

## 猪囊尾蚴磷蛋白在毕赤酵母中的表达及初步应用

苏彩霞 才学鹏\* 韩雪清 骆学农 郑亚东 窦永喜

(中国农业科学院兰州兽医研究所,兰州 730046)

**摘 要** 将猪囊尾蚴磷蛋白 P2 基因克隆到毕赤酵母表达系统分泌性表达载体 pPIC9K 中,构建了重组表达载体 pPIC9K-P2。经测序证明基因序列完全正确,从而大量制备重组质粒 pPIC9K-P2 并用 *Sal* I、*Bgl* II 两种内切酶分别线性化,然后分别电转化毕赤酵母菌种 GS115,采用 G418 抗性梯度筛选得到高拷贝重组菌株,利用 MM 和 MD 培养基鉴定重组菌株 Mut 表型,然后用甲醇进行诱导表达;并对表达产物通过 SDS-PAGE、Western-blot 和 ELISA 分析,结果表明,重组菌株成功地分泌表达了分子量大小为 12.6kD,表达量占分泌总蛋白的 33%,且具有免疫反应活性的重组磷蛋白,从而解决了囊虫病诊断抗原来源问题并为研制新型猪囊尾蚴疫苗奠定了基础。

**关键词** 猪囊尾蚴,磷蛋白基因,毕赤酵母,分泌型表达,诊断抗原

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0424-04

囊虫病(Cysticercosis)是由猪带绦虫(*Taenia solium*)的幼虫——猪囊尾蚴(*Cysticercus cellulosae*)感染猪或人而引起的人畜共患寄生虫病,猪是最主要的中间宿主,人不仅是中间宿主,而且是唯一的终末宿主。囊虫病在我国流行广泛,严重危害人体健康,并制约着养猪业发展。目前关于囊虫病的防治还未有成熟的手段,过去的化学药物治疗以及虫体抗原免疫都已经暴露了很大的局限性。研究资料表明磷蛋白参与蛋白质的合成<sup>[1]</sup>,并且与自身免疫密切相关<sup>[2]</sup>。猪囊尾蚴磷蛋白已有在原核系统中表达的报道,并且预测了其作为诊断抗原和在自身免疫疾病尤其是脑囊虫病中的潜在作用<sup>[3]</sup>,因此磷蛋白基因成为在研制诊断试剂盒和基因工程猪囊尾蚴疫苗中免疫相关基因的候选基因之一。

毕赤酵母表达系统是当前流行的真核表达系统之一<sup>[4,5]</sup>,它具有可诱导的强启动子 P<sub>AOXI</sub>,外源基因整合于染色体上,具有高表达、高稳定、高密度发酵、适度糖基化及表达产物生物活性好、操作简便及易于工业化生产等优点<sup>[6,7]</sup>,已成功地表达了多种极具价值的蛋白,比如:TNF10.0g/L<sup>[8]</sup>,破伤风毒素 C 片段 12g/L<sup>[9]</sup>,HIVgp120 1.25g/L<sup>[10]</sup>,在基因工程疫苗的开发研制中显示出其特有的优越性。本研究探讨了

猪囊尾蚴磷蛋白 P2 在毕赤酵母表达系统中分泌表达的可行性,并研究了重组磷蛋白作为诊断抗原的可能性,从而解决了囊虫病诊断抗原来源问题并为猪囊尾蚴的其他功能性抗原基因在此系统中的表达,研制猪囊尾蚴病诊断试剂盒及基因工程疫苗打下了良好的基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种、载体和酵母表达系统试剂

JM109 菌种购自 Promega 公司;毕赤酵母 GS115 由预防医学科学院病毒研究所吕宏亮博士提供;pGEM-P2 重组质粒由本室构建<sup>[11]</sup>;分泌型真核表达载体 pPIC9K 由本所病毒室韩雪清博士提供,培养基及其它试剂均按美国 Invitrogen 公司的多拷贝巴斯德毕赤酵母表达试剂盒的操作手册配制。

