

修饰的含前 S1、前 S2 免疫决定簇乙肝表面抗原融合多肽在毕赤酵母中的共表达

Simultaneous Expression of Modified Hepatitis B Surface Antigen Fusion Polypeptides Containing PreS1 , PreS2 Epitopes in *Pichia pastoris*

谭昌耀* , 蒋丽明 , 葛永红 , 袁 进 , 金 瓯 , 胡 波

TAN Chang-Yao* , JIANG Li-Ming , GE Yong-Hong , YUAN Jin , JIN Ou and HU Bo

成都生物制品研究所生物技术研究室 , 成都 610023

Department of Biotechnology , Chengdu Institute of Biological Products , Chengdu 610023 , China

摘 要 用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切含 SS2 嵌合基因片段的重组质粒 pAO815-SS2 , 分离含 AOX1 启动子区、SS2 嵌合基因和 AOX1 转录终止序列的表达盒。将分离的 *Bam*H I -*Bgl* II 表达盒与经 *Bam*H I 线性化的 pAO815-SS1 质粒连接 , 转化大肠杆菌 Top10F' , 提取质粒 , 用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切分析重组质粒并筛选正向插入 SS2 表达盒的重组子。将该重组质粒用电转化法导入 *Pichia pastoris* GS115 细胞 , 经表型筛选、小试表达和产物鉴定 , 构建了重组表达菌株 GS115-SS1S2。重组菌株经甲醇诱导后制备抗原粗提液 , 进一步进行 ELISA 和 Western blot 鉴定。ELISA 结果显示 , 产物同时具有 S、前 S1 和前 S2 抗原性。Western blot 分析进一步表明 , 表达产物既能与 S 抗体结合 , 也能与前 S1 和前 S2 抗体结合。工程菌经高密度发酵 , 表达量达到 300 ~ 600mg/L。抗原经纯化后进行电镜观察 , 形成直径 20 ~ 35nm 的球形颗粒。纯化抗原经 SDS-PAGE 分析 , SS1 和 SS2 多肽仍然保持完整 , 基本无降解。

关键词 前 S1 , 前 S2 , 嵌合基因

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0604-05

Abstract At present time , the widely used hepatitis B virus (HBV) vaccines consist of only the small hepatitis B surface antigen expressed in yeast or CHO cells. The frequency of non-responders to these vaccines has increased the demand for a more immunogenic vaccine. Some studies have suggested that the addition of preS region to the vaccine will improve its efficacy. However , the large protein (L) containing the whole preS region can not be effectively expressed *in vitro*. To overcome this problem , two chimeric constructs , SS1 , surface gene containing preS1 region at C-terminus and SS2 , surface gene containing preS2 region at C-terminus , were constructed and effectively expressed in our previous studies. Here we further constructed an expression vector containing both SS1 and SS2 expression cassettes by separation and ligation the SS2 cassette to a linearized SS1 expression vector pAO815-SS1. The recombinant vector was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. A high-level expression strain (GS115-SS1S2) was established by primary screening for His⁺ transformants and further analysis for induction products. ELISA results demonstrated that the expressed protein had S , preS1 and preS2 antigenicities simultaneously.

Received : February 27 , 2006 ; Accepted : May 25 , 2006.

This work was supported by a grant from the Science and Technology Office of Sichuan Province (No. 04SG0248).

* Corresponding author. Tel : 86-28-84418872 ; E-mail : changyao_tan@hotmail.com

四川省科技攻关计划项目 (No. 04SG0248)

Western blotting showed that the product can bind to all of the three antibodies , anti-S , anti-preS1 and anti-preS2 . The expression protein was present in the form of particles of 20 ~ 35nm diameter and the yield of recombinant particles reached 300 ~ 600mg/L by fermentation . The SS1 and SS2 polypeptides kept intact in purified particles , suggesting that the stability of preS region has been significantly improved .

