



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118222604 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 21

(21) 申请号 202311823309.6

C07K 14/025 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.27

C12R 1/78 (2006.01)

(71) 申请人 江苏中慧元通生物科技股份有限公司

地址 225316 江苏省泰州市医药高新区杏林路32号

申请人 易慧生物技术(上海)有限公司

(72) 发明人 刘志磊 杨文彬 仝光杰 安有才

(74) 专利代理机构 北京邦申诚知识产权代理事务所(普通合伙) 11871

专利代理师 简德明

(51) Int. Cl.

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/37 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

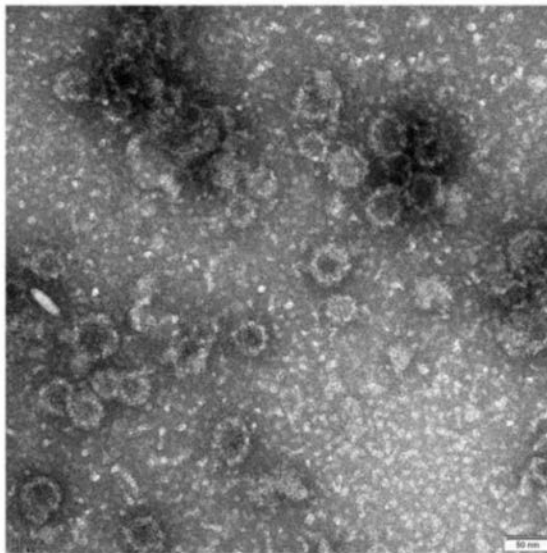
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株及其应用

(57) 摘要

本发明属于微生物及其应用领域,提供了用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法,用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株,以及该菌株在制备HPV 16L1蛋白中的应用。本发明提供的用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株可高效表达HPV 16L1蛋白,有效减少了发酵过程中目的蛋白的降解,提升了目的蛋白的产量;并且表达获得的HPV 16L1蛋白稳定性高、纯度高、可以自组装成VLP,更适用于商业化生产和工业纯化,具有显著的经济效益和社会效益。



1. 一种用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

以野生型多形汉逊酵母为基础,将多形汉逊酵母的蛋白酶B的编码基因prb1失活以获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母,然后将HPV 16L1蛋白的编码基因插入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母的操作。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

将所述野生型多形汉逊酵母的蛋白酶B的编码基因prb1失活的操作为插入失活;

优选地,通过向汉逊酵母蛋白酶B的编码基因prb1序列中间插入抗性选择基因序列,导致蛋白酶B的编码基因prb1的插入失活;

优选地,所述抗性选择基因序列为G418抗性基因序列。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

将插入了G418抗性基因序列的prb1序列克隆到pUC57质粒载体上,获得PBG418-pUC57重组质粒;再将所述PBG418-pUC57重组质粒转入野生型汉逊酵母中,经G418抗性筛选获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:

所述HPV 16L1蛋白的编码基因为:以如列表中的序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序列为基础,根据汉逊酵母密码子偏好性、消除不利于表达的二级结构和对转录及翻译有潜在负影响的调控元件、去除常用限制性内切酶的酶切位点的原则,对所述序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序列对应的核苷酸编码序列进行优化之后获得的序列;

优选地,所述HPV 16L1蛋白的编码基因为列表中的序列7所示的序列。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于:

所述将HPV 16L1蛋白的编码基因插入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母的操作包括:

以pPICZαA质粒为基础,依次插入HARS序列、MOX启动子、MOX终止子、HPV 16L1的编码序列,从而构建含有HPV 16L1蛋白的编码基因的汉逊酵母表达载体,再将所述汉逊酵母表达载体转入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母中的操作。

6. 一种用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株,其特征在于,所述菌株以野生型多形汉逊酵母为基础,蛋白酶B的编码基因prb1失活,且插入了HPV 16L1蛋白的编码基因。

7. 根据权利要求6所述的菌株,其特征在于:

所述蛋白酶B的编码基因prb1的序列里插入了一段外源基因片段,从而导致蛋白酶B的编码基因prb1的失活;

优选地,所述外源基因片段为抗性选择基因序列;

进一步优选地,所述外源基因片段为G418抗性基因序列;

进一步优选地,所述蛋白酶B的编码基因prb1失活的方式为:将插入了G418抗性基因序列的prb1序列克隆到pUC57质粒载体上,获得PBG418-pUC57重组质粒;再将所述PBG418-pUC57重组质粒转入野生型多形汉逊酵母中,经G418抗性筛选获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株。

8. 根据权利要求7所述的菌株,其特征在于:

所述HPV 16L1蛋白的编码基因为:以如列表中的序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序

列为基础,根据汉逊酵母密码子偏好性、消除不利于表达的二级结构和对转录及翻译有潜在负影响的调控元件、去除常用限制性内切酶的酶切位点的原则,对所述序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序列对应的核苷酸编码序列进行优化之后获得的序列;

优选地,所述HPV 16L1蛋白的编码基因为序列表中的序列7所示的序列。

9. 根据权利要求8所述的菌株,其特征在于:

插入HPV 16L1蛋白的编码基因按照包括如下操作的方式进行:以pPICZαA质粒为基础,依次插入HARS序列、MOX启动子、MOX终止子、HPV 16L1的编码序列,从而构建含有HPV 16L1蛋白的编码基因的汉逊酵母表达载体,再将所述汉逊酵母表达载体转入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母中。

10. 权利要求1-5中任一项所述的用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法制备得到的菌株,和权利要求1-5中任一项所述的用于表达HPV 16L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株在制备HPV 16L1蛋白中的应用。

用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物及其应用领域,特别涉及一种用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株及其应用。

背景技术

[0002] 宫颈癌是全世界妇女第四常见癌症,据WHO估计,2020年有60.4万个新增病例。在2020年34.2万多宫颈癌死亡病例中,大约90%发生在低收入和中等收入国家,大多数此类病例发生在低收入国家。绝大多数(95%以上)宫颈癌病例都来自人乳头瘤病毒(HPV)感染。

[0003] HPV是全世界人群中高度流行的人类病原体,是最常见的性传播感染因子之一,可感染粘膜内部进而引发上皮恶性肿瘤及其他皮肤症状。该病毒可长期反复感染人体且无明显症状,一般发现时已到癌症晚期,须经过筛查发现癌前病变及时予以治疗。因此安全有效的疫苗对降低该疾病的死亡率有重要意义。

[0004] HPV直径约50nm,呈球形,无包膜,衣壳由72个五聚体组成二十面体,其病毒颗粒由主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2组成。主要衣壳蛋白L1单独在真核细胞中表达,能自动组装形成病毒样颗粒(Virus-like Particles, VLPs),该颗粒与天然病毒有相似的空间构象、免疫特性和生物学活性,并可大规模制备和纯化。因此,基于主要衣壳蛋白L1的VLPs预防性疫苗成为目前HPV疫苗研究的主要方向。

[0005] VLPs的组装不仅基于主要衣壳蛋白L1基因序列的正确,培养条件和细胞内微环境也至关重要,需要解决诸如多个HPV型病毒样颗粒难表达、表达量低、颗粒组装不完善、蛋白易降解等技术难题和技术瓶颈。

