

猪瘟病毒流行毒株 E2 基因密码子优化 及在酵母中的高效表达

韩雪清¹ 刘湘涛¹ 张永国² 张 涌² 谢庆阁¹

(¹ 中国农业科学院兰州兽医研究所 农业部畜禽传染病重点实验室 兰州 730046)

(² 西北农林科技大学生物工程研究所 杨凌 712100)

摘 要 密码子的偏嗜性是影响基因异源表达的重要参数之一,优化密码子序列能够提高外源基因的表达水平。野生型猪瘟病毒 E2 基因在毕赤酵母中的表达量较低,为了提高 E2 基因在毕赤酵母中的表达水平,利用 PCR 基础上的定点突变技术将 E2 基因上的毕赤酵母低利用密码子突变为高利用率的简并密码子。结果表明,替换野生型 E2 基因上 24 个酵母低利用密码子后,E2 基因在酵母中表达水平有较显著提高,表明通过密码子优化提高 E2 基因在毕赤酵母中的表达这一策略是成功的。

关键词 猪瘟病毒 E2 基因表达 密码子优化 酵母

中图分类号:Q789 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)05-0560-09

猪瘟(Classical Swine Fever,CSF)是世界范围内危害十分严重的猪接触性传染病。CSF 防治主要是以免疫或净疫为基础,但目前这两种方针在执行中都面临着很大的困难。第一,温和型猪瘟出现后,已应用 40 余年的 C-株弱毒疫苗频频发生免疫失败,加大免疫剂量效果也不显著。第二,由于注射弱毒疫苗后无法区分免疫的和自然感染野毒的动物,加之在国际贸易中许多国家禁止从疫苗免疫国家或地区进口生猪及猪肉制品,从而大大限制了传统疫苗的使用。而在实行净疫政策防治 CSF 的国家,由于禁止进行免疫接种,这些国家的猪群暴发 CSF 风险极高,一旦暴发 CSF 就会造成巨大的经济损失。1997~1998 年荷兰、德国、比利时和西班牙等欧盟成员国暴发 CSF,直接经济损失达数十亿美元,故研制亚单位标记疫苗已迫在眉睫。因为亚单位标记疫苗能够帮助摆脱上述防治政策面临的困境,所以成为近年来 CSF 新型疫苗研究的热点^[1]。CSF 的致病原是一种 RNA 病毒,即经典猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus,CSFV)。CSFV 由 12 个基因组成,其中 E2 基因编码的病毒囊膜糖蛋白是其主要的保护性抗原蛋白,能够单独诱导有效的免疫保护反应^[2~5]。目前,CSFV 的主要保护性抗原基因已在大肠杆菌、昆虫杆状病毒等表达系统中成功地进行了表达,表达产物免疫动物后能够保护其抵抗强毒的攻击。但上述表达系统都存在一些不足之处,如表达产物缺乏活性或无翻译后修饰或不易操作等^[6~9]。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是 20 世纪 80~90 年代发展起来的一种极具潜力的真核表达系统,具有其它表达系统所不具备的优点,即兼有原核细胞良好的可操作性和真核系统的翻译后加

基金项目:国家 973 项目(G199011900)

作者简介:韩雪清(1962-),女,甘肃兰州市人,副研究员,清华大学博士后,研究方向为病毒分子生物学和病毒生物大分子结构与功能。Tel:86-931-8342710;E-mail:hanxueq@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-11-18,修回日期:2003-06-25

工的双重特点,且具有高稳定、高表达、高分泌等特点,适合于表达二硫键丰富的 E2 蛋白^[10,11]。我们已报道了利用 *P. pastoris* 成功表达 CSFV 遗传树中 Group1 中代表毒株 Shimmen 株的 E2 基因,但表达量较低^[12]。这可能是 *P. pastoris* 的密码子偏爱所致。密码子选择和分布是影响基因有效表达的因素之一,通过对外源基因上的密码子序列进行优化可提高蛋白表达水平。本研究利用 PCR 基础上的定点突变技术对流行野毒中的代表株——广西玉林株 E2 基因密码子序列进行了优化,显著提高了 E2 基因的表达水平,并为研制 CSFV 流行毒株基因工程亚单位疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毒株、菌株和 DNA 载体

