

乙型肝炎病毒表面抗原基因在酵母 SUC2 启动子-信号顺序控制下的表达

赵家刚 秦 宁 李育阳

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

酵母 SUC2 基因克隆 YFD6 的 DNA 用核酸酶 BAL31 从 SUC2 基因的 BamHI 切点进行酶解, 加上 BamHI 接头后, 自连成环, 得到的一个缺失质粒 YFD6 Δ 21 保留 SUC2 基因的启动子-信号顺序以及氨基端 22 个氨基酸残基的编码顺序。将带有 HBsAg 基因的 BamHI 片段插入 YFD6 Δ 21 的 BamHI 切点, 使 HBsAg 基因和 SUC2 基因融合, 然后将重组质粒引入酵母。

将酵母转化子在葡萄糖阻遏及去阻遏条件下生长, 然后测定细胞内、周质空间和培养基中的 HBsAg 的量。我们只能在葡萄糖去阻遏条件下检测到 HBsAg 的表达, 几乎全部表达的 HBsAg 位于细胞内。

关键词 酵母; 启动子; 信号顺序; 分泌

近年来酵母已被广泛用来表达外源基因。为了表达乙型肝炎病毒表面抗原基因已经用了 ADH、PGK、PHO5 和 GAL10 等基因的启动子。有些已取得比较高的表达水平^[1-4]。由于破碎细胞比较困难, 从破碎细胞的混合物中提取外源基因产物也比较困难, 有人就开始致力于分泌型表达系统的研究^[5,6]。这样可以避免破碎细胞的困难及简化外源基因产物的分离提纯步骤。此外, 还可以通过和分泌途径相偶联的蛋白质加工修饰过程取得接近天然产物结构的蛋白质。

目前, 用于酵母分泌型表达的载体多数是用 α -因子基因的启动子-信号顺序来指导外源基因的表达的。酵母 SUC2 基因在葡萄糖去阻遏条件下的表达可产生一种分泌性的糖基化蔗糖酶。Taussig 等已发表了 SUC2 基因的全顺序, 信号顺序编码 19 个氨基酸残基的信号肽^[7]。利用 SUC2 基因的启动子-信号顺序应当也可以指导外源基因的分泌型表达。

我们已经克隆了 SUC2 基因^[8]。本文

报道从已取得的 SUC2 基因克隆 YFD6 出发, 将其改造成为外源基因在 SUC2 启动子-信号顺序控制下进行表达的载体。并报道了乙型肝炎病毒表面抗原基因插入这个载体后所进行的表达试验的结果。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株和质粒: YFD6 是本实验室取得的 SUC2 基因克隆^[8]; DCO 4 [Cir⁺]ade 1 leu2 作为酵母转化的受体细胞; Mc1061 或 C600 作为大肠杆菌转化的受体细胞。

pDR720 HBsAg49, 52, 54, 59 系 4 株 HBsAg 基因克隆质粒。带 HBsAg 基因的片段具 BamHI 粘性末端, 其 5' 端曾经 BAL31 核酸酶随机缺失处理。由卫生部上海生物制品研究所何葆光同志提供。

2. 酶和试剂: 限制性内切酶和

本文于 1987 年 8 月 21 日收到。

止后在缺失 DNA 的末端接上 BamHI 接头。经BamHI酶切后，DNA用T4 DNA连接酶自连环化，再转化大肠杆菌。转化子经快速质粒 DNA 提取，选出缺失质粒。以限制性内切酶EcoRI和BamHI双酶切来估计缺失的大小。图版 I -A 为被选到的部分缺失质粒DNA经 EcoRI, BamHI 双酶切后的电泳图谱。按电泳迁移率计算，YFD6Δ17, YFD6Δ18 缺失区太大。在其上游已经超过起始密码子。而缺失质粒 YFD6Δ21 的缺失区大概在+100bp 到 +1700bp 之间。将 YFD6Δ21 中 1kb 和 1.6 kb 的EcoRI-BamHI 片段克隆进 M13 mp8进行BamHI接头两端的顺序分析。结果表明缺失区两端的核苷酸顺序为：

```

5' TCA ATG ACA AAG GAA ATC AGC GAT AGA CCT TTG
3' ACT TAC TGT TTG CTT TAG TCG CTA TCT GGA AAC

GTC CAC TTC ACA CCC AAC AAG GGC TGG ATG AAT
CAG GTG AAG TGT GCG TTG TTC CCG ACC TAC TTA
+128 BamHI +1713
GAC CCG GGA TCC GGAAATTTATTTTATTTTT..... 3'
CTG GCG CCT AGG COTTTTAAATAAAAATAAAAA..... 5'
    
```

