

猪瘟病毒 E2 蛋白 A/D 抗原域在毕赤酵母中的表达^{*}

徐学清, 曹瑞兵, 蔡梅红, 任雪枫, 周 斌, 陈溥言

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 对含猪瘟病毒 E2 蛋白 A/D 抗原区基因插入的重组酵母菌株进行诱导表达, 通过对诱导时间、重组酵母菌株、菌体密度、培养液 pH、甲醇剂量等培养条件与表达产量关系的分析, 对重组蛋白的表达条件进行了优化。优化后的条件为: 28~30 ℃, 225 r/min 振荡培养至 BMGY 中菌体 OD₆₀₀ 值为 3.0~3.5 时, 将菌体转入相当于 4 倍体积 BMMY, pH 为 6.0 的 BMMY 培养基中培养 72 h, 每 24 h 加入甲醇至终浓度为总体积的 0.5%~1.0%。在此优化条件下, 重组蛋白的表达量可达 275.38 μg/mL, 比较温度对重组蛋白降解率的影响后发现, 培养物上清液应保存于 -20 ℃。

[关键词] 巴斯德毕赤酵母; 猪瘟病毒 E2 蛋白; A/D 抗原区; 表达条件; 条件优化

[中图分类号] S852.65⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)03-0011-05

由猪瘟病毒引起的猪瘟是一种急性、致死性疾病, 具有高度接触传染性, 流行广泛, 且发病率高, 危害极大^[1]。该病毒的囊膜糖蛋白 E2 是其主要保护性抗原, 能够单独诱导有效的免疫保护反应^[2], 其 2 个相对独立的抗原结构单位 B/C 抗原区和 A/D 抗原区, 一直都是研究防制猪瘟的检测抗原和亚单位疫苗的重点对象。苏小运等^[3]曾用原核表达系统来表达 A/D 抗原区基因, 以期获得 ELISA 检测试剂盒的包被抗原。在笔者的研究中, 选用的是酵母 (*P. pastoris*) 表达系统, 巴斯德毕赤酵母是一种单细胞真核生物, 近年来其基因工程菌已被广泛应用于外源蛋白的商业化生产。与其他表达系统相比, 尽管该系统具有高表达、高稳定、高分泌的优点, 但仍有一些蛋白表达量相对较低, 如 β-cryotogin 表达量级仅为 1~5 mg/L^[4]; 有些甚至不能表达, 如 HM 表面糖蛋白^[5]; 而且还存在分泌表达产物的不均一、信号肽加工不完全、表达产物内部降解等现象^[6]。这些现象的发生, 一方面是由于外源基因本身的特性引起的, 如基因密码子组成、5'非翻译区(5'-UTR)核苷酸的序列和长度等; 另一方面, 表达条件的选择也有十分重要的影响。综合考虑外源基因在巴斯德毕赤酵母中高效表达的各种影响因素后,

本研究在实验室现有条件下, 研究了所得到的表达 E2 蛋白高拷贝重组酵母菌株的最适表达条件, 以期作为 E2 蛋白的大规模发酵表达和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株 含猪瘟病毒 E2 蛋白 A/D 抗原区基因插入的重组酵母菌株, 自行构建获得; 不含任何插入的 X-33 菌株由本实验室保存。

1.1.2 试 剂 酵母用蛋白胨、酵母氮碱(YNB 无氨基酸)、D-山梨糖醇、生物素和抗生素 ZeocinTM 均购自 Invitrogen 公司; SDS(十二烷基磺酸钠)、DTT(二巯基糖醇)、Tris 碱、过硫酸铵、丙烯酰胺、蛋白质分子量 Marker、考马斯亮兰 R250 和甘氨酸均购自上海生物工程有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。用于酵母培养表达的 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)、YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose sorbitol Medium)、BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) 及 BMMY (Buffered Methanol-complex Medium) 均按 Easy selectTM *p ichia* expression kit 方法配制。

