

毕赤酵母表达的 HBV 全长 PreS 蛋白的分离纯化

The Purification of HBV Full-length PreS Protein in *Pichia pastoris*

韩 雪 叶林柏* 李宝宗 余应龙 叶 力 郑 珺 高 博 郝金荣, 吴正辉

HAN Xue, YE Lin-Bai*, LI Bao-Zong, SHE Ying-Long, YE Li, ZHENG Hong, GAO Bo, GAO Jin-Rong and WU Zheng-Hui

病毒学国家重点实验室/武汉大学生命科学院, 武汉 430072

National Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

摘 要 巴斯德-毕赤酵母工程菌株 GS115-PreS 经发酵在甲醇诱导下可高效表达分泌型全长 PreS 蛋白。Western blot 证明发酵液中存在可溶性的分子量为 48kD 的 PreS 蛋白和蛋白质颗粒, 蛋白质颗粒主要成分为 48kD 的全长 PreS 蛋白和 28kD 的 S 蛋白, 电镜观察发现蛋白质颗粒直径为 30nm。发酵液经过脱盐、浓缩处理后, 上清液经 DEAE-SFF 阴离子交换柱得到纯化的 PreS 蛋白, 超速离心和蔗糖密度梯度离心得到蛋白颗粒。该颗粒的主要组分为全长 PreS 蛋白(PreS1 + PreS2 + S), 还有少量的主蛋白(S)。ELISA 检测证明全长 PreS 蛋白和蛋白颗粒有着良好的抗原性, P/N 显示蛋白颗粒的抗原性比 PreS 蛋白的抗原性高。

关键词 HBV 全长 PreS 蛋白, 发酵, 分离纯化, 免疫原性

中图分类号 TQ93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0708-05

Abstract The *Pichia pastoris* strain GS115-PreS could produce a high expression level of full-length PreS protein that secreted to the supernatant after methanol induction in the fermentation. The Western blot analysis showed a single band with expected molecular mass of 48kD and that the major component of the particles was the full-length PreS protein(PreS1 + PreS2 + S) and small envelope protein(S) of 48 and 28 kD, respectively. Electron microscopy image showed PreS particles with 30 nm in diameter. The supernatants of the fermentation were desalted and concentrated. Purified PreS protein was obtained by DEAE-SFF anion exchange column chromatography and the PreS particles were obtained by ultracentrifugation and sucrose density gradient. The ELISA assay results proved that both full-length PreS protein and particles showed high immunogenicity and specificity. P/N ratio further demonstrated that the immunogenicity of the particles is higher than the full-length PreS protein.

Key words Full-length PreS protein, fermentation, purification, immunogenicity

乙肝病毒的感染严重威胁着人类的健康, 在世界范围内, 慢性乙肝感染是第十大致死原因, 每年导致 50 ~ 120 万病人的死亡^[1]。现在对于 HBV 的感染并没有有效的治疗方法, 因此接种有效的乙肝疫苗成为控制乙肝感染的最有效的途径^[2]。现在使用的乙肝疫苗主要是由啤酒酵母表达的乙肝表面抗原

主蛋白(HBsAg)组成, 对于控制 HBV 的传播起到了重要的作用。但是现有的疫苗亦存在不足之处, 仅对 90% 的接种人群有不同程度的保护作用, 对 10% 的人无反应, 而且疫苗接种后 HBV 可能产生逃逸突变^[3]。PreS1 蛋白中含有好几个免疫原性比 S 蛋白更强的 T 细胞和 B 细胞表位, 由 PreS1 引起的特异

性的细胞免疫应答可以帮助克服某些人对 S 蛋白的免疫无反应状态或同时对 S 和 PreS2 蛋白的双重无反应状态。在疫苗制剂中加入 PreS1 和 PreS2 的抗原表位后,人群对传统的乙肝疫苗的不反应和低反应频率大大降低^[4]。

毕赤酵母表达系统是现代分子生物学中研究透彻和应用很广的一种真核表达系统,在以甘油为碳源的生长期后,在表达期能以甲醇为唯一碳源和诱导物进行启动表达,其自身分泌到培养基中的蛋白种类很少,高效分泌表达的外源蛋白非常容易从无机盐培养基中提纯^[5]。DEAE-SFF 为阴离子快速交换柱,其吸附能力强,分离速度快,操作简单方便,非常适用于工业化生产。

