

# 人乳头瘤病毒 16 亚型 L1 蛋白在多形汉逊酵母中的优化表达

李巍巍<sup>1,2</sup>, 何秀萍<sup>1</sup>, 郭雪娜<sup>1</sup>, 张振颖<sup>1</sup>, 张博润<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 酵母菌分子遗传与育种实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:** 为了实现人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)16 亚型衣壳蛋白 L1 在多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)中的高效表达, 根据 L1 蛋白的氨基酸序列及多形汉逊酵母的密码子偏爱性, 对 L1 蛋白的编码序列进行优化设计, 合成了完整的编码序列, 命名为 *HPV16L1*。以甲醇诱导型启动子 *MOXp* 和终止子 *AOXTT* 为表达调控元件, 以尿嘧啶合成相关基因 *URA3* 为筛选标记, 构建了 *HPV16L1* 的重组表达质粒 pYMOXU-HPV16。用 *Sac II* 酶切质粒 pYMOXU-HPV16 使其线性化, 电转化多形汉逊酵母菌株 H-ura3, 依据营养缺陷互补筛选重组菌株。通过 PCR 扩增及 HPV16 L1 蛋白表达量分析表明已获得稳定高表达 L1 蛋白的重组汉逊酵母菌株 HP-U-16L。摇瓶发酵条件的初步优化表明, 以 YPM (pH 7.0) 为基础培养基进行诱导培养, 控制接种量使初始培养液  $OD_{600}$  为 1.0, 每隔 12 h 补加甲醇至终浓度为 1% (V/V), 37°C、200 r/min 条件下诱导培养 72 h 后, HPV16 L1 蛋白的最高表达量为 78.6 mg/L。本研究为多形汉逊酵母源 HPV16 L1 疫苗的研制奠定了基础。

**关键词:** 人乳头瘤病毒 16 亚型, 衣壳蛋白 L1, 多形汉逊酵母, 优化表达

## Optimized expression of the L1 protein of human papillomavirus in *Hansenula polymorpha*

Weiwei Li<sup>1,2</sup>, Xiuping He<sup>1</sup>, Xuena Guo<sup>1</sup>, Zhenying Zhang<sup>1</sup>, and Borun Zhang<sup>1</sup>

1 Laboratory of Yeast Molecular Genetics and Breeding, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The heterologously expressed L1 protein of human papillomavirus 16 can assembly into virus-like particles (VLPs), which has been used as prophylactic vaccine for cervical carcinoma. To express L1 protein in *Hansenula polymorpha*, we analyzed the codon usage of the native gene of L1 protein and redesigned the encoding sequence according to the codon bias of *H. polymorpha*. We used assembly PCR to synthesize the native gene *HPV16L1-N* and the codon optimized gene *HPV16L1*. The synthesized genes were cloned into pMOXZ- $\alpha$ -A vector to generate plasmids pMOXZ-HPV16N and pMOXZ-HPV16. The expression cassettes *MOXp-HPV16L1(N)-AOXTT* were cloned into YEp352 vector and transferred into *H. polymorpha*. After methanol inducement, the expression of L1 protein in *H. polymorpha* was detected from the codon optimized gene *HPV16L1* rather than the native gene *HPV16L1-N*. The parameters for induced cultivation for strain HP-U-16L with *HPV16L1* were investigated in shaking flask cultures. After induced cultivation in YPM (pH 7.0) medium supplemented with methanol to a final concentration of 1.0% every 12 h at 37°C for 72 h, the recombinant produced 78.6 mg/L of L1 protein. This work offers the possibility for the production of prophylactic

Received: July 6, 2009; Accepted: August 17, 2009

Corresponding author: Xiuping He. Tel: +86-10-64807356; E-mail: hexp@im.ac.cn

vaccine for cervical carcinoma by *H. polymorpha*.

