

乙肝表面抗原结合蛋白 SBP 在毕赤酵母中的表达纯化及功能鉴定

庞云, 龚立, 彭思扬, 朱乃硕

复旦大学生命科学学院 生物医学研究院, 上海 200433

摘要: 乙肝表面抗原结合蛋白(HBsAg binding protein, SBP)是本实验室发现的一种人源蛋白, 该蛋白与人乙型肝炎病毒 HBV 表面抗原 HBsAg 存在特异性的结合能力。此前的研究证实 SBP 具有增强乙肝疫苗免疫效果的作用。为进一步研究该蛋白的生理功能和作用机制, 利用毕赤酵母表达系统进行了 SBP 的表达菌株构建, 筛选得到了 SBP 的高效表达菌株。发酵产物经过分离纯化, 最终得到了大量高纯度的真核来源的目的蛋白。通过 SDS-PAGE、高效液相色谱、Western blotting 和质谱鉴定, 证实所得到的蛋白具有较高的纯度和完整性。通过 ELISA 方法初步证实了其与乙肝表面抗原具有较好的结合能力。该研究为进一步进行 SBP 的体内外功能研究及免疫增效研究打下了基础。

关键词: 毕赤酵母, 乙肝表面抗原结合蛋白, 表达与纯化

Expression, purification and characterization of HbsAg binding protein in *Pichia pastoris*

Yun Pang, Li Gong, Siyang Peng, and Naishuo Zhu

School of Life Science, Institutes of Biomedical Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Human hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) binding protein(SBP) shows a specific binding ability to HBV surface antigen HBsAg. Previous work proved an ability of SBP to enhance the immune response of HBsAg vaccine. To investigate the function and mechanism of this protein, we constructed SBP-expression strains with *Pichia pastoris* expression system. We screened these strains and have got an expression strain with high protein expression quantity. Fermentation product was collected and purified to gain a large amount of purified protein. Identification of purified SBP with SDS-PAGE, High performance liquid chromatography, Western blotting and mass spectrometry suggested that the protein was highly purified and with a good integrity. ELISA test of purified SBP showed a significant binding ability to HBsAg, suggesting a good protein activity. This work offers a solid foundation to the research of SBP function and mechanism of immune enhancement.

Keywords: *Pichia pastoris*, HBsAg binding protein, expression and purification

Received: May 22, 2009; **Accepted:** July 17, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30571650, 30471512), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2006AA02Z462).

Corresponding author: Naishuo Zhu. Tel/ Fax: +86-21-65641215; E-mail: nszhu@sina.com

国家自然科学基金项目(Nos. 30571650, 30471512), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA02Z462)资助。

乙型病毒性肝炎(Hepatitis B, HB)是一种严重危害人类健康的传染性疾病,全世界约有 3.5 亿 HBV 慢性携带者^[1],我国更是乙肝高流行区,约有 1.2 亿携带者^[2],接种乙肝疫苗是预防感染乙型肝炎和降低乙肝病毒携带率的最有效的措施^[3]。但是,乙肝疫苗的免疫效果个体差异很大,正常人群中 5%~10%的个体在按标准程序接种乙肝疫苗后不能产生足够的抗体以抵抗乙肝病毒的感染^[4]。因此,寻找一种能够有效增强乙肝疫苗免疫原性的分子来强化机体的应答反应具有非常重要的现实意义。

HBV 外膜蛋白是识别人肝细胞质膜可能受体的重要分子,它决定了 HBV 对宿主细胞的靶向和最初的侵染过程^[4]。本实验室在前期工作中,以乙肝表面抗原(Hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)为探针,通过印迹免疫分析技术从人肝 cDNA 噬菌体表达库中筛选出 1 株编码乙肝表面抗原结合蛋白的 cDNA 克隆。该 cDNA 具有独立的开放阅读框架,编码 1 个由 344 个氨基酸残基构成的可溶性蛋白分子,蛋白同源性分析表明该蛋白与免疫球蛋白重链具有高度同源性,应当属于免疫球蛋白超家族成员,暂命名为乙肝病毒表面抗原结合蛋白(HBV surface antigen binding protein, SBP, GenBank Access No. AY570731)^[5]。

前期的研究工作中,在原核蛋白表达系统中成功表达了该蛋白。Western blotting 和 ELISA 实验表明原核 SBP 蛋白具有与 HBsAg 特异性结合的能力;流式细胞实验证实,基因工程表达的 HBV-SBP 蛋白可以显著增强肝癌细胞株 HepG2 对乙肝表面抗原的亲合力^[5];将乙肝疫苗和 SBP 一起注射小鼠发现其诱导产生 HBsAg 特异性抗体的水平较对照明显提高,证实其具有针对乙肝疫苗的免疫增效作用^[6]。

