

## SARS 冠状病毒核衣壳蛋白在酵母中的表达与活性检测

# Expression of the Recombinant SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein in *Pichia pastoris* and Identification of its Bioactivity

刘如石<sup>1,2</sup>, 邱义兰<sup>1</sup>, 杨坤宇<sup>2</sup>, 张智洪<sup>2</sup>, 梁 良<sup>2</sup>, 张 军<sup>2</sup>, 夏宁邵<sup>2\*</sup>

LIU Ru-Shi<sup>1,2</sup>, QIU Yi-Lan<sup>1</sup>, YANG Kun-Yu<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-Hong<sup>2</sup>, LIANG Liang, ZHANG Jun<sup>2</sup> and XIA Ning-Shao<sup>2\*</sup>

1. 湖南师范大学生命科学学院生物化学与分子生物学系,长沙 410081

2. 福建省医学分子病毒学研究中心,厦门 361005

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

2. The Research Center for Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen 361005, China

**摘 要** 用 PCR 扩增 SARS 冠状病毒 N 蛋白全长 cDNA,克隆到酵母表达载体 pPIC3.5K 构建 pPIC3.5K-SCoVN 酵母表达质粒。表达质粒线性化后电转化到毕赤酵母 GS115 中,经 G418-RDB, MM/MD 平板与 PCR 扩增筛选获得 *His*<sup>+</sup> *Mut*<sup>+</sup> 重组菌株。比较研究了不同的培养基、溶解氧以及甲醇浓度对菌株生长与重组蛋白表达的影响。结果表明:FBS 培养基最适宜重组菌的生长与表达,溶氧对菌体的生长与表达有显著的影响,甲醇诱导最佳终浓度为 1%(V/V),SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达量,发现重组 N 蛋白表达量占细胞总蛋白的 6%,每升培养基可以生产 410mg 重组 N 蛋白,生物量达 45 *OD*<sub>600</sub>。Western blotting 结果表明,重组 N 蛋白对鼠源单克隆抗体以及 SARS 病人恢复期血清具有较强的特异性反应。对摇瓶培养条件进行了发酵罐放大实验,结果生物量达到 348 *OD*<sub>600</sub>,表达量达到 2.5g/L,分别为摇瓶表达的 7.7 倍和 6.1 倍,为 SARS 早期血清学诊断研究以及为 N 蛋白在病毒复制以及致病机理的研究奠定了一定的基础。

**关键词** 严重急性呼吸综合症 核衣壳蛋白 毕赤酵母 真核表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)04-0540-07

**Abstract** The full length cDNA of SARS coronavirus nucleocapsid(N) protein was amplified by PCR and cloned into yeast expression vector pPIC3.5K to generate expression vector pPIC3.5K-SCoVN. The plasmid was linearized and then transformed into *P. pastoris* (*His*<sup>-</sup> *Mut*<sup>+</sup>) by electroporation method. *His*<sup>+</sup> *Mut*<sup>+</sup> recombinant strains were screened on G418-RDB and MM/MD plates, and further confirmed by PCR. The influence of various inducing media, dissolved oxygen(DO) and the different final concentration of methanol was subsequently investigated. The results showed that the FBS medium was optimal for recombinant N protein expression and growth of the recombinant strain. The optimal final concentration of methanol is 1%(V/V), and the DO has a significant effect on recombinant N protein expression and growth of recombinant strain. The recombinant N protein expressed was about 6% of the total cell proteins, 410mg/L of recombinant N protein and 45 *OD*<sub>600</sub> were achieved in shake flask. Western-blot showed that the recombinant N protein had high specificity against mouse-anti-N protein-

Received: February 2, 2005; Accepted: April 27, 2005.

This work was supported by a grant from the Great Science Foundation of Fujian(No.2002F103) and the Excellent School Incubation Plan of Ministry of Education, China.

\* Corresponding author. Tel 86-592-2184110; E-mail: nsxia@jiangxian.xmu.edu.cn.

福建省重大科技项目(No.2002F103)与教育部跨世纪人才培养计划。©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

mAb and SARS positive sera, but had no cross-reaction with normal human sera. The result of scale-up culture in fermentator demonstrated that 2.5g/L of recombinant N protein and the maximum cell 345  $OD_{600}$  of were achieved, which was 6.1 times and 7.7 times higher than that in shake flask. So this study provide a basis for further researches on the early diagnosis of SARS and the virus reproduction and pathology reaction of SARS coronavirus.

