

惠萌萌, 孙曼曼, 刘秀霞, 等. 猪伪狂犬病病毒糖蛋白 gD 在谷氨酸棒杆菌中的表达及优化[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1578-1585.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.016

猪伪狂犬病病毒糖蛋白 gD 在谷氨酸棒杆菌中的表达及优化

惠萌萌¹, 孙曼曼¹, 刘秀霞^{1,2,3}, 杨艳坤^{1,2,3}, 白仲虎^{1,2,3}

(1. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中进行猪伪狂犬病病毒糖蛋白 gD (Glycoprotein gD of porcine pseudorabies virus)的可溶性表达,通过启动子、底盘菌株和发酵条件的优化,提高 gD 在 *C. glutamicum* 中的表达量,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western Blot 方法进行表达产物的分析与鉴定,用镍离子亲和层析柱纯化产物。SDS-PAGE 和 Western Blot 分析结果表明,gD 在谷氨酸棒杆菌表达系统获得正确表达,相对分子质量约 4.5×10^4 ,可与猪抗 gD 阳性血清特异性反应。摇瓶培养下最优发酵条件为诱导温度 30 ℃,诱导时长 24 h,优化后 gD 质量浓度可达到 517 mg/L。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 猪伪狂犬病病毒; 糖蛋白 gD; 发酵优化

中图分类号: S858.282.65⁺9.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1578-08

Expression and optimization of glycoprotein gD of porcine pseudorabies virus in *Corynebacterium glutamicum*

HUI Meng-meng¹, SUN Man-man¹, LIU Xiu-xia^{1,2,3}, YANG Yan-kun^{1,2,3}, BAI Zhong-hu^{1,2,3}

(1. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Wuxi 214122, China)

Abstract: To express soluble glycoprotein gD of porcine pseudorabies virus in *Corynebacterium glutamicum*, promoter, chassis strain and fermentation conditions were optimized in this study to improve the expression of gD in *C. glutamicum*. Then the target protein gD was detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot, and was purified by Ni-NTA affinity chromatography column. The results showed that glycoprotein gD was successfully expressed in *C. glutamicum* with a relative molecular mass of about 4.5×10^4 , and the protein could specifically bind to PRV antibodies. Under the optimal shaking flask culture condition, the gD production reached the highest mass concentration (517 mg/L) after 24 h incubation at 30 ℃.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; porcine pseudorabies virus; glycoprotein gD; fermentation optimization

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(22078128, 21878124)

作者简介: 惠萌萌(1996-), 女, 安徽宿州人, 硕士, 主要从事发酵工程、医药蛋白表达等方面的研究。(E-mail) huimengmengw@163.com

通讯作者: 白仲虎, (E-mail) baizhonghu@jiangnan.edu.cn

伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是一种由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的传染性、病毒性疾病,宿主范围广,可引起多种家畜、家禽以及野生动物共患,属 α 疱疹病毒亚科^[1]。PRV在猪群中呈爆发性流行,临床症状包括猪的生长迟缓和呼

吸困难、母猪流产和种猪不孕,大都呈致死性感染,对全世界养猪业危害极大^[2-3]。自 1914 年以来,基于临床症状、动物接触史或血清抗体检测结果,偶有关于人类感染 PRV 的争议性报道^[4-5]。2019 年, Wang 等^[6]报道了 4 例人急性脑炎病例,均由伪狂犬病病毒感染引起,首次提供了 PRV 向人群跨种传播的病毒分离证据。研究表明,PRV 基因组由线性双股 DNA 组成,大约长 150 kb,具独特长区段(UL)和短区段(US),位于 UL 区的主要编码蛋白质有 gB、gC、gH、TK 等,位于 US 区的主要编码蛋白质有 gD、gE、gG、gI 和 gL 等。gC、TK 和 gE 是 PRV 主要毒力蛋白质,gB、gD 和 gH 是病毒复制的必需蛋白质^[7]。目前已发现的 11 种 PRV 糖蛋白中,gB、gC、gD 均能诱导机体产生中和抗体,其单克隆抗体在体内、体外均能中和 PRV,是制造亚单位疫苗的首选蛋白质。gD,又称 gp50,开放阅读框由 1 206 个碱基组成,蛋白质相对分子质量约为 4.5×10^4 ,是成熟 PRV 表面的主要囊膜糖蛋白,参与病毒的穿通过程;gD 作为必需的结构蛋白质,在 PRV 侵入宿主细胞时的感染和增殖过程中具有重要作用^[8]。研究表明,不同毒株间 gD 的 DNA 水平和蛋白质水平的同源性都非常高,说明 gD 在遗传过程中是高度保守的。