**Keywords:** human papillomavirus, 16 L1 protein, *Hansenula polymorpha*, optimized expression

宫颈癌(Cervical cancer)是发生于子宫颈鳞状上皮或者腺上皮的一种癌症,居女性恶性肿瘤发病率和死亡率的第二位<sup>[1]</sup>,全球每年大约有 500 000 新发病例,并且每年大约有 250 000 个宫颈癌患者死亡。1977 年德国学者豪森 Zur Hausen 从宫颈癌标本中发现了人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV) DNA,推测 HPV 感染与宫颈癌发生有关<sup>[2]</sup>。国际癌症研究机构(IARC)在 22 个国家进行了针对引起侵袭性宫颈癌(Invasive cervical cancer, ICC)的 HPV 类型的调查,组织学确诊为 ICC 的 1000 个病例中有 99.7%发现 HPV DNA 阳性,其中 HPV 的类型主要为 HPV16 和 HPV18<sup>[3]</sup>。WHO 于 1992 年宣布 HPV 是引起宫颈癌的首要因素<sup>[4]</sup>。我国女性中高危 HPV 的感染率是 14.2%,其中 HPV16 和 HPV18 两种病毒造成了大约 70%的宫颈癌病例<sup>[5]</sup>。HPV 是一类小分子 DNA 病毒,由基因组 DNA 和外壳蛋白组成,其中异源表达的主要衣壳蛋白 L1(约 55 kD)能自我装配成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs),VLPs 有着与天然病毒颗粒十分相似的空间结构和抗原表位,但不含病毒 DNA<sup>[6]</sup>。动物模型和人体临床试验结果均表明 VLPs 通过诱导产生高滴度抗体阻止病毒的感染,从而为生物体提供安全保护<sup>[7-9]</sup>。所以,病毒样颗粒疫苗被认为是有前途的宫颈癌预防性疫苗。近年来 HPV16 L1 蛋白在大肠杆菌、酿酒酵母、昆虫细胞-杆状病毒系统以及毕赤酵母等中的异源表达均有报道,其中葛兰素史克(GSK)利用昆虫细胞-杆状病毒表达的 VLPs 疫苗、以及 Merck 生产的酿酒酵母重组 VLPs 疫苗均已完成临床上的有效性和安全性试验,后者已被批准上市<sup>[10-11]</sup>。但这些产品由于受产量的影响成本比较高,导致价格昂贵,限制了疫苗的广泛应用。

多形汉逊酵母是近年来备受关注的一种新型的酵母菌表达系统,它不但可以通过利用甲醇诱导型强效启动子、目标基因在基因组上的高拷贝整合、以及在廉价的合成或半合成培养基中进行细胞的高密度培养实现外源蛋白的稳定高效表达,尤其重要

的是与其他真核表达系统相比,汉逊酵母对外源蛋白的糖基化修饰程度要低得多,因此表达的外源蛋白热原性低,而成为生产具有重要医用价值的蛋白质的理想宿主<sup>[12]</sup>。目前,已经有多种具有诊断和治疗价值的真核蛋白在汉逊酵母中得到了成功表达,如水蛭素、乙型肝炎病毒表面抗原 B、人干扰素 IFN $\alpha$ -2a、胰岛素、尿酸氧化酶等<sup>[13-14]</sup>。但还没有 HPV16 L1 蛋白在汉逊酵母中成功表达的报道。本研究依据多形汉逊酵母密码子偏好性,优化了 HPV16 的 L1 蛋白编码序列,构建了稳定表达 HPV16 L1 蛋白的汉逊酵母重组菌株,并对诱导培养条件进行了优化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  [*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*], 大肠杆菌(*E. coli*) TOP 10, 多形汉逊酵母(*H. polymorpha*) H-ura3, 质粒 pBluscriptM13、YEp352、pMOXZ $\alpha$ -A, 为本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 *Pfu* Mix 均购自宝生物工程(大连)有限公司。抗生素 Zeocin 购自 Invitrogen 公司。HPV16L1 抗体购自 Santa Cruz (USA)。质粒提取、PCR 产物纯化、胶回收试剂盒以及蛋白电泳及 Western blotting 相关试剂均购自天根公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HPV16L1 基因遗传密码的优化

根据 GenBank 提供的 HPV16 主要衣壳蛋白 L1 的氨基酸序列(GenBank Accession No. ACA14209),依据多形汉逊酵母的密码子偏爱性,重新设计 L1 蛋白的编码序列,通过 PCR 搭桥的方法由上海生工生物工程公司合成了密码子优化的基因,命名为 *HPV16L1*,全长约 1.5 kb;将合成的 DNA 片段连接到克隆载体 pBluscriptM13 上,获得重组质粒 pM13-HPV16L1,进行序列分析。

### 1.2.2 汉逊酵母重组表达质粒的构建

利用引物 HPV16L1-L (5'-AGTAAGCTTATGTCTTTGTGGTTGCCATCT-3', 下划线处为 *Hind* III 酶切位点)和引物 HPV16L1-R (5'-GGCGCGGCCGCCTATTACAACCTTCTCTTCTT-3', 下划线处为 *Not* I 酶切位点), 以质粒 pM13-HPV16L1 为模板, PCR 扩增优化后的 *HPV16L1* 全序列, PCR 产物经 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切后, 插入到经 *Hind* III 和 *Not* I 酶切的质粒 pMOXZ $\alpha$ -A 中, 构建重组质粒 pMOXZ-HPV16。利用引物 MOXp-L (5'-CCTGAGCTCGTCGACGCGGAG AACGATCTC-3', 下划线处为 *Sac* I 酶切位点)和引物 AOXt-R (5'-GCAGGATCCGCAAA TGGCATTCTGACATCC-3', 下划线处为 *Bam*H I 酶切位点), 以质粒 pMOXZ-HPV16 为模板, PCR 获得约 3.4 kb 的 DNA 片段, 即 *MOXp-HPV16L1-AOXITT* 表达盒, 用 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切 PCR 产物, 插入到质粒 YEp352 的相应位点, 获得以 *URA3* 为筛选标记的重组表达质粒 pYMOXU-HPV16。

