

## 人可溶性低密度脂蛋白受体在甲醇酵母中的表达

胡 箭 李 元\*

(中国医学科学院、中国协和医科大学医药生物技术研究所,北京 100050)

**摘 要** 为获得低密度脂蛋白受体配基结合结构域在甲醇酵母中的分泌表达,首先用 RT-PCR 方法以人肝癌 Bel-7402 总 RNA 为模板扩增了编码低密度脂蛋白受体配基结合结构域的基因片段。核酸测序分析表明克隆到的 DNA 片段的序列与报道的人 LDLR 的 cDNA 序列相同。然后构建了甲醇酵母表达质粒 pPIC9K-sLDLr,并将其线性化后用电穿孔法导入 *Pichia pastoris* GS115。分别用 SDS-PAGE、Western blot 和 Ligand binding blot 对 GS115/pPIC9K-sLDLr 上清中的重组 sLDLr 进行鉴定。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明表达的 sLDLr 的表观分子量为 36kD。Ligand binding blot 分析表明表达的 sLDLr 具有配基结合的生物学活性。

**关键词** 低密度脂蛋白受体、*Pichia pastoris*, 分泌表达

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0040-05

低密度脂蛋白受体(Low density lipoprotein receptor, LDLR)对调节胆固醇的内环境稳定起重要作用<sup>[1]</sup>。血浆中胆固醇主要由低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)携带运输,其只有通过低密度脂蛋白受体途径被内吞至细胞内才能被机体利用。各种原因引起的 LDLR 功能的降低或缺失都会引起脂质代谢的紊乱。升高的血浆胆固醇水平加速了动脉粥样硬化斑的形成,进而诱发心脏病和中风。当血浆 LDL-胆固醇水平低于 100mg/100mL 时心脏病发生的机率很低;而当血浆 LDL-胆固醇水平超过 200mg/100mL 时心脏病发生的几率就很高。人类有一种称为家族性高胆固醇血症(Familial hypercholesterolemia, FH)的病例,患者血浆胆固醇水平异常升高,在幼年时期就发生严重的动脉粥样硬化。后经研究者证实,家族性高胆固醇血症的病因是由于 LDLR 编码基因的遗传缺损。

LDLR 为一镶嵌型单链糖蛋白<sup>[2,3]</sup>,其分子结构包括 5 个不连续的功能结构域:胞浆结构域、跨膜结构域、糖基化结构域、表皮生长因子前体同源结构域和配基结合结构域。本工作表达的为配基结合结构域,亦将其称为可溶性低密度脂蛋白受体(sLDLr)。此结构域包括受体 N-端的 292 个氨基酸残基,由 7 个以首尾相接方式排列的富含 Cys 的重复单位组

成。对配基结合结构域的分析表明 7 个重复单位在功能上不是等价的<sup>[4]</sup>,并且与 ApoE 和 ApoB-100 的结合需要重复单位的不同组合。除了 N 端的重复单位外,其它任一重复单位的缺失都会影响受体与 LDL 的结合。

近年来有人用 *E. coli*<sup>[5]</sup> 和昆虫细胞<sup>[6]</sup> 对 LDLR 配基结合结构域进行了表达,但在甲醇酵母中还未有成功表达的报道。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌种、质粒和培养基

*P. pastoris* GS115(his4)(Invitrogen)用于外源蛋白质表达。*E. coli* TG1(本实验室保存)用于载体的克隆。*P. pastoris* 整合型分泌表达质粒 pPIC9K(Invitrogen)用于在 GS115 中表达外源蛋白质。pGEM<sup>+</sup>-T(Promega)用于 DNA 克隆。LB-Amp 培养基(1%胰化蛋白胨,0.5%酵母提取物,1% NaCl, pH7.0, 50μg/mL 氨苄青霉素)用于 *E. coli* 的培养。YPD 培养基(1%酵母提取物,2%蛋白胨,1%葡萄糖)用于 *P. pastoris* GS115(his4)的培养。MD 平板(1.34% YNB(Invitrogen), 4 × 10<sup>-5</sup>% 生物素, 2% 葡萄糖, 1.5% 琼脂粉)用于 His<sup>+</sup> 转化子的筛选。YPS(1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 2%山梨醇)用于酵母生物量的积累。

收稿日期:2001-07-20, 修回日期:2001-10-17。

\* 通讯作者。Tel: 86-10-63153320; Fax: 86-10-63017302; E-mail: yuanwli@263.net

MMC培养基(1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % 生物素, 3% 酪蛋白酸水解物, 0.5% 甲醇)用于外源蛋白质的诱导表达。

