

· 基础论著 ·

## HCV NS5A 反式激活基因 NS5ATP13 在毕氏酵母中的表达研究

袁菊 成军 洪源 杨延平 陶明亮 靳亚平 韩莉

**【摘要】 目的** 探讨 NS5AATP13 能否在毕氏酵母中成功表达。**方法** 用 *Bst* X I 将 pPICZ $\alpha$ A-NS5ATP13 线性化后,电转化毕氏酵母菌株 KM71H,用 Zeocin 筛选高拷贝数的酵母菌落,在 BMGY 和 BMMY 培养基中进行诱导表达,以甲醇诱导,30℃ 培养 4 d,表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。**结果** 预期分子量大小的 NS5ATP13 蛋白分泌至培养液。**结论** NS5ATP13 在毕氏酵母中成功表达。

**【关键词】** 毕氏酵母;分泌表达;HCV NS5A

**Expression of NS5ATP13 transregulated by HCV NS5A in *Pichia pastoris*** YUAN Ju\*, CHENG Jun, HONG Yuan, YANG Yan-ping, TAO Ming-liang, JIN Ya-ping, HAN Li. \*Institute of Infections Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

**【Abstract】 Objective** To express NS5ATP13 in *Pichia pastoris*. **Methods** The constructed plasmid pPICZ $\alpha$ A-NS5ATP13 was linearized with *Bst* X I and transformed into *Pichia pastoris* KM71H, multi-copy recombinants was selected with Zeocin and expressed in BMGY and BMMY media. The Zeocin-resistant clones were induced expression by methanol, which were growing at 30℃ for 4 days. The expressed products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. **Results** SDS-PAGE and Western blot showed NS5ATP13 protein with expected molecular weight secreted in the supernatant. **Conclusions** NS5ATP13 protein was successfully expressed in *Pichia pastoris*.

**【Key words】** *Pichia pastoris*; Secretory expression; HCV NS5A

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染与肝纤维化、肝细胞癌发生发展过程密切相关,病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用可能是 HCV 致病的重要分子机制。HCV 非结构蛋白 5A(HCV NS5A)基因(位于 6258 ~ 7601 碱基之间)编码的 56 kD NS5A 蛋白(448 个氨基酸)位于细胞浆内。NS5A

基金项目:国家重点基础研究项目(2004CB518908)

作者单位:100011 北京,北京地坛医院传染病研究所(袁菊、成军、洪源、杨延平、陶明亮、韩莉);西北农林科技大学动物科技学院(袁菊、靳亚平)

通讯作者:成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

作为一种反式启动因子在 HCV 复制过程扮演重要角色<sup>[1]</sup>,它通过与单链 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR)催化区域直接相互作用抑制 PKR 的活动,从而抑制其抗病毒功能<sup>[2]</sup>,因此在阻断宿主抗病毒应答以及形成慢性感染过程中发挥重要作用。本课题组利用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术筛选 NS5A 蛋白反式激活作用的部分靶基因时克隆了 NS5ATP13,该新基因的开放读码框架(ORF)由 2103 个核苷酸组成<sup>[3-5]</sup>。

酵母表达系统尤其是 *Pichia pastoris* 表达系统不仅比原核表达系统高效、快速、简便,而且能进行与哺乳类细胞类似的翻译后加工,表达具有生物活性的外源蛋白<sup>[6,7]</sup>。本研究主要利用毕氏酵母表达系统诱导表达 NS5ATP13 蛋白,为进一步纯化蛋白、研究其生物学功能及临床应用创造了条件,同时也为阐明 HCV 感染引起慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制奠定基础。