基因工程亚单位疫苗是指将病原的保护性抗原编码基因在原核或真核细胞中表达,再将基因产物制成疫苗,其优点是:安全性高,接种后不会引起机体急性感染;稳定性好,便于输送和贮存;可与野毒感染产生的免疫应答区分,利于疫病的控制与根除^[9-11]。Marchioli 等^[12]筛选出一株表达 gD 的细胞株,免疫猪后能产生中和性抗体并抵抗 PRV 的强毒攻击。作为 PRV 最重要的保护性抗原,gD 在刺激动物机体后,可以产生中和抗体^[13],是 PRV 亚单位疫苗的主要候选蛋白质,在 PRV 的免疫防控中意义重大^[14-15]。为进一步加强 PR 的疫情监测和流行病学调查,gD 还可作为理想的血清学检测用抗原。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种典型高 GC 含量的革兰氏阳性菌^[16],被美国食品药品监督管理局(FDA)认证为安全菌株(Generally recognized as safe, GRAS),具有无内毒素、胞外蛋白酶含量少^[17]、可高密度发酵且易于分泌^[18-21]等优良特性,是目前工业生产重组蛋白质的优越表达系统^[22-23]。

PRV 蛋白的表达有一定的难度,构建的表达载体往往不能表达,其主要原因可能是 PRV 蛋白与工程菌的兼容性不好,现有的研究多用病毒或真核载体表达,在大肠杆菌中以包涵体形式表达^[24-25],尚未有在谷氨酸棒杆菌中表达生产 gD 的研究报道。本研究拟在谷氨酸棒杆菌中进行 gD 的可溶性表达,通过 Western Blot 和酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法检测 gD 蛋白的表达和抗原活性,并优化发酵条件以提高产量,为进一步研制 PRV 亚单位疫苗提供一种可用的表达体系,也为 PRV 免疫学检测方法提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本研究所用的菌株见表 1。大肠杆菌用于构建质粒,谷氨酸棒杆菌用于表达重组蛋白质,均由本实验室保存。

1.1.2 质粒 本研究所用的质粒见表 2。质粒 pXMJ19 用作谷氨酸棒杆菌外源蛋白质表达载体,由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 大肠杆菌培养条件:LB 培养基(蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L,蒸馏水定容),37 ℃,220 r/min。谷氨酸棒杆菌培养条件:LBB 培养基(蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L,脑心浸出液 10 g/L,蒸馏水定容),30 ℃,220 r/min。大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌培养体系中使用的氯霉素质量浓度分别为 30 μg/ml 和 20 μg/ml。

1.2.2 gD 表达质粒的构建 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)官网上获取 gD 的氨基酸序列(GenBank:ABR13825.1),对其编码序列进行密码子优化(参考 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032)。基因合成由苏州安升达生物科技有限公司完成,添加 5'(*Hind* III)和 3'(*Eco*R I)。将基因通过 5'(*Hind* III)和 3'(*Eco*R I)酶切连接克隆至表达载体 pXMJ19,获得重组基因表达质粒 pXMJ19-gD。

1.2.3 gD 表达菌株的构建 将构建好的质粒 pXMJ19-gD 电击转化 *C. glutamicum* 获得表达菌株 Cg-gD,30 ℃培养 36 h,对长出的单菌落进行 PCR 和测序验证。为更好地反映 gD 的表达情况,同时构建 Cg-pXMJ19 作为空白对照。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株名称	描述	来源
<i>Escherichia coli</i> JM109		实验室储存
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGMCC1.15647	野生型	实验室储存
Cg- Δ clpC	clpC 蛋白酶敲除菌	实验室储存
Cg- Δ clpS	clpS 蛋白酶敲除菌	实验室储存
Cg-gD	蛋白质表达菌株, 含有 pXMJ19-gD 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg-pXMJ19	空载菌株, 含有 pXMJ19 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg- Δ clpC-gD	蛋白质表达菌株, 含有 pXMJ19-gD 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg- Δ clpC- pXMJ19	空载菌株, 含有 pXMJ19 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg- Δ clpS-gD	蛋白质表达菌株, 含有 pXMJ19-gD 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg- Δ clpS- pXMJ19	空载菌株, 含有 pXMJ19 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg- Δ clpS-H36-gD	蛋白质表达菌株, 含有 H36-gD 质粒, 组成型, Cm ^r	本研究
Cg- Δ clpC-H36-gD	蛋白质表达菌株, 含有 H36-gD 质粒, 组成型, Cm ^r	本研究
Cg-H36-gD	蛋白质表达菌株, 含有 H36-gD 质粒, 组成型, Cm ^r	本研究
Cg-H36-pXMJ19	空载菌株, 含有 pXMJ19 质粒, 组成型, Cm ^r	本研究
Cg-cspB-gD	蛋白质表达菌株, 含有 cspB-gD 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg-cspB- pXMJ19	空载菌株, 含有 pXMJ19 质粒, 诱导型, Cm ^r , cspB-Sec	本研究
Cg-0949-gD	蛋白质表达菌株, 含有 0949-gD 质粒, 诱导型, Cm ^r	本研究
Cg-0949- pXMJ19	空载菌株, 含有 pXMJ19 质粒, 诱导型, Cm ^r , 0949-Tat	本研究

