

破伤风毒素保护性抗原在毕氏酵母中的分泌表达

王 慧, 荫 俊, 侯晓军, 邢洪光

(军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 中国北京 100071)

摘 要: 采用 PCR 方法, 从 *C. Tetani* 64008 菌株中扩增大小为 1 353 bp 的破伤风毒素与靶细胞起结合作用的重链 C 端基因 (*Tetc*), 直接连接 pGEM-T 载体进行测序, 并以 pPIC9K 为表达载体构建重组表达质粒, 经线性化的重组质粒电转化毕氏酵母细胞 GS115 和 KM71, 甲醇诱导获得了分泌表达, 表达产物存在于培养上清中, 占分泌蛋白的 10%。通过免疫印迹可以检测到重组表达产物。活性测定表明, 重组蛋白具特异结合活性。本研究通过实现破伤风毒素保护性抗原在酵母系统中的分泌表达, 研究其影响因素, 为其它细菌毒素蛋白高效可溶性表达, 及进一步抗原片段介导保护性免疫研究及抗毒素制备奠定了基础。

关键词: 破伤风毒素; 保护性抗原; 基因表达; 毕氏酵母

中图分类号: Q786; Q936

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)01-0032-04

High-level Secretion Expression of Protective Fragment of *Tetani* Toxin in *Pichia pastoris* and Affecting Factors in Inducing Expression

WANG Hui, YIN Jun, HOU Xiao-jun, XING Hong-guang

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: In order to clone and express the protective fragment of *Tetani* toxin in *Pichia pastoris*, the C fragment of toxin was amplified with PCR from strain *C. Tetani* 64008 and cloned into yeast expression vector pPIC9K. Cloned *Tetc* gene was expressed in *Pichia pastoris* GS115 or KM71 cells. Expression product was identified by Western Blotting and the specific binding activity to antiserum was identified in ELISA. Results showed about 1 353 bp DNA fragment containing protective antigenic determinants was amplified from strain of *C. Tetani* 64008. Cloned gene was expressed in soluble form by secreting into culture mixture. Recombinant *Tetc* was of 10% of total secreted protein and easily identified by SDS-PAGE analysis and Western blotting. The Recombinant *Tetc* protein can react specially with *Tetani* neurotoxin antiserum. It could be concluded that the successful cloning and expression of *Tetc* with specific antibody binding activity are conducive to further study on immunology and making antitoxin.

Key words: *Tetani* toxin; protective fragment; gene expression; *Pichia pastoris*

(Life Science Research, 2004, 8(1): 032 ~ 035)

收稿日期: 2003-10-14; 修回日期: 2004-02-01

基金项目: 全军医药卫生科研基金资助项目(01MB059)。

作者简介: 王慧(1971-), 女, 满族, 北京人, 军事医学科学院博士研究生, 主要从事微生物毒素及感染免疫研究, Tel: +86-010-66948532。

E-mail: wanghui_71@hotmail.com.

破伤风毒素 (Tet) 是由破伤风梭菌在厌氧环境中产生的外毒素, 可引起破伤风, 是一种严重的急性病, 平均死亡率 20% ~ 30%, 重症可达 70%。虽然破伤风毒素功能片段^[1-4]已在大肠杆菌^[5,6]、鼠细胞^[7]、及酵母^[8]中获得了表达, 但表达产物存在于胞浆。本研究则希望实现分泌表达, 并对表达影响因素进行研究。获得的重组表达蛋白对破伤风抗毒素血清进行特异性结合活性测定和免疫印迹鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

破伤风梭菌 *C. Tetani* 64 008 购自卫生部中国生物制品检定所; *E. coli* DH5 α 为本室保存; 克隆载体 pGEM-T 为 Promega 公司产品; 表达载体 pPIC9K, 毕氏酵母菌株 GS115, KM71 均为 Invitrogen 公司产品。

1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Xho*I、*Not*I 和 *Sac*I, T4 DNA 连接酶, DNA 和蛋白标准分子量, 质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品; PCR 试剂为宝生物公司产品; PCR 产物及酶切产物回收采用博大公司玻璃奶 DNA 快速回收纯化试剂盒; 培养基配制及其它均为进口试剂。

1.2 方法

1.2.1 破伤风毒素重链 C 端片段 (Tetc) 的 PCR 扩增

依据 EMBL 的 DNA 数据库中破伤风毒素基因全序列^[5]设计引物, 引物 5' 端引入限制性内切酶 *Xho*I 和 *Not*I 位点。

上游引物:

5'ccgctcgagaaaagaaaaatctggattgtgggtt3';

下游引物:

5'aatcgccgcttaatacattgtccataattcate 3'.