## 1.2 寡核苷酸引物

根据已知的 LDLR 的 cDNA 序列设计 sLDLr 的 5'和 3'端寡核苷酸引物,在 5'和 3'端引物的 5'末端都引入 *Not* I 限制性酶切位点并分别加上 3 个保护碱基。5'和 3'端引物序列如下:

5'-TTTGC GCCCG CACTGGGCGACAGATG-3'

5'-TAAGCGGCCGCGACTCTTTGATGGGTT-3'

## 1.3 RT-PCR 扩增和序列测定

使用 Promega 的 SV 总 RNA 提取试剂盒从人肝癌 Bel-7402 细胞(约  $1 \times 10^6$  个细胞)中提取总 RNA。提取方法依试剂盒推荐的步骤进行。总 RNA 溶于 100 $\mu$ L 不含核酸酶的水中。取 5 $\mu$ L 总 RNA 为模板使用 Advantage<sup>®</sup> One-step RT-PCR 试剂盒(CLONTECH)以美国 MJ Research 公司的 MiniCycleTM、PTC-150 型 PCR 仪进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 条件如下:50 $^{\circ}$ C, 1h;94 $^{\circ}$ C, 5min;94 $^{\circ}$ C, 30s, 50 $^{\circ}$ C, 30s, 68 $^{\circ}$ C, 100s;3 个循环后,94 $^{\circ}$ C, 30s, 68 $^{\circ}$ C, 2min;30 个循环后,68 $^{\circ}$ C 延伸 5min;4 $^{\circ}$ C 保存。获得的约 900bp 的产物纯化后采用 Promega 的 TA 克隆试剂盒将其克隆至 pGEM<sup>®</sup>-T 载体中,构建克隆质粒 pGEM<sup>®</sup>-T-sLDLr,用 ABI-PRISM377 DNA 测序仪测序。

## 1.4 重组表达质粒的构建

用限制酶 *Not* I 将克隆到的 sLDLr 基因从 pGEM<sup>®</sup>-T-sLDLr 质粒上切下,同样用 *Not* I 酶切质粒 pPIC9K,脱磷、连接。连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞。选取阳性克隆,提取质粒进行分析。提取的质粒 DNA 分别用 *Not* I 和 *Eco*R I 酶切,以确定 sLDLr 基因是否以正确的方向插入。

## 1.5 转化甲醇酵母及鉴定

pPIC9K-sLDLr 质粒用 *Bgl* II 酶切线性化,并用电穿孔法转化 *P. pastoris* GS115(his4)菌株,以空质粒 pPIC9K 为对照。实验方法按照公司提供的标准操作进行(Invitrogen)。首先在不含组氨酸的 MD 平板上筛选 His<sup>+</sup> 转化子。少量培养后提取 His<sup>+</sup> 转化子基因组 DNA 并以 5' AOX1 和 3' AOX1 引物(5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'; 5'-GCAAATGGCAT-TCTGACATCC-3')(Invitrogen)进行 PCR 分析,若 sLDLr 基因整合到酵母基因组中并且为 Mut<sup>+</sup> 表型,PCR 产物应只有一条约 1.3kb(900bp + 429bp)的 DNA 条带,而空载体转化的应只有一条 429bp 的 DNA 条带。

## 1.6 sLDLr 在酵母中的诱导表达

选取 PCR 鉴定正确的克隆菌(GS115/pPIC9K-sLDLrMut<sup>+</sup>)接种到含 2mL YPG 的试管中,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养过夜。再以 1% (V/V) 接种到含有 100mL YPS 培养基的 500mL 的摇瓶中。28 $^{\circ}$ C 振荡(200r/min)培养约 24h 后将菌体离心并重悬于 MMC 培养基中,28 $^{\circ}$ C、200r/min 振荡诱导表达 5d,每隔 24h 补加 100% 的甲醇至终浓度为 1%,取样分析。

## 1.7 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析

将发酵液离心去除菌体,上清液用终浓度为 20% (W/V) 的 TCA 沉淀蛋白质。沉淀的蛋白质用 1 $\times$  蛋白质上样缓冲液溶解,在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上进行还原性的 SDS-PAGE 电泳分析。Western 印迹分析使用 Amersham pharmacia biotech Hoefers<sup>®</sup> mini VE Blotter 并按照公司提供的标准操作进行。使用鼠抗人 LDLR 的单克隆抗体(Oncogene)为一抗,碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H + L)为二抗,用 NBT/BCIP (Sigma)进行显色。