### 1.2.3 汉逊酵母转化及重组菌株筛选

用限制性内切酶 *Sac* II 酶切质粒 pYMOXU-HPV16 使其线性化, 线性化后的质粒 pYMOXU-HPV16 通过电转化的方法 (Bio-Rad Gene-Pulser Apparatus, 1.5 kV, 50  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 3 ms) 导入多形汉逊酵母 (*H. polymorpha*) H-ura3。由于受体菌 H-ura3 为尿嘧啶营养缺陷型 (*ura3*), 而重组质粒上带有与之互补的 *URA3* 基因, 因此在酵母菌基本培养基 (SC)<sup>[15]</sup> 上筛选可能的重组菌株, 并进一步通过 PCR 分析进行验证。

### 1.2.4 酵母菌培养及 HPV16 L1 蛋白的诱导表达

将受体菌株和重组菌株接种于 5 mL YPG (1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 1% (V/V) 甘油, 自然 pH) 液体培养基中, 37°C、200 r/min 培养 20 h。3000  $\times$ g 离心 5 min 收集菌体, 用无菌水洗 2 遍, 将细胞转接于装有 50 mL YPM (1% 酵母粉, 2% 蛋白胨, 1% (V/V) 甲醇) 培养基的 250 mL 摇瓶中, 37°C、200 r/min 诱导培养, 每隔 12 h 补加甲醇至总体积的 0.5%。诱导培养 72 h 后, 如上离心收集细胞, 分别测定生物量, 细胞总蛋白含量及 HPV16 L1 蛋白表达量。

以上述培养条件为基础, 分别分析甲醇补加浓

度及补加间隔时间、培养基 pH 值、初始接种量、诱导培养时间等因素对细胞生长和 L1 蛋白表达的影响。

### 1.2.5 蛋白质提取及分析

3000  $\times$ g 离心 5 min 收集诱导培养后的菌体, 细胞分别用蒸馏水和酵母细胞裂解缓冲液 (20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mmol/L EDTA, 0.4 mol/L NaCl, 用 NaOH 调 pH 7.0) 洗 1 次, 然后悬浮于含 2 mmol/L PMSF 的酵母细胞裂解缓冲液中, 超声波破碎法 (400 W 工作 10 s, 间歇 20 s, 共 80 个循环) 提取细胞蛋白, 11 000  $\times$ g 离心 10 min, 取上清液立即进行蛋白分析或 -20°C 保存备用。

蛋白质含量测定采用 Bradford 法, 具体参照文献 [16]。利用 Western blotting 分析重组 L1 蛋白的分子量和免疫特异性, 蛋白样品经 12% SDS-PAGE<sup>[17]</sup> 后, 150 mA 转膜 1 h, 膜封闭液处理 1 h, 然后与一抗 HPV16L1 抗体反应 1 h, 洗膜后, 与二抗 HRP 标记羊抗鼠 IgG 反应 1 h, 洗膜后, 利用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒 (天根生化) 显色。通过胶扫描 (Shimadzu dual-wavelength Tlc scanner cs-930, Japan) 对 Western blotting 膜或 SDS-PAGE 上的目标蛋白进行定量。

## 2 结果

### 2.1 密码子优化 HPV16L1 基因的合成和表达质粒的构建

利用 DNAMAN 软件对 HPV16 中国株 L1 蛋白编码基因 *HPV16L1-N* (GenBank Accession No. EU430688) 的密码子使用情况进行分析, 发现天然 L1 蛋白编码基因的密码子使用情况与利用多变量统计分析软件 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/codonw.html>) 得到的多形汉逊酵母密码子偏好性有明显的区别, L1 蛋白编码序列中多数密码子在多形汉逊酵母中的使用频率偏低。因此依据 GenBank 中 L1 蛋白的氨基酸序列 (GenBank Accession No. ACA14209), 选用在多形汉逊酵母中使用频率较高的密码子, 并兼顾 GC 含量及在基因中的分布, 避免出现富含 GC 或 AT 的区域, 重新设计了 HPV16 L1 蛋白编码基因的核苷酸序列。由上海生工生物技术服务公司分两段进行合成, 然后通