**Key words** SARS, nucleocapsid protein, *Pichia pastoris*, eukaryotic expression

SARS (severe acute respiratory syndrome, 严重急性呼吸综合症) 的病原体得到了确认, 为一种新型的冠状病毒 (SARS-CoV), 能够引起人类与动物的呼吸道与肠道疾病<sup>[1-5]</sup>。2003 年在全世界范围内包括中国、新加坡和加拿大等 25 个以上的国家和地区爆发流行, 严重危害全世界人们的身体健康。SARS-CoV 是一类具有包膜的单股正链 RNA 病毒, 序列分析表明该病毒在系统发生上属于冠状病毒, 为当今发现的最大的冠状病毒。目前认为 SARS-CoV 编码 23 个蛋白, 其中包括主要的 4 个结构蛋白, 核衣壳蛋白 (N), 刺突蛋白 (S), 膜蛋白 (M) 以及小的包膜蛋白 (E)。成熟的 S、M、E 与 N 蛋白都能使宿主产生免疫反应, 这与胃肠冠状病毒<sup>[6]</sup>、感染性支气管炎病毒<sup>[7,8]</sup>、猪呼吸冠状病毒<sup>[9]</sup>和鼠肝病毒<sup>[10]</sup>的结果一致, 从临床症状上很难将 SARS 与普通肺炎区分开来, 因而在 SARS 感染早期得到正确的特异性诊断显得尤其重要<sup>[10]</sup>。在疾病感染早期, 血清学诊断是一种灵敏而且特异性好的方法。而 N 蛋白在病毒的复制与病理反应中起重要作用, 其抗原性比 S 蛋白强<sup>[6,12,13]</sup>, 因而有可能为血清学诊断的候选抗原。

毕赤酵母表达系统不但能够高水平表达外源重组蛋白, 而且遗传操作简单, 具有类似于哺乳动物翻译后的加工修饰功能, 特别是容易进行高密度培养从而提高重组蛋白的产率等优点倍受人们青睐<sup>[14,19]</sup>。到目前为止, 重组 N 蛋白都为大肠杆菌表达产物, 而大肠杆菌表达的 N 蛋白一般以包含体的形式存在, 表达蛋白不能正确折叠而影响其生物活性。因而本研究的目的是在毕赤酵母中表达具有正确构象的重组 N 蛋白以及分析表达蛋白的生物活性, 为研究 N 蛋白在病毒包装与病理反应中的作用提供可靠的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒**: TOP10F<sup>+</sup> [*proAB*, *lacI<sup>f</sup>*, *lacZ*  $\Delta$  M15, *Tn10*(*Tet<sup>R</sup>*)], TG1(*supE hsd*  $\Delta$  5 *thi*  $\Delta$  (*lac-proAB*)F [*traD36 PROAB<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup>*, *lacZ*  $\Delta$  M15]), T-SCoVN 质粒, 本实验室保存, pMD18-T 载体购自

TaKaRa 公司, 宿主菌 *P. pastoris* GS115 (*his<sup>-</sup> mut<sup>+</sup>*) 与胞内表达质粒 pPIC3.5K 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.2 工具酶与试剂**: 所用限制酶 *Bam*H I, *Eco*R I, *Sac* I 为大连宝生物工程公司产品。Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司, 酵母提取物、蛋白胨购自 Oxoid 公司。酵母基本氮源 YNB 购自 Difco 公司, 其余试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验所用 PCR 扩增引物**由上海博亚生物公司合成, 其序列见表 1。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
N gene	5' - GGATCCACCATGCTCTGATAATGGACCCC - 3'
	5' - GAATTCCTATGCGCTGAGITGAATCAG - 3'
AOX1	5' - GACTGGTTCGAATTGACAAGC - 3'
	5' - GCAAATGGCATTCTG ACA - 3'

**1.2.2 表达质粒 pPIC3.5K-SCoV 的构建**: 重组 DNA 技术采用标准的分子克隆技术<sup>[15]</sup>, 以 T-SCoVN 质粒为模板。分别利用其正向引物 NFP 与反向引物 NRP 进行 PCR 扩增: 94°C 4min, 94°C 50s, 57°C 50s, 72°C 80s, 共 20 个循环; 72°C 10min。PCR 产物回收后连接到 pMD18-T 载体上, 然后用 *Bam*H I / *Eco*R I 切下 N 基因, 克隆到用同样酶切处理的表达 pPIC3.5K 载体上构建 pPIC3.5K-SCoV 表达载体 (图 1), 测序结果证实了 N 基因处于 AOX1 启动子控制下。