Cm^r: 氯霉素抗性。

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒名称	描述	来源
pXMJ19	表达载体, 诱导型 tac 启动子, Cm ^r	实验室储存
H36-RiboJ	包含组成型启动子 H36, Cm ^r	实验室储存
pXMJ19-gD	蛋白质表达质粒, pXMJ19, 含 gD 编码基因, Cm ^r	本研究
H36-gD	蛋白质表达质粒, 组成型 H36 启动子, 含 gD 编码基因, Cm ^r	本研究
cspB-gD	蛋白质表达质粒, pXMJ19, 含 gD 编码基因, 含 cspB-Sec 信号肽, Cm ^r	本研究
0949-gD	蛋白质表达质粒, pXMJ19, 含 gD 编码基因, 含 0949-Tat 信号肽, Cm ^r	本研究

tac: 大肠杆菌通用启动子; Cm^r: 氯霉素抗性。

1.2.4 *gD* 的诱导表达 Cg-*gD* 和 Cg-pXMJ19 分别接种于 10 ml 氯霉素抗性 LBB 培养基中, 在 30 ℃、220 r/min 条件下过夜培养, 之后以 2% 接种量转接到 50 ml 新鲜的氯霉素抗性 LBB 培养基中, 培养 3~5 h (OD_{600} = 0.6~0.8) 时添加 1% (质量体积比) 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 (100 mmol/L IPTG), 继续培养 24 h 后收集菌体进行蛋白质分析。

1.2.5 生长曲线的测定 将蛋白质表达菌株接种于 10 ml 氯霉素抗性 LBB 培养基中, 30 ℃、220 r/min 条件下过夜培养, 转接至 100 ml 新鲜的 LBB 培养基中, 使初始 OD_{600} = 0.2。30 ℃、220 r/min 条件下培养 48 h, 每 4 h 取 1 次样并测定 OD_{600} 。

1.2.6 蛋白质表达鉴定 取 *gD* 发酵产物 (定量 OD_{600} = 10) 在 12 000 r/min 离心, 弃上清液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗菌体 2 次, 并用 PBS 重悬菌体, 破碎, 取全菌液、上清液和沉淀 (用 PBS 重悬) 制成相应蛋白质样品, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western Blot 分析。使用组氨酸 (His) 单抗进行 Western Blot 定性分析。纯化后使用 ELISA 法进行蛋白质检测, 封闭液用 5% 牛血清白蛋白 (BSA), 一抗用 *gD* 阳性血清, 二抗用辣根过氧化物羊抗猪 IgG。ELISA 方法: 将纯化液按一定梯度进行稀释后, 每孔 100 μ l, 37 ℃、1 h 孵育至酶标板上, 用洗液清洗 5 次后甩干; 按 1: 800

的体积比每孔 100 μ l 继续孵育一抗试剂,37 $^{\circ}$ C,1 h,用洗液清洗 5 次后甩干;按 1 : 2 000 的体积比每孔加入 100 μ l 继续孵育二抗试剂,37 $^{\circ}$ C,1 h,用洗液清洗 5 次后甩干;每孔加入 200 μ l 显色液,37 $^{\circ}$ C,1 h;最后每孔加入 50 μ l 终止液,观察颜色反应或检测 OD_{450} 值。

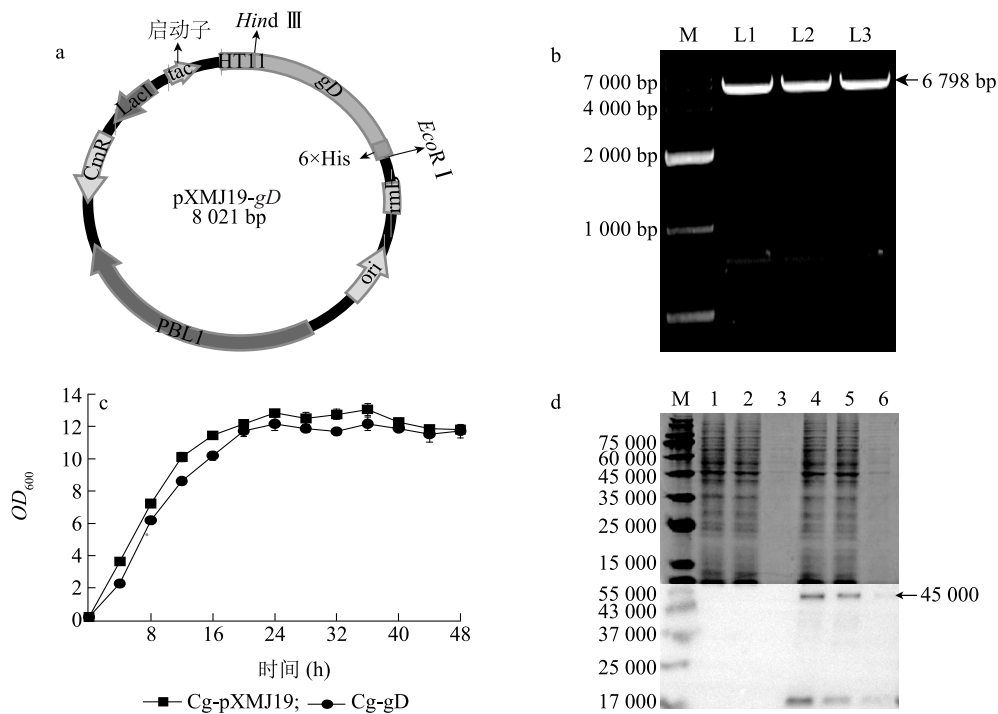
1.2.7 蛋白质纯化及定量分析 取 50 ml 发酵液,收集菌体沉淀,用 50 ml 结合液 (Binding buffer) 重悬,并进行高压匀浆破碎,于 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,收集上清液,用镍离子亲和层析柱进行目标蛋白质的纯化,用不同浓度洗脱液 (Elution buffer) 梯度洗脱目标蛋白质。结合液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 5.8 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593 g/L, NaCl 29.22 g/L,用蒸馏水定容;洗脱液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593 g/L, NaCl 29.22 g/L,咪唑 34 g/L,用蒸馏水定容。使用 BCA 试剂盒法进