## 材料与方法

### 一、材料与试剂

*Pichia pastoris* 酵母表达质粒 pPICZαA、表达细胞 KM71H 为美国 Invitrogen 公司产品。培养基 YPD、YPDS (YPD 培养基加 1mol/L 山梨醇)、BMGY (1% 酵母抽提物、2% 蛋白胨、100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.0、1.34% 酵母氮源、0.00004% 生物素、1% 甘油)、BMMY (1% 酵母抽提物、2% 蛋白胨、100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.0、1.34% 酵母氮源、0.00004% 生物素、0.5% 甲醇)均为 BD 公司产品。pGEM-T 载体试剂盒为 Promega 公司产品,DNA 回收试剂盒为杭州博大生物技术有限公司产品,*Sac* II/*Xba* I 及 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品,氨苄西林、卡那霉素为华北制药有限公司产品,玻璃珠为 Sigma 公司产品。 $\beta$ -巯基乙醇为瑞典 Biochemika 公司产品,所有引物为上海生物工程有限公司合成。

### 二、方法

1. 重组质粒的构建:根据基因 NS5ATP13 的完整开放阅读框和空载体 pPICZαA 序列及读码框设计引物,引物序列如下:上游引物:5'-CCGCGGAATG-GCGGACG-3',下游引物:5'-TCTAGACGCTCGCTGTCAAACCTTAATA-3'。以 HepG2 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 参数如下:95℃ 5 min 预变性,94℃ 1 min 变性,60℃ 1 min 退火,72℃ 2 min 延伸,共 35 个循环,72℃ 延伸 10 min。玻璃珠回收 PCR 产物,将其和 pGEM-T 克隆载体连接,并转化感受态细胞 DH5α 中,挑取单菌落,碱裂解法提取质粒 DNA,用设计的酶切位点和菌落 PCR 进行初步鉴定分析,并测序。同时玻璃珠回收酶切片段,用 *Sac* II 和 *Xba* I 酶切、克隆至载体 pPICZαA,再次转化大肠埃希菌,酶切鉴定正确的重组表达质粒 pPICZαA-NS5ATP13,碱裂解法提取质粒 DNA。

2. 酵母感受态细胞的制备:挑取 KM71H 酵母单菌落,接种至含有 5 ml YPD 培养基中,30℃ 振摇过夜,取 0.1~0.5 ml 的培养物接种至 500 ml 新鲜培养基中,30℃ 振摇过夜至  $A_{600} = 1.3 \sim 1.5$ ,将培养物  $1500 \times g$  4℃ 离心 5 min,将菌体悬浮于 500 ml 预冷无菌水,同样条件离心,将菌体悬浮于 250 ml 预冷无菌水,离心,将菌

体菌体悬浮于 20 ml 浓度为 1 mol/L 山梨醇;再次离心,最后将菌体悬浮于 1 ml 浓度为 1 mol/L 山梨醇。

3. 转化筛选:取 600  $\mu$ l 新鲜制备的(或  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存的)感受态细胞置于冰浴中,使其完全解冻,加入 5 ~ 20  $\mu$ g *Bst* X I 线性化重组质粒,轻弹混匀,尽数吸出转移到电穿孔转化杯中,冰浴 5 min。电转化条件:电压 2500 V,时间 5 ms。电击后电击杯中加入 1 ml 1 mol/L 山梨醇,  $30^{\circ}\text{C}$  静置 1 h。取 200  $\mu$ l 菌液分别涂布于含抗生素 Zeocin 500  $\mu$ g/ml、1000  $\mu$ g/ml、2000  $\mu$ g/ml 的 YPDS 平板上,  $30^{\circ}\text{C}$  孵育 2 ~ 3 d,筛选抗性强的转化子。

4. 表达产物的 SDS-PAGE 分析:选取抗性最高的阳性转化子,于 100 ml BM-GY 培养基中  $30^{\circ}\text{C}$  250 r/min 摇至  $A_{600} = 2 \sim 6$ ,离心后重悬于 BMMY 培养基中,使重悬后的细胞  $A_{600}$  为 1.0 左右,  $30^{\circ}\text{C}$  250 r/min 继续培养,分别于 24、48、72、96 和 120 h 加入新鲜的甲醇至终浓度为 0.5%,以维持诱导表达,并分别于 0、24、48、72、96、120 和 144 h 取样,收集细胞沉淀及上清,分别制样(具体参考 Invitrogen 公司的 *Pichia pastoris* 表达手册),经 SDS-PAGE 检测。