引物由赛百盛公司合成。

取产毒破伤风梭菌 *C. Tetani* 64008 菌株冻干粉少许, 以 0.01 mol/L Tris. Cl (pH 7.4) 50 μ l 溶解, 加入 0.5 mol/L KOH 50 μ l, 96 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 加入 0.5 mol/L Tris. Cl (pH 6.5) 100 μ l, 12 000 g 离心 10 min, 取上清 15 μ l 做 PCR 模板。

PCR 50 μ l 反应体系 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 再按 94 $^{\circ}$ C 40 s、55 $^{\circ}$ C 60 s、72 $^{\circ}$ C 60 s 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. 扩增产物行 1% 琼脂糖凝

胶电泳, 以 λ DNA/*Hind* III 酶切片段为标准分子质量确定产物大小。

1.2.2 Tetc 基因的克隆

将 PCR 产物直接连接进入 pGEM-T 载体, 转化到 *E. coli* DH5 α , 通过 α - 互补的蓝白筛选挑选重组子。经酶切电泳鉴定后, 选出重组质粒, 送赛百盛公司测序。

1.2.3 重组表达质粒 pPIC9K-Tetc 的构建

利用 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切, 将表达载体 pPIC9K 进行消化, 回收纯化, 与用相同酶切的目的片段 Tetc 连接, 并转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 经酶切电泳鉴定, 确定重组子。

1.2.4 重组表达质粒 pPIC9K-Tetc 的线形化和电转化酵母细胞

利用 *Sac*I 酶切, 将重组表达质粒 pPIC9K-Tetc 进行线形化, 纯化回收。分别将 10 μ g 线形 DNA 加入致敏的酵母细胞 GS115 和 KM71, 进行电转化 (1 500 V, 200 Ω , 50 μ F)。转化的细胞涂布 YPD-G418 板 (G418 浓度梯度为 0.25、0.5、1.0、2.0 g/L), 进行筛选。

随机挑取 GS115 和 KM71 单克隆进行 PCR 鉴定, 选出阳性重组子用于诱导表达。

1.2.5 酵母重组克隆的活化和甲醇诱导表达

接种 GS115 (Mut⁺) 单菌落于 5 ml YPD-G418 培养基 (含 Amp 100 mg/L, Kan 25 mg/L) 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。按 1: 50 转接于新鲜 2 ml BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养至菌液 $OD_{600} = 2 \sim 6$, 3 000 g 室温离心 5 min, 弃上清, 15 ml BMMY 培养液悬浮细胞沉淀, 30 $^{\circ}$ C 诱导表达培养, 每 24 h 补加甲醇至终浓度 1%, 连续培养 5 d, 离心收集上清, 浓缩后 4 $^{\circ}$ C 保存。

接种 KM71 (Mut⁺) 单菌落于 5 ml YPD-G418 培养基 (含 Amp 100 mg/L, Kan 25 mg/L) 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。按 1: 50 转接于新鲜 50 ml BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养至菌液 $OD_{600} = 1.0$, 3 000 g 室温离心 5 min, 弃上清, 10 ml BMMY 培养液悬浮细胞沉淀, 30 $^{\circ}$ C 诱导表达培养, 每 24 h 补加甲醇至终浓度 1%, 连续培养 5 d, 离心收集上清, 浓缩后 4 $^{\circ}$ C 保存。

表达中对不同诱导剂量 (0.5%, 1%, 2% 甲醇), 不同 pH 值 (pH 3 ~ 4, pH 6 ~ 7), 蛋白酶抑制剂, 不同培养基等因素对诱导表达的影响作用进行观察。

1.2.6 重组表达蛋白的 SDS-PAGE 分析和

Western blot 鉴定

取浓缩的培养上清与等量的 SDS-PAGE 样品处理液混合, 加热后上样进行蛋白分析。

1.2.7 表达产物特异活性测定(ELISA 试验)

用破伤风重组蛋白包被酶联板, 分别加入破伤风抗毒素和 A 型肉毒抗毒素马血清(马血清购自卫生部中国药品生物制品检定所), 测定表达产物(rTetc)的特异结合活性, 以含空载体的酵母培养上清(Control)作为对照。

2 结果

2.1 *Tetc* 基因的 PCR 扩增

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以 λ DNA/*Hind* III 为标准分子质量。结果获得了大小为 1.3 kb 左右的扩增带, 结果见图 1。

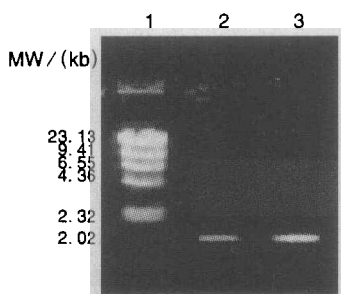


图 1 *Tetc* 基因的 PCR 扩增

1: DNA 标准分子量 λ DNA/*Hind* III; 2, 3: *Tetc* 的 PCR 产物。

Fig. 1 Analysis of *Tetc* amplified from *C. Tetani* by agarose gel electrophoresis

1: DNA molecular weight marker λ DNA/*Hind* III; 2, 3: PCR product of *Tetc*.

