

乙型肝炎病毒表面抗原在乳酸克鲁维酵母中的表达

李 嵩* 高卜渝 李育阳**

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

摘 要 将乙型肝炎表面抗原基因插入具调控型启动子 PH05 的乳酸克鲁维酵母表达载体中, 构建完成质粒 pLS1, 转化宿主菌 *Kluyveromyces lactis* CXJ1-7A, ELISA 结果表明, 其表达水平受无机磷浓度的调控。为了进一步提高表达水平, 我们将 pLS1 中的乙型肝炎表面抗原表达单元插入带完整 pKD1 序列的载体 pE1, 并将构建成的质粒 pLS2 转化 MW98-8C。在比较了 CXJ1-7A/pLS1 和 MW98-8C/pLS2 后, 我们发现 MW98-8C/pLS2 的稳定性大大提高, 表达量也增加 4~8 倍。

关键词 乳酸克鲁维酵母, 乙型肝炎病毒表面抗原, 基因表达, 基因调控

肝炎病毒是严重影响人类健康的病毒之一, 它的感染导致肝炎等人类肝脏疾病, 特别在亚洲、非洲一些发展中国家, 肝炎病毒传染更为广泛, 其中乙型肝炎尤为严重, 现对乙型肝炎病毒 (HBV) 的结构等性质已有所了解, 它是一种 DNA 病毒, 此病毒的基因组编码了表面抗原、核心抗原和复制它自己的 DNA 聚合酶等蛋白质。表面抗原蛋白是在病毒外壳表面的蛋白质, 目前一般被作为抗 HBV 疫苗。

乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 基因已在多种原核和真核系统中得到表达。其中在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 系统中的结果令人兴奋, MeAleer 等人^[1]用酵母产生的重组 HBsAg 蛋白进行了动物实验, 证明了酵母产生的 HBsAg 蛋白作为疫苗使用较人血源疫苗安全, 效果也更显著。何葆光等^[2]沈绿萍等^[3]也分别用 PGK1 启动子和 GAL10 启动子指导 HBsAg 在酿酒酵母中的表达。但是酿酒酵母表达 HBsAg 的水平都不高。Cregg 等^[4]用毕赤氏酵母表达乙肝病毒表面抗原达到了很高的水平, 说明酿酒酵母以外的酵母菌 (通常被称为非常规酵母), 在表达 HBsAg 方面有很大的潜力。随着环状质粒 pKD1 的发现, 乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) 也有了类似于酿酒酵母 2 μ 质粒为基础的高效多拷贝高稳定的体系。通过构建具备完整 pKD1 序列的载体在乳酸克鲁维酵母中已能使 rHSA^[5] rIL β ^[6]等的表达水平达到数百毫克/升的高水平。但是, 至今尚未见乙型肝炎表面抗原在乳酸克鲁维酵母中表达的报道。

本文报道了将乙型肝炎病毒表面抗原基因插入两个 *K. lactis* 表达载体, 初步研究了 HBsAg 基因的表达情况, 同时也研究了上述重组质粒在酵母中的稳定性。

国家“863”高科技项目。

* 上海科学技术大学 88 级学生。

** 联系作者。

本文于 1996 年 5 月 27 日收到。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 质粒: pS38-83 系带 HBsAg 基因的质粒, 由何葆光教授提供。pEPHO^[6], pE1 均为 *K. lactis* 的质粒载体, 由陈新杰博士提供。

菌株: *K. lactis*: CXJ1-7A (α , *uraA*, *lac4-8*, *ade-1*, k^+ , *pKD1*⁺) MW98-8c (α , *uraA*, *argA*, *lysA*, *rag2*, K^+ , *pKD1*⁰) 作为酵母转化的宿主细胞, 由陈新杰博士提供。*E. coli*: TG1 作为大肠杆菌转化的宿主细胞。