行蛋白质定量分析。

2 结果与分析

2.1 表达 gD 的菌株构建与验证

为获得表达 gD 的谷氨酸棒杆菌,首先构建质粒 pXMJ19-gD,质粒图谱如图 1a 所示,载体质粒 pXMJ19 酶切结果如图 1b 所示。为观察谷氨酸棒杆菌表达 gD 对菌株生长的影响,对 Cg-gD 和 Cg-pXMJ19 进行了生长曲线测定,结果显示,表达 gD 的菌株前期生长稍显缓慢,对菌株生长的影响较小 (图 1c)。Cg-gD 发酵 24 h 后,取样进行蛋白质表达分析,Western Blot 分析结果如图 1d 所示,在相对分子质量 4.5×10^4 处有明显条带,与 gD 理论大小相符,且基本为可溶性表达,但在 1.7×10^4 处有降解,SDS-PAGE 条带较浅,表明表达量较低。



a: pXMJ19-gD 的质粒图谱; b: pXMJ19 载体酶切结果, M 为 10 000 marker, L1~L3 为生物学平行样本; c: Cg-pXMJ19 和 Cg-gD 菌株 48 h 生长曲线; d: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western Blot 分析结果, M 为蛋白质 marker, 1~3 分别为 Cg-pXMJ19 发酵全菌、破碎后上清液、沉淀, 4~6 分别为 Cg-gD 发酵全菌、破碎后上清液、沉淀。

图 1 质粒 pXMJ19-gD 的构建与目的蛋白质分析
Fig.1 Construction of plasmid pXMJ19-gD and analysis of target protein

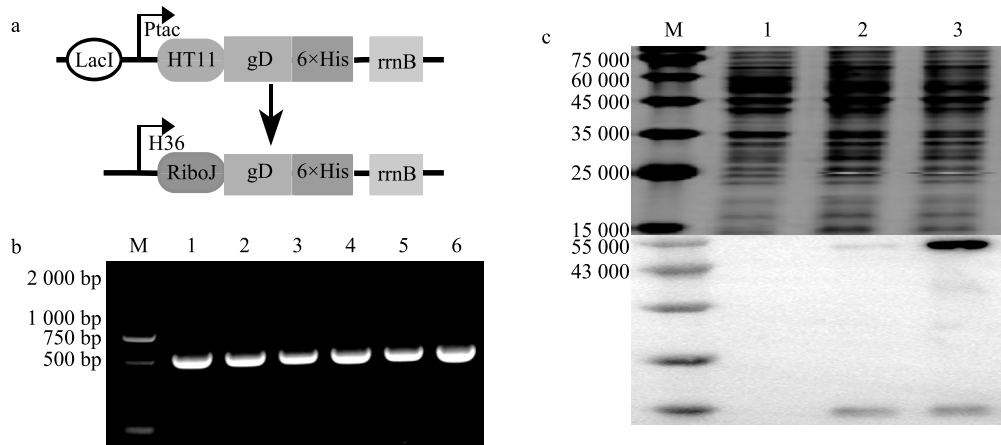
2.2 gD 表达元件优化

为进一步提高 gD 的表达量,对表达元件启动子和信号肽进行了优化。由于 *C. glutamicum* 中组

成型启动子更有利于外源蛋白质的表达^[26],因此分别选用组成型 H36 启动子 (图 2a)、cspB 和 0949 信号肽对 gD 的表达进行优化 (图 3a)。

为构建组成型表达质粒 H36-*gD*,对 pXMJ19-*gD* 质粒进行 *Hind* III 和 *Eco* R V 酶切,凝胶回收后获得含目的基因的载体,H36 序列(300 bp)使用引物 H36-F+H36-R 扩增获得,载体和片段以 1:3 浓度比例进行同源重组,转化 *E. coli* JM109 并测序验证。用相同方法构建对照质粒 H36-pXMJ19。将菌落 PCR 和测序正确的 H36-*gD*