本文报道了巴斯德-毕赤酵母 GS115-PreS^[6]表达的 PreS 蛋白及其形成的蛋白颗粒的分离纯化方法,制备的高纯度 PreS 蛋白有良好抗原性。为生产高效、廉价的新型乙肝疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种:巴斯德-毕赤酵母表达菌株 GS115-PreS 由本实验室保存。

1.1.2 设备:DS-10L 发酵罐购于镇江达森发酵设备有限公司,脱盐浓缩装置购于天津膜天膜工程有限公司,DEAE-SFF 阴离子交换柱购于安玛西亚生物技术有限公司。

1.1.3 检测用抗体:乙肝表面抗体阳性、阴性血清由武汉市同济医科大学附属医院获得,酶标二抗购自北京中山生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 巴斯德-毕赤 GS115-PreS 酵母高密度发酵:酵母工程菌株 GS115-PreS 在 BMGY 培养基中活化后,转种至含有 4% 甘油的 BMGY 培养基中,28℃ 培养 20~24 h 作为种子,再转种至 10L 发酵罐中,在含 4% 甘油的基本盐培养基中培养 32~38 h 后,加入甲醇诱导。

1.2.2 PreS 蛋白的分离纯化:发酵液上清经膜滤器脱盐浓缩后,用 DEAE-SFF 柱层析分离纯化,Tris-NaCl 梯度洗脱,分步收集。核酸蛋白质检测仪(HD-2000 型)监测下分别收集洗脱峰。

1.2.3 蛋白颗粒的分离纯化:发酵液上清经脱盐浓缩后,60 000 g 高速离心 1.5 h,收集沉淀。TNE(50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.6), 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl)重悬,20%~80%(W/V)的蔗糖梯度离

心 40000g 离心 1h。吸出颗粒带,PBS 重悬,40000g 离心 1h,收集沉淀,重复 4~5 次,沉淀重悬于 0.5% 吐温中,20000g 离心 15min,收集上清。

1.2.4 电镜观察:蔗糖梯度离心后收集的颗粒经洗糖处理后,PTA 负染,透射电镜放大 22000 倍观察。

1.2.5 Western blot 鉴定分离纯化的 PreS 蛋白和病毒颗粒:取上述纯化后得到的 PreS 蛋白和尿素处理后的蛋白颗粒,分别加入电泳上样缓冲液,沸水浴 5 min,取 10μL 加样电泳。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12%,电泳分离后,再将蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上,18V 恒压转膜 16h。将硝酸纤维素膜在 37℃ 5%脱脂奶粉溶液中封闭 60min。加入阳性血清(1:100 稀释)于 37℃ 温育 30min。洗膜后,加入 1:5000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 于 37℃ 温育 30min,充分洗涤后再用 DAP 显色。

1.2.6 ELISA 检测:取纯化的 PreS 蛋白和蛋白颗粒(尿素溶解),用碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释,包被酶标反应板 4℃ 过夜,在 5%脱脂牛奶中,37℃ 封闭 2h。待测血清样品用 PBS 稀释 50 倍;每孔加入 100μL,用已知的 HBV S 抗体阳性和阴性血清各一份作阳性和阴性对照;二抗为 1/5000 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。以 P/N 值 > 2 为阳性,OPD 显色 10min 后,加 50μL 2mol/L H₂SO₄ 中止反应。ELISA 酶标仪测定 OD₄₉₂ 值。

2 结果

2.1 巴斯德-毕赤 GS115-PreS 酵母发酵和 PreS 表达

10%接种于 10L 发酵罐,在基本盐培养基中进行发酵培养,36h 菌体量可达到 150g/L。甘油耗完后溶氧开始上升,再以甲醇为碳源进行诱导表达,诱导初期菌体处于适应期,甲醇浓度保持在 0.3%,菌量还会继续增加,可达到 180g/L。诱导期间甲醇浓度保持在 1%,溶氧稳定,60h 后,溶氧逐渐上升到 50 左右,菌量稳定在 100g/L,72h 左右结束诱导。

