

恶性疟裂殖子表面蛋白 1 合成基因在毕赤酵母中的表达

张冬梅² 潘卫庆¹ 陆德如²

(¹ 第二军医大学病原生物学教研室 ;² 医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

摘 要 恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 是当今疟疾疫苗主要的候选抗原。由于天然 MSP1 基因 AT 含量异常高 (为 74%), 使得克隆全长天然基因无法实现。本文已全合成了 *m*sp1 基因(4940bp), 解决了该天然基因在异源系统中不稳定的问题。为制备大量 *m*sp1 重组蛋白进行疫苗有效性试验, 本研究建立了 *m*sp1 基因在毕赤酵母中的表达, 将合成的 *m*sp1 基因克隆到毕赤酵母胞内表达载体 pPIC3.5, 构建了重组质粒 pPIC3.5/*m*sp1, 用电击转化毕赤酵母得到重组转化子, 经 PCR 证实 *m*sp1 基因已整合于毕赤酵母染色体中。含有重组表达质粒的毕赤酵母菌经甲醇诱导后表达出全长 *m*sp1 重组蛋白。表达产物能与识别 MSP1 分子二硫键依赖构象表位的特异性单抗发生很强的反应, 表明 *m*sp1 重组蛋白至少在该表位构象上与天然蛋白一致。从毕赤酵母中分离得到大量 *m*sp1, 为开展该蛋白的结构与功能, 特别是测定其疟疾保护性免疫提供可能。

关键词 毕赤酵母 恶性疟原虫 疟疾疫苗 裂殖子表面蛋白 1

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0723-04

疟原虫裂殖子表面蛋白 1(MSP1) 是分子量约 200kD 的糖蛋白。由于该抗原能诱导很强的疟疾保护性免疫^[1-5], 因而被认为是当今疟疾疫苗主要的候选抗原。然而, 由于该抗原基因 AT 含量异常高 (为 74%), 使得该基因在异源系统中极不稳定, 至今仍无法克隆到完整 MSP1 基因。我们已成功地全合成了 4940bp *m*sp1 基因, 该合成基因的 AT 含量降为 55%, 并能稳定存在于多种异源系统中^[6]。本文报道了在毕赤酵母中表达出全长 *m*sp1 重组蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、质粒 pBlue-scriptks/+ 为本实验室保存; 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)SMD1168 和质粒 pPIC3.5 购自 Invitrogen 公司。限制酶、T4DNA 连接酶购自 Promega, MBI, Biolabs 公司; TaqDNA 聚合酶购自 Boeringer Mannheim 公司, 测序试剂盒购自 Promega 公司, 质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司, 其它生物化学试剂购自本市试剂商店。

1.2 方法

1.2.1 分子克隆、PCR 扩增、质粒抽提、酶切、片段回收、连接、转化、琼脂糖电泳、核酸序列分析等均参照《分子克隆实验指南》手册或相应试剂盒说明书进行。

1.2.2 重组质粒转化入酵母细胞及鉴定 毕氏酵母菌株 SMD1168 单克隆菌入 YPD 培养基(1% 酵母浸出粉、2% 多聚蛋白胨、2% 葡萄糖) 中培养至 OD 值 1.5 后离心收集菌体、用电穿孔法进行转化, 转化菌液涂布于 RDB 平板(18.6% 山梨醇, 2% 葡萄糖, 1.34% YNB, 0.00004% 生物素, 0.005% 多种氨基酸混合液) 30℃ 培养直至转化子出现。

1.2.3 重组质粒在毕赤酵母中的诱导表达 将含有重组表达质粒的 SMD1168 菌接种入 MGY 培养基中(1.34% YNB, 1% 甘油, 0.00004% 生物素), 培养至 OD 值 2~6 时, 更换为 BMMY 培养基(1% 酵母浸出粉, 2% 多聚蛋白胨, 0.1mol/L 磷酸缓冲液 pH6.0, 1.34% YNB, 0.00004% 生物素, 0.5% 甲醇), 每天补加甲醇至终浓度 0.5%。不同时间点样进行表达产物的检测。

1.2.4 表达产物的检测 用玻璃珠加超声破碎法制

收稿日期: 1999-12-04, 修回日期: 2000-07-10。

基金项目: 国家“九五”863 计划(102-07-04-04) 和联合国计划开发署/世界银行/世界卫生组织热带病研究和训练特别计划(TDRID980260) 资助项目。

