

猪瘟病毒 E2 蛋白在酵母中分泌表达条件的优化

韩雪清^{1,2}, 刘湘涛¹, 任芳丽², 冯卫权³, 张涌⁴, 谢庆阁¹

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽传染病重点实验室, 兰州 730046;

2. 清华大学生物系; 3. 深圳市动物食品卫生检验监督所; 4. 西北农林科技大学生物工程研究所)

摘要: 影响外源基因在毕赤酵母中表达的因素很多, 除了基因序列本身的内在特性外, 表达条件对外源基因的表达量的高低也有着极显著的影响。本文对猪瘟病毒 E2 基因在毕赤酵母中不同的时间、不同的诱导型、不同的 pH、不同的诱导剂量等方面表达量的差异进行了详细对比研究。结果表明, 诱导后 72~96 h, 重组 E2 蛋白的表达量最高。与单纯甲醇诱导相比, 甘油/甲醇诱导后的表达量明显提高。在 pH7.5 和 pH8.0 表达 E2 蛋白是比较合适的。甲醇浓度在 3% 左右时 E2 蛋白的表达量较高。

关键词: 猪瘟病毒; E2 蛋白; 酵母; 表达条件; 优化

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)06-0567-06

猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)是引起 CSF 的病原体。CSFV 的 RNA 全长约 12 300 个碱基, 由 11~12 个基因组成, 其中 E2 基因编码的外膜糖蛋白 gp55 是主要免疫原蛋白, 可诱导动物产生有效的免疫保护。在全部的结构蛋白中, gp55 引起的中和效力最强, 而且 gp55 的抗原结构业已研究清楚^[1,2], 因此, gp55 是目前用于基因工程疫苗的最好材料。我们已报道了利用毕赤酵母(*P. Pastoris*)成功表达 CSFV 遗传树中 Group 1 中代表毒株 shimen 株 E2 基因, 而且进行了密码子优化。用 *P. Pastoris* 系统表达外源基因, 虽然运用的都是相同的 Aox1 启动子, 但对于不同的外源蛋白, 表达量千差万别。虽然许多蛋白质在 *P. Pastoris* 中可高效表达, 如明胶表达量高达 14.8 g/L^[3], 但仍有一些蛋白质表达量相对较低, 如 β -cryptogein 表达量约为 1~5 mg/L^[4]。同一表达系统, 对于不同的外源蛋白, 表达量千差万别。一方面是外源基因序列本身的内在特性起着很重要的作用; 另一方面, 表达条件对表达量高低的影响也极其显著。除外源基因序列本身的内在特性如 A+T 含量、低频利用密码子、外源基因的长度等起着很重要的作用外, 表达条件对表达量高低的影响也极其显著^[5]。首先考虑的因素是载体的选择, 一般选分泌型、高拷贝标记, 易操作的穿梭载体, 如本实验所用的载体 pPIC9K。

其次需要考虑菌株及其表型, 一般首选蛋白酶缺失型菌株, 如本实验所用的 SMD1168, 有报道使用 SMD1168 较之使用 GS115 提高两倍。重组菌的表型方面, 对于分泌表达, Mut⁺ 和 Mut^s 无明显差别, 但在高生物量的发酵中, Mut⁺ 生长更快, 较之 Mut^s 对于提高外源蛋白的产率更有效。除这些普遍的规律之外, 对于不同的基因需要独特的表达条件。因此, 为了使外源基因在毕赤酵母中获得尽可能高的表达, 非常有必要进行表达条件的优化。我们分别在不同的时间、不同的诱导型、不同的 pH、不同的诱导剂量方面进行了较详细的对比研究, 得到了一套较完善的在 *P. Pastoris* 中表达 CSFV E2 基因的优化条件, 以供今后在发酵罐中大规模表达 E2 基因蛋白生产亚单位疫苗时参考。

1 材料和方法

1.1 毒株、菌株与表达系统 CSFV 标准强毒石门株, 引自农业部中国兽药监察所; *E. coli* DH5 α 由本室保存; SMD1168 酵母菌和 pPIC9K 分泌型表达载体由中国科学院微生物研究所田波院士惠赠。