#### 1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶 *Eco*R I、*Xho* I、*Not* I、*Bgl* II、*Sal* I、T4DNA 连接酶、Klenow 酶、PCR 试剂盒、Agarose Gel DNA Extraction Kit 均购自 promega 公司;酵母氮碱(YNB)购自 Difco、D-生物素为日本进口、D-山梨醇购自 Sigma、G418 购自 GIBCO、蛋白酶抑制剂 PMSF 购自 Boehringer、DNA Marker(DL2000)购自 TaKaRa、低分子量蛋白 Marker 购自 Pharmacia、辣根

收稿日期 2003-02-26,修回日期 2003-05-07。

基金项目 国家重大基础研究发展规划项目基金资助(No. G19990119)。

\* 通讯作者。Tel: 86-931-8342535; Fax: 86-931-8340977; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自经科公司 ; 咪吧唑购自 Sigma 公司、囊虫病病人阳性血清由吉林农业大学囊虫病研究所刘德惠教授提供。

### 1.3 重组表达载体 pPIC9K-P2 的构建

将测序正确的含有猪囊虫磷蛋白基因 P2 的 pGEM-P2 质粒和 pPIC9K 载体质粒分别用 *Xho*I 和 *Not*I 内切酶酶切 , 再分别用 Klenow 酶补平粘末端使其形成平末端 , 最后均用 *Eco*RI 酶切 , 因此外源基因 P2 和载体片段均形成了匹配的一平一粘端 , 用 T4 DNA 连接酶将二者连接 , 转化大肠杆菌菌 JM109 , 运用酶切、PCR 和测序的方法鉴定阳性克隆 , 命名为 pPIC9K-P2。PCR 扩增引物依据 GenBank 中猪囊虫磷蛋白基因序列设计 , 由宝生物(大连)工程公司合成 , 上游引物 : 5'-GGATCCATG , CGC , TAT , CTC , GCT , GCT , TAT , C-3' , 下游引物 : 5'-CTC , GAG , TTA , GTC , AAA , GGG , ACT , GAA , ACC-3'。

### 1.4 电转化酵母细胞筛选高拷贝酵母菌株

将 pPIC9K-P2 和 pPIC9K 质粒对照 , 经 *Sal* I、*Bgl* II 两种酶线性化处理 , 与感受态毕赤酵母细胞 GS115 混匀进行电转化 , 转化物涂营养缺陷型 MD 平皿 , 置 28℃ 恒温培养 2 ~ 4d , 能在 MD 培养基上生长的菌落为 HIS<sup>+</sup> 转化子。将 MD 培养基平皿中生长的最初 HIS<sup>+</sup> 转化子 , 影印法依次接种到含 G418 浓度梯度为 1.0、2.0、3.0、4.0mg/mL 的 YPD 培养基中 , 逐级筛选 G418 抗性菌株即目的基因高拷贝重组菌株。

### 1.5 鉴别 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> 和 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>S</sup> 表型

将筛选得到的高拷贝菌株依次影印接种到 MD 和 MM 培养基上 , 28℃ 培养 , 观察其生长差异。若在 MD 培养基上生长良好 , 而同时在 MM 培养基上也生长快的菌落即甲醇利用快的 , 则表型为 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> , 命名为 GS115/pPIC9K-P2 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> ; 相反若在 MD 培养基上生长良好 , 而同时在 MM 培养基上生长缓慢的菌落即利用甲醇慢的 , 则表型为 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>S</sup> , 命名为 GS115/pPIC9K-P2 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>S</sup>。

### 1.6 重组酵母菌株的诱导表达及表达产物的检测和鉴别

将高拷贝菌株单菌落(或者接种冻存的菌液)于 BMGY 培养基中 , 28 ~ 30℃ 摇床培养 16 ~ 18h , 当 OD<sub>600</sub> 达 4 ~ 6 时 , 离心收获细胞弃上清 , 用 BMMY 培养基悬浮细胞 , 28℃ 甲醇诱导表达 , 诱导表达完毕将表达培养液离心 , 收集上清并用 75% 的饱和硫酸铵沉淀 , 离心弃上清 , 蛋白沉淀用 50mmol/L 的 Tris-HCl (含 1mmol/L PMSF) 缓冲液溶解 , 透析浓缩留作检测

用。同时将离心得到的菌体加入细胞裂解缓冲液和玻璃珠 , 破碎处理 , 离心取上清留作检测用。用 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测并鉴别表达产物。