[0006] 多形汉逊酵母(*Hansenula Polymorpha*)既具备原核生物生长快速、易于遗传操作等特点,又有真核细胞翻译后加工和修饰等功能,是目前公认最理想的表达系统。相比于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株不稳定、产量低及糖基化侧链过长以及毕赤酵母(*Pichia Pastoris*)外源基因整合拷贝数较低的问题,汉逊酵母转化拷贝数高、易操作、发酵密度高而更适用于工业生产。目前,应用汉逊酵母表达系统生产的药物所用的汉逊酵母多为野生株,但是汉逊酵母最适繁殖温度为37~42℃,对于长时间诱导下产生的蛋白稳定性存在挑战。

[0007] 酵母的溶酶体样液泡含有细胞的许多主要水解酶,包括蛋白酶A、蛋白酶B、羧肽酶Y、大氨基肽酶、可抑制碱性磷酸酶和至少一种RNA酶。大多数液泡水解酶都是糖蛋白,它们首先作为无活性前体被合成。像外分泌的蛋白质一样,液泡水解酶的前体通过内质网和高尔基体。液泡水解酶前体从高尔基体内的分泌蛋白中分选,并转运到液泡中。蛋白酶B是一种单亚基糖蛋白,是一种丝氨酸蛋白酶,pH值接近中性。分子量(MW)的估计范围从31,000到44,000。

发明内容

[0008] 为了解决现有技术中存在的上述问题,本申请的发明人经过大量的试验,发现汉逊酵母中蛋白酶B的缺失不会影响其有丝分裂及产孢,但可以有效减少外源蛋白的降解。基于此,本发明构建获得了蛋白酶B缺失汉逊酵母株,并以蛋白酶B缺失汉逊酵母株作为宿主,构建获得了16型HPV L1蛋白(HPV 16 L1蛋白)的表达菌株,减少了发酵过程中目的蛋白的降解,从而提升目的蛋白的产量。

[0009] 本发明第一方面提供了一种用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法,所述方法包括:

[0010] 以野生型多形汉逊酵母为基础,将多形汉逊酵母的蛋白酶B的编码基因prb1失活以获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母,然后将HPV 16 L1蛋白的编码基因插入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母的操作。

[0011] 本发明第二方面提供了一种用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株,所述菌株以野生型多形汉逊酵母为基础,蛋白酶B的编码基因prb1失活,且插入了HPV 16 L1蛋白的编码基因。

[0012] 本发明第三方面提供了根据本发明第一方面提供的用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法制备得到的菌株,和根据本发明第二方面提供的用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株在制备HPV 16 L1蛋白中的应用。

[0013] 本发明提供的用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株可高效表达HPV 16 L1蛋白,有效减少了发酵过程中目的蛋白的降解,提升了目的蛋白的产量;并且表达获得的HPV 16 L1蛋白稳定性高、纯度高、可以自组装成VLP,更适用于商业化生产和工业纯化,具有显著的经济效益和社会效益。

附图说明

[0014] 图1:pHMZ-16L1质粒图谱。

[0015] 图2:pPICZ-16L1质粒图谱。

[0016] 图3:H/pHMZ-16L1阳性克隆WB检测。

[0017] 图4:HB/pHMZ-16L1阳性克隆WB检测。

[0018] 图5:GS115/pPICZ-16L1阳性克隆WB检测。

[0019] 图6:SMD1168H/pPICZ-16L1阳性克隆WB检测。

[0020] 图7:不同重组酵母表达菌株发酵曲线。

[0021] 图8:H-12株各时间点WB检测。自左至右的八个泳道依次为:1:诱导12h样品;2:诱导24h样品;3:诱导36h样品;4:诱导48h样品;5:诱导60h样品;6:诱导72h样品;7:HPV 16 L1对照品(购自北京博奥龙,分子量为50~55kD,下同);8:蛋白Marker。

[0022] 图9:HB-19株各时间点WB检测。自左至右的八个泳道依次为:1:蛋白Marker;2:HPV 16 L1对照品;3:诱导12h样品;4:诱导24h样品;5:诱导36h样品;6:诱导48h样品;7:诱导60h样品;8:诱导72h样品。

[0023] 图10:G-9株各时间点WB检测。自左至右的五个泳道依次为:1:蛋白Marker;2:HPV 16 L1对照品;3:诱导12h样品;4:诱导24h样品;5:诱导36h样品。

[0024] 图11:S-6株各时间点WB检测。自左至右的八个泳道依次为:1:诱导12h样品;2:诱

导24h样品;3:诱导36h样品;4:诱导48h样品;5:诱导60h样品;6:诱导72h样品;7:HPV 16 L1对照品;8:蛋白Marker。

[0025] 图12:4株菌株下罐样品(诱导72小时发酵结束,G-9株为36小时发酵结束)WB检测图。自左至右的六个泳道依次为:1:H-12株样品;2:HB-19株样品;3:G-9株样品;4:S-6株样品;5:HPV 16 L1对照品;6:蛋白Marker。

[0026] 图13:重组汉逊酵母菌株表达的蛋白纯化结果。自左至右的五个泳道依次为:1:蛋白Marker;2:H-12株目的蛋白POROS 50HS纯化液;3:H-12株目的蛋白Sepharose 6FF纯化液;4:HB-19株目的蛋白POROS 50HS纯化液;5:HB-19株目的蛋白Sepharose 6FF纯化液。

[0027] 图14:HB-19株表达的HPV 16 L1蛋白自组装成的HPV-VLP电镜图。

[0028] 图15:H-12株表达的HPV 16 L1蛋白自组装成的HPV-VLP电镜图。

具体实施方式

[0029] 为使本发明的技术方案、目的和优点更加清楚,下面通过具体的实施例子对本发明做进一步的详细描述。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0030] 本发明第一方面提供了一种用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法,所述方法包括:

[0031] 以野生型多形汉逊酵母为基础,将多形汉逊酵母的蛋白酶B的编码基因prb1失活以获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母,然后将HPV 16 L1蛋白的编码基因插入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母的操作。

[0032] 根据本发明第一方面,所述野生型多形汉逊酵母(*Hansenula Polymorpha*)的具体分类信息为酵母科(*Saccharomycetaceae*)*Ogataea*种*angusta*属DL-1株;可以从ATCC处购买获得(货号为:ATCC26012)。

[0033] 根据本发明第一方面,将所述野生型多形汉逊酵母的蛋白酶B的编码基因prb1失活的操作可以为插入失活;也即,在蛋白酶B的编码基因prb1的序列里插入一段外源基因片段导致蛋白酶B的编码基因prb1的失活。

[0034] 在一个优选的具体实施方式中,通过向汉逊酵母蛋白酶B的编码基因prb1序列中间插入抗性选择基因序列(例如G418抗性基因序列),导致蛋白酶B的编码基因prb1的插入失活。通过插入抗性选择基因序列,不仅可以导致蛋白酶B的编码基因prb1的失活,还可以为菌株的筛选提供抗性筛选标记。

[0035] 在一个优选的具体实施方式中,将插入了G418抗性基因序列的prb1序列(即PBG418)克隆到pUC57质粒载体上,获得PBG418-pUC57重组质粒;再将所述PBG418-pUC57重组质粒转入野生型汉逊酵母中,经G418抗性筛选获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株。