1.2 酶与试剂 限制酶, T4 DNA 连接酶等工具酶为 Promega 公司产品; G418、YNB 为 Invitrogen 公司产品。

1.3 引物的设计与合成 根据石门强毒核苷酸序列^[6], 利用 DNASTar 软件, 设计正、负方向的两条引物, 并引入酶切位点 EcoR I 和 Not I。引物由中国科学院微生物研究所合成。

收稿日期: 2002-11-01

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目资助

作者简介: 韩雪清(1962-), 女, 甘肃兰州人, 副研究员, 博士后, 研究方向: 病毒分子生物学和病毒生物大分子结构和功能。

表 1 PCR 扩增引物的序列

Table 1 The sequences of the primers for PCR

引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence	长度(nt) Length
E2	5' AGGGGACAGATCGTGCAA3'	18
E2	5' GCCGAGTTGTTCTGTTAG3'	18
P ₁	5' GCGAATCCGTCTAGCCTGCAAGGAAGAT3'	29
P ₂	5' GCCCGCGCCGCTGATTAGGCTCACCGTCAG3'	30

1.4 猪瘟病毒石门毒 E2 基因的克隆和鉴定 将种毒接于 PK 细胞上 48 h, 细胞数约为 10^8 后, 参照 Chomczgnski 方法收集细胞, 然后利用 GIBCOBRL 公司的 TRLzol 试剂提取总 RNA, 并按文献[7]的方法扩增 E2 基因片段。

1.5 E2 基因的改造 去除 E2 基因中起细胞锚定作用的 C 末端跨膜区, 以确保 E2 基因的表达产物有效地分泌到培养上清中。根据酵母密码子偏爱性^[8], 还需将 E2 基因中在 P. Postoris 中利用率几乎为零的 CGG 和 CGC 突变为 CGT, 以免低利用率密码子在翻译过程中产生瓶颈效应。在 E2 基因中除 5' 端和 3' 端跨膜区上游区域的序列外, 其它部位没有 CGG 和 CGC。以 P1 和 P2 作为引物进行 PCR 扩增, 去除 E2 基因跨膜区, 并对上述的两个低利用密码子进行突变。

1.6 重组转移质粒载体的构建^[9,10] 将鉴定后的 E2 基因和 pPIC9K 质粒用 EcoR I 和 Not I 酶切。然后在 1% 进口琼脂糖凝胶上进行电泳, 用玻璃奶 DNA 快速纯化回收试剂盒 (PURIGENE 北京原平皓生物技术有限公司) 回收纯化目的基因片段。纯化的 E2 片段与 pPIC9k 质粒分别用 EcoR I 和 Not I 双酶切后, 分别回收纯化大片段, 混合后用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 进行连接 (见图 1)。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌, 涂于含羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 37℃ 培养过夜。随机挑选 5 个阳性菌落进行 PCR 鉴定, 将扩出目的条带的菌落, 再进行增菌培养后小量提取质粒。

1.7 酵母细胞的转化及阳性转化子的筛选 重组酵母表达载体经 Sal I 线性化, 电穿孔法转化 SMD1168, 经 MD 平板筛选得到 His 克隆再经不同浓度 G418 的 YPD 平板上挑选高拷贝克隆, 以备用于诱导表达目的蛋白。

1.8 重组酵母菌株的诱导表达 选一高拷贝菌株和低拷贝菌株各 2 株接于 20 mL BMGY 培养基中 (装于一个 250 ml 的三角瓶中) 28~30℃ 摇床培养

过夜 (16~18 h) 转速为 250~280 r/min。当 OD₆₀₀ \approx 2~6 时, 即酵母处于对数生长期, 室温离心 6 000 r/min, 5 min, 收集菌体, 再用 50 mL 的 BMGY 重悬菌体, 加甲醇使其终浓度为 0.5%, 28~30℃ 摇床培养。每隔 24 h 补加甲醇使其终浓度为 0.5%, 直到 96 h 为止。表达物 4℃ 5 000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀。上清中加 60% 研磨细的固体硫酸铵 4℃ 沉淀 E2 蛋白, 用 20 ml pH7.6 Tris·HCl 透析, 至彻底透净盐离子, 然后进行 SDS-PAGE 及 Western-blotting。