备细胞抽提液经 SDS-PAGE 分离后电转移至硝酸纤维素膜上,用 mAb5.2 特异性单抗识别表达产物,第二抗体是碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG,用 NBT/BCIP 底物显色。

2 结 果

2.1 表达质粒的构建

考虑到在毕赤酵母系统分泌表达 200kD 蛋白的实际困难,我们采用了非分泌型表达载体 pPIC3.5。为使目的基因插入该表达载体并能有效表达,我们对全合成 *msp1* 基因按图 1 进行改造,去掉该基因 5'端信号肽序列,并在该基因起始处加上起始密码 ATG。为此,我们合成了一对引物, P_1 : GC, GGA, TCC, ATG, GTG, ACC, CAC, GAA, TCC, TAT, CAG 和 P_2 : CAGC, CTG, TTC, CAG, AAG, GAG 扩增了该基因 5'端一个 90bp 的片段,并利用 97 位置上 *Hind* III 位点将该片段 5'端 40bp 的小片段与 *msp1* 基因 58~4940 片段连接,产生的基因已缺失 57bp 信号肽序列并在其 5'端带有 *Bam*HI-ATG 序列,这样,用 *Bam*HI 和 *Not*I 位点将 *msp1* 基因插入到 pPIC3.5 相应的位点(图 1),构建了 pPIC3.5/*msp1* 重组质粒。经转化大肠杆菌并用 *Bam*HI 和 *Not*I 鉴定为正确插入(图 2)。序列分析了该基因 5'端 PCR 扩增片段及连接点的序列,结果序列正确。

2.2 表达质粒转化及插入酵母染色体

由于毕赤酵母表达系统在本实验室是新建立的系统,因此我们比较了不同的转化方法和条件以建立适合本室应用的转化方法。我们分别采用了氯化锂法,PEG-1000 法和电穿孔法转化酵母细胞。结果表明,尽管前两种方法简便、成本低,不需要特殊设备,但转化效率很低、难以得到足够数量的转化子以满足实验需要,而用电穿孔法转化取得了满意结果。本实验电穿孔转化法使用的参数是:电压 1500V,电容 25μF,电阻 200Ω,采用 0.2cm 电极杯,内盛转化细胞的容积以 100μL 为最佳。

pPIC3.5 表达质粒为整合型,需插入酵母染色体才能稳定存在。我们在该载体酵母乙醇氧化酶 1 (AOX1) 基因处进行线性化,这样有利于该质粒能插入酵母染色体相应的基因处,由此得到的转化子在以甲醇为碳源的培养基中菌的生长速度缓慢(*Mut^s* 型)。我们利用位于 AOX1 启动子中的 *Nsi*I 酶切位点将 pPIC3.5/*msp1* 重组质粒线性化,并转化酵母细胞。我们共检测 3 个转化子,结果均为

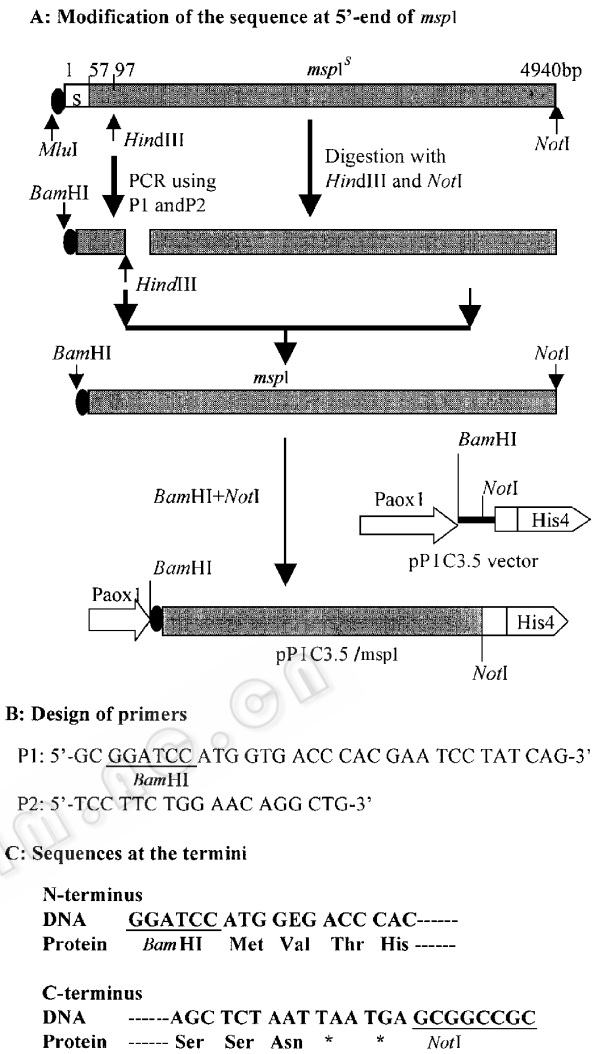


图 1 pPIC3.5/*msp1* 表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of pPIC3.5/*msp1* expression plasmid

