

毕赤酵母分泌表达嵌合 HEV 表位的 HBcAg 颗粒

章建楠,李少伟*,杨坤宇,何芳萍,唐明,

顾颖,王颖彬,杜海莲,张军,夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,生命科学学院,
细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建 厦门 361005)

摘要:在毕赤酵母分泌表达嵌合有 HEV 受体相关表位 12A10 的 HBcAg 蛋白,经甲醇诱导后的培养液上清通过切向流浓缩、更换缓冲液后,进行疏水层析纯化。CsCl 等密度梯度离心测得分泌的重组颗粒的密度为 1.32 g/mL。透射电镜观察显示,纯化的重组颗粒为均一的直径 30 nm 左右的空心颗粒。小鼠免疫实验表明,纯化颗粒免疫 8 周后鼠血清中的特异性 12A10 抗体滴度可达到 1.6×10^5 ,并且重组颗粒较好地呈递了 HEV 受体相关的非免疫优势表位。本文的结果为毕赤酵母胞外分泌表达其它大尺度的重组蛋白颗粒提供了参考,为研究携带表位多肽的疫苗载体提供了范例。

关键词:乙肝病毒核心抗原;融合蛋白;毕赤酵母;分泌表达

中图分类号:Q 813

文献标识码:A

文章编号:0438-0479(2009)01-0107-06

毕赤酵母是近年来发展迅速,应用广泛的真核表达系统,具有良好的蛋白翻译后修饰和加工能力,能对所分泌蛋白进行 N-、O-糖基化修饰;而且在分泌过程中,可促使前体蛋白成熟,并正确折叠形成二硫键,使所表达的外源蛋白结构更接近于天然构象。同时,由于毕赤酵母自身胞外分泌的蛋白量很低,与胞内表达外源蛋白的方法相比,没有细胞破碎过程中的细胞内溶物的释放以及所带来的细胞碎片的分离等问题,具有易分离纯化、工艺简单等优点^[1]。

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)基因 ORF2 编码病毒主要结构蛋白^[2]。经研究发现,ORF2 aa423-438 在介导病毒与细胞的结合中起重要作用,是 12A10 单克隆抗体的识别表位^[3-4]。乙型肝炎病毒的核心抗原(HBcAg)是一种良好的免疫载体,在原核和真核表达系统中均能自我组装成颗粒^[5]。本研究将 12A10 表位多肽插入 HBcAg 的 MIR(Major immunodominant region)区,并导入毕赤酵母中进行胞外分泌表达,验证了该表位在小鼠体内的免疫原性得到显著提高,探讨了 HEV 表位疫苗的可行性,为酵母分泌表达蛋白颗粒提供了一个很好的范例。

1 材料和方法

收稿日期:2008-04-08

基金项目:国家 863 重点项目(2006AA020905),国家自然科学基金(30600106,30500092),福建省青年科技人才创新项目(2003J023)资助

*通讯作者:shaowei@xmu.edu.cn

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

大肠杆菌菌株 DH5 为本实验室保存;毕赤酵母菌株 GS115(*His⁻, Mut⁺*)和毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司;pMD18-T 载体购自 Takara 公司(表 1)。

1.1.2 工具酶及主要生化试剂

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶以及 T4DNA 连接酶都购自 Takara 公司。鼠源戊型肝炎克隆抗体 12A10 为实验室工作人员制备;碱性磷酸酶标羊抗鼠二抗为 PROTOs 产品。PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒、酵母基因组提取试剂盒购自华舜公司。YNB 为 BBI 公司产品;-His Do Supplement 为 BD 公司产品;其余常用试剂均为分析纯。LB 培养基、RDB 培养基、YPD 培养基、BMGY 培养基和 BMMY 培养基成分参考 Invitrogen 公司操作手册。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

重组表达载体 pC149-mut 为本室所构建,该载体整合有 HBcAg 的 aa1-149,并用连接子替代该段 aa79、80 两个氨基酸^[6]。根据 pC149-mut 载体序列和 12A10 表位肽基因设计引物 12A10FP 和 149mutRP,可将表位肽及 linker 序列插入 HBc149 的 MIR 区。根据 HBc149 基因和 pPIC9K 载体酶切位点序列设计 HBcFP 和 HBcRF,用于构建毕赤酵母表达载体。引物 5' AOX1 可用于重组子鉴定。引物由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 克隆和鉴定所用引物

