乙肝表面抗原在酿酒酵母中的异源表达

邱 玲[1,2]，钱俊佳[3]，康 振[1,2]，陈 坚[*2,4]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏无锡 214122；3. 希森美康生物科技无锡有限公司，江苏 无锡 214028；4. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：乙肝表面抗原 HBsAg 是乙肝疫苗的主要组分。从转录水平、翻译水平以及翻译后水平对其进行优化，实现了 *HBsAg* 在重组酿酒酵母中的高效异源表达。与组成型启动子 TEF1、TDH3、HXT7、ADH1 相比，诱导型启动子 GAL1 可大幅度提高 *HBsAg* 的表达；与 GCCACC 和 AAAAAA 相比，kozak 序列 TACACA 最有利于 *HBsAg* 的翻译表达；而共表达二硫键异构酶 *pdi* 对 *HBsAg* 的活性表达具有显著的促进作用。通过 3 种水平的优化，HBsAg 活性从最初的 8.87 IU/g 提高至 151.08 IU/g；最终，利用 Ni 柱亲和层析成功获得纯化的 HBsAg，活性为 3.32 IU/mL。

关键词：酿酒酵母；乙肝表面抗原；启动子；kozak 序列；共表达

中图分类号：Q 753　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)09—0906—08

Heterologous Expression of HBsAg in *Saccharomyces* Cerevisiae

QIU Ling[1,2]，*QIAN Junjia*[3]，*KANG Zhen*[1,2]，*CHEN Jian*[2,4]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Sysmex Biotech Co., Ltd. in Wuxi, Wuxi 214028, China; 4. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: Hepatitis B surface antigen (HBsAg) is a major component of the hepatitis B vaccine. In the present work, we achieved its high efficient heterologous expression in the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by optimization at three levels: transcription, translation and post-translation. Compared with the constitutive promoters TEF1, TDH3, HXT7 and ADH1, the inducible promoter GAL1 substantially increased the expression of *HBsAg*. Moreover, compared with GCCACC and AAAAAA, the kozak sequence TACACA is more beneficial to the translation and active expression of *HBsAg*. More importantly, co-expression of protein disulfide isomerase (PDI) also significantly increased the expression of *HBsAg*. Through three levels of optimizations, the activity of recombinant HBsAg was increased from 8.87 IU/g CDW to 151.08 IU/g CDW. Finally, applying the Ni column affinity chromatography, we successfully obtained the purified

收稿日期：2014-02-28

基金项目：国家 863 计划重点项目(2011AA100905)；教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1135)；国家博士后基金面上项目(2013 M540414)；江苏省优势学科项目。

***通信作者**：陈 坚(1962—)，男，江苏无锡人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶技术、发酵过程优化与控制研究。E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

HBsAg with an activity of 3.32 IU/mL.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, HBsAg, promoter, kozak sequence, co-expression

乙型肝炎病毒(*Hepatitis B virus*,*HBV*)属致癌性病毒,严重危害人类的健康,*HBV* 感染会引起急、慢性病毒性肝炎,其感染性强、携带率高、流行面广、慢性化倾向严重,更有部分感染者会发生肝硬化和肝细胞癌[1]。目前尚无特异性药物可完全控制其传染和流行暴发,预防和控制乙肝病毒感染最有效的方法是接种乙肝疫苗[2-4]。乙肝疫苗的主要有效成分为乙肝表面抗原(*Hepatitis B virus* surface antigen,HBsAg),HBsAg 由 *HBV S* 基因编码[5],是在 *HBV* 增殖过程中产生的包膜蛋白质,是 *HBV* 的主要特征抗原,具有与天然病毒相近的抗原表位,可以刺激机体产生保护性中和抗体而预防 *HBV* 感染。

乙型肝炎疫苗的研制先后经历了血源性疫苗和基因工程疫苗阶段,血源性乙肝疫苗因血源供应有限且具有潜在的危险性,已逐步被基因工程疫苗所取代。目前基因工程乙肝疫苗技术已相当成熟,而酿酒酵母生物安全性好,具有真核细胞的翻译后修饰功能,工艺成熟,成本低,因而非常适合重组蛋白质的生产,已成为制备重组乙肝疫苗的主要系统之一。早在 1981 年美国科学家 Rutter 首先在酿酒酵母中成功表达了 *rHBsAg*[6]。随后 1982 年 Valenzuela 等[7]利用酵母乙醇脱氢酶(ADH)启动子成功实现了 adw 亚型的 *HBsAg* 基因在酿酒酵母中的表达。近年来,已有很多酿酒酵母表达乙肝疫苗的研究报道,但酿酒酵母表达 *HBsAg* 的水平并不高。因此,研究有效提高 *HBsAg* 表达水平的方法,具有重要的实际应用价值。