* [收稿日期] 2004-05-24
[基金项目] 国家 863 高技术发展计划项目(2001AA 249012)
[作者简介] 徐学清(1978-), 男, 湖北嘉鱼人, 在读硕士, 主要从事动物分子病毒学研究。
[通讯作者] 陈溥言(1942-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物分子病毒学与分子免疫学研究。E-mail: aid@njau.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 不同诱导时间对 E2 蛋白表达的影响 挑取筛选的含有高拷贝目的基因的重组酵母菌,按 Easy select™ *pichia* expression kit 方法培养,每 24 h 取 1.5 mL 样品,并补加甲醇至终体积分数为 0.5%。将 24, 48, 72 和 96 h 的表达产物离心,取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.2 不同重组酵母菌株的诱导表达 选高拷贝菌株和低拷贝菌株分别接种于装有 20 mL BMGY 培养基的 250 mL 锥形瓶中,28~30 ℃,250~280 r/min 摇床培养过夜(18~24 h)。当 OD₆₀₀ 3.0~3.5,酵母处于对数生长期时,室温 4 000 r/min 离心 4 min 收集菌体,再用 80 mL 的 BMMY 重悬菌体于同一锥形瓶中,28~30 ℃ 摇床培养,每隔 24 h 补加甲醇使其终体积分数为 0.5%。72 h 后 4 ℃ 离心,取上清液用 pH 为 7.4 的 PBS 流水透析 72 h,用 RNA/DNA Calculator 测其浓度,并进行 SDS-PAGE 电泳和薄层扫描。

1.2.3 不同菌体密度的诱导表达对 E2 蛋白表达的影响 高拷贝菌株在 BMGY 中培养菌体至 OD₆₀₀ 3~3.5 时,离心后分别用相当于锥形瓶 1/5, 1/2, 1/4 和 10 倍体积的 BMMY 重悬菌体进行诱导表达,72 h 后离心、透析取上清液进行 SDS-PAGE 电泳和薄层扫描。

1.2.4 不同 pH 培养液对 E2 蛋白表达的影响 分别配制 pH 为 6.0, 6.5, 7.0 和 8.0 的 BMMY 培养

基。取 5 个 100 mL 的锥形瓶,分别加入 20 mL 不同 pH 的 BMMY 和等量在 BMGY 中培养 24 h 的高拷贝重组菌,72 h 后离心、透析,取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 不同剂量甲醇对 E2 蛋白表达的影响 分别配制含体积分数 0.5%, 1.0%, 1.5% 和 2.0% 甲醇的 BMMY 培养基。取 5 个 100 mL 锥形瓶,分别加入 20 mL 含不同甲醇剂量的 BMMY 和等量在 BMGY 中培养 24 h 的高拷贝重组菌,每 24 h 补加甲醇使终体积分数分别为 0.5%, 1.0%, 1.5% 和 2.0%, 培养 72 h 后离心、透析,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.6 保存条件的优化 将在最优化条件下诱导的酵母培养物上清液离心、透析后,收集上清液,用 RNA/DNA Calculator 测浓度后分装到 1.5 mL 的灭菌离心管中,然后取 3 管分别于 4 ℃, 室温, -20 ℃ 储存,10 d 后各取 20 μL 测浓度后进行 SDS-PAGE 电泳。

2 结果与分析

2.1 不同诱导时间下 E2 蛋白的表达情况

不同诱导时间表达产物的电泳结果见图 1。从肉眼来看,诱导不同时间后目的蛋白的表达量有一定变化,诱导 24 h 几乎看不到蛋白条带,即重组子表达蛋白的量较低;诱导 48 h 后表达蛋白量上升,电泳带可见,但不及 72 h 和 96 h 条带明显;而诱导 72 h 后非常清晰且量较大,但诱导 96 h 和 72 h 无明显区别。