电转入 *C. glutamicum* 进行发酵表达。SDS-PAGE 和 Western Blot 分析结果如图 2 所示,可见组成型质粒 H36-*gD* 的蛋白质表达条带颜色深,灰度分析结果显示,其蛋白质表达量比诱导型质粒 pXMJ19-*gD* 的蛋白质表达量高 4.5 倍。



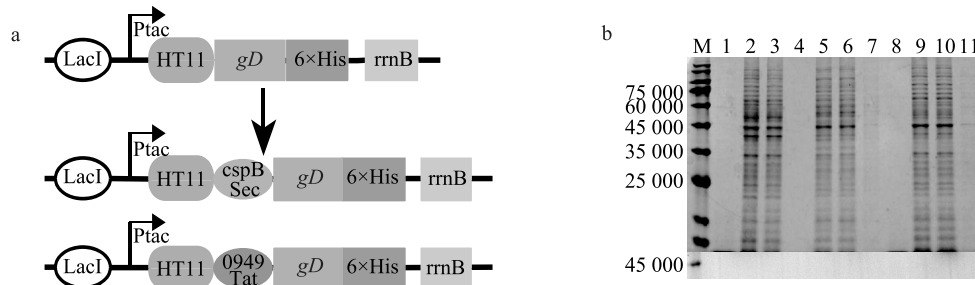
a: H36-*gD* 构建示意; b: Cg-H36-*gD* 菌株 PCR 验证, M 为 2000 marker, 1~6 平行样品; c: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western Blot 分析结果, M 为蛋白质 marker, 1 为 Cg-pXMJ19 破碎后上清液, 2 为 Cg-*gD* 破碎后上清液, 3 为 Cg-H36-*gD* 破碎后上清液。

图 2 组成型表达质粒 H36-*gD* 的构建与目的蛋白质分析

Fig.2 Construction of constitutive expression plasmid H36-*gD* and analysis of target protein

为了研究分泌表达对 *gD* 表达量的影响,分别增加 cspB 和 0949 2 种信号肽构建分泌型表达质粒 cspB-*gD* 和 0949-*gD*。以 pXMJ19-*gD* 质粒为模板,使用引物 cspB-F+sp-R、cspB-R+sp-F 扩增片段,凝胶回收后两片段以 1:1 浓度比例进行同源重组,转化 *E. coli* JM109 并测序验证,获得 cspB-*gD*。cspB-pXMJ19 的构建模板为 pXMJ19。以 pXMJ19-*gD* 质粒为模板,使用引物 gD-F+gD-R 扩增载体,0949-F+0949-R 直接引物退火,延伸获得片段,载体和片段

以 1:3 浓度比例进行同源重组,转化 JM109 并测序验证,获得 0949-*gD*。0949-pXMJ19 的构建模板为 pXMJ19。长出的转化子通过菌落 PCR 和测序来验证,用测序正确的质粒转化 *C. glutamicum* 进行发酵诱导表达。SDS-PAGE 和 Western Blot 结果(图 3)显示,在相对分子质量 4.5×10^4 处无条带,这表明增加信号肽序列,*gD* 在谷氨酸棒杆菌中反而不表达,猜测是因为蛋白质自身特性,在添加信号肽后不能正确折叠导致无法表达。



a: 质粒 cspB-*gD* 和 0949-*gD* 构建示意; b: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western Blot 分析结果, M 为蛋白质 marker, 1~3 分别为 Cg-pXMJ19 发酵液上清液、全菌、细胞破碎后上清液, 4~7 分别为 Cg-cspB-*gD* 发酵液上清液、全菌、细胞破碎后上清液、细胞破碎后沉淀, 8~11 分别为 Cg-0949-*gD* 发酵液上清液、全菌、细胞破碎后上清液、细胞破碎后沉淀。

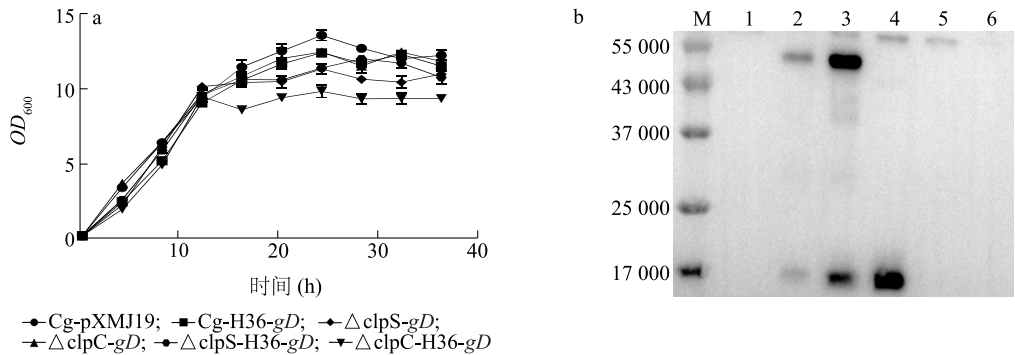
图 3 糖蛋白 *gD* 分泌系统的构建与目的蛋白质分析

Fig.3 Construction of glycoprotein *gD* secretion system and analysis of target protein