猪瘟病毒流行野毒株分离自广西玉林病猪组织, -70°C 保存^[13]; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和 DH5 α 菌株由本室保存; pMD18-T 和 pPROEXTM HTb 载体分别购自 TaKaRa 和 Lifetech 公司; 酵母菌 SMD1168 和 pPIC9K 分泌型表达载体由中国科学院微生物研究所的田波院士惠赠。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等工具酶购自 Promega 公司; G418、YNB 等购自 Invitrogen 公司; DNA 纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (for color detection with NBT/BCIP) TRLzol 试剂为 Gibco BRL 公司产品。

1.3 RT-PCR 和 nPCR

采用 TRLzol 试剂,从 CSFV C-株兔脾组织毒和 CSFV 广西毒株病猪脾组织毒中提取总 RNA。按文献^[12]的方法扩增 E2 基因,PCR 产物经电泳鉴定后对片段大小合适者进行测序。

1.4 E2 基因密码子的优化

根据赵翔等^[14]方法对 *Pichia pastoris* 密码子用法分析结果的基础上,利用 DNASTar 分子生物学分析软件对 CSFV 广西毒株 E2 基因密码子组成及分布分析发现,其 5' 端部分存在 5 处可能不利于在 *Pichia pastoris* 中高效表达的含有低利用率密码子的区域。设计了 9 条突变引物(表 1)。然后采用 PCR 基础上的定点突变技术对 E2 基因密码子进行优化。具体操作如下:首先分别以 P_1 和 R_1 、 P_6 和 R_3 为引物,以 CSFV 广西株 E2 基因为模板,分别扩增出两个带有重叠序列的片段,将 E2 分为两部分,由于引物上带有 *Eco*R I、*Bgl* II 和 *Not* I 序列,在扩增片段两边分别引入了 4 个酶切位点。对广西毒株 E2 基因密码子的优化参照 Van Rijn 等^[15]所采用的方法进行,通过两轮 PCR 扩增实施(图 1)。共进行 4 次突变反应,待所有的反应完全结束后,将最后获得的 P_1R_1 片段与前面所扩增的 P_6R_3 片段分别用琼脂糖凝胶电泳纯化回收后,等体积混合,按照 Ho 等^[16]的方法,以 P_1 和 R_3 为引物,利用 *pfu* DNA 聚合酶扩增 P_1R_3 片段,PCR 反应条件为 95°C 50s, 48°C 1min, 72°C 150s, 35 个循环。扩增完成后,琼脂糖凝胶电泳回收纯化 P_1R_3 片段,然后利用 T4 DNA 连接酶将其克隆到 pMD-18T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,得到阳性重组克隆 nMD-18T/F2。质粒由大连

宝生物公司测序。

表 1 克隆和定点突变的引物

Table 1 Primer for cloning and site-specific mutagenesis

Primer	Nucleotide sequence	Length/nt
P ₁	5'GCGAATTCAGACTTGCCTGTAAGGAAGATTAC 3'	32
P ₂	5'TTACAGATACGCTATCTCTCCACCGATGAG 3'	31
P ₃	5'TGAGGTTGGTCTGTGGGTGCTGA AGG 3'	27
P ₄	5'TTAGTAAGAGATACCTGCC 3'	19
P ₅	5'TACCTCA GTTACTTTTCAACTTCTTTTCGATGGGAC 3'	36
P ₆	5'GGAAGATCTGTCTACTGC 3'	19
R ₁	5'GAACAGATCTTCCITTTCAACAATAG 3'	26
R ₂	5'GCTGTGCTGTAGAAAGCACTGCCGT3'	25
R ₃	5'GAGCGCCGCCAACTAGTCCGTGTGGTG3'	28

