

单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D 在酵母中的表达*

李智华, 徐维明, 姬秋彦, 龙海亭, 彭正华, 李健峰**

(中国医学科学院/中国协和医科大学 医学生物学研究所 昆明 650118)

Expression of Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein D in *Pichia pastoris*

LI Zhi-hua, XU Wei-ming, JI Qiu-yan, LONG Hai-ting, PEN Zheng-hua, LI Jian-feng**

(Chinese Academy of Medical Sciences / Peking Union Medical college, Institute
of Medical Biology, Kunming 650118, China)

Abstract: The extracellular portion of glycoprotein D gene (*gDt*), encoding 1-314 amino acids, was amplified from extracted HSV-1 DNA and cloned into expression vector pPIC9K. After electroporation transformation of *Pichia pastoris* GS115 and selection with G418, a strain of *P. pastoris* with high yield of secreted recombinant gD was obtained. The yield of recombinant gD was 250mg/liter in shake flask cultures. The recombinant protein could be identified with specific monoclonal antibody 1-I-9 using ELISA and Western blotting assays. Recombinant gD was purified to almost homogeneity by Q-Sepharose ion exchange, Chelating Sepharose immobilized metal ion affinity and Sephacryl S-200 gel filtration chromatographies. Purified gD expressed in *P. pastoris* elicited high level of specific antibodies in BALB/c mice, indicating recombinant gD were characteristic high immunogenicity and capable of inducing significant titers of specific antibodies.

Key words: Herpes simplex virus (HSV); Glycoprotein D (gD); *Pichia pastoris*; Purification

摘要: 从提取的 HSV-1 基因组中扩增得到编码 gD 蛋白胞外区 1~314aa 的基因 *gDt*, 将其插入毕赤酵母表达质粒 pPIC9K 的醇氧化酶 (AOX1) 启动子下游, 构建携带 *gDt* 的重组载体, 经电转化 GS115 菌株和 G418 筛选, 得到了高效分泌表达 gD 蛋白的毕赤酵母菌株, 表达量达到 250mg/L, 该目的蛋白可被 gD 单抗 (1-I-9) 特异性识别。表达产物经离子交换、金属螯合、分子筛柱层析纯化后得到纯度较高的重组蛋白。重组 gD 蛋白免疫 BALB/c 小鼠可诱生一定水平的特异性抗体, 表明该蛋白具有较好的免疫原性, 能够诱导小鼠产生体液免疫应答。

关键词: 单纯疱疹病毒; 包膜糖蛋白 D; 毕赤酵母表达; 纯化

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0006-05

单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 是危害人类健康的常见病原体, 分为 HSV-1 及 HSV-2 两型。HSV 具有神经毒性, 可侵犯中枢神经系统、破坏神经细胞, 还有嗜神经节潜伏感染的特性, 能够有效地逃避免疫系统的作用, 且病毒容易再激活, 在临床上常导致原发/复发性的疱疹性脑炎、疱疹性角膜炎、生殖器疱疹、新生儿感染、胎儿致畸等疾病的发生, 目前尚无有效的疫苗来进行

防治, 其疫苗的研究开发有着重要的现实意义。研究发现 HSV 包膜糖蛋白可引起 HSV 的免疫反应, 其中糖蛋白 gD 与感染细胞膜上的受体 HveA、HveC 等结合参与了病毒穿膜的过程, 是 HSV 的最重要的保护性抗原^[1]。gD 有多个中和表位, 能诱导细胞和体液免疫反应, 对 HSV-1 和 HSV-2 的感染均有保护作用, 是 HSV 疫苗研究的主要对象^[2,3], 目前 gD 亚单位疫苗研究已处于 III 期临床阶段^[4]。考虑

收稿日期: 2005-06-21, 修回日期: 2005-07-18

* 基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2005C0062M)