1.1.2 培养基: A. 大肠杆菌培养基: LB 培养基 (1% 蛋白胨、1% 氯化钠、0.5% 酵母抽提物 pH7.5) LBA 培养基 (每毫升 LB 培养基中加 100 μ g 氨苄青霉素)。B. 酵母培养基: YEPD 培养基 (1% 酵母抽提物、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖) SD 培养基 [0.6% YNB (Yeast Nitrogen Base)、2% 葡萄糖, 每毫升培养基中根据需要补加 20mg 的氨基酸]。低磷发酵培养基 (10% 10 \times 低磷贮存液、2% 葡萄糖, 根据需要于每升低磷发酵培养基中加入所需氨基酸或碱基各 40mg), 其中 10 \times 低磷贮存液的配方为: 12.5g 酵母抽提物 (DIFCO)、50g 蛋白胨 (DIFCO) 溶于 400ml 水中, 在搅拌下缓缓加入 5ml 1mol/L MgAc, 用 5mol/L NaOH 调至 pH8.4, 补加水至总体积 500ml, 置于冰浴 2h, 用 3mm 滤纸除去 Mg₃(PO₄)₂ 沉淀, 再用发烟 HCl 调至 6.5, 保存于 -20 $^{\circ}$ C。高磷发酵培养基 (每升低磷发酵培养基中加入 0.2% KH₂PO₄)。

1.1.3 酶和试剂: 限制酶和连接酶均为 Biolabs 或 Boehringer mannheim 产品。酶切反应, 连接反应均接通常反应条件进行。乙型肝炎表面抗原酶标试剂盒为上海荣盛生物试剂厂产品。反应按产品说明所述条件进行。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌转化、质粒 DNA 抽提、DNA 片段分离参照 Sambrook^[7] 的方法。

1.2.2 酵母转化参照 Hisao Ito^[8] 的方法。

1.2.3 酵母培养及抽提物的制备: 将经 24h 在高磷条件下生长的种子培养液按 4% 接种量转接 25ml 高磷培养基。16h 后离心 (2500r/min, 10min), 去上清, 用 10ml 无菌水洗涤一次, 再分别以 25ml 高磷和低磷培养基悬浮, 继续培养 8h。培养结束, 离心, 收集菌体。菌体重新悬浮于 25ml 溶菌缓冲液 (Tris 25mmol/L pH6.7, DTT 0.1mmol/L, EDTA 1mmol/L, PMSF 2mmol/L, 甘油 10%), 加入 10g 玻璃珠, 用 Bead Beater 破壁 12 次, 每秒 90 次, 破壁液经 17K, 10min 离心, 吸取上清放在 -20 $^{\circ}$ C 保存, 作为样品。

2 结 果

2.1 HBsAg 基因表达质粒 pLS1 和 pLS2 的构建 (图 1)

pEPHO 质粒是带有 PHO5 启动子和终止子的载体, 且具有 pKD1 质粒复制起始点序列 S11 片段和大肠杆菌 ColE1 的复制起始点, 所以这个质粒可以在乳酸克鲁维酵母及大肠杆菌中都能复制。质粒 pS38-83 的 EcoRI 片段带有 HBsAg 基因, 经分离后插入质粒 pEPHO 的 EcoRI 切点。由于 HBsAg 基因的编码区的近 5' 端有一个 XbaI 切点, 而

载体上有一个 SalI 切点，插入片段的方向通过电泳检查 XbaI 和 SalI 双酶切片段的大小来确定（图 2）。插入方向正确的重组质粒此时应出现 0.8kb 和 7.2kb 两条带。这个质粒被命名为 pLS1，而插入方向相反的质粒被定名为 pLS1-0。