一般来说,外源基因在酵母中的表达与基因的转录水平有密切的关系,所以选择转录活性较优、强度较高的启动子对基因的高效表达十分重要。酿酒酵母表达系统常用的启动子分为组成型和诱导型两种,这两种启动子各有利弊,针对不同的目标产物和表达体系,选择适配的启动子需要进一步的探究。Yocum 等[8-9]研究表明,诱导型启动子 GAL1 的调控活性强于 GAL10。Siavash Partow 等[10]通过检测 β-半乳糖苷酶的表达量考察了酿酒酵母中较常见的组成型和诱导型的启动子(TEF1、TPI1、HXT7、PGK1、PYK1、GAL1、GAL10、TDH3、ADH1)的强度和活力,发现启动子 TEF1、TDH3 在发酵培养基中葡萄糖尚未耗尽时调控强度最大,葡萄糖耗尽时 TEF1、HXT7 的调控强度最大,而启动子 ADH1 适合高葡萄糖浓度下的调控。本研究中选用酿酒酵母中较为常见的 4 种组成型强启动子(TEF1、TDH3、HXT7、ADH1)及广泛应用的诱导性强启动子 GAL1 来分别表达 *HBsAg* 并进行比较。

蛋白质的翻译也是基因表达过程中的关键步骤。Kozak 序列是存在于真核生物 mRNA 上 AUG 侧翼的一段序列,能够被核糖体识别并作为翻译起始位点,对应于原核生物的 SD 序列。因此在酵母中表达基因时,一般可在基因的 N 端添加 kozak 序列[11-12],以增强基因的翻译效率,有效提高基因的表达。参照 Kozak[13]提出的真核生物偏好的转移起始密码子周边序列,本研究中选取 GCCACC 序列(记为 k)通过引物添加于 HBsAg 序列上游的-1 到-6 位;根据 Robert Hamilton 针对酿酒酵母 kozak 序列的报道[14],另选用 TACACA 序列(记为 yk)及 AAAAAA 序列(记为 kk),从而考察不同 kozak 序列对 *HBsAg* 表达的影响。

对于大多数蛋白质,多肽链翻译后还要进行不同方式的加工修饰才具有生理功能,其中,二硫键的形成是蛋白质折叠过程中的限速步骤,对稳定蛋白质的空间结构和保持其活性功能有极其重要的作用[15]。蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase,PDI)是真核生物内质网腔中的一种多功能蛋白质,能催化蛋白质二硫键的形成、还原或异构化,还具有抑制错误折叠蛋白质聚集的分子伴侣活性[16]。PDI 在蛋白质折叠和分泌的过程中起重要的作用,Freedman 等认为,PDI 通过形成正确的链内、链间二硫键,进而使蛋白质正确地折叠,形成正确的空间构象[15,17]。Robinson 等[17]发现,过量表达 *pdi* 可以使人血小板导出生长因子 B 二聚体在酿酒酵母中的分泌量提高 10 倍。Smith 等[18]在酿酒酵母中表达葡萄糖苷酶时发现,利用基因工程手段增加内质网内的分子伴侣 BIP 和 PDI 的量,可以提高表达

量。研究表明,酵母中 *pdi* 的过量表达能大幅度提高外源蛋白质的表达水平及分泌量,尤其是含较多二硫键的蛋白质。而 HBsAg 是具有 8 对二硫键的复杂蛋白质,故本研究中将 *pdi* 和 *HBsAg* 进行共表达。

本研究中利用组成型启动子 TEF1 在酿酒酵母中成功表达乙型肝炎病毒表面抗原,并通过筛选强启动子、优化 kozak 序列及共表达二硫键,辅助蛋白质 PDI 分别从转录水平、翻译水平及翻译后加工水平有效提高 *HBsAg* 的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

