

# 庚型肝炎病毒 E2 区 cDNA 在毕赤酵母中的表达及抗原性鉴定

王卓华 叶 凯 徐 洪 马辉文\*

(武汉大学药学院生物技术药理学系 武汉 430072)

童立恒 彭习亮

(武汉市生物技术研究开发中心 武汉 430030)

**摘 要** 利用 PCR 技术,从含有庚型肝炎病毒(GBV-C/HGV)包膜蛋白 E2 cDNA(559bp)的质粒 pGEX-E2 中,扩增得到能够编码日本血吸虫谷胱甘肽硫转移酶(GST)和 GBV-C/HGV 包膜蛋白 E2 的融合基因片段。将此长度为 1324bp 的 DNA 片段插入到酵母表达载体 pPIC9K 中,使之位于  $\alpha$ -因子信号肽下游,且与之同框。通过电激转化将构建的重组表达质粒 pPIC9K-GST-E2 插入到 *Pichia pastoris* GS115 菌株染色体中。筛选 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 表型的转化子,震荡培养,用 0.5% 甲醇诱导表达 5d 后,在培养液中得到表达的 GST-E2 融合蛋白。经过表达条件的优化,GST-E2 蛋白可占培养液中总蛋白的 50%。通过谷胱甘肽亲和层析柱纯化,GST-E2 融合蛋白的纯度可达 95% 左右。以庚型肝炎病人血清为探针,进行免疫印迹及 ELISA 实验,结果表明该融合蛋白具有能被庚型肝炎病人血清特异性识别的抗原性。

**关键词** 庚型肝炎病毒, E2 膜蛋白, 巴斯德毕赤氏酵母, 表达, 抗原性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0187-06

庚型肝炎是近年来发现的经血液、体液传染的一种新型病毒性肝炎。其病原体是以单股正链 RNA 为遗传物质的黄病毒科病毒 GBV-C/HGV(即庚型肝炎病毒)。其基因组全长 9.1~9.4kb,有一个大的开放阅读框,能编码约 2900 个氨基酸残基组成的 HGV 多聚蛋白质。根据其 cDNA 序列,该蛋白被划分成 N 端的 E1 和 E2 包膜蛋白区和其后的 NS1-NS5 5 种非结构蛋白区<sup>[1-3]</sup>。

近年来,表达 E2 区重组蛋白、构建免疫学诊断试剂一直是 GBV-C/HGV 免疫学诊断试剂的研究热点。然而,在原核表达系统中虽能获得大量表达的 HGVE2 蛋白,但是,由于表达的蛋白在翻译后不能被正确地折叠和糖基化等翻译后修饰,因而所得到的 HGV E2 蛋白免疫原性很差,不能被病人血清中抗 HGV 抗体免疫识别<sup>[4]</sup>。一些学者利用重组的病毒表达载体转染昆虫细胞、小鼠细胞进行表达<sup>[5,6]</sup>,虽然表达的蛋白具有较好的免疫原性,但其操作繁琐,耗时长,成本高,而且表达量不高。

甲醇营养型酵母——巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)作为一个新型的真核表达系统,具有蛋白表达量高,表达的蛋白具有天然的免疫原性,

操作简单,价格低廉等优点<sup>[7,8]</sup>。因而,巴斯德毕赤氏酵母为表达具有天然抗原性的重组 HGVE2 蛋白提供了一个良好的真核表达环境。

本研究将一段含有 HGV E2 区 cDNA 片段的 GST 融合蛋白基因插入巴斯德毕赤氏酵母表达载体 pPIC9K  $\alpha$ -因子基因的下游,构建出能过量表达 HGV E2-GST 融合基因的重组 *P. pastoris*。通过对表达条件的优化,实现了 E2 蛋白的高表达,得到能被庚型肝炎病人血清特异性识别的 HGV E2 蛋白质。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株和试剂

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ [*supE44*  $\Delta$ *lacU169*( $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$  M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] 及 LB21( DE3 ) [*hsdSgal* ( $\lambda$ *c1ts857ind1* *Sam7nin5lacUV5-T7* 基因 1)] 为本实验室保存。含有 HGV E2 区 cDNA 片段的重组质粒 pThioHisA-E2 由石建提供<sup>[9]</sup>。质粒 pGEX-5X-1-E2 为含有 E2cDNA 的 pThioHisA-E2 *Bgl* II - *Sma* I 片段与质粒 pGEX-5X-1 的重组体。质粒 pPIC9K 及 *Pichia pastoris* 菌株 GS115 [*his4*] 购自 Invitrogen 公司。含质粒和不含质