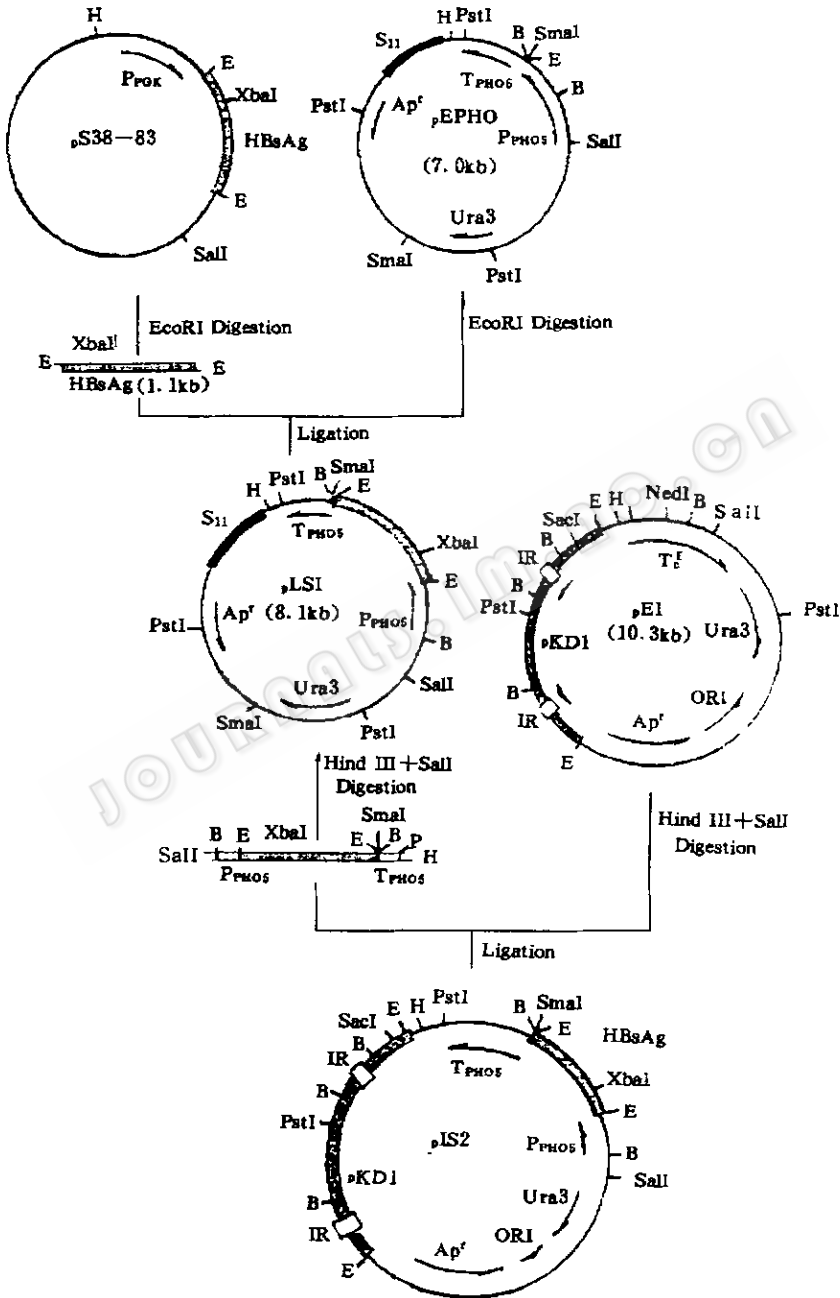


图 1 重组质粒 pLS1 和 pLS2 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pLS1 and pLS2

质粒 pE1 是带有 pKDi 完整序列的载体克隆, 它在细胞中具有很高的稳定性, 为了比较稳定性不同的表达载体对表达 HBsAg 的影响, 我们将重组质粒 pLS1 用 HindIII 和 SalI 双酶切, 取得带有具 PHO5 启动子、HBsAg 基因和 PHO5 终止子的完整表达单元的 DNA 片段。然后将其插入 pE1 的 HindIII 和 SalI 的位点之间, 重组质粒经 HindIII 和 SalI 双酶切应得到 2.3kb 和 9.6kb 两条带 (图 3), 这个质粒被定名为 pLS2。

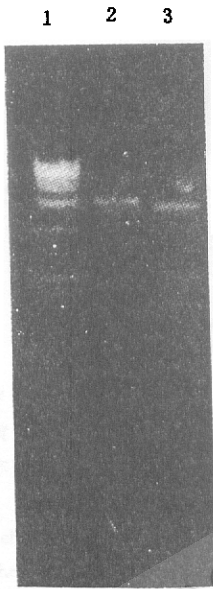


图 2 重组质粒 pLS1 和 pLS1-0 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of plasmid pLS1 and pLS1-0 digests

Lane 1: λ /HindIII marker

Lane 2: pLS1 digested by XbaI and SalI

Lane 3: pLS1-0 digested by XbaI and SalI

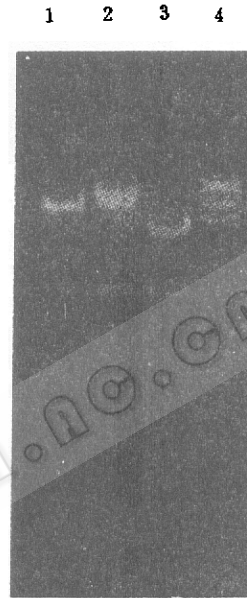


图 3 重组质粒 pLS2 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of plasmid pLS2 digests

