

表达 TGEV S 基因 AD 片段的重组 乳酸杆菌的构建及免疫研究

黄海楠¹ 黄海鸥² 杨金生¹ 程荣华¹ 刘云志¹ 任锐¹ 姚新华^{1*}

1. 吉林省畜牧兽医科学研究所, 长春 130062; 2. 吉林省长春市动物检疫站, 长春 130062

摘要 为构建表达 TGEV S 基因 AD 片段的重组乳酸杆菌, 根据猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)S 蛋白的抗原决定簇 AD 片段的基因序列, 设计引物, PCR 扩增该片段, 测序正确后利用穿梭质粒整合进益生乳酸菌中表达。结果显示, 经过酶切、PCR 和 PAGE 电泳鉴定重组的 *rS-AD* 基因在乳酸菌中得到了表达。所以, 获得了表达 TGEV S 基因 AD 片段的重组乳酸杆菌。

关键词 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV); 抗原片段; 乳酸菌

猪感染了传染性胃肠炎病毒(TGEV)后引起的严重腹泻、呕吐和脱水并且高度接触性传染的传染病就是猪传染性胃肠炎。1946 年 DOYLE 和 HUTCHINGS 在美国首次报导发现了该病。日本和英国先后在 1956 年和 1957 年报导发现了该病, 现在猪传染性胃肠炎已经成为一种世界性的猪疫病^[1-3]。我国从 60 年代起就曾报导有猪传染性胃肠炎的发生, 近些年来该病更有进一步扩大流行的趋势。该病常在冬季和早春等寒冷季节的某些区域呈地方性暴发流行, 给养猪业带来极大的危害^[4]。

猪传染性胃肠炎病毒的结构蛋白有 4 种。其中纤突糖蛋白(S)是主要的免疫蛋白, 是唯一能够诱导机体产生中和抗体, 给宿主提供免疫保护的结构蛋白, 它携带主要的 B 淋巴细胞抗原决定簇, 并在决定宿主细胞的亲嗜性、细胞融合、致病性和血凝作用等方面起重要作用^[5]。TGEV 的纤突糖蛋白有 4 个抗原位点分别是 A、B、C、D, 不同毒株之间 A 和 D 抗原位点高度保守, 在诱导中和抗体过程中起主要作用。A 或 D 抗原位点的缺失可导致纤突糖蛋白丧失产生中和抗体的能力。

由于 AD 位点对于 TGEV 产生中和抗体的重要性, 因此我们利用分离到的毒株研制以乳酸杆菌为

载体表达 TGEV S 基因 AD 抗原片段的基因工程口服疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 毒株、细胞和菌株。病毒 TGEV 为本实验室分离并保存在 -80 ℃。猪肾传代细胞 IBRS2 购自武汉中国典型培养物保藏中心。冻干的乳酸菌由本实验室分离并保存在 -80 ℃(付殿国研究员赠予)。JM109 感受态细胞购自北京全氏金生物技术有限公司。

2) 试剂。犊牛血清、胰酶、MEM 培养基、谷氨酰胺、细胞培养瓶、DEPC 水均购自北京鼎国生物公司。Trizol 试剂购自 GIBCO 公司。Ex TaqDNA 聚合酶、dNTP (2.5 mmol/L 与 10 mmol/L)、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、pMD18T 载体、DL 2000 和 DL 15000 Marker 为 TakaRa 宝生物工程(大连)公司产品; RT-PCR 试剂盒; DNA 凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit) 均购自 TIANGEN BIOTECH 公司。琼脂糖、溴化乙锭(EB)均购自 AMRESCO 公司。

在大肠杆菌与乳酸菌中都能表达的穿梭载体 pMG36e 是由本实验室保存。红霉素为 Sigma 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20140101030JC)

* 通讯作者

黄海楠, 女, 1981 年生, 博士, 副研究员。

3) 仪器。SANYO MC0165 型 CO₂ 培养箱; k5062184 电转化仪; HYBAID HBSP05220 型 PCR 仪; DYY-8B 型稳压电泳仪; KZL-1 型可见紫外检测仪; EPPENDORF MINISPIN 个人微型高速离心机; HH-2 型电热恒温水浴锅。

1.2 含有 TGEV 的 S 蛋白的抗原片段的重组质粒的制备

根据猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) S 蛋白的抗原决定簇 AD 片段的基因序列, 利用 Primer5.0 软件设计一对 PCR 引物 S1、S2, 前后分别添加了 *ScaI* 和 *SphI* 两个酶切位点。PCR 用引物均是 PAGE 级, 由 TaKaRa 宝生物工程(大连)公司合成。