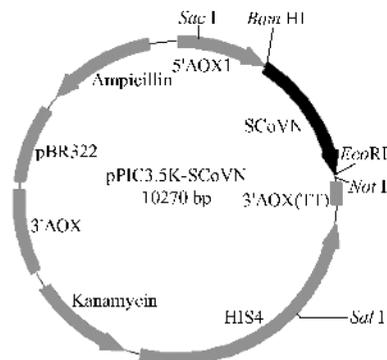


图 1 表达质粒 pPIC3.5K-SCoVN 的构建

Fig. 1 Construct of expression plasmid pPIC3.5K-SCoVN

**1.2.3 质粒转化与 *his<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>* 重组表型阳性克隆的筛选**: *P. pastoris* 酵母感受态细胞的制作以及电转化

按 Invitrogen 公司方法进行<sup>[16]</sup>。然后挑取单菌落先后分别接种到 MB 与 MM 平板上 29℃ 培养 2~3d 根据甲醇利用快型 *his<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>* 与甲醇利用慢型 *His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup>* 在 MD 与 MM 的生长速度不同来鉴别其甲醇利用表型。

**1.2.4 PCR 分析重组毕赤酵母的表型与整合** :以 5' AOX1 和 3' AOX1 引物对 ,以采用 Invitrogen 公司方法分别提取的 pPIC3.5k-SCoVN 重组菌与 pPIC3.5k 重组菌的基因组总 DNA 为模板<sup>[16]</sup> ,进行 PCR 扩增 ,然后进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增结果。

**1.2.5 摇瓶培养重组菌株与重组 N 蛋白的胞内诱导表达** :经 PCR 鉴定正确的重组菌株按 Invitrogen 公司方法进行诱导 ,每 12h 取样检测生物量  $OD_{600}$ 、表达水平与生物活性。

**1.2.6 细胞的裂解与重组蛋白表达的检测** :收获诱导表达的重组细胞 ,按 Liu 等<sup>[18]</sup>的方法破碎细胞 ,12000g 离心 10 min 留上清 ,用 BCA 法测定上清中蛋白质浓度 ,取 10 $\mu$ L 上清加入适量上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳 ,然后用凝胶成像系统分析表达重组蛋白占细胞总蛋白的量<sup>[17,18]</sup>。

**1.2.7 Western blot 分析重组 N 蛋白的活性** :SDS-PAGE 在电转缓冲液 (25 mmol/L Tris·HCl, 192mmol/L 甘氨酸, 3.5 mmol/L SDS, 20%(V/V) 甲醇) 中平衡后 ,将蛋白电转到硝酸纤维素薄膜上 (安玛西亚 TE70 半干转移系统, 0.8mA/cm<sup>2</sup> 电转 30min)<sup>[19]</sup> ,再用 5% 脱脂奶/TN 缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl, 150mmol/L NaCl, pH 8.0) 封闭 ,1:1000 加入鼠源抗 N 单克隆抗体或 1:100 加入 SARS 病人血清在 20~25℃ 温浴 1h ,洗膜后用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠或羊抗人 IgG (用 5% 的脱脂奶/TE 缓冲液按 1:10000 稀释) 与膜于 20~25℃ 温浴 1h ,最后用 BCIP 与 NBT 底物显色<sup>[15]</sup>。

**1.2.8 10L 自控发酵罐分批培养生产重组 N 蛋白** :在 10L 自控发酵罐中 ,最大工作体积为 8L 进行发酵培养 ,装料前校准 pH 电极 ,灭菌后校准溶氧电极 ,并保持接种发酵前溶氧为 100% ,按 8%~10% 的接种量接种摇瓶培养种子 ,发酵温度维持 29℃ ,发酵过程几个关键参数设定为 : (1) 转速与溶氧控制 :0~24h 按 MCS/win2.0 预设的 profile 程序从 400~800 r/min 直线上升 ,然后保持 800r/min ,保持溶氧不低于 30% ,低于 30% 时自动通入溶氧 ; (2) pH 值 :自动流加浓氨水保持 pH 为 5.5 $\pm$ 0.1 ; (3) 起泡通过消泡泵自动流加消泡剂 ; (4) 补料控制 :0~18h 不补料 ,18~

23h 以 17.8mL/(h·L) 的流速限制性补加 50%(w/w) 的甘油 ,23~25h 停止补加甘油 ,当溶氧 (DO) 陡然上升时说明甘油已经耗尽 ;25~28h 开始以 6.5 mL/(h·L) 的流速流加 100% 甲醇 ,28~40h 甲醇流速加倍 ;40~72h 甲醇的流加速度加到 17.8 mL/(h·L)。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化子表型的筛选

