

猪囊尾蚴疫苗候选基因 TSO18 在酵母中的高效表达

High-level Expression of the Potential Vaccine Antigen TSO18 of *Taenia solium* in *Pichia pastoris*

袁改玲, 才学鹏*, 景志忠, 郑亚东, 骆学农, 贾万忠, 李 辉, 丁军涛

YUAN Gai-Ling, CAI Xue-Peng*, JING Zhi-Zhong, ZHENG Ya-Dong, LUO Xue-Nong, JIA Wan-Zhong, LI Hui and DING Jun-Tao

中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046

Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

摘 要 将猪带绦虫六钩蚴 TSO18 基因亚克隆至毕赤酵母分泌性表达载体 pPIC9K, 构建重组表达载体 pPIC9K-TSO18, 电转化毕赤酵母菌 GS115, 使重组表达载体与酵母染色体发生同源整合。采用 G418 抗性梯度法筛选得到多拷贝重组菌株, 用甲醇进行诱导表达, 并对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析、脱糖基化分析、分子筛纯化和小鼠免疫接种等表明, 目的蛋白得到了高效表达并进行了适度的糖基化, 易于纯化且具有免疫活性。在 5L 发酵罐中目的蛋白表达量达到 2.54mg/mL, 为制备基因工程疫苗打下了坚实的基础。

关键词 猪囊尾蚴, TSO18 基因, 毕赤酵母, 高效表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)04-0563-05

Abstract TSO18 gene was subcloned into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K. The recombinant plasmid pPIC9K-TSO18 was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation so that the plasmid will be integrated with chromosome of *P. pastoris*. The *P. pastoris* strains containing multi-copy recombinant were screened by G418 and induced by methanol. The expression product was analyzed by SDS-PAGE, Western blot, deglycosylation, and purified by Sephadex column, and was used to immunize mice. The results indicated that the target protein was efficiently expressed in *P. pastoris*, and glycosylated moderately, and had immunological activity. In a 5 liter fermentor, the expression level of the target protein was up to 2.54 mg/mL. These results will benefit for the development of genetically engineering vaccine.

Key words *Taenia solium*, TSO18 gene, *Pichia pastoris*, High-level expression

猪囊虫病(*Cysticercosis cellulosae*)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。猪是最重要的中间宿主,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^[1]。目前关于囊虫病的防治还没有成熟的手段,过去的化学药物治疗以及虫体抗原免疫都已经暴露出很大的局限性。近年来,随着分子生物学的不断深入和发展,人们意识到通过寻找虫体内具有免疫保护性的抗原基因,

Received: March 7 2005; Accepted: April 27 2005.

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program of China(No. G1999011906).

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

国家重点基础研究发展规划项目基金资助(No. G1999011906)

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

对基因进行克隆并在体外大量表达,进而研制成基因工程疫苗来克服上述方法的局限性已成为可能。

在猪囊尾蚴疫苗研究方面,六钩蚴抗原免疫保护作用强,而且六钩蚴是抗体介导为主的免疫应答作用的靶子,应答机制相对简单,疫苗研制前景乐观。Verastegui 等^[2]研究表明,粗制猪带绦虫六钩蚴抗原(OAs)可以诱导 100% 的保护,而中绦期抗原仅能诱导产生部分保护,说明 OAs 可用于预防猪囊虫感染。TSO18 基因被认为是猪带绦虫六钩蚴时期重要的免疫原基因,是最具有前途的疫苗候选基因^[3-4]。毕赤酵母表达系统具有高表达、高稳定、高密度发酵、适度糖基化及表达产物生物活性好等特点。因此,本研究选用毕赤酵母分泌型表达载体,将 TSO18 基因整合到酵母染色体基因组中,对重组菌株进行诱导表达并对其表达产物进行分析研究,为研制抗猪囊尾蚴重组基因工程疫苗的商品化生产打下基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 JM109 菌种、酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115、质粒 pPIC9K 均为本实验保存;pGEM-TSO18 重组质粒由本室构建。

1.2 工具酶和生化试剂

限制酶 *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I、DNA Markers (DL2000)、Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自大连宝生物工程公司;D-生物素为日本进口;低分子量蛋白 Marker 购自 BBI;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;Endo H 购自 Biolabs 公司;酵母氮碱(YNB)、G418、D-山梨醇、辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自经科公司;其它常规试剂为国产分析纯。

