

结核杆菌热休克蛋白 70 在毕赤酵母中的分泌表达与鉴定

彭明利* 凌 宁 许红梅 卿玉玲 任 红

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

摘 要 为获得结核杆菌热休克蛋白 70 在毕赤酵母中的分泌表达。构建了酵母表达质粒 pPIC9K-*hsp70*,并将其线性化后用电穿孔法导入 *Pichia pastoris* GS115,经 PCR 方法筛选出阳性菌落,在 0.5% 甲醇诱导下分泌表达。所得产物经离心收集上清、超滤浓缩脱盐、亲和层析后,分别用 SDS-PAGE、Western blot 和动物免疫实验对上清中的重组 Hsp70 进行鉴定,并考察产物对 DC 的作用。经 SDS-PAGE、Western blot 分析表明表达的 Hsp70 表观分子量为 70kD 并能特异性地与抗-Mt. Hsp70 单抗结合。动物实验表明重组的 Hsp70 能在体诱导免疫应答。重组 Hsp70 能够诱导 DC 成熟并释放 Th1 型细胞因子。摇瓶发酵表达量达 120mg/L,占培养上清 30% 以上。这为研究结核杆菌热休克蛋白 70 的生理功能提供了必要的物质条件。

关键词 结核杆菌热休克蛋白 70, *Pichia pastoris*, 分泌表达, 树突状细胞

中图分类号 R730.51, R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0286-05

肿瘤组织来源的热休克蛋白(Heat shock protein, Hsp)-肽复合物能够激发特异性抗肿瘤免疫,这种特异性是由与热休克蛋白相结合的短肽决定,热休克蛋白自身起着多肽伴侣功能。肿瘤组织 Hsp-肽复合物因纯化复杂和来源受限大大限制了它的应用,现已证实,在体外重组的 Hsp-肽复合物在没有任何佐剂的情况下也能诱导针对所携带抗原肽特异性细胞毒 T 淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)效应。其中应用最为广泛的 Hsp 是结核杆菌 Hsp70 和哺乳动物 gp96。Moroi 等^[1]设计了一系列对 Hsp70 有高度亲和力的杂交肽在体外与其重组,免疫小鼠后获得特异性的免疫应答。E. Roman 等^[2]应用 A 型流感病毒核心蛋白 pNP(206~229)与结核杆菌 Hsp70 在适当的缓冲溶液中重组为复合物,也能引起抗原特异性的 CTL 作用。Srivastava 等^[3]应用体外重组 gp96-VSV(泡状口炎病毒)和 Hsp70-VSV 在动物免疫实验证实了这一观点。

此外, Hsp70 还能诱导 APCs 成熟,尤其是 DC 细胞。Maria 等^[4]证实重组人 Hsp70 能够诱导 DC 细胞的成熟并提高 CD40、CD83、CD86、HLA-DR 分子在 DC 细胞上的表达。同时 Hsp70 和 gp96 能诱导 APCs 细胞分泌细胞因子如 IL-6、IL-12、TNF- α ,其中 IL-12

在抗原特异性细胞免疫应答中起着重要的作用。

在既往的研究中,对结核杆菌热休克蛋白 70 及其融合蛋白的获得都是采用大肠杆菌胞内表达的方式,这种方法存在表达量低、纯化复杂等缺点。本研究尝试将结核杆菌 *hsp70* 克隆到酵母表达载体 pPIC9K 中,应用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统,以胞外分泌的方式表达了 Hsp70,并对表达的蛋白质进行了生化和免疫学鉴定,为进一步研究制备结核杆菌 Hsp70-抗原肽疫苗以及结核杆菌 Hsp70 与抗原肽的融合蛋白疫苗提供物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Pichia pastoris GS115 表达宿主菌及整合表达质粒 pPIC9 和 pPIC9K 为 Invitrogen 公司产品。含结核杆菌热休克蛋白基因(*hsp70*)的质粒 pGET-*hsp70* 由本实验室构建。YNB(w/o amino acid)和蛋白胨为 Difco 公司产品,限制酶、T4DNA 连接酶购自 Roche 公司,pfuDNA 聚合酶为 Promega 公司产品,鼠 Anti-Hsp70 抗体(MBL 公司产品)和细胞因子 IL-6、IL-12、TNF- α (Endogen 公司)购自深圳晶美,HRP 标记羊抗鼠 IgG 及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物有