过 PCR 搭桥法分别获得约 1.5 kb 编码 L1 蛋白的天然序列 *HPV16L1-N* 和优化序列 *HPV16L1*, 并将其克隆到载体 pBluscriptM13 上, 获得重组质粒 pM13-HPV16L1N 和 pM13-HPV16L1, 序列分析结果表明合成基因核苷酸序列与理论设计的序列完全相同。

优化的 *HPV16L1* 基因中, 编码甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和色氨酸(Trp)的密码子与天然基因 *HPV16L1-N* 的一致, 而其他氨基酸的密码子均选择多形汉逊酵母比较偏好的密码子, 整个基因中 505 个密码子中的 233 个被优化(表 1)。基因序列中 GC 含量没有明显的变化, 但分布发生了变化, 去除了富含 GC 区和富含 AT 区。优化后的完整序列已在 GenBank 中注册(GenBank Accession No. GQ423063)。利用 RNAfold 分析软件(<http://rna.tbi.univie.ac.at>) 对密码子优化前后 mRNA 的二级结构进行了分析(图 1), 优化前后 mRNA 自由能没有明显变化, 但序列优化使 mRNA 二级结构组装的多样性由原来的 376.43 降为 327.23。

以质粒 pM13-HPV16L1 为模板, 利用引物 HPV16L1-L 和 HPV16L1-R 进行 PCR 扩增, 将克隆

表 1 优化后基因 *HPV16L1* 与天然基因 *HPV16L1-N* 的密码子使用对比

Table 1 Codon usage in *HPV16L1* and *HPV16L1-N*

Amino acids	Codon usage in <i>HPV16L1-N</i>	Codon usage in <i>HPV16L1</i>
Ala	6GCC+15GCA+9GCT	30GCT
Arg	1CGG+4CGA+3CGC+11AGA	19AGA
Asn	20AAT+8AAC	28AAC
Cys	4TGC+8TGT	12TGT
Gln	11CAA+9CAG	20CAA
Gly	8GGA+14GGT+8GGC+4GGG	34GGT
His	8CAT+2CAC	10CAC
Ile	9ATA+1ATC+12ATT	7ATC+15ATT
Leu	3CTT+5CTG+5TTG+7CTA+23TTA	43TTG
Lys	18AAA+15AAG	33AAG
Pro	16CCT+16CCA+5CCC	37CCA
Ser	15TCT+5AGT+2AGC+5TCC+6TCA	27TCT+6TCC
Thr	13ACT+1ACG+17ACA+11ACC	30ACT+12ACC
Tyr	13TAT+9TAC	22TAC
Val	5GTC+8GTA+14GTT+5GTG	26GTT+6GTC

The number before the codon represents the times of codon usage.

到的 *HPV16L1* 基因插入到汉逊酵母表达载体 pMOXZ $\alpha$ -A 的 *Hind* III 和 *Not* I 位点, 获得重组质粒 pMOXZ-HPV16 (图 2A)。利用引物 MOXp-L 和 AOXt-R 从重组质粒 pMOXZ-HPV16 中克隆到约 3.4 kb 的 DNA 片段, 即分别以甲醇氧化酶基因启动子 MOXp 和醇氧化酶基因终止子 AOXITT 为上下游调控元件的 *HPV16L1* 表达盒 MOXp-*HPV16L1*-AOXITT。将上述表达盒插入到载体 YEp352 的 *Sac* I 和 *Bam*H I 位点, 获得重组表达质粒 pYMOXU-HPV16(图 2B)。序列分析证实质粒 pYMOXU-HPV16 中具有正确的 MOXp-*HPV16L1*-AOXITT 表达盒。按上述方法同样构建了天然基因的重组表达质粒 pYMOXU-HPV16N。

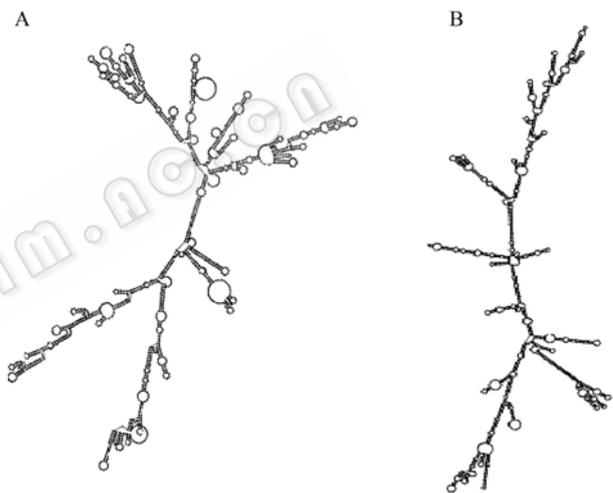


图 1 *HPV16 L1* 蛋白天然 mRNA 二级结构(A)和密码子优化后二级结构(B)比较

Fig. 1 Secondary structure of the native mRNA (A) and the codon optimized mRNA (B).