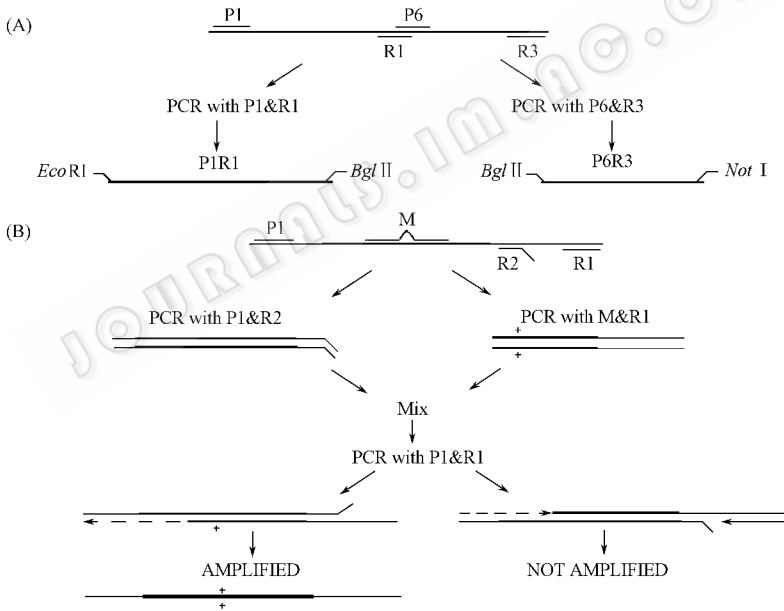


图 1 E2 基因密码子序列优化策略

Fig. 1 Strategic map of optimizing E2 gene codons

1.5 重组酵母表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Hin*d III 分别双酶切 pMD-18T/E2 质粒和 pPROEXTM HTb 载体, 琼脂糖凝胶电泳分别回收约 1100bp 和 4700bp 片段, 两片段按适当比例混合, 加入 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接 20h, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌, 挑选 Amp⁺ 阳性的重组菌落接种含有 Amp⁺ 的 LB 培养基, 小提质粒后用 *Bam*H I 和 *Hin*d III 进行酶切鉴定, 得到插入 E2 基因的重组质粒 pPROEXTM HTb/E2。用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切 pPROEXTM HTb/E2 质粒, 同时用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切 *P. pastoris* 分泌性表达载体 pPICOK, 利用琼脂糖凝胶电泳分别回

收 1.1bp 左右和 9.0kb 左右的片段,将两片段按适当比例混合后,加入 T4 DNA 连接酶,于 16℃ 连接 20h。取 5 μ L 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌,挑选 Kna⁺ 阳性的重组菌接种含 Kna⁺ 的 LB 培养基,小提质粒后用 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定,最后得到插入 E2 基因的重组表达质粒 pPIC9K/E2。

1.6 酵母的转化和重组酵母的筛选

重组的 pPIC9K 载体经 *Sal* I 线性化后,利用电穿孔法转化酵母宿主菌 SMD1168,经 MD 平板筛选整合了 E2 基因的 His⁺ 重组酵母菌克隆,再利用含不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选含有高拷贝目的基因的重组酵母菌克隆。

1.7 重组酵母菌的鉴定

1.7.1 酵母基因组 DNA 的提取:采用玻璃珠法,参照文献 [17] 进行操作。

1.7.2 重组酵母 DNA 的 PCR 扩增和测序:PCR 所用引物为扩增 E2 用的 P₁ 和 R₃,方法同前。反应体系:10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, Mg²⁺ 3 μ L,引物 P₁/R₃ 各 20pmol/L,含石门株 E2 基因的质粒 1 μ L, *Taq* 酶 0.5U, ddH₂O 34.5 μ L。反应条件:98℃ 8min, 98℃ 10s, 55℃ 30s, 72℃ 90s, 35 个循环, 72℃ 10min。PCR 产物电泳,用 DNA 纯化回收试剂盒纯化回收目的片段。测序由大连宝生物工程有限公司完成。

1.7.3 重组酵母 DNA 的斑点杂交:以含 E2 基因的质粒为模板, P₁/P₂ 为引物,进行 PCR,将扩增片段进行标记即得探针,依试剂盒说明操作。将重组酵母基因组 DNA 分别做 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 稀释,同时对对照未重组酵母基因组的 DNA 分别做 1:5、1:10 稀释,各取 2 μ L 点样,按试剂盒所述方法进行 DNA 斑点杂交。