2.2 *Tetc* 基因的克隆与序列分析

序列分析结果表明, 克隆到的基因长度为 1 353 bp, 可编码 451 个氨基酸, 经与 Genbank 的已知序列对照分析, 其与已知的破伤风毒素的重链 C 端(*Tetc*)基因的同源性高达 99%, 可以认为此基因序列即为 *Tetc*。

2.3 重组表达质粒(pPIC-*Tetc*)的构建

重组表达质粒经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切, 能得到与外源目的片段 *Tetc* 和 pPIC 酶切片段大小相同的两条带, 图略。

2.4 *Tetc* 基因在毕氏酵母中的诱导表达和重组蛋白 rTetc 的鉴定(WB)

诱导的重组阳性克隆和空酵母细胞的培养上清浓缩样品进行 SDS-PAGE 分析, 诱导的重组阳性

克隆在蛋白质相对分子质量大小为 50 kD 处多一条诱导表达的蛋白带, 与预期的分子质量一致, 结果见图 2。经薄层扫描分析, 表达的目的蛋白占培养上清分泌蛋白的 10% 左右。结果如图 2 所示。

诱导与含空载体酵母细胞的培养上清浓缩样品进行 Western Blot 分析, 诱导的重组阳性克隆在蛋白质相对分子质量大小为 50 kD 处有一条特异免疫印迹带, 与预期的分子量一致, 结果见图 3。

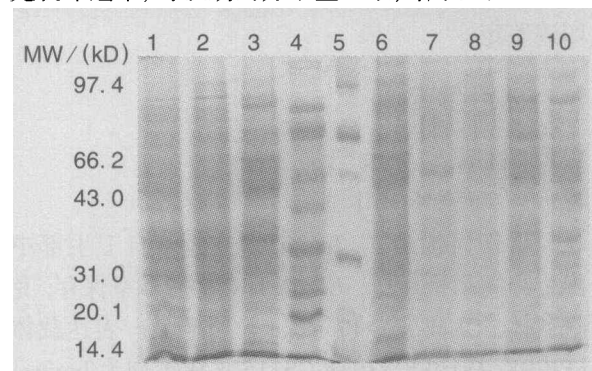


图 2 含 pPIC-*Tetc* 菌株的诱导分泌表达结果

1, 2: 未诱导的重组酵母菌; 3, 6~10: 诱导的重组菌 GS115 or KM71 的浓缩上清; 4: 诱导的含空载体酵母菌 GS115; 5: 蛋白相对分子质量。

Fig. 2 Analysis of *Tetc* expressed in *Pichia pastoris* harboring the plasmid pPIC-*Tetc* by SDS-PAGE

1, 2: preinduced pPIC-*Tetc*/GS115; 3, 6~10: Induced GS115 or KM71 harboring pPIC-*Tetc* suspension after concentrated; 4: Induced *Pichia pastoris* pPIC/GS115 suspension after concentrated; 5: Relative molecular weight marker.

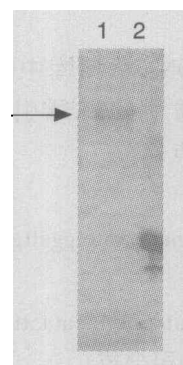


图 3 重组 *Tetc* 的分泌表达的鉴定(Western Blot)结果

1: 诱导的重组菌 GS115 的浓缩上清; 2: 转移标记。

Fig. 3 Identification of recombinant *Tetc* expressed in *Pichia pastoris* by WB

1: Induced GS115 harboring pPIC-*Tetc* suspension after concentrated; 2: transfer molecular marker.

2.5 重组蛋白的活性测定(ELISA)

经酶联免疫检测, 重组蛋白 rTetc 与破伤风抗

毒素血清具有特异结合活性, 而与 A 型肉毒抗毒素不具有结合活性, 结果见表 1.