诱导 15~20h,上清中可检测出分泌的 PreS 蛋白,以后 PreS 逐渐增加,至 60h 后产量不会明显增加。随着发酵液中分泌的 PreS 蛋白增加,可自动聚合形成颗粒,诱导 72h 后,PreS 蛋白产量达到 10 mg/L,以可溶性和颗粒两种形式存在。若继续诱导,蛋白产量并不随着诱导时间的延长而增加。

2.2 全长 PreS 蛋白的分离纯化

发酵液上清经膜滤器脱盐浓缩处理后,高速离心去除颗粒沉淀,加 Tris(pH8.0)至 40mmol/L,然后

用 DEAE-SFF 层析柱纯化,用 Tris-NaCl 梯度洗脱,48kD 的 PreS 蛋白被 0.2 ~ 0.25 (mol/L) 的 NaCl 洗脱。收集洗脱峰,电泳检测只含有一条带(见图 1),而 28 ~ 36kD 的几条带可被 0.15 ~ 0.2 (mol/L) NaCl 先从柱中洗出。

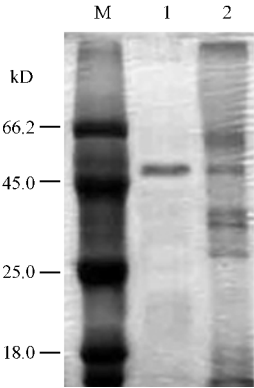


图 1 全长 PreS 蛋白的分离纯化

Fig. 1 The purification of the full-length PreS protein
M: protein molecular mass standards; 1: the purified full-length PreS protein; 2: the supernatant of the yeast culture.

2.3 电镜检测

经高速离心和蔗糖梯度离心获得的蛋白颗粒磷钨酸负染色后,透射电镜 22 000 倍下可以观察到直径为 25 ~ 30 nm 的球状蛋白颗粒,每个视野下均有 8 ~ 10 个,轮廓清晰,分布均匀规则,见图 2。分泌蛋白形成的蛋白颗粒,形态与乙肝病人血清中由 S 蛋白形成的大小 15 ~ 20nm 的蛋白颗粒相近,但直径稍大。

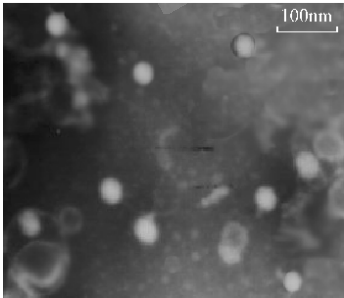


图 2 蛋白颗粒的电镜检测

Fig. 2 The detection of the PreS particles by electron microscopy

2.4 Western blot

Western blot 结果显示,分离纯化的 PreS 蛋白在 48kD 处显示一条单带,而尿素溶解的蛋白颗粒样品从进样孔开始,一直拖延至 ~ 48 kD 处(见图 3 smear 区),在 28kD 处也有一条淡淡的带,能与 S 抗体反应,其分子量与 S 蛋白相仿,很可能 PreS 蛋白之间存在相互作用,在形成蛋白颗粒时有极少量全

长 PreS 蛋白被切割,产生少量的 S 蛋白,这些 S 蛋白也参与了蛋白颗粒的形成。

Western blot 结果显示,无论是纯化的可溶性 PreS 蛋白还是形成蛋白颗粒,都具有很强的抗原性,能与病人血清中抗体呈强烈反应,而对照的不表达 PreS 的酵母培养上清中,不含与病人血清反应的蛋白。

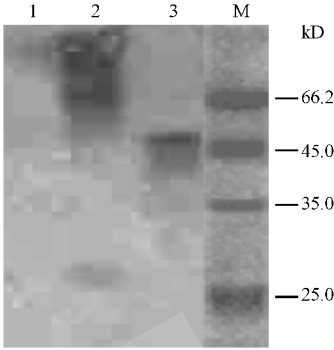


图 3 全长 PreS 蛋白和蛋白颗粒的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of the full-length PreS protein and PreS particles

1: negative cultured supernatant of GS115- pPIC9K; 2: PreS particles; 3: full-length PreS protein.