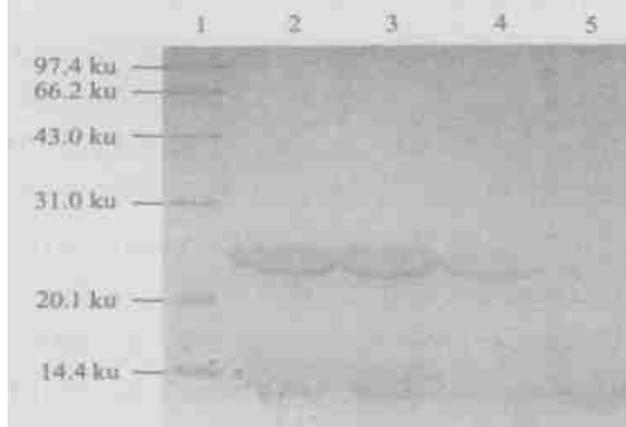


图 1 重组酵母菌在不同诱导时间分泌表达 E2 蛋白的情况

1. 蛋白质分子量标准; 2 96 h; 3 72 h; 4 48 h; 5 24 h

Fig. 1 Secreted expression of E2 protein by recombinant yeast in different time

1. Protein MW marker; 2 96 h; 3 72 h; 4 48 h; 5 24 h

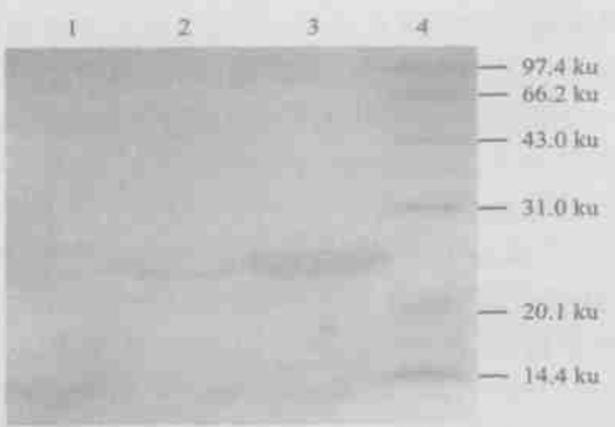


图 2 不同重组酵母菌株分泌表达 E2 蛋白的情况

1. X33; 2 低拷贝菌株; 3 高拷贝菌株; 4 蛋白质分子量标准

Fig. 2 Secreted expression of E2 protein by different recombinant yeast strains

1. X33; 2 Low-copy yeast strain; 3 High-copy yeast strain; 4 Protein MW marker

2.2 不同重组酵母菌株对 E2 蛋白诱导表达的影响

电泳和 RNA/DNA Calculator 测量结果(图 2)表明, 酵母所含外源基因拷贝数越高, E2 蛋白表达量就越高, 低拷贝菌株诱导产物的表达量为 $70.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, 明显低于高拷贝菌株的 $168.45 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

薄层扫描结果也表明, 高拷贝菌株所表达的重组蛋白占总蛋白的 65.8%, 而低拷贝菌株所表达的重组蛋白占总蛋白的 50.6%。

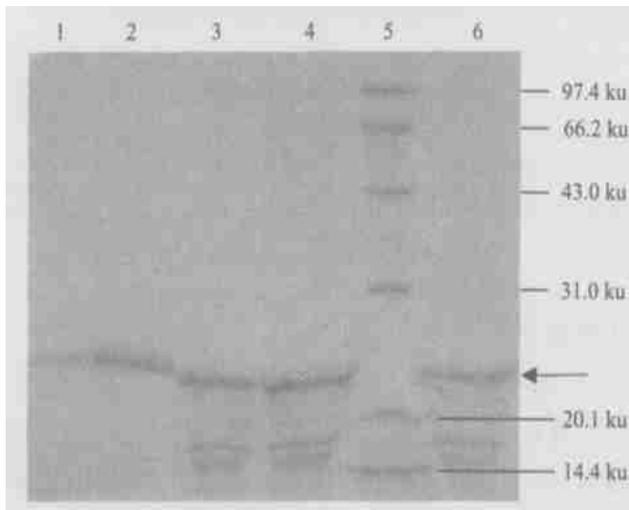


图3 不同起始菌体密度对 E2 分泌表达的影响
箭头所指为目的蛋白条带

1. 10 倍稀释; 2. 4 倍稀释; 3. 不稀释; 4. 2 倍浓缩;
5. 蛋白质分子量标准; 6. 5 倍浓缩

Fig. 3 Influence of the initial yeast concentration on the secreted expression of E2 protein

1. Ten times dilution; 2. Four times dilution;
3. No dilution; 4. Concentration of two times;

5. Protein MW marker; 6. Concentration of four times

2.4 不同 pH 培养液对 E2 蛋白诱导表达的影响

从不同 pH 值培养液诱导表达的电泳结果(图 4)可以看出, 在所有 pH 培养液中几乎无杂带产生, 但表达目的蛋白的量却有差别, 在 pH 为 6.0~8.0 时, 目的蛋白的表达量逐渐降低, 到 pH 为 8.0 时几乎无目的蛋白诱导产生, 故 pH 为 6.0 是最佳 pH 值。

2.5 不同剂量甲醇对 E2 蛋白诱导表达的影响

利用不同剂量甲醇诱导所得表达产物的电泳结果(图 5)表明, 甲醇终体积分数为 0.5% 时, 诱导蛋白的表达量最高。

2.3 不同菌体密度对诱导表达的影响

试验结果(图 3)表明, 表达蛋白的产量随发酵密度增大而明显提高, 但表达量在发酵密度达一定值后有所下降, 其中以重悬于 4 倍体积 BMMY 中(OD 值约 1.0)的表达量最高。