### 1.7 重组磷蛋白应用于囊虫病临床诊断

应用毕赤酵母表达的重组磷蛋白以间接 ELISA 法检测囊虫病病人血清 , 具体步骤如下 (1) 包被 13 号 GS115/pPIC9K-P2 菌株所表达的重组磷蛋白作为抗原 , 同时以 GS115-pPIC9K 菌株分泌上清作为阴性对照 , GS115 菌株作为空白对照。(2) 封闭后加适当稀释的囊虫病病人血清 , 同时正常人血清作为阴性对照 , 37℃ 反应 1h。(3) 加入酶标第二抗体 HRP-抗人 IgG 抗体 37℃ 反应 1h。(4) 加 TMB 底物显色并终止 , 终止反应后酶标仪读 OD<sub>450</sub> 值 , P/N 比大于 2.1 判为阳性。

## 2 结 果

### 2.1 重组表达载体 pPIC9K-P2 的构建及鉴定

重组质粒经酶切和 PCR 扩增鉴定 , 酶切扩增片段都与目的基因大小相一致 , DNA 测序结果显示其序列和读码框架皆正确 , 与国外发表在 GenBank 中的磷蛋白基因核苷酸序列相比较其同源性达 99.45% , 阅读框架完全一致 , 推导氨基酸同源性达 98.36%。重组质粒结构和鉴定结果分别见图 1、2。

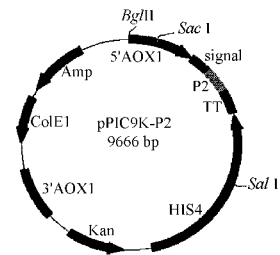


图 1 重组表达载体 pPIC9K-P2 的结构

Fig.1 Structure of recombinant vector pPIC9K-P2

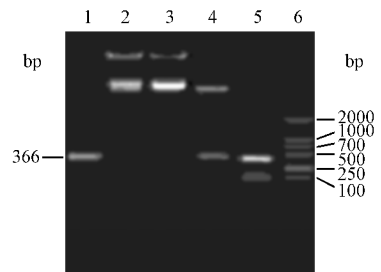


图 2 重组表达质粒 pPIC9K-P2 酶切及 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPIC9K-P2

1. P2 gene ; 2. pPIC9K ; 3. pPIC9K-P2 ;
4. pPIC9K-P2 digested with *Eco*RI and *Not*I ;
5. PCR product from pPIC9K-P2 ; 6. DL2000 marker

## 2.2 重组酵母菌株的构建及鉴定

pPIC9K-P2 用 *Sal* I、*Bgl* II 酶线性化的载体转化后在 MD 培养基平皿上分别长出 351、60 个 HIS<sup>+</sup> 转化子。将所有转化子,通过 G418 筛选,最后得到用 *Sal*I、*Bgl* II 酶线性化的 G418 高抗性即高拷贝菌株分别为 20 个和 2 个;对这 22 个菌株 MM、MD 培养基鉴定表型,结果为 *Sal*I 酶线性化所得重组菌株表型为 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup>,*Bgl* II 酶线性化所得重组菌株表型为 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>s</sup>,这一结果与不同的酶切线性化产生不同整合方式从而产生不同表型这一理论相符合。同时用 PCR 方法鉴定重组菌株,即提取重组菌株的染色体 DNA 作为模板,引物为 5' AOX1、3' AOX1 进行 PCR 扩增,均能扩增出含有外源基因的片段。

## 2.3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测和 Western-blot 鉴别

将诱导表达量较高的重组菌株 GS115/pPIC9K-P2 HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> 13 号的培养上清液、菌体破碎液、不

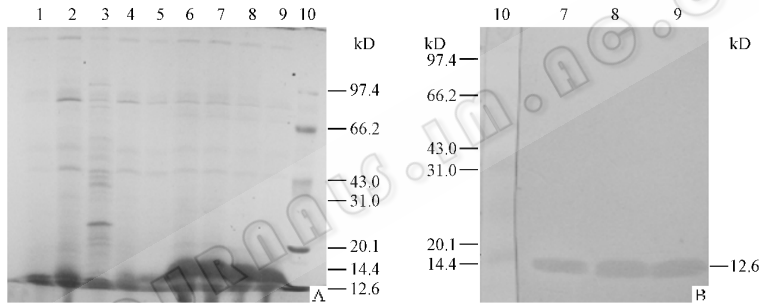


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析(A)及表达产物的 Western-blot 分析结果(B)