挑取 20 个 G418-RDB 平板上长出的抗性转化子在 MD 和 MM 平板上鉴定表型 ,结果它们都有相同的生长速率 ,因而所有重组子均为 *His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>* 表型。G418 抗性菌株在 YEPD 液体培养基中培养过夜 ,提取重组菌总 DNA ,用 5' AOX1 与 3' AOX1 为引物进行 PCR 扩增。由于转化菌株含有 AOX1 基因 ,转化质粒含有 AOX1 基因两端的同源序列 ,所以阳性重组子应该扩增出 AOX1 基因 (2.2 kb) 与 N 基因 ,结果每个转化子总 DNA PCR 均扩增出了 N 基因与 AOX1 基因 ,说明所有重组菌均为阳性克隆 ,而且表型均为 *His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>* ,其结果与 MM/MD 平板鉴定的一致 ,这些说明总 DNA PCR 扩增不但可以鉴定外源的 N 基因插入到了毕赤酵母基因组的 *His4* 基因座 ,而且可以一步鉴定重组菌的表型 (图 2 第 6,7 泳道)。

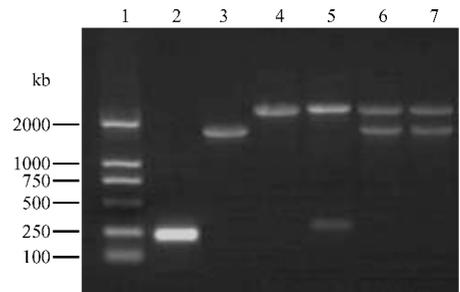


图 2 以 5' AOX1 与 3' AOX1 为引物 PCR 分析 SCoVN 基因整合到毕赤酵母 GS115 基因组

Fig.2 Integration of SCoVN gene into the *P. pastoris* GS115 was confirmed by PCR using 5' AOX1 primer and 3' AOX1 primer 1 : DNA ladder ; 2 : PCR product of pPIC3.5K ; 3 : PCR product of pPIC3.5K-ScovN ; 4 : PCR product of *P. pastoris* GS115 without transformation ; 5 : PCR product of control strains ; 6,7 : PCR product of positive recombinants.

### 2.2 摇瓶表达重组 N 蛋白及其活性检测

*His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>* 表型重组单克隆在 BMGY 培养基中于 30℃、250r/min 培养 1d ,然后更换为 BMMY 培养基诱导 ,每天添加 100% 甲醇到终浓度 0.5% 维持诱导 ,以只转化 pPIC3.5K 空质粒的菌株同样培养作对照。诱导 60L 后取样进行 SDS-PAGE 电泳 ,结果显

示重组 N 蛋白在毕赤酵母胞内获得了高效表达。其表达量占细胞总蛋白的 6%(图 3A),在 N 基因重组菌中约 45kD 位置处有一蛋白带,而在仅转化空质粒的重组菌中没有这一条蛋白带,初步说明 N 蛋白在酵母中得到了表达。Western blotting 结果表明(图 3B-D) 45kD 蛋白带能与鼠源 N 蛋白单克隆抗体和 6 份 SARS 病人恢复期血清具有反应,而只转化空载体的重组菌没有反应,并且表达的重组 N 蛋白和 8 份正常人的混合血清没有任何反应,这进一步说明 N 蛋白在毕赤酵母中得到了高效表达,而且具有较强的特异性与良好的生物活性。

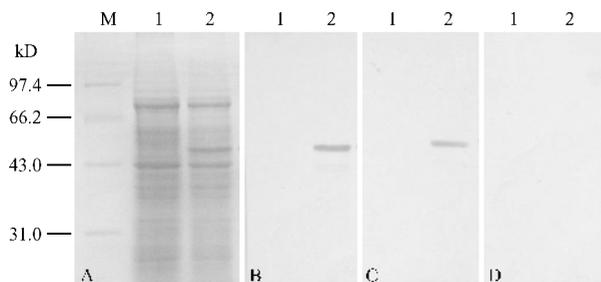


图 3 SDS-PAGE 与 Western-blot 分析重组菌株表达 N 蛋白

Fig.3 Analysis of SDS-PAGE and Western-blot of recombinant N expression by recombinant yeasts

A: SDS-PAGE analysis of N protein expression; B-D: bioactivity analysis of recombinant N protein by Western blotting against mouse-anti-N-mAb, positive and negative serum. M: protein molecular-mass marker; 1: protein from control strain; 2: proteins from the recombinant N gene strain.