相关质粒和菌株见表 1,Escherichia coli JM109 用于重组质粒的保存和增殖,Saccharomyces cerevisiae INVscI 作为 *HBsAg* 表达的宿主。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株,质粒	基因属型	出处
菌株		
E. coli JM109	*e14⁻(mcrA), endA1, recA1, hsdR17 (rk⁻,mk⁺), (lac-proAB) lacIqZM15,relA1*	Invitrogen
S. cerevisiae INVscI	*MATa, his3Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52 / MATα, his3Δ1, leu2, trp1-289, ura3-52*	Invitrogen
质粒		
pYES2	2μ, Amp^R, URA3, GAL1 promoter	Invitrogen
pTEF1	pYES2 derivative, TEF1 promoter	实验室备有
pTDH3	pYES2 derivative, TDH3 promoter	实验室备有
pHXT7	pYES2 derivative, HXT7 promoter	实验室备有
pADH1	pYES2 derivative, ADH1 promoter	实验室备有
pGAL1-sAg	GAL1 promoter , *HBsAg* gene	本次工作
pTEF1-sAg	TEF1 promoter, *HBsAg* gene	本次工作
pTDH3-sAg	TDH3 promoter, *HBsAg* gene	本次工作
pHXT7-sAg	HXT7 promoter, *HBsAg* gene	本次工作
pADH1-sAg	ADH1 promoter, *HBsAg* gene	本次工作
pGAL1-ksAg	kozak sequence (GCCACC), *HBsAg* gene	本次工作
pGAL1-yksAg	kozak sequence (TACACA), *HBsAg* gene	本次工作
pGAL1-kksAg	kozak sequence (AAAAAA), *HBsAg* gene	本次工作
pGAL1-yksAg-pdi	kozak sequence (TACACA), *HBsAg* gene, *pdi* gene	本次工作

1.2 试剂

PCR 引物(见表 2),由生工生物上海有限公司合成;质粒提取试剂盒,购自生工生物上海有限公司;Prime Star DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶,限制性内切酶,DNA 相对分子质量标准,DNA 凝胶回收试剂盒,感受态制备试剂盒,均购自宝生物大连有限公司;蛋白质相对分子质量标准,购自碧云天(Beyotime)公司;酵母基因组提取试剂盒,购自上海杰美基因(GENMED)公司。YNB、半乳糖、氨苄青霉素、卡那霉素、咪唑及其他常用试剂,均为国产分析纯。

表 2 引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列 a(5′-3′)
ksAg_F	CGGGATCCGCCACCATGGAAAACACTACTTCTGGTTTCT
yksAg_F	CGGGATCCTACACAATGGAAAACACTACTTCTGGTTTCT
kksAg_F	CGGGATCCAAAAAAATGGAAAACACTACTTCTGGTTTCT
sAg_R	CGGAATTCTTAATGATGATGATGATGGATGTAAACCCACAAACAGAAG
pGAL1_F	CGGAATTCCTCGAGACGGATTAGAAGCCGCCGAGCG

续表 2

引物	序列 a(5′-3′)
pGAL1_R	ATAGTTTAGCGGCCGCCGGTTTTTTCTCCTTGACGTTAA
tCYC1_F	CCGGAATTCATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTC
tCYC1_R	CCGCTCGAGAAATTAAAGCCTTCGAGCGTCCCAA
pdi_F	ATAAGAATGCGGCCGCTACACAATGCAATTCAACTGGAATATTAAAAC
pdi_R	TAGTCTAGATTAAAGCTCGTCGTGAGCGTCT

注:下划线部分为限制性内切酶识别位点。

1.3 培养基

LB(Luria-Bertani Medium)培养基(g/L):酵母粉 5,胰蛋白胨 10,氯化钠 10;pH 7.0~7.2。制备固体培养基时添加质量分数 2%琼脂粉。

YNB(Yeast Nitrogen Base)选择性培养基(g/L):葡萄糖 20,硫酸铵 1.7,YNB 5;pH 5.5。添加过滤除菌的亮氨酸、组氨酸、色氨酸至终质量浓度为 50 μg/mL。

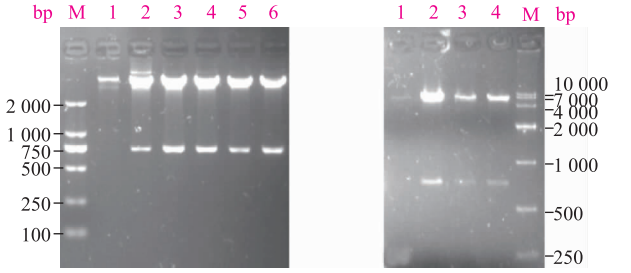
YPDG(Yeast Extract Peptone Dextrose Galactose)发酵培养基(g/L):酵母粉 10,胰蛋白胨 20,葡萄糖 20,半乳糖 33;pH 5.5。

1.4 HBsAg 重组表达载体的构建

HBsAg 主蛋白质由 S 区编码,由 226 个氨基酸组成。按照酵母密码子偏好性对 S 区基因序列(Genbank:AF504292.1)进行密码子优化并合成基因(金斯瑞生物科技),所得质粒 pUC57-sAg 含有完整的 HBsAg 编码序列(681 bp),在其 C 端添加有 6×His 纯化标签,并在上下游分别添加 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点。