2.5 ELISA 鉴定

用纯化的 PreS 蛋白和尿素溶解的蛋白颗粒溶液分别包被酶标板,每孔包被蛋白约 50ng,平行测定已知的 S 抗体阳性和阴性血清各 20 份。结果可溶性 PreS 抗原检出的阳性平均值为 0.54,阴性平均值为 0.03, P/N 平均值为 21.6;蛋白质颗粒抗原检出的阳性平均值为 0.87,阴性平均值为 0.03, P/N 平均值为 34.8。

3 讨论

HBV 包膜蛋白由 S 基因,PreS1 基因,PreS2 基因编码。三者用同一个阅读框,各自有自己的起始密码子,而仅在 S 区 C 端有一个共同的终止密码子。形成 S 蛋白(S 基因编码),M 蛋白(PreS2 + S 编码),L 蛋白(PreS1 + PreS2 + S 编码)3 种,产生病毒的包膜蛋白含重要的抗原表位^[7],其中 L 蛋白对病毒装配和感染过程很重要。

研究表明 HBV 首次感染的时间越早,发展成为慢性携带者的可能性越高:超过 90% 的新生儿感染了 HBV 会发展为慢性感染者,而成人只有 5% ~ 10% 会发展为慢性感染者^[8]。目前抗病毒治疗是减少慢性 HBV 感染发病率和死亡率的唯一途径。传统的 IFN- α 和拉米夫啶是治疗 HBV 的首选药物。但

IFN- α 和拉米夫定都只能在一定比例的患者中产生持久的疗效,可能还会产生一些副作用和抗药性^[9]。乙肝表面抗原主蛋白(S),是现有疫苗的主要成分,对于控制 HBV 的传播起到了重要的作用,但是有 10% 左右的人群对此不能产生免疫应答,而且由于婴幼儿的免疫系统发展不完善,在对婴幼儿的使用过程中也存在不应答和安全方面的问题。所以,开发更加安全、更有效的乙肝疫苗可能是防止 HBV 传播的更理想的途径。

研究证明 PreS1 (21-47aa) 为肝细胞表面受体的结合位点,对这一区段的抗体有可能阻断 HBV 与肝细胞的结合,抗 PreS1 (21-47aa) 多肽的抗血清具有体外中和病毒的能力,用 PreS1 (21-47aa) 多肽免疫猩猩可使其免受 HBV 侵染^[10,11],用识别 PreS1 (37-45aa) 的人源化抗体静脉注射黑猩猩可使其在一年内免受 HBV 侵染^[12]。另外在 PreS2 (120-145aa) 顺序中有能中和病毒的抗原决定簇。用痘苗病毒表达系统将 HBV PreS 蛋白主要的抗原表位 PreS2 (120-146) 和 PreS1 (21-47) 与 S 蛋白融合后表达,形成了分泌性的病毒颗粒。在 BALB/c 小鼠中,这些嵌合 HbsAg 颗粒能够对 S, PreS1 和 PreS2 抗原产生很强的抗体反应^[13]。含有 PreS1 和 PreS2 的 HBV 疫苗在人体内显示有更好的免疫原性,并且比传统 HBV 疫苗更快地产生抗体反应。这种疫苗在新生儿中有着更好的耐受性和安全性。在两针注射后即可产生更高滴度的抗 HBs 的抗体^[14]。因此,乙肝疫苗以全长的 PreS 蛋白(PreS1 + PreS2 + S)为主要成分可以取得更好效果。

巴斯德-毕赤酵母菌株 GS115-PreS 经高密度发酵,在甲醇诱导下可高效表达分泌型全长 PreS 蛋白。所用基本盐培养基,成本低。在此基础上我们对培养条件进行了摸索,结果发现(1)若 pH 长时间高于 5.5 时,菌体生长速度慢,36 h 只能达到 100 g/L;在菌体培养时若不及时补加氨水,大约每 6h pH 下降 1,当 pH 低于 2.5 时,菌体停止生长。(2)Pres 蛋白为胞外产物,诱导时期菌体的密度对蛋白表达量有一定的影响,诱导时期菌体密度应在 120g/L ~ 190g/L 范围内,菌体密度过低蛋白表达量低,菌体密度 > 200g/L 时,在 10L 发酵罐内由于通气量的限制,蛋白的表达量并不能随着菌体密度的增加而相应增加,片面追求高菌体密度而推迟诱导时间反而使蛋白表达量下降(3)甲醇诱导是决定蛋白表达量的关键,若过早开始诱导,由于甘油未耗完,菌体不利用甲醇而使罐内甲醇积累,而甲醇浓度过高会导致菌