### 2.3 重组菌株拷贝数与重组蛋白表达量的关系

挑取对不同浓度 G418 具有抗性的菌株进行诱导表达,对浓度越高的 G418 具有抗性,说明外源基因插入的拷贝数越高。而一般认为,外源基因的剂量与蛋白表达量正相关,因而研究了外源基因的剂量与表达量关系。结果拷贝数不同的菌株重组蛋白的表达都在 48h 达到表达高峰,均为 300mg/L 左右,没有显著的差别,说明重组 N 蛋白的表达量与重组菌株的拷贝数无关,这与 Vassileva 等<sup>[20]</sup>表达 HBsAg 时外源基因的剂量与表达量正相关的结果不一致。这说明重组菌株的表达量不一定总与整合基因的拷贝数正相关,即对于特定的基因来说具有个性。

### 2.4 培养与表达条件的优化

2.4.1 不同培养基对菌株生长与表达的影响 比较研究了 BMMY、BMM 以及 MM 培养基与 FBS 培养基在甲醇诱导量为 0.5% 时对菌株生长与 N 蛋白表达的影响(图 4),结果显示重组菌株生物量在诱导 48h 后达到稳定期,重组蛋白的表达量也达到最大值。在 FBS 与 BMMY 培养基中重组菌的  $OD_{600}$  达 33,是

BMM 培养基的 1.2 倍,MM 培养基的 1.45 倍;在 FBS 与 BMMY 培养基中表达量达到约 300mg/L,约为 BMM 培养基的 1.4 倍,MM 培养基的 2.1 倍,重组菌株在 FBS、BMMY 中的生物量与表达量没有显著的区别。但是 FBS 只由简单的无机盐组成,价格便宜,更适宜于工业生产用,因而对于重组菌株来说,FBS 是较优诱导培养基。

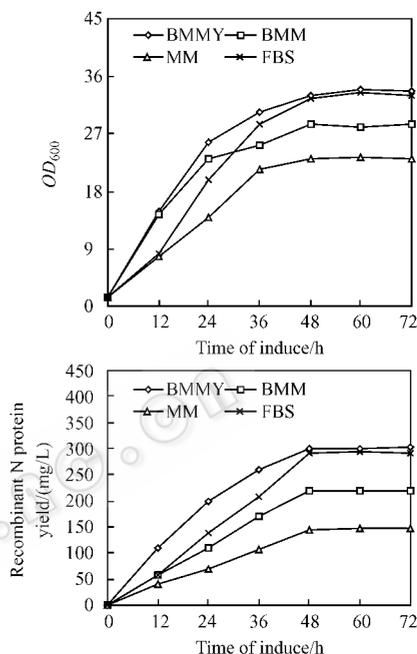


图 4 不同培养基对重组菌株生长与表达的影响

Fig.4 The effect of different media on growth and N protein expression

2.4.2 溶氧对菌体生长与表达的影响 在 100mL 锥形瓶中分别装入不同体积的 FBS 培养基(10、20、30、40、50mL),甲醇诱导量为 0.5% 时研究了溶氧(DO)在诱导过程中对菌体生长与表达的影响(图 5),研究说明溶氧对菌体的生长与重组 N 蛋白的表达有明显的影响。装瓶量为 10mL 或 20mL 培养基锥形瓶中溶氧丰富,生物量最大,约达到 40  $OD_{600}$ ,N 蛋白表达水平达到约 360mg/L,比其它装瓶量重组菌株的表达量高。但随着锥形瓶中培养基体积的增加,DO 下降,菌体的生长与表达都随着下降,装瓶量为 20mL 的重组蛋白表达量与生物量分别约为装瓶量为 50mL 的 1.7 倍和 1.6 倍,因而溶氧是影响菌体生长与重组蛋白表达的一个重要因素。

2.4.3 诱导过程中甲醇浓度对菌体生长与表达的影响:为确定甲醇的最佳补充程序,每 24h 添加一定量的甲醇维持诱导(图 6),研究表明,在低于 1% 的甲醇浓度时,随着甲醇浓度的增大,生物量与重组蛋白的表达量都呈上升趋势,而在 1% 时达到高峰,分

