

表达乙肝病毒融合表面抗原基因 SA-28 的二倍体酵母工程菌的选育

陈孝康¹ 袁汉英¹ 潘 辉¹ 邬向东² 李育阳¹

¹(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

²(江西农业大学动物科学技术学院 南昌 330045)

摘 要 将乙肝病毒融合表面抗原基因 SA-28 的单倍体酵母工程菌 Y19/YFD158 和与其不同接合型的单倍体酵母菌 Y95 接合,筛选到二倍体酵母工程菌 Y95xY19/YFD158。对两种工程菌的研究表明:二倍体工程菌发酵密度为单倍体工程菌的 3 倍,表达质粒在二倍体酵母中的稳定性明显高于单倍体工程菌;二倍体工程菌对融合抗原的表达量为单倍体的 3 倍以上,表达质粒在二倍体细胞中的平均拷贝数略低于单倍体工程菌。

关键词 酵母,二倍体,乙肝病毒表面抗原,表达

中图分类号 Q344+.B 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0010-03

随着分子生物学和生物技术的不断发展乙型肝炎疫苗的研制也不断改进。人们在乙型肝炎血源疫苗和基因工程疫苗的基础上,努力解决疫苗用量大,成本高以及对少数人无免疫反应或反应低下的难题,开辟了新型乙肝疫苗、合成肽疫苗及 DNA 免疫等新途径。其中带有 preS1 区的乙肝表面抗原的新型乙肝疫苗集预防和治疗为一体,显示了很好的应用前景^[1,2]。酵母已经被用来大规模生产乙肝病毒表面抗原,成为我国广泛使用的乙肝疫苗。我们已报道过乙肝病毒融合表面抗原 SA-28 基因在酵母菌中的表达^[3,4]。由于我们得到的工程菌都是带有营养缺陷标记的单倍体酵母,发酵时生长较慢。另有文献报道^[5]:工程菌的二倍体化可以提高外源基因的拷贝数,从而提高外源基因的表达水平。为了进一步提高我们构建的工程菌的表达水平,我们将表达乙肝病毒融合表面抗原 SA-28 的一株 a 型单倍体酵母工程菌和另一株带 *leu2* 等多重营养缺陷的 α 型单倍体酵母 Y95 进行接合,选育出一株原养型二倍体工程菌,取得了良好的结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

表达乙肝病毒融合表面抗原 SA-28 基因的 a 型单倍体酿酒酵母工程菌 Y19/YFD158 由本所构建和保存,酿酒酵母 Y95[*MAT α* *rad52* *his3* *leu2*

ura3 *trp1* *gal* *cir*^o]由本所保存。

1.2 二倍体酵母菌子囊孢子观察

从斜面接种菌株到含 3mL YEPD 的试管,30℃,200 r/min 振荡培养 18h,10000 r/min 离心 5 min,去上清,沉淀移到长孢子斜面,30℃ 培养 2 周,镜检子囊。

1.3 工程菌的发酵

按文献[4]的方法进行。

1.4 SA-28 基因表达水平的测定

离心收集菌体后,取 1g 湿重的菌体按文献[4]的方法制备酵母细胞抽提液。样品的 HBsAg 抗原性测定采用华美公司的 ELISA 试剂盒进行。

1.5 工程菌表达载体拷贝数的测定

先按常规提取酵母总 DNA。DNA 经 *Bam*HI 酶切后用琼脂糖凝胶电泳分离,再转移到硝酸纤维薄膜上。用于杂交的探针为由两个 DNA 片段组成的混合物:一个是 0.77kb 长的带有 SA-28 基因的 *Eco*RI 片段,另一个为 0.87kb 长带有 *HIS3* 基因 5' 端的 *Bam*HI-*Bgl*II 双酶切片段。后者是在定量测定拷贝数时被用作内部参考。表达载体在细胞中的拷贝数的测定和计算方法见文献[6]。

