

人 DNA 拓扑异构酶 I 在毕赤酵母中的表达及发酵条件优化

杨国武^{1,2} 袁保红¹ 何国平⁴ 戴欣¹ 林永成³ 周世宁^{1*}

¹(中山大学生命科学院生物化学系,广州 510275)

²(深圳市计量质量检测研究院,深圳 518055)

³(中山大学化学与化工学院天然产物研究室,广州 510275)

⁴(香港理工大学应用生物与化学技术系,香港)

摘 要 为了在体外以人 DNA 拓扑异构酶 I (hTopo I) 为靶位进行抗肿瘤化合物的快速筛选,用 RT-PCR 法从 HeLa 细胞中克隆了 hTopo I 基因 ORF 并在毕赤酵母中首次成功表达。表达产物可分泌到发酵上清,易于制备。蛋白酶 A 缺陷的重组酵母(SMD-hTopoI)分泌重组酶的能力比具有蛋白酶 A 活性的重组酵母(X33-hTopoI 和 KM-hTopoI)更高。通过发酵条件的优化,使用 BMMY(pH 7.25),于 20°C,每隔 24h 补加 0.5% (V/V) 的甲醇和 3% (V/V) 的营养液, SMD-hTopo I 诱导 72h 后可表达最高的酶活力(43000u/mL),发酵上清中 hTopo I 可达 11 mg/L,约占总蛋白的 10%。SDS-PAGE 和 Western blot 分析显示,表达的 hTopo I 为 91kD 蛋白,无糖基化修饰。

关键词 人 DNA 拓扑异构酶 I,分泌表达,优化,毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0181-06

DNA 拓扑异构酶(DNA topoisomerase)通过调节 DNA 的拓扑结构,在细胞代谢过程中起着极重要的作用,如 DNA 复制、基因转录、DNA 重组、有丝分裂等^[1,2]。DNA 拓扑异构酶组成了 type I 和 type II 两个家族。Type I 酶改变 DNA 双螺旋的拓扑结构时,不需要 ATP 供能,一次仅切割 DNA 双链中一条链。Type II 酶改变 DNA 双螺旋的拓扑结构时,需要 ATP 提供能量,一次同时切开 DNA 的双链^[3]。除细菌的 DNA 拓扑异构酶 II(即旋转酶,gyrase)能将负超螺旋引入 DNA 中,其余 DNA 拓扑异构酶能松弛 DNA 链中的超螺旋^[1]。真核生物 DNA 拓扑异构酶 I 或 II 被证实为多种抗肿瘤药物的有效靶位,细菌的 gyrase 也是临床上广泛使用的喹诺酮类抗生素的作用靶位^[4,5]。

人 DNA 拓扑异构酶 I (hTopo I) 为 91kD 的单肽,有 765 个氨基酸^[6]。该酶由位于染色体 20q12-13.2 位点的单拷贝基因编码^[7],在细胞中含量甚微。hTopo I 在酿酒酵母、昆虫细胞及肿瘤细胞中得到了表达^[8,9,10],但表达量都十分低,这是因为表达的具有活性的 hTopo I 在宿主细胞内会影响细胞正常的代谢过程^[11]。在细胞内表达后,hTopo I 的分离

纯化步骤也十分复杂,且在分离纯化过程中酶活性极易丧失。为了获得足够的酶供研究和应用,本文应用了毕赤酵母表达系统。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)有 α 信号肽引导,表达产物能分泌到发酵液中,易于纯化,它还有甲醇诱导型强启动子,外源蛋白的表达产量高^[12,13]。本研究首次在毕赤酵母中成功表达了 hTopo I 全长蛋白并进行了表达条件的优化,表达产物性质稳定,产量较以往的方法高。表达产物经过简单的超滤制备,即能满足体外以 hTopo I 为靶位抗肿瘤化合物的快速筛选。

