

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710089251.1

[51] Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月24日

[11] 公开号 CN 101058798A

[22] 申请日 2007.3.16

[21] 申请号 200710089251.1

[30] 优先权

[32] 2007.1.9 [33] CN [31] 200710071615.3

[71] 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号

[72] 发明人 唐丽杰 李一经 葛俊伟 欧 笛

[74] 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有限责任公司
代理人 祖玉清

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

[54] 发明名称

表达猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的重组乳酸乳球菌及制法

[57] 摘要

本发明提供的是一种表达猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 纤突 S 蛋白的重组乳酸乳球菌的方法。根据猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的全基因序列及表达载体质粒的基因融合特点,设计一对引物,进行 PCR,获得含有 TGEV S 基因 4 个主要抗原位点的 2007bp 目的片段,将其与分泌表达的载体质粒 pNZ8112 进行连接,通过电转化进入宿主菌乳酸乳球菌 NZ9000 细胞内,在乳糖菌肽的诱导下进行表达。本发明中构建了冠状病毒 TGEV S 蛋白乳酸乳球菌表达载体系统,表达了含有 TGEV S 蛋白 A、B、C、D 四个主要抗原位点的约 66KDa 的目的蛋白,免疫印迹实验和间接免疫荧光试验均表明,所表达的外源蛋白能够与 TGEV 免疫血清发生反应,表明重组 S 蛋白与 TGEV 天然抗原一样具有相同的抗原性。

1、一种表达猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的重组乳酸乳球菌，其特征是：它是保藏在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为 CCTCC NO: M 207020 的重组乳酸乳球菌。

2、一种表达猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的重组乳酸乳球菌的制法，其特征是：根据猪传染性胃肠炎病毒纤突蛋白的全基因序列及表达载体质粒的基因融合特点，设计一对引物，进行 PCR，获得含有 TGEV S 基因 4 个主要抗原位点的 2007bp 目的片段，将其与分泌表达的载体质粒 pNZ8112 进行连接，通过电转化进入宿主菌乳酸乳球菌 NZ9000 细胞内，在乳链菌肽的诱导下进行表达。

3、根据权利要求 2 所述的表达猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的重组乳酸乳球菌的制法，其特征是：所述的引物序列为

TS7	5' CTTGCATGCATGAAAAAAGTTCGTTGTTCTGGTTGTAAT 3'
TS8	5' CGTCTAGACACCACTATTATCA GACGGTACACCACTATGTTG 3'

4、根据权利要求 2 或 3 所述的表达猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的重组乳酸乳球菌的制法，其特征是：

(1) TGEV S 基因乳酸乳球菌表达载体的构建

以质粒 pUC-S 为模板，以 TS7 和 TS8 为引物扩增含有 TGEV S 基因 A、B、C 和 D 主要抗原位点的片段，命名为 Sa，Sa 基因与 pNZ8112-Sa 载体质粒进行酶切、连接并经电转化转入感受态细胞 NZ9000，获得含有重组质粒的乳酸乳球菌命名为 pNZ8112-Sa/ NZ9000。

(2) TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达

pNZ8112-Sa/NZ9000 阳性重组菌及 pNZ8112/NZ9000 空质粒对照菌，接种于 GM17 液体培养基中，30℃厌氧培养过夜后，取过夜培养物以体积比 1: 25 比例接进行扩增培养于 20 ml 培养基中，30℃培养至 OD₆₀₀ 为 0.4 左右；取 10 ml 细菌培养液用质量浓度 1ng/ml 的乳链杆菌肽 Nisin 诱导 2-3h。终止培养后分别取出 1ml 样品经溶菌酶处理后进行 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析。