1.3 培养基及培养条件

酵母生长培养基 YPD、选择培养基 MD、MM 以及诱导表达培养基 BMGY、BMMY、发酵培养基培养基及其它试剂均按美国 Invitrogen 公司的多拷贝毕赤酵母表达试剂盒的操作手册配制。

1.4 目的基因的扩增

根据编码 TSO18 蛋白的基因序列,除去位于 5' 端的 51bp 的信号肽序列,并按照毕赤酵母密码子的偏爱性,在不改变其氨基酸序列的前提下,将低利用率密码子 GAT、GTG 同义突变为高利用率密码子 GAC 和 GTT:

TSO18 基因上游引物:

5'CGAGAATTCGACATTTTCGTTCCATACCTT3';

下游引物:

5'TAGCGGCCGCTCACTACGATCTTCGGACCTTC3';

pPIC9K 质粒载体引物:

5'AOX1 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3';

3'AOX1 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

以上两对引物均由宝生物(大连)工程公司合成。

以本室构建的 pGEM-TSO18 重组质粒为模板进行 PCR 扩增反应。反应条件为:94℃ 5min,94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。

1.5 重组表达载体 pPIC9K-TSO18 的构建

将 PCR 产物和表达载体 pPIC9K 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,用试剂盒回收后连接,连接产物转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞,经 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组菌株送大连宝生物用双脱氧链终止法进行 DNA 序列测定。用 DNASTar 软件对序列进行分析。

1.6 毕赤酵母感受态细胞的制备、筛选及表型的鉴别

参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行,所制感受态细胞立即使用。

将 pPIC9K-TSO18 和 pPIC9K 用 *Sal* I 单酶切线性化后,与毕赤酵母感受态细胞混匀进行电转化,转化物涂营养缺陷型 MD 培养基平皿,置 28℃ 恒温培养 2~4d,能在 MD 培养基上生长的菌落为 His⁺ 转化子。将 MD 培养基平皿中长出最初 His⁺ 转化子,影印法依次接种到含 G418 浓度梯度为 1.0、2.0mg/mL 的 YPD 培养基中,筛选多拷贝重组菌株。PCR 法确认重组菌株,并在 MD 和 MM 培养基上筛选表型。

1.7 重组酵母菌株的诱导表达

从 YPD-G418 平皿上挑取多拷贝 GS115/pPIC9K-TSO18 HIS⁺ MUT⁺ 菌株的单菌落于 5mL BMGY 培养基中 28~30℃ 摇床培养 24h,离心 5min 收获细胞。将其用 10mL BMMY 培养基悬浮,28℃ 诱导培养 60h,每 24h 向培养基中补加甲醇至终浓度为 1%,以保证持续的诱导表达。

1.8 摇瓶水平和发酵罐水平表达产物的 SDS-PAGE 分析

取在摇瓶诱导表达 60h 后的培养液,12000r/min 离心取上清液进行 SDS-PAGE 分析,并筛选出高表达菌株。

重组酵母在 5L 发酵罐中进行发酵。重组酵母的发酵为高密度补料发酵,发酵过程分为菌株培养

阶段、碳源饲喂阶段和诱导表达阶段,具体方法见 Invitrogen 操作手册。在诱导前及诱导过程中每 12h 取样一次以备检测。诱导结束后,以 10000r/min 离心 30min 取上清后浓缩冻干保存备用。

1.9 表达产物 TSO18 蛋白的糖基化分析及纯化

将 20 μ L (1mg) 上清液加入等量的 10 \times Glycoprotein 变性缓冲液中煮沸 10min 使其变性,再加入 1 \times G5 缓冲液、5 μ L Endo H 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后加等量的上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

用 Sephadex G-100 分子筛等步骤进行层析。将预处理的 Sephadex G-100 装柱后,再用 0.01MPBS 缓冲液充分平衡至电导率、紫外吸收、pH 均稳定,取样品 0.5mL (约含蛋白含量 50mg),用同样的缓冲液洗脱,流速为 0.5mL/min,收集峰值。

1.10 免疫活性分析

取诱导上清液进行 SDS-PAGE,电泳后将分离的条带转至硝酸纤维素膜上进行 Western blot 鉴定。

以纯化的酵母表达的 TSO18 蛋白免疫一组小白鼠,同时以 PBS 免疫小鼠作阴性对照,每组 8 只。免疫接种量为 50 μ g/只,与弗氏完全佐剂等体积混合,初次免疫接种后 15d 用一免的 1/2 剂量与弗氏不完全佐剂等量混合后再次免疫。免疫前和免疫后 7d、14d 尾部采血,分离血清;加强免疫后 7d (免疫后 30d) 眼眶采血、分离血清,用 ELISA 法检测血清抗体效价。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