1.8 重组酵母的培养和诱导表达

挑取筛选出的含有高拷贝目的基因的重组酵母菌克隆接种 100mL 的 MGY 液体培养基, 28℃ ~ 30℃ 摇床 280 ~ 300r/min 培养至 OD₆₀₀ 约 4。室温 3000g 离心 5min,弃上清,用 1/10 原培养体积的诱导培养基 MMY 重悬菌体, 28℃ ~ 30℃ 继续诱导培养 3 ~ 4d,其间每 24h 加入 100% 的甲醇至终浓度 0.5% 以保持持续诱导。

1.9 表达 E2 蛋白的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定

用台式离心机在室温下以最大速度离心经甲醇诱导后的培养液 2 ~ 3min,将上清转移到干净的收集管,从中取适量的上清进行 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定,其余置 -80℃ 冻存。

2 结果

2.1 E2 基因密码子的优化

E2 基因突变前后测定的核甘酸序列分析比较结果(图 2)显示,突变后的 E2 基因上共有 24 个密码子的序列获得成功突变,而氨基酸的序列则无变化,这与实验设计的结果完全一致,表明通过 PCR 基础上的定点突变对 E2 基因密码子的优化是成功的。

2.2 重组酵母表达载体的构建

含有 E2 基因的重组酵母表达载体 pPIC9K/E2 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切获得了约 1100bp 片段,由此表明构建成功。

1	CGGCTGCGCTGTAAGGAAGATTACAGGTATGCGATATCTCTCCACCGATGAGGTTGGGCTG	GX-E2.seq
1	CGGCTGCGCTGTAAGGAAGATTACAGGTATGCGATATCTCTCCACCGATGAGGTTGGTCTG	Optimized E2.SEQ
61	CTAGGGCTGTAAGGTCTCACCACCACCTGGAAAGAATACAACCATGGTTTGCAGCTGGAT	GX-E2.seq
61	TTAGGTGCTGAAGGTCTCACCACCACCTGGAAAGAATACAACCATGGTTTGCAGCTGGAT	Optimized E2.SEQ
121	GACGGGACTGTCAGGGCCATTTCGACTGCGAGGGTCCTTTAAAGCTACAGCTCTTAATGTG	GX-E2.seq
121	GACGGGACTGTCAGGGCCATTTCGACTGCGAGGGTCCTTTAAAGCTACAGCTCTTAATGTG	Optimized E2.SEQ
181	GTTAGTAAGCGGTACCTGGCATCATTACACAAGAGGGCTCTGCCTACCTCAGTTACATTTT	GX-E2.seq
181	GTTAGTAAGCGGTACCTGGCATCATTACACAAGAGGGCTCTGCCTACCTCAGTTACTTTCT	Optimized E2.SEQ
241	GAACTCTCTTTTGGATGGGACCAGCCAGCAATTGAGGAGATGGGAGATGACTTTGGATTT	GX-E2.seq
241	GAACTCTCTTTTGGATGGGACCAGCCAGCAATTGAGGAGATGGGAGATGACTTTGGATTT	Optimized E2.SEQ
301	GGACTGTGCCCTTTTGACACAATTTCCGTGGTCAAAGGGAAGTACAATACCACCTTTATTA	GX-E2.seq
301	GGACTGTGCCCTTTTGACACAATTTCCGTGGTCAAAGGGAAGTACAATACCACCTTTATTA	Optimized E2.SEQ
361	AACGGCAGTGCTTTCTACCTAGTCTGCCCAATAGGATGGACGGGTGTCATAGAGTGCACA	GX-E2.seq
361	AACGGCAGTGCTTTCTACCTAGTCTGCCCAATAGGATGGACGGGTGTCATAGAGTGCACA	Optimized E2.SEQ
421	GCAGTAAGCCCACAACCTTGAGAACAGAAGTGGTGAACACCCTTCAAGAGAGAGAAGCCT	GX-E2.seq
421	GCAGTAAGCCCACAACCTTGAGAACAGAAGTGGTGAAGACCTTCAAGAGAGAGAAGCCT	Optimized E2.SEQ
481	TTCCCGCACAGAGTGGGCTGCGTGACCCTATTGTTGAAAAAAGAAGATCTGTTCTACTGC	GX-E2.seq
481	TTCCCGCACAGAGTGGGCTGCGTGACCCTATTGTTGAAAAAAGAAGATCTGTTCTACTGC	Optimized E2.SEQ
541	AAGTTGGGGGGTAATTTGGACATGTTGTGAAAGGCAACCCAGTGACCTACGCTGGGGGGCAA	GX-E2.seq
541	AAGTTGGGGGGTAATTTGGACATGTTGTGAAAGGCAACCCAGTGACCTACGCTGGGGGGCAA	Optimized E2.SEQ
601	GTAAACAATGCAGGTGGTGCCTTTTGTACTTCAAGGAGCCCGATGGGCTCCACACTAC	GX-E2.seq
601	GTAAACAATGCAGGTGGTGCCTTTTGTACTTCAAGGAGCCCGATGGGCTCCACACTAC	Optimized E2.SEQ
661	CCCCTAGGCAAGTGCATCCTAGCAAATGAGACGGGTTACAGGGTAGTGGATTCCACAGAC	GX-E2.seq
661	CCCCTAGGCAAGTGCATCCTAGCAAATGAGACGGGTTACAGGGTAGTGGATTCCACAGAC	Optimized E2.SEQ
721	TGCAACAGAGATGGCGTCTTATCAGCACTGAAGGAGAACACGAGTGCCTTGATTGGCAAC	GX-E2.seq
721	TGCAACAGAGATGGCGTCTTATCAGCACTGAAGGAGAACACGAGTGCCTTGATTGGCAAC	Optimized E2.SEQ
781	ACCACCGTTAAGGTGCACGCGTTGGATGGAAGACTGGCCCTATGCCGTGCAGACCCAAA	GX-E2.seq
781	ACCACCGTTAAGGTGCACGCGTTGGATGGAAGACTGGCCCTATGCCGTGCAGACCCAAA	Optimized E2.SEQ
841	GAAATCGTCTCTAGCGCGGGACCTGTAAGGAAAACCTTCTGTACTTTCAACTACACAAAG	GX-E2.seq
841	GAAATCGTCTCTAGCGCGGGACCTGTAAGGAAAACCTTCTGTACTTTCAACTACACAAAG	Optimized E2.SEQ
901	ACTCTAAGAAACAAGTACTATGAACCCAGGGACAGCTACTTTACAGCAATATATGCTTAAAG	GX-E2.seq
901	ACTCTAAGAAACAAGTACTATGAACCCAGGGACAGCTACTTTACAGCAATATATGCTTAAAG	Optimized E2.SEQ
961	GGCGAGTACCAACTACTGGTTTGTACTGGACGTGACTGACCACCACACGGACTATCTTC	GX-E2.seq
961	GGCGAGTACCAACTACTGGTTTGTACTGGACGTGACTGACCACCACACGGACTAGTTC	Optimized E2.SEQ

Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from the Consensus.

图2 密码子优化前后的 E2 基因核苷酸序列

Fig.2 The nucleotide sequences of E2 and the optimized E2

2.3 重组酵母 DNA 斑点杂交

对照未重组酵母基因组 DNA 1:1、1:5、1:10 均为阴性,重组酵母基因组 DNA 1:1、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 均为阳性(图3)。证明重组酵母基因组 DNA 含 E2 基因,即 E2 基因稳定整合到酵母基因组中。

2.4 重组酵母 DNA 中 E2 基因的 PCR 扩增和测序

提取酵母菌 DNA,用 PCR 扩出目的条带并测序,结果与前面的测序结果完全一致,证明 E2 基因整合到重组酵母菌的转化子的基因中。

2.5 E2 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定

构建好的 E2 基因酵母表达载体经 *Sal* I 线性化后转化酵母宿主菌 SMD1168,利用 MDH 平板和 G418 筛选含有高拷贝目的基因的重组酵母菌克隆,经甲醇诱导后取上清进行 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定。结果(图 4)显示,在约 56kD 处存在一特异的蛋白表达条带,与预计的目的蛋白的大小基本一致,并且该蛋白带能与 CSF 的阳性血清发生特异性反应,表明 E2 蛋白在毕赤酵母中得到了成功表达。