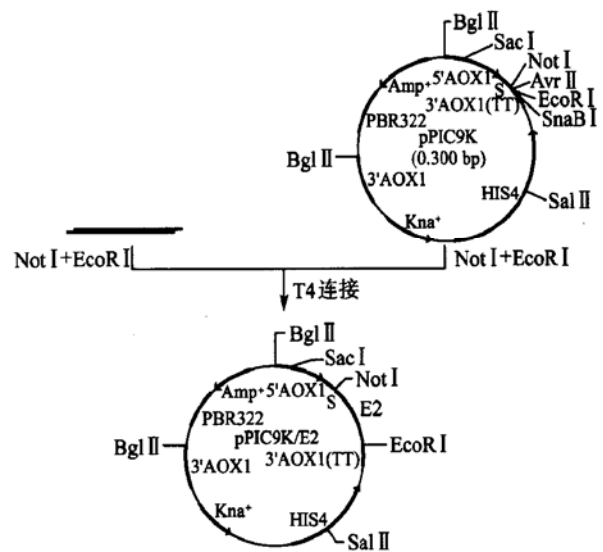


图 1 E2 基因重组酵母表达载体构建策略图

Fig.1 Strategic map of constructing recombinant expression plasmid of E2 gene

1.9 诱导后不同时间内的表达 挑取筛选的含有高拷贝的目的基因重组子接种 100 mL BMGY 培养液中, 方法同 1.8。每 24 h 取样 5 mL 表达上清液, 并补加甲醇至终浓度为 1%。将 24.48.72.96 h 的表达上清用硫酸铵处理, 方法同 1.8。

1.10 不同诱导型诱导表达 同时用两个容量相同的三角瓶, 在相同体积的 BMGY 中表达同一株重组子菌株。I 号瓶按常规方法诱导, 即在达到生长极限时用甲醇培养基并加甲醇诱导, 每 24 h 补加甲醇到终浓度 1%, 96 h 后诱导结束; II 号瓶只是在转变期加入 0.5% 甘油, 并同时加入 1% 的甲醇诱导, 即甘油和甲醇混合补料。同样每 24 h 混合补加, 96 h 后诱导结束。然后, 离心收集上清, 硫酸铵沉淀、透析 SDS-PAGE 电泳。整个过程同 1.8。

1.11 在不同 pH 的培养液中的诱导表达 分别配制 pH6.0、pH6.5、pH7.0、pH7.5、pH8.0 的 BMGY 甲醇培养液。取 5 个相同容量的三角瓶 (100 mL),

分别加 30 mL 的不同 pH 在 BMMY 瓶中, 加入等量的复苏重组子菌株, 甲醇诱导表达, 每 24 h 补充一次甲醇, 使终浓度为 1%, 96 h 后诱导结束。表达产物处理同 1.8。进行 SDS-PAGE 电泳。

1.12 不同剂量甲醇的诱导表达 取 5 个相同容积的三角瓶, 分别加 30 ml 的 BMMY 甲醇培养液在瓶中, 加入等量的复苏的重组子菌株, 分别用 0.5%、1%、2%、3%、3.5% 不同剂量的甲醇进行诱导表达, 每 24 h 补一次甲醇, 使其终浓度分别为 0.5%、1%、2%、3%、3.5%, 96 h 后诱导结束。离心收集上清, 硫酸铵沉淀、缓冲液透析。分别 SDS-PAGE。整个过程同 1.8。

2 结果

2.1 E2 基因克隆鉴定 经 RT-PCR 得到完整的 E2 基因, 其电泳结果见图 2, 经进一步测序证明其核苷酸序列正确(结果略), 为 1034 bp。

2.2 高拷贝克隆的挑选 在含 G418 5 mg/mL 的 YPD 上, 多拷贝重组菌生长良好。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 两个样品经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 从图 3(A) 中

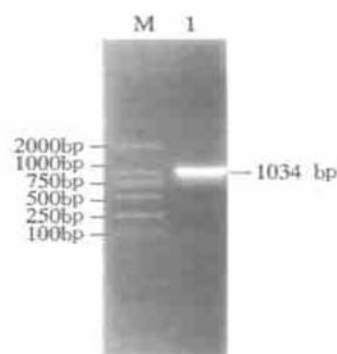


图 2 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.2 The result of agarose gel electrophoresis of amplified product