然而,SBP 是一个人源蛋白。原核表达来源的 SBP 不可避免地与其天然形式存在着差异,包括高级结构的差异和氨基酸残基的糖基化修饰等。因此,要进一步研究 SBP 的功能和作用机理,必须获得正确折叠和糖基化的真核来源的 SBP。

真核生物毕赤酵母(*Pichia pastoris*)近年来被广泛应用于蛋白质表达和纯化,具有蛋白质的糖基化修饰能力,比原核表达的蛋白在结构上更为接近天然构象。并且表达量高,遗传稳定,操作方便,是理

想的真核蛋白表达系统。目前毕赤酵母已经广泛应用于各种蛋白的生物工程生产,有着很好的应用前景^[7]。因此,结合本室课题的研究,希望利用毕赤酵母进行 SBP 的真核表达,为进一步研究其功能打下基础,同时也为今后可能对 SBP 进行大规模工业化生产和应用提供前期准备。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 DH5 α 为本室保存;*P. pastoris* 表达菌株 GS115,表达载体 pPICZ α A 购于 Invitrogen 公司。克隆含 SBP 全长序列的载体 pBV220-SBP 由本室构建并保存。

1.2 主要试剂

培养基:低盐 LB(0.5% yeast extract, 1.0% Tryptone, 0.5% NaCl, 1.5% Agar 用于制备平板, W/V), YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, W/V), BMGY(1.18% KH₂PO₄, 0.3% K₂HPO₄·3H₂O, 1.34% YNB, 4×10⁻⁵%生物素 biotin, 1% 酵母膏 yeast extract, 2%蛋白胨 peptone 及 2% 甘油, W/V), BMMY(1.18% KH₂PO₄, 0.3% K₂HPO₄·3H₂O, 1.34% YNB, 4×10⁻⁵%生物素 biotin, 1% 酵母膏 yeast extract, 2%蛋白胨 peptone 及 0.5%甲醇, W/V)。

酵母膏(Yeast extract)及蛋白胨(Peptone)购于上海生工生物工程有限公司;无氨基酸酵母氮源(YNB)购于 BD 公司;质粒小量抽提,PCR 产物回收, DNA 凝胶回收试剂盒购于 Axygen 公司;T4 DNA 连接酶, PrimeStar DNA 聚合酶, DL2000 DNA marker, 蛋白质低分子量 marker, 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Not* I 购于 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶及 dNTP 购于上海申能博彩有限公司;小鼠抗 SBP 单克隆抗体由本室制备并保存^[5];HRP 标记的羊抗鼠 IgG(二抗)购于北京鼎国生物技术有限公司;超滤杯及超滤膜购自 Millipore 公司;ProteinA 预装亲和层析柱购于 GE 公司;Zeocin 购自 Invitrogen 公司;PNGaseF 去糖基化酶购自 NEB 公司。

1.3 方法

1.3.1 pPIC-SBP 表达载体的构建

以 pBV220-SBP 载体为模板,利用引物 SBP-F (5'-CAG CTC GAG AAA AGA ATG GAC GTC TGG

GGC CAA GG-3')和 SBP-R(5'-TGC GCG GCC GCT CAT CAT TTA CCC GGG GAC AGG GAG AG-3')将 SBP 全长序列扩增下来,并在两端分别引入 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点(下划线部分)。用 *Xho* I 和 *Not* I 酶切后,克隆到毕赤酵母表达载体 pPICZ α A,得到的质粒经 Invitrogen 公司测序正确后,命名为 pPIC-SBP。

1.3.2 毕赤酵母表达菌株的构建

重组 pPIC-SBP 表达载体经 20 mL 含有 Zeocin (25 μ g/mL)的低盐 LB 培养并抽提质粒,并用乙醇沉淀法浓缩至 500 ng/ μ L 以上。将质粒浓缩液进行 *Dra* I 酶切线性化后,回收质粒并再次用乙醇沉淀法浓缩,使终浓度达到 1 μ g/ μ L 以上。

按 *P. pastoris* 使用手册(Invitrogen)制备酵母菌株 GS115 电转感受态细胞,80 μ L 酵母感受态细胞与 5~10 μ g 线性化重组质粒混合后,在电转仪上进行电转化。电转参数:电压 1500 V,电阻 200 Ω ,电容 25 μ F,转化菌液涂布于含 100 μ g/mL 的 Zeocin 的 YPDS 平板(YPD 中加入 1 mol/L sorbitol),于 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 1~2 d,以使其长出抗性克隆。