薄层扫描表明, 此种密度下表达的重组蛋白占总蛋白的 66.7%, 而其他密度下所表达的重组蛋白占总蛋白的 44.7%~61.2%, 即随发酵密度增大, 杂蛋白不断增多, 目的蛋白减少。

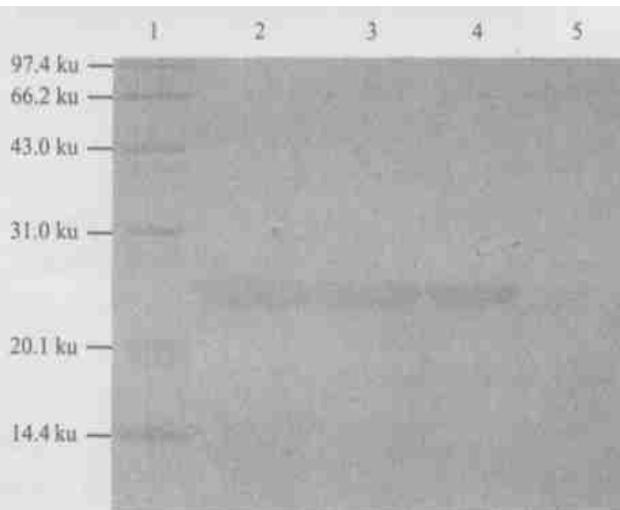


图4 培养液 pH 对 E2 蛋白分泌表达的影响

1. 蛋白质分子量标准; 2. pH=6.0; 3. pH=6.5;
4. pH=7.0; 5. pH=8.0

Fig. 4 Influence of pH of the culture on the secreted expression of E2 protein

1. Protein MW marker; 2. pH=6.0; 3. pH=6.5;
4. pH=7.0; 5. pH=8.0

随着甲醇终体积分数由低到高, 表达蛋白量逐渐降低, 但终体积分数为 1.0% 与 0.5% 时, 二者之间无明显差异。

2.6 不同保存温度对 E2 蛋白降解的影响

从电泳结果(图 6)来看, 不同储存条件对猪瘟病毒 E2 蛋白降解的影响很大。在最优化条件下, 重组蛋白的表达量达 $275.38 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

10 d 后, 室温下储存蛋白的浓度下降了 92.64%; 4℃ 保存的降解速度稍慢, 下降了 42.31%; 而在 -20℃ 条件下几乎不降解。因此, 重组蛋白应保存于 -20℃。

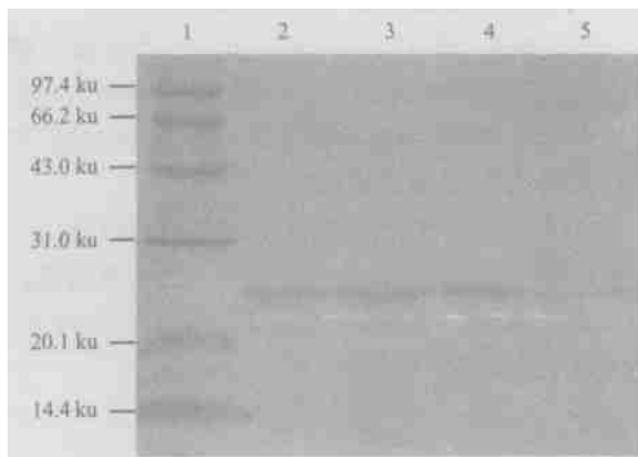


图 5 不同剂量甲醇诱导后表达产物的 SDS-PA GE 结果

1. 分子量蛋白质标准; 2 0.5%; 3 1.0%; 4 1.5%; 5 2.0%

Fig 5 The SDS-PA GE results of expression products induced with different doses of methanol