体快速死亡;若过晚开始诱导,蛋白表达产量低。(4)无论在适应期或诱导期,甲醇浓度不能太高,否则酵母生长受到抑制甚至死亡,但是如果甲醇浓度过低,诱导无效,产量也很低。实验表明控制甲醇诱导的时机和甲醇浓度,是提高表达产量的关键。

目标蛋白 PreS 分子量为 48 kD,发酵液中没有与其分子量相近的杂蛋白,因此易于分离纯化。用我们膜滤器脱盐浓缩处理结合 DEAE-SFF 层析柱纯化的方法,可得到纯度为 98% 的 PreS 蛋白,且抗原性好。全长 Pres 蛋白由于其自身的特性,在酵母表达系统中的表达量很低,其分离纯化的方法在国内未见其他报道,国际现有报道中最高的表达水平为 4 mg/L^[15],我们的表达水平达到了 10 mg/L,通过成熟简便的分离纯化工艺,收率达到 85%。

综上所述,乙型肝炎病毒全长 PreS 蛋白在毕赤酵母中不仅能够分泌表达,而且能形成蛋白质颗粒。表达产物易于分离纯化,适合大规模生产,有望发展成为新一代的乙型肝炎工程疫苗。我们对毕赤酵母表达的 HBV 全长 PreS 蛋白和蛋白颗粒的发酵以及 PreS 分离纯化条件的摸索,为安全、高效、低价疫苗的生产提供了参考数据,奠定了工业大规模生产的基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*, 2004, **11**: 97 - 107
- [2] Najib ul-Haq, Syed S Hasnain, Muhammad Umar *et al.* Immunogenicity of 10 and 20 μ g hepatitis B vaccine in a two-dose schedule. *Vaccine*, 2003, **21**: 3179 - 3185
- [3] Holzer G W, Mayrhofer J, Leitner J *et al.* Overexpression of hepatitis B virus surface antigens including the PreS1 region in a serum-free Chinese hamster ovary cell line. *Protein Expr Purif*, 2003, **29**(1): 58 - 69
- [4] Milich DR. T and B cell recognition of hepatitis B viral antigen. *Immunology Today*, 1988, **9**: 380 - 386
- [5] Zhang RA(章如安), Yang S(杨 晟), Qiu RX(秋荣德) *et al.* Advances in the study of *Pichia pastoris* expression system. *Microbiology* 2000, **27**(5): 370 - 373
- [6] Sun MH(孙明颢), Ye LX(叶林柏), Gao JR(郜金荣) *et al.* Expression of the full length pres gene of hepatitis B virus in *Pichia pastoris*. *Virologica Sinica* 2003, **18**(2): 99 - 103
- [7] Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the Hepatitis B Viruses. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 651 - 693
- [8] Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**: 761 - 785
- [9] Kumar R, Agrawal B. Novel treatment options for hepatitis B virus

- [10] Neurath AR , Kent SBH , Strick N *et al* . Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* , 1986 **46** : 429 – 436
- [11] Neurath AR , Seto B , Strick N . Antibody to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein are virus-neutralizing and protective. *Vaccine* , 1989 **7** : 234 – 236
- [12] Hong HJ , Ryu CJ , Hur H *et al* . *In vivo* neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in chimpanzees. *Virology* , 2004 **318** (1) : 134 – 141
- [13] Hui J , Li G , Kong Y *et al* . Expression and characterization of chimeric hepatitis B surface antigen particles carrying PreS epitopes. *J Biotechnol* , 1999 , **72** (1 – 2) : 49-59
- [14] Madalinski K , Sylvan SP , Hellstrom U *et al* . Presence of anti-PreS1 , anti-PreS2 , and anti-HBs antibodies in newborns immunized with Bio-Hep-B vaccine. *Med Sci Monit* , 2004 , **10** (1) : 110 – 117
- [15] Tadanori Yamada , Hidehiko Iwabuki , Takashi Kanno *et al* . Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1-pre-S2-S) protein. *Vaccine* , 2001 , **19** : 3154 – 3163