2.3 gD 的表达底盘菌株优化

为了分析不同底盘菌株对 *gD* 表达的影响,以提高蛋白质表达量,在前期研究基础上,选取 3 株底盘菌株(分别为 *C. glutamicum* CGMCC1.15647、蛋白酶敲除菌株 Cg- Δ clpC 和 Cg- Δ clpS) 进行研究。首先进行生长曲线的测定,结果如图 4a 所示,与对照菌株 Cg-pXMJ19 相比,表达 *gD* 的其他菌株生长都

受到不同程度的影响, Δ clpC -H36-*gD* 长势最弱。SDS-PAGE 和 Western Blot 分析结果(图 4b)显示,Cg- Δ clpS-*gD* 的蛋白质表达条带最深,经灰度分析发现其蛋白质表达量比组成型表达菌株 Cg-H36-*gD* 高 2.4 倍。由此可见 clpS 蛋白酶对外源蛋白质在 *C. glutamicum* 中表达的影响最大。



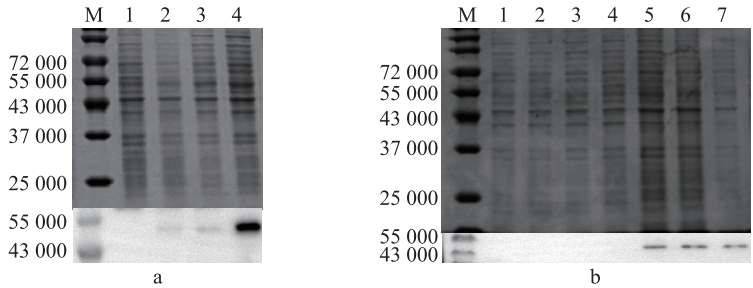
a:不同底盘菌株的 36 h 生长曲线;b:Western Blot 分析结果,M 为蛋白质 marker,1~6 均为发酵后破碎上清液,1 为 Cg-pXMJ19,2 为 Cg-H36-*gD*,3 为 Cg- Δ clpS-*gD*,4 为 Cg- Δ clpC-*gD*,5 为 Cg- Δ clpS-H36-*gD*,6 为 Cg- Δ clpC-H36-*gD*。

图 4 *gD* 的表达底盘菌株优化
Fig.4 Optimization of chassis strain expressing *gD*

2.4 gD 的表达发酵条件优化

选取最优表达菌株 Cg- Δ clpS-*gD* 进行发酵条件优化,以进一步提高 *gD* 的表达量,分别从发酵温度和诱导时间进行优化。根据谷氨酸棒杆菌生长特性,选取 16 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 3 个温度进行 *gD* 的表达,以 Cg- Δ clpS-pXMJ19 作为阴性对照,摇瓶培养 24 h 后进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析。结果(图 5a)显示,30 $^{\circ}$ C 培养条件下,蛋白质条带最深,16 $^{\circ}$ C 和 23 $^{\circ}$ C 条

件下蛋白质条带较浅,且菌株长势弱于 30 $^{\circ}$ C 培养条件。这表明对于 *gD* 的表达而言,30 $^{\circ}$ C 不仅有利于菌株生长,还有利于蛋白质的表达。为探究诱导时长对 *gD* 表达的影响,分别在诱导后 6 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h 取样进行目的蛋白质表达量分析。结果(图 5b)显示,*gD* 在诱导后 24 h 才开始明显表达,且后期增量不明显,这表明菌株前期主要侧重于生长,在稳定期进行外源蛋白质表达。



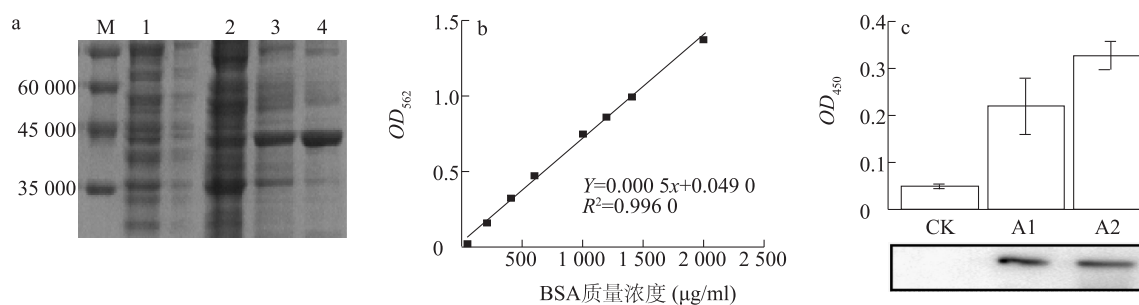
a:不同温度发酵表达 *gD* 的 SDS-PAGE(上图)和 Western Blot 分析结果(下图),其中 1 为 Cg-pXMJ19 发酵后破碎上清液,2~4 分别为 16 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 下 Cg- Δ clpS-*gD* 发酵后破碎上清液;b:不同诱导时长发酵表达 *gD* 的 SDS-PAGE(上图)和 Western Blot 分析结果(下图),其中 1 为 Cg-pXMJ19 发酵后破碎上清液,2~7 分别为 Cg- Δ clpS-*gD* 发酵后 6 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h 破碎上清液;M:蛋白质 marker。