粒的大肠杆菌菌株,分别在 4℃ 保藏于含氨基青霉素(100 $\mu$ g/mL)和不含氨基青霉素的 LB 平板上,每 2 周传代 1 次。所有 *P. pastoris* 菌株均在 4℃ 下保藏于 YDP 平板上,每 2 周传代 1 次。抗 GST 兔血清及抗 HGV E2 兔血清是本实验室以大肠杆菌表达、纯化的 GST 和 HGV E2 蛋白分别免疫家兔制备的。大肠杆菌表达的可溶性 GST-E2 融合蛋白从经乳糖诱导表达的大肠杆菌 BL21(DE3)<sub>p</sub>GEX-5X-1-E2 细胞中制得。受 GBV-C/HGV 感染的病人血清及健康人血清由中国药品及生物制品检定所提供。免疫学及分子生物学试剂购自华美生物工程公司和 Amersham-pharmacia Biotech 公司。PCR 引物由大连日本宝酒造生物工程公司合成。

### 1.2 酵母菌培养基

YPD 固体培养基:1%酵母抽提物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,1.5%琼脂;MD 固体培养基:0.34% YNB,1%硫酸铵,2%葡萄糖,1.5%琼脂;MM 固体培养基:0.34% YNB,1%硫酸铵,0.5%甲醇,1.5%琼脂;甘油液体培养基:1%酵母粉,2%胰蛋白胨,0.34% YNB,1%硫酸铵,1%甘油,溶于所需缓冲能力的 pH6.0 磷酸缓冲液中;甲醇液体培养基:0.34% YNB,1%硫酸铵,0.5%甲醇,溶于所需缓冲能力的 pH6.0 磷酸缓冲液中。

### 1.3 目的基因片段 GST-E2 的制备

两端带有限制酶 *Hind*Ⅲ 识别位点的引物,其核苷酸序列分别如下:

上游 Primer 5'-CGCAAGCTTCGGATAACAATTTACACAGG-3'

下游 Primer 5'-CCGAAGCTTGGCAGATCGTCAGTCAGTCAC-3'

以 pGEX-5X-1-E2 的 *Pvu* I 酶切反应物为模板进行 PCR 扩增循环:94℃ 60s,53℃ 90s,72℃ 90s,循环 30 次后置于 72℃ 再延伸 10min。

### 1.4 重组表达质粒的构建

PCR 产物用 *Hind*Ⅲ 酶切,质粒 pPIC9K 用 *Eco*RI 消化后,二者分别用大肠杆菌聚合酶 I Klenow 片段及 dNTP 补平粘末端,经连接酶环化后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,提取质粒,酶切鉴定。

### 1.5 酵母宿主菌感受态细胞的制备

按照 Invitrogen 公司提供的毕赤氏酵母操作手册进行,所制感受态细胞立即使用或冷冻保存。

### 1.6 电转化

将 80 $\mu$ L 感受态细胞和 10 $\mu$ L DNA 溶液(含 15 $\mu$ g pPIC9K-E2 质粒 DNA 的 *Bgl* II 消化产物)混合后,转

入冰预冷的 0.2cm 电转化杯中,冰浴 5min。用 Bio-Rad GenePulser 电激(1500V 电压,25 $\mu$ F 电容,10ms)后立即加入 1mL 冰冷的 1mol/L 山梨醇溶液,将混合液转入 1.5mL 无菌离心管。取 200 $\mu$ L 涂布于 MD 平板上,在 30℃ 下培养 2~4d,得到 His<sup>+</sup> 型转化子。

### 1.7 转化子甲醇利用型的鉴定

用无菌牙签挑取转化子,先后在 MM 和 MD 平板上划线(先划 MM 平板)。30℃ 培养 2d。在 MD 上生长正常,在 MM 上没有生长或生长缓慢的菌株为甲醇慢利用型(His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup>)。

