

重组猪卵透明带抗原 pZP3 α 在毕赤酵母中的分泌表达 Secretory Expression of Recombinant Porcine Zona Pellucida Glycoprotein-3 α (rpZP3 α) in *Pichia pastoris*

高彦茹, 潘善培*, 谢琪璇, 肖鑫娟, 柯 琼, 李文星, 史卫卫

GAO Yan-Ru, PAN Shan-Pei*, XIE Qi-Xuan, XIAO Luan-Juan, KE Qiong, LI Wen-Xing and
SHI Wei-Wei

暨南大学生殖免疫研究所, 广州 510632

Institute of Reproductive Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 为制备 rpZP3 α 蛋白供发展避孕疫苗研究, 将编码天然提取 pZP3 α 上的 DNA 序列(446~1423)插入至毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZ α A 上, 重组质粒 pPICZ α A-pZP3 α 线性化后通过电穿孔转入毕赤酵母 GS115, 经抗生素 Zeocin 筛选获得工程菌。在 2L 发酵罐中, 用甲醇诱导工程菌进行高密度发酵生产 rpZP3 α 。分离浓缩发酵上清液, 通过整合铜离子的亲和柱纯化 rpZP3 α , 用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行鉴定, 以 Quantity One 软件对 rpZP3 α 进行定量分析并计算纯度和回收率。用 rpZP3 α 免疫家兔, 以 ELISA 法和间接免疫荧光法检测抗血清对 rpZP3 α 和猪卵透明带的抗体反应。获得了分泌表达 rpZP3 α 的工程菌, 其高密度发酵产物经分离纯化后获得能与抗 pZP3 抗体反应的 46kD 成分, 命名为 rpZP3 α , 平均产量为 8mg/L, 纯度达 92%, 回收率为 63%。用其免疫家兔获得抗 rpZP3 α 抗血清, ELISA 测定显示能与 rpZP3 α 和天然提取 pZP3 反应。间接免疫荧光法分析显示抗 rpZP3 α 抗血清能与猪卵透明带反应, 产生亮绿荧光。用酵母表达系统成功表达了 rpZP3 α , 该蛋白保留有天然 pZP3 的免疫活性。

关键词 重组 pZP3 α 蛋白, 毕赤酵母, 分泌表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0499-05

Abstract To obtain the recombinant pZP3 α protein for the study of the contraceptive vaccines, the DNA sequence(446-1423) encoding purified pZP3 α was inserted into a vector——pPICZ α A. The recombinant plasmid pPICZ α A-pZP3 α was linearized and then transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. Engineering strains were attained by screening with zeocin and induced to produce rpZP3 α in high-density fermentation. Then rpZP3 α was purified by Cu²⁺ metal affinity column chromatography from the separated and concentrated fermentative supernatants. The purified rpZP3 α was identified by SDS-PAGE and Western blot, and the quantity, purity and rate of recovery of the rpZP3 α were analyzed by Quantity One software. One male rabbit was immunized with the Cu-NTA-purified rpZP3 α . The antibody responses against rpZP3 α and porcine ZP were detected by ELISA and the indirect immunofluorescence. Engineering strains expressing rpZP3 α in secretion were constructed. A 46kD component named rpZP3 α which can react with anti-pZP3 antibody was purified from fermentative supernatants of engineering strains and the average yield of purified rpZP3 α obtained from fermentative supernatants was 8mg/L. The purity and the rate of recovery were up to 92% and 63% respectively. The anti-rpZP3 α antiserum was prepared by immunization of a male rabbit with

Received: November 2, 2005; Accepted: February 20, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China(No.30570683&30370541).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85220468; E-mail: tpansp@jnu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30570683 和 30370541).

purified rpZP3 α . This anti-rpZP3 α antiserum could react with rpZP3 α and purified pZP3 in ELISA and bind to porcine zona pellucida which produced bright green fluorescence in the indirect immunofluorescence. The rpZP3 α (46kD) protein could be successfully expressed in the *Pichia pastoris* expression system. And this protein retained the immunogenic activity of natural pZP3.

