

梅毒螺旋体膜抗原基因在毕赤酵母中的表达和蛋白纯化

黄宗炎¹, 王亚妮¹, 朱娟莉², 董兆麟¹, 陈超^{2*}

(¹ 西北大学生命科学学院 国家微检测系统工程技术研究中心 西安 710069)

(² 陕西西大北美基因股份公司 西安 710069)

摘要:以梅毒螺旋体(*Treponema pallidum* subsp. *pallidum*) Nichols 菌株基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增梅毒螺旋体 47kDa、17kDa 和 15kDa 3 个膜抗原基因,克隆进毕赤酵母表达载体 pPICZ B,构建重组表达载体 pTP47、pTP17、pTP15,转化酵母菌株 GS115,甲醇诱导表达。表达菌体裂解后通过镍离子亲和层析获得 3 个抗原与 6xHis tag 的融合蛋白,重组蛋白的获得量分别为 His-TP15 4.8mg/L,His-TP17 6.6mg/L,His-TP47 25mg/L,经 SDS-PAGE 鉴定纯度都在 96% 以上,ELISA 鉴定均具有很好的抗原性。从而首次在毕赤酵母中表达出梅毒螺旋体膜抗原,为梅毒血清学检测方法开辟了新的抗原制备途径。

关键词:梅毒螺旋体;毕赤酵母;膜抗原;表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)05-0831-04

梅毒(*Syphilis*)是一种由梅毒螺旋体引起的性传播疾病。虽然近几十年来梅毒发病率呈下降趋势,但最近几年,特别是进入 21 世纪以来,梅毒发病率在全球范围内又急剧上升^[1]。梅毒螺旋体迄今为止还不能在体外培养,在兔子睾丸内培养并且分离螺旋体成本高,效率低,而且易受兔子组织污染^[2]。相对而言,用基因重组的方法获得梅毒抗原就显得比较容易。

国内外研究表明梅毒抗原的构成相对复杂,目前发现至少有数十种蛋白有抗原性^[3],其中 47kDa、17kDa、15kDa 3 个膜脂蛋白具有较强的抗原性^[4-6]。47kDa 被认为是梅毒螺旋体内丰度最高^[7]、免疫原性强^[8]和特异性好的抗原,15kDa 和 17kDa 虽然含量较低,但无论在人体内还是动物实验都表明是主要的免疫原^[9-11]。3 种抗原目前均已制备有单克隆抗体,并已应用于临床检测。

目前,已报道的 3 种重组抗原均是在大肠杆菌内表达^[4-8],在酵母中表达则未见报道。本研究首次采用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)对梅毒 47kDa、17kDa、15kDa 3 个抗原(不含 N 端信号肽)进行重组表达。与传统的大肠杆菌表达系统相比,毕赤酵母的优势在于它可对表达的蛋白进行加工折叠和翻译后修饰,外源基因可以整合到酵母染色体中,获得稳定的遗传性。此外,它还克服了大肠杆菌表达产物多以包涵体形式存在、复性困难、背景杂蛋白多、不易纯化等缺陷。较酿酒酵母而言,又具有强诱导型醇氧化酶基因 AOX1 启动子,可有效地调控外源基因的高效表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和 DNA:大肠杆菌(*Escherichia coli*)

TOP10F'、表达质粒 pPICZ B 和菌株 *Pichia pastoris* GS115 均购于 Invitrogen 公司,梅毒螺旋体标准菌株 Nichols 基因组 DNA 由 Dr. Steven Norri(University of Texas Medical School)赠送。

1.1.2 工具酶和试剂:DNA 限制性内切酶、DNA 连接酶和 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司,IPVDF 膜由 OSMONICS INC 生产, α -myc 单抗购自 Invitrogen 公司,镍离子亲和层析柱(Ni-NTA Agarose)购自 Qiagen 公司,梅毒病人和正常人血清由西安市血站提供。

