供新的思路。

JEV 在翻译过程中首先产生多聚蛋白, 然后被病毒编码的 NS3 蛋白酶和宿主细胞弗林蛋白酶等切割为 C、prM 和 E 共 3 个结构蛋白以及 NS1 等 7 种非结构蛋白^[10]。prM 和 E 被宿主细胞弗林蛋白酶切割后, 共同组装成病毒的囊膜, 在病毒的成熟过程中 pr 被进一步酶解^[11-12]。本研究发现酵母分泌表达 JEV prME 重组蛋白过程中 prM 与 E 不能被有效水解切割, 可能是因为毕赤酵母不表达弗林蛋白酶。但这并没有影响 prME 蛋白在酵母菌内的折叠组装, 在电镜下观察到毕赤酵母 X33 表达上清及纯化后的目的蛋白均存在直径为 30–50 nm 的病毒样颗粒, 表明 prME 重组蛋白在毕赤酵母 X33 中可自发组装成 VLPs。

研究还发现, 与 pPICZa-prME/X33 相比, pPICZa-SprME/X33 分泌表达 prME 蛋白的产量显著提高。因此, 尽管 pPICZa-A 表达载体带有醇氧化酶的信号肽编码基因, JEV Cap 末端 19 个 aa 的信号肽序列促进了 prME 蛋白的分泌表达, 可能与 JEV prM 蛋白自身信号肽促进 prME 蛋白早期正确折叠有关。

本研究中毕赤酵母 X33 分泌表达 JEV prME

蛋白纯化浓缩后浓度约为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最初的表达量不够理想, 还不能满足规模发酵生产的要求。接下来的研究中, 我们将通过 Zeacin 抗性筛选含多拷贝目的基因的酵母菌株、信号肽的优化、表达基因密码子毕赤酵母嗜性改造等多个途径进一步探究如何提高 JEV prME 蛋白的表达量^[19, 23-24]。此外, 我们设想用毕赤酵母 X33 共表达弗林蛋白酶和 JEV prME 蛋白, 使 prME 蛋白能有效地被水解成 M 和 E 蛋白, 进而使 prM 与 E 蛋白组装形成 VLP, 在结构和形态上与天然病毒颗粒更相似。

将毕赤酵母表达的 prME VLPs 单次免疫小鼠后, ELISA 检测结果表明小鼠在接种 1 周后即出现 JEV 特异性抗体明显转阳, 并逐渐上升, 3 wpi 达到高峰, 并维持抗体阳性较长时间, 并且被免小鼠血清抗体具有中和 JEV 活性。该结果表明毕赤酵母分泌表达的 JEV prME VLPs 具有与天然病毒相似的免疫原性, 与文献报道的酵母表达 DENV、Chikungunya VLPs 免疫效果相似^[22, 25-26]。此外, 毕赤酵母表达的 JEV prME VLPs 具有快速诱导机体产生抗体的特性, 在应用于紧急免疫接种的情况下更有优势。

本研究还鉴定了核酸佐剂配伍 JEV prME VLPs 免疫小鼠的效果, 结果表明, 核酸佐剂有很好的免疫增强功能, 可诱导小鼠产生更强的免疫应答。VLPs 是纯蛋白抗原, 不能有效刺激细胞模式识别受体、激发先天性免疫应答, 核酸佐剂的配伍可弥补其中不足。后继的试验将具体研究被免小鼠细胞免疫应答效果。

综上所述, 本研究发现毕赤酵母表达 JEV prME 蛋白虽不能发生水解切割, 但仍可形成 VLPs 并诱导免疫小鼠产生较高水平中和抗体, 从而为今后研制 JEV 亚单位疫苗抗原提供新思路。

REFERENCES

- [1] van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu Rev Entomol*, 2009, 54(1): 17–35.
- [2] Tsai WY, Hsieh SC, Lai CY, et al. C-terminal helical domains of dengue virus type 4 E protein affect the expression/stability of prM protein and conformation of prM and E proteins. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52600.
- [3] Halstead SB, Jacobson J. Japanese encephalitis. *Adv Virus Res*, 2003, 61: 103–138.
- [4] Shahana PV, Das D, Gontu A, et al. Efficient production of Tymovirus like particles displaying immunodominant epitopes of Japanese encephalitis virus envelope protein. *Protein Expr Purif*, 2015, 113: 35–43.
- [5] Hua RH, Li YN, Chen ZS, et al. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 62.
- [6] Konishi E, Pincus S, Paoletti E, et al. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology*, 1992, 188(2): 714–720.
- [7] Kwon WT, Lee WS, Park PJ, et al. Protective immunity of *Pichia pastoris*-expressed recombinant envelope protein of Japanese encephalitis virus. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(11): 1580–1587.
- [8] Keelapang P, Sriburi R, Supasa S, et al. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol*, 2004, 78(5): 2367–2381.
- [9] Pugachev KV, Guirakhoo F, Mitchell F, et al. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 71(5): 639–645.
- [10] Sato T, Takamura C, Yasuda A, et al. High-level expression of the Japanese encephalitis virus E protein by recombinant vaccinia virus and enhancement of its extracellular release by the NS3 gene product. *Virology*, 1993, 192(2): 483–490.
- [11] Kim JM, Yun SI, Song BH, et al. A single N-linked glycosylation site in the Japanese encephalitis virus prM protein is critical for cell type-specific prM protein biogenesis, virus particle release, and pathogenicity in mice. *J Virol*, 2008, 82(16): 7846–7862.
- [12] Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol*, 1993, 67(3): 1672–1675.
- [13] Garcea RL, Gissmann L. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(6): 513–517.
- [14] Chackerian B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 2007, 6(3): 381–390.
- [15] Wispelaere MD, Ricklin M, Souque P, et al. A lentiviral vector expressing Japanese encephalitis virus-like particles elicits broad neutralizing antibody response in pigs. *Plos Neglect Trop D*, 2015, 9(10): e0004081.
- [16] Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*, 2002, 347(21): 1645–1651.
- [17] Scolnick EM, McLean AA, West DJ, et al. Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *JAMA*, 1984, 251(21): 2812–2815.
- [18] Pushko P, Tumpey TM, Bu F, et al. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine*, 2005, 23(50): 5751–5759.
- [19] Kramer RM, Zeng YH, Sahni N, et al. Development of a stable virus-like particle vaccine formulation against Chikungunya virus and investigation of the effects of polyanions. *J Pharm Sci*, 2013, 102(12): 4305–4314.
- [20] Pattenden LK, Middelberg APJ, Niebert M, et al.

- Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(10): 523–529.
- [21] Liu WQ, Jiang HN, Zhou JM, et al. Recombinant dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties. *Virus Genes*, 2010, 40(1): 53–59.
- [22] Saraswat S, Athmaram TN, Parida M, et al. Expression and characterization of yeast derived Chikungunya virus like particles (CHIK-VLPs) and its evaluation as a potential vaccine candidate. *PLoS Neglect Trop D*, 2016, 10(7): e0004782.
- [23] Purdy DE, Chang GJ. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. *Virology*, 2005, 333(2): 239–250.
- [24] Sugrue RJ, Cui TA, Xu QR, et al. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J Virol Methods*, 1997, 69(1/2): 159–169.
- [25] Wei HY, Jiang LF, Xue YH, et al. Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. *J Virol Methods*, 2003, 109(1): 17–23.
- [26] Guzmán MG, Rodríguez R, Rodríguez R, et al. Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69(2): 129–134.

(本文责编 郝丽芳)