挑取抗性克隆,采用玻璃珠和酚/氯仿法抽提酵母基因组,以基因组为模板,利用前述的 SBP-F/R 引物进行 PCR 筛选成功整合的阳性克隆。将挑取得到的阳性克隆保种,准备进行表达分析鉴定。

1.3.3 表达菌株的表达量分析及稳定高表达株筛选

将上述挑出的阳性菌株克隆空毕赤酵母菌株 GS115 接种于 2 mL BMGY 培养基,30 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 24 h。然后将菌液转接于 50 mL BMGY 培养基,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h 至菌浓饱和(OD_{600} 在 16 以上)。离心收集菌体,重悬于 15 mL BMMY 培养基,开始诱导培养,每 24 h 补加甲醇 75 μ L,诱导 96 h 后结束诱导,收集上清。将阳性克隆菌株及 GS-pPIC 菌株经诱导后的表达上清进行 SDS-PAGE 分析。

对 80~100 个阳性克隆进行蛋白表达诱导及 SDS-PAGE 检测,并通过凝胶扫描系统对转化子的目的蛋白水平进行分析,筛选出表达水平较高的转化子作为稳定高表达菌株,命名为 GS-pPIC-SBP。

1.3.4 表达菌株 GS-pPIC-SBP 的表达条件优化

为优化蛋白表达水平,本实验中设置的诱导条件包括,诱导剂甲醇浓度梯度:0.5%、1.0%、1.5%、

2.0%、3.0%及 4.0%;诱导时间梯度:12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、96 h、120 h;培养基 pH 值梯度:6.0、7.0、8.0;蛋白酶抑制剂 EDTA 梯度:0、1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L、10 mmol/L;蛋白酶抑制剂 Casamino Acid 和抗生素(卡那霉素和氨苄青霉素)的添加与不添加。

将 GS-pPIC 菌株在不同诱导条件下进行诱导,收集各条件下的表达上清进行 SDS-PAGE 电泳分析,每孔上样 10 μ L 上清液,电泳结束后进行银染显色,并使用凝胶扫描系统以蛋白分子量 Marker 的条带为基准值 1.0 对不同条件下的 SBP 表达水平进行分析。

1.3.5 重组 SBP 的分离纯化

诱导 72 h 后,收集发酵上清液,0.22 μ m 过滤除菌;过滤后的上清液用截留分子量为 10 kD 的超滤膜超滤浓缩 5~10 倍;并用超滤的方法将浓缩液替换为 pH 7.0 的 PBS 溶液。

由于 SBP 与人免疫球蛋白重链具有高度同源性,因此认为该蛋白可以与金黄色葡萄球菌 A 蛋白(ProteinA)特异结合。为此首先利用 ELISA 方法对 SBP 与 ProteinA 的结合能力进行了初步分析。方法如下:以 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释 ProteinA 蛋白溶液为 1 μ g/mL,每孔 100 μ L,每样品 3 个重复,4 $^{\circ}$ C 过夜包被;PBST 洗板 5 次;用溶解于 PBST 的 5% 脱脂奶粉封闭,300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBST 洗板 5 次;加入 SBP 表达上清液,空载体表达上清液各 100 μ L;PBST 洗板 5 次;用 PBST 1:6000 稀释 SBP 单抗,每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBST 洗板 5 次;用 PBST 1:5000 稀释 HRP-羊抗鼠二抗,每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBST 洗板 5 次;每孔加 100 μ L 显色液,室温避光,显色 0.5 h;每孔中加入 50 μ L 2 mol/L 硫酸终止反应,测量 OD_{492} ,作图比较 SBP 表达上清与空载体菌株表达上清 OD 值的差异。

利用 SBP 能够与 ProteinA 结合的这一特性,利用 ProteinA 亲和纯化柱对上述发酵产物进行了亲和纯化,步骤如下:将处理好的蛋白溶液上样于用 PBS (pH 7.0)预平衡过的 ProteinA 亲和纯化柱,柱体积为 5 mL,流速 2.5 mL/min;上样完毕后,再用 PBS (pH 7.0)对柱进行洗涤,流速 2.5 mL/min,直至 UV280 至基线位置;最后用 pH 为 3.5 的 0.1 mol/L

的柠檬酸钠缓冲液进行目的蛋白的洗脱, 流速 1.0~2.0 mL/min, 手动控制峰宽, 洗脱收集液中立即按 10:1 比例加入 pH 为 9.0 的 Tris-Cl 缓冲液使洗脱液恢复中性环境。