5. 表达产物的 Western blot 分析:样品经 SDS-PAGE 后,60 V 转膜 4 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,抗 HIS 单克隆抗体(1:200)  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,羊抗鼠 HRP-IgG 二抗(1:5000)室温孵育 1 h,加入化学发光底物 ECL 后观察结果。

## 结 果

### 一、pPICZ $\alpha$ A-NS5ATP13 饵载体的构建及鉴定

以 HepG2 细胞 cDNA 为模板 PCR 扩增 NS5ATP13 基因,琼脂糖凝胶电泳分析其大小与理论一致(图 1),将其与 pGEM-T 克隆载体连接,转化大肠埃希菌,酶切鉴定及测序结果显示克隆成功。用设计的酶切位点进行酶切后,再与 pPICZ $\alpha$ A 载体连接,得到诱饵载体 pPICZ $\alpha$ A-NS5ATP13,酶切鉴定显示构建成功(图 2),重组载体 pPICZ $\alpha$ A-NS5ATP13 图谱(图 3)。

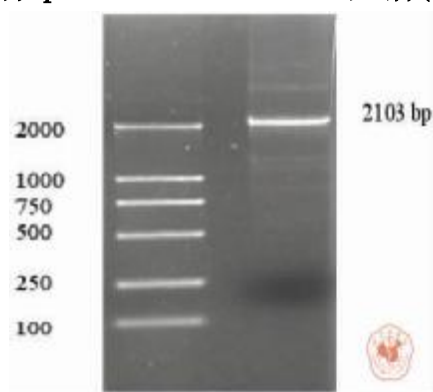


图 1 NS5ATP13 基因的 RT-PCR

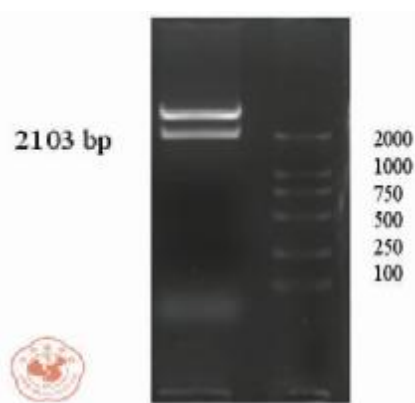


图 2 pPICZ $\alpha$ A-NS5ATP13 的双酶切鉴定(*Sac* II/*Xba* I)

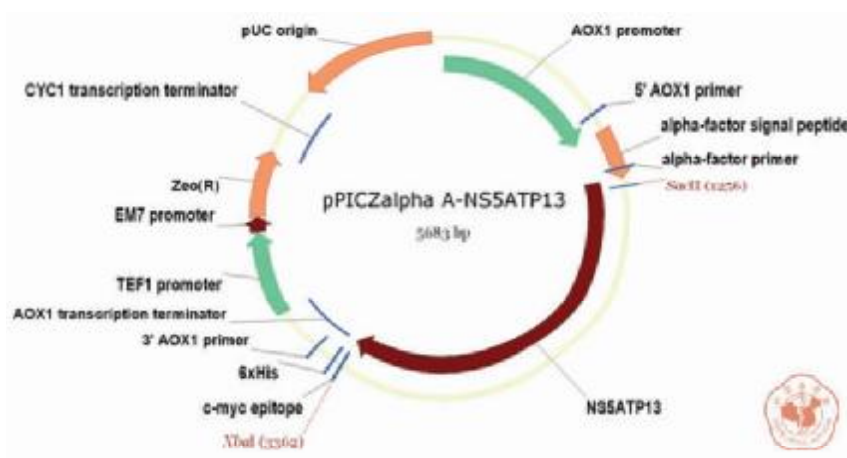


图 3 pPICZαA-NS5ATP13 质粒图谱

## 二、重组表达质粒的线性化

将重组质粒 pPICZαA-NS5ATP13 用限制性内切酶 *Bst*X I 酶切,使表达质粒线性化(图 4),便于外源基因与酵母染色体发生同源重组。

图 4 pPICZαA-NS5ATP13 质粒的线性化酶切(*Bst*X I)