表 1 重组表达产物 rTetC 蛋白的特异结合活性的测定
Table 1 Identification of the specific activity of rTetC to antiserum

抗原蛋白 Antigen	重组蛋白 rTetC	重组蛋白 rTetC	对照 Control
抗毒素马血清 Antiserum	破伤风抗毒素 Anti-tet	A 型肉毒抗毒素 Anti-BoNTa	破伤风抗毒素 Anti-tet
A ₄₉₀	1.067	0.093	0.051

3 讨论

目前, 对于外源蛋白的表达, 有多种表达系统可供选择: 各种原核高效表达载体, 昆虫细胞表达系统, 杆状病毒表达系统, 哺乳细胞表达系统以及酵母表达系统等, 而酵母表达系统具有特有的优势, 正在被越来越广泛的应用. 本研究我们选择利用新型的 *Pichia* 高拷贝基因表达载体 pPIC9K, 可通过对单拷贝克隆基因的 His⁺ 重组子进行加压筛选, 获得高拷贝整合的超抗 G418 的克隆株, 而且 α -因子信号肽可使甲醇诱导表达的外源蛋白分泌到胞外.

首先将 *TetC* 基因克隆入表达载体 pPIC9K, 用 *Sac* I 将重组质粒 pPIC9K-*TetC* 线性化, 分别电转化 *Pichia pastoris* GS115 和 KM71 细胞, G418 抗性筛选出阳性整合子, Mut⁺ 和 Mut⁻ 表型株分别进行甲醇快速和慢速利用诱导. 结果均筛选出 GS115 和 KM71 高表达株, 而不同的诱导条件对表达水平及表达产物的状态有非常大的影响. 第一, 营养条件: 在营养丰富的培养基 BMMY 中实现了分泌表达, 在 MMH 中则是胞内表达; 第二, pH 值: 低 pH 值使 Tet 表达产物降解, 而 Tet 稳定表达在 pH 5.0. 第三, 酵母宿主: 20 个 GS115 克隆有 2 个克隆有高表达, 10 个 KM71 克隆有 2 个克隆有高表达, 宿主的甲醇利用表型会影响表达水平. 其它一些因素如蛋白酶抑制剂的添加、通气量、湿度等对诱导表达结果也都有影响.

经过条件的优化, 最终筛选到蛋白表达量占上清蛋白约 10% 的分泌高表达株; 控制条件, 同时获得了胞内表达的高表达株, 表达量占全菌蛋白的 26%. 酶联免疫检测结果表明, 纯化的重组蛋白与破伤风抗毒素具有特异结合活性, 提示重

组表达蛋白具有天然蛋白的分子构象, 可以被特异性抗毒素所识别. 破伤风毒素保护性抗原的高表达为进一步的免疫学研究打下了基础, 而酵母表达系统中影响因素的评价为今后的其它外源蛋白的表达提供了借鉴.

参考文献 (References):

- [1] FISCHER P M, HOWDEN M E. Synthetic peptide antigens of tetanus toxin[J]. *Mol Immunol*, 1994, 31(15): 1141-1148.
- [2] FITZSIMMONS S P, CLARK K C, WILKERSON R, *et al*. Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside G(Tib) by monoclonal antibodies recognizing different epitopes[J]. *Vaccine*, 2000, 15: 19(1): 114-121.
- [3] DIETHELM-OKITA B M, RAGHAVANPILLAI R, OKITA D K, *et al*. Epitope repertoire of human CD4⁺ T cells on Tetanus toxin: identification of Immunodominant sequence segments[J]. *The Journal of Infection Diseases*, 1997, 175: 382-391.
- [4] REECE J C, GEYSEN H M, RODDA S J. Mapping the major human T helper epitopes of tetanus toxin. The emerging picture [J]. *Immunol*, 1993, 151(11): 6175-6184.
- [5] FAIRWEATHER N F, LYNESS V A, PICHARD D J, *et al*. Cloning, Nucleotide sequencing, and expression of tetanus toxin fragment C in *Escherichia Coli*[J]. *J Bacteriol*, 1986, 165: 21-27.
- [6] 贺华君, 何志勇, 施惠娟. 破伤风毒素 C 片段在大肠杆菌中的克隆与表达 [J]. *生物化学与生物物理学报* (HE H J, HE Zh Y, SHI H J, *et al*. Cloning and expression of Tetanus toxin fragment C in *E. coli*[J]. *Acta biochimica et biophysica sinica*), 2000, 33(4): 322-326.
- [7] EISEL U, REYNOLDS K, RIDDICK M, *et al*. Tetanus toxin light chain expression in Sertoli cells of transgenic mice causes alterations of the actin cytoskeleton and disrupts spermatogenesis[J]. *EMBO J*, 1993, 12(9): 3365-3372.
- [8] CLARE J J, RAYMENT F B, BALLANTINE S P, *et al*. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strain containing multiple tandem integrations of the gene[J]. *Biotechnology*, 1991, 9: 455-461.