Key words preS1 , preS2 , chimeric construct

乙型肝炎是一种全球性的传染病 , 仅在中国就有约 1.2 亿乙肝病毒携带者。乙肝疫苗免疫接种是预防乙肝的有效手段 , 目前国内外广泛使用的主要是由在啤酒酵母或 CHO 细胞中表达的乙肝表面抗原 (HBsAg) 主蛋白 (S) 制成的重组疫苗。尽管这一疫苗已取得较好的免疫效果 , 但仍有 10% 的人群无应答或应答低下。而在疫苗中加入前 S 抗原成分则有可能克服这种不应答或低应答的情况^[1]。

乙肝病毒包膜蛋白含有大蛋白 (L) , 中蛋白 (M) 和主蛋白 (S) 三种成分 , 其中 S 蛋白由 226 个氨基酸组成 , 在 S 蛋白之前 , 有一个由 119 个氨基酸组成的前 S1 (preS1) 区和由 55 个氨基酸组成的前 S2 (preS2) 区 , 其中 , preS2 和 S 一起构成中蛋白 , preS1 和 M 一起构成大蛋白。乙肝表面抗原大蛋白虽然含有 preS1、preS2 和 S 三种抗原成分 , 但其内部含有多个蛋白酶敏感位点 , 易于降解 , 也不能有效组装成颗粒样结构^[2] , 难以作为疫苗成分加以利用。为了解决乙肝表面抗原前 S 成分易于降解和难以组装的问题 , 我们在以前的研究中 , 曾构建成功羧端含前 S1 (20-47) 免疫决定簇的乙肝表面抗原融合基因 (SS1) 和羧端含前 S2 (Met¹-Gly²⁶) 免疫决定簇的乙肝表面抗原融合基因 (SS2) 并分别在毕赤酵母中进行了表达^[3,4]。本文在此基础上 , 进一步构建了同时表达 SS1、SS2 两种多肽 , preS1、preS2 和 S 三种抗原的毕赤酵母工程菌株 , 并对工程菌的诱导表达和产物性质进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

毕赤酵母菌株 GS115 (His⁻ , Mut⁺) , 大肠杆菌 Top10F' 购自 Invitrogen 公司 ; 含 SS1 融合基因的质粒 pAO815-SS1 和含 SS2 融合基因的质粒 pAO815-SS2 由本室构建 ; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶分别购自 NEB 公司和 MBI 公司 ; 乙肝表面抗原反相血凝 (RPHA) 试剂盒和表面抗原 (S) 酶标试剂盒购自上海科华生物技术有限公司 , 前 S1 酶标试剂盒购自上海阿尔法生物技术有限公司 , 前 S2 单克隆抗体和酶标试剂盒购自北京肝炎试剂研制中心 ; 乙肝病毒变性

S 抗原的抗体参考宗芳等^[5]的方法自制 , 前 S1 抗体也是自制的多克隆抗体 , 方法如下 : 用纯化的 SS1 融合蛋白免疫家兔 , 制备抗血清 , 用纯化的乙肝表面抗原 (S) 吸收家兔血清中的 S 抗体成分而得到前 S1 抗体。

1.2 含 SS1 和 SS2 双表达盒 (expression cassette) 重组质粒的构建

用 BamH I 和 Bgl II 双酶切 pAO815-SS2 质粒 , 分离含毕赤酵母醇脱氢酶 1 (AOX1) 启动子区、SS2 融合基因和 AOX1 转录终止序列的表达盒。将分离的 BamH I - Bgl II 表达盒与经 BamH I 线性化的 pAO815-SS1 质粒连接 , 转化大肠杆菌 Top10F' , 制备质粒 , 用 BamH I 和 Bgl II 双酶切分析重组质粒并筛选正向插入 SS2 表达盒的重组子。该重组质粒含有两个表达盒 : 表达盒 1 , AOX1 启动子区 + SS1 融合蛋白编码序列 + AOX1 转录中止序列 ; 表达盒 2 , AOX1 启动子区 + SS2 融合蛋白编码序列 + AOX1 转录中止序列。将该重组质粒转化到宿主菌以后 , 两个表达盒上的调控序列能够分别起始 SS1 和 SS2 融合基因的转录并进一步翻译成为相应的多肽。将该重组质粒命名为 pAO815-SS1/SS2。

1.3 重组质粒向酵母细胞的转化和阳性克隆的初步筛选

用 Bgl II 线性化 pAO815-SS1/SS2 质粒 , 经酚/氯仿抽提 , 酒精沉淀后用电穿孔法转化 GS115 细胞。用 MD[1.34% YNB (无氨基酸) (4×10^{-5})% 生物素 , 2% 葡萄糖] 琼脂平板筛选阳性克隆。由于 GS115 菌株本身不能合成组氨酸 , 只有整合了含 HIS4 基因的 pAO815-SS1/SS2 载体序列的菌株才能在无组氨酸的培养基上生长。