Key words recombinant porcine zona pellucida glycoprotein-3 α (rpZP3 α), *Pichia pastoris*, secretory expression

卵透明带(zona pellucida, ZP)是包被在哺乳动物卵细胞及着床前胚胎外的一层非细胞结构,是卵泡发育过程中由卵母细胞和颗粒细胞分泌的一种酸性糖蛋白。其主要功能是参与受精过程的精卵识别、阻止多精子受精和诱发顶体反应。早期的免疫研究工作表明 ZP 抗原组分具有组织特异性和种属交叉反应性,进而使其成为发展孕前型避孕疫苗的一种理想靶抗原^[1]。猪卵透明带蛋白(pZP)对异种动物具有很强的免疫原性,研究已证实抗 pZP3 血清能与猪卵透明带发生交叉反应,并阻断人精卵结合^[2],因此 pZP3 被用于发展人用避孕疫苗的研究。pZP3 由 pZP3 α 和 pZP3 β 组成,其中 pZP3 α 具有精子受体活性,在精卵识别中起重要作用,是发展避孕疫苗的一种重要抗原^[3]。目前,用于免疫动物观察抗生育效果的 pZP3,大多从天然卵巢提取获得,从猪卵巢中很难获得大量高纯度的 pZP3 α ,为了进一步研究 pZP3 α 免疫避孕的分子机制和评价其抗生育效果及安全性,我们试图通过基因工程获得这一抗原成分。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*, Pp)作为一种高效的真核蛋白表达体系,具有真核细胞翻译后的加工和修饰功能,并且能将所表达的蛋白产物分泌到细胞外的培养基中,便于分离和纯化。卵透明带蛋白是一种糖蛋白,适当的糖基化修饰作用可能会增加卵透明带抗原的免疫效能。因此,本研究中选用分泌型表达载体 pPICZ α A 构建重组 pZP3 α 真核表达质粒,在巴斯德毕赤酵母表达体系中发酵表达了 pZP3 α ,以期获得具有免疫效能的 rpZP3 α 抗原,为避孕疫苗研究提供重要材料来源。

1 材料和方法

1.1 材料

目的基因质粒 pZ58 由美国 Zonagen 公司 Jeffrey D. Harris 博士馈赠;兔抗猪 ZP3 和猪 ZP3 蛋白均由本实验室制备;其他试剂均为国产或进口分析纯。Chelating Sepharose Fast Flow 柱为 GE 公司产品,由本实验室用 Cu²⁺ 螯合。成年新西兰雄兔购自中山医学院实验动物中心,新鲜猪卵巢从广州市肉联厂采集。

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸引物:所用引物及其序列见表 1。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列
Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
P1(5' primer)	5'-CGGAATTCGATGTTCCAACCATGG-3'
P2(3' primer)	5'-TAGTCGACCGCAGCAGGACAGGTTCT-3'
α -factor(5' primer)	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'
3'AOX1(3' primer)	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

根据 pZP3 α cDNA 序列,设计引物 P1 和 P2,扩增 446-1423 基因序列(含天然提取 pZP3 α 抗原序列),使 P1 和 P2 分别带有 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点(由北京三博远志生物技术有限责任公司合成)。毕赤酵母表达系统通用引物 α -factor 和 3'AOX1 由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2.2 重组质粒 pPICZ α A-pZP3 α 的构建:以含有 pZP3 α 基因片段的 pZ58 质粒为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。其 PCR 产物和载体 pPICZ α A 按常规方法进行双酶切、连接并转化感受态大肠杆菌 Top10,利用 Zeocin 抗性筛选阳性转化子。挑阳性单克隆进行扩增培养、抽提质粒,对构建的重组质粒 pPICZ α A-pZP3 α 进行双酶切鉴定和测序(由上海博亚生物技术有限公司测序)。

1.2.3 酵母工程菌 GS115-pZP3 α 的构建:碱裂解法大量抽提测序正确的重组质粒 pPICZ α A-pZP3 α ,取 5~10 μ g 用 *Sac* I 限制酶进行线性化。线性化质粒加入 GS115 酵母感受态细胞(参照 Invitrogen 公司手册制备),混合均匀,用 Bio-Rad 电转仪进行电打孔。转化产物涂布含 Zeocin(100 μ g/mL)的 YPDS 板,28~30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d,挑取数个单克隆分别接种于含高浓度 Zeocin(1000 μ g/mL)的 YPD 培养液,进行高拷贝重组子的筛选,筛选 3~4 轮,最后涂布 YPD 平板,挑取单克隆进行菌体破碎,用引物 P1、P2 和 α -factor、3'AOX1 进行 PCR 鉴定。