Tab. 1 The primers for cloning and detection

引物名称	引物序列
12A10FP	<i>agatctggaggaggtggttct aagggtattgcaatcccgcgatgac- atcgacctcggggagtctcgt g gatccggtggtggaggttcagg</i>
149 mutRP	<i>gaattcttaacaacagtagttt</i>
HBcFP	<i>gaattcatggacattgacccatataa</i>
HBcRF	<i>gcggccgcttaacaacagtagtttccg</i>
5 AOX1	<i>gactggttccaattgacaagc</i>

注:12A10 表位肽基因以下划线标出;酶切位点序列以斜体标出。

1.2.2 重组质粒的构建

依据 Gu 等人^[6]的方法,用引物 12A10FP 和 149 mutRP 进行 PCR 扩增,将 12A10 表位肽以及 linker 基因序列插入 HBcAg 基因内部,进而构建重组载体 pC149-mut-12A10。

以重组载体 pC149-mut-12A10 为模板,HBcFP 与 HBcRF 为引物扩增出 HBc149-12A10 片段(长 587 bp)。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接并鉴定,再用 *EcoR* I / *Not* I 双酶切回收 HBc149-12A10 基因片断,并将片段接入 pPIC9 K 分泌表达载体,构建成重组表达载体 pPIC9 K-HBc149-12A10。酶切鉴定正确后,由上海博赛生物有限公司做 DNA 序列测定。

1.2.3 转化酵母细胞

按 Invitrogen 公司 Multi-Copy Pichia Expression Kit 所述方法制备酵母菌 GS115 感受态。取 80 μ L 感受态与 5~20 μ g 的 *Sac* 线性化的重组表达载体 pPIC9 K-HBc149-12A10 混合,转入冰冷的 2 mm 电转杯,冰浴 5 min。在 1.5 kV、25 μ F、200 μ s 条件下,用 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪电击转化,立即加入 800 μ L、1 mol/L 冰冷的山梨醇。吸出后涂布 RDB 筛选培养基平板,30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,观察转化子的生长情况。

1.2.4 重组菌株的筛选及 PCR 鉴定

将 RDB 平板上生长出来的转化子接种到 G418 浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL 的 YPD 平板,筛选高抗性菌株。挑取 G418 高抗性的重组菌株接种于 YPD 培养基中 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h,用酵母基因组提取试剂盒提取酵母染色体 DNA,以引物 5 AOX1 与 CA GRF 对整合到 GS115 染色体中的 HBc149-12A10 序列进行 PCR 鉴定。

1.2.5 诱导表达与目的蛋白 Western Blotting 鉴定

挑取重组菌株单克隆于 100 mL BMGY 培养基中,于 28 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 为 6.0,然后 3 000 \times g 离心 5 min 收集菌体,用 BMMY 培养基重悬细胞到 OD_{600} 为 2.0,在 28 $^{\circ}$ C 培养诱导 72 h;同时每天补加 100% 甲醇

到培养基中维持甲醇终浓度为 1%。转化 pPIC9 K 空载体的 GS115 菌株以同样的条件培养诱导做阴性对照。取培养上清液进行 13.5% SDS-PAGE 凝胶电泳,然后将蛋白质进行电转移至硝酸纤维膜上。以单克隆抗体 12A10 作为一抗,AP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗,进行 Western Blotting 蛋白印迹实验。

1.2.6 重组蛋白的纯化

4 $^{\circ}$ C, 20 000 \times g 离心 30 min 收集细胞培养液上清。上清通过切向流装置(Pall 公司生产,膜截留分子量为 10 ku)浓缩 50 倍,再用 10 倍体积的 Buffer I (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mol/L NaCl) 进行液体交换。将浓缩换液后的上清液上样至用 Buffer I 预平衡的 TSK Phenyl-5PW (7.5 cm \times 7.5 cm) 疏水交换柱,再用 Buffer II (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 500 mmol/L NaCl) 洗脱,收集洗脱峰组分,纯化得到的重组蛋白命名为 rHBc149-12A10。