(3) 间接免疫荧光检测

取 12 小时培养的阳性重组菌和空载体对照菌液体培养物 0.5ml 离心去上清后，分别用磷酸盐缓冲液 PBS 低速离心洗三次，加入兔源抗 TGEV 抗血清，悬浮混合后 37℃作用 30 分钟，离心去上清，PBS 离心洗菌体三次，加入稀释的含有伊文思蓝的抗兔异硫氰酸荧光素荧光标记二抗，悬浮混合后 37℃作用 30 分钟，离心去上清，PBS 离心洗菌体三次，菌体沉淀物悬浮在 200μl PBS，取适量涂片，自然干燥后，冷丙酮固定 30min 后，干燥后荧光显微镜观察。

表达猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白的重组乳酸乳球菌及制法

(一) 技术领域

本发明涉及的是生物制品，本发明还涉及这种生物制品的制备方法。

(二) 背景技术

猪传染性胃肠炎 (Transmissible gastroenteritis, TGE) 是由冠状病毒科猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 引起的以仔猪呕吐、严重腹泻和高致死率为特征的消化道传染病。该病是我国及世界各养猪国家仔猪早期死亡的重要疫病之一。疫苗免疫接种是预防本病的主要措施。实践证明，肠道粘膜免疫所产生的分泌型抗体 (sIgA) 是抵抗 TGEV 感染的有效抗体，而非经口免疫所产生的其它血清抗体，如 IgG、IgM 对本病的免疫保护效果并不理想。因此选择安全无毒，能够在肠道中存活并能表达和传递抗原物质的载体系统，有效的刺激粘膜免疫系统所产生的粘膜免疫应答对本病的防治具有重要意义。

TGEV 有三种主要结构蛋白，分别为磷酸化的核衣壳蛋白 N、膜蛋白 M 和糖基化的纤突蛋白 S。其中 S 糖蛋白携带主要的 B 淋巴细胞抗原决定簇，是唯一能诱导产生中和抗体和提供免疫保护作用的结构蛋白；S 蛋白含有宿主细胞氨肽酶受体 (PAPN) 的识别位点，因此，S 蛋白对病毒感染、发挥其致病性和决定宿主细胞亲嗜性方面起关键作用。

(三) 发明内容

本发明的目的在于提供一种能够用于防治猪传染性胃肠炎的安全、有效的黏膜免疫活菌疫苗的表达猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) S 蛋白的重组乳酸乳球菌及其制法。

本发明的目的是这样实现的：

它是保藏在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为 CCTCC NO: M 207020，命名为 *Lactococcus lactis* NZ9000/pNZ8112-Sa/NZ9000 的重组乳酸乳球菌，保藏日期 2007 年 2 月 14 日。

本发明的重组乳酸乳球菌是采用这样的方法来制备的：

根据猪传染性胃肠炎病毒纤突 (S) 蛋白的全基因序列及表达载体质粒的基因融合特点，设计一对引物，进行 PCR，获得含有 TGEV S 基因 4 个主要抗原位点的 2007bp 目的片段，将其与分泌表达的载体质粒 pNZ8112 进行连接，通过电转化进入宿主菌乳酸乳球菌 NZ9000 细胞内，在乳链菌肽 (Nisin) 的诱导下进行表达。

采用本发明的方法获得的产物经检验结果为：

1、乳酸乳球菌表达载体的酶切鉴定结果

经 PCR 扩增得到的 2007bp 片段经胶回收纯化，与载体质粒同时用相应的限制性内切酶进行双酶切并以胶回收试剂盒进行回收纯化后进行 16℃ 过夜连接，连接产物电转化入宿主菌 NZ9000，阳性重组质粒 PCR 鉴定后得到约 2000bp 的目的片段，单双酶切鉴定后分别得到与预期结果相一致的 5300bp、2000bp 和 3300bp 的目的片段 (见图 1)。序列测定结果分析表明 TGEV S 基因已插入到表达载体质粒中。获得的阳性重组菌命名为 pNZ8112-Sa/NZ9000 菌株。