限公司,ATP-agarose 购自 Sigma 公司,其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因的扩增与鉴定

引物和测序由上海生工完成。hsp70 上下游引物分别如下:

hsp1: 5'-CGCTCGAGAAAAGA[↓]

gctCGTGGCGTCCGGATC-3'

hsp2: 5'-GCGAATTCTCAActGGCCTCCCGGCCGTC-3'

其中下画线分别是 *Xho* I 和 *Eco* R I 限制酶位点,小写顺序分别为热休克蛋白第一个氨基酸(Ala)的密码子和最后一个氨基酸(Lys)的反密码子,箭头表示酵母 α -因子信号肽的切割位点。PCR 扩增参数为: 94℃ 1min, 62℃ 1min, 72℃ 3min, 扩增 25 个循环,最后延伸 7min。

1.2.2 酵母表达载体的构建

将扩增的 hsp70 基因经 *Xho* I 和 *Eco* R I 酶切后插入 pPIC9 的相同位点,得 pPIC9-hsp70。为了筛选多拷贝的酵母转化子,将 pPIC9-hsp70 以 *Sac* I 和 *Hpa* I 切下含 hsp70 基因的 3.8kb 片段,装入 pPIC9K 中,得 pPIC9K-hsp70。经酶切和测序鉴定后,用 *Sac* I 将 pPIC9K-hsp70 线性化后保存备用。

1.2.3 电穿孔转化及 PCR 方法筛选重组子

将线性化的克隆载体在 1.5kV, 20 μ F, 200 Ω 的条件下转化到 *Pichia pastoris* GS115 酵母感受态中^[5],以空质粒 pPIC9K 为对照,取 400 μ L 铺于 MD 平板上,30℃ 培养 2~3d,首先在不含组氨酸的 MD 平板上筛选 His⁺ 转化子。从 MD 平板上任意挑选长势良好的单菌落,于 2mL YPD 培养过夜后,取新鲜的菌液 3 μ L,在 50 μ L 的体系中做 PCR,所用引物为 α -factor 和 3'-AOX1 测序引物,分别如下: α -factor: 5'-CTACTATTGCCAGCATTGC-3' 3'-AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。

1.2.4 重组酵母的表达

将 PCR 阳性的单菌接种于 5mL 的 BMGY 培养基中,28~30℃,250~300r/min 培养 18h 左右,1500~2000r/min 离心 8min。菌沉淀用 5mL BMMY 培养基重悬,OD 约为 1~2,28~30℃ 继续培养 4~5d,每隔 24h 补加甲醇至终浓度为 0.5%,并在 0、6、12、18、24、36、48、72、96、120h 分别取少量的培养上清和菌体,以确定表达的最佳时间。诱导培养结束后,分别收集上清和沉淀,于 -20℃ 保存备用。将表达上清用 SDS-PAGE 检测,蛋白质含量按文献所述的 Bradford^[5]考马斯亮蓝法进行测定。

1.2.5 表达蛋白的纯化

表达上清经 50kD 的滤膜超滤后,除掉小分子和盐,取留在滤器中的浓缩表达

液,用 ATP-agarose 分离纯化,参考文献用含 25mmol/L ATP 的缓冲液洗脱 Hsp70^[6]。

1.2.6 表达产物的免疫学鉴定

经 SDS-PAGE 检测有 Hsp70 表达的上清进行蛋白质印迹(Western blotting)鉴定。所用一抗为鼠 Anti-Hsp70 抗体,二抗为羊抗鼠 IgG-HRP。将纯化的 Hsp70 蛋白免疫 6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,10 只,经腹腔注射 10 μ g/200 μ L 的重组蛋白,2 周后加强免疫 1 次,2 周后眼眶采血,用 ELISA 方法检测血清中抗-Hsp70 抗体。

1.2.7 Hsp70 诱导 DC 细胞分泌细胞因子

IL-6、IL-12、TNF- α :取新鲜的正常人抗凝外周血 40mL,常规分离外周血单个核细胞(PBMC),用 RPMI1640 完全培养基重悬细胞,并分装到 6 孔培养板中,每孔 3mL,放置 37℃,5% CO₂ 孵箱内孵育 1h,吸出未贴壁细胞。用 RPMI1640 培养基清洗 3 次,洗去非贴壁细胞,获得贴壁细胞,按 rhGM-CSF 和 hIL-4 各 200u/mL 的终浓度加入细胞因子,隔日吸出培养基的 1/3,加入 1/2 量细胞因子的加入量为首次的 1/2。