1.2.4 工程菌的诱导表达及分析:挑取工程菌单克隆,接种到 5mL YPD 中,于 28~30 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜;取 50~100 μ L 菌液转到 10mL BMGY 培养基中,220r/min 振荡培养 16~18h,无菌条件下,3 000r/min 离心去上清,沉淀用 20mL BMMY 重悬,继续培养,

每隔 24h 加甲醇(终浓度 1%),诱导培养 96h 后,取培养上清作 SDS-PAGE 和 Western blot 分析鉴定。

1.2.5 重组 pZP3 α 抗原的制备:工程菌经小批量优化培养后,在 2L 自控式发酵罐高密度发酵生产目的蛋白,培养条件为 pH6.0,1% 甲醇诱导表达 32h,发酵方法参照文献[4]。从发酵液分离的上清液经 10kD 超滤膜超滤浓缩后,上样至预先用上样缓冲液 PBS(含 0.5mol/L NaCl 的 0.02mol/L PB,pH 7.4)平衡的 Cu²⁺ 螯合 Chelating Sepharose Fast Flow 柱,接着用上样缓冲液洗至基线,用约 3 个柱体积的含 0.5mol/L NH₄Cl 的 0.02mol/L PB 洗涤后再用含 0.1 mol/L 咪唑的 PBS 进行洗脱,收集洗脱峰组分,用 G25 脱盐柱脱盐,冻干。

1.2.6 兔抗 rpZP3 α 抗体的制备与检测:取纯化的 rpZP3 α 蛋白,按常规方法免疫成年新西兰雄兔,制备抗血清。从新鲜猪卵巢中分离出卵细胞,用间接免疫荧光法检测抗 rpZP3 α 抗血清与猪卵透明带的反应,并用免疫前的兔血清作对照。用等量的 rpZP3 α 蛋白和天然纯化 pZP3 蛋白(1 μ g/孔)包被 96 孔板,分析采用间接 ELISA 法,取兔抗 rpZP3 α 血清(1:400)进行反应,酶联检测仪 450nm 下测每孔吸光度值。比较抗 rpZP3 α 抗体与 rpZP3 α 及天然 pZP3 的反应。

1.2.7 纯化后 rpZP3 α 纯度和回收率的计算:通过 Quantity One 软件分析 SDS-PAGE 电泳结果,以 BSA 作为标准对照物,计算每次发酵表达的 rpZP3 α 产量,以及纯化后 rpZP3 α 的纯度和回收率。

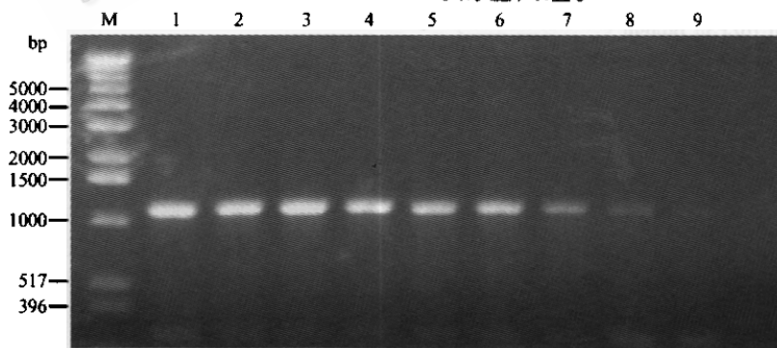


图 2 酵母重组子的 PCR 鉴定

Fig.2 The PCR analysis of GS115 recombinants

M: markers; 1~8: the amplified fragments of 1~8 recombinants using α -factor and 3'AOX1 as primers; 9: the GS115 control.

2.3 诱导表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

在摇瓶中工程菌经 96h 1% 甲醇诱导表达,培养上清 SDS-PAGE 图谱见图 3,与空载体转化酵母菌表达产物对比,在约 38kD 和 46kD 位置有特异蛋白表达带(lane1)。Western blot 鉴定结果亦显示二者均

2 结果

2.1 重组质粒的构建

重组质粒 pPICZ α A-pZP3 α 电泳图谱见图 1(lane 1),经双酶切后,除在 3.5kb 位置有一条与空载体一致的带外,在 1kb 处有明显的目的片段特异带(lane 3),取此单克隆进行测序,结果表明插入的序列和方向正确。