1.2.7 CsCl 密度梯度离心及抗原性检测

用 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 配制浓度为 32% 的 CsCl 溶液。在离心管(SW41 转头)中加入 10 mL 32% CsCl 溶液,再将 2 mL 纯化样品缓慢铺在液体顶部,在超速离心机(Beckman LE-80 K 型)中 35 000 r/min, 20 $^{\circ}$ C 离心 22 h。离心完毕后,从上往下以每组分 500 μ L 收集样品,共获得 24 管。用阿贝折光仪测量每管溶液的折光率,并依据公式换算成密度。然后用间接法 ELISA 检测每管样品中 rHBc149-12A10 的 12A10 表位抗原性:样品用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释 10 倍后包被 ELISA 板,封闭后加入 100 μ L/孔 12A10 单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBST(含 0.1% Tween20)洗涤 5 次,再加入 100 μ L/孔 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(=1:10 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBST 洗 5 次,并扣干后,加入显色剂,37 $^{\circ}$ C 反应 15 min,用 50 μ L 2 mol/L 硫酸终止反应,于酶标仪上读取 $OD_{450/620}$ 的值。以曲线显示每组分的密度和 OD 值分布。

1.2.8 重组颗粒的电镜观察

纯化后的样品 rHBc149-12A10,用 2% 磷钨酸负染,在日本电子株式会社生产的 JEM-2100HC 型高衬度透射电子显微镜下观察。本工作由厦门大学生命科学学院分析测试中心完成。

1.2.9 重组蛋白免疫原性的检测

免疫动物:4~6 周龄雌性 BAL B/c 小鼠;免疫剂量:50 μ g 纯化 rHBc149-12A10 重组颗粒(与等体积的弗氏佐剂混合);免疫方式和程序:皮下注射,每周免疫,共免疫 4 次,每周采血,分离血清。

检测血清中 12A10 抗体的滴度:取包被含有

12A10 表位的 p239 蛋白^[7]的 ELISA 板,加入 100 μL /孔免疫小鼠血清(用 20%小牛血清 PBS 稀释),其余步骤同 1.2.7 中的间接法 ELISA,以读值大于 0.2 的血清最高稀释度作为抗体滴度.检测血清中抗 HBc149 载体抗体的滴度,取包被 HBc149 蛋白^[6]的 ELISA 板,方法同上.

阻断 ELISA 检测:用过碘酸钠法标记单抗 12A10,取包被 p239 蛋白的 ELISA 板,加入 100 μL /孔免疫 8 周后的小鼠血清(用 20%小牛血清 PBS 稀释),以 20%小牛血清 PBS 作为对照;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBST 洗涤 5 次后,再加入 100 μL /孔 HRP 标记的单抗 12A10,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;PBST 洗 5 次,扣干后显色,用硫酸终止反应,于酶标仪上读取 $OD_{450/620}$ 的值,计算阻断率:阻断率 = $(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{阻断}}) / OD_{\text{对照}} \times 100\%$.

1.2.10 重组颗粒 rHBc149-12A10 与 p239 呈递

12A10 表位的比较

分别取包被 p239 蛋白^[7]和 rHBc149-12A10 蛋白的 ELISA 板,分为两组,第 1 组分别加入 100 μL /孔稀释后的 p239 免疫小鼠血清,第 2 组分别加入 100 μL /孔稀释后的 HBc149-12A10 免疫小鼠血清,其余步骤同 1.2.7 中的间接法 ELISA.

2 结果

2.1 重组菌株的筛选和鉴定

将线性化的 pPIC9 K-HBc149-12A10 质粒转入宿主菌 GS115,涂布 RDB 选择培养基,将转化子转接到 G418-YPD 平板上,获得可抗 5.0 mg/mL G418 的重组菌株.提取筛选到重组菌株的酵母总 DNA,用 5 AOX1 与 CAGR1 为引物进行 PCR 鉴定.图 1 所示,与对照相比,重组菌株的 DNA 中含有 800 bp 左右(包括 5 AOX 基因和 HBc149-12A10 基因)的特异片段,说明目的基因 HBc149-12A10 成功地整合到酵母基因组中.

