维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 3期
2002年8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(3):198-201
August 2002

# 登革2型病毒E蛋白在酵母菌中的分泌表达*

魏惠永[1,2], 江丽芳[2**], 薛耀华[2], 郭辉玉[2]
(1.广东省人民医院老年医学研究所,广东 广州 510080;2.中山医科大学微生物学教研室,广东 广州 510089)

# Secreted Expression of D2V Envelope Glycoprotein in *Pichia pastoris*

WEI Hui-yong[1,2], JIANG Li-fang[2**], XUE Yao-hua[2], GUO Hui-yu[2]
(1. *Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou* 510080, *China*; 2. *Department of Microbiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou* 510089, *China*)

**Abstract**: The *E* gene of dengue-2 virus was amplified using RT-PCR mothod from the C6/36 cells infected by D2V NGC strain and inserted into pPICZ α B vector. The recombinant plasmid was integreted into *Pichia pastoris* X-33 by electroporation and the expressed products were analyzed with SDS-PAGE and Western blotting. High level secreted expression was performed by determining the Mut phenotype and screening multi-copy integrants in the recombinant Pichia strains. The molecular mass of recombinant E glycoprotein was approx. 69kD and secreted into supernatants when induced with methanol. The expression product was able to reacted with D2V polyclone antibody and D2V E specific McAb. MCAC purified E-hisidine-tagged protein from the expressed product with HisTrap Kit can bind immunologically to His antibody and D2V E specific McAb in Western-blot assay. This study suggests the entire E gene coding D2V envelope glycoprotein can be expressed efficiently in *Pichia pastoris* and the expressed products of E fusion protein could amount to 0.1g/L.

**Key words**: Dengue virus; E glycoprotein; Secreted expression; *Pichia pastoris*

**摘要**:以pPICZ α B为载体,应用RT-PCR从感染D2V的C6/36病变细胞中克隆全长 *E* 基因,电转化法将重组质粒整合入巴斯德毕赤氏酵母菌,经抗生素筛选、表型鉴定和PCR分析得到Mut$^+$型的多拷贝整合菌,经甲醇诱导培养可产生69kD的融合蛋白,与含组氨酸尾的D2V包膜糖蛋白分子量理论值相符;免疫印迹证实该表达产物可与D2V E特异性单抗和D2V多抗进行反应;表达产物经金属螯合亲和层析可获得纯化的含组氨酸尾的E融合蛋白并保留其免疫反应性。研究显示克隆的全长D2V *E* 基因可在毕赤氏酵母菌中高效分泌表达,E融合蛋白最大表达量0.1g/L。

**关键词**:登革病毒;E蛋白;分泌表达;毕赤氏酵母菌
**中图分类号**:R373.33 **文章标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2002)03-0198-04

登革病毒(DV)为黄病毒属内的单正股RNA病毒,它通过蚊媒传播而引起世界范围的登革热流行,并可导致登革出血热或登革休克综合症(DHF/DSS)而使患者死亡,由于其发病机理尚未明了,加之二次感染中可能存在的依赖抗体的增强作用(ADE),严重阻碍着DV疫苗的研制。E蛋白是病毒体上主要的包膜糖蛋白与最大的结构蛋白,由495个氨基酸组成,分子量约为60kD,它决定着病毒的组织亲嗜性,介导病毒与细胞表面受体的特异性结合,诱导保护性免疫反应。对其高级结构的相

收稿日期:2001-11-07,修回日期:2001-12-17
* 基金项目:广东省科技厅自然科学基金资助课题(201036)
作者简介:魏惠永(1964-),男,江西安远籍,助理研究员,现在中山医微生物学教研室攻读博士学位,研究方向为登革病毒致病与免疫的分子生物学。
** 通讯作者:江丽芳(1953-),女,广东人,教授,博士导师。Correspondence author. Tel:020-87331594, E-mail:jiang LF@sums.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com