作者简介: 李智华 (1972-), 男, 云南省籍, 助研。

** 通信作者: 李健峰 (1973-), 男, 云南省籍, 博士, 从事病毒学及疫苗研究。

Corresponding author. Tel: 0871-835702; E-mail: lijianfeng73@hotmail.com

到原核表达系统不能实现 gD 蛋白的如糖基化等翻译后修饰, 而酵母系统比之哺乳动物细胞表达系统、病毒表达系统具有成本低廉, 通常表达水平更高, 便于大规模生产等优点, 我们将其在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中进行表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料

Hep2 细胞、HSV-1 病毒株为医学生物学研究所保存, pMD18-T 载体、限制性内切酶、修饰酶及蛋白酶等购自大连宝生物工程公司, *Pichia pastoris* 宿主菌 GS115、表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司, Yeast Nitrogen Base、D-Biotin 购自 Sigma 公司, DMEM 培养基、G418 购自 GIBCOBRL 公司, Q Sepharose、Chelating Sepharose、Sephacryl S-200 购自 Amersham Pharmacia 公司, 鼠源 HSV-1 gD 单抗 (1-I-9) 购自 Biodesign 公司, 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自昆明医学院实验动物中心, 其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 HSV-1 病毒总 DNA 的提取

参照 Mahy BWJ 等的方法^[5], 以 M.O.I₅₀ ≥ 5 的 HSV-1 病毒接种感染 Hep2 细胞, 从中提取病毒总 DNA。

1.3 HSV-1 gD 基因的扩增

根据编码 HSV-1 cDNA ORF 的碱基序列设计下述 PCR 引物, 以提取的 HSV 总 DNA 为模板, 扩增编码成熟 HSV-1 gD 胞外区 (1~314aa) 的基因, 命名为 *gDt*。上下游引物引入 *EcoR* I 限制酶酶切位点, C 端设计了 6 个 His 的标记以利于后续表达产物的纯化。引物序列如下:

DP1: 5'-CGGGAATTCAAATATGCCTTGGCGGATGC-3';

DP2: 5'-CGGGAATTCTTAATGATGATGATGATGATGATGTTGTTTCGGGGTGGCCG-3'

PCR 反应条件为 95 变性 5 min; 然后 94 50s, 56 45s, 72 90s, 30 个循环; 最后 72 延伸 7min。

1.4 pPIC9K-gD 表达载体的构建

上述 PCR 获得的 *gDt* 基因, 胶回收后连接于 pMD18-T 载体, 转化 DH5 α 感受态菌株, 提取质粒, *EcoR* I 酶切鉴定到的阳性克隆送样进行序列测定。取测序正确的克隆 *EcoR* I 酶切, 胶回收 *gDt* 目的基因片段。取 pPIC9K 质粒同样用 *EcoR* I 酶切并去磷酸化, 将二者连接, *EcoR* I、*Apa* I+*Sac* I、*Aat* II+*Xba* I 酶切鉴定, 挑取正向阳性克隆, 用碱裂解法及 PEG 进行质粒大提及纯化。

1.5 转化毕赤酵母 GS115

制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 取 80 μ L, 加入经 *Sal* I 线性化的表达质粒 pPIC9K-gD 10 μ g, 混匀后转入冰预冷的 0.2cm 的电转杯, 冰上放置 5min, 电击转化, 转化条件为 1.5 kV, 25 μ F, 200 Ω 。立即加入 1mL 冰预冷的 1mol/L 山梨醇, 取转化物 200 μ L 涂布 MD 培养基平板, 30 培养直至长出单菌落。

1.6 G418 筛选多拷贝转化子

用灭菌牙签挑取 MD 平板上生长的单菌落约 100 个, 接种至含 G418 0.25 mg/mL 的 YPD 平板, 30 培养 48-72h, 再将生长的菌落依次接种至含 G418 为 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL 和 4 mg/mL 的 YPD 平板 30 培养 48-72h。挑取所有抗 4mg/mL G418 的菌落在 MM 和 MD 平板上先后划线, 筛选出 Mut⁺表型的菌落。