1.2 47kDa、17kDa、15kDa 3 个成熟蛋白基因(不包含 N 端信号肽序列)的扩增

引物基于 GenBank 中基因序列设计(47kDa、17kDa、15kDa 抗原基因在 GenBank 中的 accession number 分别为 M88769、M74825 和 U55214),47kDa 抗原基因上下游引物分别为 5'-AATCACGTCGATAATGTGTGGCTCGTCTCATCAT-3' 和 5'-TTCTCTAGATACTGGCCACTACCTTCGC-3'(5'端酶切位点分别为 *Pml* I 和 *Xba* I),17kDa 抗原基因上下游引物分别为 5'-ATAGAATTCATAATGTGTGTCTCGTGCACAACCG-3' 和 5'-ATAGCGGCCGCTTTCTTTGTTTTTTGAGC-3'(5'端酶切位点分别为 *Eco*R I 和 *Not* I),15kDa 抗原基因上下游引物分别为 5'-GCCGAATTCATAATGTGTTCATTTGATTCATCC-3' 和 5'-GCGTCTAGATACCTGCTAATAATGGCTTC-3'(5'端酶切位点分别为 *Eco*R I 和 *Xba* I)。50 μ L PCR 反应体系含模板 10ng,25mmol/L MgCl₂ 5 μ L,10 \times Ex *Taq* buffer 5 μ L,2.5mmol/L dNTP 2 μ L,20mmol/L 上下游引物各 1 μ L,Ex *Taq* 酶 2.5U,去离子水补足至 50 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

基金项目:国家“863 计划”(2005AA205220)

* 通讯作者。Tel 86-29-88303800;E-mail:chaochen@lifegen.com

作者简介:黄宗炎(1980-)男,福建尤溪人,硕士研究生,研究方向为微生物和分子生物学。E-mail:hzongyan@126.com

收稿日期:2005-12-01;接受日期:2006-03-07;修回日期:2006-04-11

1.3 重组表达载体 pTP47、pTP17 和 pTP15 的构建及鉴定

分别对氯仿:异戊醇抽提纯化过的 PCR 产物和质粒载体 pPICZ B 进行双酶切,酶切产物在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃ 过夜。连接产物转化 TOP10F' 感受态细胞,抽提质粒,双酶切鉴定重组子,并进行测序。

1.4 重组表达载体转化酵母菌株及其诱导表达

分别取 10 μ g 的 pTP47、pTP17 和 pTP15 重组质粒用 Sac I 内切酶线性化后,电转化酵母菌株 GS115(电转化条件为:电压 2000V、电容 25 μ F、电阻 200 Ω 、电转化杯直径 2mm),转化菌液在含 Zeocin 的 YPDS 平板上进行筛选,28℃~30℃ 倒置培养 48h。

在含有 Zeocin 的 YPDS 平板上挑取 10 个克隆,于 5mL BMGY[1% 酵母粉,2% 蛋白胨,100mmol/L 磷酸盐(pH6.0),1.34% 酵母氮源,4 \times 10⁻⁵ 生物素,1% 甘油]培养基中 28℃~30℃ 250r/min 过夜培养至 OD₆₀₀ = 2~6 时,3500r/min 离心,弃上清,沉淀悬浮于诱导培养基 BMMY 中(不含甘油,含 0.5% 甲醇)使 OD₆₀₀ = 1~1.5,每 24h 补加甲醇至终浓度为 0.5%,诱导表达 72h,取 1mL 菌液,离心收集菌体沉淀。菌体沉淀加入裂解缓冲液(50mmol/L 磷酸钠,1mmol/L PMSF,1mmol/L EDTA,5% 甘油,pH7.4)100 μ L 和等体积直径为 0.5mm 的玻璃珠,剧烈震荡 1min,冰浴 1min,反复 15 次,4℃、14000r/min 离心收集上清。上清经 SDS-PAGE(以空质粒 pPICZ B 表达做对照)筛选出表达量较高的克隆。

1.5 免疫印迹杂交(Western blot)鉴定

将少量表达收集的菌体沉淀裂解,取上清 SDS-PAGE 转移至 PVDF 膜(转移条件为恒压 80V,1h),以 c-myc 单克隆抗体为一抗,HRP 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗做免疫印迹,已转化空质粒菌株作为阴性对照,化学发光(ECL)显色,胶片显影至清晰条带显出。

1.6 大量诱导表达并纯化重组蛋白

挑阳性菌株于 5mL BMGY 培养基中,28℃~30℃,250r/min 过夜培养至 OD₆₀₀ = 2~6,再接入 100mL BMGY 培养基中,继续培养至 OD₆₀₀ = 2~6,3500r/min 离心,弃上清,沉淀悬浮于诱导培养基 BMMY 中,OD₆₀₀ = 1~1.5,每 24h 补加甲醇至终浓度为 0.5%,诱导表达 72h,收集菌体,-80℃ 冻存备用。菌体沉淀重悬于 5mL 裂解缓冲液(Lysis buffer:50mmol/L NaH₂PO₄,300mmol/L NaCl,10mmol/L 咪唑,1mmol/L PMSF,0.05% Tween-20)中,超声破碎酵母细胞(超声功率 400W,超声 10s,间歇 30s,重复 20 次)4℃、14000r/min 离心 20min,取上清与 Ni-NTA Agarose 在 4℃ 平衡 1h 后,收集液体。清洗缓冲液(Wash buffer,含 20mmol/L 咪唑)4mL/次洗两遍,最后用洗脱液(Elution buffer,含 250mmol/L 咪唑)5mL/次洗脱 4 次。收集的样品进行 SDS-PAGE,目的蛋白用 Bradford 法测浓度。