2 结果和讨论

2.1 二倍体工程菌 Y95xY19/YFD158 的获得

单倍体工程菌 Y19/YFD158 是由表达乙肝病

毒融合表面抗原的载体 YFD158 转化单倍体酿酒酵母 Y19 而成^[1]。由于 Y19 的接合型为 α 型,是 *leu2* 和 *ade1* 双重营养缺陷株。YFD158 则为带有 LEU2 选择标记的质粒,所以 Y19/YFD158 仅有 *ade1* 营养缺陷。单倍体酵母 Y95 接合型为 α 型,有多重营养缺陷,但具有野生型 ADE1 基因。所以, Y19/YFD158 和 Y95 都不能在基本培养基上生长。但是,两种细胞一旦接合形成二倍体,由于营养互补,就可以在基本培养基上生长。结果见表 1。

表 1 二倍体接合子的筛选

Table 1 Selection for diploid conjugon

Strain	Number of clones on SD plate
Y19/YFD158	0
Y95	0
Y95xY19/YFD158	51

为了进一步证明在基本培养基上生长的菌落确系二倍体,我们将在基本培养基上长出的菌落接种到产孢培养基斜面上,培养数天后在显微镜下可以看到有子囊孢子形成。这就是二倍体工程菌 Y95xY19/YFD158。

2.2 二倍体工程菌 Y95xY19/YFD158 的生长

单倍体工程菌和二倍体工程菌先在基本培养基上培养,然后接种到 YEPD 培养液中振荡培养 24h 和 48h 测定培养液中的菌体密度,结果见表 2。从表 2 结果可以看出:在相同的培养基和相同的培养时间下,二倍体工程菌的细胞密度是单倍体工程菌的 3 倍左右。

表 2 单倍体工程菌和二倍体工程菌生长密度的比较

Table 2 The cell density of the diploid in comparison with that of the haploid

Strain	OD _{600nm}	
	24h	48h
Y19/YFD158	0.214	0.246
Y95xY19/YFD158	0.650	0.720

Grew the two strains in YEPD medium at 30°C for 24 or 48 hours. The cell culture was diluted by 20 folds and measured the optical density at 600nm.

2.3 表达载体在二倍体工程菌中的稳定性

由于 Y19 和 Y95 都是 *leu2* 营养缺陷株,二倍体工程菌丢失表达载体 YFD158 后就不能在缺少亮氨酸的培养基上生长。因此我们可以和 Y19/YFD158 一样测定二倍体 Y95xY19/YFD158 的质

粒稳定性^[5]。实验结果见表 3。从表 3 可见:二倍体工程菌中表达载体的稳定性明显地要比其在单倍体工程菌中的高。

表 3 单倍体工程菌和二倍体工程菌的表达质粒稳定性比较

Table 3 Stability of expression vector in the diploid in comparison with that in the haploid

Strain	Stability of expression vector/%				
	10G	20G	30G	40G	50G
Y19/YFD158	82	70	62	65	53
Y95xY19/YFD158	96	94	89	89	74

The stability was presented by the percentage of cells containing the expression vector when grown after indicated generations, G = generations.

2.4 SA-28 基因在二倍体工程菌中的表达

将单倍体工程菌和二倍体工程菌以相同的方式发酵培养,用等量的菌体制备抽提液。然后,用 ELISA 试剂盒测定 HBsAg 的水平(结果见表 4)。结果表明在等量菌体的情况下二倍体工程菌表达 HBsAg 的量是单倍体工程菌的 3 倍以上。考虑到二倍体工程菌的细胞密度是单倍体工程菌的 3 倍左右,因此二倍体工程菌在单位体积的发酵液中 HBsAg 的表达量至少是单倍体工程菌的 9 倍。

表 4 SA-28 基因在单倍体工程菌和二倍体工程菌的表达水平的比较

Table 4 The expression level of SA-28 gene in the diploid in comparison with that in the haploid

Strain	Dilution	OD _{450nm}
Y19/YFD158	1000	0.16
	2000	0.07
Y95xY19/YFD158	4000	0.22
	8000	0.11

The crud yeast extracts were diluted to appropriate dilution and subjected to ELISA assay.