[0036] 根据本发明第一方面,所述HPV 16 L1蛋白的编码基因可以为:以如列表中的序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序列为基础,根据汉逊酵母密码子偏好性、消除不利于表达的二级结构和对转录及翻译有潜在负影响的调控元件、去除常用限制性内切酶的酶切位点等原则,对所述序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序列对应的核苷酸编码序列进行优化之后获得的序列。优选地,所述HPV 16 L1蛋白的编码基因为列表中的序列7所示的序列。

[0037] 根据本发明第一方面,所述将HPV 16 L1蛋白的编码基因插入所述蛋白酶B缺失型

汉逊酵母的操作可以包括:以pPICZ α A质粒为基础,依次插入HARS序列、MOX启动子、MOX终止子、HPV 16 L1的编码序列,从而构建含有HPV 16 L1蛋白的编码基因的汉逊酵母表达载体,再将所述汉逊酵母表达载体转入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母中的操作。

[0038] 本发明第二方面提供了一种用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株,所述菌株以野生型多形汉逊酵母为基础,蛋白酶B的编码基因prb1失活,且插入了HPV 16 L1蛋白的编码基因。

[0039] 根据本发明第二方面,所述野生型多形汉逊酵母(Hansenula Polymorpha)的具体分类信息为的具体分类信息为酵母科(Saccharomycetaceae)Ogataea种angusta属DL-1株;可以从ATCC处购买获得(货号为:ATCC26012)。

[0040] 根据本发明第二方面,所述蛋白酶B的编码基因prb1的序列里插入了一段外源基因片段,从而导致蛋白酶B的编码基因prb1的失活。

[0041] 优选地,所述外源基因片段为抗性选择基因序列;进一步优选为G418抗性基因序列。

[0042] 根据本发明第二方面,所述蛋白酶B的编码基因prb1失活的方式为:将插入了G418抗性基因序列的prb1序列(即PBG418)克隆到pUC57质粒载体上,获得PBG418-pUC57重组质粒;再将所述PBG418-pUC57重组质粒转入野生型多形汉逊酵母中,经G418抗性筛选获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株。

[0043] 根据本发明第二方面,所述HPV 16 L1蛋白的编码基因可以为:以如列表中的序列4所示的HPV16 L1的氨基酸序列为基础,根据汉逊酵母密码子偏好性、消除不利于表达的二级结构和对转录及翻译有潜在负影响的调控元件、去除常用限制性内切酶的酶切位点等原则,对所述氨基酸序列对应的核苷酸编码序列进行优化之后获得的序列。优选地,所述HPV 16 L1蛋白的编码基因为列表中的序列7所示的序列。

[0044] 在一个优选的具体实施方式中,插入HPV 16 L1蛋白的编码基因按照包括如下操作的方式进行:以pPICZ α A质粒为基础,依次插入HARS序列、MOX启动子、MOX终止子、HPV 16 L1的编码序列,从而构建含有HPV 16 L1蛋白的编码基因的汉逊酵母表达载体,再将所述汉逊酵母表达载体转入所述蛋白酶B缺失型汉逊酵母中。

[0045] 本发明第三方面提供了根据本发明第一方面提供的用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株的制备方法制备得到的菌株,和根据本发明第二方面提供的用于表达HPV 16 L1蛋白的蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株在制备HPV 16 L1蛋白中的应用。

[0046] 下述实施例中所使用的各种试剂、材料等,若无特别说明,均为可以从商业渠道获得的产品;下述实施例中所使用的各种测试、检测方法若无特别说明,均为本领域中的常规测试、检测方法,均可以从教科书、工具书或学术期刊中获得。

[0047] 实施例1

[0048] 本实施例用来说明蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株(HB株)的构建。

[0049] 技术思路是:通过向汉逊酵母蛋白酶B的编码基因prb1序列中间插入G418抗性基因序列,导致蛋白酶B的编码基因prb1的插入失活。将插入了G418抗性基因序列的prb1序列(即PBG418)克隆到pUC57质粒载体上,获得PBG418-pUC57重组质粒。将PBG418-pUC57重组质粒转入野生型汉逊酵母中,经G418抗性筛选获得蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株。

[0050] 一、缺失突变序列设计:

[0051] 从genebank数据库中汉逊酵母DL-1株V号染色体基因组序列(登录号NC_027862.1)获取prb1基因及其两端500~1000bp序列的核苷酸,获取pPIC9k质粒中的G418抗性基因核苷酸序列(登录号Z46234.1),将其引入prb1序列中,并委托金唯智公司进行基因合成,得到含该序列的质粒PBG418-pUC57。

[0052] 二、PBG418目的片段的获取

[0053] 对上述PBG418-pUC57质粒采用Dra I进行限制性内切酶酶切,获得PBG418目的片段(序列列表中的序列1)。

[0054] 三、野生型汉逊酵母感受态制备及电转化

[0055] 将PBG418目的片段电转入ATCC26012感受态细胞,涂布至200 μ g/mL G418抗性平板,37 $^{\circ}$ C培养2~4天。

[0056] 四、目标宿主菌株的筛选、鉴定

[0057] 引物1:5'-TGCACCATGAAACACGCAG-3'(序列列表中的序列2);

[0058] 引物2:5'-TCCGTCAGCCAGTTTAGTCT-3'(序列列表中的序列3)。

[0059] 采用上述引物对多个阳性菌落进行PCR验证、保菌和目的基因测序验证,并经10代稳定性验证得到蛋白酶B缺失型汉逊酵母菌株(HB株)。

[0060] 实施例2

[0061] 本实施例用来说明应用汉逊酵母缺失株及野生株、毕赤酵母表达HPV 16 L1蛋白(16型HPV L1蛋白)的重组质粒构建。

[0062] 一、HPV 16 L1序列的优化

[0063] 全长的HPV 16 L1蛋白由505个氨基酸组成,经过数据库检索及比对分析,选择最具代表性的保守序列作为HPV16 L1的氨基酸序列(AAC09292.1),其序列信息如序列列表中的序列4所示。为了更高效的表达HPV 16 L1,发明人根据汉逊酵母密码子偏好性、消除不利于表达的二级结构和对转录及翻译有潜在负影响的调控元件、去除常用限制性内切酶的酶切位点等原则,对该氨基酸序列对应的核苷酸编码序列进行优化,优化后仍编码天然氨基酸序列。委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成含有上述优化后核苷酸序列的HPV(hans)-PUC57合成质粒,并对合成质粒的基因序列进行测序验证。

[0064] 以HPV(hans)-PUC57合成质粒为基础,以下述同源重组引物(引物3和引物4)通过PCR扩增得到长度为1557bp的HPV 16 L1(hans)目的片段(如序列列表中的序列7所示)。

[0065] 引物3(序列列表中的序列5):

[0066] 5'-CAAAAACAAATCATACAAAATATGTCACTGTGGCTGCCCTCTGAAG-3';

[0067] 引物4(序列列表中的序列6):

[0068] 5'-GCCGCGGCTCGAGGTACCTTAGAGCTTTCTCTTCTTCTCTT-3'。

[0069] 毕赤酵母转入的HPV 16 L1核苷酸序列HPV(pichia)与上述获取步骤相同,唯一有区别的是,改用毕赤酵母惯用的密码子对其进行优化,用限制性内切酶BstBI和KpnI酶切获得约1596bp的HPV(pichia)目的片段,其核苷酸序列如序列列表中的序列8所示。