S1: (*ScaI*)5'GGGCAGTACTATGACTCTTGAAA TTTTCATGTTAT 3'

S2: (*SphI*)5'CGGGCATGCTTTTATAACAGCTG TGGCATCTAA 3'

1) 质粒 pMD18T-S-AD 的制备。

①提取 RNA: 将猪传染性胃肠炎病毒以 1MOI 的剂量接种长满单层的 IBRS2 细胞, 待 90% 的细胞出现病变后, 收集病变的细胞。用 GIBCO 公司的 Trizol 试剂按试剂使用说明操作提取总 RNA。所有离心管和枪头都用 DEPC 水处理过, 保证确实没有 RNA 酶。

②反转录和 PCR 扩增: 扩增片段全长共 733 bp, 位置位于 S 蛋白的 1 102 ~ 1 812 bp, 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 90 s, 65 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共进行 30 个反应循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。反应结束后电泳 (1% 琼脂糖凝胶)。电泳大小正确的 PCR 产物, 按 DNA 回收试剂盒说明书操作回收 PCR 产物。

③连接和转化: 将回收的 PCR 产物连接到 T 载体将连接产物 10 μL 加入至 100 μL JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 min。42 °C 水浴 90 s 后, 再在冰中放置 5 min。加入 700 μL 无抗性 LB 培养基, 37 °C 220 r/min 振荡培养 60 min。3 000 r/min 离心 5 min, 留 100 μL 上清混匀后涂布于 LB 琼脂平板上 (红霉素抗性 100 μg/mL), 37 °C 培养过夜。

④质粒的获得: 小量提取重组质粒 DNA, 电泳鉴定, 剩余置 -20 °C 保存。

a. 酶切鉴定: 分别用双酶切和单酶切鉴定质粒 (双酶切 37 °C 4 h、单酶切 37 °C 2 h)

pMG36e-S-AD	5 μL
<i>ScaI</i>	1 μL
<i>SphI</i>	1 μL
10 × H Buffer	2 μL
ddH ₂ O	11 μL
总计	20 μL
pMG36e-S-AD	5 μL
<i>ScaI</i> / <i>SphI</i>	1 μL
10 × H Buffer	2 μL
ddH ₂ O	12 μL
总计	20 μL

反应结束后, 电泳鉴定, 对鉴定为阳性的质粒进行 PCR 鉴定。

b. PCR 鉴定: 在合成的 S-AD 片段两端设计鉴定引物, 以重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 合成片段长度约 710 bp, 反应体系如下:

J1: 5' ACTCTTGAAATTTTCATGTTATAC 3'

J2: 5' TTTTATAACAGCTGTGGCATCTA 3'

反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 90 s, 50 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共设 30 个反应循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。反应结束后电泳。

⑤测序: 将鉴定正确的质粒在 Takara 公司测序。

2) 重组质粒 pMG36e-S-AD 的制备。

①酶切。37 °C 双酶切 4 h 后电泳, 按 DNA 回收试剂盒说明书操作回收目的基因片段 S-AD 片段和载体 pMG36e。

pMD18T-S-AD/pMG36e	5 μL
<i>ScaI</i>	1 μL
<i>SphI</i>	1 μL
10 × H Buffer	2 μL
ddH ₂ O	11 μL
总计	20 μL

②连接与转化。

将纯化回收的 S-AD 和 pMG36e 进行连接, 冰上操作, 16 °C 过夜。反应体系如下:

S-AD	15 μL
pMG36e	2 μL
T4 DNA 连接酶	1 μL
T4 DNA 连接 Buffer	2 μL
总计	20 μL

③重组质粒的鉴定。

a. 重组质粒 DNA 的小量提取

b. 酶切鉴定:(双酶切 37 °C 4 h、单酶切 37 °C 2 h)

pMG36e-S-AD	5 μL
<i>Scal</i>	1 μL
<i>SphI</i>	1 μL
10 × H Buffer	2 μL
ddH ₂ O	11 μL
总计	20 μL
pMG36e-S-AD	5 μL
<i>Scal/ SphI</i>	1 μL
10 × H Buffer	2 μL
ddH ₂ O	12 μL
总计	20 μL