1 材料与方法

1.1 材料

pBR322、pPICZ α A、*P. pastoris* SMD1168(*his4 ura3 pep::URA3*, Mut⁺) X33(wild type, Mut⁺) KM71(*his4 aox1::ARG4*, Mut^s)为本室保存。Thermo-ScriptTM RT-PCR System 为 Gibco 公司产品,EcoRI、KpnI、SacI、T4 DNA Ligase 为 TaKaRa 公司产品。一抗为抗 hTopo I 的鸡 IgY,二抗为兔抗鸡 IgG-HRP,由珠海百奥公司生产。

1.2 方法

1.2.1 hTopo I 基因 ORF(open reading frame)的克隆

收稿日期 2003-08-07,修回日期 2003-10-29。

基金项目 国家高技术研究发展计划(863)专项资助项目(2001AA620401);广东省自然科学基金资助项目(011124)

* 通讯作者。Tel 86-20-84110238 Fax 86-20-84036215 E-mail jsszsl@zsu.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

与表达载体的构建:作者从处于对数生长期的 Hela 细胞中提取总 RNA,使用 ThermoScript™ RT-PCR kit 和 hTopo I ORF 的下游 Primer (B) (5' ATAGGTAC-CCTACTAAAACATCATAGTCTTCATCAGC 3', 含 *Kpn* I 位点) 以 hTopo I mRNA 为模板进行逆转录,合成 hTopo I cDNA 第一链。再以此为模板,用 hTopo I ORF 的上游 Primer (A) (5' ATAGAATTCATGAGTGGGGAC-CACCTCCAC 3', 含 *Eco*R I 位点) 和 Primer B, 通过 PCR 合成全长 hTopo I ORF (2295bp)。引物设计依据发表的序列 (GenBank Accession No. J03250)^[6]。PCR 条件为 94℃ 变性 5 min, 然后 94℃ 30s → 56℃ 40s → 72℃ 2min 进行 30 cycles, 最后 72℃ 延伸 10min。合成的 hTopo I ORF 片段含有两个终止子。将 PCR 产物与载体 pPICZαA 用 *Eco*RI 和 *Kpn*I 双酶切后, ORF 与 pPICZαA 相连接构建出表达载体 pPICZα-hTopoI。

1.2.2 毕赤酵母的转化与 hTopo I 的表达: 将 pPICZα-hTopoI 经过 *Sac* I 酶切, 线性化后的表达载体用电转化方式导入毕赤酵母 SMD1168、X33、KM71 并与宿主的基因组发生同源重组。整合后的 pPICZα-hTopoI 除在毕赤酵母中表达 hTopo I 外, 还会表达 zeocin 抗性蛋白而起筛选的作用。zeocin 抗性蛋白在宿主细胞内不是以酶解的方式分解 zeocin, 而是与 zeocin 按一定化学剂量结合, 使 zeocin 失效。这样, 整合到毕赤酵母基因组中重组质粒的拷贝数越多, zeocin 抗性蛋白表达量就越高, 其耐受高浓度 zeocin 的能力就越强, 表达 hTopo I 的能力也可能提高。因此, 可方便地从含高浓度 zeocin 的培养基中直接筛选高拷贝重组子^[14]。用含 1000μg/mL zeocin 的 YPDS 筛选的重组酵母 (SMD-hTopoI, X33-hTopoI, KM-hTopoI) 可表达 hTopo I, 并在 α -factor 的引导下分泌到发酵上清中。

Mut⁺ 表型 (甲醇利用野生型) 重组酵母的表达: 接种重组酵母于 BMGY [1% (W/V) yeast extract, 2% (W/V) tryptone, 1.34% (W/V) yeast nitrogen base (YNB), 4×10^{-5} % (W/V) biotin, 1% (V/V) glycerol and 100 mmol · L⁻¹ potassium phosphate (pH6.0)] 中, 30℃ 250 r · min⁻¹ 培养至 OD_{600} 为 2~6, 室温离心 5min 收集细胞, 加入原培养体积 4 倍的 BMMY [1% (W/V) yeast extract, 2% (W/V) tryptone, 1.34% (W/V) YNB, 4×10^{-5} % (W/V) biotin, 0.5% (V/V) methanol and 100 mmol · L⁻¹ potassium phosphate (特定 pH)] 重悬细胞, 盖 4 层纱布, 在一定温度下 250 r/min 表达 hTopo I, 每隔 24h 补加一定量甲醇诱导表达。