1.3.6 重组蛋白表达量分析及纯化得率的计算

将 GS-pPIC-SBP 及 GS115 经诱导 72 h 后的表达上清 19 mL 分别装入透析袋, 将 PEG6000 和 PEG20000 以 1:1 混合并覆盖于透析袋外表面上, 对透析袋内表达液进行 4°C 过夜浓缩, 至终体积为初始体积的 1/5 倍左右后取出, 采用 Bradford 蛋白定量法分别测定浓缩液中的总蛋白浓度, 并计算得到诱导上清中总蛋白浓度。具体方法如下。

将 GS-pPIC-SBP 和 GS115 的诱导表达上清液分别浓缩 5 倍左右后用 Bradford 法测定浓缩液中总蛋白浓度, 除以浓缩倍数, 即为上清原液中的总蛋白浓度。然后按照下述公式计算重组蛋白浓度:

重组蛋白浓度=GS-pPIC-SBP 上清总蛋白浓度- GS115 上清总蛋白浓度。

1.3.7 重组 SBP 的 Western blotting 鉴定

将纯化定量后的 SBP 蛋白取 10 ng 进行 SDS-PAGE 电泳, 经 200 mA 2 h 电转于 NC 膜后, 采用本实验室制备的小鼠抗 SBP 单抗及 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(二抗)进行 Western blotting 分析。

1.3.8 重组 SBP 的 HPLC 分析

将纯化后的 SBP 取 12 μ L(2 mg/mL)上样于 C18 疏水 HPLC 层析柱, 由仪器自动分析, 输出色谱图, 计算纯度。

1.3.9 重组 SBP 的质谱分析

将纯化后的 SBP 取 10 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳后考马斯亮蓝染色, 切下主蛋白条带, 送复旦大学生物医学研究院质谱分析室进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF-MS)分析。

1.3.10 重组 SBP 与 HBsAg 结合能力的 ELISA 分析

以 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释 HBsAg 为 1 μ g/mL, 每孔 100 μ L 每样品 3 个副孔铺板包被, 4°C 过夜; PBST 洗板 5 次; 用溶解于 PBST 的 5% 脱脂奶粉封闭, 300 μ L/孔, 37°C 孵育 2 h; PBST 洗板 5 次; 加入 PBST 稀释的 SBP, 设 4 个浓度梯度 1、2、5、10 mg/mL,

每孔加 100 μ L, 37°C 孵育 2 h, 同时以加入 100 μ L 不含 SBP 的孔作为阴性对照; PBST 洗板 5 次; 用 PBST 1:4000 稀释 HRP 标记的抗人 IgG 二抗, 每孔加 100 μ L, 37°C 孵育 1 h; PBST 洗板 5 次; 每孔加 100 μ L 显色液, 室温避光, 显色 0.5 h; 每孔中加入 50 μ L 2 mol/L 硫酸终止反应, 测量 OD_{492} ; 作图比较不同 SBP 浓度下 OD 值的变化情况。

2 结果

2.1 pPIC-SBP 表达载体的构建及鉴定

以 pBV220-SBP 为模板 PCR 扩增 SBP 编码基因并克隆到 pPICZ α A 载体, 阳性克隆经测序验证无误, 将该表达质粒命名为 pPIC-SBP。

2.2 毕赤酵母阳性转化子鉴定

采用 SBP-F/R 引物, 以抽提得到的毕赤酵母重组子基因组为模板进行 PCR, 并以 pBV220-SBP 质粒作为阳性对照, 结果如图 1 所示, 得到大小与 SBP 大小相符的基因片段, 证实 SBP 已经成功转入 *P. pastoris* 菌株并整合于酵母染色体。

2.3 重组 SBP 的表达检测

将 GS-pPIC-SBP 及 GS115 经诱导 72 h 后的表达上清进行 SDS-PAGE, 电泳结束后进行银染显色, 结果如图 2。可以看出, GS-pPIC-SBP 经诱导后分泌出大小约为 38 kD 左右的蛋白, 大小与 SBP 理论大小相符, 且该蛋白在 GS-pPIC 经诱导后的表达上清中不存在。由此可以推断出, 该蛋白的表达是由于目的片段 SBP 的引入而产生, 即为毕赤酵母所分泌的重组 SBP。

2.4 SBP 高表达菌株的筛选

将候选菌株 96 h 诱导发酵后的发酵上清液取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 分析, 银染显色, 目测蛋白表达量, 保留较高表达量的菌株, 弃去表达量较低的菌株(图 3)。以该方法筛选 80~100 个候选菌株, 最终选定表达量最高的一株菌株为最终的工程菌, 命名为 GS-pPIC-SBP。