1.7 在毕赤酵母菌中诱导表达重组 gD

挑取所有抗 4mg/mL G418 和 Mut⁺表型的菌落, 分别接种含 20mL BMGY 培养基的 100mL 小三角瓶, 30 培养至菌液 OD₆₀₀ 2~4; 取 1 mL 种子液接种到含 200mL BMGY 培养基的 1000 mL 三角瓶, 30 培养至菌液 OD₆₀₀>10(约 18~24h) 5000g 离心 5min, 弃上清。重悬菌体于 50 mL BMMY 培养基, 30 继续培养, 每隔 24h 按培养液 1% 体积补充无水甲醇, 每隔 12h 取样, 离心, SDS-PAGE、ELISA 及 Western Blot 检测 gD 蛋白的表达情况。

1.8 重组 gD 的纯化

诱导 4d 后, 离心收集上清, 用 Mr 5kDa 的超滤膜进行超滤浓缩并更换为 A 缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl pH8.5)。用 A 液平衡 Q Sepharose 层析柱 (XK16/20), 超滤液以 5mL/min 的流速上样, 用 B 液 (20mmol/L Tris-HCl pH8.5, 500mmol/L NaCl) 线性梯度洗脱 5 个柱床体积, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 电泳分析。Chelating Sepharose 层析柱 (XK16/20) 经 EDTA 再生处理用 100mmol/L CuSO₄ 结合层析柱, 以 C 液 (20mmol/L Na₂HPO₄, 150mmol/L NaCl, pH7.0) 平衡, 将 Q Sepharose 层析柱收集的峰上样, 流速 5mL/min, 用 D 液 (20mmol/L Na₂HPO₄, 150mmol/L NaCl, 100mmol/L 咪唑, pH7.0) 洗脱, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 电泳分析。将收集的峰进一步上 Sephacryl S-200 (XK16/100) 凝胶过滤柱, 用 E 液 (20mmol/L Na₂HPO₄ pH7.0) 洗脱, 流速 0.5mL/min, 收集洗脱峰, SDS-PAGE、ELISA 鉴定, Lowry 法测定蛋白浓度。

1.9 重组 gD 蛋白的鉴定分析

SDS-PAGE 电泳、ELISA 及 Western Blot 分析

方法参照 DR.马歇克等^[6]进行,以 HSV-1 gD 单抗 (1-I-9, Biodesign) 为一抗, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗。

参照 Monsigny M 等的方法进行^[7], 以大肠杆菌表达的重组 GM-CSF (20 μ L) 作为阴性对照, 分析重组 gD 蛋白的糖含量

1.10 重组 gD 免疫原性初步研究

取 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 20 只, 随机分组。阴性对照组 10 只, 注射 Al(OH)₃ 佐剂-生理盐水 0.2mL; 实验组 10 只, 注射 Al(OH)₃ 佐剂-gD 蛋白 0.2mL, 2 μ g/只。用微量注射器给小鼠腹部皮下注射, 0、4、6 周各免疫一次, 注射后每两周断尾采血一次, 在注射后第八周, 采取眼球摘除法收集血样。采集的血样 4 放置过夜, 12000r/min 离心 5min, 收集上清, -20 保存备用。分别以 1 μ g/mL 纯化的 gD 抗原和 56 30min 灭活的 HSV-1 病毒 (10⁴PFU/mL) 包被酶标板, 100 μ L/孔, 加入 PBS 倍比稀释的血清, 用 IgG-HRP 羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 检测小鼠抗血清的效价。

2 结果

2.1 gDt 基因的获得

经引物 DP1 和 DP2 进行 PCR 扩增, 获得编码 HSV-1 gD (1~314aa) 的基因 (gDt), 大小为 981bp。PCR 获得的 gDt 基因, 连接到 pMD18-T 载体, EcoR I 酶切阳性克隆测序结果与 HSV-1 Kos、F、17 株 gD 序列存在两个核苷酸的差异, 所编码的氨基酸和 Kos、F、17 株相比在 14 位发生了一处变异 (Pro \rightarrow Gln)。