## 三、转化及筛选

为了获得稳定表达目的蛋白的转化子, pPICZαA-NS5ATP13 由 *Bst*X I 线性化后,电转入 KM71H 细胞株,取 200 μl 菌液分别涂布于含抗生素 Zeocin 500 μg/ml、1000 μg/ml、2000 μg/ml 的 YPDS 平板上,30℃ 孵育 2~3 d,含抗生素 Zeocin 1000 μg/ml 的平板长出 8 个克隆、2000 μg/ml 的长出 3 个克隆,高浓度 Zeocin 平板长出的克隆为筛选出的高抗性转化子。

## 四、诱导上清的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

甲醇诱导的 0、4、8、24、96、120 和 144 h 培养物上清 SDS-PAGE 结果显示:0 h 上清没有蛋白分泌,96、120 和 144 h 均有蛋白表达并分泌至上清,大小约 140 kD (图 5)。Western blot 结果显示:140 kD 大小的 NS5ATP13 蛋白在毕氏酵母中成功表达。



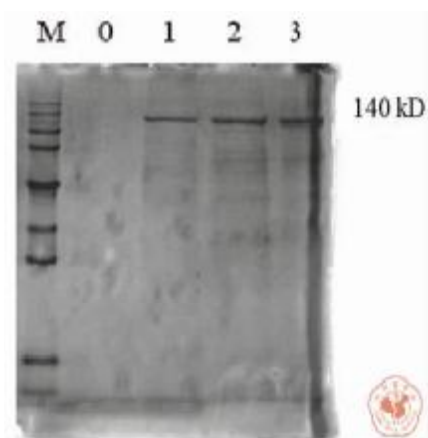


图 5 高拷贝菌株不同时间诱导上清 SDS-PAGE 结果

M:标准蛋白分子量;0:未加甲醇上清;1:4 d 诱导上清;2:5 d 诱导上清;3:6 d 诱导上清

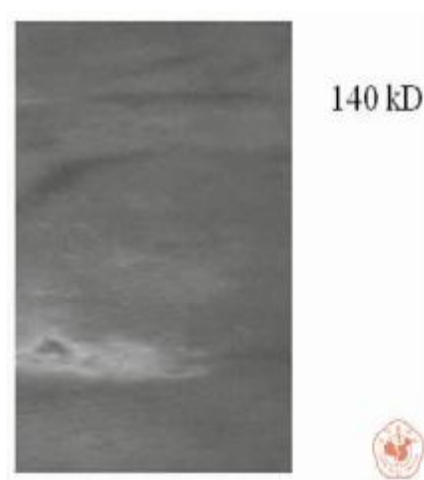


图 6 表达产物的 Western-blot 鉴定

## 讨 论

巴斯德毕氏酵母表达系统是一类以甲醇为唯一碳源和能量来源的酵母菌,和其它真核、原核表达系统相比有许多优点<sup>[8-12]</sup>:(1)具有醇氧化酶(alcohol oxidase, AOX1)基因启动子,这是目前最强调控机理最严格的启动子之一;(2)表达质粒能在基因组的特定位点以单拷贝或多拷贝的形式稳定整合;(3)菌株易于进行高密度发酵,外源蛋白表达量最高;(4)毕氏酵母中存在过氧化物酶体,表达的蛋白贮存其中,可免受蛋白酶的降解,而且减少对细胞的毒害作用。此外,胞外表达需要在外源蛋白的 N-末端加上一段信号肽序列,引导重组蛋白进入分泌途径,可使蛋白质在分泌到胞外之后获得准确的构型。毕氏酵母对外源蛋白自身的信号序列识别能力差,在本研究所使用 pPICZαA 质粒,其信号肽来自酿酒酵母的 α-交配因子(α-factor),能很好地满足分泌需求。作为新一代的毕氏酵母分泌表达质粒,它拥有如下特点<sup>[9-11]</sup>:(1)具有强效可调控启动子 AOX1;(2)具有 Zeocin 抗性筛选标记基因,重组转化子可直接用 Zeocin 进行筛选,即在 YPDZ 平板上生长的转化子中 100% 都有外源基因的整合,大大简化了重组转化酵母的筛选过程;(3)在表达载体 AOX1 5'-端启动子序列下游,有供外源基因插入的多克隆位点,多克隆位点下游有 AOX1 3'-端终止序列;(4)分泌效率强的信号肽 α 因子。