2.5 GS-pPIC-SBP 的表达条件优化分析

按照方法 1.3.4 所述将 GS-pPIC 菌株在不同诱导条件下进行诱导, 对不同条件下的 SBP 表达水平进行分析。

甲醇浓度的优化(图 4A)实验结果显示, 当诱导剂甲醇浓度在 1.0%~1.5%之间时, 蛋白表达水平较甲醇浓度为 0.5%时有所提高; 但当甲醇浓度继续升高至 2.0%以上时, 蛋白表达水平因菌体受甲醇毒性作用状态不佳而下降。

抗生素 Kan 和 Amp 的添加与否, 对蛋白质的表达水平影响并不明显(图 4B)。蛋白酶抑制剂 EDTA 浓度优化(图 4C)结果显示, EDTA 的添加在一定程度上可以起到减缓蛋白降解, 稳定蛋白表达水平的作用, 但当其浓度超过 2 mmol/L 时, 此作用不再因其浓度的增加而增强。

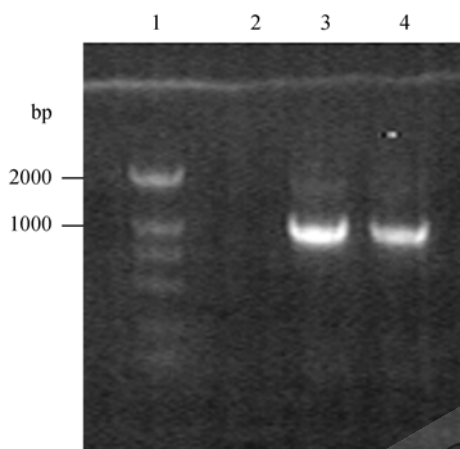


图 1 PCR 鉴定毕赤酵母阳性转化子
Fig. 1 Identification of GS-pPIC-SBP by PCR. 1: DL2000 DNA marker; 2: negative control; 3: pPIC-SBP transformants; 4: pBV220-SBP, positive control.

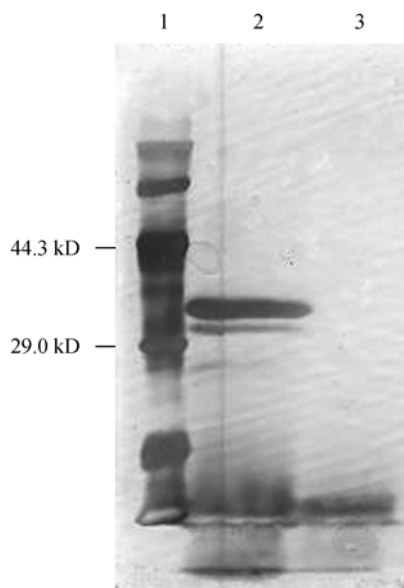


图 2 SDS-PAGE 鉴定发酵上清中 SBP 的表达
Fig. 2 Identification of SBP expression by SDS-PAGE analysis. 1: protein marker; 2: supernatant of GS-pPIC-SBP; 3: supernatant of GS115, negative control.

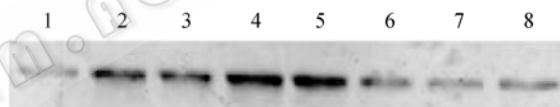


图 3 SDS-PAGE 法鉴定高表达菌株
Fig. 3 Identification of clone with high expression level. 1-8: SDS-PAGE of the supernatant of 8 strains, the expressing quantity of strains 4 and 5 are higher.

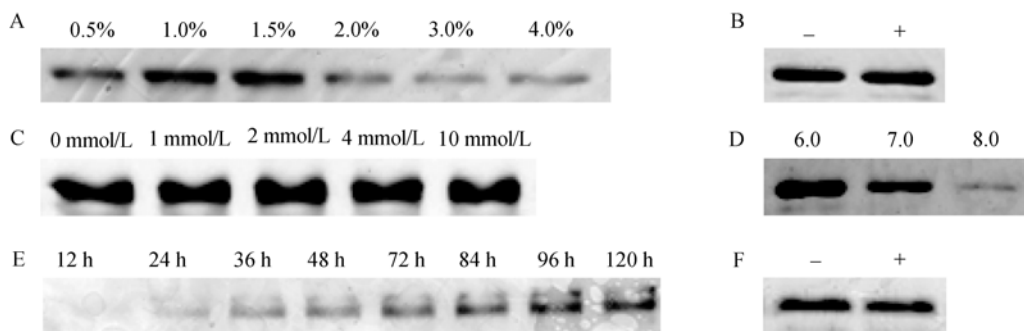


图 4 SDS-PAGE 分析确定蛋白表达最佳条件

Fig. 4 Optimization of SBP expressing conditions based on scan by SDS-PAGE and gel image analysis system. SDS-PAGE analysis of supernatant in different fermentation conditions. (A) Different MeOH concentrations(%). (B) Add(+) or not add(-) antibiotics (Kanamycin, Ampicillin). (C) Different EDTA concentrations (mmol/L). (D) pH of culture medium. (E) Time (hours) of fermentation. (F) Add (+) or not add(-) casamino acid.