1.4 抗原的诱导表达及粗提液的制备

挑取 His⁺ (组氨酸合成阳性) 的单菌落 , 接种于 100mL MGY 培养基 [1.34% YNB , 1% 甘油 (4×10^{-5})% 生物素] , 30℃ 振荡培养过夜 , 收获菌体 , 悬浮于 20mL MM 培养基 [1.34% YNB , (4×10^{-5})% 生物素 , 0.5% 甲醇] 继续培养。每 24h 补加 100μL 甲醇并取样 , 离心收集菌体 , 共诱导 72h。

在菌体中加入适量破壁缓冲液 (50mmol/L 磷酸

缓冲液 pH7.4, 1mmol/L PMSF, 1mmol/L EDTA, 5% 甘油)和等体积玻璃珠(直径 0.5mm),在振荡器上剧烈振荡 30s 后,冰浴 30s,重复 8 次,离心抽取上清,即为抗原粗提液。

1.5 表达产物的抗原性检测

通过反相血凝法(RPHA)和 ELISA 对粗提液进行抗原性检测,操作方法分别按试剂盒说明书进行。

1.6 表达产物的 Western blot 鉴定

将抗原粗提液经还原型 SDS-PAGE 电泳并转移到硝酸纤维素膜上,分别以变性 S 抗体、前 S1 抗体和前 S2 抗体为一抗,以碱性磷酸酶(AP)标记的兔抗鼠(S和前 S2 抗体)或羊抗兔(前 S1 抗体)IgG 为酶标二抗,以 NBT/BCIP 为显色底物,进行印迹分析。

1.7 工程菌发酵

挑取工程菌单菌落,接种到 MGY 培养基,30℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 2 \sim 6$,转移到发酵罐继续培养,发酵设备为 NBS 公司 Bioflo 3000 5L 发酵系统。发酵方法参见文献 [6]。

1.8 抗原的纯化和检测

取适量菌体,经细胞破碎、酸沉淀、硅胶吸附、疏水层析和凝胶过滤后,进行还原型 SDS-PAGE 电泳分析。

1.9 复合抗原的电镜观察

将纯化的融合抗原经 2% 磷钨酸负染后进行透射电镜观察。

2 结果

2.1 含 SS1 和 SS2 双表达盒重组质粒的鉴定

pAO815 空载体在经 *Avr* II 和 *Bam*H I 双酶切后,产生 4.0kb、2.4kb 和 1.3kb 三个片段,其中 1.3kb 片段包含单一的 *Eco*R I 克隆位点,在插入 SS1 融合基因后,1.3kb 片段增大至约 2.0kb,该片段包含 AOX1 启动子区、SS1 融合基因和 AOX1 转录终止序

列,构成一个完整的表达盒。在 pAO815-SS1 质粒中进一步插入 SS2 表达盒后,pAO815-SS1/SS2 质粒中含双表达盒的片段增大至约 4.0kb,在电泳图谱中将与载体 4.0kb 的骨架片段重合。将上述三种质粒用 *Avr* II 和 *Bam*H I 双酶切,进行琼脂糖凝胶电泳,其带型分布如图 1 所示。

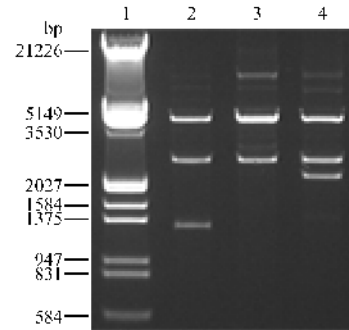


图 1 含双表达盒重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid containing two expression cassettes

1: DNA marker (λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III); 2: pAO815; 3: pAO815-SS1/SS2; 4: pAO815-SS1. All three plasmids are double digested with *Avr* II and *Bam*H I.