### 1.8 GST-E2 基因片段在毕赤氏酵母细胞中的表达

将 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型单菌落接种于装有 75mL 甘油液体培养基的 500mL 培养瓶中,28~30℃ 摇床培养(250~300r/min)30h。离心收集细胞(室温,3000 $\times$ g,5min)细胞沉淀重悬于 20mL 甲醇液体培养基。置于 250mL 培养瓶中继续培养。每隔 24h。补加蒸发的水分,并添加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%。6d 后,离心,收集上清,取样进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.9 表达条件的优化

在其它培养条件一致的情况下,分别对培养基 pH 缓冲能力、诱导时间、诱导物浓度及诱导条件下的通气状况等条件进行优化,通过 SDS-PAGE 比较培养液上清中的 GST-E2 融合蛋白的量确定其最佳表达条件。

### 1.10 表达产物的免疫学鉴定

Western Blotting 及 ELISA 按前人描述的标准方法进行<sup>[10,11]</sup>。

### 1.11 表达产物的纯化

将偶联有谷胱甘肽的 Sepharose 4B 凝胶经 PBS 溶胀,用 10 倍体积的 PBS 洗涤后,悬浮于含有 GST-E2 融合蛋白的酵母培养液上清液中。在室温下轻摇 10min 后,将其装入层析柱中,用 PBS 洗柱直至流出液在 280nm 波长下检测不再含有蛋白质为止。用洗脱液(15mol/L 还原型谷胱甘肽,50mol/L Tris-Cl, pH8.0)洗脱亲和吸附在凝胶上的 GST-E2 融合蛋白。用 Harlow Ed and David Lane 描述的考马斯亮蓝法收集含 GST-E2 融合蛋白的分部<sup>[12]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 pPIC9K-GST-E2 质粒的构建

重组质粒 pPIC9K-GST-E2 的构建过程如图 1 所示。PCR 扩增的 GST-E2 融合基因片段长度为 1324bp,与预计的大小相符。重组质粒 pPIC9K-GST-E2 的 *Pvu* I、*Bgl* II 及 *Sac* I 酶切分析如图 2 所示。