2.2 pPIC9K-gDt 表达载体的构建

EcoR I 酶切 pMD18-gDt 获得目的基因片段, 与同样用 EcoR I 酶切的表达载体 pPIC9K 连接, 用 EcoR I、Aat II+Xba I、Apa I+Sac I 酶切鉴定正反向, 图 1 为筛选到的正向阳性克隆酶切鉴定结果, 与预期相符。

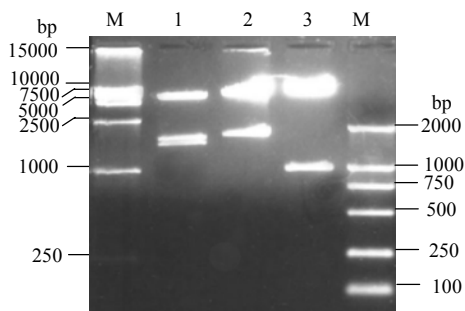


图 1 pPIC9K-gDt 克隆的正向酶切鉴定

Fig.2 Orientation analysis of recombinant plasmid of pPIC9K-gDt
M, DNA marker; 1, AatII+XbaI; 2, Apa I + SacI; 3, EcoR I.

2.3 转化毕赤酵母 GS115 并筛选稳定的多拷贝转化子

Sal I 线性化的表达质粒 pPIC9K-gDt 电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞后, 经 G418 0.25mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL, 3mg/mL 和 4mg/mL 浓度加压筛选, 从转化子中筛选出稳定多拷贝转化子用于诱导表达实验。

2.4 在毕赤酵母中诱导表达重组 gD

挑取所有抗 4mg/mL G418 和 Mut⁺表型的菌落接种至 200mL BMGY, 经诱导表达, SDS-PAGE 电泳分析结果表明, 与空载体对照菌相比, 诱导 48h, pPIC9K-gDt 转化的酵母菌液上清出现明显表达条带, 并于诱导 72h 达高峰, 表观分子量约 44kDa, 蛋白含量测定其表达量可达 250 μ g/mL。ELISA 及 Western Blot 分析显示鼠抗 HSV-1 gD 单抗 (1-I-9) 能与毕赤酵母表达的重组蛋白发生特异的抗原抗体结合, 见图 2 和图 3。

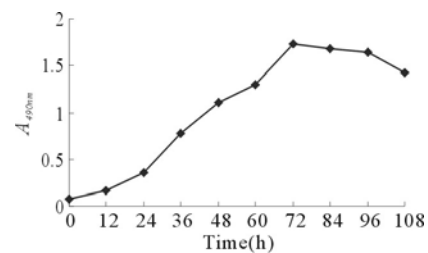


图 2 ELISA 检测 (A_{490nm}) 不同时间分泌表达 gD 蛋白的抗原性

Fig.2 Antigenicity of recombinant gD after different periods

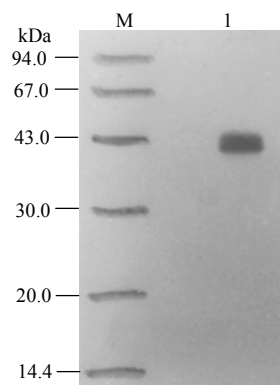


图 3 重组 gD 蛋白 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of Recombinant gD of induction
M, Low molecular weight protein marker; 1, gD secreted from *P. pastoris*.