## 1.8 配基结合印迹分析

表达培养物的发酵上清液加入等体积的 2 $\times$  非还原的蛋白质上样缓冲液,按文献[7]方法进行非还原的 10% SDS-PAGE。电泳后的聚丙烯酰胺凝胶经电转移将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,转移缓冲液为不含甲醇的 Towbin 缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, 192mmol/L glycine, pH8.3),方法参照 Western 印迹分析。然后用 20 $\mu$ g/mL LDL 作为配基(含 20mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup>),分别加入第一抗体(兔抗人载脂蛋白 B)、第二抗体(碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG(H + L)),最后用 NBT/BCIP 进行显色。

## 2 结 果

### 2.1 sLDLr 的克隆

RT-PCR 扩增结果见图 1。结果可见有与预期的片段大小一致的 DNA 条带(约 900bp)。测序结果与文献报道的 LDLR 基因序列基本一致,其中有一个同义突变。突变位点发生在 LDLR cDNA 的第 81 位,是 T 被 C 所替代,氨基酸未发生改变。

### 2.2 pPIC9K-sLDLr 分泌表达质粒的构建及转化甲醇酵母

将 sLDLr 基因插入 pPIC9K,构建成分泌表达质粒 pPIC9K-sLDLr(图 2)。质粒 pPIC9K-sLDLr 用 *Not* I 酶切产生与纯化的 sLDLr 基因片段大小一致的片段,见图 3,表明 sLDLr 基因插入到 pPIC9K 中。在 pPIC9K 多克隆位点和 sLDLr 基因内部各有一个

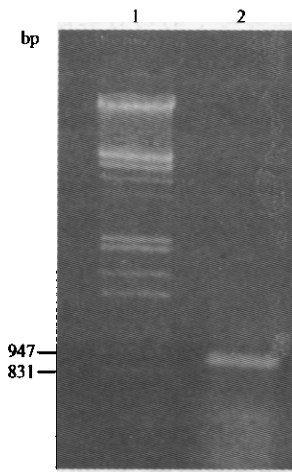


图 1 RT-PCR 产物的电泳分析结果  
Fig.1 Analysis of RT-PCR product  
1.  $\lambda$ DNA/*Eco*R I、*Hind*III ; 2. RT-PCR product

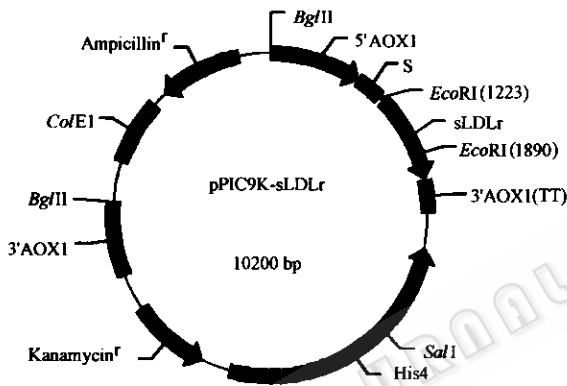


图 2 分泌表达质粒 pPIC9K-sLDLr 结构示意图  
Fig.2 The sketch map of pPIC9K-sLDLr

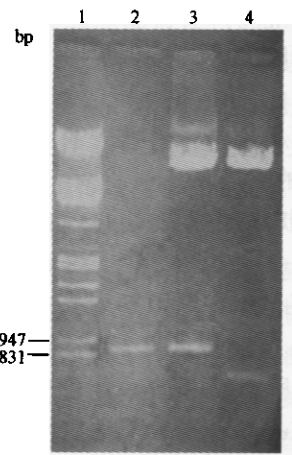


图 3 鉴定 sLDLr 基因片段的插入及插入方向  
Fig.3 Identification of the insert direction for sLDLr gene fragment  
1.  $\lambda$ DNA/*Eco*R I、*Hind*III ; 2. Purified sLDLr gene fragment  
3. pPIC9K-sLDLr/*Not* I ; 4. pPIC9K-sLDLr/*Eco*R I

*Eco*R I 位点。因而若 sLDLr 以正确的方向插入到 pPIC9K 中,用 *Eco*R I 应能切下一个大小为 667bp 的片段。图 3 的结果表明了 sLDLr 基因片段插入的方向为正向。用 *Bgl* II 酶切线性化重组质粒 pPIC9K-sLDLr 和空质粒 pPIC9K,并转化甲醇酵母。提取 His<sup>+</sup> 转化子基因组 DNA 进行 PCR 分析,证明 sLDLr 基因插入到酵母染色体中。分别将得到的菌株命名为 GS115/pPIC9K-sLDLr 和 GS115/pPIC9K。