反应结束后电泳,对酶切鉴定阳性的质粒进行 PCR 鉴定。

c. PCR 鉴定:以酶切鉴定阳性的质粒为模板,以 J1、J2 为引物,进行 PCR 扩增,合成片段长度约 710 bp,反应体系与条件同上。

d. 重组质粒 pMG36e-S-AD DNA 纯化

(1)将 3 mL 粗制重组质粒移至 30 mL 洁净的离心管中,冰浴后加预冷的 5 mol/L 的 LiCl 3 mL,颠倒混匀,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min。吸取上清至新的 30 mL 离心管中,加等体积的异丙醇,颠倒混匀,12 000 r/min 室温离心 10 min。

(2)小心除去上清,倒置,用 70%乙醇清洗管壁和沉淀,小心除去乙醇,保持沉淀的湿润,用 500 μL TE(pH8.0,含 RnaseA)溶解沉淀,转移至 1.5 mL 离心管中,室温静置 30 min。

(3)酚氯仿和氯仿各抽提 1 次,1 mL 灭菌水溶解沉淀,加 500 μL PEG-MgCl₂ 溶液,室温静置 10 min 后最大速度室温离心 20 min。

(4)用 500 μL 70%乙醇重悬沉淀,最大速度离心 5 min,吸去上清,重复洗涤 1 次后,静置 10 ~ 20 min,用 0.5 mL TE(pH8.0)溶解沉淀,分装后 -20 °C 保存备用。

1.3 乳酸菌的制备

1) 复苏培养。将冻干的乳酸菌用 MRS 培养基溶解后,在 MRS 琼脂平板上划线,37 °C 培养 24 h,挑单菌落接种 4 mL MRS 培养基 37 °C 静置厌氧培养 24 h 复苏。

2) 乳酸菌感受态的制备。

①将过夜复苏的乳酸菌按 2% 的比例接种 20 mL MRS 培养基中,37 °C 厌氧培养 4 h,当细胞生

长到 OD₆₀₀ 值为 0.5 ~ 0.8 时,8 000 r/min 0 °C 离心 10 min 收集沉淀。

②用冰电击缓冲液 (PEB) 悬浮沉淀,8 000 r/min 0 °C 离心 5 min 洗 2 次,沉淀悬浮于 0.6 mL 冰 PEB 中,分装备用(200 μL/管,现用现制备)。

3) 重组质粒 pMG36e-S-AD 的乳酸菌电穿孔转化实验。

①取一管新制备的乳酸菌感受态冰浴 5 min,加入重组质粒 5 ~ 10 μL,混匀,冰浴 5 min。将混合物用预冷的枪头移至预冷的内径 0.2 cm 的电穿孔杯中,设置电击参数,进行电转化。

②将电击混合物移入一预冷的 1.5 mL 离心管中,冰浴 5 min 后加入 0.5 mL MRS 培养基,37 °C 静置 3 ~ 4 h。

③取 50 μL 培养物涂布含红霉素的 MRS 固体培养皿,37 °C 静置培养 48 h。

4) 乳酸菌重组质粒的鉴定。

①乳酸菌重组质粒的提取。

a. 取 10 mL 过液培养的乳酸菌 4 °C 8 000 r/min 离心 10 min,用 0.1 mol/L Tris 溶液(pH7.5)洗涤沉淀,加入 200 μL 25%蔗糖溶菌液(含 30 mg/mL 溶菌酶),37 °C 水浴 15 min。

b. 加入 3% 的 SDS 和 0.2 mol/L 的 NaOH 的混合液 0.4 mL,立即混匀在室温下静置 7 min,加入预冷的醋酸钠(pH4.8)300 μL,立即颠倒混匀,4 °C 5 000 r/min 离心 15 min。弃上清,用 320 μL 的去离子水溶解沉淀,加入 7.5 mol/L 的醋酸铵(含 0.5 mg/mL 的 EB)200 μL 和酚氯仿 350 μL,立即混匀,4 °C 8 000 r/min 离心 5 min。

c. 将上清移至 1.5 mL 离心管中,加入冰无水乙醇 1 mL,混匀,室温静置 30 min,4 °C 8 000 r/min 离心 15 min。移去上清,用 70%乙醇洗沉淀,并溶于 40 μL(含 RNase 0.1 mg/mL)的水中,-20 °C 保存备用。

②酶切鉴定:用 *Scal* 和 *SphI* 双酶切重组质粒 pMG36e-S-AD。

③PCR 鉴定:用 J1 和 J2 鉴别引物鉴定。

④SDS-PAGE 鉴定。

a. 将鉴定为阳性的重组菌接入 5 mL MRS 液体培养基(含红霉素)中,37 °C 静置过夜。取 2 mL 接入 100 mL 含红霉素的 MRS 液体培养基(添加 40 mmol/L DL- 苏氨酸)中,37 °C 静置培养至 OD₆₀₀ 为