说明 GST-E2 DNA 片段被正确地插入到 pPIC9K 质粒中。

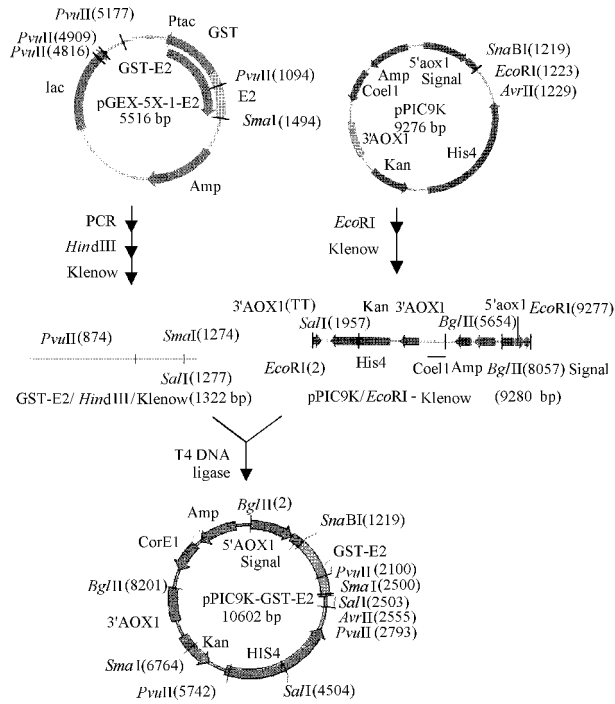


图 1 重组质粒 pPIC9K-GST-E2 的构建过程

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-GST-E2

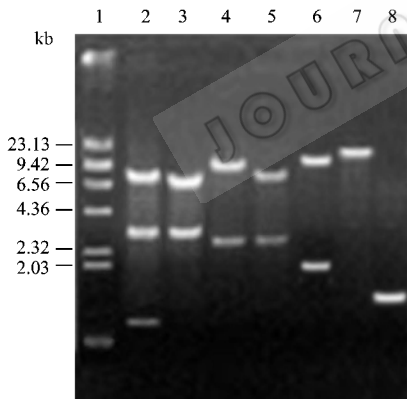


图 2 重组质粒 pPIC9K-GST-E2 的酶切图谱

Fig.2 Restriction map of plasmids pPIC9K-E2

1.  $\lambda$ /HindIII molecular marker ;
2. pPIC9K-GST-E2 digested with PvuII ( 6960bp + 2949bp + 693bp ) ;
3. pPIC9K digested with PvuII ( 2949bp + 6327bp ) ;
4. pPIC9K-GST-E2 digested with BglII ( 8199bp + 2403bp ) ;
5. pPIC9K digested with BglII ( 2403bp + 6873bp ) ;
6. pPIC9K-GST-E2 digested with SalI ( 10602bp ) ;
7. pPIC9K digested with SalI ( 927bp ) ;
8. GST-E2 gene fragment amplified with PCR ( 1324bp )

## 2.2 GST-E2 片段在 Pichia pastoris GS115 菌株中的表达

取 200 个电转化得到的 *P. pastoris* His<sup>+</sup> 型转化

子进行甲醇利用型鉴定,结果表明 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型菌株约占被检菌落总数的 97%。从中挑取 6 个重组菌株进行表达分析,从图 3 可以看出,His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型重组 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-GST-E2 可以高效分泌表达分子量约为 54kD 的 GST-E2 融合蛋白。

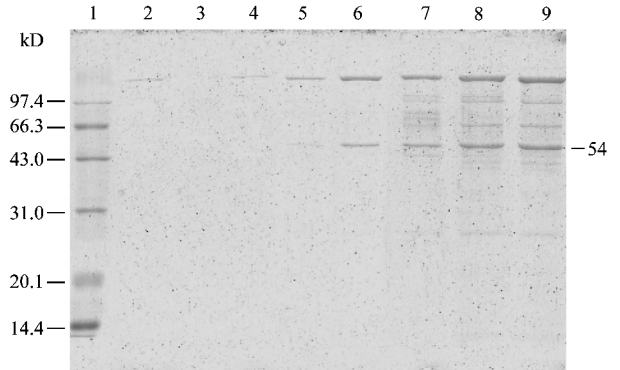


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression products

1. Molecular weight standard ;
2. Induced culture supernatant of *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K ;
- 3 ~ 9. Induced supernatant of *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-GST-E2 ( induced for 1 2 3 4 5 6days )

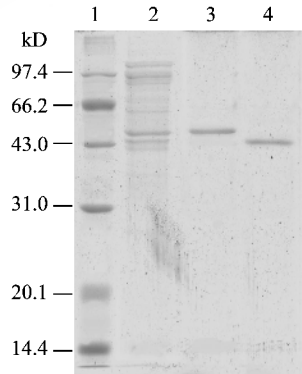


图 4 GST 亲和层析柱纯化的重组 GST-E2 蛋白

Fig.4 GST-E2 fusion proteins purified with Sepharose 4B glutathione affinity chromatography

1. Molecular weight marker ; 2. culture supernatant of methanol induced *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-GST-E2
3. GST-E2 fusion protein purified from the culture supernatant of methanol induced *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-GST-E2 ;
4. GST-E2 fusion protein purified from the cell lysate of lactose induced *E. coli* BL21( DE3 )pGEX-5X-1-E2

## 2.3 重组蛋白的纯化

以分泌蛋白形式存在于酵母培养液中的 GST-E2 融合蛋白可以直接通过谷胱甘肽亲和层析进行纯化。纯化获得的融合蛋白 GST-E2 经 SDS-PAGE 检查,只有一条 54kD 的蛋白带,纯度可达 95% 以上(图 4)。将大肠杆菌 LB21( DE3 )pGEX-5X-1-E2 在 20℃ 下诱导表达的可溶性 GST-E2 融合蛋白也用谷胱甘肽亲和层析柱进行纯化。从图 4 可以看出,在

两种表达系统中表达的 GST-E2 融合蛋白的分子量大小明显不同。与大肠杆菌表达的 GST-E2 融合蛋白相比,重组 *P. pastoris* 表达的 GST-E2 融合蛋白分子量约大几个 kD。这表明重组 *P. pastoris* 表达的 GST-E2 融合蛋白可能经过了糖基化修饰,含有寡糖链。