[0070] 二、汉逊酵母表达载体的构建

[0071] 技术思路为:以pPICZ α A质粒为基础,依次插入HARS序列、MOX启动子、MOX终止子、HPV 16 L1编码序列。

[0072] 在NCBI数据库中获取HARS序列(NCBI ID:U31859.1),在其上游引入BamHI酶切位

点,其下游引入XbaI酶切位点,并委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成HARS-pUC57质粒,双酶切后获得HARS序列(如序列表中的序列9所示)。

[0073] pPICZ α A质粒经BglII、XbaI双酶切后,与HARS序列连接,获得pHZ质粒(长度约2420bp)。

[0074] 在NCBI数据库中获取MOX启动子及终止子序列(NCBI ID:CP060324.1),在其上游引入XbaI酶切位点,其下游引入BglII酶切位点,并委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成PMOX-TT-pUC57质粒,XbaI、BglII双酶切后获得XbaI-PMOX-BglII序列,即为MOX转录单元(如序列表中的序列10所示)。

[0075] pHZ质粒经BamHI、XbaI双酶切后与XbaI-PMOX-BglII序列连接获得pHMZ质粒(全长为4432bp)。pHMZ质粒经限制性内切酶EcoRI和KpnI双酶切获得4394bp的pHMZ质粒载体片段。

[0076] 取上述的HPV 16 L1(hans)目的片段、pHMZ质粒载体片段经ClonExpress® II One Step Cloning Kit试剂盒连接,获得pHMZ-16 L1(hans)表达载体,质粒图谱如图1所示,序列组成如序列表中的序列11所示。

[0077] 三、毕赤酵母表达载体的构建

[0078] pPICZ α A质粒经限制性内切酶BstBI和KpnI双酶切获得约3281bp的pPICZ载体片段。取上述HPV(pichia)目的片段、pPICZ载体片段经DNA连接酶连接获得pPICZ-16L1(pichia)表达载体,质粒图谱如图2所示,序列组成如序列表中的序列12所示。

[0079] 实施例3

[0080] 本实施例用来说明基于不同宿主的HPV 16 L1表达菌株的构建及筛选。

[0081] 一、汉逊酵母HPV 16 L1表达菌株的构建及筛选

[0082] 将上述汉逊酵母表达载体pHMZ-16 L1(hans)分别电转入HB株和野生株(ATCC26012),依次传代于100 μ g/mL、200 μ g/mL、500 μ g/mL、1000 μ g/mL、2000 μ g/mL的Zeocin抗性YPD平板,每个抗性浓度传两代,挑取第10代阳性克隆以1:100接种BMGY培养基,于37 $^{\circ}$ C、250rpm培养约16h,12000rpm离心8min收集菌体。

[0083] 以BMMY诱导培养基重悬菌体至OD₆₀₀=1.0,37 $^{\circ}$ C、250rpm培养,诱导开始后每24h补充甲醇至其终浓度为0.5%,持续诱导至约72h结束,取样测定OD₆₀₀,并于12000rpm离心5min收集菌体。

[0084] 用20mM Tris-HCl(pH 8.0)重悬菌体至OD=10.0,于冰水浴中进行超声破碎,工作参数为:(600W ON 2sec;OFF 4sec)12min,取破碎混合液,于12000rpm离心10min,分离上清与沉淀。取上述破碎上清,用0.22 μ m滤器过滤,收集滤液,取40 μ L与10 μ L 5 $\times$ Sample Buffer充分混匀,煮沸10min,于12000rpm离心5min收集上清液,作为电泳样品进行WB检测。本发明中的WB检测对照品均为Biodragon生产的HPV 16 L1蛋白,购自北京博奥龙,分子量约为50~55kD,下文不再赘述。

[0085] 在约56kDa有明显的蛋白条带,表明菌株在甲醇诱导下目的蛋白正常表达,其中12号和15号野生型表达菌株表达量相对较高,光密度检测结果分别为22.6 μ g/mL和18.3 μ g/mL(如图3所示);11号和19号蛋白酶B缺失型表达菌株表达量相对较高,光密度检测结果分别为11.1 μ g/mL和38.4 μ g/mL(如图4所示)。

[0086] 经表达量比较(Western blot分析),选择12号野生型汉逊酵母表达菌株(简称为

H-12株)、19号蛋白酶B缺失型表达菌株(简称为HB-19株)作为后续研究对象,即得到HPV 16 L1的蛋白酶B缺失型和野生型汉逊酵母表达菌株。

[0087] 二、毕赤酵母HPV 16 L1表达菌株的构建

[0088] 将上述毕赤酵母表达载体pPICZ-16 L1 (pichia) 分别电转入GS115株(his4⁻)和SMD1168H株(pep4⁻),阳性克隆传代及表达量筛选步骤同汉逊酵母。

[0089] 经表达量比较(Westernblot分析),选择9号GS115表达菌株(简称为G-9株,结果如图5所示)、6号SMD1168H表达菌株(简称为S-6株,结果如图6所示)作为后续研究对象,即得到HPV 16 L1的毕赤酵母表达菌株。

[0090] 三、高表达菌株冻存

[0091] 将以上表达量较高的菌株H-12株、HB-19株、G-9株、S-6株分别冻存为含甘油量为15%的甘油菌并存放于-80℃,作为发酵种子。

[0092] 实施例4

[0093] 本实施例用来说明重组酵母表达菌株的拷贝数检测。

[0094] 一、酵母基因组DNA的提取

[0095] 使用酵母基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取上述实施例3中的H-12株、HB-19株、G-9株、S-6株4种重组表达菌株的基因组DNA。

[0096] 二、荧光定量PCR法对酵母外源基因拷贝数的定量检测

[0097] H-12株和HB-19株以MOX看家基因作为内参基因(采用引物5和引物6进行扩增),测定外源基因HPV 16 L1拷贝数(采用引物7和引物8进行扩增);重组毕赤酵母菌株:G-9和S-6以GAPDH看家基因作为内参基因(采用引物9和引物10进行扩增)测定外源基因HPV16 L1拷贝数(采用引物11和引物12进行扩增)。

[0098] 引物5:5'-AACGTGACCTTGCTAACCG-3'(序列列表中的序列13);

[0099] 引物6:5'-AAACTGGGGATGTGCGAGTC-3'(序列列表中的序列14);

[0100] 引物7:5'-CCTCGATCTGCAAGTACCCC-3'(序列列表中的序列15);

[0101] 引物8:5'-CTGCTCGGTTGAAGAGGTGT-3'(序列列表中的序列16);

[0102] 引物9:5'-TGCTATCAACGACCCATTCA-3'(序列列表中的序列17);

[0103] 引物10:5'-GGCAGAAACCTCACCTTGT-3'(序列列表中的序列18);

[0104] 引物11:5'-CCTGATACGCAACGCCTAGT-3'(序列列表中的序列19);

[0105] 引物12:5'-CTCCTGCATTTGCCGCATAG-3'(序列列表中的序列20)。

[0106] 反应体系:2×SGExcel Fast SYBR Mixture(with rox)(上海生工)10μL,正反向引物各0.8μL,DNA模板1μL,加双蒸水至总体积20μL。在Quant Studio™5荧光定量PCR仪(美国生命技术公司)上设置熔解曲线的反应条件:预变性95℃3min;变性95℃5s,退火及延伸60℃30s,40个循环。