Mut^s 表型 (甲醇利用迟缓型) 重组酵母的表达: 接种重组酵母于 BMGY (pH6.0) 中, 30℃ 250 r/min 培养至 OD_{600} 为 2~6, 室温离心 5min 收集细胞, 加入原培养体积 1/4 倍的 BMMY 重悬细胞诱导表达, 其余条件同上。

1.2.3 重组酵母基因组 PCR 分析: 重组酵母基因组的提取参考 EasySlect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, USA)。PCR 使用两对特异引物, 即 hTopo I ORF 的 Primer A 和 B, *P. pastoris* AOX1 基因的上游 primer (5' GACTGGTTCGAATTGACAAGC 3') 和下游 primer (5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3')。

1.2.4 表达产物的酶活力分析: 酶活力单位定义: 在 20μL hTopo I 反应体系 [35mmol/L Tris · HCl (pH7.5), 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 2 mmol/L spermidine, 0.1 mmol/L EDTA, 50 μg/mL BSA] 中, 能在 37℃ 30min 松弛 0.5μg 负超螺旋 pBR322 所需的 hTopo I, 为 1 个单位 (u) 的酶量。

在共 20μL hTopo I 反应体系中, 加入 4μL 反应缓冲液 (5 × [175mmol/L Tris · HCl (pH7.5), 250 mmol/L KCl, 25 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L spermidine, 0.5 mmol/L EDTA, 250 μg/mL BSA], 0.5μg 负超螺旋 pBR322, 适当体积的发酵上清或其稀释液 (μL, 定义为 A)^[15]。37℃ 反应 30min 后, 加入 4μL hTopo I 反应终止液 (6 × [3% (V/V) SDS, 60mmol/L EDTA, 50% (V/V) glycerol, 0.25% (W/V) bromphenol blue]) 使用 1% 琼脂糖, 0.5 × TBE, 1.5~4V/cm 于室温 (或冰箱内) 电泳 2~8h (电压低时, 电泳效果好)。电泳完毕, 用 0.5% 的溴化乙锭染色 30 min, 再用去离子水漂洗 30 min, 紫外线下照像。若能使 0.5μg 负超螺旋 pBR322 全部松弛时, 发酵上清的最大稀释倍数为 B, 则发酵上清的酶活力为 (B/A) × 10³ u/mL。

1.2.5 SDS-PAGE 和 western blot 分析: SDS-PAGE、银染及 Western blot 方法参见 [16]。发酵上清中 hTopo I 相对量通过对 SDS-PAGE 的薄层扫描进行分析, 发酵上清的总蛋白用 Bradford 法定量^[17]。

2 结 果

2.1 重组酵母基因组 PCR 分析

从含 1000μg/mL zeocin 的 YPDS 平板上挑取重组酵母 SMD-hTopoI, X33-hTopoI, KM-hTopoI 各一株, 在 YPD 上传代 10 次, 然后再提取其基因组, 以分析外源基因在重组酵母中的稳定性。在重组酵母基因组中, hTopo I 表达盒的结构见图 1。重组酵母基因

组 PCR 分析结果见图 2。从图中可看出,使用 AOX1

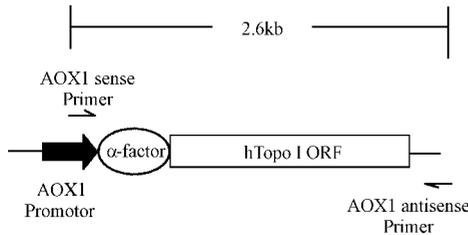


图 1 重组酵母基因组中 hTopo I 表达盒示意图

Fig.1 The expression cassette of hTopo I in the genome of the recombinant *P. pastoris*.