## 2.4 重组 E2 蛋白的免疫学鉴定

Western blot 实验表明,抗 E2 兔血清与抗 GST 兔血清都能特异性地识别重组 *P. pastoris* 表达的 GST-E2 蛋白(见图 5a 与图 5b)。

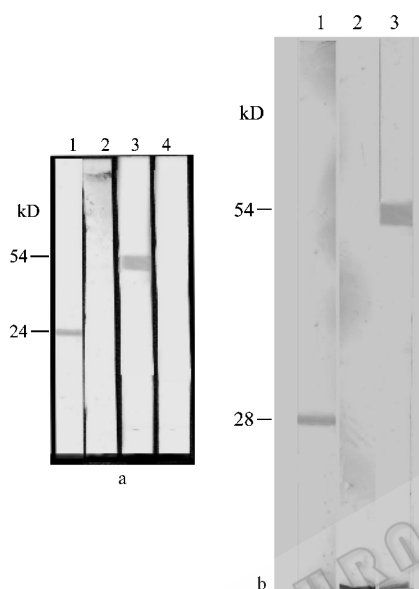


图 5 表达产物的免疫印迹(Western blot)分析

Fig. 5 Western blot analysis of the expression products

5a. The expression products recognized by the rabbit antiserum directed against E2 protein 1. IPTG induced cell lysate of *E. coli* DH5 $\alpha$ /pThiohisA-E2 2. Culture supernatant of methanol induced *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K 3. Culture supernatant of methanol induced *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-GST-E2 4. GST protein expressed in *E. coli* DH5/pGEX-5x-1

5b. GST-E2 fusion protein expressed in the recombinant *Pichia pastoris* could be recognized by the rabbit antiserum directed against GST protein 1. GST protein expressed by *E. coli* DH5 $\alpha$ /pGEX-5X-1 2. Culture supernatant of methanol induced *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K 3. Culture supernatant of methanol induced *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-GST-E2

## 2.5 重组 E2 蛋白的抗原性分析

将 2 种不同来源的 GST-E2 融合蛋白经谷胱甘肽亲和柱纯化后,分别包被酶标板。以庚型肝炎病人血清及健康人血清为探针,用间接 ELISA 法检测 GST-E2 蛋白的抗原性。庚型肝炎病人血清中的抗 E2 抗体能特异性识别重组 *P. pastoris* 表达的 GST-E2 融合蛋白,而不能识别大肠杆菌表达的 GST-E2

蛋白(表 1)。这一事实表明,重组 *P. pastoris* 表达的 GST-E2 蛋白在翻译后得到了正确的折叠和糖基化等翻译后修饰,具有正确的构象,因而具有良好的抗原性,能被庚型肝炎病人血清中的抗 HGV 抗体识别。

表 1 表达的 HGV E2 抗原的 ELISA 结果

Table 1 ELISA of HGV E2 antigens probed with GBV-C/HGV-RNA positive and healthy human sera

GST-E2 <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	P	P/N <sup>c</sup>	+ / -
Expressed in <i>E. coli</i>	0.018	0.022	1.222	-
Expressed in <i>P. pastoris</i>	0.020	0.123	6.150	+

<sup>a</sup> GST-E2 fusion protein expressed either by *E. coli* BL21(DE2)/pGEX-5X-1-E2 or by *Pichia pastoris*/pPIC9K-GST-E2

<sup>b</sup> N:OD490 of negative control well probed with healthy human sera; P: OD490 of positive well probed with sera from the patients infected by GBV-C/HGV;

<sup>c</sup> P/N $\geq 2.10$  a cut-off value meaning that E2 antibody in the human serum can recognize the E2 protein(+) while P/N < 2.10 meaning that the E2 antibody can not recognize the E2 protein(-)