从 pGEM-TSO18 重组质粒中扩增出特异的 DNA 片段,大小约为 342bp,与预期结果一致(见图 1)。

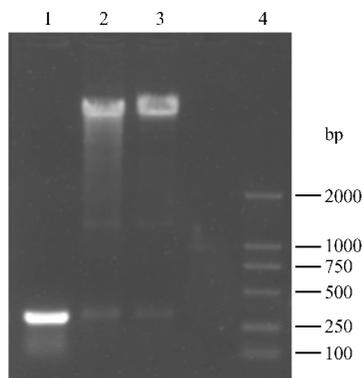


图 1 重组表达质粒 pPIC9K-TSO18 酶切及 PCR 分析

Fig.1 Analysis of Recombinant Plasmid pPIC9K-TSO18 by digesting with *EcoR* I / *Not* I and PCR

1 : PCR product of TSO18 ; 2, 3 : pPIC9K-TSO18/ *EcoR* I + *Not* I ; 4 : DL2000 Markers.

2.2 重组表达载体 pPIC9K-TSO18 的构建和鉴定

重组质粒经 PCR 和 *EcoR* I、*Not* I 双酶切鉴定,均得到大小约 342bp 的片段,测序结果表明 TSO18 基因以正确的阅读框架与酵母表达载体 pPIC9K 的 α -因子信号肽序列的 3'端融合,结果如图 1 所示。

2.3 重组酵母菌株的鉴定

对用 G418 筛选后的重组菌株用 PCR 方法鉴定,参照文献 [5],以重组菌株的染色体 DNA 作为模板,以 5' AOX1、3' AOX1 为引物进行 PCR 检测,得到 834bp 大小的特异片段(空白菌株应为 492bp),表明转化子基因组中确实整合有 TSO18 基因(见图 2)。

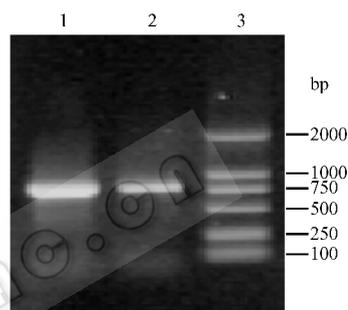


图 2 重组菌株的 PCR 鉴定结果

Fig.2 PCP analysis of interested gene integration in GS115/ pPIC9K-TSO18

1 2 : GS115/pPIC9K-TSO18 3 : DL2000 Markers.

2.4 发酵罐水平目的蛋白的表达

选择摇瓶培养表达量高的毕赤酵母重组菌株 *P. pastoris* pPIC9K-TSO18 进行 5L 发酵罐发酵培养。

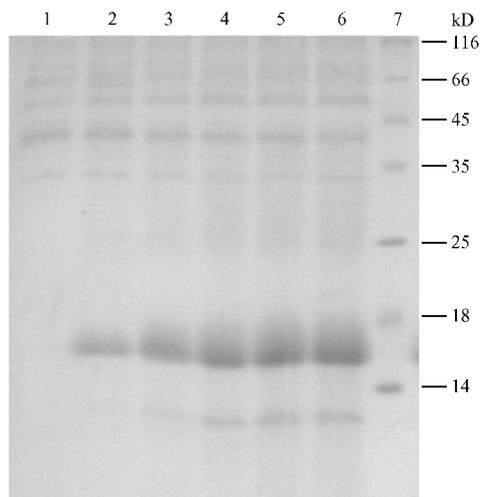


图 3 在 5L 发酵罐中表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression products in the 5L fermentor

1 : fermentation broth before induction by methanol ; 2 ~ 6 : fermentation

broth induced by methanol for 12h, 24h, 48h, 60h, 72h respectively ; 7 : © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn> low molecular weight protein markers.