Fig. 3 SDS-PAGE(A) and Western-blot(B) analysis of P2 protein expressed in *Pichia pastoris*

- 1, 4. Culture supernatant of GS115/pPIC9K and GS115/pPIC9K-P2 ;
- 2, 3. Crude protein from the culture precipitation of GS115/pPIC9K and GS115/pPIC9K-P2 ;
- 5 ~ 9. Crude protein from the culture supernatant of GS115/pPIC9K-P2 after induced 48h, 72h, 72h, 96h, 96h respectively ;
10. Molecular weight marker

## 2.4 重组磷蛋白应用于囊虫病检测结果

用毕赤酵母重组菌株表达的重组磷蛋白作包被抗原共检测了 10 份人囊虫病阳性血清 OD<sub>450</sub> 值均在 1.2 以上,而阴性对照均在 0.2 以下, $P/N = 6 > 2.1$ ,这一检测结果与临床其它方法诊断结果相一致,并且有很强的特异性,与其它寄生虫如棘球绦虫、血吸虫等抗血清无交叉反应,因此说明此重组磷蛋白完全可以作为临床囊虫病诊断用抗原。

## 3 讨 论

猪囊虫的虫体抗原成分十分复杂,是由多种生物分子组成的异质性混合物,其抗原与多种寄生虫抗原交叉反应,因此以虫体抗原作为诊断抗原暴露了很大的局限性,而且虫体抗原来源有限。本实

验选择了猪囊虫免疫相关基因磷蛋白基因,在毕赤酵母系统中进行分泌表达,经过培养条件的初步优化获得了稳定表达目的蛋白的重组菌株,表达产物的 SDS-PAGE 检测结果表明表达量占总蛋白的 33%,分子量为 12.6kD;Western-blot 分析结果表明重组磷蛋白能被囊虫病病人阳性血清抗体识别具有免疫反应活性,而且临床应用研究表明它完全可以用作诊断检测囊虫病的抗原,且与其它寄生虫抗血清无交叉反应,有很强的特异性。因此,重组磷蛋白有望成为一种理想的临床诊断用抗原,从而代替传统的虫体诊断抗原;并且有待更进一步对其进行纯化研制诊断试剂盒用于早期临床诊断人的脑囊虫病和养猪业猪囊虫病的筛选,相信会带来巨大的经济效益和实用价值。同时也为当前猪囊虫疫苗的研制

同时点取样的上清液经沉淀浓缩后进行 SDS-PAGE 分析,结果显示重组菌株菌体破碎液中未检测到外源蛋白,而培养上清液中检测到分泌表达的 12.6kD 的外源蛋白,占总蛋白的 33%,分子量大小与国外报道以及氨基酸序列推导的大小一致。在诱导表达 48h 开始分泌表达,72h 表达量达最高(图 3A)。

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上,转移完毕剪下 Marker 泳道 NC 膜进行氨基黑染色,所有的蛋白带都显色;样品泳道 NC 膜进行免疫学反应后吡唑显色,出现了一条特异性强的显色带且无任何非特异性显色带,与氨基黑染色的 Marker 泳道 NC 膜拼接进行分析,结果显示,表达产物中 12.6kD 的外源蛋白带能被人囊虫病血清抗体识别,出现强特异性显色带,说明分泌表达的目的外源蛋白具有免疫反应活性(图 3B)。