2.3 sLDLR 的表达

2.3.1 SDS-PAGE: 以 1mL 上清液沉淀的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,结果在分子量约 36kD 处有一明显的蛋白质条带分子量与通过计算得到的 sLDLR 的分子量(34kD)基本相符。

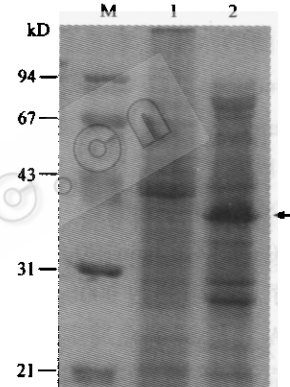


图 4 sLDLR 的 SDS-PAGE 分析结果  
Fig.4 Analysis of SDS-PAGE for sLDLR  
M. Marker; 1. GS115/pPIC9K;  
2. GS115/pPIC9K-sLDLr

2.3.2 Western blot: Western 印迹分析中,在与 SDS-PAGE 电泳特异蛋白条带的相应位置处有一杂交条带出现(图 5),表明表达产物为 sLDLR。

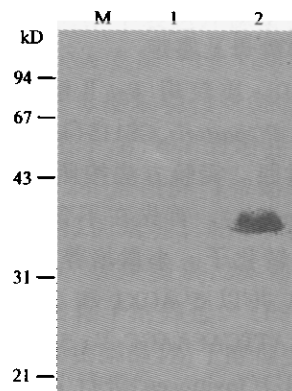


图 5 sLDLR 的 Western blot 分析结果  
Fig.5 Analysis of Western blot for sLDLR  
M. Standard marker for protein; 1. GS115/pPIC9K; 2. GS115/pPIC9K-sLDLr

**2.3.3 Ligand binding blot:** 为了确定表达的 sLDLR 是否具有配基结合活性,进行了受体、配基结合印迹分析(图 6)。样品在相应的分子量处有一明显的杂交条带。表明表达产物 sLDLR 具有配基结合的生物活性。

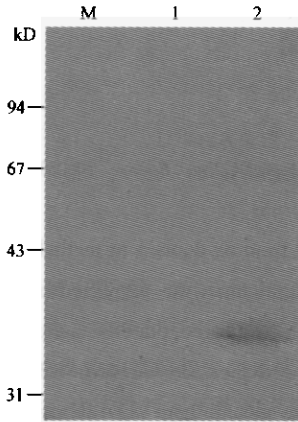


图 6 sLDLR 的 Ligand binding blot 分析结果

Fig.6 Analysis of Ligand binding blot for sLDLR

M. Standard marker for protein;

1. GS115/pPIC9K; 2. GS115/pPIC9K-sLDLr

### 3 讨 论

近些年来有很多文献报道了用 *Pichia pastoris* 甲醇酵母成功表达真核蛋白质的例子<sup>[8]</sup>。在原核表达系统中重组蛋白质一般不能正确折叠,而在啤酒酵母中重组蛋白质又存在过度糖基化的问题。甲醇酵母具有很强的真核蛋白质修饰功能,另外 *Pichia pastoris* 甲醇酵母自身的外泌蛋白质很少并且易于高密度发酵,因此其在表达和分离纯化异源蛋白质等方面具有很强的优势。本文利用甲醇酵母成功地表达了具有配基结合活性的 sLDLR,到目前为止,还未见有关此方面的文献报道,因此具有一定的新颖性。在 sLDLR 的表达过程中,发现用山梨醇替代甘油为碳源的发酵结果较为理想。在培养基中加入酪蛋白酸水解物后,最终诱导培养物上清液的 pH 值约为 7.0,这一 pH 值偏离了预测的 sLDLR 的等电点( $pI = 4.31$ ),另外酪蛋白酸水解物也为甲醇酵母的生长提供了营养并且能够保护外源蛋白质免受蛋白水解酶破坏,这些对 sLDLR 的分泌表达都起到促进作用。

由于低密度脂蛋白受体在胆固醇代谢中所起的重要作用,其作为药物筛选靶位越来越受到人们的重视。有人以 LDLR 基因启动子为靶位筛选得到了能够上调 LDLR 表达的化合物<sup>[9,10]</sup>。本文拟用通过基因工程方法获得的 sLDLR 蛋白质为靶位建立新