## 2.6 重组 E2 蛋白表达条件的优化

影响宿主细胞中外源基因表达水平的因素很多,任何一种表达系统,最佳的表达条件并不是固定的。为了进一步提高 GST-E2 融合蛋白在重组 *P. pastoris* 中的表达量,我们对其表达条件,如培养基 pH 缓冲能力、诱导物浓度、甲醇培养基的装量(通气量)及诱导时间等进行了广泛的优化。如图 3 所示,在 28~30℃ 条件下,将重组 *P. pastoris* 的单个菌落接种在装量为 75mL 150mmol/L 磷酸盐缓冲的甘油培养基中培养 30h,离心,将收集的细胞重悬于相同缓冲条件下的 25mL 甲醇诱导液体培养基中,以 0.5% 的甲醇诱导 5d(每 24h 添加一次甲醇,至终浓度为 0.5%),可获得大量分泌表达的 GST-E2 融合蛋白。其表达量可占重组酵母培养液中蛋白总量的 50% 以上。

## 3 讨 论

HGV 的感染呈全球性分布,其病毒可能引起各种急、慢性肝炎甚至肝硬化、肝癌。而患者多因输血而导致感染,这主要是由于目前尚缺乏一种灵敏度高、特异性强且费用低廉的诊断试剂以用来对献血员进行筛查。免疫学诊断分析方法就是一种费用较低且易于实施的诊断方法。由于对 HGV E2 抗体的检测可以动态地反映 HGV 感染者的病情发展及转归,因此,获取高免疫活性的 HGV E2 蛋白,在研制

完善的诊断试剂方面具有重要意义。而且, HGV E2 活性蛋白的获得, 对研究 HGV 的抗原表位、致病机理以及理解 HGV 与肝炎及其它疾病之间的联系提供了一个重要的基础。本项研究证明, 重组 *P. pastoris* 表达的 HGV E2 蛋白质可能已被糖基化和经历了表达后的其它后加工过程, 因而不同于大肠杆菌表达的 HGV E2 蛋白质。表 1 展示的结果表明此种蛋白质具有能被庚型肝炎病人血清特异性识别的免疫原性。因此, 此种重组 *P. pastoris* 表达的具有天然结构的 E2 蛋白不仅可以用来制备庚型肝炎免疫学诊断试剂, 而且也可用来研制抗庚型肝炎疫苗。

本实验表明, *P. pastoris* GS115/pPIC9K 表达系统是表达 HGV E2 蛋白的较理想的表达系统。它具有以下优点: 一是表达量高。由于 *P. pastoris* 细胞生长速度较快, 而且外源基因的表达由强启动子醇氧化酶基因启动子启动, 所以目的蛋白 E2 的表达量很高。二是获得的重组酵母菌株十分稳定。由于将外源基因引入酵母细胞的载体 pPIC9K 在细胞中不是以自主复制的质粒形式存在, 而是整合在染色体中, 所以构建的 *Pichia pastoris* 菌株 GS115/pPIC9K-GST-E2 (His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>) 十分稳定。在本研究工作中, 该菌株在没有任何选择压力的 YPD 平板已转接 30 多代, 其 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 表型和表达 GST-E2 融合蛋白的能力没有发生任何改变(结果未展示)。三是分泌型表达。啤酒酵母  $\alpha$ -因子先导序列作为分泌信号置于 E2 编码序列的上游, 使表达的 E2 蛋白质被分泌到细胞外面, 从而使目的蛋白质易于分离和纯化。四是表达的重组蛋白质具有天然活性。*P. pastoris* 能对目的蛋白进行翻译后的修饰和加工, 使其适当地糖基化。从而保持了 E2 蛋白的天然构象和生物学活性, 使其具有很好的免疫原性(图 5, 表 1)。五是操作简便。与其它真核表达系统相比, *P. pastoris* 对培养条件要求简单。同时, 表达载体 pPIC9K 的 His4 基因, 对于组氨酸缺陷型的 GS115 菌株而言, 易于利用不含组氨酸的培养基筛选重组子。六是便于放大培养。作为一种酵母菌, 重组 *P. pastoris* 能够很好地运用现有的、成熟的发酵技术进行放大培养, 甚至工业化生产。