从顺序分析可知 BamHI 接头被连在 +128和+1713bp之间，BamHI 插口的阅读框架为3n + 1。

(二) HBsAg 基因和 YFD6Δ21 的重组

质粒pDR720HBsAg49、52、54、59的 BamHI片段带有 HBsAg 基因，不同质粒中HBsAg 基因的 BamHI 片段分离后，分别插入 YFD6Δ21 的 BamHI 切点，因为 HBsAg 基因的 5' 端保留不同长度的上游序列。将这些质粒的DNA中带 HBsAg 基因的编码区的近5' 端有一个 XbaI 切点，而载体上也有一个 XbaI 切点，插入片段的方向很容易通过电泳检查 XbaI 酶切片段大小来确定（图2）。插入方向正确的重组质粒被转化进酵母 DCO4(Cir⁺)。转化子分离纯化后，经培养制备抽提物样品。对流免疫电泳测定表明插有从pDR720

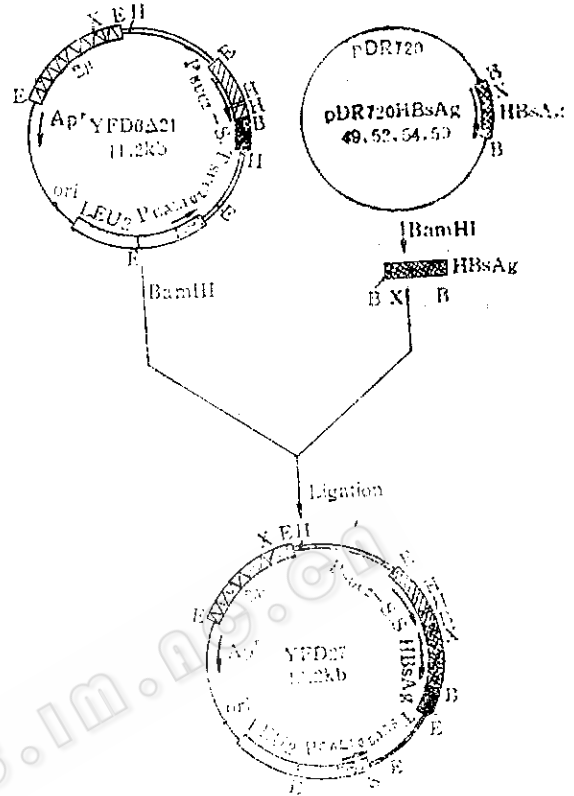


图2 HBsAg基因表达载体YFD27的构建

Fig.2 The construction of vector YFD27 for HBsAg gene expression

B, BamHI, X, XbaI, E, EcoRI, H, Hind III, S, SalI

HBsAg52 来的片段的质粒转化子有 HBsAg 的表达，将此质粒定名为 YFD27。顺序分析表明 pDR720 HBsAg52 中 HBsAg 基因片段 5' 端顺序为：

```

BamHI
5' GCA TCG GGG GAC CCT GCA CCG AAC ATG..... 3'
   G CCC CTG GGA CGT GGC TTG TAC..... 5'
    
```

可见 HBsAg 基因 5' 的阅读框架为 2 + 3n，和上述测定的载体插口的阅读框架正好吻合。

(三) 在葡萄糖阻遏和去阻遏条件下 HBsAg 基因的表达

SUC2 启动子是一个可调控的启动子，如果 HBsAg 基因受 SUC2 启动子控制，那末 HBsAg 基因的表达也应当是可

以调控的。

我们将带有YFD27的酵母转化子在含有2%葡萄糖或者0.05%葡萄糖的培养基中生长后,制备样品,以对流免疫法测定处于不同位置的HBsAg的表达。图版I-B为带有YFD27的酵母转化子在葡萄糖阻遏和去阻遏条件下细胞内抽提物样品对流免疫电泳的结果。从图中可知在葡萄糖阻遏条件下,细胞内抽提物即使在原倍浓度下也未见沉淀带。但在去阻遏条件下细胞内抽提物在1:16的稀释倍数下还能看到沉淀带。此结果说明在YFD27中的HBsAg基因的表达是受SUC2启动子调控的。采用对流免疫电泳我们还测定在葡萄糖去阻遏条件下生长的培养物。在培养液、细胞周质空间和细胞内的样品中HBsAg的表达情况。从图版I-C可知,来自细胞内的样品经1:16稀释还可以看到沉淀带(有时在1:64稀释下也能看到沉淀带,在细胞周质空间和培养液均未能测到有HBsAg)。