培养液 pH 值优化(图 4D)实验结果显示, 当培养基 pH 处于微酸性状态(pH 6.0)时, 蛋白表达水平最佳。诱导时间的优化(图 4E)结果显示自诱导剂加入开始, 24 h 后开始有明显的目的蛋白分泌表达, 随时间推移表达水平逐渐增加, 并于 96 h 时达到最佳水平。蛋白酶抑制剂 Casamino Acid 的添加与否, 对蛋白质的表达水平影响不明显(图 4F), 故该方法不适用于本实验。

2.6 重组 SBP 具有与 ProteinA 结合的能力

用 ELISA 法进行 SBP 与 ProteinA 体外结合能力的初步检测, 检测结果如图 5 所示。表明构建的表达菌株发酵上清相对于 GS115 发酵上清显示了更强的与 ProteinA 的结合能力。表明 SBP 能够与 ProteinA 结合。

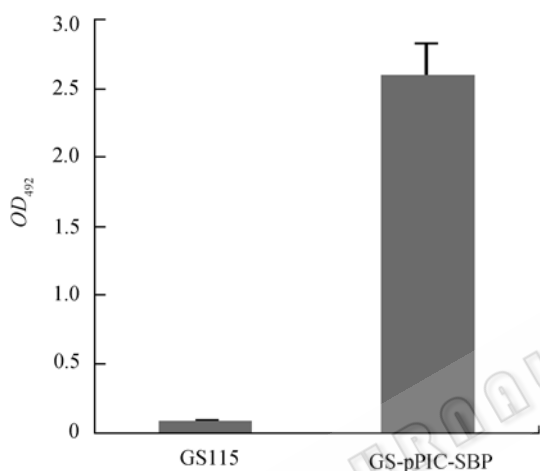


图 5 重组 SBP 与 ProteinA 亲和能力的 ELISA 检测
Fig. 5 Examination of affinity between recombinant SBP and ProteinA. GS115: fermentation supernatant of GS115 strain, negative control; GS-pPIC-SBP: fermentation supernatant of SBP expressing strain.

2.7 SBP 的纯化和纯度分析

将 GS-pPIC-SBP 表达培养液经超滤及 ProteinA 柱一步法亲和层析纯化后, 经 HPLC 分析纯度达到 95%以上(图 6)。经过 Western blotting 分析, 用本实验室制备的 SBP 特异性单克隆抗体验证了所表达的蛋白为 SBP(图 7)。在随后进行的质谱分析中蛋白的结构也得到最终证实。

2.8 目的蛋白表达量的定量分析

将 GS-pPIC-SBP 和 GS115 分别进行诱导表达后, 上清液中蛋白浓度按方法 1.3.6 所述进行定量和计算, 计算得出重组 SBP 在毕赤酵母中的表达量约为 21.5 mg/L。

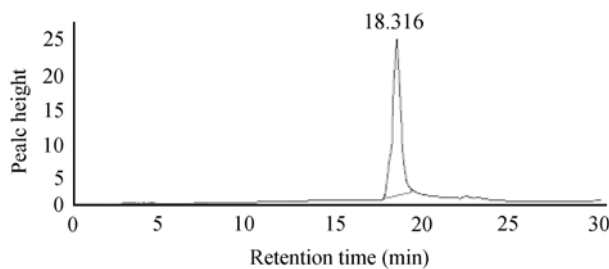


图 6 HPLC 法分析重组 SBP 纯度
Fig. 6 Purity test of recombinant SBP by HPLC.

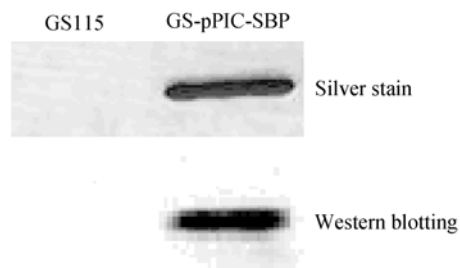


图 7 纯化后 SBP 的 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定
Fig. 7 SDS-PAGE and Western blotting analysis of purified SBP.