2.2 表达菌株的筛选和表达产物的抗原性检测

用反相血凝法(RPHA)对 4 株 His^+ (组氨酸合成阳性)菌株的抗原粗提液进行测定,其中有一株阳性,进一步用 ELISA 法对该产物进行前 S1、前 S2 和 S 抗原性检测,三者均为阳性。测定结果如表 1。将该重组菌株命名为 GS115-SS1S2。

表 1 表达产物的抗原性检测

Table 1 Antigenicity of expressed products in crude extract

PreS1	PreS2	S
1. (1/8 dilution)	2. (1/8 dilution)	2. (1/100 dilution)

2.3 重组抗原的 Western blot 检测

表达产物的 Western blot 分析结果显示(图 2),重组抗原既能与 S 抗体结合,也能与前 S1 和前 S2

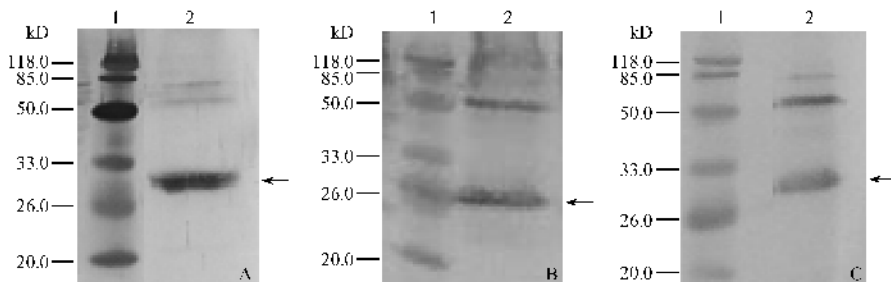


图 2 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of expression products of GS115-SS1S2

A: immuno-reacting with anti-S; B: immuno-reacting with anti-preS1; C: immuno-reacting with anti-preS2. 1: prestained protein marker; 2: crude extracts of GS115-SS1S2 cells. Arrows indicate SS1 and SS2 fusion proteins.

抗体结合。由于 SS1 和 SS2 融合蛋白的理论分子量相近,都在 27kD 左右,前 S1 和前 S2 抗体印记带几乎在同一位置。这同时也说明,前 S 区域并没有发生降解,否则 S 抗体印记会出现较前 S 抗体印记较小的条带。乙肝表面抗原融合多肽可以形成二聚体和多聚体,在图中也有相应的显色带。

2.4 工程菌发酵和抗原表达

工程菌发酵包括甘油批量培养、甘油补料培养和甲醇诱导三个阶段,其中诱导 48~72h 即可达到较高表达量,此时培养物浓度大致达到每毫升 150~180 个 OD_{600} 单位。抽样制备抗原粗提液,用反相血凝法测定样品滴度,同时以 CHO 细胞表达的纯化 HBsAg 作参照对表达量进行估算。经测定,10 μ g/mL 纯化 CHO 细胞 HBsAg 血凝效价为 1:256,发酵样品粗提液效价达到 1:8192~1:16384,即参考品的 32~64 倍,初步推算抗原表达量为 300~600mg/L 左右。

2.5 纯化抗原的 SDS-PAGE 检测

将纯化抗原进行还原型 SDS-PAGE 电泳并经银染显色(图 3)。从图 3 可以看出,纯化的抗原带型完整,没有明显的降解条带。由于 SS1 和 SS2 的分子量相近,在电泳照片上的位置重合,均为 27kD。电泳图上也有二聚体和三聚体带,这些结果均与 Western blot 分析相吻合。进一步用 ELISA 法对纯化抗原进行检测,其前 S1、前 S2 和 S 抗原均呈阳性。

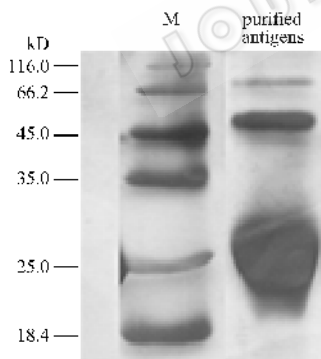


图 3 纯化抗原的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified antigens

2.6 纯化抗原的电镜观察

纯化抗原呈现直径 20~35nm 的颗粒样结构(图 4)表明 SS1 和 SS2 融合多肽自发组装成了与天然乙肝表面抗原结构类似的球形颗粒。

3 讨论

根据 Imamura^[2]和 Langley^[7]等的研究,preS2 N 端第 16、18 和 48 位精氨酸特别是第 48 位精氨酸易受蛋白酶的攻击,preS2 区极易在这些位点发生断