[0107] 三、不同酵母外源基因拷贝数的比较

[0108] 结果如下表1所示。由表1可见:在外源基因拷贝数上,汉逊酵母的重组菌株明显优于毕赤酵母。其中,H-12株的拷贝数最高,达到273;HB-19株的拷贝数也比较高,达到了96;而S-6株(拷贝数10)和G-9株(拷贝数2)的拷贝数都非常低,说明采用毕赤酵母的重组菌株的外源基因整合效率低,不利于目的基因的转录表达及高表达菌株的筛选,不适于本发明中用于高表达水平制备HPV 16 L1蛋白。

[0109] 表1:不同酵母外源基因拷贝数对比

编号	菌株名	拷贝数
1	H-12株	273
2	HB-19株	96
3	S-6株	10
4	G-9株	2

[0111] 实施例5

[0112] 本实施例用来说明重组酵母表达菌株的发酵培养。

[0113] 一、发酵种子液制备:

[0114] 按0.2%接种量将冻存的上述实施例3中的H-12株、HB-19株、G-9株、S-6株4种重组表达菌株接种于YPD培养基中,汉逊酵母于37℃、毕赤酵母于30℃条件下,250rpm培养至OD₆₀₀为2~15,即为发酵种子液。

[0115] 二、发酵控制:

[0116] 将制备的发酵种子液按照5%~10%的比例接入发酵罐中。

[0117] pH控制:发酵过程中将pH维持在5.0±0.1左右,诱导后pH维持在6.0±0.1左右。温度控制:汉逊酵母发酵温度自控,温度维持在37±1℃,诱导后温度维持在30±1℃;毕赤酵母发酵全程温度维持在30±1℃,其余条件相同。溶氧控制:溶氧设定为20%~80%;通过控制通气量和搅拌桨维持溶氧稳定。

[0118] 诱导72小时发酵结束时放出发酵液。4℃离心收集菌体。

[0119] 经测定,H-12株、HB-19株这两株汉逊酵母发酵密度明显高于G-9株、S-6株这两株毕赤酵母,其中H-12株发酵密度最高,菌体湿重达468g/L;HB-19株次之,达到435g/L,与野生型汉逊酵母没有明显差异(如表2、图7-11所示)。G-9株由于诱导后菌体湿重不再增长且有溶氧缓慢上升的趋势,因此于36h提前结束发酵(如表2、图7、图10所示)。

[0120] 经WB检测,蛋白酶B缺失型汉逊酵母(HB-19株)诱导60h时HPV 16 L1蛋白浓度最高,通过光密度分析其产量可达284.92mg/L,明显高于其他重组表达菌株(如表2和图9所示)。

[0121] 表2:不同重组酵母表达菌株发酵过程HPV 16 L1蛋白表达量(单位:mg/L)

发酵时间	H-12	HB-19	G-9	S-6
12小时	70.67	38.05	0.43	6.09
24小时	95.54	98.04	1.24	25.07
36小时	93.58	170.07	2.28	37.77
48小时	108.17	215.96	-----	38.78
60小时	152.98	284.92	-----	38.50
72小时	132.89	270.66	-----	39.06

[0123] 表3:不同重组酵母菌株菌体湿重随诱导时间的变化(g/L)

诱导时间	H-12	HB-19	G-9	S-6
0小时	180	185	150	224
12小时	208	204	112	218

24小时	242	237	111	212
36小时	360	334	108	203
48小时	420	407	-----	201
60小时	459	423	-----	205
72小时	468	435	-----	211

[0125] 分别收集重组汉逊酵母菌株和重组毕赤酵母菌株发酵终点收获液样品,按照OD=10调整菌体浓度,按照上述步骤对菌体进行破碎处理,每个菌株分别取20 μ L破碎后上清液进行WB检测,结果见图12。除G-9株诱导36h提前下罐外,其余重组菌株诱导72h下罐。结果表明,在相同菌体湿重中,汉逊酵母的重组菌株表达量明显高于毕赤酵母的重组菌株,且蛋白酶B缺失株(HB-19株)与野生型重组汉逊酵母(H-12株)相比,降解带明显减少。

[0126] 由此可以看出,相比使用毕赤酵母的菌株(G-9株、S-6株),采用汉逊酵母的菌株(H-12株、HB-19株)发酵过程中HPV 16 L1蛋白的表达量显著升高,并且蛋白酶B缺失株(HB-19株)所表达的蛋白降解带相比野生型重组汉逊酵母(H-12株)更少,蛋白的性质更稳定。

[0127] 实施例6

[0128] 本实施例用于说明比较不同菌株经两步纯化后的HPV 16 L1蛋白纯度。

[0129] 将实施例5获得的菌体破菌(破菌缓冲液:200mM MOPS, pH7.0, 0.7NaCl, 0.05% Tween-80)离心后,取破菌后上清液经过层析方法纯化,得到自组装成病毒样颗粒的HPV 16 L1蛋白,具体步骤如下:

[0130] 将表达HPV 16 L1的酵母细胞(实施例5中获得的H-12株、HB-19株两种重组表达菌株的菌体),按1:10加入破菌缓冲液混合,搅拌至无块状物,高压破碎至破菌率达90%以上。将破碎物于2~8℃下,12000rpm离心30min,收集上清液。

[0131] 将经过离心澄清的破菌上清液通过POROS 50HS (Thermo Fisher公司)进阳离子层析介质初步纯化,蛋白吸附于层析介质后,0.5M~1.5M NaCl,线性梯度洗脱,收集75%洗脱组分,并采用SDS-PAGE检测。

[0132] 将含有HPV 16 L1蛋白的洗脱组分合并后,使用Sephacrose 6FF层析介质进一步纯化,凝胶过滤缓冲溶液:50mM MOPSNa, 1.25M NaCl, 5mM NaP, 0.03% Tween80, pH7.1。先用凝胶过滤缓冲溶液平衡分子筛柱子3-4个柱体积,然后通过AKTA (美国GE公司)上样环注入上述粗纯后的样品,流速3mL/min。收集第一个峰,然后进行SDS-PAGE电泳分析其纯度。

[0133] 结果如图13所示,可见汉逊酵母蛋白酶B缺失株(HB-19株)表达的蛋白的纯度明显高于汉逊酵母野生株(H-12株)。

[0134] 实施例7

[0135] 本实施例用于说明蛋白酶B缺失型汉逊酵母表达的HPV 16 L1蛋白可以自主装成VLP颗粒。本实施例采用透射电镜观察蛋白酶B缺失型汉逊酵母表达的VLP颗粒。

[0136] 对上述HB-19株表达纯化的蛋白(实施例6的两步纯化后获得的蛋白)进行电镜检查,验证VLP颗粒的产生,结果如图14所示。经电镜观察发现,该重组汉逊菌株表达的HPV 16 L1蛋白可以自组装成VLP,形态与预期相符。

[0137] 对上述H-12株表达纯化的蛋白(实施例6的两步纯化后获得的蛋白)进行电镜检查,验证VLP颗粒的产生,结果如图15所示。经电镜观察发现,该重组汉逊菌株表达的HPV 16 L1蛋白自组装成VLP数量显著少于HB-19株。