M. 标准分子量 DL2000 1. PCR 扩增产物

可见 56KDa 处有一表达条带, 大小与 E2 的推导分子一致。在图 3(B) 中 Western blot 结果在 56KDa 处有明显的杂交带而对照组杂交呈阴性, 说明酵母细胞表达产物能与猪瘟疫血清特异性结合。表达的 E2 蛋白占酵母培养原液总蛋白的 7%, 含量为 0.25 g/L。对照菌培养液是未经诱导的, 因此菌体蛋白很少, 一经诱导, 菌体蛋白和目的基因同时表达, 电泳条带较多。而低拷贝的克隆和 24 h、48 h 的样品均未跑出电泳带。72 h 与 96 h 的基本一样。

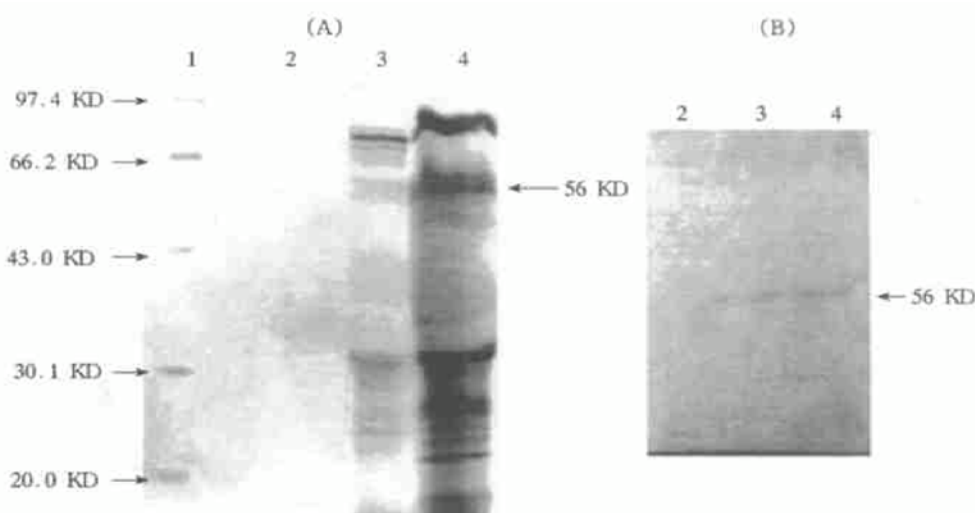


图 3 E2 基因在毕赤酵母中表达的 SDS-PAGE 电泳(A)及 Western-blotting(B)结果

1. 蛋白分子量标准 2. 对照菌上清 3、4. 重组菌样品上清

Fig.3 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of E2 expressed in *Pichia pastoris*

2.4 甲醇诱导后不同时间的表达 利用甲醇诱导后在不同时间表达产物的电泳结果见图 4, 诱导 24 h 几乎看不到蛋白条带, 即重组子表达蛋白的量较低; 诱导 48 h 后表达蛋白的量已上升, 电泳带很清晰, 但不及 72 h 和 96 h; 而诱导 72 h 后非常清晰且

量也大, 诱导 96 h 和 72 h 没有明显区别。

2.5 不同诱导型的表达 采用不同诱导剂进行诱导表达, 表达产物的电泳结果见图 5, 很明显甲醇/甘油(诱导/抑制)诱导比单纯用甲醇诱导其蛋白表达量要明显提高, 蛋白电泳条带也非常清晰。

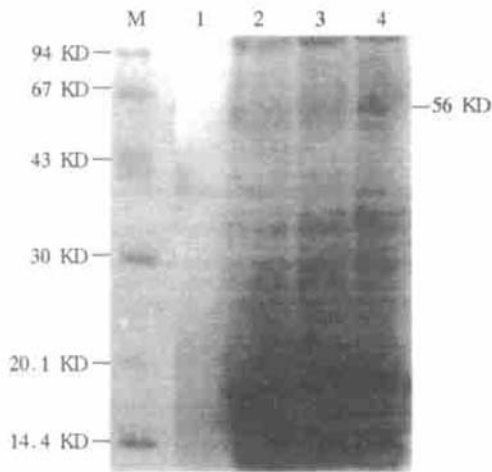


图4 诱导后不同时间内表达产物的电泳结果
M. 蛋白标准分子量
1. 24h, 2. 48h, 3. 72h, 4. 96h

Fig.4 The electrophoresis result of the products expressed within different time after induction