1.7 ELISA 鉴定抗原活性

将收集纯化的重组蛋白分别包被微孔板,4℃ 过夜,5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2h,梅毒病人阳性血清作为一抗,HRP 标记的山羊抗人 IgG 作为二抗,设正常人血清作对照,鉴定抗原活性。

2 结果

2.1 重组酵母菌株的诱导表达

分别将整合进 pTP47、pTP17、pTP15 重组质粒的酵母菌株诱导表达,小量玻璃珠破碎后离心,上清进行 SDS-PAGE,以转化 pPICZ B 空质粒菌株作为对照。理论上 3 个成熟蛋白(去除 N 端信号肽)与 6 \times His tag 融合后分子量应分别为 48.5kDa、18kDa 和 17kDa。由图 1 知 His-TP47、His-TP17 和 His-TP15 重组蛋白实际分子量分别约为 48.5kDa、24kDa、17kDa,其中 His-TP17 蛋白比预期大一些(约 6kDa),分析原因很可能是由于酵母的糖基化作用导致分子量增大。

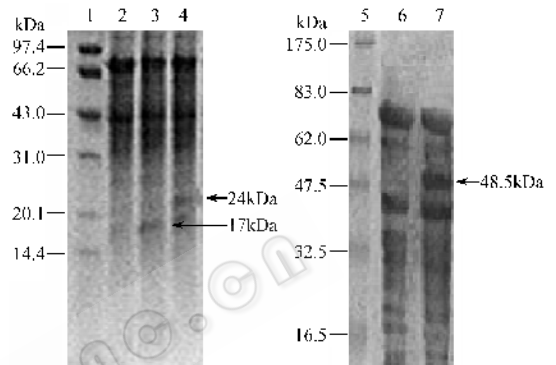


图 1 重组蛋白表达菌体裂解液的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of three antigens in *Pichia pastoris*. 1 and 5. Protein marker; 2 and 6. pPICZ B-GS115; 3. pTP15-GS115; 4. pTP17-GS115; 7. pTP47-GS115.

2.2 重组蛋白的免疫印迹(Western blot)鉴定

重组蛋白表达菌体裂解液经 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜上,用 c-myc 单抗作为一抗进行免疫印迹(Western blot)鉴定。结果表明在相应位置出现特异性杂交带,而含空质粒 pPICZ B 的对照菌未出现杂交带(图 2)。

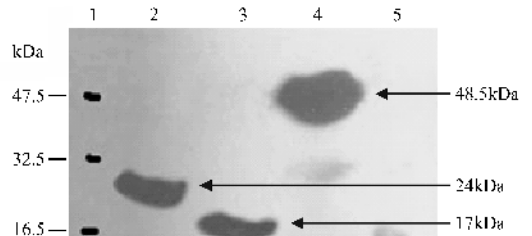


图 2 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig.2 Western blot analysis of recombinant antigens. 1. Protein marker; 2. pTP17-GS115; 3. pTP15-GS115; 4. pTP47-GS115; 5. pPICZ B-GS115.

2.3 重组蛋白的纯化并用 ELISA 检测蛋白抗原性

重组蛋白是带 6 \times His tag 的融合蛋白,用镍离子亲和层析的方法纯化目的蛋白,收集样品进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色(图 3-A、B、C)。可见杂蛋白均被清洗缓冲液洗脱(W1~W2),目的蛋白基本都被洗脱下来(E1~E4),而且无明显的杂蛋白。His-TP17 蛋白可能是由于部分降解或是糖基化作用,而在胶上呈现模糊条带(图 3-B E2 和 E3)。SDS-PAGE

胶经软件扫描后确定目的蛋白纯度都在 96% 以上。纯化蛋白用 Bradford 法测浓度,确定重组蛋白获得量分别为 His-TP15 4.8mg/L;His-TP17 :6.6mg/L;His-TP47 :25mg/L。最后以