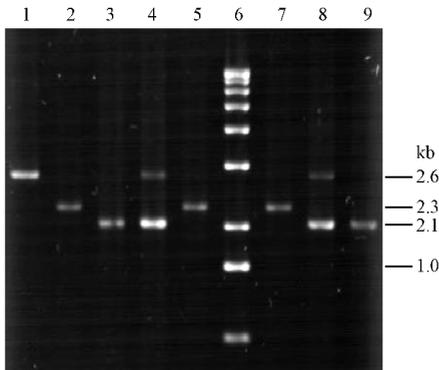


图 2 重组酵母基因组 PCR 分析结果

Fig.2 PCR analysis of genomes of recombinant *P. pastoris*

1,4,8: the genomes of KM-hTopoI, X33-hTopoI and SMD-hTopoI was analyzed by using the AOX1 primers, respectively; 3,9: the genomes of X33 and SMD1168 was analyzed by using the AOX1 primers, respectively; 2,5,7: the genomes of KM-hTopoI, X33-hTopoI and SMD-hTopoI was analyzed by using the hTopo I primers, respectively

的引物扩增 KM-hTopoI 基因组时(lane 1),hTopo I ORF(2.3kb)前融合有约 300bp 的 α 信号肽碱基序列,故扩增出约 2.6 kb 的片段。在 KM-hTopoI 基因组中,野生型 AOX1 基因(约 2.1kb)的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点间插入了 ARG4 基因(约 2 kb)而使其失活(EasySlect™ *Pichia* Expression Kit)(Invitrogen, USA),这个突变的 *aox1*:ARG4 基因太长未能扩增出来。使用 AOX1 的引物扩增 X33-hTopoI 和 SMD-hTopoI 基因组时(lane 4 和 8),扩增产物除 2.6 kb 的 hTopo I 表达盒,还有更明亮的野生型 AOX1 基因条带。使用 AOX1 的引物扩增空载体转化的 X33 和 MD1168 基因组时(lane 3 和 9),仅有 AOX1 基因条带。使用 hTopo I 的特异引物扩增 KM-hTopoI、X33-hTopoI 和 SMD-hTopoI 基因组时(lane 2,5 和 7),扩增产物仅有 hTopo I ORF 条带。这样证实了 hTopo I 基因正确整合到了 KM71、X33 和 MD1168 基因组中且十分稳定。

2.2 三种重组酵母表达 hTopo I 比较

从含 1000 μ g/mL zeocin 的 YPDS 平板上挑取

SMD-hTopoI、X33-hTopoI、KM-hTopoI 各 5 株,五株 KM-hTopoI 均为 Mut^s 表型,而 SMD-hTopoI 和 X33-hTopoI 则均为 Mut⁺ 表型。重组酵母在 BMMY (pH6.0),于 30 $^{\circ}$ C、250 r/min,每隔 24h 补加 0.5% (V/V)甲醇诱导表达。于不同诱导时间取发酵上清进行酶活力测定,测得三类重组酵母都是在诱导 72h 时酶活力最高。用空载体转化的宿主菌作对照时,其发酵上清均未检测到酶活力(以下实验均有此阴性对照,不再特别注明)。结果(表 1)表明,同类的重组酵母表达的酶活力水平相近。结果还表明,SMD-hTopoI 表达的酶活力水平比 X33-hTopoI、KM-hTopoI 更高。图 3 示一株 X33-hTopoI 诱导 72h 时的酶活力测定结果。此时,加样体积 A 为 1 μ L,能使 0.5 μ g 负超螺旋 pBR322 全部松弛时发酵上清的最大稀释倍数 B 为 4,则发酵上清的酶活力为 $(4/1) \times 10^3 = 4000$ u/mL。