Lane 1: pE1 digested by HindIII and SalI

Lane 2: pLS2 digested by HindIII and SalI

Lane 3: pLS1 digested by HindIII and SalI

Lane 4: λ /HindIII marker

2.2 重组质粒的转化以及 HBsAg 的表达

将重组质粒 pLS1 和 pLS1-0 分别转化菌株 CXJ1-7A, 用 URA3 表型选择转化子, 转化子 CXJ1-7A/pLS1 和 CXJ1-7A/pLS1-0 分别在高磷和低磷条件下培养。测定 OD₆₀₀ 说明两者在高磷和低磷条件下的生长情况相差不多, 都在 30 左右。菌体离心后制备抽提物, 并用酶标试剂盒进行不同条件下表达量的测定。图 4 结果表明, CXJ1-7A/pLS1 在高磷和低磷条件下均有明显表达, 且在低磷条件下, 表达量明显提高。但是对于 CXJ1-7A/pLS1-0, 由于插入的方向相反, 在高磷和低磷条件下均无表达。

与此同时, 我们还将重组质粒 pLS2 以 URA3 为选择转化 *K. lactis* 菌株 MW98-8C。转化子 MW98-8C/pLS2 也分别在高磷和低磷条件下培养。测定 OD₆₀₀ 说明两者的生长情况差不多, 也都在 30 左右, 菌株离心后制备抽提物, 并用酶标试剂盒测定表达量。图 4 结果表明 MW98-8C/pLS2 在高磷和低磷条件下均有明显表达, 且在低磷条件

下表达量明显提高。将 MW98-8C/pLS2 的低磷条件的样品进行对半 (1/2) 梯度稀释, 并用目测进行比较, 稀释 2⁹ 样品仍呈阳性, 而且可见 MW98-8C/pLS2 的低磷条件的表达量要比 CXJ1-7A/pLS1 的低磷条件的表达量提高 4~8 倍。

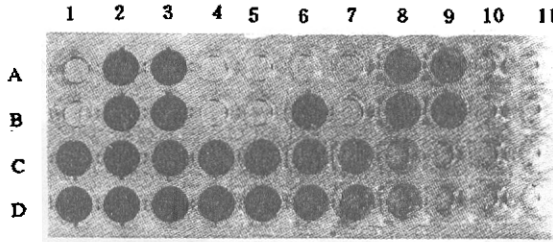


图4 CXJ1-7A/pLS1 和 MW98-8C/pLS2 表达 HBsAg 的 ELISA 分析

Fig. 4 The ELISA analysis of HBsAg expressed by CXJ1-7A/pLS1 and MW98-8C/pLS2

A6: Negative control B6: Positive control C11, D11: Blanked
 A7, B7: CXJ1-7A A8, B8: CXJ1-7A/pLS1 in High-Pi condition
 A9, B9: CXJ1-7A/pLS1 in Low-Pi condition
 A10, B10: CXJ1-7A/pLS1-0 in High-Pi condition
 A11, B11: CXJ1-7A/pLS1-0 in Low-Pi condition
 A1, B1: MW98-8C A2, B2: MW98-8C/pLS2 in High-Pi condition
 A3, B3: MW98-8C/pLS2 in Low-Pi condition
 C1-C10, D1-D10: The sample of MW98-8C/pLS2 in Low-Pi condition was serially diluted to 1/2 concentration

2.3 重组质粒在酵母细胞中的稳定性

为了测定质粒在细胞中的稳定性, 我们先将工程菌 CXJ1-7A/pLS1 和 MW98-8C/pLS2 在完全培养基 YEPD 中生长 24h 后 (约繁殖 10 代), 稀释涂布到 YEPD 平板上, 长出菌落后, 影响至缺尿嘧啶的 SD 培养基, 经培养 48h 后, CXJ1-7A/pLS1 只有 27% 的菌落生长, 也就是 CXJ1-7A/pLS1 在非选择性条件下繁殖约 10 代, 有 73% 细胞丢失了质粒, 稳定性较差。与此相反, MW98-8C/pLS2 却有 70% 菌落生长, 也就是说在相同条件下 MW98-8C/pLS2 只有 30% 细胞丢失质粒, 说明后者与前者在质粒稳定性上有明显提高。