梅毒阳性血清作为一抗进行 ELISA 检测,并确定 3 种重组蛋白均具有很好的抗原活性。

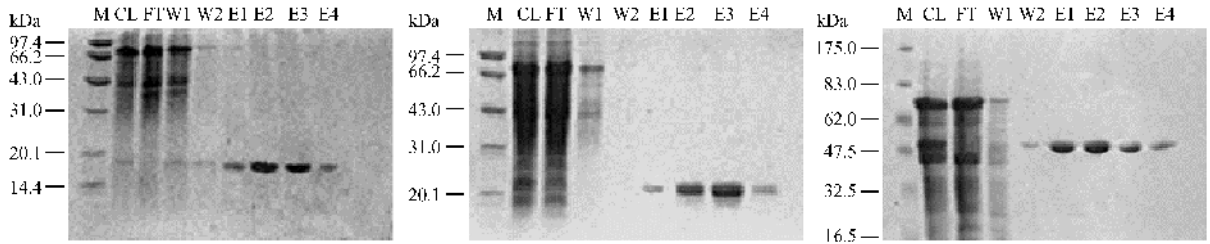


图 3 重组蛋白 His-TP15 (A)、His-TP17 (B) 和 His-TP47 (C) 亲和层析纯化后 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purification for recombinant protein His-TP15 (A), His-TP17 (B) 和 His-TP47 (C)

using Ni-NTA Agarose. M. Marker; CL. Cell-lysate; FT. Flow-through; W1-W2. Wash; E1-E4. Eluates.

3 讨论

血清学非特异性试验是目前梅毒初诊的主要方法,如快速血浆反应素试验(RPR),不加热血清反应素试验(USR),作为非螺旋体抗原试验,此类方法诊断梅毒特异性及敏感性较差,需做确认试验。而以梅毒螺旋体为抗原的特异性检测方法,如荧光螺旋体抗体吸收试验(FT-ABS),梅毒螺旋体血凝试验(TPHA)等方法虽然特异性、敏感性较好,但试剂成本较高,难以普及。近年来,应用梅毒螺旋体重组抗原作为血清学检测方法已经在国外展开^[12,13],应用研究趋向于将 2 种或 2 种以上的重组抗原联合使用,综合两种或多种抗原的不同特性,从而使其具有更高的特异性和敏感性;国内也开发出了数种酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒,多数是多抗原联合使用。国内外这类试剂盒研究应用,都集中在 15kDa、17kDa、47kDa 3 个膜抗原上^[14]。目前,这些抗原均在大肠杆菌中表达,存在包涵体复性困难,表达量低,表达不稳定^[15]等缺点。

毕赤酵母表达系统是近年发展起来的一个高效表达体系,与大肠杆菌及酿酒酵母表达系统相比具有不可比拟的优势,迄今已有数百种蛋白在此系统中表达^[16]。作为一种真核单细胞生物,可对外源蛋白进行加工折叠和翻译后修饰。此外,培养基营养要求低,易于高密度发酵培养和工业化放大生产。本研究首次尝试用毕赤酵母表达系统表达梅毒螺旋体 15kDa、17kDa、47kDa 3 个膜抗原,结果表明抗原基因通过与酵母基因组整合形成稳定的表达菌株,成功地表达出了膜抗原与 6 个组氨酸形成的融合蛋白。通过镍离子亲和层析纯化蛋白,操作简单,蛋白纯度高,经 SDS-PAGE 分析达到 96% 以上。其中 His-TP47 蛋白有较高的表达量,摇瓶培养达到 25mg/L,可以进一步进行发酵罐培养。His-TP15 和 His-TP17 蛋白表达量相对较低,His-TP17 蛋白比预期大了 6kDa 左右,这很可能是由于酵母糖基化作用导致^[17]。纯化蛋白经 ELISA 检测都有较好的特异性(数据未列出),表明糖基化作用并不影响 His-TP17 蛋白的抗原活性。

因此,用毕赤酵母表达的梅毒螺旋体 3 个重组蛋白 His-TP15、His-TP17 和 His-TP47 都可以用于梅毒血清学检测,从而

为制备梅毒螺旋体抗原开辟了新途径。特别是 3 个抗原的同时表达和纯化,为 2 个或 3 个抗原联合使用建立双抗原夹心血清学检测方法奠定了基础。本实验室正以金磁微粒为载体,用该方法制得的抗原建立梅毒 ELISA 检测系统。此外,我们用获得的 47kDa 抗原制备其单克隆抗体的工作也在进行中。