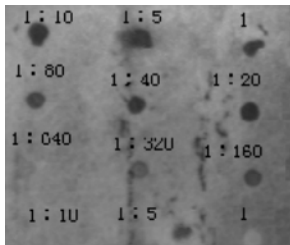


图 3 重组酵母菌 DNA 的斑点试验

Fig.3 Dot blot of recombinant *Pichia pastoris* DNA

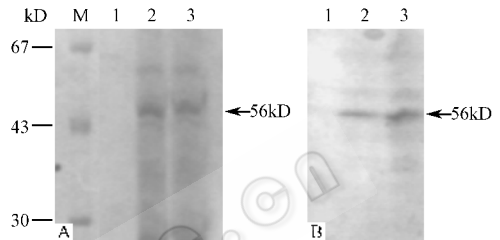


图 4 E2 基因在毕赤酵母中表达的 SDS-PAGE(A) 和 Western blot(B) 结果

Fig.4 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of E2 expressed in *Pichia pastoris*

M. Protein molecular weight marker; 1. The protein expressed in *P. Pastories* transformed with pPIC9K; 2 and 3. The protein expressed in *Pichia* transformed with pPIC9K-E2.

3 讨论

CSFV 流行毒株的变异可能是近年来影响 C-株弱毒疫苗免疫保护力降低的一个重要的因素,研制针对当前流行毒株的基因工程疫苗可能是解决目前 CSF 流行日趋上升、弱毒疫苗免疫屡屡失败的难题,最终消除疫源的一种有效手段。本研究中所选用的广西玉林毒株是目前正在我国流行的流行毒株(Group 2)中最具代表性的流行毒株,该毒株在细胞培养中增殖稳定,因此极适合用于 CSFV 新型基因工程疫苗的研究。近年来虽然国内外许多研究机构均在体外成功地表达了 CSFV 的主要抗原基因 E2,但因表达产物的不同缺陷,结果并不理想。我们以前也曾报道在毕赤酵母中成功地表达了 CSFV 石门毒(Group 1 的代表毒株)的 E2 基因,但表达量较低。在异源基因表达的研究中,达到尽可能高的表达水平是很重要的,因此为了进一步提高 CSFV E2 基因的表达产量,我们开展了本项研究。

影响外源基因表达水平的因素很多,除了结构基因旁侧的调控元件外,基因自身的编码序列中也含有与该基因表达水平有关的关键信息^[18]。密码子的选择可能是影响表达的参数之一。尽管大多数氨基酸的遗传密码子是简并的,但在原核和真核基因上简并密码子的使用并不是随机的,基因表达水平与嗜好密码子的使用程度之间存在强的相关

性^[19,20]。从异源基因表达和密码子使用的有关研究文献中得出的比较一致的结论是,优化密码子序列将会提高表达水平。酵母密码子的使用与表达水平之间的相关性已被提出,酵母基因的编码序列显示,61个三联密码子中的25个具有偏爱性,这种偏爱性密码子的使用程度与其表达水平是正相关的,暗示优化密码子的使用可能有助于高水平表达^[21~24]。Sharp等^[25]对酵母中110个基因的密码子偏向性进行了研究,发现在酵母大量表达的基因中,编码Arg的6个密码子中AGA的使用频率为86.6%,而根本不使用CGA和CGG这两种密码子。Shiping等^[26]对酵母等中的低利用密码子分析结果显示,CGC、CGG、CGA、CCG、CUC、GCG、ACG和AGG等8个密码子在酵母中使用率最低,其中编码Arg的CGG、CGC和CGA的使用率不超过5%。在CSFV广西毒株E2基因中,有两个编码Arg的密码子CGG和3个编码Leu的CUC等共20个最低利用率的密码子。为了提高E2基因在毕赤酵母中的表达水平,我们利用赵翔等^[14]确定出毕赤酵母的19个高表达优越密码子对E2基因的密码子序列进行优化,共有24个密码子序列被替换。从E2基因的表达结果来看,这样改造后的E2基因与以前报道的仅改造了两个Arg密码子的E2基因相比,在表达水平上有了显著提高,表明我们对E2基因的优化是成功的。