关研究成果显示它由3个非重叠的抗原决定簇A、B、C组成,这3个抗原决定簇至少构成16个不同的表位。目前通过对E蛋白抗原表位的分析,寻找只产生保护抗体而不产生增强感染作用,又能激活抗病毒感染所必需的特异性细胞免疫的决定簇,是DV疫苗研制的热点[1]。本研究拟用基因工程技术克隆全长D2V *E* 基因并转入酵母菌进行真核表达,期望获得分泌型的重组E蛋白,为深入研究及DV重组亚单位疫苗的研制创造条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

质粒pPICZαB、巴斯德毕赤氏酵母菌(*Pichia pastoris*)X-33及其筛选抗生素Zeocin为Invitrogen公司产品,D2V NGC株E特异性单抗3H5-1-21由美国CDC提供,抗D2V多克隆抗体由本室制备,HRP酶标羊抗鼠IgG购自武汉博士德公司,金属螯合亲和层析(MCAC)柱为发玛西亚公司的His Trap Kit,模块式离心浓缩盒为颇尔-格尔曼公司的Macrosep 50K/30K,酸洗玻璃珠(425~600nm)购自Sigma公司。

### 1.2 重组质粒pPICZαB-E构建

C6/36细胞感染D2V后病变为+++至++++时用异硫氰酸胍法提取RNA,按常规逆转录法得到cDNA后进行PCR扩增,得到1.5kb的 *E* 基因片段,用 *Pst* I和 *Xba* I酶切载体pPICZαB及纯化后的PCR产物,电泳回收、纯化后用T4DNA酶连接,经Zeocin抗生素筛选获得了5.1kb的重组质粒,命名为pPICZαB-E。

### 1.3 整合酵母与筛选鉴定

1.3.1 电穿孔转化:用 *Sac*I酶切重组质粒pPICZαB-E使其线性化,将纯化回收的DNA10μg与80μl新鲜的感受态酵母菌在预冷的0.2cm电转化杯(Bio-Rad)混匀,冰浴5min后用Bio-Rad GenePulser进行电穿孔,操作参考Invitrogen公司指南,取液体平铺含100μg/mL抗生素Zeocin的YPDS平板,30℃培养2-4 d。

1.3.2 表型鉴定:将MM与MD平板划线分成多个小格,用灭菌牙签细挑YPDS上生长的具Zeocin抗性的单菌落(编号)先点MM平板,再点MD平板,置换30℃培养2-3d,通过观察生长速度鉴定其表型。

1.3.3 筛选多拷贝整合子:挑选抗Zeocin的单菌落(编号)点种于高浓度抗生素的(500~1 000μg/mL Zeocin)YPDS平板,30℃培养2-4 d。

1.3.4 基因扩增:参考Invitrogen公司的操作指南提取酵母菌染色体DNA,以此为模板按原PCR条件扩增D2V *E* 基因,用5′AOX1和3′XOA1引物扩增AOX1基因,取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。

### 1.4 初步表达筛选

1.4.1 诱导表达 以X-33为空白对照,空质粒转化子为阴性对照,挑取8个表型为$Mut^+$的单菌落进行小量诱导表达,方法见Invitrogen公司的操作指南,即将BMGY中呈对数生长的酵母细胞重悬于BMMY,$OD_{600}$测定浓度约为1.0,置30℃振荡培养96h,每24h加入终浓度为1.0%的甲醇,分别于12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96h取样检测。

1.4.2 电泳分析 离心分离上清与细胞沉淀,取小量上清按《分子克隆实验指南》进行SDS-PAGE电泳与染色[2]。

1.4.3 表达产物的免疫反应鉴定 按《分子克隆实验指南》进行免疫印迹试验[2]。

### 1.5 规模表达及其条件优化

1.5.1 规模培养 将有E蛋白分泌表达的阳性克隆(73#)用250mL BMMY($OD_{600}$约为1.0)进行诱导,恒温恒速振荡培养96h,每24h加入终浓度为1.0%的甲醇并每隔12h定期取样。