2、 TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达及蛋白检测

对重组的 pNZ8112-S/NZ9000 菌株和 pNZ8112/NZ9000 空质粒的菌的诱导结果表明, 重组蛋白获得了表达, 蛋白大小约在 66KDa 左右。通过 Western-blot 检测表明重组蛋白具有与 TGE 全病毒制备的抗血清发生反应的能力, 并具有良好的特异性, 即反应原性。见图 2。光密度扫描分析测定蛋白表达效率, 表达的 TGEV S 蛋白在适宜表达条件下, 光密度扫描分析表达蛋白含量为 9.0%, 见图 3。

3、 TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达间接免疫荧光检测结果

以 pNZ8112-Sa/NZ9000 重组菌和 pNZ8112/NZ9000 对照菌所进行的间接免疫荧光实验结果表明, 重组菌 pNZ8112-Sa/NZ9000 荧光显微镜检查可见明显的黄绿色荧光(图 4), 由此也表明, 重组菌所表达的外源蛋白是存在于菌体的表面位置; pNZ8112/NZ9000 未发现绿色荧光, 菌体被染成红色(图 5)。

光密度扫描分析测定蛋白表达效率, 表达的 TGEV S 蛋白在适宜表达条件下, 光密度扫描分析表达蛋白含量见图 3。

基于 TGEV 的肠道致病特点和粘膜免疫特点, 本发明以 TGEV 起主要免疫保护作用的囊膜蛋白基因(S 基因)主要抗原位点片段 Sa 插入到乳酸菌表达载体, 构建了表达 TGEV S 蛋白的重组乳酸菌表达系统, 以期获得 TGEV 口服活菌疫苗, 依靠乳酸菌天然的抗菌抗腹泻作用和 S 蛋白刺激的特异性粘膜免疫作用, 达到预防本病的目的。

(四) 附图说明

图 1 是重组质粒 pNZ8112-Sa 的酶切及 PCR 鉴定图。

图 2 是表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。

图 3 是重组菌株 pNZ8112-Sa/NZ9000 蛋白表达含量光密度扫描分析。

图 4 和图 5 表达产物的间接免疫荧光检测 (40×)。

(五) 具体实施方式

下面结合附图举例对本发明做更详细地描述:

1. TGEV S 基因乳酸乳球菌表达载体的构建

以质粒 pUC-S 为模板, 以 TS7 和 TS8 为引物扩增含有 TGEV S 基因 A、B、C 和 D 主要抗原位点的片段, 命名为 Sa, Sa 基因与 pNZ8112-Sa 载体质粒进行酶切、连接并经电转化转入感受态细胞 NZ9000, 获得含有重组质粒的乳酸乳球菌命名为 pNZ8112-Sa/ NZ9000。

2. TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达

pNZ8112-Sa/NZ9000 阳性重组菌及 pNZ8112/NZ9000 空质粒对照菌, 接种于 GM17 液体培养基中, 30℃ 厌氧培养过夜后, 取过夜培养物以体积比 1: 25 比例接进行扩增培养于 20 ml 培养基中, 30℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4 左右; 取 10 ml 细菌培养液用质量浓度 1ng/ml 的乳链杆菌肽 Nisin 诱导 2-3h。终止培养后得到保藏在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为 CCTCC NO: M 207020, 命名为 *Lactococcus lactis* NZ9000/pNZ8112-Sa/NZ9000 的重组乳酸乳球菌。分别取出 1ml 样品经溶菌酶处理后进行 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析。

3. 间接免疫荧光检测

取 12 小时培养的阳性重组菌和空载体对照菌液体培养物 0.5ml 离心去上清后, 分别用 PBS 低速离心洗三次, 加入兔源抗 TGEV 抗血清, 悬浮混合后 37℃ 作用

30 分钟，离心去上清，PBS 离心洗菌体三次，加入稀释的含有伊文思蓝的抗兔异硫氰酸荧光素 (FITC) 荧光标记二抗，悬浮混合后 37℃ 作用 30 分钟，离心去上清，PBS 离心洗菌体三次，菌体沉淀物悬浮在 200 μ l PBS，取适量涂片，自然干燥后，冷丙酮固定 30min 后，干燥后荧光显微镜观察。