定点突变是基因密码子序列替换常用的方法,其中最有效的方法是在PCR基础上的定点突变技术。有许多利用PCR进行定点突变的报道,最有效的方法之一就是Higuchi等^[27]报道的重叠延伸方法。但该方法每次突变都需要两条新的引物,因此,不适于在同一DNA序列上进行广泛突变。本研究中,我们采用了另一种改进的利用PCR进行密码子替换的方法,对CSFV广西毒株E2基因上的24个密码子序列进行了突变,测序结果表明上述密码子都得到了正确的替换,并且没有随机突变的情况,进一步表明该方法是一种可用于在同一DNA序列上进行广泛突变的极其有效的方法。

*P. pastoris*表达系统是一种能进行蛋白翻译后修饰,包括糖基化修饰的真核高效表达系统^[28],这是因为酵母细胞在分泌过程中能正确识别外源蛋白上的N-糖基化信号,进行正确的糖基化修饰^[29,30]。E2基因在CSFV病毒上编码的产物是一种结构糖蛋白,因此利用*P. pastoris*表达的E2蛋白更接近病毒自身的E2糖蛋白,更适于用于开发CSFV亚单位标记疫苗的表达系统,本项研究也将为研制新型CSF基因工程疫苗奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Moormann R J, Bouma A, Kramps J A. Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Vet Microbiol*, 2000, **73**: 209 ~ 220.
- [2] Hulst M M, Westra D F, Wensvoort G. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, 1993, **67**(9): 5435 ~ 5442.
- [3] Konig M, Lengsfeld T, Pauly T. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 1995, **69**(10): 6479 ~ 6486.
- [4] Van Rijn P A, Bossers A, Wensvoort G. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J Gen Virol*, 1996, **77**: 2737 ~ 2745.
- [5] Van Zijl M, Wensvoort G, de Kluiver E. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol*, 1991, **65**(5): 2761 ~ 2765.
- [6] Hammond J M, McCoy R J, Jansen E S. Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the

- classical swine fever virus gp55(E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine*, 2000, **18**:1040~1050.
- [7] Ruggli N, Moser C, Mitchell D. Baculovirus expression and affinity purification of protein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187. *Virus Genes*, 1995, **10**(2):115~126.
- [8] 余兴龙, 涂长春, 李红卫, 等. 猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的构建及基因疫苗的研究. *中国病毒学*, 2000, **15**(3):264~271.
- [9] 周鹏程, 陆宇, 陈建国. 猪瘟病毒 E2(gp55)基因的克隆表达及其 DNA 疫苗的初步研究. *微生物学报*, 2000, **40**(3):223~251.
- [10] 瞿礼嘉, 主编. 现代生物技术导论. 第一版. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [11] 彭毅, 杨希才, 康良仪. 影响甲醇酵母中外源蛋白表达的因素. *生物技术通报*, 2000, **4**:33~36.
- [12] 韩雪清, 刘湘涛, 张涌, 等. 猪瘟病毒 E2 基因在 *Pichia pastoris* 中的表达及其免疫活性的初步研究. *生物工程学报*, 2002, **18**:208~211.
- [13] 张永国, 刘湘涛, 韩雪清. 广西猪瘟流行毒与 C 株疫苗毒 gp55(E2)主要抗原区 DNA 序列差异的比较. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2002, **30**(1):79~84.
- [14] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. *生物工程学报*, 2000, **16**(3):308~311.
- [15] Van Rijn P A, Miedema G K, Wensvoort G. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol*, 1994, **68**(6):3934~3942.
- [16] Ho S N, Hunt H D, Horton R M. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, **77**(1):51~59.
- [17] 奥斯泊 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [18] Mellor J, Dobson M J, Roberts N A. Factors affecting heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1985, **33**(2):215~226.
- [19] Chen C Y, Oppermann H, Hitzeman R A. Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1984, **12**(23):8951~8970.
- [20] Hoekema A, Kastelein R A, Vasser M. Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol Cell Biol*, 1987, **7**(8):2914~2924.
- [21] Kim C H, Oh Y, Lee T H. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin(EPO) in mammalian cells. *Gene*, 1997, **99**(1-2):293~301.
- [22] Cormack B P, Bertram G, Egerton M. Yeast-enhanced green fluorescent protein(yEGFP)a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 1997, **143**(Pt 2):303~311.
- [23] Lakey D L, Voladri R K, Edwards K M. Enhanced production of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Escherichia coli* by replacement of low-usage codons. *Infection and Immunity*, 2000, **68**(1):233~238.
- [24] Uchijima M, Yoshida A, Nagata T. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J Immunol*, 1998, **161**(10):5594~5599.
- [25] Sharp P M, Tuohy T M, Mosurski K R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1986, **14**(13):5125~5143.
- [26] Zhang S P, Zubay G, Goldman E. Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 1991, **105**(1):61~72.
- [27] Higuchi R, Krummel B, Saiki R K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**(15):7351~7367.
- [28] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8**(6):423~488.
- [29] Grinna L S, Tschopp J F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1989, **5**(2):107~115.
- [30] Kukuruzinska M A, Bergh M L, Jackson B J. Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**:915~944.