[0138] 由此可见,蛋白酶B缺失型汉逊酵母对于HPV 16 L1-VLP的自组装产量明显高于野生型汉逊酵母,更适用于商业化生产和工业纯化。

[0139] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

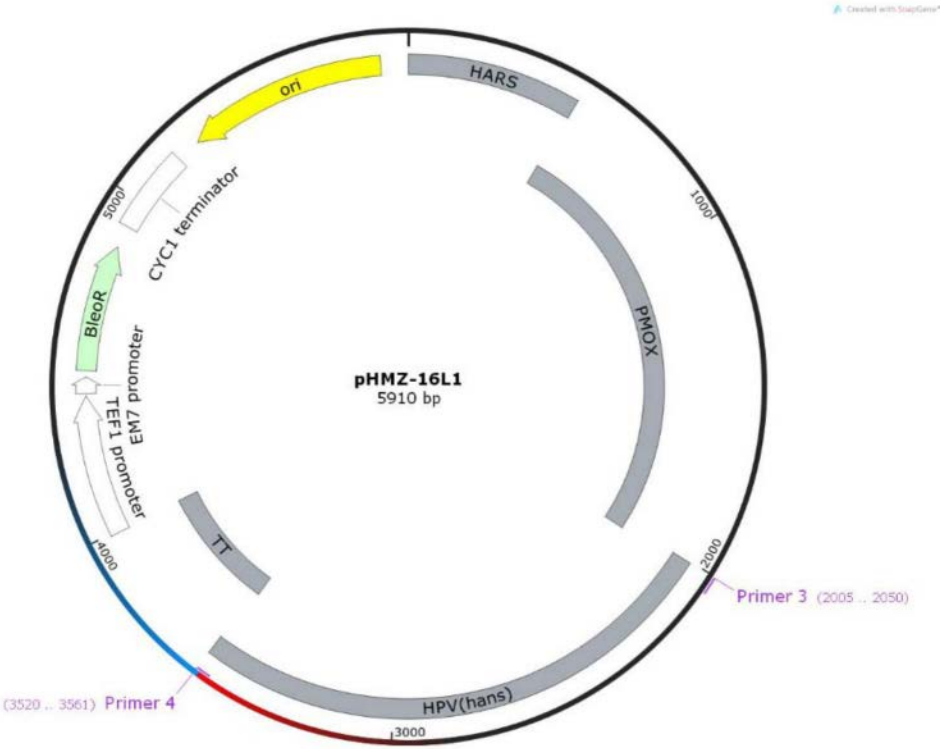


图1

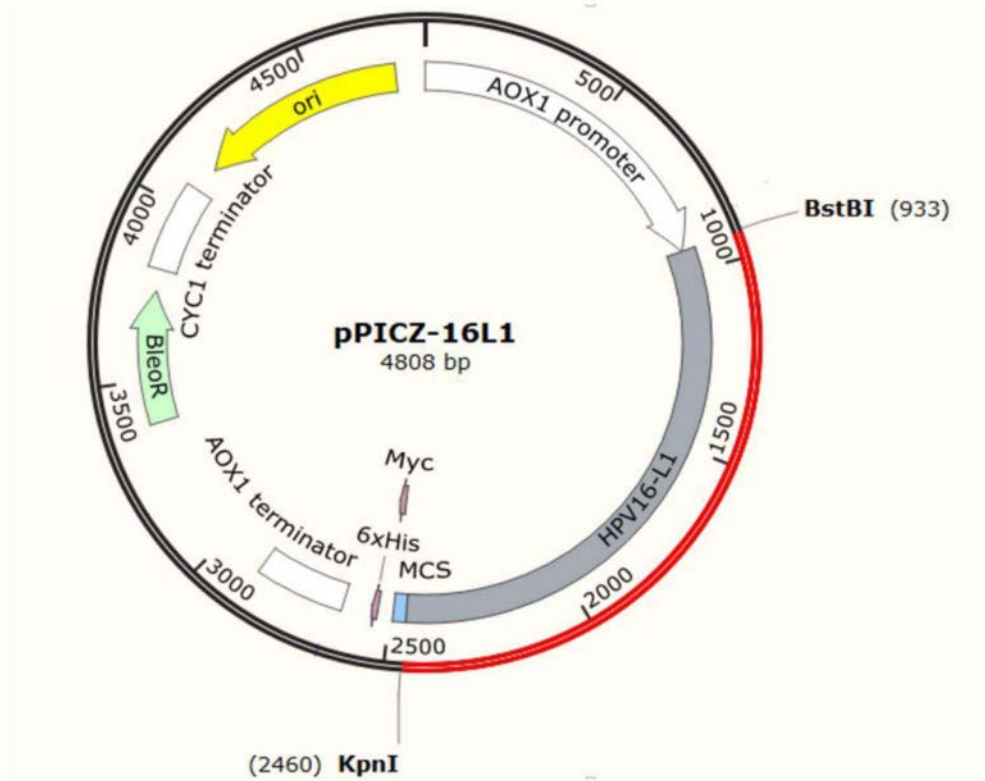


图2



图3



图4