2.5 毕赤酵母表达的重组 gD 的纯化

诱导 4d 后的上清用截留分子量为 5kDa 的超滤膜进行超滤浓缩, 上样 Q-sepharose FF 离子交换柱, 将收集的峰上样 Chelating Sepharose 金属螯和层析柱, 并经 Sephacryl S-200 凝胶过滤进一步纯化,

收集洗脱峰,经 SDS-PAGE 及薄层扫描表达的重组蛋白纯度可达 95%,见图 4。

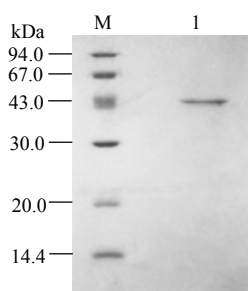


图 4 经 Sephacryl S-200 柱层析纯化产物的 12% SDS-PAGE 分析

Fig.4 12% SDS-PAGE of gD purified using Sephacryl S-200 M, Low molecular weight protein marker; 1, gD Eluted from Sephacryl S-200.

2.6 重组蛋白糖含量分析

在硫酸存在的条件下,糖蛋白上的糖基能与间苯二酚反应生成橙黄色的产物,并且产物颜色随糖含量的增加而变深。结果可见,与空白和阴性对照管相比,加入毕赤酵母表达的重组蛋白实验组反应液颜色发生明显的变化,经 OD 值测量表明:毕赤酵母表达的重组蛋白: $OD_{430}=0.85$, $OD_{415}=1.16$; 阴性对照: $OD_{430}=0.03$, $OD_{415}=0.02$ 。

2.7 重组 gD 免疫原性初步研究

分别用纯化的重组 gD 和灭活的 HSV-1 病毒包被酶标板,ELISA 检测重组 gD 蛋白免疫 BALB/c 小鼠后不同时间抗血清的滴度,结果如图 5 所示,重组 gD 蛋白能够诱导适当滴度的抗 gD 或 HSV-1 特异性抗体。

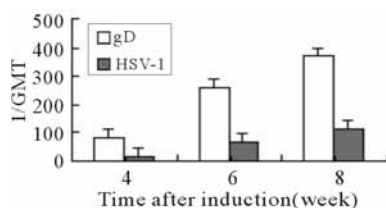


图 5 gD 蛋白免疫小鼠后抗体滴度 (GMT) 消长曲线
Fig.5 GMT curve of specific IgG in mice induced by recombinant gD

3 讨论

HSV 是一种结构复杂的双链 DNA 病毒,可引起龈口炎、脑炎、角膜结膜炎、生殖器疱疹等疾病,复发性感染率高,是亟待解决的公共卫生问题,其疫苗的研究开发有着重要的现实意义。

在 HSV 感染过程中, gD 与感染细胞膜上的受

体 (HveA 或 HVEM、nectins 等) 结合使病毒更加稳定地吸附在细胞膜上,与 gB、gH-gL 等包膜糖蛋白一起介导病毒包膜与质膜融合使病毒传入易感细胞。针对这些包膜糖蛋白所产生抗体的中和活性,是用其作免疫原设计 HSV 亚单位疫苗的主要理论基础。其中 gD 在病毒感染早期起着必不可少的作用,是 HSV 的最重要的保护性抗原。

gD 在两型间同源性较高,由 US6 基因编码,基因序列长 1185bp。gD 是一种典型的跨膜蛋白,切除 C 端 25aa 的信号肽加工后形成成熟的 gD 分子 (369aa),靠近 C 端有疏水性的跨膜结构域 (TMR)。有研究报道去除其胞浆尾部和 TMR 有助于蛋白转运到细胞外,更有利于 MHC 分子的呈递,能产生较高水平的免疫应答,在体外和体内均能阻断 HSV 对细胞的感染,抑制病毒在细胞间的传播^[8,9]。gD 是一种复合抗原,已确定的 gD 功能区有四个: I (27-43aa)、II (126-161aa)、III (226-246aa)、IV (277-310aa)。每个功能区在感染过程中都有其独特的作用,至少有六个抗原簇分为四个抗原结合位点: I、II、III、IV,目前已探明其中含有辅助性 T 细胞表位和 B 细胞表位,极有可能也存在着 CTL 表位^[10,11]。研究表明,用纯化的天然或重组的 gD 蛋白免疫动物能保护动物免受 HSV 的感染,减少隐性感染的发生,以及潜伏病毒对细胞的破坏作用。Chiron 和 GlaxoSmithKline (GSK) 公司的 gD2 亚单位疫苗临床研究表明,该疫苗可以诱发较高的中和抗体,对 HSV 感染者和疾病患者有一定的保护作用,不同程度地降低被病毒感染后的发病率和致死率。