图 5 不同温度、诱导时长发酵表达 *gD* 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western Blot 分析
Fig.5 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot analysis of *gD* expression at different fermentation temperatures and induction durations

2.5 gD 的纯化及定量分析

在目的蛋白质 3'端添加 6×His 标签,使用镍离子亲和层析柱对其进行纯化分析,结果表明,使用 5%洗脱液即可将目的蛋白质洗脱,纯化样品 SDS-PAGE 结果如图 6a 所示。使用 BCA 试剂盒对目的蛋白质进行定量分析,经计算,200 ml 摇瓶发酵液中,菌株 Cg-ΔclpS-gD 发酵后 gD 质量浓度约为 517 mg/L。洗脱液蛋白质电泳结果显示仍有少量杂蛋

白质,且流穿液也含有目的蛋白质,说明目的蛋白质和纯化柱结合得不够紧密。使用 ELISA 法检测纯化后的 gD,以 5% BSA 为封闭液,gD 抗体阳性血清为一抗、HRP 羊抗猪 IgG 为二抗进行包板试验,以 2.1 倍阴性对照值作为阳性结果的判断标准, $OD_{450}^{\text{目的蛋白}} > 2.1 \text{ 倍 } OD_{450}^{\text{阴性对照}}$,纯化后 gD 呈阳性。以 gD 抗体阳性血清作单抗孵育,Western Blot 结果(图 6c)显示,gD 有特异性条带。



a: ΔclpS-gD 纯化后样品的 SDS-PAGE 分析结果,1 为 Cg-pXMJ19 破碎后上清液,2 为 ΔclpS-gD 纯化流穿液,3~4 为纯化蛋白质样品;b:BSA 质量浓度标准曲线;c: OD_{450} 值和 Western Blot 结果,CK 为阴性对照,A1 为纯化流穿液,A2 为纯化蛋白质样品。

图 6 糖蛋白 gD 的定量定性检测

Fig.6 Quantitative and qualitative detection of glycoprotein gD

3 讨论

谷氨酸棒杆菌在表达异源蛋白质上具有很大潜力,相较于大肠杆菌表达系统,*C. glutamicum* 不含内毒素,更适合医药蛋白质生产;与同为革兰氏阳性菌的枯草芽孢杆菌相比,*C. glutamicum* 能正确折叠蛋白质,确保蛋白质活性;与真核细胞相比,*C. glutamicum* 生长周期短,培养成本不高,基因操作成熟,可高密度发酵,有利于异源蛋白质的发酵放大。本研究中,为了在谷氨酸棒杆菌中表达 gD,首先进行 pXMJ19-gD 的构建与表达,初步通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 条带分析,验证 gD 可在谷氨酸棒杆菌中可溶性表达。其次通过表达元件、底盘菌株、发酵条件等优化,发现与诱导型表达质粒相比,组成型表达质粒更有利于 gD 的表达,蛋白质表达量提高了 4.5 倍;蛋白酶敲除菌株 Cg-ΔclpS 诱导表达 gD 的能力最强,蛋白质表达量是组成型的 2.5 倍。上述研究结果说明,不同菌株对于不同启动子的适配能力不同。根据谷氨酸棒杆菌的生长特性,30 ℃ 培养、诱导 24 h 是 gD 表达的最优条件。推测表达 gD 对宿主菌有一定毒性,所以使宿主菌生长缓慢,生长

到一定程度后,延迟表达。最后,通过镍离子层析柱纯化目的蛋白质,经 BCA 试剂盒检测,在摇瓶水平 200 ml 发酵液中目的蛋白质质量浓度可达 517 mg/L。利用 ELISA 法检测目的蛋白质, OD_{450} 值和显色反应均显示纯化后的 gD 呈阳性。综上所述,本研究成功构建了表达可溶性 gD 的谷氨酸棒杆菌系统,该系统同样可以用于其他异源蛋白质的表达,目前已有用 *C. glutamicum* 表达 VHH 和 scFv 等异源蛋白质的报道。

本研究中还存在一些需要进一步探索的问题,比如本研究只验证了蛋白酶单敲除菌株对 gD 表达的影响,组合敲除的情况有待进一步研究。其次,gD 与镍离子亲和层析柱结合的紧密性也需要进一步研究,以获得更高纯度的目的蛋白质。最后,没有进行大规模发酵培养,优化更多的发酵条件,比如碳源、溶解氧含量等。这些未解决的问题同样具有重要意义,亟待研究人员进一步探索。