2.2 重组蛋白的诱导表达与纯化

筛选得到的重组酵母菌株经甲醇诱导培养,培养上清液进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,与空载体转化的酵母菌对比(图 2 lane2),在 22 ku 位置有一差异表达条带(图 2 lane1).以 12A10 单抗对上清液进行 Western Blotting 蛋白印迹实验,结果表明该条带与单抗 12A10 有明显的反应(图 2 lane3);这说明,重组菌株能够成功地表达重组蛋白 rHBc149-12A10,并将其分泌到胞外.诱导后的培养上清液经过切向流装置浓缩并更换缓冲液,再进行疏水交换层析.纯化后蛋白

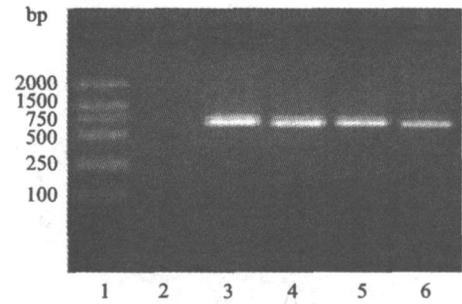


图 1 PCR 鉴定电转化后的酵母基因组

1: DNA Marker DL2000; 2: 阴性对照 (GS115/pPIC9 K); 3~6: 重组菌株

Fig. 1 PCR determines the insertion of HBc149-12A10 into yeast genome

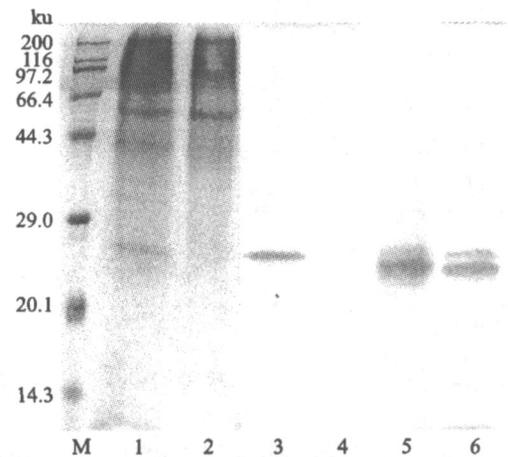


图 2 rHBc149-12A10 的表达和纯化的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

M: 蛋白质分子量 marker; 1, 3: 菌株 GS115/pPIC9 K-HBc149-12A10 的培养上清液; 2, 4: 菌株 GS115/pPIC9 K 的培养上清液; 5, 6: 疏水层析纯化后 rHBc149-12A10 蛋白; M, 1, 2, 5: 13.5% SDS-PAGE; 3, 4, 6: Western blotting(单抗 12A10 为一抗)

Fig. 2 SDS-PAGE and Western Blotting analysis of expression and purification of rHBc149-12A10

纯度大于 90% (如图 2 lane5), 可与 12A10 单抗发生反应(图 2 lane6).

2.3 重组蛋白的颗粒性

CsCl 等密度梯度离心: 将纯化样品进行 CsCl 等密度梯度离心, 收集的样品组分进行密度测定和单抗 12A10 的 ELISA 检测(图 3), OD 值最高时样品对应的密度为 1.32 g/mL.

透射电镜观察: 样品为大小均一、直径约为 30 nm 的球形空心颗粒(图 4). 结果表明, 重组菌株可将 rHBc149-12A10 颗粒分泌到胞外.