表 1 三种重组酵母表达 hTopo I 比较

Table 1 The hTopo I activities (u/mL) in the supernatant fermented by three types of recombinants after 72h induction

Number of strain	1 #	2 #	3 #	4 #	5 #
KM-hTopoI	1000	1000	1300	800	800
X33-hTopoI	3200	3200	4000	2700	3200
SMD-hTopoI	5300	5300	6400	6400	5300

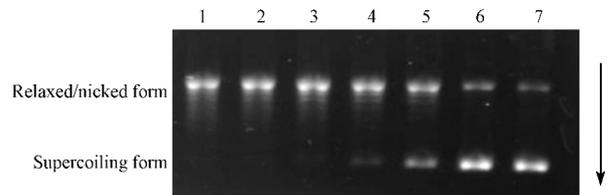


图 3 X33-hTopoI 发酵上清酶活力测定结果 (hTopo I 松弛 DNA 超螺旋活性)

Fig.3 The relaxing activity of hTopo I in the culture supernatant of one strain of X33-hTopoI

1 20 μ L of the hTopo I reaction system contained 35mmol/L Tris.HCl (pH7.5), 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 2mmol/L spermidine, 0.1 mmol/L EDTA, 50 μ g/mL BSA and 0.5 μ g supercoiled pBR322 with 1 μ L culture supernatant of X33-hTopoI; 2~5: same as lane 1, but with 1 μ L of the 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 diluted culture supernatant of X33-hTopoI, respectively; 6: same as lane 1, but with 2 μ L culture supernatant of X33 transformed with pPICZ α A; 7: same as lane 1, but without any supernatant. The enzyme activity in the supernatant of X33-hTopoI was 4000 u/mL.

2.3 SMD-hTopoI 发酵条件的优化

选取表达量最高的一株 SMD-hTopoI 进行表达条件的优化。

2.3.1 甲醇诱导浓度: SMD-hTopoI 在 BMMY (pH6.0)于 30 $^{\circ}$ C,每隔 24h 加入 0.5% 或 1% (V/V)

的甲醇进行诱导。结果表明,两种条件时发酵上清的酶活力在相同时间基本上无差别。

2.3.2 pH 值:使用 pH 值 4.0、5.0、6.0、7.0 的 BMMY,于 30℃,隔 24h 加入 0.5%(V/V)的甲醇进行诱导。结果发现,BMMY(pH4.0)的发酵上清始终未检测到酶活性,pH 为 7.0 的 BMMY 在 72h 的发酵上清酶活力明显高于 5.0 和 6.0。最高酶活力都出现在 72h。

基于以上结果,再选用 pH 值为 6.5、6.75、7.0、7.25、7.5 的 BMMY 进行诱导,其余条件同上。结果发现(图 4),72h 时 pH7~7.5 的酶活力较高,其中 pH7.25 酶活力最高。

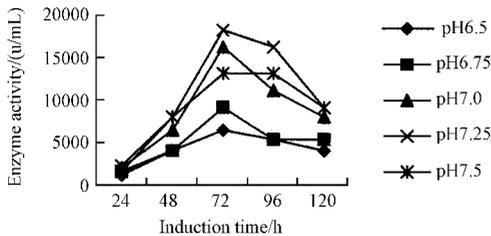


图 4 pH 对 SMD-hTopoI 表达 hTopo I 的影响

Fig.4 The effect of pH on the expression of hTopo I by SMD-hTopoI

2.3.3 温度:使用 BMMY(pH 7.25),每隔 24h 加入 0.5%(V/V)的甲醇,在 15℃、20℃、25℃、30℃ 进行表达。结果表明(图 5),在不同的温度下,酶活力高峰都出现在 72h。在较低的温度(15℃、20℃)条件下,酶活力明显提高,最高酶活力可达到 32000u/mL。