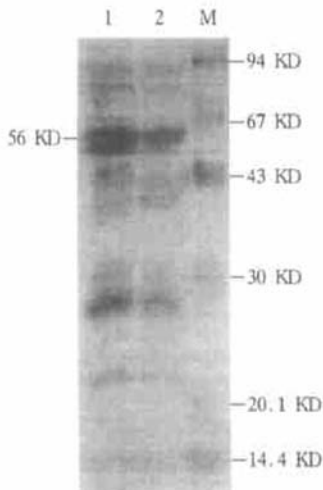


图5 不同诱导剂诱导的表达产物的电泳结果
M. 蛋白标准分子量

1. 甘油/甲醇诱导的表达产物 2. 甲醇诱导的表达产物

Fig.5 The electrophoresis result of the expression products induced with different induction reagents

M.Marker, 1. Expression product induced with glycerol/methanol 2. Expression product induced with methanol.

2.6 不同 pH 的培养液中的表达 图 6 为在不同 pH 培养液中诱导表达的电泳结果。从图中可以看出, pH6.0 的 BMMY 培养液中几乎没有表达目的条带, 杂带也少; 同样在 pH6.5 的 BMMY 培养液中目的蛋白的表达量也很低, 且杂蛋白比较多; 而在 pH7.0 的 BMMY 培养液中目的蛋白表达较多, 蛋白带清晰, 而且杂蛋白非常少; 在 pH7.5 和 pH8.0

的 BMMY 培养液中目的蛋白的表达量最高, 目的蛋白带都很清晰, 似乎 pH8.0 要更好些, 但差别不明显, 杂蛋白的量也相应较高。

2.7 不同剂量甲醇诱导的表达 利用不同剂量甲醇诱导后得到表达产物的电泳结果见图 7, 从电泳带看, 甲醇终浓度 0.5% 时诱导蛋白表达量最低, 表达蛋白量的排列是由低到高, 即 0.5% < 1% < 2% < 3% ≈ 3.5%。

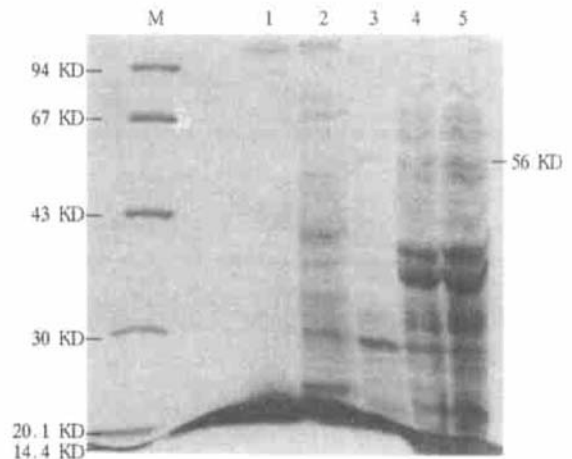


图6 不同 pH 的培养液中的表达
M. 蛋白标准分子量: 1. pH6.0; 2. pH6.5; 3. pH7.0; 4. pH7.5; 5. pH8.0

Fig.6 Induced expression results in different pH medium

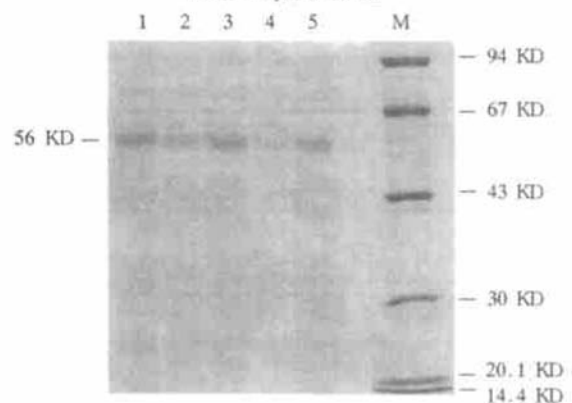


图7 不同剂量甲醇诱导后表达产物的电泳结果
M. 蛋白标准分子量: 1. 3.5%; 2. 1%; 3. 2%; 4. 0.5%; 5. 3%

Fig.7 The electrophoresis result of expression products induced with different doses of methanol