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统因其稳定高效、表达产量高、可以分泌表达、能完成蛋白质翻译后加工、培养简便及可以高密度发酵等优点而成为一种理想的真核表达系统,适用于大量制备各种药用及研究用重组蛋白^[12],考虑到胞外区 gD 是一个可溶的蛋白分泌片段,本实验选择毕赤酵母表达载体 pPIC9K 进行重组 gD 的表达研究,通过 0.5 ~ 4mg/mL G418 抗性筛选得到了具有较高抗原性和表达量的重组菌株,该菌株能稳定分泌表达 gD 重组蛋白,在摇瓶中表达量达到 250mg/L 和 van Kooij A 等报道的表达量相近^[13],比 Sisk WP 等用杆状病毒表达的 HSV-1 gD(1-306)表达量 35mg/L 有显著提高^[14]。表达产物经 SDS-PAGE、Western blot 等分析,所获得的重组分泌型 gD 的主要分子量条带约为 44kDa,可与 HSV-1 gD 单克隆抗体 (1-I-9) 特异性结合,且存在一定程度的糖基化。所诱导分泌表达的上清液经超滤、阴离子交换、金属螯和及分子筛

柱层析,取得较好的纯化效果。将纯化后的重组 gD 蛋白免疫接种 BALB/c 小鼠后可诱导针对 gD 的特异性体液免疫应答。本研究结果为 HSV gD 亚单位疫苗和 HSV 诊断抗原的进一步研究开发打下基础,同时还为深入 gD 结构及功能等基础领域的研究提供了材料。

References

- [1] Spear P G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry [J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6:401-410.
- [2] Stanberry L R, Spruance S L, Cunningham A L, *et al.* Glycoprotein D adjuvant vaccine to prevent genital herpes [J]. *N Engl J Med*, 2002, 21:1652-1661.
- [3] Bourne N, Bravo F J, Francotte M, *et al.* Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs [J]. *J Infect Dis*, 2003, 187: 542-549.
- [4] Koelle D M, Corey L. Recent Progress in Herpes Simplex Virus Immunobiology and Vaccine Research [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16:96-113.
- [5] Mahy B W J, Kangro H O. *Virology methods manual* [M]. San Diego: Academic Press, 1996.
- [6] Jin D Y (金冬雁, 黎孟枫, 等译). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual (分子克隆实验指南)* [M]. 2nd, Beijing: Science Press, 2002.
- [7] Monsigny M, Petit C, Roche A C. Colorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod [J]. *Anal Biochem*, 1988, 175:525-530.
- [8] Nicola A V, Willis S H, Naidoo N N, *et al.* Structure-function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D [J]. *J Virol*, 1996, 70:3815-3822.
- [9] Nicola A V, Peng C, Lou H, *et al.* Antigenic structure of soluble herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D correlates with inhibition of HSV infection [J]. *J Virol*, 1997, 71:2940-2946.
- [10] Whitbeck J C, Muggeridge M I, Rux A H, *et al.* The major neutralizing antigenic site on herpes simplex virus glycoprotein D overlaps a receptor-binding domain [J]. *J Virol*, 1999, 73:9879-9890.
- [11] BenMohamed L, Bertrand G, McNamara C D. Identification of novel immunodominant CD4+ Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity [J]. *J Virol*, 2003, 77:9463-9473.
- [12] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 16:23-52.
- [13] van Kooij A, Middel J, Jakab F, *et al.* High level expression and secretion of truncated forms of herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2002, 25:400-408.
- [14] Sisk W P, Bradley J D, Leipold R J, *et al.* High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gD synthesized by baculovirus-infected insect cells [J]. *J Virol*, 1994, 68:766-775.