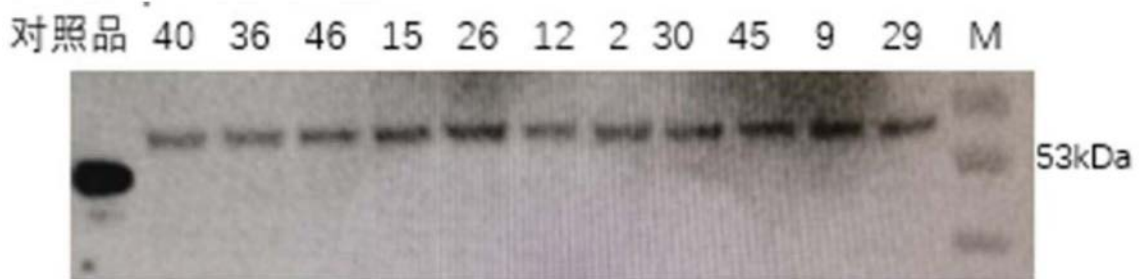


图5

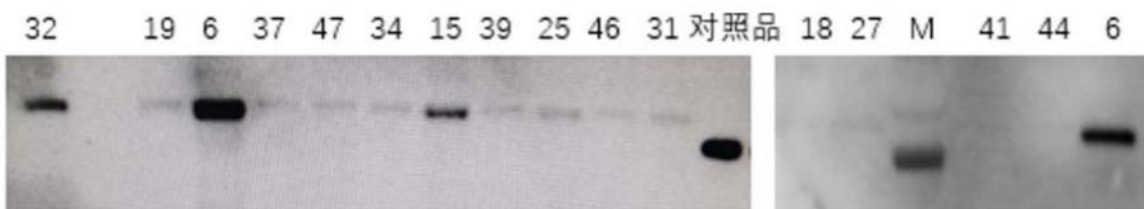


图6

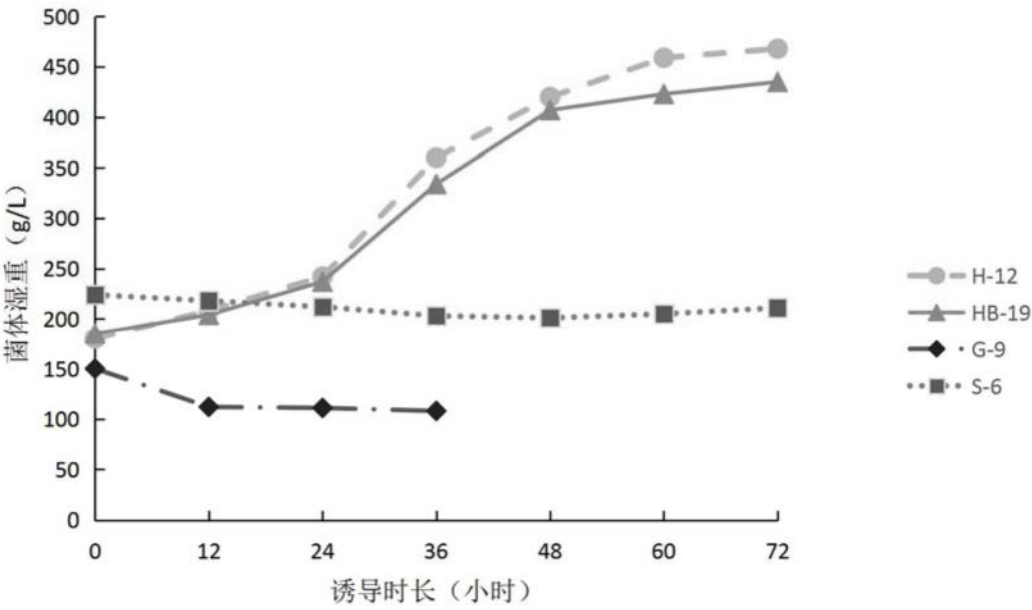


图7

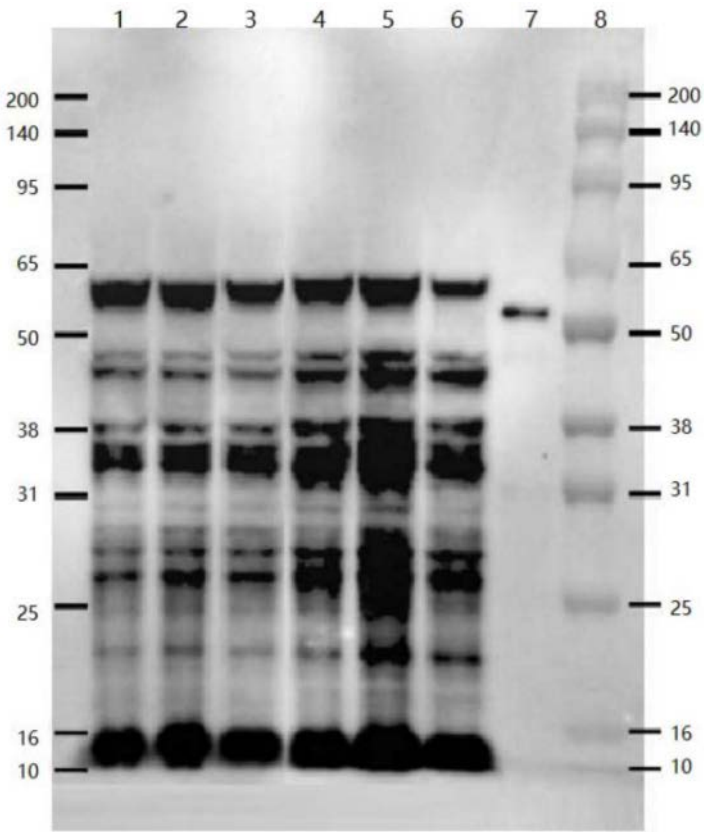


图8

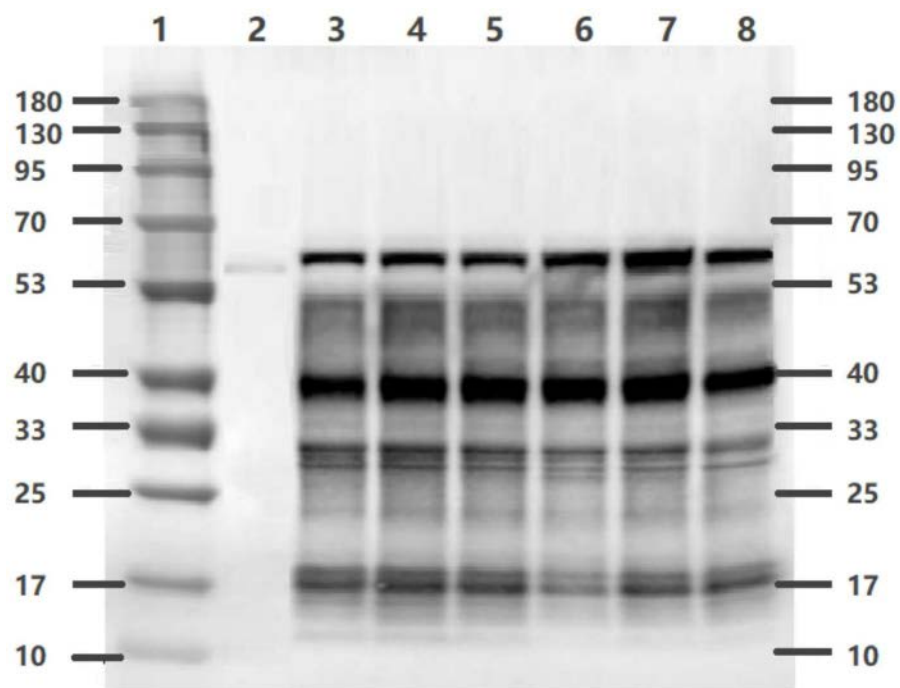


图9

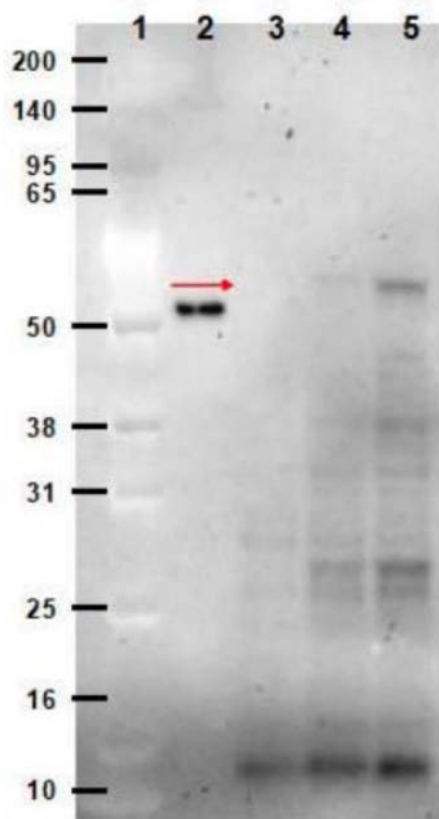