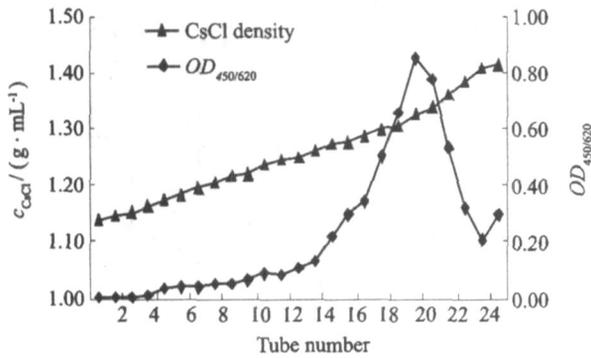


图3 CsCl 等密度梯度离心组分的 12A10-ELISA 分布和密度测定

Fig.3 12A10-ELISA analysis and density determination for CsCl iso-density gradient centrifuge of rHBc149-12A10

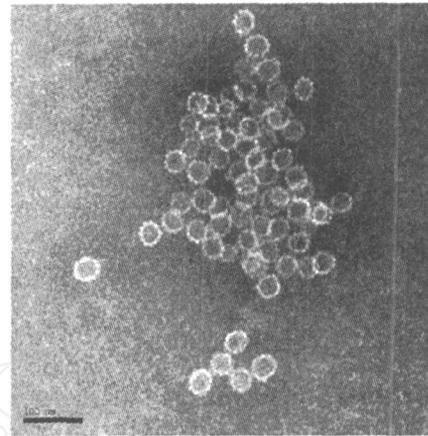


图4 rHBc149-12A10 颗粒的透射电镜观察(放大 25 000 倍)

Fig.4 Transmission electron micrograph of rHBc149-12A10 particles (×25 000)

表2 重组颗粒 rHBc149-12A10 与 p239 呈递 12A10 表位的比较

Tab.2 The 12A10-specific immunogenicity of rHBc149-12A10 and p239

免疫小鼠血清	ELISA 包被抗原蛋白	
	p239	rHBc149-12A10
p239 免疫鼠血清	2.041	0.018
rHBc149-12A10 免疫鼠血清	1.844	1.837

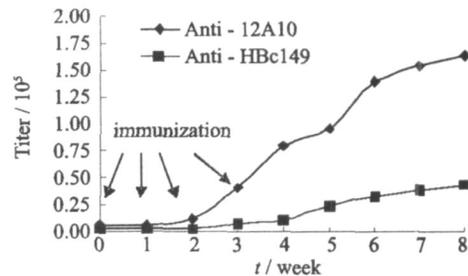


图5 rHBc149-12A10 免疫小鼠后血清中抗体的变化

Fig.5 Antibody response of the rice immunized with rHBc149-12A10

2.4 重组颗粒 HBc149-12A10 的免疫原性

重组颗粒 HBc149-12A10 免疫小鼠后,以 p239-ELISA 检测 12A10 表位肽产生的抗体:2 周后所有的免疫小鼠均发生阳转并且抗体滴度快速上升,7 周后抗体上升减缓,8 周时抗体平均滴度可达 1.6×10^5 。以 HBc149-ELISA 检测载体本身的免疫原性:3 周时开始阳转,8 周时抗体平均滴度为 4.4×10^4 ,明显低于 12A10 表位肽产生的抗体滴度(图 5),说明 HBc149 载体较好地呈递了 12A10 表位,同时这也与重组蛋白中去除了 HBcAg 优势表位 c/e1 有关。抗体阻断实验表明:8 周的鼠血清在 1:1 600 稀释时对单抗 12A10 与 p239 反应的阻断率可达到 50%。

将同含有 12A10 表位的 p239 与 rHBc149-12A10 以相同方式免疫小鼠,比较抗体的生成情况,以 p239 和 rHBc149-12A10 为包被抗原进行 ELISA 检测。结果(表 2)表明:p239 颗粒免疫小鼠产生的抗体与 p239 有明显的反应(OD 值为 2.041),但与 rHBc149-12A10 几乎没有反应,说明 12A10 表位不是 p239 的免疫优势表位;而本研究的 rHBc149-12A10 颗粒免疫小鼠产生的抗体不仅与 rHBc149-12A10 有明显的反应(OD 值为 1.837),与 p239 也有较好的反应(OD 值为