提供了有力的检测手段,加速猪囊虫基因工程疫苗的研制,从而尽早消除流行于世界各地的囊虫病。

**致 谢** 本实验在兰州兽医研究所农业部畜禽病毒病重点实验室完成,特此感谢刘湘涛研究员和韩雪清博士。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Keith Elkon, Elonisa Bonfa, Roxana Llovet. Properties of the ribosomal P0 protein autoantigen are similar to those of foreign protein antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **85**: 5186 – 5189
- [ 2 ] Yasir A W Skeiky, Karin R Benson, Mohamed Elwasila. Antigen Shared by *Leishmania* Species and *Trypanosoma cruzi*: Immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infection and Immunity*, 1994, **5**: 1643 – 1651
- [ 3 ] Kalinna B H, Memanus D P. Cloning and characterization of ribosomal P protein from *Taenia solium*, the aetiological agent of human cysticercosis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1996, **219**(1) 231 – 237
- [ 4 ] Sreekrishna K, Potenz R H B, Cruze J A *et al.* High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

- Journal Basic Microbio*, 1988, **28** 265 – 278
- [ 5 ] Wegner G H. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, **87** 279 – 284
- [ 6 ] Buckholz R G, Gleeson M A G. Yeast systems for the commercial production of heterologous protein. *Bio/Technology*, 1991, **9**: 1067 – 1072
- [ 7 ] Cregg J M, Higgins D R. Production of foreign protein in the yeast *Pichia pastoris*. *Canadian J Botany Supp.* 1995, **73** 5981 – 5987
- [ 8 ] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R *et al.* High level expression purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 1989, **28** 4117 – 4125
- [ 9 ] Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P *et al.* High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/technology*, 1991, **9** 455 – 460
- [ 10 ] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J *et al.* The intracellular production and secretion of HIV – 1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1993, **136** 111 – 119
- [ 11 ] LUO X L (骆学农). Cloning and identification of phosphoprotein P2 of *Cysticercus cellulosae* and expression in *E. coli*. Master Thesis (硕士学位论文), 2001, Gansu Agriculture University, Lanzhou (甘肃农业大学)

## Expression of Phosphoprotein P2 of *Cysticercus cellulosae* in *Pichia pastoris* and Its Application

SU Cai-Xia CAI Xue-Peng\* HAN Xue-Qing LUO Xue-Long ZHENG Ya-Dong DOU Yong-Xi  
(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract** Cysticercosis is caused by the metacestode form of *Taenia solium-Cysticercus cellulosae* and it causes great economic losses and threatens the people's health. There are some problems on how to control cysticercosis, in order to resolve the key problem that the native antigen to diagnose and prevent cysticercosis is very limited and is not satisfied, *Pichia pastoris* Expression System was used to express recombinant P2 protein. The interested P2 gene was got by digesting the pGEM – P2 vector using restriction endonuclease, then it was inserted into the secretory pPIC9K *Pichia pastoris* expression vector and transformed into *E. coli*. Positive recombinant plasmids were selected, sequenced and named pPIC9K-P2 and it was linearized by *Sal* I and *Bgl* II, then the linear DNA transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant expression vector pPIC9K – P2 integrated into GS115 via homologous recombination between the transforming DNA and regions of homology within the genome. The transformants were screened for multicopy recombinants using G418 and were distinguished for Mut phenotypes by MD and MM. Two different phenotypes were generated-HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> (Methanol utilization plus) and HIS<sup>+</sup> MUT<sup>S</sup> (Methanol utilization slow). PCR analysis of the multicopy recombinants indicated that the P2 gene was integrated within the genome of *Pichia pastoris*. The multicopy recombinants were named GS115/pPIC9K – P2HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> and GS115/pPIC9K-P2HIS<sup>+</sup> MUT<sup>S</sup>, both HIS<sup>+</sup> MUT<sup>+</sup> and HIS<sup>+</sup> MUT<sup>S</sup> were induced with methanol. The results of SDS-PAGE and Western blot demonstrated that the culture supernatant of the induced *Pichia pastoris* contained P2 protein which was accumulated up to 33% of total proteins in the culture supernatant and its molecular weight is 12.6kD. The results of the clinical study indicated that the expression P2 protein could be used to diagnose human cysticercosis and swine cysticercosis as diagnosis antigen.

**Key words** *Cysticercus cellulosae*, P2 gene, *Pichia pastoris*, secretory expression, diagnosis antigen

Received: 02-26-2003

This work was supported by grant from the State Key Basic Research and Development Program (No. G19990119)

\* Corresponding author. Tel: 86-931-8342535; Fax: 86-931-8340977; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>