● An initiating codon ATG; Paox1 *aox1* promoter; His4 Histidino dehydrogenase gene; * Stop codon

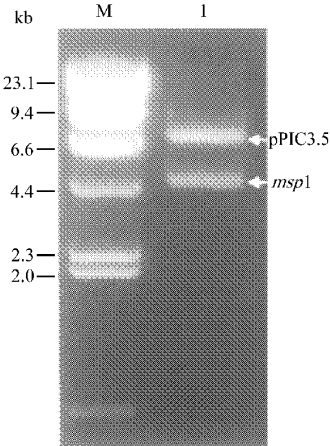


图 2 pPIC3.5/*msp1* 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant

Mut^s 型,抽提酵母基因组总 DNA,用一对 *msp1* 基因内部引物(引物序列:5′引物:CTCAACCTAA-GAAGCCTGC;3′引物:TCCTCGGTGCATT-TAGCATC)进行 PCR 扩增,得到与预计值一致(1147bp)的单一一条带(图 3),这表明该表达质粒已插入毕赤酵母染色体。

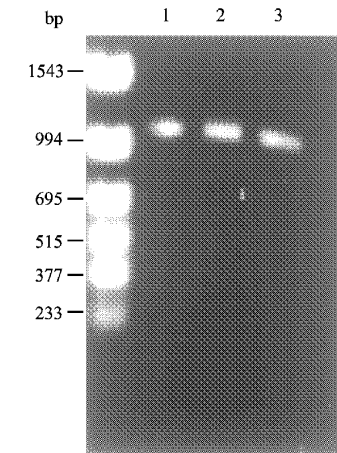


图 3 PCR 分析 pPIC3.5/*msp1* 质粒插入的转化子

Fig. 3 PCR analysis of three *Pichia* integrants of the *msp1* gene
1~3. *msp1*-derived fragments from the three *Pichia* integrants, respectively

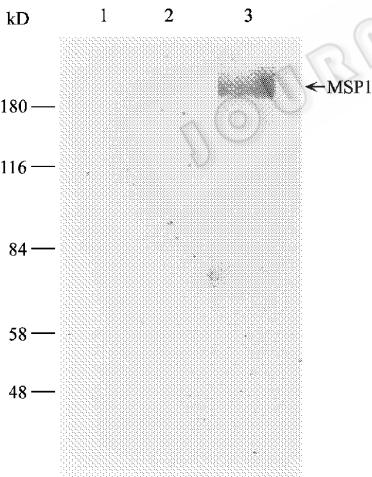


图 4 免疫印迹法检测 *msp1* 基因的表达产物

Fig. 4 Western blot analysis of the expression of *msp1* gene

1. Untransformed SMD 1168 2. Before induction;
3. After induction

2.3 *msp1* 基因的诱导表达

我们对有 *msp1* 基因插入的 pPIC3.5/*msp1* 菌株进行甲醇诱导表达。该菌先生长在以甘油为碳源的培养基,待酵母生长密度 OD₆₀₀ 达 5 时改用以甲醇为碳源的培养基。我们比较了每隔 12h 收集菌体表达产物的检测结果,表明该重组蛋白在诱导后 144h 表达量最高。经 144h 诱导后收集菌体,用玻璃珠加超声破碎法制备细胞抽提液,用 SDS-PAGE 和免疫印迹法检测,结果显示诱导后样本约 200kD 处可见一条强阳性反应条带,而诱导前及未转化菌样本无反应带(图 4)。此外,单克隆抗体 *mAb5.2* 识别 *MSP1* C-末端构象表位,该抗体能与毕赤酵母表达 *msp1* 重组蛋白产生强的免疫反应,这表明该重组蛋白至少在该相当重要表位上与天然 *MSP1* 蛋白一致。