## 2.2 多形汉逊酵母重组菌株的构建与筛选

带有 *URA3* 基因的线性化重组质粒 pYMOXU-HPV16 和 pYMOXU-HPV16N 分别转化 *URA3* 基因被破坏的多形汉逊酵母 H-ura3, 通过尿嘧啶营养缺陷互补在酵母菌基本培养基(SC)上对转化菌株进行初步筛选, 分别提取受体菌和转化菌株的基因组 DNA, 以此为模板, 进行 PCR 扩增, 结果从筛选的转化菌株中均扩增出约 1.5 kb 的 DNA 片段, 而受体菌没有相应的 PCR 产物, 说明 *HPV16L1* 基因或 *HPV16L1-N* 已整合到转化菌株的基因组中。

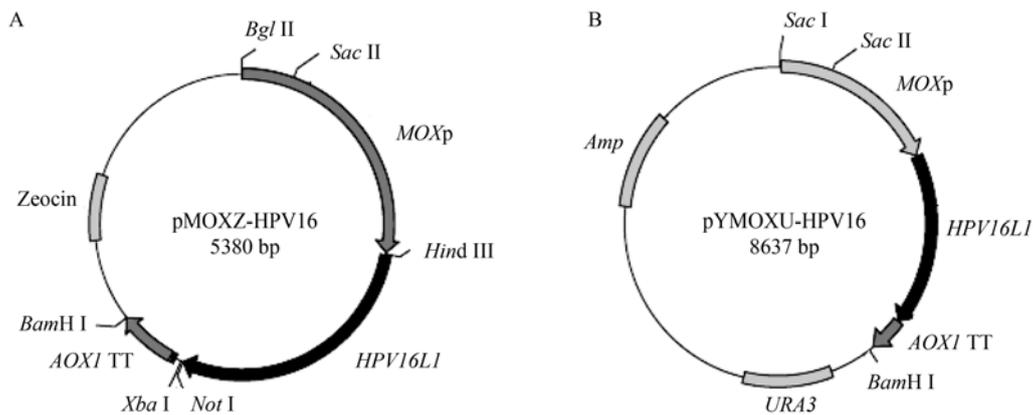


图2 质粒 pMOXZ-HPV16 (A)和 pYMOXU-HPV16 (B)的物理图谱

Fig. 2 Physical maps of plasmids pMOXZ-HPV16 (A) and pYMOXU-HPV16 (B).

### 2.3 HPV16 L1 蛋白的诱导表达和分析

受体菌和转化菌株在 37°C 诱导培养 72 h, 离心收集菌体, 提取胞内蛋白, 进行 Western blotting 分析, 结果在受体菌蛋白和 HPV16 L1 蛋白天然基因转化菌株蛋白中均未检测到特异性蛋白带, 而线性化重组质粒 pYMOXU-HPV16 转化的酵母菌株的胞内蛋白与 HPV16 L1 抗体发生免疫反应, 在约 55 kD 处产生了特异性条带(图 3), 表明通过密码子优化使 HPV16 的 L1 蛋白在汉逊酵母细胞中得到了表达, 并且具有特异的免疫原性。天然基因 *HPV16L1-N* 中一些密码子在汉逊酵母中使用频率过低是影响蛋白表达的主要限制因素, 如编码精氨酸(Arg)的密码子 CGG 和 CGA 在天然基因中出现了 5 次, 但它们在汉逊酵母中的使用频率为零。

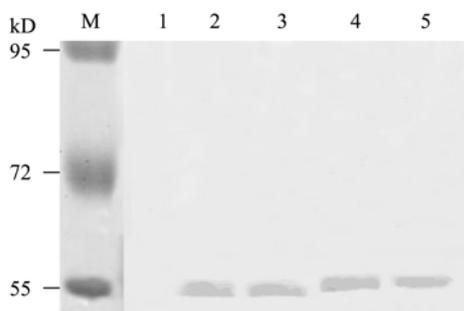


图3 HPV16 L1 蛋白表达的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of the expression of HPV16 L1 in *H. polymorpha*. M: protein marker; 1: negative control (protein sample of *H. polymorpha* H-ura3); 2-5: protein samples of transformants carrying the coden optimized *HPV16L1* gene.