(四) 重组质粒在酵母细胞中的稳定性

把工程菌DCO4(Cir⁺)/YFD27在非选择性培养基中生长18h,其中86%左右的细胞还保留有重组质粒,说明YFD27在酵母细胞中还是相当稳定的。

讨 论

我们用已经取得的SUC2基因克隆将其改造成为表达载体。在构建过程中采用BAL31缺失处理。从顺序分析结果看,在缺失区的上游除有完整的启动子和信号顺序外,还保留编码成熟蔗糖酶蛋白前22个氨基酸残基的顺序。因此,这个载体可以被用来进行外源基因的分泌表达。另外,按照Taussig等的序列分析资料,在SUC2基

因3'非编码区从+1771bp起有TATA顺序,他们认为这可能是这个基因转录的终止信号。载体YFD6Δ21缺失区下游末端在+1717bp。因此,SUC2基因的转录终止信号估计还完整地保留着。

质粒pDR720 HBsAg52中HBsAg基因5'端的顺序在阅读框架上和载体YFD6Δ21的外源基因插口在顺序上是相吻合的。并已经在转化酵母后取得了HBsAg的表达。从工程菌在葡萄糖阻遏和去阻遏条件下,HBsAg的表达规律看,重组质粒中HBsAg基因的表达确实受到处于上游的SUC2启动子的调控。

通常认为SUC2启动子是一个比较强的启动子。在葡萄糖去阻遏条件下,由它转录的mRNA可达细胞总mRNA的5%左右。从我们的实验知道YFD27在细胞中的稳定性也是比较高的,但是HBsAg基因在这个系统中的表达水平并不高,并且未能象预期的那样检测到产物的分泌。HBsAg在感染病毒的细胞中是一种分泌蛋白,但是它并没有通常分泌蛋白所有的信号肽。Bernard等^[11]用基因融合的方法证明HBsAg的信号肽可能存在于编码区中。HBsAg基因在我们这个系统中表达水平不高,又不能检测到分泌的原因可能与融合蛋白所具有的两种信号肽的作用相互干扰有关。Bernard等还提出一种HBsAg颗粒形成的模型。认为HBsAg单体可以在分泌过程中插进细胞膜,然后通过一种宿主细胞膜蛋白的切割和宿主脂质成分的重新组织过程而形成HBsAg颗粒。如果在酵母细胞里也能形成颗粒,这种颗粒状的HBsAg可能就很难通过酵母的整个分泌途径而进入培养液。对HBsAg基因未能在我们的系统中实现表达产物的分泌的确切原因还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Hitzeman, R. A. et al.; *Nucleic Acids Research*, 11(9):2745—2763, 1983.
- [2] Miyahara, A. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1—5, 1983.
- [3] 何慕光等:生物工程学报, 1(1): 20—28, 1985.
- [4] 沈绿萍等:中国科学, B辑29(8): 856—863, 1986.
- [5] Brake, A. J. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4642—4646, 1984.
- [6] Smith, R. A. et al.; *Science*, 229: 1219—1224, 1985.
- [7] Taussig, R. et al.; *Nucleic Acids Research*, 11:1943—1954, 1983.
- [8] 李育阳等:生物工程学报, 2(1):25—30, 1986.
- [9] Maniatis, T. et al.; *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982.
- [10] 李育阳等:遗传学报, 12(1): 1—6, 1985.
- [11] Bernard, E. E. et al.; *Mol. Cell. Biology.*, 6(5):1454—1463, 1986.

EXPRESSION OF HBsAg GENE DIRECTED BY YEAST SUC 2 PROMOTER-SIGNAL SEQUENCE

Zhao Jiagang Qin Ning Li Yuyang
(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai*)