3 讨 论

尽管我们已在大肠杆菌及哺乳动物细胞中表达出全长的 *msp1* 重组蛋白,但这些表达系统产生的重组蛋白不能满足我们将要进行的疫苗有效性试验的需要。这是因为 *MSP1* 存在多对二硫键,特别在该分子的 C-末端有两个表皮生长因子样结构^[7],并有证据表明,*MSP1* 产生的疟疾保护性免疫依赖于该分子正确二硫键的形成^[8]。大肠杆菌表达系统虽然能产生大量重组蛋白,但在二硫键形成方面的能力较弱。哺乳动物细胞表达系统表达产量极低,难以产生足够的重组蛋白用于疫苗试验。毕赤酵母是新近发展起来的高水平真核表达系统^[9],该系统具有与哺乳动物细胞相似的二硫键形成等翻译后加工能力。本研究已在该系统中表达出全长的 *msp1* 重组蛋白。更为重要的是,*mAb5.2* 单抗是识别该分子 C-末端二硫键依赖的构象表位,本研究产生的 *msp1* 重组蛋白能与该单抗发生很强的反应,推测从毕赤酵母中产生的 *msp1* 重组蛋白在构象上接近天然蛋白。此外,尽管 *MSP1* 含有 12 个糖基化位点,但该蛋白在天然宿主中未被糖基化^[10]。胞质内表达的蛋白不进入内质网及高尔基体因而亦未发生糖基化,这样胞内表达的 *msp1* 在糖基化方面应更接近天然蛋白。我们目前正在纯化毕赤酵母表达的 *msp1* 重组蛋白,并测定其免疫保护作用,包括疟原虫体外抑制试验及体内攻击试验。

参 考 文 献

[1] Majarian WR ,Daly T M ,Weidanz W P ,et al. J Immunol. 1984 ,132 3131~3138
[2] Lew A M ,et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 ,86 3768~3776
[3] Chang S P ,Gibson H L ,Leeng C T et al. J Immunol ,1992 ,149 548~556
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals. im. ac. cn

- [4] Blackman M J ,Heidrich H G ,Donache S et al. J Exp Med ,1990 ,**170** :379~382
- [5] Holder A A ,Sandhu J S ,Hillman Y et al. Parasitology ,1987 **94** :199~204
- [6] Pan W ,Ravot E ,Tolle R et al. Nucleic Acids Research. 1999 **27** :1094~1103
- [7] Tschopp J F ,Sverlow G ,Kosson R et al. Bio/Technology ,1987 **5** :1035~1039
- [8] Chang S P ,Case S E ,Gosnel W L et al. Infect Immunol ,1996 **664** :753~759
- [9] Buckholz R G ,Gleeson M A G ,Anal Chem ,1991 **9** :1067~1072
- [10] Dieckmann-Schuppert A ,Bender S ,Odental-Schnittler M et al. Eur J Biochem ,1992 **205** :815~825

Production of the Major Merozoite Surface Protein 1(MSP1) of *Plasmodium falciparum* in *Pichia pastoris*

ZHANG Dong-Mei² PAN Wei-Qing¹ LU De-Ru²

(¹ Department of Aetiology Biology and ² Institute of Medical Biotechnology & Molecular Genetics of
Second Military Medical University ,Shanghai 200433)

Abstract The major Merozoite Surface Protein 1(MSP1) of *Plasmodium falciparum* is an important candidate for malaria vaccine. Highly instability of msp1 gene due to its unusual high AT content (74%), however, render cloning of the full-length of this gene impossible. Synthesis of the entire gene using other codon usage has provided possibility to produce the entire MSP1 in heterogeneous system. In this investigation, the entire MSP1 recombinant protein has been expressed in *Pichia pastoris*. Insertion of the synthetic msp1 gene into the *pichia* expression vector pPIC3.5 generated the recombinant plasmid pPIC3.5/msp1 and transformation of the *Pichia pastoris* SMD1168 by electroporation produced recombinant transformants which were verified by PCR amplification of msp1-derived fragment from the chromosome. The recombinant MSP1 derived from *Pichia* was interacted strongly with monoclonal antibody mAb5.2 recognizing the disulfide-bond-dependent conformational epitope at the C-terminus of MSP1 molecule, indicating that the protein generated in this system resembled most likely to native protein at least at this conformational epitope. Availability of isolating the recombinant protein from the yeast provides a possibility to examine the protective potential of the molecule as a vaccine candidate.

Key words *Pichia pastoris* , *Plasmodium falciparum* , malaria vaccine , merozoite surface protein 1