用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切质粒 pUC57-sAg 得 sAg 片段,经 PCR 纯化试剂盒纯化后,分别与经相同酶切及纯化的载体 pTEF1、pTDH3、pHXT7、pADH1 及 pYES2 进行连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板,经菌落 PCR 筛选阳性转化子,提取质粒,再经酶切验证及上海生工生物公司测序验证,获得含有不同启动子的重组质粒 pTEF1-sAg、pTDH3-sAg、pHXT7-sAg、pADH1-sAg 及 pGAL1-sAg。如图 1 所示。

使用引物(ksAg_F、yksAg_F、kksAg_F 及 sAg_R)分别克隆出含不同 kozak 序列的 ksAg、yksAg 及 kksAg 片段,经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切及纯化后,与经相同酶切及纯化的载体 pYES2 进行连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板,经菌落 PCR 筛选阳性转化子,提取质粒,再经酶切及测序验证,获得含有不同 kozak 序列的重组质粒 pGAL1-ksAg、pGAL1-yksAg、pGAL1-kksAg。



(a) 对应于sAg片段　(b) 对应于ksAg、yksAg、kksAg片段

(a):1. pTEF1as control; 2. pTEF1-sAg; 3. pTDH3-sAg; 4. pHXT7-sAg; 5. pADH1-sAg; 6. pGAL1-sAg;M:DL 2000 DNA Marker。(b):1. pYES2; 2. pGAL1-ksAg; 3. pGAL1-yksAg; 4. pGAL1-kksAg;M:DL 10000 DNA Marker。

图 1 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切验证重组质粒

Fig. 1 Confirmation of recombinant plasmids by *Bam*HI and *Eco*RI digestion

在质粒 pGAL1-yksAg 的基础上构建共表达质粒(见图 2),利用引物 pGAL1_F、pGAL1_R 和 tCYC1_F、tCYC1_R 从质粒 pYES2 克隆获得 pGAL1(474 bp)和 tCYC1(259 bp)片段,连接至 pGAL1-yksAg 获得具有两个表达框的二价表达载体 pGAL1-yksAg-PT。使用引物 pdi_F、pdi_R 从 *P. pastoris* GS115 基因组扩增得二硫键异构酶基因 *pdi*,经 *Not*I 和 *Xba*I 双酶切及 PCR 纯化试剂盒纯化,与经相同酶切及纯化的载体 pGAL1-yksAg-PT 进行连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板,经菌落 PCR 筛选阳性转化子,提取质粒,再经酶切及测序验证,获得 *pdi* 共表达质粒 pGAL1-yksAg-pdi。