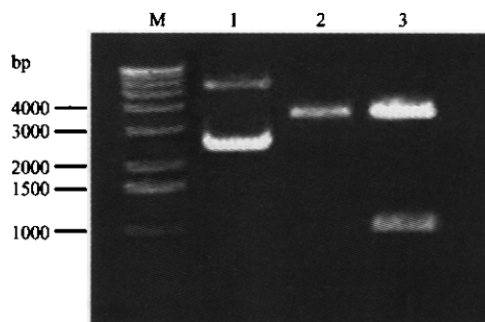


图 1 质粒 pPICZ α A/ pPICZ α A-pZP3 α 的酶切鉴定

Fig.1 Enzyme analysis of plasmid pPICZ α A/ pPICZ α A-pZP3 α
M: markers; 1: pPICZ α A-pZP3 α ; 2: pPICZ α A/EcoR I + Sal I; 3: pPICZ α A-pZP3 α /EcoR I + Sal I.

2.2 重组子的 PCR 鉴定

经 Zeocin 压力筛选后,涂布 YPD 平板,培养 2~3d,从 YPD 平板上挑取单克隆,用引物 P1, P2 PCR 扩增获得有 1kb 的特异带阳性克隆,而后用 α -factor、3'AOX1 进行 PCR 扩增鉴定,结果见图 2,这些阳性克隆在 1.2kb 位置可见特异带。表明 1~8 号单克隆中,重组质粒 pPICZ α A-pZP3 α 已稳定地整合到酵母的基因组。

能与兔抗 pZP3 抗血清反应(lane2)。

2.4 rpZP3 α 的发酵制备及兔抗 rpZP3 α 抗体的检测

高密度发酵产物经亲和层析纯化后收集洗脱峰组分进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,仅获得相对分子量约 46kD 的 rpZP3 α 蛋白,能与兔抗 pZP3 抗体反应(图 4 lane2)。

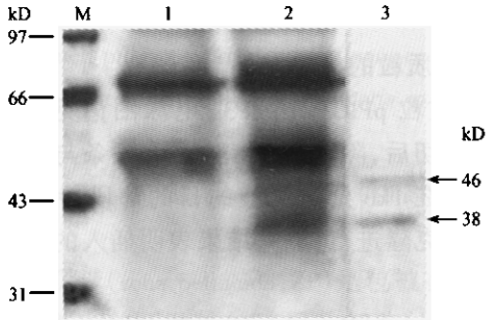


图3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.3 The SDS-PAGE and Western blot analysis of the expression supernatant of GS115-pZP3α engineering strains

M: low molecular weight protein standard; 1: the SDS-PAGE of GS115 control; 2: the SDS-PAGE of engineering strains; 3: the Western blot result of engineering strains.

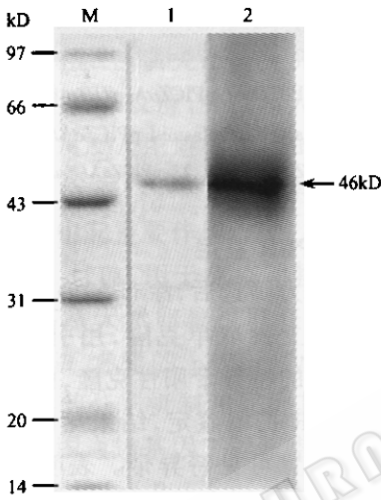


图4 纯化后的 rpZP3α 的 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析

Fig.4 The SDS-PAGE and Western blot analysis of purified rpZP3α protein

M: low molecular weight protein standard; 1: the purified rpZP3α reacted with anti-pZP3 antibody in Western blot; 2: the SDS-PAGE of purified rpZP3α (about 46kD).

用 rpZP3α 免疫家兔能诱发抗 rpZP3α 抗体反应, 免疫 6 周后, 抗体滴度可达 1:12 800。从新鲜卵巢中分离出的卵子与 1:50 的抗血清共同孵育后, 与 FITC 标记的羊抗兔 IgG 反应后可见在卵透明带上呈现强的亮绿荧光(图 5 left), 用免疫前兔血清同样处理的卵子没有荧光反应(图 5 right)。

2.5 兔抗 rpZP3α 抗体与 rpZP3α 及天然 pZP3 抗原的反应比较

rpZP3α 蛋白免疫家兔得到的抗血清, 分别同 rpZP3α 蛋白和提取的天然 pZP3 进行反应, 结果见图 6, 免疫后不同时期分离的抗血清与两种抗原反应的强度和趋势基本一致。