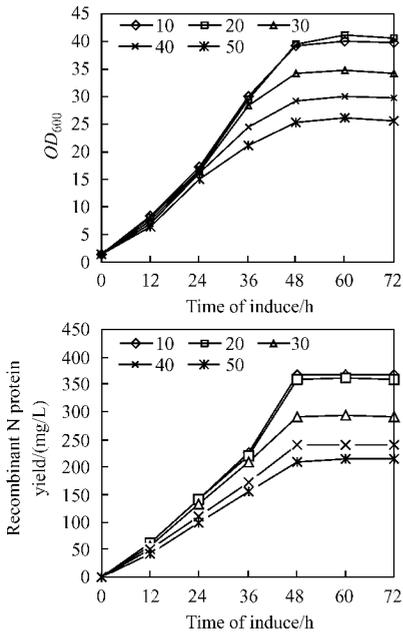


图5 不同溶氧对重组菌体生长与表达的影响

Fig.5 The effect of DO on growth and N protein expression

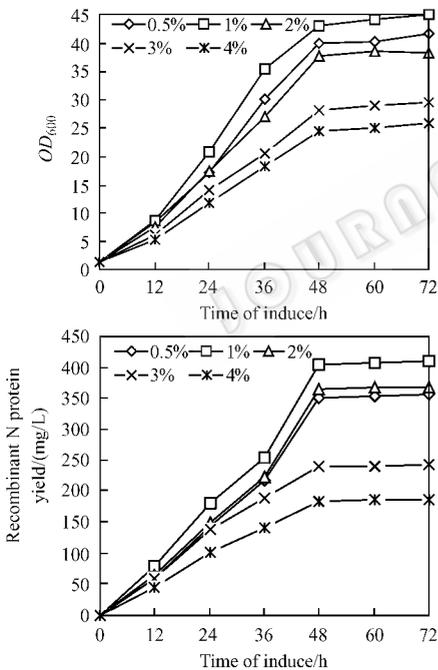


图6 不同甲醇诱导浓度对重组菌株生长与表达的影响

Fig.6 The effect of different content of methanol on growth and N protein expression

别为 45  $OD_{600}$  与 410mg/L, 分别是甲醇浓度 4.0% 的 1.7 倍和 2.2 倍。这是由于甲醇浓度小于 1% 时, 甲醇为限制性碳源, 影响了菌体正常生长与表达; 而当甲醇浓度超过 1% 时, 生物量与重组蛋白表达量都下降, 这是由于甲醇浓度过大对菌体造成了毒性, 抑制菌体的生长与表达。所以每天添加一次甲醇保持

甲醇浓度在 1% 时是较理想的诱导方法, 既保持了菌体生长与表达的需要, 又不会使甲醇成为限制性碳源或对菌体造成毒性。

## 2.5 高密度培养表达重组 N 蛋白

高密度发酵是实现高表达的重要策略之一, 采用 10L 发酵罐对 N 蛋白进行了规模表达, 发酵过程中 pH 值用 4mol/L 的氨水调节在  $5.5 \pm 0.1$ , 发酵温度为 29℃。当菌体分批培养到 18h 时开始限制性流加甘油, 继续维持菌体的继续生长, 流加 3h 后停止补料, 待甘油消耗完全后 (DO 迅速上升), 开始低速率地补加甲醇, 此时菌体  $OD_{600}$  达到 110 左右, 以后不断增加甲醇的流量。开始由于碳源由甘油转换为甲醇, 菌体要有一段适应期, 因而生长缓慢或不生长, 同时重组蛋白开始表达, 适应期过后不断加大甲醇的流加速度, 菌体又继续以一定的速度生长, 表达量迅速上升。期间不断进行 DO spike 操作, 防止甲醇浓度过高对菌株产生毒性, 同时不使甲醇成为限制性碳源与能源。培养 66h 后, 菌体密度不再上升, 重组蛋白表达量开始下降 (图 7, 图 8), 说明由于随着发酵的不断进行, 有害代谢废物以及分泌蛋白酶的积累, 细胞进入稳定期, 细胞开始自溶, 因而达到发酵终点, 应马上停止发酵, 以防菌体自溶降解外源蛋白。由于 pH 值、DO、甲醇浓度、温度等发酵参数得到了较好的控制, 因而高密度培养后, 菌体生物量与表达量得到了显著的提高, 菌体  $OD_{600}$  达到 348, 是摇瓶发酵培养的 7.7 倍; 目的蛋白的表达量为 2.5g/L, 为摇瓶发酵的 6.1 倍。初步建立了重组 N 蛋白的高密度发酵生产工艺, 为研究开发 SARS 血清学早期诊断试剂以及研究 N 蛋白在病毒的复制以及致病机理的研究提供了重要的基础。