在诱导之前的菌体生长阶段发酵上清中检测不到目的蛋白。随着甲醇的诱导,从 12h 开始检测到目的蛋白,其表观分子量分别为为 16kD 和 12kD 左右,将表达上清液进行 SDS-PAGE,用薄层扫描分析,目的蛋白约占上清液中总蛋白质的 80% 以上,诱导 72h 目的蛋白表达量高达 2.54mg/ml(见图 3)。

2.5 表达产物 TSO18 蛋白的糖基化分析及纯化

将表达的外源蛋白进行脱糖基化后,16kD 左右的蛋白带变为一条分子量约为 12kD 左右的蛋白带,与 TSO18 基因产物的理论分子量相当,分析该氨基酸序列,发现有一处潜在糖基化位点,说明该蛋白可能经过了糖基化修饰,含有寡糖链,造成分子量偏大。

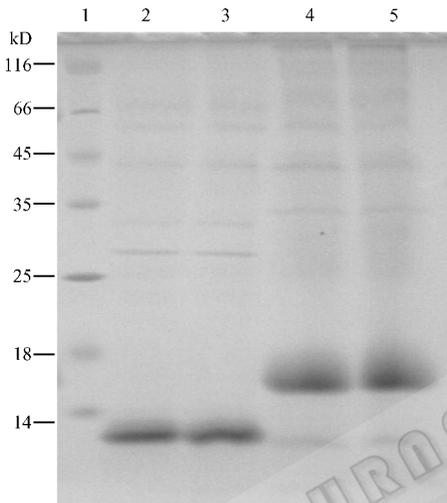


图 4 TSO18 蛋白脱糖基化前后的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed TSO18 deglycosylated by Endo H

1 low molecular weight protein markers; 2,3: TSO18 deglycosylated by Endo H; 4,5: expressed TSO18.

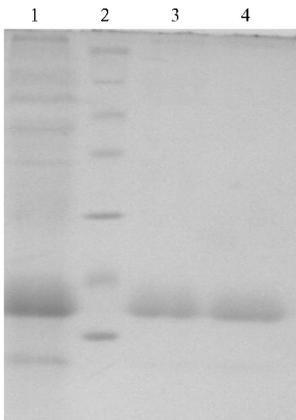


图 5 TSO18 蛋白纯化图

Fig.5 Purified protein of TSO18

1 expressed TSO18; 2 low molecular weight protein markers (from top to bottom: 116kD, 66kD, 45kD, 35kD, 25kD, 18kD, 14kD); 3,4: purified TSO18.

表达的 TSO18 蛋白经纯化后,目的蛋白和来自诱导培养基中的色素得到了很好的分离。目的蛋白存在于第二个峰里,色素在第一个峰里,结果见图 5。

2.6 免疫活性分析

表达产物和脱糖基化产物经 SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上进行 Western blot 免疫学反应,结果显示,表达产物和脱糖基化产物 16kD 和 12kD 的外源蛋白带分别能被人囊虫病血清抗体识别,出现显色带(见图 6),说明分泌表达的外源蛋白具有免疫反应活性。糖基化处理对蛋白的免疫反应活性影响不大,糖基化产物对其他作用是否有影响,尚需进一步研讨。



图 6 TSO18 蛋白的 Western blot 分析

Fig.6 Western blot analysis of the TSO18 protein

1: low molecular weight protein markers; 2: *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K; 3: expressed TSO18; 4: TSO18 deglycosylated by Endo H.

小鼠免疫实验结果表明,对照组抗体水平没有明显的变化,免疫组则从第 7 天开始上升,并在免疫后 30d 达到很高的峰值(见图 7)。说明分泌表达的外源蛋白具有免疫原性。

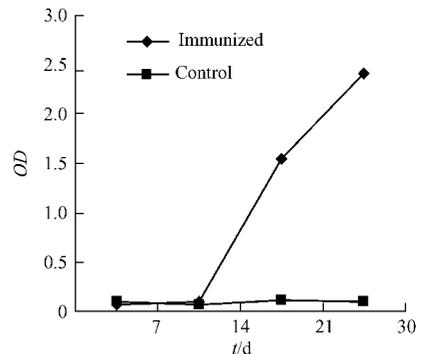


图 7 免疫原性分析

Fig.7 Analysis of immunogenicity

3 讨论

1989 年 Johnson 应用重组 DNA 技术第一次成

功地克隆鉴定出了羊带绦虫具有保护性抗原的基因,并在大肠杆菌中表达,保护率达 90% 以上,并于 1994 年 2 月成为商品寄生虫疫苗,这为带科绦虫基因工程疫苗的研制和开发提供了新的思路和广阔的前景^[6]。Gauci 等(1998)克隆出猪带绦虫 TSO18 基因,其编码序列与其他带绦虫相应保护性抗原有很高的同源性,其表达蛋白可以作为一种重组疫苗来预防猪囊虫病^[7]。本研究选择疫苗候选基因 TSO18,采用近年来发展迅速的新型外源蛋白质生产系统-巴斯德毕赤酵母表达系统,构建的重组毕赤酵母在 5L 发酵罐高细胞密度发酵中表达量高达 2.54mg/mL。此外,酵母表达系统不但能使外源蛋白高水平表达,而且还能通过一定途径将表达蛋白分泌到培养基中,且杂蛋白少,经过分子筛层析即可得到纯度很高的蛋白,这为基因工程下游的分离纯化和鉴定奠定了基础。