TGEV 感染具有明显的嗜肠性。病毒粒子表面的纤突蛋白 (S 蛋白) 与存在于肠上皮细胞顶膜的氨基肽酶 (APN) 的结合是感染发生的首要条件；粘膜免疫是本病特异性免疫应答的主要特征，肠道粘膜表面 sIgA 含量的高低直接决定临床疾病的发生和疾病严重程度。乳酸菌作为表达和传递异质性抗原的活载体系统具有许多优点，如载体对动物本身是安全的，而大肠杆菌、沙门氏菌作为活载体系统就不能称谓安全的生物制剂；某些乳酸菌又可合成一些生物活性物质和多种有机酸类，这些物质本身具有抑菌抗菌、抗腹泻作用。

本发明针对 TGE 发生和免疫的几个特点，在实验设计上以阻断肠道传染性疾病病原感染的第一道防线为目的，利用安全无毒的乳酸菌表达系统在肠道黏膜上黏附、定植和表达及传递抗原物质，因而抗原物质对粘膜的免疫刺激作用更接近于病毒的自然感染途径，因此所产生的粘膜免疫保护效果将更为理想。本发明中构建了冠状病毒 TGEV S 蛋白乳酸乳球菌表达载体系统，表达了含有 TGEV S 蛋白 A、B、C、D 四个主要抗原位点的约 66KDa 的目的蛋白，免疫印迹实验和间接免疫荧光试验均表明，所表达的外源蛋白能够与 TGEV 免疫血清发生反应，表明重组 S 蛋白与 TGEV 天然抗原一样具有相同的抗原性。

目前普遍认为，在宿主细胞表面表达外源抗原是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式。本发明所使用的 pNZ8112 表达载体，具有单链分泌信号肽 ssUSP，属分泌型表达载体。经诱导表达后，对其培养物上清液 10 倍浓缩后进行目的蛋白的检查，结果未检测到表达的 S 蛋白，菌体裂解物经 SDS-PAGE 电泳可见在预期的分子量大小有目的蛋白的表达，Western-blot 检测也证实表达蛋白存在于菌体上，诱导表达后的活菌体免疫荧光试验表明，所表达的蛋白初步定位于菌体的表面，存在菌体表面的目的蛋白，为抗原物质有效刺激免疫系统，提高抗体水平奠定了重要的物质基础。