1. MW protein marker; 2 0.5%; 3 1.0%; 4 1.5%; 5 2.0%

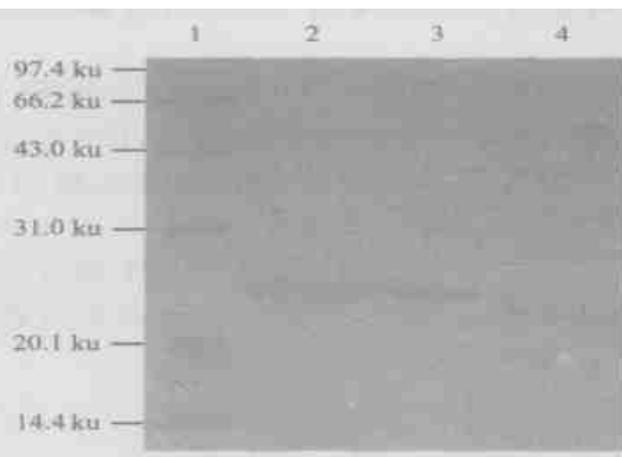


图 6 表达产物在不同温度下保存的 SDS-PA GE 结果

1. 分子量蛋白质标准; 2 - 20 ; 3 4 ; 4 室温

Fig 6 The SDS-PA GE results of expression products conserved in different temperature

1. Protein MW marker; 2 - 20 ; 3 4 ; 4 RT

3 讨论

影响外源基因表达的因素很多, 为了将不良影响因素降至最低, 以便提高 E2 蛋白的表达量。本研究对影响诱导表达的以下几个因素进行了优化。

3.1 诱导表达时间

通常情况下, 随发酵时间增加, 蛋白浓度和产物活性均会相应增加; 但是, 当发酵超过一定时间后, 才会出现蛋白浓度、产物活性降低的情况。其原因可能在于: (1) 当发酵产物浓度超过一定值后, 发生产物抑制, 导致细胞增长速度降低, 蛋白浓度下降, 产物活性降低; (2) 发酵产物可能对细胞具有一定的毒性, 当蛋白浓度增加到一定程度时, 将导致细胞死亡; (3) 随发酵时间增加, 宿主细胞的蛋白水解酶浓度也会随之增加, 使分泌的重组蛋白发生降解, 使产物的得率降低。不同诱导时间蛋白表达的测定结果显示, 24 h 时表达量非常低, 48 h 时已经上升, 72 h 和 96 h 时达峰值, 二者在电泳带上没有明显区别。由此可得出结论: 在发酵罐中大量表达 E2 蛋白时, 可以考虑诱导至 72 h 即可, 没必要诱导 96 h。这样可缩短表达时间, 节约成本, 提高产量。

3.2 重组酵母菌株外源基因的拷贝数

尽管在大多数情况下, 外源基因的拷贝数加大, 表达量上升, 但也有个别例外。如在小牛溶菌酶表达过程中, 当拷贝数从 1 个增至 3 个时, 其分泌水平反而下降^[7]。因此, 有必要确定 A/D 区基因拷贝数与表达量的关系, 本研究表明, 高拷贝数的 E2 蛋白表

量更大。

3.3 诱导表达的起始菌体密度

理论上, 诱导表达时菌体密度越大则表达量也越大, 但考虑到过高菌体密度会限制培养基中氧和营养物质的供给, 导致杂蛋白表达量增加, 并可能对外源蛋白的溶解性、稳定性等产生影响。因此, 诱导前过高的细胞密度不能使酵母菌处于表达外源蛋白的最佳对数生长期, 故应针对不同的目的蛋白确定其在 2 种培养基中的具体菌体密度^[8]。本试验中, 当用相当于 4 倍体积 BMGY 的 BMMY, 稀释已在 BMGY 中生长至 $OD_{600} = 3.0 \sim 3.5$ 的酵母菌, 并使诱导表达开始时的 OD 值接近于 1.0 时, 其目的蛋白的表达量最高。

3.4 培养液的 pH

尽管巴斯德毕赤酵母能在较大的 pH 范围 (pH = 3~8) 内生长, 不同的 pH 值, 特别是酸性 pH 对细胞的生长速度影响很小, 有时甚至没有影响, 但在酸性 pH 下, 细胞分泌蛋白质水解酶的活性大多丧失或降低, 从而保护了目的蛋白。但如果目的蛋白并不耐酸, 较低的 pH 值则会使其失活或降解, 因此 pH 值成为影响蛋白表达的另一个重要因素。本试验分别选取不同 pH 的 BMMY 培养基, 其表达结果表明, 在 pH 为 6.0~6.5 的培养基中, E2 蛋白表达量较高, 而在 pH = 8.0 时表达量低。因此, 可断定最适的 pH 条件是 pH = 6.0~6.5。