通过胶扫描分析密码子优化后转化菌株的 HPV16 L1 表达量, 从中选出表达量最高的菌株, 命名为 HP-U-16L。

### 2.4 HPV16 L1 诱导表达条件的优化

在摇瓶发酵条件下, 分别检测了甲醇补加方式及浓度、培养液 pH、初始接种量、以及诱导时间等因素对 HPV16 L1 表达的影响。

重组菌株 HP-U-16L 在 YPG 中活化培养 20 h 后, 按 10% 接种量转接于 50 mL YPM 培养基中, 37°C 摇床(200 r/min)诱导培养, 每隔 12 h 或者 24 h 补加甲醇, 浓度分别控制在培养液体积的 0.5%、1.0% 和 1.5%。诱导培养 72 h 后取样分析, 结果发现不同的甲醇补加方式对细胞生长影响不很明显, 但对 HPV16 L1 蛋白的表达有明显影响(图 4), 其中每隔 12 h 补加甲醇到培养液体积的 1.0% 时, 对细胞生长和 L1 蛋白的表达均最为有利, 在此诱导条件下 L1 蛋白的表达量达最高, 为 58.2 mg/L。在甲醇浓度比较低的条件下诱导培养时, L1 蛋白的表达量低可能是由于低浓度的甲醇优先供应细胞的生长, 而不能有效诱导外源蛋白的表达; 而过高的甲醇浓度可能对细胞内基因的表达过程产生一定的抑制作用, 而不利于外源蛋白的表达<sup>[18-19]</sup>。

重组菌株 HP-U-16L 在不同 pH 的 YPM 培养基(利用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液控制 pH 在 5.8~7.8 之间)中进行诱导培养, 每隔 12 h 补加甲醇到培养液体积的 1.0%。72 h 后取样分析, 结果如图 5 所示, 多型汉逊酵母生长的 pH 范围比较广, 但 pH 在 6.2~6.6

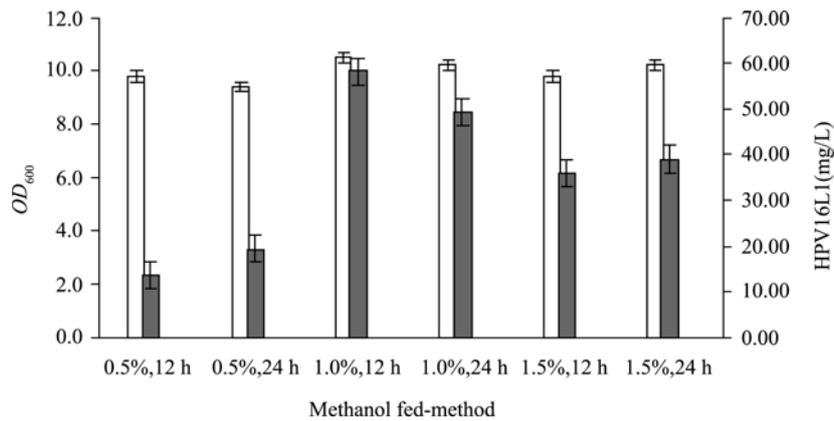


图 4 甲醇添加方式对细胞生长和 HPV16 L1 表达的影响

Fig. 4 Effects of different methanol fed-method on the expression of HPV16 L1. Values are means of three replications  $\pm$  standard deviation. □: OD<sub>600</sub>; ■: concentration of HPV16 L1.

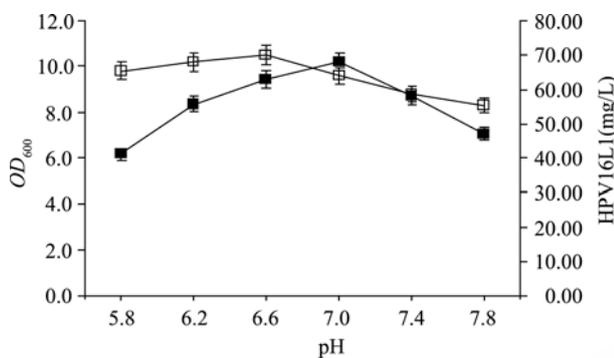


图 5 培养液 pH 对细胞生长和 HPV16 L1 表达的影响

Fig. 5 Effects of pH on cell growth and the expression of HPV16 L1. Values are means of three replications  $\pm$  standard deviation. □: OD<sub>600</sub>; ■: concentration of HPV16 L1.

之间时, 最有利于细胞的生长, 而 L1 蛋白的表达量却在 pH 值为 7.0 时达最高, 为 69.8 mg/L。培养液的 pH 值进一步升高则对细胞生长和 L1 蛋白的表达均产生抑制作用。

将不同量的种子细胞转接到 50 mL YPM (pH 7.0) 培养基中, 每隔 12 h 补加甲醇到培养液体积的 1.0%, 研究诱导培养时起始细胞浓度对 HPV16 L1 表达的影响, 结果发现随着接种量的增加细胞生物量不断增加, 但 L1 蛋白表达量在诱导开始 OD<sub>600</sub> 为 1.0 时达到最高(图 6)。过高的接种量可能使甲醇更多用于细胞的生长, 而降低了诱导 L1 蛋白表达的效率。