图10

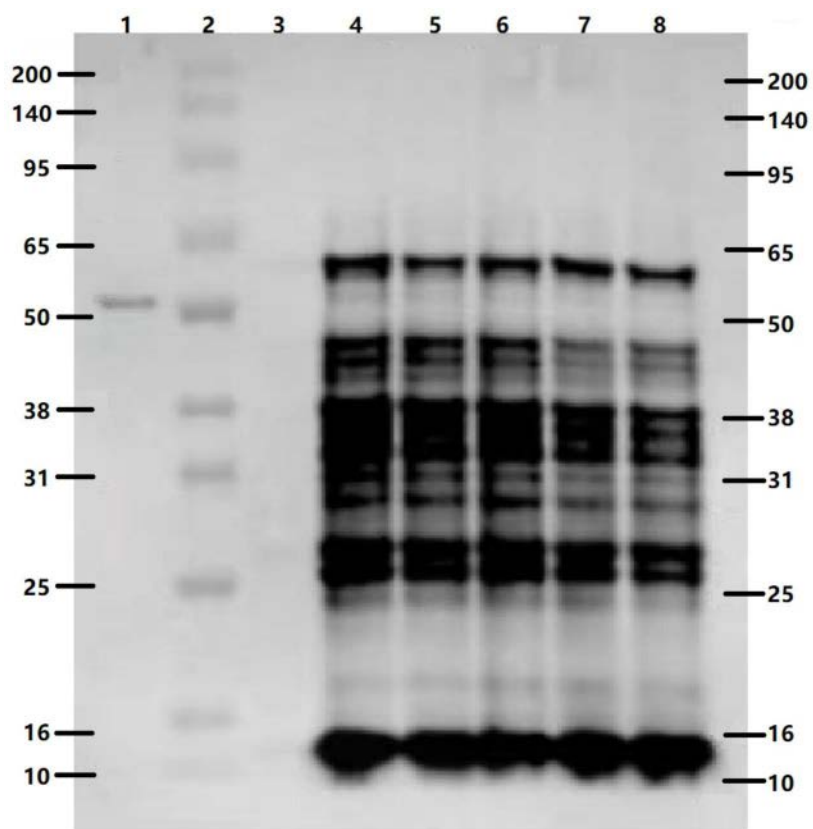


图11

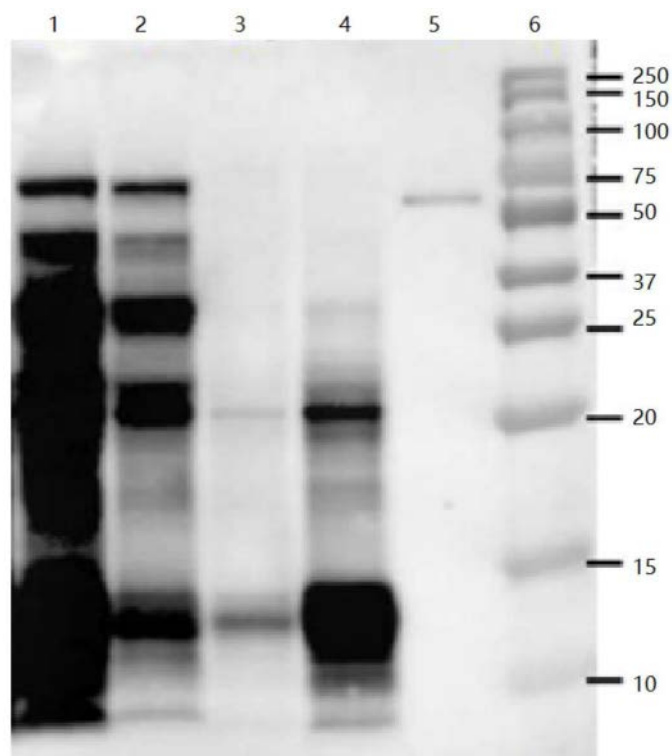


图12

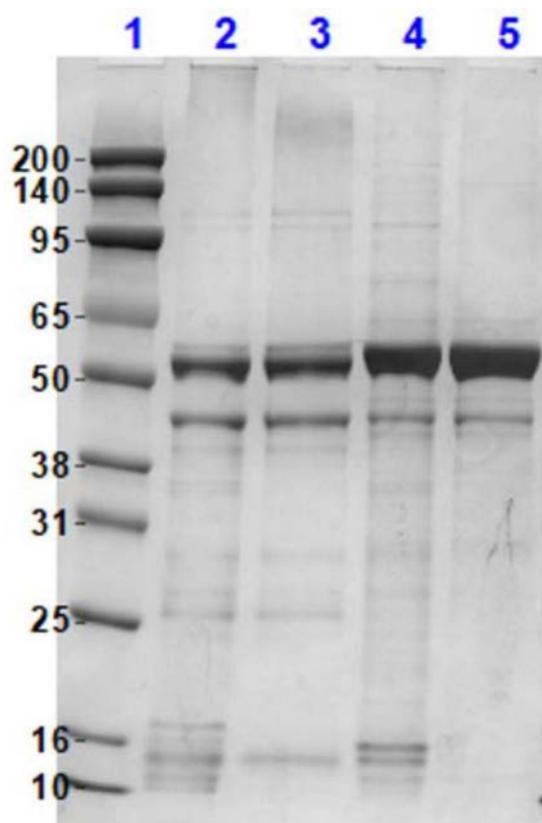


图13

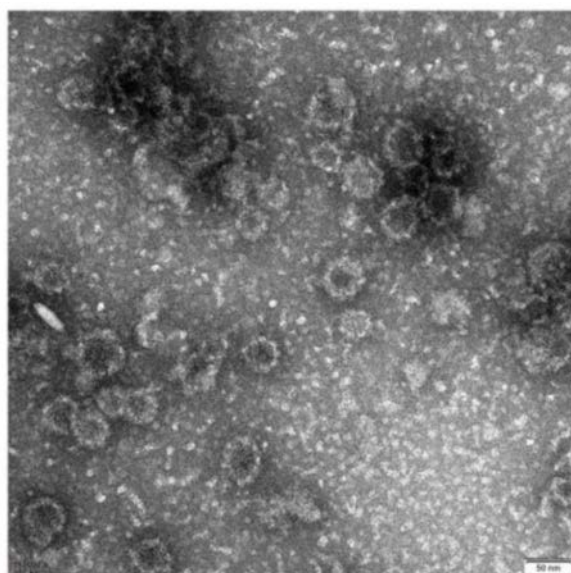


图14

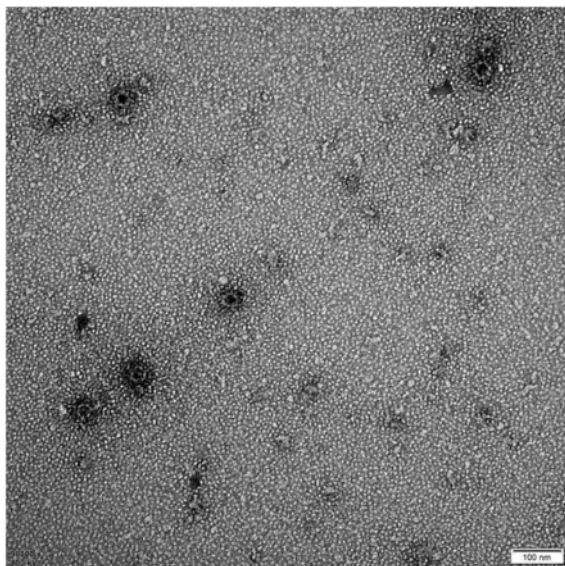


图15