药筛选模型筛选低密度脂蛋白受体的激动剂和拮抗剂,以期获得抗动脉粥样硬化的药物和其它用途的药物。而且人们发现在许多肿瘤细胞中 LDLR 的表达水平都有所提高<sup>[11]</sup>。尤其是在妇科肿瘤和骨髓白血病细胞中发现有异常高数量的 LDLR 的表达。这可能是因为肿瘤细胞的快速增生需要由 LDL 携带的胆固醇来合成细胞膜<sup>[12]</sup>。Norata 等人<sup>[13]</sup>给荷瘤小鼠静脉注射人的<sup>125</sup>I 标记的 LDL 发现在注射 24h 后在移植的纤维肉瘤中的放射性比在肝、脾和肌肉中高许多(按每克组织计算)。因而对于 LDLR 的拮抗剂而言,有可能会起到抑制肿瘤细胞生长的作用,同时也可能作为抗肿瘤药物的载体以达到特异性地运输抗肿瘤药物到肿瘤细胞的作用。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, 232(4746): 34 ~ 47
- [2] Russell D W, Schneider W J *et al.* Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, 1984, 37(2): 577 ~ 585
- [3] Yamamoto T, Davis C G, Michael S *et al.* The Human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple *alu* sequences in its mRNA. *Cell*, 1984, 39(1): 27 ~ 38
- [4] Esser V, Limbird L E, Brown M S *et al.* Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1988, 263(26): 13282 ~ 13290
- [5] Simmons T, Newhouse Y M, Arnold K S *et al.* Human low density lipoprotein receptor fragment successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(41): 25531 ~ 25536
- [6] Marlovits T C, Zechmeister T, Gruenberger M *et al.* Recombinant soluble low density lipoprotein receptor fragment inhibits minor group rhinovirus infection *in vitro*. *The FASEB Journal*, 1998, 12(9): 695 ~ 703
- [7] Bochokv V N, Tkachuk V A, Philippova M P *et al.* Ligand selectivity of 105kD and 130kD lipoprotein-binding proteins in vascular-smooth-muscle-cell membranes is unique. *Biochem J*, 1996, 317(Pt 1): 297 ~ 304
- [8] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J Y *et al.* Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, 16(1): 23 ~ 52
- [9] Koguchi Y, Nishio M, Kotera J *et al.* Trichostatin A and Herboxidiene up-regulate the gene expression of low density lipoprotein receptor. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(11): 970 ~ 971
- [10] Zhang H(张华), Hiroshi T(供田洋), Satoshi O(大村智). Study on active compound increasing the expression of LDLR gene from fungi KS-1995. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 1998, 23(4): 248 ~ 252
- [11] Vitols S. Uptake of Low-Density Lipoprotein by Malignant Cells-Possible Therapeutic Application. *Cancer cells*, 1991, 3(12): 488 ~ 495

- [12] Firestone R A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting anti-tumor compounds to cancer cells. *Bioconjugate Chem.* 1994, 5(2): 105 ~ 113
- [13] Norata G, Cinti G, Ricci L *et al.* *In vivo* assimilation of low density lipoproteins by a fibrosarcoma tumor line in mice. *Cancer Letter*, 1984, 25(2): 203 ~ 208

## Expression of the Human Soluble Low Density Lipoprotein Receptor in Methylootropic Yeast

HU Jian LI Yuan\*

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

**Abstract** To obtain the expression of human low density lipoprotein receptor ligand binding domain in methylootropic yeast, firstly the DNA fragment encoding for human low density lipoprotein receptor ligand binding domain was amplified by RT-PCR with human hepatoma Bel-7402 total RNA as template. The nucleotide sequencing analysis indicated that the sequence of the cloned DNA fragment was as same as the reported human LDLR cDNA sequence. Then the expression vector pPIC9K-sLDLr was constructed, linearized and introduced into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant sLDLr was identified by SDS-PAGE, Western blot and Ligand binding blot in supernatant of GS115/pPIC9K-sLDLr. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the apparent molecular weight of expressed sLDLr was about 36kD. And the ligand binding blot analysis indicated the expressed sLDLr has the biological activity. The sLDLr, which had the biological activity, was successfully secretorily expressed in the *Pichia pastoris* (GS115).

**Key words** low density lipoprotein receptor, *Pichia pastoris*, Secretary expression

Received: 07-20-2001

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63153320; Fax: 86-10-63017302; E-mail: yuanwli@263.net