当 DC 培养 5d 后,在 96 孔平底培养板中加入 DC 细胞 1 \times 10⁵/100 μ L,每个设 3 个复孔,加入 10 μ g Hsp70,以添加培养基为空白对照,最后用 1640 完全培养液将每孔调至 200 μ L,置 37℃,5% CO₂ 孵箱内培养 24h,取细胞上清测细胞因子。IL-12、IL-6 和 TNF- α 具体检测方法按试剂盒说明进行操作。

2 结果

2.1 重组质粒 pPIC9K-hsp70 的酶切鉴定结果

以 pGEM-hsp70 为模板,hsp1 和 hsp2 为引物可扩增出与预计相符的片段(约 1900bp),用 *Sac* I 和 *Hpa* I 对 pPIC9-hsp70 双酶切得到约 3.7kb(1.9 + 1.8)和 6kb 的两片段。回收含 hsp70 基因的 3.7kb 小片段与经同样酶处理的 pPIC9K 的 7.4kb 大片段,重组为 pPIC9K/hsp70。经测序分析与结核杆菌 H37Rv 株 Hsp70DNA 序列的同源性为 100%,测序结果表明热休克蛋白基因已正确插入。重组质粒的构建如图 1。

用 *Sac* I 酶切线性化重组质粒 pPIC9K-hsp70 和空质粒 pPIC9K 转化 GS115 感受态。在 MD 板上筛选 His⁺ 转化子,用测序引物进行 PCR 扩增。PCR 产物只有一条约 2.1kb(1.9 + 0.2kb)的 DNA 条带,而空载体转化的只有一条 195bp 的 DNA 条带。PCR 结果阳性者表明 hsp70 基因整合到酵母基因组中并且为 Mut^s 表型。将得到的菌株命名为 GS115/pPIC9K-hsp70 和 GS115/pPIC9K。

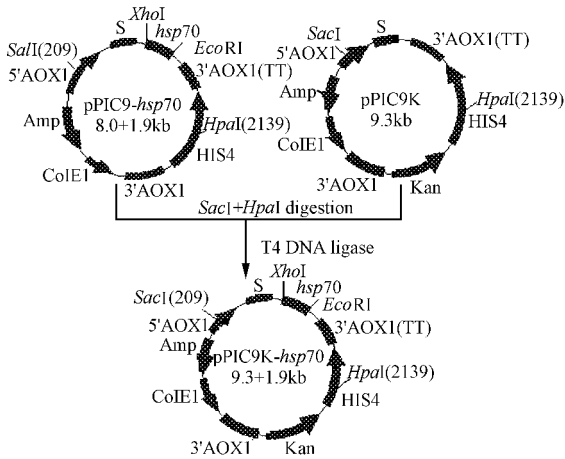


图 1 重组质粒 pPIC9K-hsp70 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-hsp70

2.3 8 个酵母转化子的表达

将 GS115/pPIC9K-hsp70 进行诱导表达 3d 后,取表达上清直接进行 SDS-PAGE,同时以 GS115/pPIC9K 为参照,电泳结果见图 2。8 个转化子的表达上清在 70kD 处有一条带,而 GS115/pPIC9K 上清没有相应的蛋白条带。

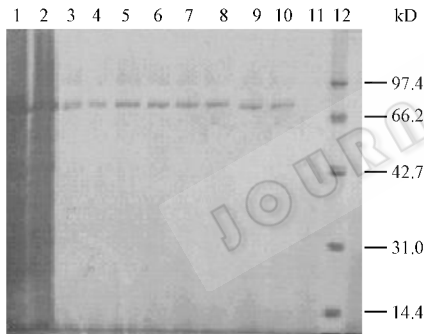


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of secreted heat shock protein 70

1. GS115/pPIC9K cell lysate; 2. GS115/pPIC9K-hsp70 cell lysate; 3 ~ 10. Supernatant of GS115/pPIC9K-hsp70; 11. GS115/pPIC9K supernatant; 12. Protein marker

2.4 Hsp70 分泌表达条件的优化

经 SDS-PAGE 和蛋白含量分析得出甲醇诱导时间对表达量的影响见图 3,甲醇诱导第一天,即有表达产物出现,但表达量较低,随着表达时间的延长,表达量也逐步增高,到第三天就基本达到高峰,经双波长薄层扫描分析,表达量最高可达上清总蛋白的 30% 以上。目的蛋白的含量用考马斯亮蓝法测定达 120mg/L。