本文主要应用酵母细胞 KM71H 高效分泌表达 NS5ATP13,由于毕氏酵母表达系统具有蛋白加工功能,该蛋白经修饰加工后高度磷酸化,其分子量约达 140 kD<sup>[13]</sup>,本研究使用的分泌型酵母表达载体 pPICZαA 具有 α 信号肽序列,能够引导表达的外源蛋白分泌到细胞外。由于酵母菌自身分泌的蛋白成分少,况且酵母培养基中的成分简单,这有利于表达的目的蛋白的分离纯化。培养液上清 SDS-

PAGE 和 Western blot 分析结果表明: NS5ATP13 基因表达产物确实存在于上清中。为了大量得到重组蛋白, 对菌体培养条件摸索, 发现蛋白表达的最佳诱导时间为 96 h, 从而为大量发酵生产奠定了基础。NS5ATP13 在毕氏酵母中的成功表达为进一步研究其生物学功能及临床应用创造了条件, 同时也为阐明 HCV 感染导致慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制奠定了基础。

### 参 考 文 献

- 1 Houshmand H, Bergqvist A. Interaction of hepatitis C virus NS5A with Laprotein revealed by T7 phage display. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 695-701.
- 2 De Francesco R, Neddermann P, Tomei L, et al. Biochemical and immunologic properties of the nonstructural proteins of the hepatitis C virus: implications for development of antiviral agents and vaccines. *Semin Liver Dis*, 2000, 20: 69-83.
- 3 刘妍, 段惠娟, 成军, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式启动 SV40 病毒早期启动子的研究. *军医进修学院学报*, 2003, 24: 81-83.
- 4 刘妍, 陆荫英, 成军, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志*, 2003, 28: 40-43.
- 5 党晓燕, 成军, 刘妍, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式启动基因 NS5ATP13 的克隆化研究. *胃肠病学和肝病杂志*, 2003, 12: 260-262.
- 6 Borgheresi RA, Palma MS, Ducancel F, et al. Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris*. *Toxicon*, 2001, 39: 1211-1218.
- 7 Rogeli B, Strukelj B, Bosch D, et al. Expression, purification, and characterization of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2000, 19: 329-334.
- 8 Fischer R, Drossard J, Commandeur U, et al. Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 30: 101-108.
- 9 李晶, 赵晓祥, 沙长青, 等. 甲醇酵母基因表达系统的研究进展. *生物工程进展*, 1999, 19: 17-20.
- 10 欧阳立明, 张惠展, 张嗣同. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27: 151-154.
- 11 彭毅, 杨希才, 康良仪. 影响甲醇酵母外源蛋白表达的因素. *生物技术通报*, 2000, 4: 33-36.
- 12 杨晨, 黄鹤, 章如安. 重组人血清蛋白在 *Pichia pastoris* 中分泌表达影响因素的研究. *生物工程学报*, 2000, 16: 675-678.
- 13 Kim YK, Jin Y, Vukoti KM, et al. Purification and characterization of human nucleolar phosphoprotein 140 expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2003, 31: 260-264.

(收稿日期: 2007-05-14)

(本文编辑: 王丹静)