0.6~0.8。每隔 1 h 取 1 次菌液,取至 7 h。同时同法诱导含空载体 pMG36e 的乳酸菌作对照。

b.将 7 次收获的诱导菌液的 OD₆₀₀ 均调至 0.6~0.8,取 1.4 mL 菌液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。沉淀中加入 1×SDS 上样缓冲液 50 μL (含 1/10 的 DTT),沸水煮 10 min,25 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

2 结果

2.1 用 *ScaI* 和 *SphI* 双酶切质粒 S-AD 与载体质粒 pMG36e

电泳结果见图 1 和图 2。图 1 所示 S-AD 双酶切片段为 710 bp,图 2 所示 pMG36e 双酶切片段为 3 600 bp。

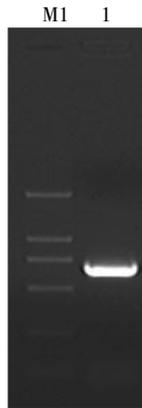


图 1 *ScaI* 和 *SphI* 双酶切质粒 P1
M1:Marker DL2000;1:P1 酶切片段,约为 710 bp

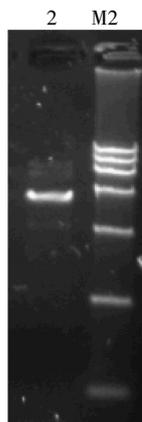


图 2 *ScaI* 和 *SphI* 双酶切载体质粒 pMG36e
M2:Marker DL15000;2:pMG36e 酶切片段,约为 3 600 bp

2.2 双酶切鉴定重组质粒 pMG36e-S-AD

将阳性重组质粒用 *ScaI* 和 *SphI* 双酶切,大片段约 3 600 bp,小片段约为 710 bp,酶切结果与预期相符,结果见图 3。

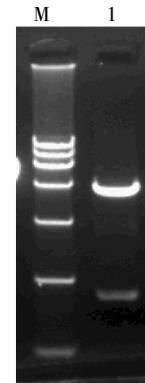


图 3 *ScaI* 和 *SphI* 双酶切鉴定重组质粒 pMG36e-P1
M:Marker DL15000;1:质粒 pMG36e-P1 酶切后大片段约 3 600 bp,小片段约为 710 bp

2.3 PCR 鉴定 pMG36e-S-AD

以鉴定引物 J1、J2 扩增双酶切阳性的质粒,都能扩增到约 710 bp 左右大小的片段,如图 4。

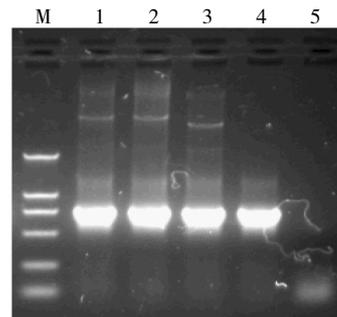


图 4 PCR 鉴定重组质粒 pMG36e-P1
M:Marker DL2000;1~3:鉴定为阳性的重组质粒;4:阳性对照;5:阴性对照

2.4 双酶切鉴定乳酸菌中的重组质粒 pMG36e-S-AD

ScaI 和 *SphI* 双酶切乳酸菌中提取的重组质粒 pMG36e-S-AD,共酶切出 2 条片段,大片段大约 3 600 bp,小片段大约 710 bp,结果如图 5。

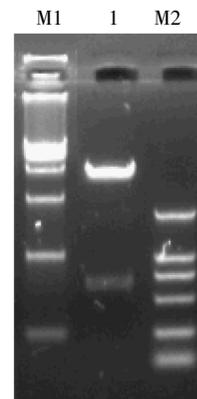


图 5 双酶切鉴定乳酸菌中重组质粒 pMG36e-P1
M1:Marker DL15000;M2:Marker DL2000;1:重组质粒 pMG36e-P1 酶切后大片段约 3 600 bp,小片段约为 710 bp

2.5 PCR 鉴定乳酸菌中的重组质粒 pMG36e-S-AD (图 6)

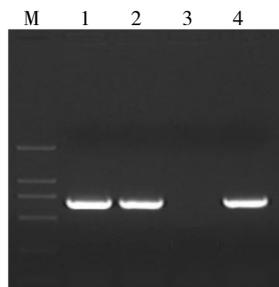


图 6 PCR 鉴定乳酸菌中的重组质粒 pMG36e-P1

M: Marker DL2000; 1, 2: 阳性质粒; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照