参 考 文 献

- [1] Zeltser R, Kurban AK. Syphilis. *Clinics in Dermatology*, 2004, 22: 461 - 468.
- [2] Sell S, Norris SJ. The biology, pathology, and immunology of syphilis. *Int Rev Exp Pathol*, 1983, 24: 203 - 276.
- [3] McKevitt M, Patel K, Smajs D, et al. Systematic cloning of *Treponema pallidum* open reading frames for protein expression and antigen discovery. *Genome Res*, 2003, 13(7): 1665 - 1674.
- [4] Norgard MV, Chamberlain NR, Swancutt MA et al. Cloning and expression of the major 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1986, 54(2): 500 - 506.
- [5] Akins DR, Purcell BK, Mitra MM, et al. Lipid modification of the 17-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity. *Infect Immun*, 1993, 61(4): 1202 - 1210.
- [6] Centurion-lara A, Arroll T, Castillo R, et al. Conservation of the 15-kilodalton lipoprotein among *Treponema pallidum* subspecies and strains and other pathogenic treponemes: genetic and antigenic analyses. *Infect Immun*, 1997, 65(4): 1440 - 1444.
- [7] Marchitto KS, Selland-Grossling CK, Norgard MV. Molecular specificities of monoclonal antibodies directed against virulent *Treponema pallidum*. *Infect Immun*, 1986, 51: 168 - 176.
- [8] Lukehart SA, Baker-Zander SA, Sell S. Characterization of the humoral immune response of the rabbit to antigens of *Treponema pallidum* after experimental infection and therapy. *Sex Transm Dis*, 1986, 13: 9 - 15.
- [9] Hanff PA, Fehniger TE, Miller JN, et al. Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *J Immunol*, 1987, 139: 1287 - 1291.

- [10] Baker-Zander SA , Fohn MJ , Lukehart SA. Development of cellular immunity to individual soluble antigens of *Treponema pallidum* during experimental syphilis. *J Immunol* , 1988 , **141** : 4363 – 4369.
- [11] Bishop NH , Miller JN. Humoral immunity in experimental syphilis II . The relationship of neutralizing factors in immune serum to acquired resistance. *J Immunol* , 1976 , **117** : 197 – 207.
- [12] Zrein M , Maure I , Soufflet L , *et al.* Recombinant antigen-based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antigens in blood bank routine. *J Clin Microbiol* , 1995 , **33** : 525 – 527.
- [13] Lefevre JC , Bertrand MA , Bauriaud R. Evaluation of the captia enzyme immunoassays for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. *J Clin Microbiol* , 1990 , **28** : 1704 – 1707.
- [14] 尹跃平 徐文严. 重组梅毒螺旋体抗原的研究进展. 国外医学皮肤性病学分册 , 1999 , **25** (6) : 352 – 355.
- [15] Sato NS , Suzuki T , Ueda T , *et al.* Recombinant antigen-based immuno-slot blot method for serodiagnosis of syphilis. *Brazilian J of Medical and Biological Research* , 2004 , **37** : 949 – 955.
- [16] Cereghino GPL , Cereghino JL , Ilgen C , *et al.* Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 2002 , **13** : 329 – 332.
- [17] Cereghino JL , Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* , 2000 , **24** : 45 – 66.

Expression and purification of membrane immunogens of *Treponema pallidum* in *Pichia pastoris*

HUANG Zong-yan¹ , WANG Ya-ni¹ , ZHU Juan-li² , DONG Zhao-lin¹ , CHEN Chao^{2*}

(¹ National Engineering Research Center for Miniaturized Detection System , Department of Biology , Northwest University , Xi 'an 710069 , China)

(² Shaanxi Lifegen Limited Liability Company , Xi 'an 710069 , China)

Abstract : Genes of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* three membrane antigens (47kDa , 17kDa and 15kDa) were amplified by PCR with the template of the genomic DNA of Nichols strain and cloned into plasmid pPICZ B , the recombinant plasmids of pTP47 , pTP17 and pTP15 were transformed into *Pichia pastoris* GS115. Recombinant antigens were expressed by the methanol induction and confirmed by the Western blot assay. Fusion antigens with 6 × His tag were purified using Ni-NTA agarose , and purified fusion protein yields were 4.8mg/L , 6.6mg/L and 25mg/L of cell culture for His-TP15 , His-TP17 and His-TP47 , respectively. Purity of all three antigens were more than 96% by SDS-PAGE assay. Particularly , His-TP17 was more about 6kDa molecular weight than that of expected probably because of glycosylation in *Pichia pastoris* . At last , these recombinant antigens were evaluated by ELISA assay with serum from syphilis patient and healthy blood donors , all three antigens showed strong sensitivity and specificity. So three membrane antigens of *Treponema pallidum* were expressed and purified fused with 6 × His tag in *Pichia pastoris* for the first time. The immunoreactivity results showed that all of which can be applied to diagnosis of *Treponema pallidum* , especially to diagnosis method based on combined two or three antigens.

Keywords : *Treponema pallidum* ; *Pichia pastoris* ; Membrane antigen ; Expression