1.5.2 蛋白含量分析 取各培养上清用分光光度计测定其$OD_{260}/OD_{280}$值,根据公式:蛋白质浓度(g/L)=(1.55$OD_{280}$-0.75$OD_{260}$)X稀释倍数计算总蛋白量。扫描SDS-PAGE胶染色后显示的各蛋白条带,确定分子量及其在总蛋白中所占的比例。

1.5.3 胞内蛋白检测 参考Invitrogen公司的操作指南用裂解缓冲液和酸洗玻璃珠裂解酵母细胞,离心吸取上清进行SDS-PAGE电泳。

1.5.4 抑制蛋白降解 将阳性菌分别接种于酸性的MM培养液、含1%干酪素或0.5%酪蛋白BMMY,振荡培养观察蛋白表达量。

### 1.6 超滤浓缩与蛋白纯化

将73#菌最高分泌表达E蛋白的培养液(BMMY 72h)低温离心,取上清用模块式离心浓缩盒进行浓缩,参考发玛西亚公司的操作指南将浓缩液再用His Trap Kit过柱纯化,SDS-PAGE和免疫印迹试验(D2V E单抗及组氨酸抗体)检测纯化后的样品。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 2 结果与分析

### 2.1 D2V *E* 基因重组质粒的构建

PCR 扩增出与 D2V 全长 *E* 基因大小一致的约 1500bp 片段，将双酶切的载体 DNA 与 PCR 产物连接，用 Zeocin 抗生素筛选获得了 5.1kb 的重组质粒，命名为 pPICZαB-E。

### 2.2 酵母菌转化子的筛选与鉴定

电穿孔后 YPDS 平板（含 100μg/mL Zeocin）可长出数十至上百个转化菌落，再经 MM/MD 培养筛选出甲醇诱导快速生长型的 $Mut^+$ 表型菌，并将 $Mut^+$ 表型菌落点种于 500～1 000μg/mL 高浓度的 Zeocin 平板来确定多拷贝整合转化子。另以提取的酵母菌整合转化子的 DNA 为模板，用原引物进行 PCR 扩增，可得到约 1500bp 的片段，扩增 AOX1 基因见 2.1～2.2kb 的片段，表明有 *E* 基因整合入酵母菌染色体 AOX1 基因（图 1）。

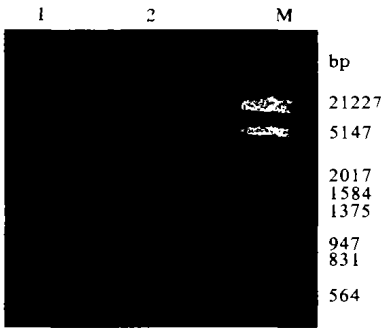


图 1 酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR analysis of *Pichia* chromosomal DNA using AOX1 primers 1, Positive clone (pPICZ α B-E/X-33 integrant); 2, Negative control (pPICZ α B-E/X-33 integrant); M, λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ.

### 2.3 *E* 基因重组质粒在酵母菌中的诱导表达

多拷贝整合转化子用 1.0% 甲醇诱导表达（BMMY）96h，定期取样用上清进行 SDS-PAGE 电泳，与空白对照菌（酵母菌 X-33）和阴性对照菌（空质粒转化酵母菌）的比较显示，转化菌一般在振荡培养 24d 后开始有外源蛋白分泌表达，72h 达到高峰，其中 73# 菌蛋白质表达量最高，且有明显的相对分子量为 69 000d 的蛋白条带，该蛋白条带可能为 D2V E 融合蛋白（图 2）。

### 2.4 表达产物的免疫印迹分析

D2V 多抗和特异性 E 单抗的免疫印迹见表达产物在近 69kD 处有一明显的显色带，而空白对照菌与空质粒转化的阴性对照菌在相应位置均无此条带，表明表达产物中有重组的 E 蛋白并具有免疫反应性（图 3）。