1.5 酵母转化及重组菌发酵

按照 Invitrogen 公司提供的 LiAc/SS-DNA/PEG 法制作酿酒酵母感受态细胞,并进行重组质粒的转

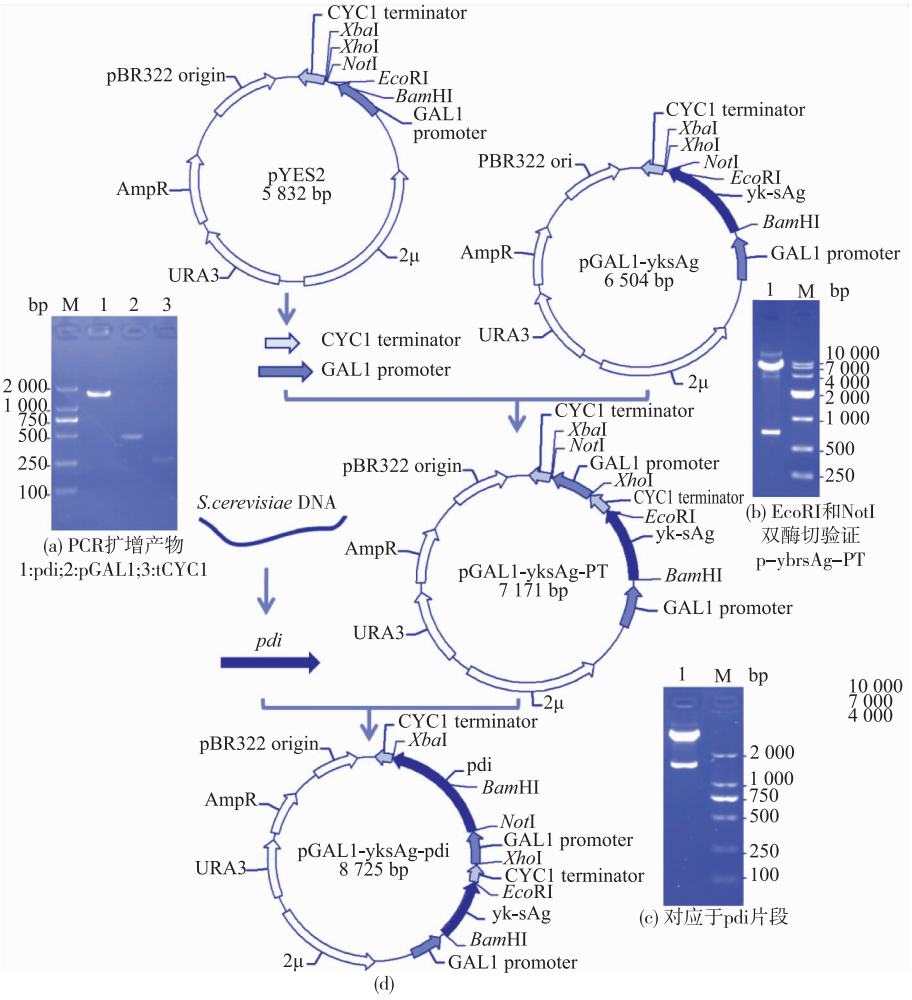


图 2　共表达质粒 pGAL1–yksAg–pdi 的构建

Fig. 2　Construction of pGAL1–yksAg–pdi for co–expression

化,涂布于含所需氨基酸的 YNB 选择性平板,获得的酵母转化子经菌落 PCR 检验。50 μL 反应体系如下:Taq DNA 聚合酶 1 μL,10 × loading buffer 5 μL,mix dNTP 4 μL,上下游引物各 1 μL,ddH_2O 至 50 μL。反应条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。

挑取菌落 PCR 呈阳性的酵母转化子接种于 YNB 液体培养基,于 30 ℃ 200 r/min 培养 36~39 h,按体积分数 10%接种量转接至 YPD (含启动子 TEF1、TDH3、HXT7、ADH1 的重组菌)或 YPDG(含诱导启动子 GAL1 的重组菌) 培养基,28 ℃ 200 r/min 培养 70 h [19]。发酵液于 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 经洗涤后悬浮于 PBS 缓冲液(pH 7.5),在低温条件下利用玻璃珠进行酵母细胞破碎,于 4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为胞内样品,加入PMSF 至终浓度为 1 mmol/L,以防止蛋白质水解酶降解,4 ℃保存。

1.6　HBsAg 活性检测及 HBsAg 的纯化

使用希森美康生物科技 (无锡) 有限公司的 Sysmex HISCL–2000i 全自动免疫分析仪和配套试剂测定 HBsAg 活性。所用 HISCL HBsAg 校准品溯源至 WHO standard 00/588。

重组 HBsAg 在 C 端添加有 6×His 纯化标签,可采用 Ni 柱亲和层析进行初步纯化。镍离子柱 His_Trap_FF_crude, 1 mL Global (90 μm),按 Novagen 公司 Ni. NTAHis·BindResin 说明书提供的方法进行纯化。纯化后的蛋白质样品液进行 HBsAg 活性检测和 SDS–PAGE 分析。

2 结果与讨论

2.1 重组表达载体的鉴定及重组菌构建

重组表达质粒 pTEF1-sAg、pTDH3-sAg、pHXT7-sAg、pADH1-sAg、pGAL1-sAg 经 *Bam*HI 和*Eco*RI 双酶切,均获得约 0.7 kb 大小片段,对应于 sAg 片段的大小(图 1(a))。重组表达质粒 pGAL1-ksAg、pGAL1-yksAg、pGAL1-kksAg 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切,均获得约 0.7 kb 大小片段,对应于 ksAg、yksAg、kksAg 片段的大小(图 1(b))。重组表达质粒 pGAL1-yksAg-pdi(构建过程见图 2)经 *Not*I 和 *Xba*I 双酶切,获得约 1.6 kb 大小片段,对应于 pdi 片段的大小(图 2(c))。结果表明,HBsAg 的重组表达质粒均构建成功。