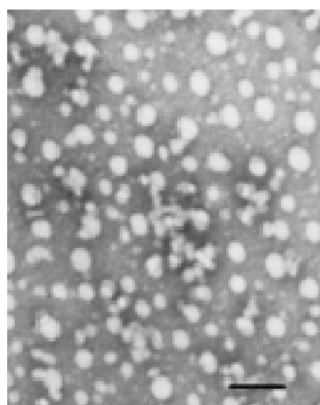


图 4 纯化抗原的电镜照片

Fig. 4 Electron micrograph of modified HBsAg particles(80 000 \times)

Samples were negatively stained with 2% phosphotungstic acid prior to observation. The bar represents 100nm.

裂,致使产物中全长中蛋白的比例很少。有学者因此采用蛋白酶缺陷的菌株表达中蛋白,或者对中蛋白进行修饰,剔除其部分蛋白酶位点后进行表达,可以在一定程度上改善其降解^[8,9]。由于 preS2 主要的免疫决定簇位于其氨基端的前 26 个氨基酸^[10],如果将这一区段直接与主蛋白融合,由于没有包含第 48 位精氨酸,理论上将会减少降解的发生。我国学者杨剑莹等将 preS2 区 1~27 位氨基酸融合于主蛋白的氨基端并在毕赤酵母中进行表达,但结果未如预期^[11]。因此我们推测,蛋白酶作用位点除了与蛋白质的一级结构有关外,可能还与其空间结构和位置有关。我们将 preS2 区 1~26 位氨基酸(Met¹-Gly²⁶)融合于主蛋白的羧基端以后,降解情况有了根本的改善,间接印证了这一推断。

在我们以往的研究中,曾将 SS1 和 SS2 融合基因分别在毕赤酵母中进行了表达,表达产物均能组装成与天然乙肝表面抗原结构类似的球形结构(未发表资料)。本文进一步利用毕赤酵母表达载体 pAO815 可以用于构建多拷贝表达盒的特性,将 SS1 和 SS2 两个不同的表达盒构建到同一个表达载体,在毕赤酵母中实现了 SS1 和 SS2 两种多肽、preS1、preS2 和 S 三种抗原的共同表达。电镜结果显示,这种混合多肽仍然能组装成颗粒状结构。ELISA 结果表明,表达产物具有良好的三重抗原性,说明 preS1、preS2 和 S 抗原表位在复合颗粒中均得到有效暴露。Western blot 分析和纯化样品的 SDS-PAGE 电泳分析表明,构成复合颗粒的 SS1 和 SS2 两种融合多肽均具有良好的稳定性,即使在经纯化后仍然基本保持了结构的完整,这对大规模生产是非常有利的条件。