参考文献:

- [1] POMERANZ L E, REYNOLDS A E, HENGARTNER C J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine [J]. Microbiology and Molecular Biology Re-

- views, 2005, 69(3): 462-500.
- [2] SONG C, GAO L, BAI W, et al. Molecular epidemiology of pseudorabies virus in Yunnan and the sequence analysis of its gD gene [J]. Virus Genes, 2017, 53(3): 392-399.
- [3] TAN L, YAO J, YANG Y, et al. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China [J]. Virologica Sinica, 2021, 36(4): 588-607.
- [4] HE W, AUCLERT L Z, ZHAI X, et al. Interspecies transmission, genetic diversity, and evolutionary dynamics of pseudorabies virus [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 219(11): 1705-1715.
- [5] OU J, CAI S, ZHENG F, et al. Human pseudorabies virus infection; a new threat in China [J]. The Journal of Infection, 2020, 80(5): 578-606.
- [6] WANG X R, LI W, LIU Q Y, et al. A novel human acute encephalitis caused by pseudorabies virus variant strain [J]. Clinical Infectious Diseases, 2021, 73(11): 1-10.
- [7] MÜLLER T, HAHN E C, TOTTEWITZ F, et al. Pseudorabies virus in wild swine; a global perspective [J]. Archives of Virology, 2011, 156(10): 1691-1705.
- [8] ZHAI X, ZHAO W, LI K, et al. Genome characteristics and evolution of pseudorabies virus strains in Eastern China from 2017 to 2019 [J]. Virologica Sinica, 2019, 34(6): 601-609.
- [9] 董政波, 田俊. 猪伪狂犬病的检测方法及应用研究进展 [J]. 畜禽业, 2021, 32(3): 23-25.
- [10] 李超, 孙道锐. 猪伪狂犬病疫苗研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40(7): 78-79.
- [11] TONG W, ZHENG H, LI G X, et al. Recombinant pseudorabies virus expressing E2 of classical swine fever virus (CSFV) protects against both virulent pseudorabies virus and CSFV [J]. Antiviral Research, 2020, 173: 1-9.
- [12] MARCHIOLI C C, YANCEY R J, J R, PETROVSKIS E A, et al. Evaluation of pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a vaccine for Aujeszky's disease in mice and swine; expression by vaccinia virus and Chinese hamster ovary cells [J]. Journal of Virology, 1987, 61(12): 3977-3982.
- [13] HWANG D Y, LEE J B, KIM T J, et al. Induction of immune responses to glycoprotein gD of Aujeszky's disease virus with DNA immunization [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2001, 63(6): 659-662.
- [14] ZHANG T, LIU Y, CHEN Y, et al. A single dose glycoprotein D-based subunit vaccine against pseudorabies virus infection [J]. Vaccine, 2020, 38(39): 53-61.
- [15] JIANG Z, ZHU L, CAI Y, et al. Immunogenicity and protective efficacy induced by an mRNA vaccine encoding gD antigen against pseudorabies virus infection [J]. Veterinary Microbiology, 2020, 251: 1-6.
- [16] SONG Y, MATSUMOTO K, YAMADA M, et al. Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 1917-1925.
- [17] LIU X X, MENG L H, WANG X Y, et al. Effect of Clp protease from *Corynebacterium glutamicum* on heterologous protein expression [J]. Protein Expression and Purification, 2022, 189: 1-14.
- [18] JURISCHKA S, BIDA A, DOHMEN-OLMA D, et al. A secretion biosensor for monitoring Sec-dependent protein export in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-15.
- [19] JIA H, LI H, ZHANG L, et al. Development of a novel gene expression system for secretory production of heterologous proteins via the general secretory (Sec) pathway in *Corynebacterium Glutamicum* [J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2018, 16(1): 42-48.
- [20] LIU X X, ZHANG W, ZHAO Z, et al. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4): 541-551.
- [21] SARVAS M, HARWOOD C R, BRON S, et al. Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1694(1/2/3): 311-327.
- [22] LEE M J, KIM P. Recombinant protein expression system in *Corynebacterium glutamicum* and its application [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1-14.
- [23] MENG L H, GAO X, LIU X X, et al. Enhancement of heterologous protein production in *Corynebacterium glutamicum* via atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening [J]. Journal of Biotechnology, 2021, 339: 22-31.
- [24] SUNG M B J L, KIM J H. Expression of pseudorabies virus (PRV) glycoproteins gB, gC and gD using bacterial expression system [J]. International Journal of Industrial Entomology, 2011, 23(1): 147-153.
- [25] 罗飞, 李宇琴, 周洁, 等. 猪伪狂犬病病毒囊膜糖蛋白 gD 主要抗原表位区基因的克隆及原核表达 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(11): 83-86.
- [26] 彭枫, 刘秀霞, 陈静, 等. 不同表达模式组合对谷氨酸棒状杆菌中脑钠肽蛋白表达的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 1-7.

(责任编辑:张震林)