2.6 SDS-PAGE 结果

取诱导了 7 h 的含有重组质粒的乳酸菌及诱导的含空载体 pMG36e 的乳酸菌菌液为空白对照进行蛋白质表达分析,从图 7 可见重组基因得到了表达,蛋白质的相对分子量约为 34 ku,与预期一致,而空载体则未见表达。

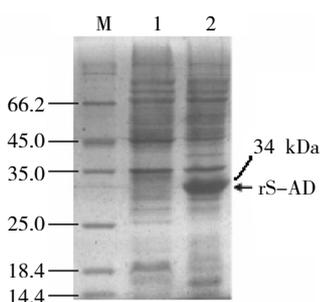


图 7 SDS-PAGE 电泳检测重组的 rS-AD 基因表达产物

M: 低分子量蛋白质 Marker; 1: 含空载体的乳酸菌诱导 7 h 的表达产物; 2: 含重组质粒的乳酸菌诱导 7 h 的表达产物

3 讨论

3.1 表达的靶基因的选择

疫苗具有较好免疫效果的关键是选择正确的重组表达的靶基因,原则上是选择编码主要免疫蛋白的基因序列。TGEV 的纤突糖蛋白(S 蛋白)携带主要的 B 淋巴细胞抗原决定簇,是惟一能够诱导宿主产生中和抗体和提供免疫保护的结构蛋白,并在决定宿主细胞亲嗜性、致病性、细胞融合、血凝作用等方面起重要作用,是其主要的免疫源。纤突糖蛋白的 A 和 D 位点高度保守,且都在诱导中和抗体过程中起主要作用。因此用 S 基因的 AD 片段就可以介导中和抗体的产生。

3.2 表达载体的选择

乳酸菌作为人和动物机体胃肠道中的正常菌

群,在维持机体正常的生理功能和疾病预防过程中起着不可替代的作用,使它成为口服疫苗最具潜力的候选者^[6-7]。它能够调节机体胃肠道内的正常菌群,在肠道上皮细胞上的黏附和定植能力能抵抗致病菌的定植和繁殖;它对一些腐败菌、低温细菌和腐败产物如内毒素的产生有较好的抑制作用,可用于防治腹泻、下痢、肠炎、便秘和由于肠道功能紊乱引起的多种疾病以及皮肤炎症等;它可以降低血清胆固醇、制造营养物质、刺激组织发育,从而对机体的生理功能、营养状况、药物效应、免疫反应等有非特异性和特异性的免疫增强。它一方面由于能定植在肠道,既具有靶向的作用,又等同于天然自动免疫;另一方面能明显激活腹膜巨噬细胞的吞噬作用,刺激巨噬细胞产生干扰素,促进细胞分裂、产生抗体及细胞免疫等增强机体的反应,提高机体的抗病能力。

猪传染性胃肠炎是一种肠道传染病,病毒感染具有明显的肠嗜性,通过口服疫苗免疫,激发肠道黏膜免疫反应是预防该病较为理想的途径。近年来,随着免疫学和分子生物学的日渐发展,基因工程实验技术的日渐应用,TGEV 疫苗的研究也进入了迅猛发展期,并在很多领域内取得不俗的成果,为其在实际生活中的应用做好了准备,提供了更坚实可靠的依据。

参 考 文 献

- [1] ENJUANES L, SANCHEZ C, MENDEZ A, et al. Tropism and immunoprotection in transmissible gastroenteritis coronaviruses[J]. Dev Biol Stand, 1995, 84: 145-152.
- [2] ENJUANES L, SMERDOU C, CASTILLA J, et al. Development of protection against coronavirus induced diseases[J]. A Review Adv Exp Med Biol, 1995, 380: 197-211.
- [3] LAUDE H, RASSCHAERT D, DELMAS B, et al. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus [J]. Vet Microbiol, 1990, 23: 147-154.
- [4] 陈焕春. 猪传染性胃肠炎[J]. 甘孟侯, 杨汉春. 中国猪病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 183-185.
- [5] WALMSLEY A M, AMTZEN C J. Plants for delivery of edible vaccines[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(2): 126-129.
- [6] BERMUDEZ H L G, LANGELLA P, CORTES P N G, et al. Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production[J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 1887-1896.
- [7] 史达, 宋岩, 李一经. 乳酸乳球菌作为黏膜免疫活载体疫苗传递抗原的研究进展[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 680-683.