1.844),提示 rHBc149-12A10 较好地呈递了 12A10 表位,具有候选作为表位疫苗的价值。

3 讨论

乙肝病毒核心抗原(Hepatitis B core antigen, HBcAg)既是一典型的胸腺非依赖性抗原,也是一很强的胸腺依赖性抗原,具有很高的免疫原性,在无佐剂的情况下时亦可诱导免疫应答,因此,是一种较理想的免疫载体^[5]。HBcAg 的其 N 端、C 端及 MIR 区均可插入外源多肽;外源多肽插入在 N 端或 C 端时,其免疫原性可得以提高,但 HBcAg 自身依然保持很强的免疫原性,因而免疫效果差^[8]。目前插入位点首选 MIR 区,删除此区数个氨基酸残基,可降低 HBcAg 自身的抗原性和免疫原性,同时增强外源多肽的免疫原性^[9]。迄今为止,HBcAg 颗粒呈递 HBV、HPV、FMDV、汉坦病毒、疟原虫等抗原表位,并取得良好的免疫效果^[10-14]。我们构建的重组表达载体 pC149-mut 整合有 HBcAg 的 aa1-149,用连接子替代 MIR 区 aa79、80

两个氨基酸,去除了 c/e1 表位后,仍能自主组装成颗粒,并可使外源表位暴露于颗粒表面^[6]。He 等首次发现 HEV 外表面至少存在两个细胞受体结合区域:其一位于 HEV ORF2 aa459-606,另一个区域位于 aa423-438(即 12A10 表位);其中,aa423-438 区域很可能和病毒上的细胞膜受体结合部位非常靠近,或可能直接参与构成了病毒与细胞特异性识别的表位^[3]。本研究将 HEV 受体相关的 12A10 表位肽插入到 MIR 区中,结果显示,HEV 类病毒颗粒蛋白 p239 上的非优势表位 12A10 通过 HBcAg 呈递,成为融合蛋白 rHBc-12A10 上的免疫优势表位。重组颗粒 rHBcAg-12A10 具有成为候选的 HEV 表位疫苗的良好前景。

目前,乙肝核心蛋白作为免疫载体已在大肠杆菌、酵母、昆虫细胞以及哺乳动物细胞等系统中成功表达,并且可组装成颗粒^[15-18]。虽然大肠杆菌繁殖快、表达量高,但常以包含体形式存在,且缺乏翻译后的加工修饰作用。而通过昆虫细胞和哺乳动物细胞表达的外源蛋白虽能够得到良好的蛋白翻译后修饰和加工,但其纯化难度大,成本高,难以大量制备。毕赤酵母表达系统是目前分子生物学领域中用于表达重组蛋白的常用工具之一,具有翻译后的修饰与加工功能,糖基化形式近似于哺乳动物细胞,且具有表达量高,遗传稳定,易于实现低成本的高密度发酵等优点。如若将蛋白分泌表达至酵母胞外,还可克服酵母胞内表达难以纯化等难题。

迄今为止,外源蛋白形成的颗粒经过毕赤酵母分泌到胞外的报道并不多,AnaVassileva 等^[19]利用 GAP 启动子在毕赤酵母中分泌表达出了 HBsAg 颗粒。Xue Han 等^[20]成功通过毕赤酵母表达分泌出 HBV L 蛋白颗粒。而 HBcAg 本身以及作为免疫载体在毕赤酵母体系中的分泌表达在国内外均未见报道。我们首次构建了能够分泌表达携带有表位多肽的 HBcAg 蛋白颗粒的毕赤酵母工程菌,为酵母分泌表达大尺度的蛋白颗粒提供了又一个范例。

参考文献:

- [1] Macauley Patrick S, Fazenda M L, McNeil B, et al. Harvey, heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. *Yeast*, 2005, 22(4): 249 - 270.
- [2] Aggarwal R, Krawczynski K. *Hepatitis E*: an overview and recent advances in clinical and laboratory research [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15(1): 9 - 20.
- [3] He S, Miao J, Zheng Z, et al. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 1): 245 - 249.
- [4] 何水珍, 郑子峥, 吴婷, 等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究[J]. *病毒学报*, 2006, 22(6): 426 - 430.
- [5] Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/ T cell epitopes[J]. *Intervirology*, 2001, 44(2/3): 98 - 114.
- [6] Gu Y, Zhang J, Wang Y B, et al. Selection of a peptide mimicking neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(11): 1583 - 1588.
- [7] Li S W, Zhang J, He Z Q, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(5): 3400 - 3406.
- [8] Schodel F, Moriarty A M, Peterson D L, et al. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity[J]. *J Virol*, 1992, 66(1): 106 - 114.
- [9] Schodel F, Peterson D, Hughes J, et al. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. presentation of foreign epitopes[J]. *J Biotechnol*, 1996, 44(1/2/3): 91 - 96.
- [10] Zhang Y L, Guo Y J, Wang K Y, et al. Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus [J]. *Scand J Immunol*, 2007, 65(4): 320 - 328.
- [11] Chen X, Li M, Le X, et al. Recombinant hepatitis B core antigen carrying preS1 epitopes induce immune response against chronic HBV infection[J]. *Vaccine*, 2004, 22(3/4): 439 - 446.
- [12] Birkett A, Lyons K, Schmidt A, et al. A modified hepatitis B virus core particle containing multiple epitopes of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein provides a highly immunogenic malaria vaccine in pre-clinical analyses in rodent and primate hosts[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(12): 6860 - 6870.
- [13] Tindle R W, Herd K, Londono P, et al. Chimeric hepatitis B core antigen particles containing B- and T-helper epitopes of human papillomavirus type 16 E7 protein induce specific antibody and T-helper responses in immunised mice[J]. *Virology*, 1994, 200(2): 547 - 557.
- [14] Ulrich R, Koletzki D, Lachmann S, et al. New chimaeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotype Puumala) epitopes: immunogenicity and protection against virus challenge[J]. *J Biotechnol*, 1999, 73(2/3): 141 - 153.
- [15] Clarke B E, Brown A L, Grace K G, et al. Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particles produced in bacteria[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(Pt 5): 1109 - 1117.

- [16] Beesley K M, Francis M J, Clarke B E, et al. Expression in yeast of amino-terminal peptide fusions to hepatitis B core antigen and their immunological properties[J]. *Biotechnology (N Y)*, 1990, 8(7): 644 - 649.
- [17] Lanford R E, Notvall L. Expression of hepatitis B virus core and precore antigens in insect cells and characterization of a core-associated kinase activity[J]. *Virology*, 1990, 176(1): 222 - 233.
- [18] Roossinck M J, Jameel S, Loukin H, et al. Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells[J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(5): 1393 - 1400.
- [19] Vassileva A, Chugh D A, Swaminathan S, et al. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter[J]. *J Biotechnol*, 2001, 88(1): 21 - 35.
- [20] Han X, Ye L B, Li B Z, et al. Expression, purification and characterization of the hepatitis B virus entire envelope large protein in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 49(2): 168 - 175.

Secretion Expression of Hepatitis B Core Antigen Particles Harboring HEV Receptor-associated Epitope in *Pichia pastoris*

ZHANG Jian-nan, LI Shao-wei^{*}, YANG Kun-yu, HE Fang-ping, TANG Ming, GU Ying, WANG Ying-bin, DU Hai-lian, ZHANG Jun, XIA Ning-shao
(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Diseases, School of Life Sciences, Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The hepatitis B virus core antigen harboring the HEV peptide was secretory-expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant strains were cultivated and induced by methanol. After concentrating and exchanging buffer by crossflow filtration, the supernatant was purified by hydrophobic interaction chromatography. Analysis of CsCl iso-density gradient centrifuge indicated that the density of the recombinant protein was 1.32 g/mL. TEM analysis indicates that the HBc149-12A10 protein can self-assemble into particles, with approximately 30 nm in diameter. Mice were immunized with the recombinant protein, and 12A10-specific antibody was elicited more than the titer 1.6×10^5 after 8 weeks, moreover, the non-immunodominant epitope was highly presented in the recombinant particles. The results of our study may shed light of the secretion expression of large-size particles in *P. pastoris* and take insight into the rational design of the vaccine carrier.

Key words: HBcAg; fusion protein; *Pichia pastoris*; secretion expression