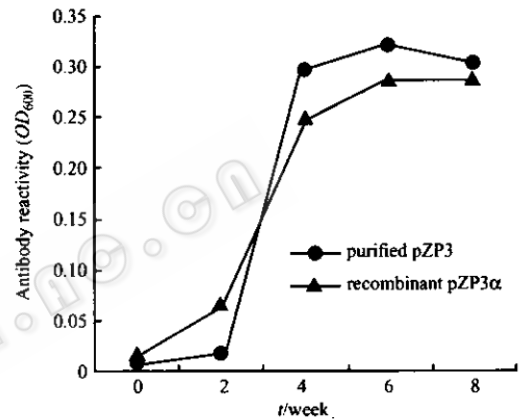


图6 抗 rpZP3α 抗体与重组抗原及天然纯化 pZP3 抗原的反应比较

Fig.6 The reaction of anti-rpZP3α antibody with rpZP3α and purified pZP3, showing identical reactivity

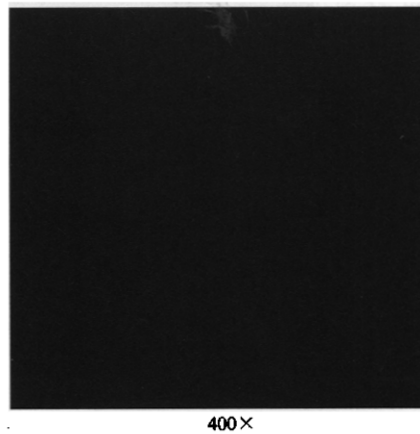
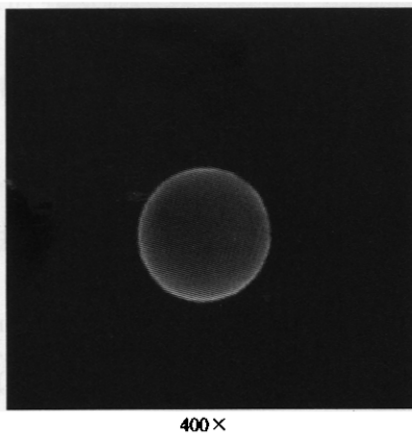


图5 间接免疫荧光法检测兔抗 rpZP3α 抗体与猪卵透明带的反应

Fig.5 Reaction of anti-rpZP3α antibody with porcine oocyte detected by indirect immunofluorescence The zona pellucida of porcine oocyte treated with rabbit anti-rpZP3α show bright green fluorescence (left), no fluorescence in the control oocyte (right).

2.6 纯化后 rpZP3 α 产量、纯度和回收率的计算

分析结果表明,纯化后 rpZP3 α 产量平均值为 8mg/L,其纯度均值为 92%,从发酵液获得 rpZP3 α 的回收率可达 63%。

3 讨论

目前,通过基因重组来制备卵透明带抗原的体系有细菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞^[5,6]以及病毒^[7,8]等。pZP3 α ^[9]、pZP3 β ^[10]、pZP4^[11]、人 ZP3^[12]等均已在大肠杆菌中获得表达,虽然大肠杆菌生长快,培养基廉价,但由原核系统获得的是非糖基化蛋白。而通过昆虫细胞和哺乳动物细胞表达的外源蛋白虽能够得到良好的蛋白翻译后修饰和加工,但其纯化难度大,成本高,难以大量制备。毕赤酵母表达系统是目前分子生物学领域中用于表达重组蛋白的常用工具之一,具有表达量高,糖基化形式更接近于高等真核生物,易于实现低成本的高密度发酵等优点^[13]。目前在酵母体系中分泌表达成功的卵透明带蛋白有人 ZP3^[14]和鼠 ZP3(mZP3)^[15],而 pZP3 α 作为免疫避孕研究的一种重要抗原,在酵母体系中的表达情况目前国内外均未报道。本研究中首次成功构建了能够分泌表达 rpZP3 α 的酵母工程菌,通过高密度发酵制备的 rpZP3 α ,能与抗天然 pZP3 抗体发生特异反应,免疫家兔获得的抗 rpZP3 α 抗血清能与猪卵透明带反应,研究结果表明我们通过酵母系统获得的 rpZP3 α 保留有天然 pZP3 的免疫活性,初步解决了 pZP3 α 抗原来源的问题。