酵母表达系统在分泌过程中能进行翻译后加工,如糖基化、磷酸化和形成二硫键等功能,其表达产物的特征接近真核蛋白,保持了分泌蛋白的天然构象和活性,毕赤巴斯德酵母表达蛋白与糖连接的方式一般为 N-连接糖化位点,以甘露糖为多,且糖基化修饰程度与哺乳动物的相似,因此利用 *Pichia Pastoris* 表达后产物更接近天然蛋白。用 SMART 分析,TSO18 是一种糖蛋白,可能含有一个潜在的糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。本研究用的糖苷内切酶 H 是一种具有切割 N-糖蛋白中高甘露糖和部分混合寡聚糖的壳二糖核心活性的重组糖苷酶,经分析后表明,表达出的目的蛋白进行了适度的糖基化修饰,而且目的蛋白的表达量达到了 2.54mg/mL,在免疫分析中也具有免疫原性和免疫反应性,这为下一步研制该基因工程疫苗的商品化生产打下了良好的基础。

本研究为了提高疫苗候选基因 TSO18 在毕赤酵母中的表达效率,采取了下列优化措施。首先在克隆 TSO18 基因时,根据 magainin cecropin 和 militin 的氨基酸序列^[8],选用毕赤酵母偏好密码子,对该基因进行适当修饰,并通过设计引物,使 PCR 扩增产物去除了信号肽序列,从而适应酵母系统的要求,提高表达量;其次,一般认为,单拷贝的转化子具有更好的遗传稳定性,但是表达量相对较低,对于具有质粒

脱落性不稳定的重组菌的培养,由于丢失重组质粒的菌体在非选择性培养基中一般具有生长的优势,一旦发生重组质粒丢失,重组菌在培养液中的比例会随时间快速下降,从而严重影响外源基因产物的生产。因此,本研究构建的重组酵母外源基因为 3~4 个拷贝整合,这样既可以做到高表达,又可以保证重组酵母的遗传稳定性。在本研究工作中,在平板上传代 5 代后,各单菌落中目的基因的 PCR 的阳性率为 100%,同时表达量也很稳定,这有利于这种重组酵母在实际生产中的应用。在发酵罐培养基因重组菌时,通常需要维持一定的 pH 和溶氧水平,在本研究中发现,在 pH5.0 时,重组酵母的稳定性最好。另外,在低溶氧环境中由于氧会限制能量的提供造成稳定性差,因而在发酵过程中需要保持溶氧在 50% 以上。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kong FY(孔繁瑶). *Veterinary Parasitology*(家畜寄生虫学). Beijing: Chinese Agricultural University Press(中国农业大学出版社), 1997
- [2] Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 2002, **108**: 49-62
- [3] Jia WZ(贾万忠). Variations of 45W, 14ku and 18ku Genes from Major Species of Taeniidae. Doctor Thesis(博士论文). Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing(中国农业科学院研究生院), 2003
- [4] Charles GP, Gauci, Ana Flisser, Mashall WA. *Taenia solium* oncospheres protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18kD antigens. *International Journal for parasitology*, 1998, **28**: 575-760
- [5] Ye L(叶玲), Liu JW(刘建伟), Liu J(刘静). Frozen storage of competent yeast cells and simple procedure for PCR screening yeast recombinant clones. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2003, **30**(6): 956-959
- [6] Johnson KS, Harrison GB, Lightowlers MW *et al.* Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*, 1989, **338**(6216): 585-587
- [7] Plancarte A, Flisser A, Gauci CG *et al.* Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol*, 1999, **29**(4): 643-647
- [8] Zhho X(赵翔), Huo KK(霍克克), Li YY(李育阳). Synonymous Condon Usage in *Pichia pastoris*. *Chinese J of Biotechnol*(生物工程学报), 2000, **16**(3): 308-311