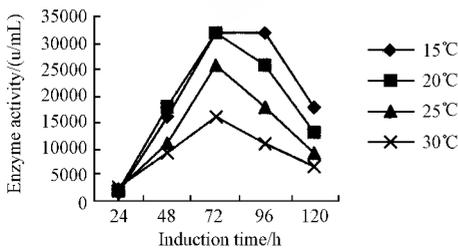


图 5 温度对 SMD-hTopoI 表达 hTopo I 的影响

Fig.5 The effect of temperature on the expression of hTopo I by SMD-hTopoI

2.3.4 补加营养液:使用 BMMY(pH 7.25),每隔 24h 加入 0.5%(V/V)的甲醇和 3%(V/V)的营养液 [10%(W/V) yeast extract, 20%(W/V) tryptone],在 20℃ 进行表达。结果表明,酶活力高峰仍在 72h 出现。补加营养液对表达 hTopo I 的有明显帮助。未加营养液时发酵上清在 72h 时酶活力为 26000u/mL,补加营养液时则为 43000u/mL。

2.3.5 酸水解干酪素:表达条件同上,于 24h 加入

1%的酸水解干酪素。同时用不加干酪素的发酵瓶做对照。结果表明,酸水解干酪素对表达 hTopo I 无帮助。

2.4 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

将 SMD-hTopoI 发酵上清用 10% SDS-PAGE 分析,银染显示上清中有约 91kD 条带(图 6B),与天然 hTopo I 相符,且此条带能被 hTopo I 的特异抗体识别(图 6A)。空载体转化 SMD1168 后其诱导上清无此条带。这说明 SMD-hTopoI 特异地表达了 hTopo I,且未发生糖基化修饰(若糖基化修饰后,重组 hTopo I 表观分子量会大于 91kD)。图 6B 的 Lane 3 经薄层扫描进行分析(图 7),发酵上清中 hTopo I 约占总蛋白的 10%,可达 11 mg/L。

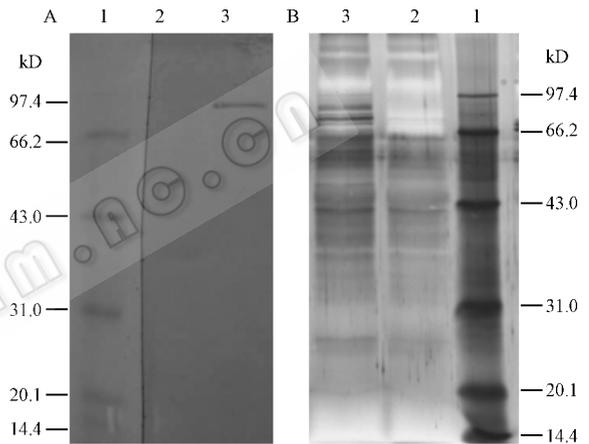


图 6 SMD-hTopoI 发酵上清的 SDS-PAGE 和 western blot 分析

Fig.6 Western blot (A) and Silver-staining (B) analysis of the culture supernatant of SMD-hTopoI

1: protein markers; 2: the culture supernatant of SMD1168 transformed with pPICZ α A; 3: the culture supernatant of SMD-hTopoI. Lane 1 in A, the lane in nitrocellulose membrane was cut down and stained in Ponceau S alone and immediately photographed with the immunoblotted membrane

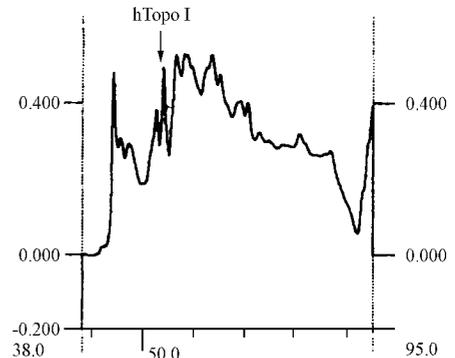


图 7 SMD-hTopoI 发酵上清 SDS-PAGE 的薄层扫描进行分析

Fig.7 Densitometric analysis of SDS-PAGE of the culture supernatant of SMD-hTopoI at 72h after induction