每 1 L GS-pPIC-SBP 诱导上清经 1.2.5 中所述方法纯化可得浓度为 2.1 mg/mL(Bradford 法测定)的 SBP 溶液约 7.5 mL, 故纯化得率为 15.5 mg/L, 纯化效率为 72.1%。

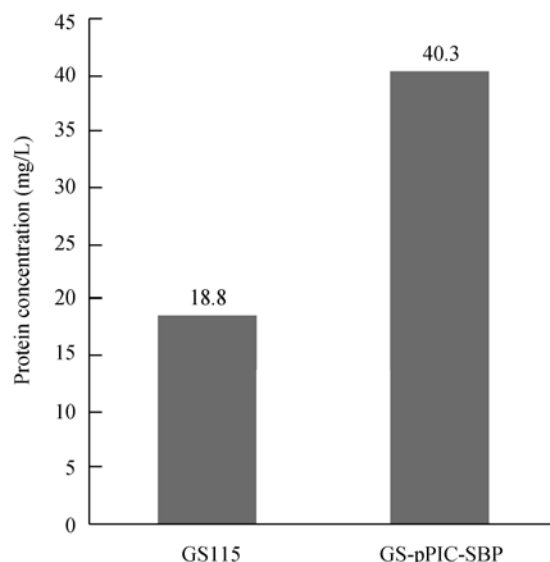


图 8 Bradford 法测定 GS-pPIC-SBP 及 GS-pPIC 诱导上清中总蛋白浓度
Fig. 8 Total protein concentration of supernatants after induction.

2.9 目的蛋白 SBP 具有与 HBsAg 的结合能力

通过 ELISA 方法对 SBP 与 HBsAg 的结合能力进行了分析(图 9), 初步表明 SBP 能够与 HBsAg 结合, 具有生物学活性。

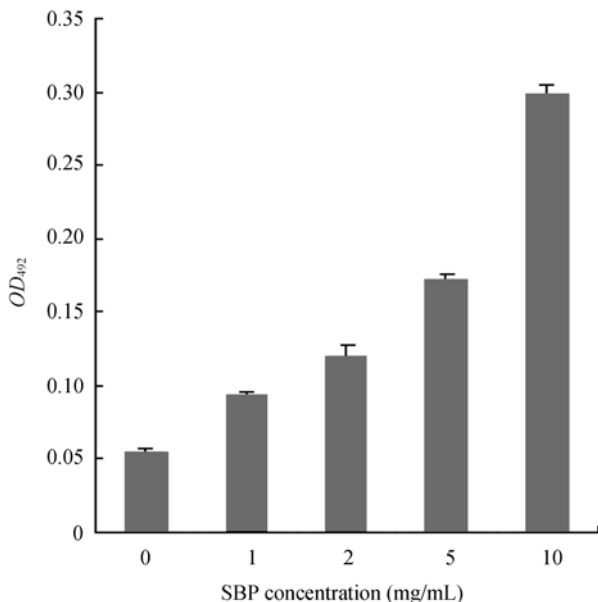


图 9 ELISA 法测定重组 SBP 与 HBsAg 的结合能力

Fig. 9 Examination of affinity between recombinant SBP and HBsAg by ELISA.

3 讨论

本实验成功地将 SBP 构建到带有分泌表达信号的毕赤酵母表达载体中, 转化 *P. pastoris* 菌株 GS115 后, 得到了摇瓶表达量达 21.5 mg/L 的稳定表达株。通过对目的蛋白的物理化学性质进行了充分的了解, 采取了超滤和亲和层析两步纯化的手段初步得到了纯度在 95% 以上的重组 SBP, 纯化得率约为 15.5 mg/L, 该方法表达的 SBP 生物学活性也已经在本研究得到了初步的证明。本研究为今后对其疫苗增效活性的研究提供了重要的前期基础, 也为今后投入规模发酵表达, 生产 SBP 提供了可参考的实验室数据。

利用真核生物毕赤酵母(*Pichia pastoris*)进行基因工程表达具有以下独特的优势: 含有特有的强有力的醇氧化酶基因启动子, 用甲醇可严格地调控外源基因的表达; 表达水平高, 既可在胞内表达, 又可分泌型表达, 且其自身胞外蛋白不多, 有利于目

的蛋白分离纯化; 外源蛋白基因整合到 *P. pastoris* 染色体上, 随染色体复制而复制, 基因遗传稳定; 发酵工艺成熟, 培养成本低, 容易进行生产工艺放大等^[6-8], 一些 *P. pastoris* 表达的外源蛋白药物已经成功进入临床实验阶段^[9], 具有人源的糖基化修饰的毕赤酵母及酿酒酵母菌株也已经通过基因工程改造的方法出来^[10-11]。今后有望通过 *P. pastoris* 表达体系, 表达并生产更接近人源蛋白构象的蛋白产品用于医药领域。