Codon Optimization and Expression in *Pichia pastoris* of E2 Gene of Classical Swine Fever Virus

Han Xueqing^{1*} Liu Xiangtao¹ Zhang Yongguo² Zhangyong² Xie Qingge¹

(¹ Key Laboratory of Agricultural Minister for Animal Virology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China)

(² Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: Codon bias was one of the important parameter which influence heterogenous gene expression, optimizing codon sequence could improve expression level of heterogenous gene. In the preview study, wildtype E2 gene was expressed poorly in *Pichia pastoris*, in order to improve the expression level of E2 gene in *Pichia pastoris*, the low usage codons of E2 gene were mutated into high usage codons in *Pichia pastoris* by directed-mutagenesis based on PCR. The result showed that, compared with the results reported in preview study, the expression level of E2 gene in *Pichia pastoris* was improved observably by substituting 24 low usage codons of E2 gene for the high usage synonymous codons. It suggested the strategy to improve the expression of E2 gene in *Pichia pastoris* by codon optimization was successful.

Key words: Codon optimization, *Pichia pastoris*, E2 gene expression, Classical swine fever virus

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G199011900)

* Corresponding author. Tel 86-931-8342710; E-mail: hanxueq@yahoo.com.cn

Received date: 11-18-2002

欢迎订阅 2004 年《应用生态学报》

《应用生态学报》1990 年创刊,是经国家科委批准、科学出版社出版的国内外发行的综合性学术刊物。本刊宗旨是坚持理论联系实际,的办刊方向结合科研、教学、生产实际报导生态科学诸领域在应用基础研究方面具有创新的研究成果,交流基础研究和应用研究的最新信息,促进生态学研究为国民经济建设服务。

本刊专门登载有关应用生态学(主要包括森林生态学、农业生态学、草地牧业生态学、渔业生态学、自然资源生态学、全球生态学、污染生态学、化学生态学、生态工程学等)的综合性论文、创造性研究报告和研究简报等。读者对象主要是从事生态学、地学、林学、农学和环境科学研究、教学、生产的科技工作者,有关专业的大学生及经济管理和决策部门的工作人员。

本刊与数十家相关学报级期刊建立了长期交换关系。《中国科学引文索引》、《中国生物学文摘》、美国《生物学文摘》(BA)、美国《化学文摘》(CA)、英国《生态学文摘》(EA)、日本《科学技术文献速报》(CBST)和俄罗斯《文摘杂志》(PK)等十几种权威检索刊物均收录本刊的论文摘要(中英文),并被认定为《中国核心期刊(遴选)数据库》和《中国科学引文数据库》来源期刊。本刊的整体质量与水平已达到新的高度,1992 年荣获全国优秀科技期刊三等奖和中国科学院优秀期刊二等奖,1996 年荣获中国科学院优秀期刊三等奖,2000 年荣获中国科学院优秀期刊二等奖,2001 年入选中国期刊方阵双效期刊。

本刊为月刊, A4 开本, 76 页, 每月 18 日出版, 定价 28.00 元, 全国各地邮政局(所)均可订阅, 发代号 8-98。过订期也可直接向本刊编辑部邮购, 人订阅优惠 30%。地址: 110016 辽宁省沈阳市文化 72 号《应用生态学报》编辑部, 电话 (024) 83970393, E-mail: xjiae@iae.ac.cn