重组表达质粒 pTEF1-sAg、pTDH3-sAg、pHXT7-sAg、pADH1-sAg、pGAL1-sAg 转化进入酿酒酵母感受态细胞,获得相应重组菌,分别命名为 TEF1-sAg、TDH3-sAg、HXT7-sAg、ADH1-sAg、GAL1-sAg。将重组质粒 pGAL1-ksAg、pGAL1-yksAg、pGAL1-kksAg 成功转化酿酒酵母感受态细胞,获得相应重组酵母菌,分别命名为 ksAg、yksAg 及 kksAg。共表达质粒 pGAL1-yksAg-pdi 转化酿酒酵母获得重组菌,命名为 yksAg-pdi。

2.2 筛选启动子强化 *HBsAg* 表达

Partow 的报道中,启动子 TEF1 的调控强度大而且稳定,本研究中将启动子 TEF1 应用于 *HBsAg* 的表达。TEF1-sAg 重组菌经发酵细胞干质量达 9.14 g/L(pTEF1 空质粒对照菌株干质量为 9.96 g/L),可见表达 *HBsAg* 对菌株生长有一定的不利影响。TEF1-sAg 重组菌发酵样品 HBsAg 活性为 8.87 IU/g,表明在酿酒酵母中,采用启动子 TEF1 能成功表达 *HBsAg*,且产物具有免疫活性。

基因最终的表达效果直接受启动子的强弱及适配性的影响,因此选择合适的强启动子至关重要。为了筛选适合表达 *HBsAg* 的启动子,将启动子 TEF1、TDH3、HXT7、ADH1 及 GAL1 进行比较。TEF1-sAg、TDH3-sAg、HXT7-sAg、ADH1-sAg 及 GAL1-sAg 重组菌的 HBsAg 活性分别为 8.87、43.25、12.94、10.61 IU/g 及 46.45 IU/g(图 3)。表明在酿酒酵母中采用 TEF1、TDH3、HXT7、ADH1 及 GAL1 5 种启动子均能成功表达 *HBsAg*,且产物具有免疫活性。其中,采用诱导型启动子 GAL1 时 HBsAg 活性最高(46.45 IU/g),较 TEF1 启动子提高了 4.23 倍;其次为组成型启动子 TDH3,较 TEF1 提高了 3.87 倍。

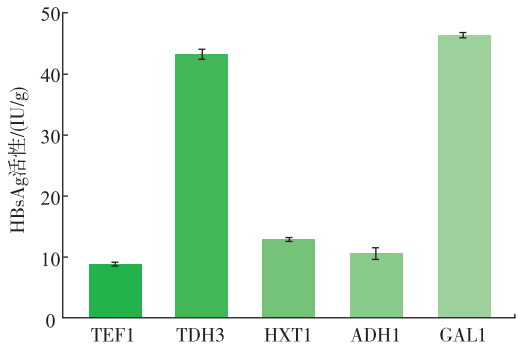


图 3 采用不同启动子表达 *HBsAg*

Fig. 3 Expression of *HBsAg* under different promoters

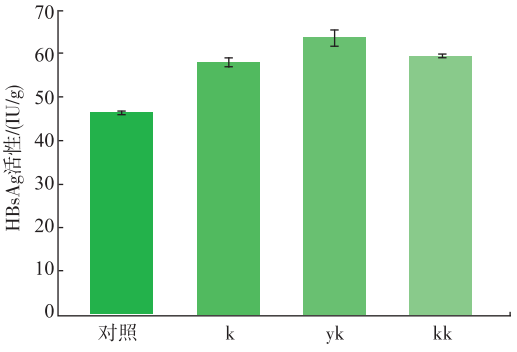
本研究中,采用诱导型启动子 GAL1 来表达 *HBsAg* 相对更为适合,因为产物 HBsAg 对细胞生长会产生一定不利影响,而诱导表达系统可将细胞生长与产物积累分开,即在 GAL1 启动子关闭时细胞利用葡萄糖正常生长,当葡萄糖耗尽时启动子被激活开始表达下游基因,而此时细胞已生长到一定密度,产物 HBsAg 对酵母细胞生长的影响已经不明显,从而避免了产物积累对细胞原有代谢平衡及细胞生长的不利影响。Siavash Partow[10]在以 β-半乳糖苷酶为报告基因的研究中,启动子 TEF1 与 TDH3 在葡萄糖尚未耗尽时的调控强度大体相同;在 Sun 等[20]的研究中,启动子的强度 TEF1 > TDH3;本研究中,在表达 *HBsAg* 时,启动子强度 GAL1 > TDH3 > HXT1 > ADH1 > TEF1,启动子 TDH3 较 TEF1 提高了 3.87 倍。可见,对于不同的目标产物及表达体系,适配的启动子不能一概而论。