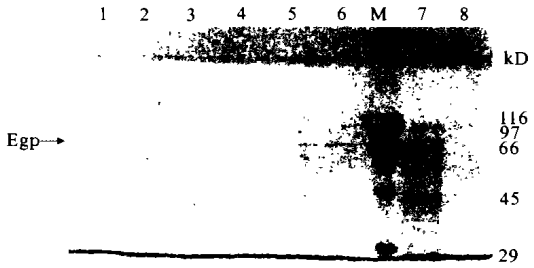


图 2 诱导时间与 E 蛋白表达量

Fig.2 SDS-PAGE of expressed E fusion protein by different period M, Protein marker (D); 1, X-33 (Control); 2 - 7, Clone 73 # expressed by 12, 24, 36, 48, 60, 72h; 8, Negative control (pPICZ α B/X-33 integrant).

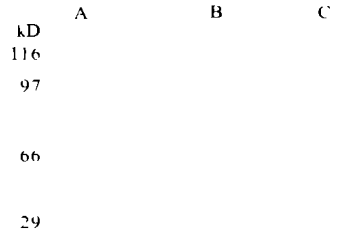


图 3 表达的 D2V E 蛋白的免疫印迹

Fig.3 Western blotting of D2V E protein expressed in *Pichia pastoris* A, Protein marker; B, Positive (pPICZ α B-E/X-33 integrants); C, Negative control (pPIC Zα B/X-33 integrant).

### 2.5 E 蛋白的规模表达及定量分析

73# 菌的规模培养物经凝胶扫描和分光光度计测定，24h 开始有 E 蛋白分泌表达，48～72h 间蛋白分泌稳定，72h 达到高峰，重组 E 蛋白占表达总蛋白的 34%，E 蛋白最大表达量可达 0.1g/L。

改用酸性的 MM 培养液未见有 E 融合蛋白表达，而在 BMMY 中添加 1% 干酪素或 0.5% 酪蛋白不能抑制 E 蛋白降解，也不能提高 E 蛋白的表达量。

### 2.6 E 融合蛋白的纯化

超滤浓缩样品 SDS-PAGE 见 69kD 的蛋白条带显著增加，金属螯合亲和层析（MCAC）后蛋白电泳与免疫印迹均有一 69kD 条带，而其它蛋白条带基本消失，提示表达产物中含组氨酸尾的 E 融合蛋白被纯化且保留其免疫反应性（图 4）。

维普资讯 http://www.cqvip.com



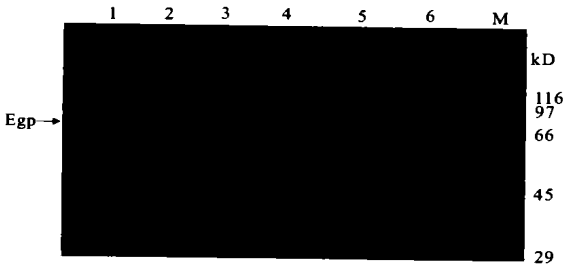


图4　表达产物纯化前后的SDS-PAGE

Fig.4　SDS-PAGE of expressed products before and after MCAC purification

1, Purified sample by MCAC; 2, Negative control (pPIC Z α B/X-33 integrant); 3, Primary expressed supernatant; 4, Sample after frist ultrafilted; 5, Sample after second ultrafilted; 6, *Pichia* cell lysate; M, Protein marker.