3 讨 论

毕赤酵母的蛋白水解酶基本储藏在液泡 (Vacuole) 内。毕赤酵母有 3 种主要的蛋白水解酶, 即蛋白酶 A、B 及羧肽酶 Y。蛋白酶 A 由基因 *PEP4* 编码, 在液泡中能自我激活。而蛋白酶 B 由基因 *PRB1* 编码, 约有 50% 是以需要蛋白酶 A 水解激活的前体形式存在。羧肽酶 Y 发挥活性前全都要蛋白酶 A 水解激活^[18]。在表达过程中, 由于少量细胞破裂, 有部分蛋白酶释放到发酵液中, 导致表达产物不稳定或被降解。SMD-hTopoI 由于蛋白酶 A 突变失活, 就缺失了全部的蛋白酶 A 和羧肽酶 Y 活性, 仅存部分蛋白酶 B 活性, 这样非常有利于发酵液中 hTopo I 的稳定。实验表明, SMD-hTopoI 的 hTopo I 表达产量明显高于 KM-hTopoI 及 X33-hTopoI。酸水解干酪素可抑制发酵上清中蛋白水解酶的活性, 从而增加重组蛋白的稳定性 (EasySlect™ *Pichia* Expression Kit) (Invitrogen, USA)。但发酵 SMD-hTopoI 时, 在培养基中加入酸水解干酪素, 对提高 hTopo I 表达产量无帮助, 原因可能是此时培养液中本身仅有很少的蛋白酶活性。

毕赤酵母的最适生长温度在 25 ~ 30℃ 之间。作者在不同的温度下表达 hTopo I, 发现 15℃ 和 20℃ 酶活力最高。从酵母的生长来看, 15℃ 和 20℃ 生长 3 天的细胞密度明显小于 25℃ 和 30℃, 但发酵上清酶活力却高许多。原因有待于进一步探讨。hTopo I 在宿主细胞中表达后, 虽有 α -factor 引导而分泌到胞外, 但在 N 端还有其自身的核定位信号 (nuclear localization signals, NLSs)^[19, 20], 故仍有一部分 hTopo I 被引导至细胞核, 并在核内发挥功能^[11]。细胞核中过高的 DNA 拓扑异构酶 I (包括 *P. pastoris* DNA topoisomerase I 和重组 hTopo I) 活性必然导致酵母细胞代谢的改变, 细胞适应这种状态后才能开始大量表达它们, 而此时培养基中营养所剩不多。因此, 通过向发酵液中逐步添加营养液, 可将 SMD-hTopoI 的酶表达量明显提高。

这样, 通过发酵条件的优化, 作者得到了一个综合的表达条件: 使用 BMMY (pH 7.25), 于 20℃, 每隔 24h 补加 0.5% 的甲醇和 3% 的营养液, SMD-hTopoI 诱导 72h 时表达的酶量可达到最高。

REFERENCES (参考文献)

[1] Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 430 - 40

- [2] Nitiss JL. Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1400**: 63 - 81
- [3] Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 369 - 413
- [4] Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs, *Annu Rev Biochem*, 1989, **58**: 351 - 375
- [5] Pommier Y. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors, *Biochimie*, 1998, **80**: 255 - 270
- [6] D'Arpa P, Machlin PS, Ratrie H *et al.* cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 2543 - 2547
- [7] Juan CC, Hwang JL, Liu AA *et al.* Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12 - 13.2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 8910 - 8913
- [8] Bronstein IB, Wynne-Jones A, Sukhanova A *et al.* Expression, purification and DNA-cleavage activity of recombinant 68-kD human topoisomerase I-target for antitumor drugs, *Anticancer Res*. 1999, **19**: 317 - 327
- [9] Mo YY, Wang P, Beck WT. Functional expression of human DNA topoisomerase I and its subcellular localization in HeLa cells, *Exp Cell Res*. 2000, **256**: 480 - 490
- [10] Stewart L, Ireton GC, Parker LH *et al.* Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I, *J Biol Chem*, 1996, **271**: 7593 - 7601
- [11] Bjornsti MA, Benedetti P, Viglianti GA *et al.* Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin, *Cancer Res*, 1989, **49**: 6318 - 6323
- [12] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *P. pastoris*. *Biotechnology*, 1993, **11**: 905 - 909
- [13] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kroop KE *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *Gene*, 1997, **190**: 55 - 62
- [14] Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB *et al.* Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991, **105**(2): 205 - 212
- [15] Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 14873 - 14878
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [17] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed, John Wiley & Sons, Inc., 1995
- [18] Van Den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, Winther JR. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, 1996, **12**: 1 - 16
- [19] Alsner J, Svejstrup JQ, Kjeldsen E *et al.* Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for *in vivo* function. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 12408 - 12411
- [20] Mo YY, Wang C, Beck WT. A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I, *J Biol Chem*, 2000, **275**: 41107 - 41113