2.3 优化 kozak 序列提高 *HBsAg* 表达

Kozak 序列是能提高基因在真核细胞中表达的一个上游调控元件,它的存在将有利于翻译的起始。因此通过添加不同的 kozak 序列改变 AUG 周边序列组成,可以影响基因的翻译,从而调控基因的表达。本研究中选取了 GCCACC(k)、TACACA(yk)及 AAAAAA (kk)3 种 kozak 序列添加至 *HBsAg* 基因上游,构建不同重组表达载体及相应重组菌。

将 ksAg、yksAg 及 kksAg 重组菌株进行发酵后,HBsAg 活性分别为 58.05、63.67 IU/g 及 59.47 IU/g(图 4),表明 GCCACC (k)、TACACA (yk) 以及 AAAAAA(kk)3 种 kozak 序列均能促进 *HBsAg* 的表

达,分别使 HBsAg 活性提高了 25%、37%及 28%(与 GAL1-sAg 对照菌株相比),可见 TACACA(yk)序列最有利于 *HBsAg* 的表达。



对照:GAL1-sAg strain;k:ksAg strain(GCCACC sequence);yk:yksAg strain(TACACA sequence);kk:kksAg strain(AAAAAA sequence)

图 4 不同 kozak 序列对 *HBsAg* 表达的影响

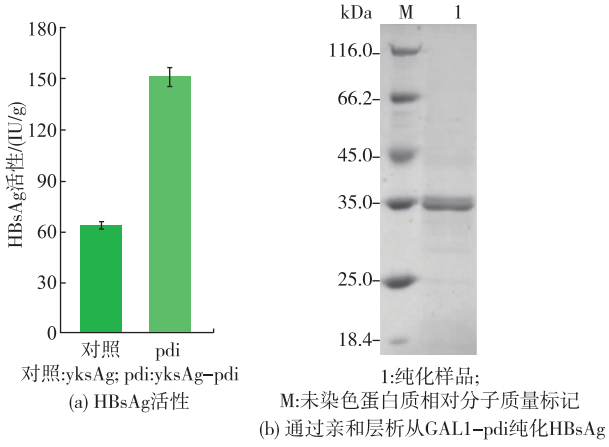
Fig. 4 Expression of *HBsAg* with different kozak sequences

2.4 共表达 *pdi* 促进 *HBsAg* 表达

HBsAg 共有 14 个半胱氨酸残基(Cys),并以 Cys 的二硫键形成复杂的空间结构[21],故加速二硫键的形成对 HBsAg 的折叠及活性都极为重要。而蛋白质二硫键异构酶 PDI 能催化蛋白质分子中二硫键的形成。本研究中从酵母基因组克隆得 *pdi* 基因与 *HBsAg* 进行共表达。

将 yksAg-pdi 重组菌进行发酵后,HBsAg 活性达 151.08 IU/g(图 5),与 yksAg 对照菌相比提高了 1.37 倍,表明共表达 *pdi* 能明显促进 *HBsAg* 的表达。Inan 等[22]发现,共表达 *pdi* 能使 Na-SPl 在毕赤酵母中的表达量显著提高。Moralejo 等[23]研究表明,甜蛋白质分泌表达量与 *pdi* 基因的表达水平存在相关性,当 *pdi* 表达水平提高 2~4 倍,甜蛋白质产量提高 5 倍。

yksAg-pdi 重组菌综合了启动子、kozak 序列以及 PDI 的有利影响,使 *HBsAg* 的表达活性提高了16倍。基于 C 端的 6×His 纯化标签,对此菌株表达的重组 HBsAg 进行 Ni 柱亲和层析,在含 300 mmol/L 咪唑的洗脱条件下获得电泳纯的样品(HBsAg 活性 3.32 IU/mL)。图 5(b)所示纯化的蛋白质相对分子质量约 35 000,较 HBsAg 的 24 000 未糖基化形式及 27 000 糖基化形式[24]都偏大;但酿酒酵母作为宿主易使表达的外源蛋白质过度糖基化,而 HBsAg 糖基化位点在第146 位的天冬酰胺(Asn)残基,分析 35 000 处蛋白质即为过糖基化的目的产物 HBsAg。