毕赤酵母系统是上世纪 80 年代发展起来的一种较为新颖的真核表达系统,具有表达量高,无外源因子污染、易于规模化培养并且成本低廉等特点。我们利用这一系统表达的乙肝表面抗原复合颗粒,在发酵条件下达到了每升 300~600mg 的表达量,明显优于乙肝表面抗原在酿酒酵母的表达量,甚至优于乙肝表面抗原 S 蛋白在毕赤酵母中的表达水平。我们将通过动物试验对抗原的免疫原性继续进行评价,如能以此为基础进行新一代乙肝疫苗的开发,则有望在增强制品的免疫原性的同时,也获得显著的成本优势。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Page M, Jones CD, Bailey C. A novel, recombinant triple antigen hepatitis B vaccine (Hepacare). *Intervirology*, 2001, **44**: 88-97
- [2] Imamura T, Araki M, Miyahara A *et al.* Expression of hepatitis B virus middle and large surface antigen genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology*, 1987, **61**(11): 3543-3549
- [3] Tan CY (谭昌耀), Jiang LM (蒋丽明), Zou P (邹萍) *et al.* Construction of chimeric hepatitis B surface antigen containing preS1 region and its expression in *Pichia pastaris*. *Progress in Microbiology and Immunology* (微生物学免疫学进展), 2005, **33**(1): 44-47
- [4] Tan CY (谭昌耀), Jiang LM (蒋丽明), Ge YH (葛永红) *et al.* Construction of hepatitis B surface antigen chimeric gene carrying pre-S2 epitope at C-terminus and expression of the gene in *Pichia pastaris*. *Chinese Journal of Biologicals* (中国生物制品学杂志), 2005, **18**(5): 375-377
- [5] Zong F (宗芳), Tian SF (田淑芳), Chen H (陈红) *et al.* Preparation and application of anti-denatured hepatitis B surface S antibodies. *Chinese J Exp Clin Virol* (中华实验和临床病毒学杂志), 2001, **5**(4): 387-388
- [6] Higgins DR, Cregg JM. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 103: *Pichia* protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1998
- [7] Langley KE, Egan KM, Barendt JM *et al.* Characterization of purified hepatitis B surface antigen containing pre-S(2) epitopes expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1988, **67**: 229-245
- [8] Kuroda S, Itoh Y, Miyazaki T *et al.* Efficient expression of genetically engineered hepatitis B virus surface antigen P31 proteins in yeast. *Gene*, 1989, **78**: 297-308
- [9] Kobayashi M, Asano T, Utsunomiya M *et al.* Recombinant hepatitis B virus surface antigen carrying the pre-S2 region derived from yeast: purification and characterization. *J Biotech*, 1988, **8**: 1-22
- [10] Neurath AR, Kent SBH, Parker K *et al.* Antibodies to a synthetic peptide from the preS120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine*, 1986, **4**: 35-37
- [11] Yang JY (杨剑莹), Hui JY (惠静毅), Li GD (李光地) *et al.* Expression of the recombinant hepatitis B surface antigen carrying PreS epitopes in *Pichia pastoris*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 2000, **32**(2): 139-144

废弃物资源化的生物技术

一切有机或无机废弃物都有可能实现资源化,这对走循环经济可持续发展之路和环保产业的发展具有重要意义。生物-微生物技术的应用在其中能起到关键性的作用,众多废弃物都有可能借助生物或非生物途径得以充分利用。这里仅介绍两类型事例(1)以源于各类含糖类物质的废物(如制糖厂废弃的糖渣)为原料发酵生产洁净氢能。如英国研究人员将这类残渣稀释后用来培养一种大肠杆菌,在氢酶作用下使糖产生大量氢气,把它收集起来作洁净能源,或作燃料电池之用。美国研究人员将灭菌花园土壤置于发电容器中,加入家庭垃圾、适中废水,再接种产氢细菌,经培养即具产氢效力,再将氢气储存于燃料电池中用于家庭发电。还有报道以花生壳为原料也可生产氢气。在日本,除花生壳之外,也用胡桃壳、葵花籽壳为原料生产木糖醇产品;也有直接从废弃桔皮中提取氢气。由此可见,将这些废弃物实现资源化的作用不可小觑,应予以更多关注,加强研发。(2)通过微生物方法从含金的尾矿或矿渣中提取黄金早已为研究者所关注。全世界已有好些国家用细菌氧化法浸提黄金,在加纳用细菌处理金矿规模可达日产 1000 吨,从 1993 年投产至 2005 年已具相当规模;巴西、澳大利亚和中国等均有日产 100 吨以上的规模。那些丢弃的尾矿或矿渣中含有微量的金(Au),白白浪费掉非常可惜,通过生物技术特别是微生物技术的综合应用有可能达到较为理想的提金效果。目前常用的菌种是氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*),俄罗斯等国家采用此细菌,并配合氰化法,浸金率达到 88%~90% 以上,在我国也获得类似结果。当然还有其他微生物或未知者,如一种曲霉可从溶液中有效吸附金(活力比其他菌高 11~13 倍);有的微型藻对金吸附力可达 400mg/g(干重)。应用此微生物法浸提金的关键在于(i)使用的“种子”与被处理材料(废矿渣)生态的适应性(最适化)和该菌活力的稳定性(ii)有效脱除硫、砷的重要性,根据需要采用不同有效菌株混合施用以提高浸提金的效率。如果能通过现代生物技术改造或构建出浸提金的新菌种,将会产生更好的效益,因此,我们应加强这方面的基础及应用基础研究。

(柯为)