Optimization of the Expression of Human DNA Topoisomerase I in *Pichia pastoris*

YANG Guo-Wu^{1 2} YUAN Bao-Hong¹ Ho Kwok-Ping⁴ DAI Xin¹ LIN Yong-Cheng³ ZHOU Shi-Ning^{1 *}

¹(Department of Biochemistry , School of Life Sciences , ZhongShan (Sun Yat-sen) University , GuangZhou 510275 , China)

²(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection , Shenzhen 518055 , China)

³(School of Chemistry and Chemical Engineering , Zhongshan (Sun Yat-sen) University , China)

⁴(Department of Applied Biology and Chemical Technology , Hongkong Polytechnic University , Hongkong , China)

Abstract Human DNA Topoisomerase I (hTopo I) has been identified to be an efficient target of many effective antitumor drugs. Natural hTopo I is not convenient to be used in screening because of its low concentration in cells. In order to fast screen new anticancer drugs targeting at hTopo I from natural compounds *in vitro*, hTopo I gene open reading frame (ORF) has been successfully cloned and overexpressed in *Pichia pastoris*. Total RNA extracted from Hela cells was reversely transcribed to synthesize cDNA with the hTopo I specific antisense primer and the hTopo I ORF was synthesized by PCR. After digestion with *EcoR* I and *Kpn* I, the synthesized fragment was inserted into pPICZ α , gave rise to pPICZ α -hTopoI. After digestion with *Sac* I, the lined pPICZ α -hTopoI was transformed into *Pichia pastoris* strains (KM71, X33 and SMD1168) by electroporation and integrated into their genome. After screened on YPDS plates (containing 1000ug/mL zeocin), the high-copy recombinant strains (KM-hTopoI, X33-hTopoI and SMD-hTopoI) could overexpress recombinant hTopo I, which was fused to the α -factor secretion signal and could be secreted into the supernatant in the culture. α -factor could be cleaved from the expressed protein during secretion. A higher activity amount of the enzyme was secreted by the particular strain SMD-hTopoI because of its absence of proteinase A than by other strains which possess proteinase A activity. After optimizing the fermentation conditions, a relatively higher enzyme activity in the culture supernatant could be obtained when SMD-hTopoI was induced in BMMY (pH7.25) at 20°C, with addition of 0.5% (V/V) methanol and 3% (V/V) nutrient liquid every 24h. The enzyme activity reached 43 000 u/mL, the yield reached 11 mg/L, achieving approximate 10% of total protein in the culture supernatant. SDS-PAGE and Western blot analyses showed that the mass of the recombinant hTopo I was 91kD with no glycosylation.

Key words human DNA topoisomerase I, secretion expression, optimization, *Pichia pastoris*

Received : 08-07-2003

This work was supported by a grant of the National High Technology Research and Development Plan of China (2001AA620401), and the Natural Science Foundation of Guangdong, China (011124).

* Corresponding author. Tel 86-20-84110238 ;Fax 86-20-84036215 ;E-mail *sszl@zsu.edu.cn