2.5 二倍体工程菌中表达载体的平均拷贝数

酵母菌 Y19, Y95, Y19/YFD158, Y95xY19/YFD158 经 Southern 杂交后的结果如图 1 所示。从图 1 可见 Y19 和 Y95 均只见一条带,这是 HIS3 基因的 *Bam*HI 条带。由于两个菌株的 HIS3 基因存在多态性,因此,它们的 HIS3 条带大小不同。在单倍体工程菌 Y19/YFD158 中可以看到相当于 Y19 的 HIS3 基因的条带及另一条 2.5kb 片段的表达载体条带。而在二倍体工程菌 Y95xY19/YFD158 中则可以同时看到相当于 Y19 和 Y95 的 HIS3 基因条带及 2.5kb 的表达载体条带。无论是单倍体工程菌

图 1 Southern 杂交分析

Fig. 1 Southern blot analysis

Genomic DNA of yeast strains were extracted, digested with *Bam*HI, and subjected to Southern blot analysis using the mixture of SA-28 gene and HIS3 gene fragments as a probe. Each lane contains 1 μ g of yeast genomic DNA. 1, Y19 2, Y95 3, Y19/YFD158 4, Y95xY19/YFD158. The size markers are shown alongside the autoradiogram.

或者二倍体工程菌表达载体的条带图明显地比 HIS3 的条带要强。为了定量测定表达载体在细胞中的平均拷贝数,我们按文献[6]进行了测定和计算。结果表明:单倍体工程菌中表达载体的平均拷贝数为 9.6 拷贝/细胞。而二倍体工程菌中表达载体的平均拷贝数则为 6.3 拷贝/细胞。二倍体工程菌中表达载体的平均拷贝数反而要比单倍体工程菌

的平均拷贝数低一些。

上述结果表明:我们所构建的二倍体工程菌明显地提高了它对乙肝融合表面抗原基因的表达水平,提高的原因一方面是由于发酵密度的提高,另一方面可能是由于细胞中表达质粒的稳定性提高所致。尽管二倍体工程菌细胞中表达载体的平均拷贝数反而低于单倍体工程菌。但是,在二倍体细胞中具有对 HBsAg 表达较适量的和较稳定的表达载体。Fu 等报道^[5],二倍体工程菌在大规模发酵时,HBsAg 的表达量提高两倍是由于二倍体工程菌细胞中表达载体的平均拷贝数提高了 2 倍。两者在分析二倍体工程菌提高表达量的原因方面不一样。其实,二倍体工程菌也不一定比单倍体工程菌表达高。我们也试验过其他形成二倍体的组合,但是得到的二倍体工程菌表达外源基因的水平反而有所下降,主要表现为表达载体的稳定性很差。Voropaeva 报道^[7],多倍体酵母工程菌表达 HBsAg 的水平受不同 MAT 位点组合的影响。看来,要分析酵母工程菌的倍体对外源基因表达的影响还比较复杂,有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 阮力,汪垣,强伯勤. 新型疫苗研究的现状与进展. 北京:学苑出版社,1992, p68
- [2] Peter J, Rutgersand T, Hauser P. *Arch Virol*, 1992, Suppl 14:37
- [3] 袁汉英,潘辉,刘映婷等. 高技术通讯, 1997, (7 10):35
- [4] 刘映婷,袁汉英,孙其梅等. 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(4):439
- [5] Fu J, Parker C B, Burke P *et al. Biotechnol Prog*, 1996, 12(1):145
- [6] 霍克克,虞兰兰,李育阳等. 中国科学 B 辑, 1992, 22(9):922
- [7] Voropaeva L A. *Gentika*(abstract), 1991, 27(7):1143

The Diploid of Genetically Engineered Yeast for Expression of Hybrid HBsAg Gene SA-28

CHEN Xiao-kang¹ YUAN Han-ying¹ PAN Hui¹ WU Xiang-dong² LI Yu-yang¹

¹(Institute of Genetics and State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433)

²(Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract By mating a yeast haploid expressing hybrid HBsAg gene SA-28, Y19/YFD158, with another haploid Y95, the diploid Y95xY19/YFD158 was constructed. The experiments showed that the cell density of the diploid in fermentation was three time higher than that of the haploid, the stability of expression vector in the diploid was much higher than in the haploid, the expression level of hybrid HBsAg gene of the diploid was more than three time higher than that of the haploid and the average cope number in diploid cell was a little lower than that in the haploid.

Key words Yeast, diploid, HBsAg, gene expression