2.5 Hsp70 的纯化

将大量诱导表达的重组菌离心后,取上清,用 Millipore 公司的超滤系统进行超滤(分子量为

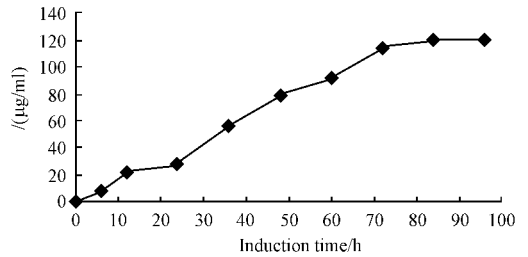


图 3 GS115/pPIC9K-hsp70 在 BMMY 诱导曲线

Fig. 3 Induction curve of GS115/pPIC9K-hsp70 in BMMY

50kD)。超滤一方面可将培养基中小分子的物质除去,尤其是大量的盐;另一方面可对上清进行浓缩。由于 Hsp70 分子结构的特点,在其保守区(N-端)有一个与 ATP 结合的功能区,因此可以利用 ATP-arganose 对表达产物进行亲和层析,用含 ATP 的洗脱液洗脱吸附在柱上的 Hsp70,纯化产物在电泳图中仅见一条带,结果见图 4。

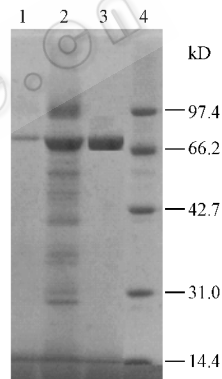


图 4 Hsp70 纯化过程

Fig. 4 SDS-PAGE purification Hsp70

1. Hsp70 before of purification; 2. Concentration of Hsp70; 3. After purification; 4. Protein marker

2.6 免疫印迹分析

其中一株表达产物用鼠抗结核杆菌热休克蛋白 70 单克隆抗体为一抗,羊抗鼠抗体为二抗进行 Western 印迹检测,结果见图 5。在转化子细胞裂解液和表达上清的泳道显示出特异的棕黄色条带,其位置与考马斯亮蓝染色的蛋白表达条带位置一致,而在对照组和对照组上清的泳道未显任何条带,说明表达产物为结核杆菌 Hsp70。同时动物免疫实验表明表达的 Hsp70 具有免疫原性,能在体诱导免疫应答,产生相应的抗-Hsp70 抗体。

2.7 Hsp70 对 DC 的作用

将培养 5d 的 DC 用 10µg 表达的 Hsp70 体外刺激 24h 后用 ELISA 检测 IL-12、IL-6 和 TNF-α 分泌情况。其结果表明它能诱导 DC 分泌大量的 Th1 细胞因子,IL-12 的分泌达到 5ng/mL,IL-6 的分泌达

700pg/mL TNF- α 分泌达 1200pg/mL。与对照组有显著性差异 ($P < 0.01$)。

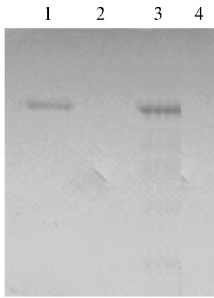


图 5 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of the expression product

1. Supernatant of GS115/pPIC9K-hsp70 ; 2. Supernatant of GS115/pPIC9K 3. Cell lysate of GS115/pPIC9K-hsp70 4. Cell lysate of GS115/pPIC9K

3 讨论

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是近 10 年发展起来的真核表达系统^[7], 更适合表达真核蛋白。迄今为止, 此系统已成功地表达了 200 多种蛋白。

本研究为了便于热休克蛋白天然的表达与纯化, 以及高拷贝菌株的筛选(此项工作正在进行中), 采用 pPIC9 和 pPIC9K 的套用构建分泌表达载体 pPIC9K-hsp70。在质粒 pPIC9 和 pPIC9K 上, 编码酵母 α -因子信号肽切除位点的序列与热休克蛋白基因之间多了 12 个碱基即 4 个氨基酸。当信号肽被切除后, 多余的 4 个氨基酸将位于热休克蛋白的 N 端, 这不符合临床要求。因而我们通过 *Xho*I 和 *Eco*RI 位点构建了 pPIC9-hsp70, 再通过 *Sac*I 和 *Hpa*I 克隆到 pPIC9K 上, 从而保障在目的蛋白的 N 端不会有多余的氨基酸。这在质粒 pPIC9K-hsp70 测序结果中得到印证, 本研究结果表明热休克蛋白能顺利地分泌到培养基。