本项研究成功地构建出能高效表达 HGV E2 区

蛋白质的重组 *P. pastoris* 菌株。表达的 GST-E2 融合蛋白易于纯化。由于 GST 与 E2 蛋白质之间的连接处含有因子 X<sub>n</sub> 蛋白酶的识别序列, Ile-Glu-Gly-Arg, 因此。可以利用此种蛋白酶处理已纯化的 GST-E2 融合蛋白质, 然后利用 GST 亲和层析法去除 GST, 从而获得纯净的 E2 蛋白质。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Simons J N, Leary T P, Dawson G L et al. Identification of Novel Virus-like Sequences with Human Hepatitis. *Nature Med.* 1995b, **1**: 564 ~ 569
- [ 2 ] Leary T P, Muernoff A S, Simons J N et al. Sequence and Genomic Organization of GBV-C. A Novel Member of the Flaviviridae Associated with Human Non-A-E Hepatitis. *J Med Virol.* 1996 **48**: 60 ~ 67
- [ 3 ] Linnen J, Wages J, Zhang-Keck Z Y et al. Molecular Cloning and Disease Association of Hepatitis G Virus: A Transmissible Agent. *Science* 1996 **271**: 505 ~ 508
- [ 4 ] Lazdina U, Hultgren C, Chen M et al. Humoral and cellular immune responses to the GB virus C/hepatitis G virus envelope 2 protein. *J Med Virol.* 2000 **62**: 334 ~ 344
- [ 5 ] ZHU S Y (朱诗应), PAN W (潘卫), QI Z T (戚中田): Expression of E2 Glycoprotein Gene of Hepatitis G Virus in Insect Cells. *Virological Sinica* (中国病毒学), 1999, **14**: 135 ~ 139
- [ 6 ] Dille B J, Surowy T K, Gutierrez R A et al. ELISA for the detection of antibodies to the E2 protein of GBV-C. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, **175**: 458 ~ 461
- [ 7 ] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Biol Technology* 1993, **11**: 905 ~ 910
- [ 8 ] Laroche Y, Storme V, Meutter J D et al. High-Level Secretion and Very Efficient Isotopic Labeling of Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Expressed in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biol Technology*, 1994, **12**: 1119 ~ 1124
- [ 9 ] SHI J (石建). Cloning and Expression for cDNA of E2 Region of Hepatitis G Virus Isolated from Chinese Blood Donor. Master Thesis (硕士论文), 1998, at The Institute of Determination of Drugs and Biological Products, China (中国药品及生物制品检定所)
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* 2<sup>nd</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 11 ] Frederick M Ausubel et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1995
- [ 12 ] Harlow Ed, David Lane. *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988

## Expression and Characterization of Envelope Protein 2 Gene of Hepatitis G Virus in *Pichia pastoris*

WANG Zhuo-Hua YE Kai XU Hong MA Hui-Wen\*

( College of Life Sciences ,Wuhan University ,Wuhan 430072 ,China )

TONG Li-Heng PENG Xi-Liang

( Wuhan R&D Center of Biotechnology ,Wuhan 430030 ,China )

**Abstract** A cDNA fragment locating at the putative envelop protein 2 ( E2 ) region of GBV-C/HGV fused with *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase( GST ) was amplified with PCR from plasmid pGEX-E2. The amplified DNA fragment was inserted into plasmid pGEX-5X-1 at the downstream of the coding sequences of GST in the same reading frame with the gene of GST. The fusion gene fragment of GST-E2 was amplified with PCR using the recombinant plasmid pGEX-5X-1-E2 as the template. The amplified 1324 bp DNA fragment of GST-E2 was inserted into *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K in reading frame with  $\alpha$ -factor secreting signal peptide. The plasmid pPIC9K-GST-E2 was transformed into *Pichia pastoris* GS115 with electroporation. The transformants ( His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> ) were selected and induced to express the 54kD GST-E2 fusion protein ,which could be specially recognized by both the antisera directed against E2 and against GST. The GST-E2 fusion protein was purified with Sepharose 4B glutathione affinity chromatography to a purity of 95% . The expression was optimized to achieve the highest expression level of GST-E2 fusion protein which was accumulated up to 50% of total proteins in the culture supernatant. The GST-E2 protein derived from the recombinant *Pichia pastoris* was proved possessing antigenicity and high specificity by ELISA ,probed with sera from the patients infected by GBV-C/HGV .

**Key words** GBV-C/HGV ,E2 protein , *Pichia pastoris* , expression , antigenicity

Received 08-31-2001

\* Corresponding author. Tel 86-27-87682487 Fax 86-27-87682339 E-mail [wma@whu.edu.cn](mailto:wma@whu.edu.cn) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>