但研究中仍存在一些问题,如在摇瓶中酵母工程菌经甲醇诱导表达后,SDS-PAGE 及 Western blot 分析显示在相对分子量约 46kD 和 38kD 位置呈现能与抗 pZP3 抗体反应的特异条带,而用发酵罐大量制备的 pZP3 α 抗原纯化后,Western blot 结果显示仅有约 46kD 大小的特异带。在摇瓶小体积培养体系出现两种大小不一表达产物的原因还有待进一步分析,推测小体积培养出现两条不同特异带的原因可能与糖基化程度不一致有关,也可能 38kD 组份是 46kD 组分被酵母部分酶解的产物。此外,目的蛋白的回收率不够理想,仅为 63%,表明发酵上清浓缩和目的蛋白纯化过程中,还是浪费了很多抗原,如何改进工艺,减少制备过程中的蛋白损失,提高目的蛋白的产量,以及通过酵母系统获得的 rpZP3 α 能否阻断精卵结合和重组疫苗的安全性等问题,都有待于进一步深入地研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gupta SK, Srivastava N, Choudhury S *et al.* Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. *Journal of Reproductive Immunology*, 2004, **62**:79 - 89
- [2] Henderson CJ, Hulme MJ, Aitken RJ. Analysis of the biological properties of antibodies raised against intact and deglycosylated porcine zonae pellucidae. *Gamete Res*, 1987, **16**:323 - 341
- [3] Barber MR, Frayer-Hosken RA. Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. *Journal of Reproductive Immunology*, 2000, **46**:103 - 124
- [4] Xie QX(谢琪璇), Yu W(余巍), Pan SP(潘善培) *et al.* Cloning and expression of recombinant human cytomegalovirus peptide gene in *Pichia pastoris*. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2005, **25**(3):29 - 34
- [5] Harris JD, Seid CA, Fontenot GK *et al.* Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr Purif*, 1999, **16**(2):298 - 307
- [6] Tsubamoto H, Yamasaki N, Hasegawa A *et al.* Expression of a recombinant porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 in mammalian cells. *Protein Expr Purif*, 1999, **17**(1):8 - 15
- [7] Hardy CM, Ten Have JF, Pekin J *et al.* Contraceptive responses of mice immunized with purified recombinant mouse zona pellucida subunit3 (mZP3) proteins. *Reproduction*, 2003, **126**(1):49 - 59
- [8] Lloyd ML, Shellam GR, Papadimitriou JM *et al.* Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse zona pellucida3. *Biol Reprod*, 2003, **68**(6):2024 - 2032
- [9] Xu WX(徐万祥), Qiu DY(邱德义), Jia XM(贾小明) *et al.* Study on the expression of porcine zona pellucida(ZP)-3 α in a prokaryotic system. *Chinese Journal of Immunology*(中华免疫学杂志), 2000, **16**:303 - 306
- [10] Xie QI(谢秋玲), Chen XJ(陈小佳), Zhu WJ(朱伟杰) *et al.* Expression of core domain of porcine zona pellucida protein 3 β in *E. coli*. *Reproduction & Contraception*(生殖与避孕), 2005, **25**(7):387 - 390
- [11] Sun XX(孙晓溪), Xu WX(徐万祥), Qiu DY(邱德义) *et al.* Study on high-level expression of porcine zona pellucida-4 protein in *E. coli*. *Chinese Journal of Immunology*(中华免疫学杂志), 2001, **17**:660 - 663
- [12] Xu WX(徐万祥), He YP(何亚萍), Hong AZ(洪爱真) *et al.* High-level expression and purification of human zona pellucida huZP3a22-176 and huZP3b177-348 peptides in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Immunology*(中华免疫学杂志), 2004, **24**(3):143 - 148
- [13] Sreerekshna K, Kropp KE. *Pichia pastoris: Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 1997, pp.293 - 311
- [14] Tang J(唐健), Xie QX(谢琪璇), Pan SP(潘善培) *et al.* Expression of recombinant human zona pellucida 3 protein(rhZP3) in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003, **19**(6):758 - 762
- [15] Shan WJ(单文娟), Liu ZY(刘忠渊), Zhang XY(张馨月) *et al.* Secreted expression of murine zona pellucida 3 in *Pichia pastoris*. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2004, **24**(2):41 - 44