## 3　讨论

有学者曾用大肠杆菌表达截断或完整的E蛋白[3,6],由于原核表达产物缺乏糖基化而影响重组E蛋白性能,故近年来多用真核表达系统制备具有活性的重组E蛋白,有人应用杆状病毒表达系统获得各种重组E蛋白[4],其免疫原性和免疫保护作用得到肯定,最近Kelly等[5]证实在杆病毒-Sf9中表达的完整D2V E糖蛋白以多聚体形式(rEgp)存在,并证明rEgp具有天然E蛋白相同的结构和功能表位。而Sugrue等学者[6,7]在酵母菌内获得分泌表达的截断E蛋白的基础上,又获得了令人鼓舞的类病毒颗粒(VLPs)。由于嗜甲醇的巴斯德毕赤氏酵母菌在糖基化过程中添加的甘露糖残基链较酿酒酵母短,从而避免了过度糖基化的影响[8],且自身分泌的蛋白质数量有限,因而近几年来的应用日趋多见。本研究将D2V全长*E*基因克隆通过电转化整合入酵母菌的染色体,经甲醇诱导得到分泌型的重组E蛋白,其相对分子量约为69000,与正确糖基化、含组氨酸尾的E蛋白大小基本一致。经单抗和多抗的免疫印迹证实该重组蛋白具有免疫反应性,表明*E*基因在该酵母菌中表达成功。

虽然毕赤氏酵母菌自身分泌的蛋白质数量较少,但导入的外源性基因表达并不稳定,与外源性基因的大小和修饰状况、基因整合部位与整合拷贝数、诱导条件及表达产物特性等因素密切相关[9],本实验在众多转化子中首先筛选出整合入酵母菌AOX1基因的快速生长型(表型$Mut^+$)单菌落,并用高浓度的Zeocin来分离多拷贝整合转化子,用甲醇诱导发现转化菌一般在振荡培养24h后开始表达外源蛋白,72h达到高峰,其中73#菌分泌表达的重组E蛋白质最高量为0.1g/L,占培养上清总蛋白量的34%,显示E融合蛋白可在毕赤氏酵母菌高效分泌表达,为其深入研究奠定基础。

与空白对照菌X-33、空质粒转化阴性对照菌的SDS-PAGE电泳分析显示,阳性菌除表达E蛋白外,另有多种蛋白电泳条带出现,可能为表达的E蛋白存在降解而形成较小片段所致[10],也与酵母菌对信号肽加工不完全导致的产物不均一有关[11],本试验根据表达载体带有6个组氨酸尾的特性应用MCAC技术纯化表达产物,获得的纯化E蛋白保留其免疫反应性,为其细胞表位研究和D2V重组亚单位疫苗的研制创造条件。

**致谢**　本文所用的载体pPICZ α B及其酵母菌X-33由中山大学生命科学院王珣章教授和杨林教授惠赠,在此表示感谢。

## 参考文献

[1] 闻玉梅.现代医学微生物学[M].上海医科大学出版社,1999.1117-1142.

[2] 金冬雁,黎孟枫.分子克隆实验指南[M].第二版,北京:科学出版社,1993.

[3] Bielefeldt-Ohman H, Beasley DW, Fitzpatrick DR, *et al*. Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system [J]. J Gel Virol, 1997, 78:2723-2733.

[4] Velzing J, Groen J, Drouel M T, *et al*. Induction of protective immunity against dengue virus type 2: comparison of candidate live attenuated and recombinant vaccines[J]. Vaccine, 1999, 17:1312-1320.

[5] Kelly E P, Greene J J, King A D, *et al*. Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice [J]. Vaccine, 2000, 18:2549-2559.

[6] Sugrue R J, Cui T, Xu Q, *et al*. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. J Virol Methods, 1997, 69:159-169.

[7] Sugrue R J, Cui T, Xu Q, *et al*. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles [J]. J Gen Virol, 1997, 78:1861-1866.

[8] Grinna L S, Tschopp J F. Size distribution and general structural features of N-linker oligosaccharides from the methylotropic yeast Pichia pastoris[J]. Yeast, 1989, 5:107-115.

[9] Cregg J M, Higgins D R. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris* [J]. Canadian J Botany Supp, 1995, 73:5981-5987.

[10] Guirakhoo F, Heinz F X, Kunz C. Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain and conformational changes occuring at acidic pH[J]. Virology, 1989, 169:90-99.

[11] 刘　文,胡　巍.酵母表达基因工程产物特性分析[J].生物工程进展,2001,21:74-76.