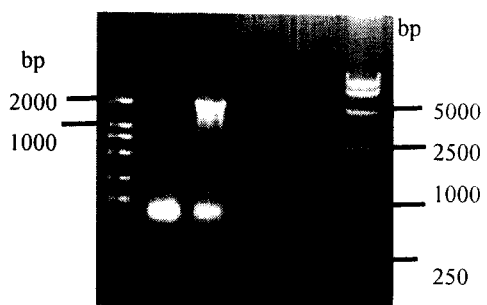


图 1

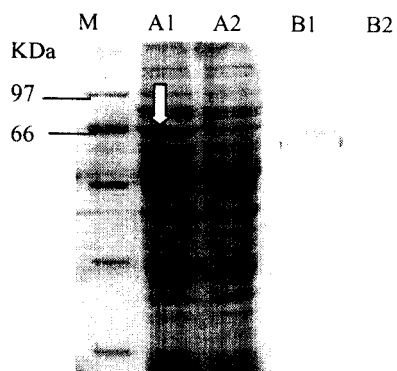


图 2

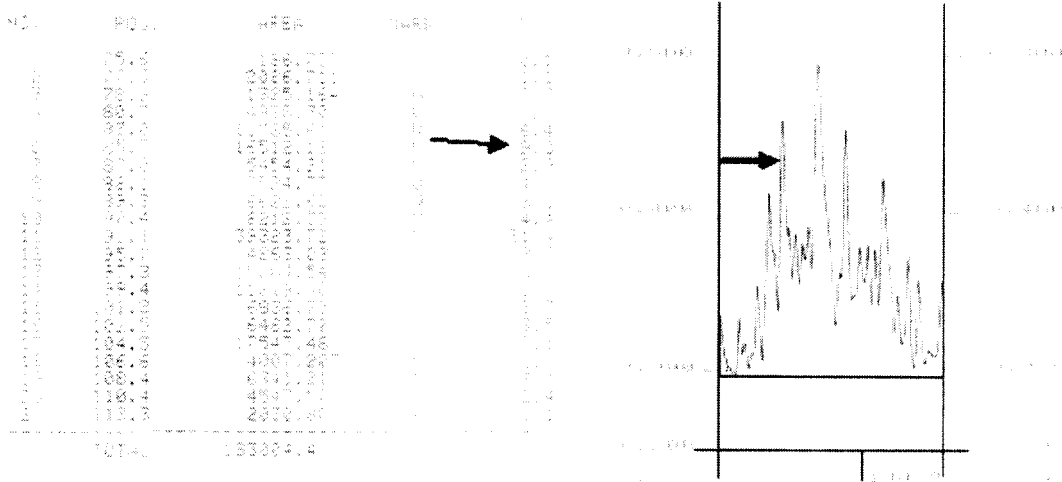


图 3

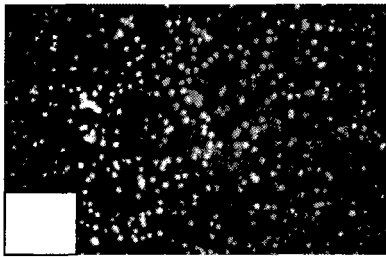


图 4



图 5

专利名称(译)	表达猪传染性胃肠炎病毒S蛋白的重组乳酸乳球菌及制法		
公开(公告)号	CN101058798A	公开(公告)日	2007-10-24
申请号	CN200710089251.1	申请日	2007-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	唐丽杰 李一经 葛俊伟 欧笛		
发明人	唐丽杰 李一经 葛俊伟 欧笛		
IPC分类号	C12N1/21 C12N15/33 C12N15/09 C07H21/04 C12N15/74 G01N33/53		
优先权	200710071615.3 2007-01-09 CN		
其他公开文献	CN100567477C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供的是一种表达猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)纤突S蛋白的重组乳酸乳球菌的方法。根据猪传染性胃肠炎病毒S蛋白的全基因序列及表达载体质粒的基因融合特点,设计一对引物,进行PCR,获得含有TGEV S基因4个主要抗原位点的2007bp目的片段,将其与分泌表达的载体质粒pNZ8112进行连接,通过电转化进入宿主菌乳酸乳球菌NZ9000细胞内,在乳糖菌肽的诱导下进行表达。本发明中构建了冠状病毒TGEV S蛋白乳酸乳球菌表达载体系统,表达了含有TGEV S蛋白A、B、C、D四个主要抗原位点的约66KDa的目的蛋白,免疫印迹实验和间接免疫荧光试验均表明,所表达的外源蛋白能够与TGEV免疫血清发生反应,表明重组S蛋白与TGEV天然抗原一样具有相同的抗原性。

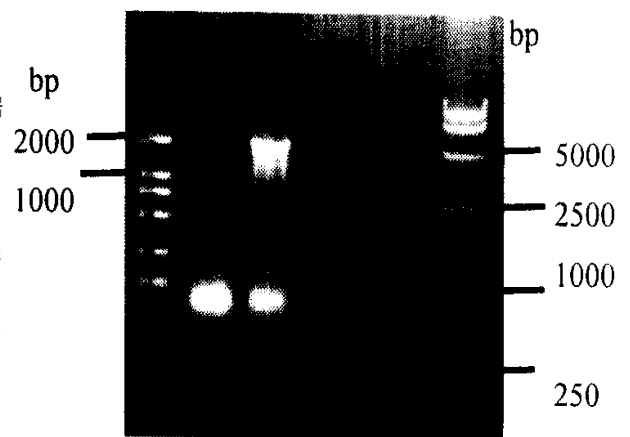


图 1