3 讨论

影响外源基因表达的因素很多, 为了将不良影响因素降至最低, 提高表达产量, 本章主要探索影响

诱导表达时的几个因素。

不同时间表达结果显示: 24 h 表达量非常低, 48 h 已经上升, 72 h 和 96 h 达峰值。二者在电泳带上没有明显区别。由此, 可得出结论: 在发酵罐大量表达中, 可以考虑诱导至 72 h 即可, 没必要到 96 h。这样大大缩短了表达时间, 节约了成本, 提高了产量; 另外, 诱导时间短, 外源蛋白的降解也相应少, 从而也提高了产量。

不同诱导型的诱导表达表明: 诱导/抑制的表达产量要比纯诱导产量大一些。这是因为甘油和甲醇混合补料, 即在菌株转变期加入了甘油, 而 Aox1 的表达遵循抑制/诱导规律, 使得这些菌株代谢和合成速率比仅用甲醇诱导时明显提高。崔蕴霞等认为用抑制/诱导法表达人白蛋白产量可占总蛋白的 80%, 产量为 10 g/L, 只是达峰值的时间要长一些, 往往需要 150 h 左右^[11]。我们没有将其延长至 150 h, 仅在统一的 96 h。不过, 甘油的量不能过多, 只能是抑制状态, 否则溶氧供应不足, 容易导致甘油的厌氧发酵而产生乙醇、乳酸等, 对目的外源蛋白表达极为不利^[12]。

不同 pH 的 BMMY 甲醇培养基的表达表明, E2 蛋白在低的 pH 中 (pH6.0, pH6.5) 表达量低, 而在 pH7.0~8.0 中表达量均好。这是因为 pH 对外源蛋白稳定性与活力非常重要^[5]。邱荣德 (1999) 等将起始 pH 由 pH6.0 提高到 pH8.0, 其表达量也提高了 50% 以上^[13]; 同样 Jonsson (1997) 等在研究 *P. Pastoris* 表达时也获得了类似的结果, 诱导表达时 pH 值的控制可能是 *P. Pastoris* 系统高效表达重组蛋白的关键之一^[14]。郭美锦等 (2001) 在表达恶性疟原虫融合抗原时, pH7.0 要比 pH6.0 时表达量提高 9 倍多^[15]。当然这不是说所有的外源蛋白质都是在这个 pH 值时表达量就高, 这还是因外源蛋白本身性质而定。郭美锦等 (2002) 在 *P. Pastor* 中表达人血清白蛋白 (HSA) 时最佳 pH 范围为 5.72~6.59^[16]。而聂东宋等在表达虎纹捕鸟蛛毒素-I 时最佳 pH 范围在 3.0~6.0^[17]。

甲醇需求量与重组菌表型有关; 而表型又与重组载体的线性化有关。重组载体只有酶切线性化, 整合效率才大大提高, 而环状质粒整合效率很低, 选用不同的内切酶线性化可得不同的转化子^[18]。我们在转化时选用的 Sal I 内切酶线性化, 此酶线性化转化后得到的都是 Mut⁺ 表型转化子, 即甲醇利用正常型。这是因此酶切位点在 His4, 质粒载体线

型化后, 一般通过单交换整合进宿主菌染色体, 单交换整合时 Aox1 完整存在, 并不缺失影响, 故利用甲醇正常^[19]。有研究者认为对于 Mut⁺ 每天添加甲醇到 3% 没有什么不良影响^[5]。但也有人认为甲醇浓度过高, 对目的蛋白的表达也有抑制作用。研究结果显示: 甲醇诱导其终浓度为 0.5% 表达量最低, 其次 1%, 最佳是 2% 和 3%, 而 3.5% 和 3% 差不多, 其表达蛋白由低到高的排列是 0.5% < 1% < 2% < 3% = 3.5%。由于是甲醇利用正常型, 所以利用甲醇要比 Invitrogen 手册推荐量 (0.5%) 要高 (2%~3%)。另外, 对于 Mut 在诱导中也在生长, 氧的需求也是非常关键, 但在小型摇瓶中很难达到基本要求。

参考文献:

- [1] Kimman J G. Cellular immune response to hog cholera virus (HCV): T cells of immune pigs proliferate *in vitro* upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen [J]. *J Virol*, 1993, 67, 2922~2927.
- [2] Van Rijn P A. Antigen structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus [J]. *J Gen Virol*, 1994, 68: 3934~3942.
- [3] Mac W T. High yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia Pastris* [J]. *Yeast*, 1999, 15: 1087~1096.
- [4] Michael J O Donbue. Over expression in *Pichia Pastries* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus [J]. *Protein Expression and Purification*, 1996, 8: 254~261.
- [5] 彭毅, 杨希才, 康良仪. 影响甲醇酵母中外源蛋白表达的因素 [J]. *生物技术通报*, 2000, (4): 33~36.
- [6] 李红卫, 涂长春, 金扩世, 等. 猪瘟疫病毒石门株与兔化弱毒株主要保护性抗原 E2 基因的序列测定 [A]. 谢庆阁, 翟中和主编. 畜禽重大疫病免疫防控研究 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 22~26.
- [7] 韩雪清, 李红卫, 刘湘涛, 等. 中国猪瘟疫化弱毒株 (C-株) 兔脾组织毒主要保护性抗原 E2 (gp55) 基因序列分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(1): 52~57.
- [8] Shiping Z H, Geoffrey Z, Emanuel G. Low-usage in *Escherichia Coli*, yeast, fruit fly and primanes [J]. *Gene*, 1991, 105: 61~72.
- [9] Barr K A, Hopkins S A, Streekishna K. Protocol for efficient secretion of HAS developed from *pichia pastoris* [J]. *Pharm Eng*, 1992, 12(2): 48~51.
- [10] David R H, James M, Cregg. *Pichia Protocol* [M]. Humana Press Inc, New Jersey, 1998.
- [11] 崔蕴霞, 明文玉, 银巍, 等. 人重组白蛋白基因在巴

- 斯德毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 244~ 246.
- [12] Wenhui W, Mark A B, Bradley A P, et al. Modeling pichia pastoris growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein. the Heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin ,serotype A [J]. Biothchnology and Biengineering, 2000, 20(1): 1~ 8.
- [13] 邱荣德, 朱建蓓, 王 垒. 人 P53 蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 477~ 481.
- [14] Jonsson L J, Saloheimo M, Penttila M. Laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of locl and expression in *Pichia pastoris*[J]. Current Genetics, 1997, 32(6): 425~ 430.
- [15] 郭美锦, 吴康华, 储 炬, 等. 毕赤氏酵母工程菌高密度发酵表达恶性疟原虫融合抗原的研究[J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 456~ 459.
- [16] 郭美锦, 庄英萍, 储 炬, 等. 重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达 rHSA[J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 62~ 68.
- [17] 聂东宋, 李 敏, 徐辉明, 等. 重组虎纹捕鸟蛛毒素-1 在巴氏毕赤酵母中的表达及纯化[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 172~ 177.
- [18] 彭 毅, 步 威, 康良仪. 甲醇酵母表达系统[J]. 生物技术通报, 2000, (1): 38~ 41.
- [19] 李 晶, 赵晓祥, 沙长青, 等. 甲醇酵母表达系统的研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 17~ 20.

Expression Condition Optimization of CSFV E2 Protein in *Pichia Pastoris*

HAN Xue-qing^{1,2}, LIU Xiang-tao¹, REN Fang-li², ZHANG Yong³, XIE Qing-ge¹
 (1. *The Key Laboratory of Agricultural Minister for Animal Virology, Lanzhou Veterinary Research Institute, CAAS, Lanzhou 730046, China*; 2. *Tsinghua University*;
 3. *Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*)

Abstract: There exist many factors which influence the expression of heterogenous gene in *Pichia pastoris*, except the internal characters of heterogenous gene sequence itself, the expression conditions also have great influence on the expression yield. The yield of E2 gene of classical swine fever virus in *Pichia pastoris* at different growth phase, different inducible pattern, pH value and the amount of inducible reagent respectively were compared. The results indicated that, the expression quantity of recombinant E2 protein is highest between 72 and 96 hours after induction. Compared with those induced only with methanol, pattern of inhibition/ induction could improve expression level observably. The most suitable pH value were between 7.5 and 8.0 and the optimized methanol induced concentration was 2% ~ 3%.

Key words: Expression condition optimization; E2 protein; Classical swine fever virus; *Pichia pastoris*