对照:yksAg; pdi:yksAg-pdi
(a) HBsAg活性

1:纯化样品;
M:未染色蛋白质相对分子质量标记
(b) 通过亲和层析从GAL1-pdi纯化HBsAg

图 5 共表达 *pdi* 对 *HBsAg* 表达的影响

Fig. 5 Co-expression of *pdi* and *HBsAg*

3 结 语

在酿酒酵母中,采用组成型启动子 TEF1 成功表达乙肝表面抗原,活性为 8.87 IU/g。为了从转录水平提高 *HBsAg* 的表达,比较了组成型强启动子 ADH1、HXT7、TEF1、TDH3 及诱导型强启动子 GAL1。结果表明,采用后者使 HBsAg 活性提高了 4.23 倍(46.45 IU/g)。为了增强 *HBsAg* 的翻译,促进表达,考察了 GCCACC、TACACA 及 AAAAAA 3 种 kozak 序列对 *HBsAg* 表达的影响。结果表明,3 种序列均有利于 *HBsAg* 的表达,TACACA 序列效果最明显(63.67 IU/g),使 *HBsAg* 表达提高了 37%。为了从翻译后水平促进 *HBsAg* 的表达,将二硫键异构酶 *pdi* 与 *HBsAg* 进行共表达,使得 HBsAg 活性进一步提高 1.37 倍(151.08 IU/g)。

综上所述,通过筛选启动子、优化 kozak 序列,以及共表达 *pdi*,分别从转录水平、翻译水平、翻译后水平进行优化,使 HBsAg 活性由 8.87 IU/g 提高至 151.08 IU/g,提高了 16 倍。本研究结果表明,选择合适的启动子对 *HBsAg* 的表达至关重要,而共表达二硫键异构酶 *pdi* 的促进作用也很明显,因为 HBsAg 富含二硫键。利用其他的二硫键辅助蛋白质促进 *HBsAg* 表达,则有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Miyanohara A. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,1983,80(1):1-5.

[2] Liu R. Optimization of fermentation conditions for maximal recombinant hepatitis B surface antigen particle production in Pichia pastoris[J].**Bioengineering**,2008,24(12):98-105.

[3] Tiollais P,Buendia M A. Hepatitis B virus[J]. **Sci Am**,1991,264(4):116-123.

[4] 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学[M]. 北京:人民军医出版社,1997:25-42.

[5] Krugman S,Giles J P,Hammond J. Hepatitis virus:Effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains[J]. **J Infect Dis**,1970,122(5):432-436.

[6] Rutter W J. Control of transcription in eukaryotes:summary[J]. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**,1981,26:171-178.

[7] Valenzuela P. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast [J]. **Nature**,1982,298 (5872):347-350.

[8] Yocum R R. Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Mol Cell Biol**,1984,4(10):1985-1998.

[9] West R, Jr W. GAL1-GAL10 divergent promoter region of Saccharomyces cerevisiae contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences [J]. **Genes Dev**,1987,1 (10):1118-1831.

[10] Partow S. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Yeast**,2010,27(11):955-964.

[11] Outten C E,Culotta V C. Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2004,279(9):7785-7791.

[12] Stuart J A. Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2001,276(21):18633-18639.

[13] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation [J]. **J Biol Chem**,1991,266(30):19867-19870.

[14] Hamilton R,Watanabe C K,de Boer H A. Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs[J]. **Nucleic Acids Res**,1987,15(8):3581-3593.

[15] Freedman R B. Protein disulfide isomerase:Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins[J]. **Cell**,1989,57(7):1069-1072.

[16] Wilkinson B,Gilbert H F. Protein disulfide isomerase[J]. **Biochim Biophys Acta**,2004,1699(1-2):35-44.

[17] Robinson A S,Hines V,Wittrup K D. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology**,1994,12(4):381-384.

[18] Smith J D,Robinson A S. Overexpression of an archaeal protein in yeast:secretion bottleneck at the ER [J]. **Biotechnol Bioeng**,2002,79(7):713-723.

[19] Kim E J. Expression of hepatitis B surface antigen S domain in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using GAL1 promoter[J]. **J Biotechnol**,2009,141(3-4):155-159.

[20] Sun J. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnol Bioeng**,2012,109(8):2082-2092.

[21] Wampler D E. Multiple chemical forms of hepatitis B surface antigen produced in yeast [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,1985,82 (20):6830-6834.

[22] Inan M. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase [J]. **Biotechnol Bioeng**,2006,93(4):771-778.

[23] Moralejo F. A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori*[J]. **Molecular Genetics and Genomics**,2001,266(2):246-253.

[24] 李河民,汪和睦. 基因工程乙肝新型疫苗(汉逊酵母表达系统)的开发[J]. 微生物学免疫学进展,2001,29(3):47-54.
LI Hemin,WANG Hemu. Development of new hepatitis vaccine for gene engineering [J]. **Progress in Microbiology and Immunology**,2001,29(3):47-54.(in Chinese)