3.5 诱导剂的甲醇体积分数

在转化前将酵母重组表达质粒切酶线性化, 使

质粒与酵母基因组发生单交换整合, 而单交换整合时 AOX1 完整存在, 并无缺失影响, 故为甲醇利用正常^[9]。一般而言, 加大甲醇量则重组蛋白的表达量会上升; 但也有研究^[10]表明, 甲醇体积分数过高, 对目的蛋白的表达有抑制作用, 因此应通过试验确定最佳诱导剂的甲醇体积分数。本研究结果显示, 甲醇诱导其的最适体积分数为 0.5% ~ 1.0%, 此时表达量最高, 其次为 1.0%。

因此, 本研究最终确定目的蛋白的诱导表达条件为: 28~30 ℃, 225 r/min 振荡培养至 BMMY 中菌体的 OD₆₀₀ 为 3.0~3.5, 将菌体转入相当于 4 倍体积的 BMMY, 且 pH 为 6.0 的 BMMY 培养基中

培养 72 h, 每 24 h 加入甲醇使终体积分数达 0.5% ~ 1.0%, 收获上清液。

此外, 笔者在试验中偶然发现, 酵母表达上清液的保存时间与温度的关系, 但仍不明白上清液中目的蛋白易在室温下降解的具体原因, 但基于 BMMY 培养基的 pH 值改变会影响重组蛋白的表达量, pH 8.0 BMMY 培养基中重组蛋白几乎不被表达, 对重组蛋白透析 48 h 时所用 PBS 的 pH 为 7.4, 酵母表达上清液中含有蛋白水解酶及温度与酶活性的关系, 作者推测蛋白易在室温下降解可能是所含蛋白水解酶所致, 但具体原因还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第4版. 北京: 中国农业出版社, 2001. 147-153.
- [2] König M, Lengsfeld T, Pauly T. Classical swine fever virus (CSFV): independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins[J]. Virology, 1995, 69(10): 6479-6486.
- [3] 苏小运, 缪德年, 许立华, 等. 猪霍乱弱毒 E2 蛋白 A/D 区的高效表达和蛋白纯化及其应用[J]. 中国病毒学, 2003, 18(2): 164-168.
- [4] Michael J O D. Over expression in *Pichia pastoris* and crystallization of anelicidor protein secreted by the phyto pathogenic fungus[J]. Protein Expression and Purification, 1996, 8: 254-261.
- [5] Score C A, Buckholz R G, Clare J J. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gene, 1993, 136: 111-119.
- [6] 彭毅, 杨希才, 康良仪. 影响甲醇酵母中外源蛋白表达的因素[J]. 生物技术通报, 2000, (4): 33-36.
- [7] Despreaux C W, Manning R F. The dacA gene of *Bacillus thuringiensis* encoding for D-alanine carboxy peptidase: clone, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. Gene, 1993, 131(1): 35.
- [8] 郭美锦, 庄英萍, 储炬, 等. 重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达 rHSA [J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 62-68.
- [9] 李晶, 赵晓祥, 沙长青, 等. 甲醇酵母表达系统的研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 17-20.
- [10] 周祥山, 范卫民, 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[J]. 生物工程学报, 2002, 18(3): 348-351.

Secretion expression conditions optimization of E2 protein A/D antigenic domain of hog cholera virus in *Pichia pastoris*

XU Xue-qing, CAO Rui-bing, CAI Mei-hong, REN Xue-feng, ZHOU Bin, CHEN Pu-yan

(Key Lab of Animal Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: We induced the acquired recombinant *Pichia pastoris* strains with the gene encoding A/D antigenic domain of hog cholera virus E2 protein and optimized expression condition by studying the relations between expression yield and growth conditions with different induction time, recombinant strain, strain density, pH value and methanol dose of medium, respectively. The optimal conditions of the recombinant protein expression were: 28-30 ℃, 225 r/min, in BMMY medium of pH 6.0 which was 4 times volume of BMMY with OD₆₀₀ being 3.0-3.5, was incubated 72 h and methanol was added to keep its concentration up to 0.5% between 24 h. After induction under optimal conditions, the yield of recombinant protein could be added up to 275.38 μg/mL. After comparing the effects of different conservation temperature on lysis of recombinant protein, it was found that the supernatant should be conserved in -20 ℃ and these jobs had provided a good basis for large-scaled ferment and application of recombinant protein.

Key words: *Pichia pastoris*; A/D antigenic domain; expression conditions; optimization