热休克蛋白能够诱导 DC 的成熟并提高 CD40、CD83、CD86、MHC-I 和 MHC-II 分子在 DC 上的表达(另文发表), 能够诱导 DC 分泌 Th1 型细胞因子, 其中 IL-12 能有效地诱导特异性细胞毒淋巴细胞(CTL)。目前我室正在进行用表达的结核杆菌 Hsp70 负载慢性乙肝患者的 DC 细胞, 研究它对患者 DC 的生物学特征和功能的影响。

本研究为结核杆菌 Hsp70 大量表达和纯化建立了一整套方法, 为进一步研究具有相对保守性的 Hsp70 作为一种免疫佐剂和免疫增强剂以及临床应用研究提供必要的条件。也为进一步地探讨热休克蛋白与抗原肽融合疫苗奠定了坚实的基础。Udono^[8]等最新的研究是将 5 种 MHC-I 抗原配基(包括 OVA、HY 抗原、TRP2 等)融合到鼠热休克蛋白 70 (HSC70) 的 C 或 N 端, 表达的融合蛋白均能引起抗原特异性的 CTL。因此可以设计很多热休克蛋白与 MHC-I 抗原肽的融合蛋白, 利用此表达系统来表达, 它可以克服从肿瘤组织中提取 Hsp-抗原肽的局限性, 为肿瘤和传染病的免疫治疗疫苗的开发开辟了新的途径。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Moroi Y, Meyhew M, Houghton A N *et al.* Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *PNAS*, 2000, **97**(7):3485-3490
- [2] Roman E, Moreno C. Synthetic peptides non-covalently bound to bacterial hsp70 elicit peptide-specific T-cell responses *in vivo*. *Immunology*, 1996 **88**:487-492
- [3] Blachere N E, Zihai L, Srivastava P K *et al.* Heat shock protein-peptide complexes reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med*, 1997, **186**(8):1315-1322
- [4] Kupprer M C, Gastpar R, Gelwer S *et al.* The role of heat shock protein(hsp70) in dendritic cell maturation :Hsp70 induces the maturation monocyte precursors. *Eur J Immunol*, 2001, **31**:1602-1609
- [5] Frederick M A, Roger B, Robert E K *et al.* Short Protocols in Molecular Biology 3rd ed. John Wiley&Sons, Inc, 1995
- [6] Suzue K, Young R A. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J Immunol*, 1996, **156**:873-879
- [7] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000 **24**(1):45-66
- [8] Udono H, Yamano T, Kawabata Y *et al.* Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70. *Inter Immunol*, 2001, **13**(10):1233-1242

Secretion Expression of Mt. Heat Shock Protein 70 in *Pichia pastoris* and Identification of the Protein

PENG Ming-Li LING Ning XU Hong-Mei QING Yu-Ling REN Hong

(Institute for Viral Hepatitis ,Chongqing University of Medical Sciences ,Chongqing 400010 ,China)

Abstract To obtain the expression of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 in methylotropic yeast. The expression vector pPIC9K-*hsp70* was constructed , linearized and introduced into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The result protein was secreted into the supernatant induced by 0.5% methanol at 30°C and purified by centrifugation , ultrafiltration and ATP-agarose. The recombinant Hsp70 was identified by SDS-PAGE , Western blot , mice experiment and effect on the immature DC. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the apparent molecular weight of expressed Hsp70 was about 70kD and the expressed protein could specifically react with anti-Mt. Hsp70 IgG. And mice immunization indicated the expressed hsp70 had immunogenicity. Hsp70 could induce DC maturation and release Th1 cytokine. The secreted 70kD protein was about 120mg/L which accounted for more than 30% of the total supernatant protein and was purified to electrophoretic purity. The Hsp70 , which had the biological activity , is successfully secretorily expressed in the *Pichia pastoris* GS115.

Key words heat shock protein 70 , *Pichia pastoris* , secretion expression , dendrite cell

Received : 11-04-2002

* Corresponding author. Tel 86-23-63849075-2225 ; Fax 86-23-63822696 ; E-mail: mingli55@yahoo.com.cn

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>