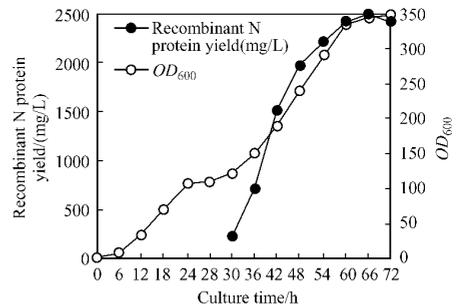


图7 毕赤酵母表达 N 蛋白发酵过程  $OD_{600}$  与蛋白表达水平曲线

Fig.7 The curve of  $OD_{600}$  and N protein expression yield by *P. pastoris* in fed-batch fermentation

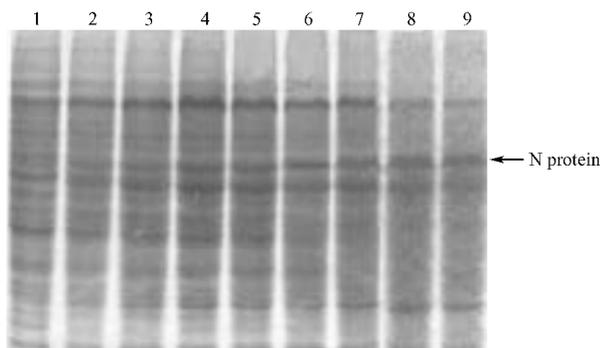


图 8 发酵罐中重组蛋白表达与诱导时间的关系

Fig.8 The relationship between the recombinant N protein and time of inducement in fermentator

1: the recombinant strain before induce; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: after inducing 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44 hours

### 3 讨论

SARS 的病原体已经被确定为一种能在人和动物上引起呼吸道与肠道疾病的新型冠状病毒<sup>[1-5]</sup>。对与之近距离接触的人群具有强的传染性。因而发现一种优良的诊断试剂进行早期诊断,以防止该病的流行是必要的。SARS 冠状病毒 N 蛋白核衣壳蛋白的抗原性优于刺突蛋白,是一种用于检测病毒抗体的良好抗原。因而本研究首次成功地在毕赤酵母表达系统中高水平表达了具有生物活性的重组 N 蛋白,Western-blot 结果显示,对鼠源单克隆抗体以及 SARS 恢复期病人血清的反应具有较强的特异性,而与正常人血清不发生交叉反应,说明重组蛋白具有良好的特异性,可以作为 SARS 病人早期血清学诊断的候选抗原。现在我们正进一步对探索重组 N 蛋白有效的保持其天然构象的纯化方法,并将进一步进行 ELISA 实验检验其作为候选抗原的能力。

同时比较了不同的诱导培养基对菌体生长与表达的影响,优选了仅由简单的无机盐组成的 FBS 培养基作为发酵培养基,由于该培养基含有丰富的微量元素,利于重组菌主的生长与表达,同时该培养基经济易得,利于工业生产降低成本。溶氧也是影响重组菌株的生长与重组 N 蛋白表达的一个重要因素。微生物在生长过程中主要利用氧进行呼吸作用,人们已经研究了氧对原核生物<sup>[21]</sup>与酵母<sup>[22]</sup>表达外源蛋白的影响做过研究。甲醇酵母利用甲醇作为碳源生长时需要大量的氧将甲醇氧化为甲醛<sup>[23]</sup>。所有细胞吸收的甲醇在醇氧化酶与过氧化氢酶的作用下氧化为甲醛,这些反应都需要分子氧作为电子受体。外源蛋白的合成需要丰富的能量,因而在毕

赤酵母表达外源蛋白时保持一定量的溶氧是很重要的。本研究的结果证实了这一点。在利用醇氧化酶启动子表达外源蛋白时,保持一定量的甲醇浓度是很重要的。在发酵罐中可以用不同的方法维持甲醇浓度<sup>[24]</sup>。已有人报道在摇瓶发酵过程中在线检测甲醇浓度,但是需要复杂的设备<sup>[25]</sup>。但是不需复杂设备的甲醇添加程序还没有被报道过。所以本研究想找到一种经验性的甲醇添加方法来进行重组菌株的诱导表达。每天添加一次维持 1% 的甲醇浓度是有利于重组菌体的生长与表达。甲醇浓度低于或高于 1% 时不利于菌体的生长与表达,可能是由于甲醇作为碳源供应不足或浓度过大对细胞产生毒性作用。对重组菌株高密度培养发现,在单因素确定了重组 N 蛋白的发酵条件后,对其进行了发酵罐扩大生产,结果显示,单因素确定的发酵条件具有可放大性,同时由于较好地控制了 pH 值、DO、甲醇浓度、温度等发酵参数,重组 N 蛋白的发酵产量得到了明显的提高,由摇瓶的 410mg/L 提高到发酵罐的 2.5g/L,发酵产量提高了 6.1 倍。重组 N 蛋白在毕赤酵母中的可溶性高效表达,不但为研究开发 SARS 血清学早期诊断试剂提供了一个重要候选原料,同时也为研究 N 蛋白在病毒的复制以及致病机理的研究提供了坚实的基础。

### REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Poutanen SM, Low DE, Henry B *et al.* Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med*, 2003, **348** ( 20 ): 1995 - 2005
- [ 2 ] Lee N, Hui D, Wu A *et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*, April 7, 2003, **348** ( 20 ): 1986 - 1994
- [ 3 ] Peiris JS, Lai S, Poon L *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, **361** ( 9366 ): 1319 - 1325
- [ 4 ] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348** ( 20 ): 1953 - 1966
- [ 5 ] Drosten C, Gunther S, Preiser W *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, **348** ( 20 ): 1967 - 1976
- [ 6 ] Gomez N, Carrillo C, Salinas J *et al.* Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology*, 1998, **249** ( 2 ): 352 - 358
- [ 7 ] Jackwood MW, Hilt DA. Production and immunogenicity of multiple antigenic peptide ( MAP ) constructs derived from the S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus ( IBV ). *Adv Exp Med Biol*, 1995,

- [ 8 ] Ndifuna A , Waters AK , Zhou M *et al.* Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive , effective serodiagnostic reagent for IBV . *J Virol Methods* 1998 , **70**( 1 ) : 37 - 44
- [ 9 ] Callenbaut P , Enjuanes L , Pensaert M . An adenovirus recombinant expression the spike glycoprotein of porcine respiratory coronavirus is immunogenic in swine . *J Gen Virol* , 1998 , **77**( 2 ) : 309 - 313
- [ 10 ] Hombberger FR . Nucleotide sequence comparison of the membrane protein genes of three enterotropic strains of mouse hepatitis virus . *Virus Res* , 1994 , **31**( 1 ) : 49 - 56
- [ 11 ] Riley S , Fraser C , Donnelly CA *et al.* Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong : impact of public health interventions . *Science* , 2003 **300**( 5627 ) : 1961 - 1966
- [ 12 ] King B , Brain DA . Bovine coronavirus structural proteins . *J Virol* , 1982 , **42**( 2 ) : 700 - 707
- [ 13 ] Daginakatte GC , Chard-Bergstrom C , Andrews GA *et al.* Production , characterization , and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus . *Clin Diagn Lab Immunol* , 1999 , **6**( 3 ) : 341 - 344
- [ 14 ] Sreekrishna K , Brankamp RG , Krop KE *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *Gene* , 1997 , **190**( 1 ) : 55 - 62
- [ 15 ] Sambrook J , *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , 2<sup>nd</sup> ed . , Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , 1989
- [ 16 ] Invitrogen , *Instruction Manual for Multi-Copy Pichia Expression Kit—Version F* , 1999 - 2002
- [ 17 ] Laemmli UK . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4 . *Nature* , 1979 , **227** : 680 - 685
- [ 18 ] Liu R( 刘如石 ) , He Z( 何志强 ) , Li SW( 李少伟 ) *et al.* Hepatitis E virus capsid production by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* . *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) , 2004 , **20**( 3 ) : 450 - 455
- [ 19 ] Amersham pharmacia biotech . *Hoef TE 70 Series semiphor semi-Dry Transfer Units User Manual* , 1998
- [ 20 ] Vassileva A , Chugh DA , Swaminathan S *et al.* Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *Protein Expr Purif* , 2001 **21** : 71 - 80
- [ 21 ] Shioya S , Morikawa M , Kajihara Y , Shimizu H . Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1999 **51**( 2 ) : 164 - 169
- [ 22 ] Hallborn J , Gorwa MF , Meinander N *et al.* The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the XYL1 gene . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1994 **42**( 2 ~ 3 ) : 326 - 333
- [ 23 ] Veenhuis M , Van Dijken JP , Harder W . The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast . *Adv Microbiol Physiol* , 1998 , **24** : 1 - 82
- [ 24 ] Cereghino J , Cregg JM . Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *FEMS Microbiol Rev* , 2000 , **24** : 45 - 66
- [ 25 ] Mewes Boettner , Bianka Prinz , Caterina Holz *et al.* High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *J Biotech* , 2002 , **99** : 51 - 62