在研究的开展过程中, 也发现一些有待解决的问题, 如目的蛋白降解问题: 由于酵母生长较为缓慢, 诱导蛋白表达时间长达 72~96 h, 而诱导温度 30°C 也是各种生物酶活性较高的温度, 因此, 在诱导表达的同时就存在目的蛋白的降解问题。如果能够减少或消除 *P. pastoris* 菌株分泌到胞外的蛋白酶, 降解问题可能会得到缓解或解决。复旦大学吕红课题组已经成功构建了基因敲除胞外分泌蛋白酶 YAP3 的 *P. pastoris* 菌株, 并证实可以有效地降低外源蛋白 tHSA 在 *P. pastoris* 中表达的降解率^[12]。在今后的研究中, 可以尝试通过将 SBP 构建到类似菌株中以优化 SBP 工程菌株。另外, 还可以尝试通过诱导条件的控制, 如温度和一些蛋白酶抑制剂的添加等, 使蛋白的降解问题得到缓解, 这些是今后工作开展的方向。

以本研究为基础, 已经可以获得纯度较高的酵母表达 SBP, 在今后的研究方向上, 将进一步对 SBP 的表达条件进行优化控制, 对体内外的生物学功能等方面进行探索, 为其实际应用于乙型肝炎的防治进行更深入的研究。

REFERENCES

- [1] Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol*, 2005, **34**(Suppl.1): S1-S3.
- [2] Parkin DM, Pisani P, Munoz N, et al. The global health burden of infection associated cancers. *Cancer Surv*, 1999, **33**: 5-33.
- [3] The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization, 2002: 74-75.
- [4] Sophie O, Xuan N, Julien B. Expression of hepatitis B surface antigen major subtypes in *Pichia pastoris* and

purification for *in vitro* diagnosis. *Protein Expr Purif*, 2007, **56**(2): 177-188.

[5] Chen YY, Zhu NS. Screening, expression and characterization of a novel protein binding to Hepatitis B surface antigen. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2005, **21**(1): 53-60.
陈媛媛, 朱乃硕. 一种新的乙型肝炎病毒表面抗原结合蛋白的筛选, 表达及其生物学活性的初步研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, **21**(1): 53-60.

[6] Li HQ, Zhu NS. Preparation of the HBV Surface Antigen Binding Protein and the functional study. *J Fudan Univ Natur Sci*, 2007, **46**(3): 390-393.
李华青, 朱乃硕. 重组乙肝表面抗原结合蛋白(SBP)的制备及功能研究. *复旦学报(自然科学版)*, 2007, **46**(3): 390-393.

[7] Dou WF, Lei JY, Zhang LF *et al.* Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagons-like-1 peptide mutants in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2008, **61**(1): 45-49.

[8] Anup KU, Da le EE. Characterization of detergent purified recombinant rat liver monoamine oxidase B expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2008, **59**(2): 349-356.

[9] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbil Rev*, 2000, **24**(1): 45-66.

[10] Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, *et al.* *In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 2639-2646.

[11] Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, *et al.* Production of human compatible high mannose-type sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1998, **273**(41): 26298-26304.

[12] Chen Y, Yuan HY, Li H, *et al.* Reduction of rHSA degradation during fermentation in *Pichia pastoris* by disrupting YPS1 gene. *J Fudan Univ Natur Sci*, 2008, **47**(3): 311-317.
陈莹, 袁汉英, 李海, 等. 毕赤酵母 YPS1 基因的失活对减少重组人血清白蛋白降解的作用. *复旦学报(自然科学版)*, 2008, **47**(3): 311-317.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

纳米生物技术学

张阳德 主编

978-7-03-022435-4 ¥ 58.00 2009年9月出版

本书概要介绍纳米生物技术学的基本概念、研究的目标对象、产生、发展和国内外现状及展望;重点介绍了国内外纳米生物技术的前沿课题;详细介绍了各类纳米生物材料的来源、组成、理化和生物学特征、制备、应用、研究现状、发展方向和亟须解决的问题;论述了纳米载体在生物医学中的应用并介绍了各种纳米药物的实验室制备方法、释药特征、稳定性、药物代谢动力学和药效学内容以及最新进展;介绍了纳米中药的种类与特点,以及其在现代生物医学领域中的应用;讲述了纳米生物传感器的类型、特点及诊断技术;阐述了纳米技术在分子生物学中的应用,与基因工程相结合;还介绍了纳米探针与诊断技术,以及纳米科学常用的检测仪器与应用。

本书可供纳米学研究相关方向的科研工作者、研究生、本科生参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>