重组菌株 HP-U-16L 在 YPG 中活化培养 20 h 后, 转接于 YPM (pH 7.0) 培养基中, 调节细胞浓度使起始 OD<sub>600</sub> 约为 1.0, 37°C 诱导培养, 每隔 12 h 补加甲

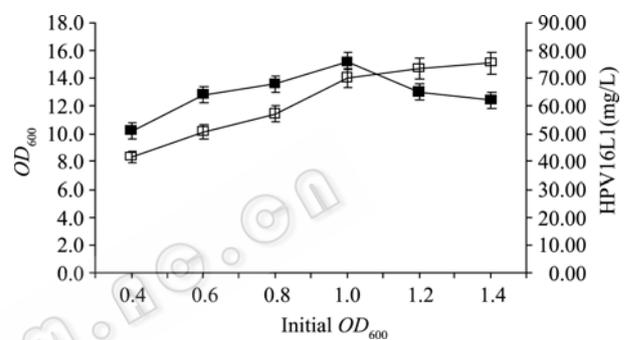


图 6 初始接种量对细胞生长和 HPV16 L1 表达的影响

Fig. 6 Effects of inoculum size on cell growth and the expression of HPV16 L1. Values are means of three replications  $\pm$  standard deviation. □: OD<sub>600</sub>; ■: concentration of HPV16 L1.

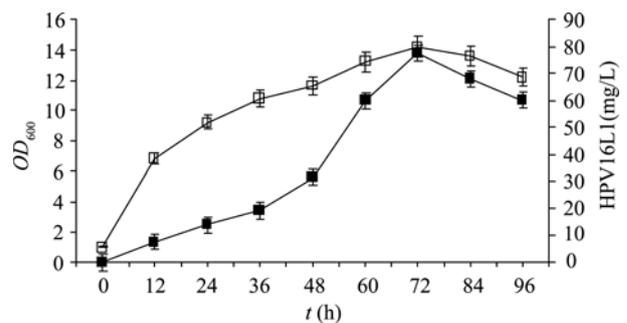


图 7 诱导时间对细胞生长和 HPV16 L1 表达的影响

Fig. 7 Time course of cell growth and HPV16 L1 production of recombinant *H. polymorpha* HP-U-16L in shake flask culture. Values are means of three replications  $\pm$  standard deviation. □: OD<sub>600</sub>; ■: concentration of HPV16 L1.

醇到培养液体积的 1.0%, 每 12 h 取样测量菌体浓度和 HPV16 L1 表达量, 共诱导培养 96 h。如图 7 所示, 36 h 之前细胞生长迅速, 而 L1 蛋白的表达量比较低, 36 h 之后细胞生长速度逐渐减缓, 而 L1 蛋白表达迅

速提高, 诱导培养 72 h 后, 菌体浓度和 L1 蛋白表达量均达到最高, L1 蛋白产量为 78.6 mg/L。继续延长诱导培养时间, 细胞开始出现老化和自溶, 同时 HPV16 L1 蛋白表达水平降低。因此在上述培养条件下, 合适的诱导时间是 72 h。

### 3 讨论

宫颈癌是危害妇女健康和生命的严重疾病, 在美国, 由于巴氏涂片实验的广泛应用, 在过去 50 年中, 宫颈癌的死亡率降低了 70%。然而在发展中国家, 由于卫生状况和经济原因, 宫颈癌在妇女癌症死因中依然排在第一位。人乳头瘤病毒(HPV)是宫颈癌的主要病因, 因此, 研究针对 HPV 的高效、价格低廉的预防性疫苗非常重要。

利用汉逊酵母表达外源蛋白不会发生过度的糖基化, 非常适合药用蛋白的表达, 而且在遗传可操作性、蛋白表达量及生物活性、工业化条件的可控性等方面比原核表达系统、酿酒酵母表达系统、毕赤酵母表达系统、以及杆状病毒-昆虫表达系统具有更大的优势<sup>[12-13]</sup>。在表达外源基因时, 如果基因序列中 AT 序列过高容易导致转录翻译提前终止, 天然 *HPV16L1* 基因的编码区 AT 序列出现的频率比较高, 针对该问题, 并且考虑到汉逊酵母的密码子偏爱性, 本研究对 HPV16 L1 蛋白的编码序列进行了优化, 构建了能够表达 HPV16 L1 蛋白的重组汉逊酵母, Western blotting 分析表明表达蛋白的分子量约为 55 kD, 与其理论分子量基本相同, 而且该蛋白能够与 HPV16 L1 抗体发生特异性反应。