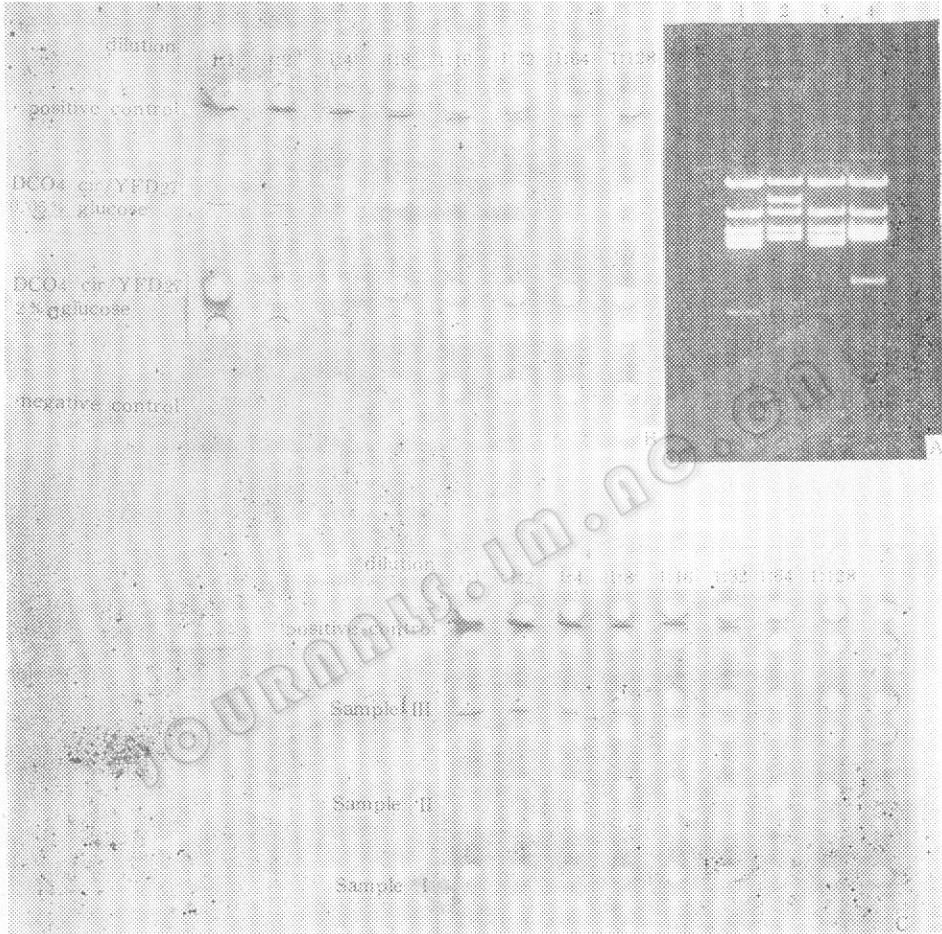
Plasmid DNA YFD6, the yeast SUC2 gene clone, was digested with nuclease BAL31 from BamHI site of SUC2 gene. After adding BamHI linker, DNA moleculars were ligated by T4 DNA ligase. One of deletion plasmid, YFD6 Δ 21, remains SUC2 promoter-signal sequence and the sequence coding for N-terminal 22 amino acid residues of external invertase. Insert BamHI fragment which contains HBsAg gene in BamHI site of YFD6 Δ 21 and make gene fusion between SUC2 gene and HBsAg gene. Then transform recombinant plasmids into yeast.

Growing resulting transformants at glucose repressed or derepressed condition, the level of HBsAg expressed in intracellular part, periplasmic space and medium was determined. We could detect expression of HBsAg gene only at glucose derepressed condition. Almost all of expressed HBsAg was in the intracellular part.

Key words

Vector; promoter; signal sequence; secretion

赵家刚等：乙型肝炎病毒表面抗原基因在酵母SUC2启动子-信号顺序控制下的表达
 Zhao Jiagang et al.: Expression of HBsAg gene directed by yeast SUC2 promoter-signal sequence



图版说明

A 缺失质粒的限制性内切酶分析

Restriction endonuclease analysis of deletion plasmid DNAs

1. YFD₆Δ₁₇ digested with EcoRI and BamHI
2. YFD₆ digested with EcoRI and BamHI
3. YFD₆Δ₁₈ digested with EcoRI and BamHI
4. YFD₆Δ₂₁ digested with EcoRI and BamHI

B HBsAg基因在葡萄糖阻遏和去阻遏条件下的表达 阳性对照：HBsAg阳性人血清，阴性对照：DCO₄(Cir⁻)抽提液
 The expression of HBsAg gene at glucose repressed or derepressed condition
 Positive control: HBsAg positive serum

Negative control: extract of DCO₄ (cir⁻) cells

C 表达HBsAg的位置 阳性对照：HBsAg阳性人血清

The localization of expressed HBsAg positive control: HBsAg positive serum

样品 I Sample I 培养液 Medium

样品 II Sample II 周质空间 Periplasmic space

样品 III Sample III 细胞内 Intracellular part