3 讨论

基因工程的目标是要使工程菌细胞产生尽量多的外源基因产物。但是过多表达的外源基因产物必定会导致对细胞正常代谢的抑制, 从而影响工程菌的生长。为了避免这种现象, 通常采用调控型的启动子来控制外源基因的表达。在工程菌生长到一定浓度时, 改变一定的条件而将指导外源基因表达的启动子调整到激活状态, 使外源基因表达, 这样就可以得到最大限度的外源基因表达产物。本文中我们采用以无机磷浓度调节的 PHO5 启动子来指导 HBsAg 基因。从结果可见, 在低磷条件下要比高磷时表达更多的产物, 说明启动子有调节作用。但是结果也表明在高磷条件下也有相当量的 HBsAg 表达。这很可能是由于我们在高磷培养条件下未补加无机磷, 培养时间过长, 培养基中的

无机磷会下降而使基因表达过早地处于去阻遏状态。这样就不能充分发挥调控型启动子的作用。如果我们能在高磷培养阶段经常补加无机磷, 延长工程菌的生长阶段, 在达到更高的培养密度后再转入低磷培养, 或许可以得到更高的表达水平。在我们构建的表达载体 pLS1 和 pLS2 中指导 HBsAg 基因表达采用了相同的表达元件, 但是由 pLS2 得到的工程菌表达 HBsAg 的量要比由 pLS1 得到的工程菌表达的高得多。分析表达载体 pLS2 的结构, 它包含有完善的 pKD1 序列, 具有维持质粒稳定性的全部元件, 因此这个质粒在细胞中应该具有较高的稳定性。对两个工程菌在非选择条件下生长, 质粒稳定性的测定证实, 在酵母细胞中 pLS2 确实比 pLS1 更稳定。因此我们认为工程菌 MW98-8C/pLS2 在表达 HBsAg 上高于工程菌 CXJ1-7A/pLS1, 很可能是和 pLS2 在细胞中的高稳定性有密切的关系。

从 ELISA 分析可知乳酸克鲁维酵母表达 HBsAg 的水平已明显高于我们以前在酿酒酵母中的水平。如果能配合发酵条件的优化, 可望达到更高的水平, 值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] McAleer W J, Buynak E B, Maigetter R Z *et al.* Nature, 1984, 307: 178~180.
- [2] 何葆光、黄培仁、李育阳等, 生物工程学报, 1985, 1 (1): 20~28.
- [3] 沈绿萍、李育阳、王二力等, 生物化学与生物物理学报, 1984, 16 (3): 320~323.
- [4] Cregg J M, Tschopp J F, Stillman C, Biotechnology, 1987, 5: 479~485.
- [5] Fleer R, Yeh P, Amella N *et al.* Biotechnology, 1991, 9: 968~975.
- [6] Fleer R, Chen X J, Amella N *et al.* Gene, 1991, 107: 285~295.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T M, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edi. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.
- [8] Ito Hisao, Murata K, Kimura A *et al.* J Bacterial, 1983, 153: 163~168.

The Expression of HBsAg Gene in *Kluyveromyces lactis*

Li Song Gao Boyu Li Yuyang

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract HBsAg gene was inserted into pEPHO, which is the expression vector of *K. lactis* with regulatory promoter PHO5. The resulted plasmid pLS1 was transformed into strain *K. lactis* CXJ1-7A. The expression level of HBsAg shown by ELISA was regulated by the concentration of Pi. To improve the expression of HBsAg, the expression unit of HBsAg in pLS1 was then inserted into pE1, which is an expression vector with the whole sequence of plasmid pKD1. The second recombinant plasmid, pLS2, was transformed into *K. lactis* MW98-8C. By comparison MW98-8C/pLS2 with CXJ1-7A/pLS1, we found that the stability of MW98-8C/pLS2 was improved and its expression level of HBsAg was increased 4~8 folds.

Key words *Kluyveromyces lactis*, HBsAg, gene expression, gene regulation