诱导培养条件的控制是实现外源蛋白高效表达的重要因素, 最适条件的确定既取决于宿主细胞的生理生化特性, 也有赖于目标蛋白的特性。在摇瓶发酵条件的研究中发现, 甲醇补加方式、发酵液 pH 控制、初始接种量等均是影响 HPV16 L1 蛋白表达和细胞生长的重要因素。利用汉逊酵母进行外源蛋白表达时, 甲醇既是诱导剂, 同时也是细胞生长和代谢活性的碳源和能源, 发酵液中过高的甲醇水平会对细胞活力产生一定的抑制, 而低水平的甲醇又可能不足以诱导蛋白的有效表达, 诱导培养过程中对甲醇水平的良好控制对实现 HPV16 L1 蛋白的高

效表达有重要意义。环境的酸碱度对细胞生理状态有明显的影 响, 在诱导培养条件的研究中发现, 当没有人为控制发酵液 pH 时, 随着诱导过程的进行 pH 值会逐渐升高到 8.0 以上, 汉逊酵母具有比较宽的 pH 适应范围, 在 4.5~7.0 之间均可生长, 但当环境 pH 大于 7 时, 细胞生长和代谢活性会明显降低, 本研究中通过控制 pH 在 7.0 使 HPV16 L1 蛋白表达量提高了约 20%。在初步优化的条件下, 即在 YPG 中活化的种子细胞转接于 pH 控制在 7.0 的 YPM 培养基中, 使起始细胞浓度控制在  $OD_{600}$  为 1.0, 37°C、200 r/min 诱导培养, 每隔 12 h 补加甲醇至发酵液体积的 1%, 72 h 后, HPV16 L1 蛋白表达量为 78.6 mg/L, 比条件优化前提高了 35%。上述研究为利用发酵罐进行细胞高密度诱导培养条件的优化和合理控制奠定了重要的基础。HPV 疫苗抗原成分的构象依赖性非常明显, VLPs 结构是否完整将明显影响其免疫原性, 只有较完整的病毒颗粒才能产生较强的免疫反应, 因此在细胞高密度诱导培养条件的优化中 VLPs 结构的完整性和免疫原性是需要分析的重要方面。

### REFERENCES

- [1] Cornelison TL. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Current Opinion Oncol*, 2000, **12**(5): 466-473.
- [2] Gissmann L, zur Hausen H. Inverted repetitive sequences in human papilloma virus-1(HPV-1) DNA. *Virology*, 1977, **83**(2): 271-276.
- [3] Walboomer JM, Jacobs MV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, **189** (1): 12-19.
- [4] Dell G, Gaston K. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**(12/13): 1923-1942.
- [5] Chen BL, Ma XD, Mu RH, *et al.* Induction of apoptosis in human cervical carcinoma cell line SiHa by antisense oligonucleotide of human papillomavirus type16 E6 gene. *Fourth Mil Med Univ*, 2000, **21**(2): 340-343.
- [6] Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, *et al.* Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(24): 12180-12184.
- [7] Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, *et al.* A controlled trial of a human papillomavirus type16 vaccine. *N Engl J Med*, 2002, **347**(21): 1645-1651.
- [8] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, *et al.* Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of

- infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. *Lancet*, 2004, **364**(9447): 1757–65.
- [9] Villa LL, Costa RL, Petta CA, *et al.* Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre Phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*, 2005, **6**(5): 271–278.
- [10] Harper DM. Prophylactic human papillomavirus vaccines to prevent cervical cancer: review of the Phase II and III trials. *Therapy*, 2008, **5**(3): 313–24.
- [11] Stanley M. Human papillomavirus vaccines versus cervical cancer screening. *Clin Onco*, 2008, **20**(6): 388–394.
- [12] Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, *et al.* New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*—a comparison. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**(11): 1079–1096.
- [13] Boer E, Steinborn G, Kunze G, *et al.* Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **77**(3): 513–523.
- [14] Chen Z, Wang Z, He X, *et al.* Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harbouring *Candida utilis* uricase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(4): 545–554.
- [15] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, *et al.* Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(5): 248–254.
- [17] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [18] Ohashi R, Mochizuki E, Suzuki T. A mini-scale mass production and separation system for secretory heterologous proteins by perfusion culture of recombinant *Pichia pastoris* using a shaken ceramic membrane flask. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**(5): 655–660.
- [19] Zhou XS, Fan WM, Zhang YX. Effects of different methanol feeding strategy on hirudin production in high-density fermentation by recombinant *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2002, **18**(3): 348–351.
- 周祥山, 范位民, 张元兴. 不同甲醇流加策略对重组毕赤酵母高密度发酵生产水蛭素的影响. *生物工程学报*, 2002, **18**(3): 348–351.

#### 我单位《生物工程学报》等 4 种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近 1 年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等 4 种期刊自第 1 卷第 1 期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计 130 卷 620 余期, 约 1 万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008 年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。