

Hepcidin 的基因克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达 Cloning and Secretion Expression of Hepcidin in *Pichia pastoris*

张 卉,袁其朋

ZHANG Hui and YUAN Qi-Peng

北京化工大学北京生物加工过程重点实验室 北京 100029

Key Laboratory of Bioprocess of Beijing, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

摘 要 根据已知 hepcidin 氨基酸序列,参照毕赤氏巴斯德酵母(*Pichia pastoris*)密码子偏好性,设计合成了 hepcidin 目的基因。所合成的 hepcidin 基因全长 96bp,其 5' 端引入 KEX2 基因产物(*Kex2*)的特异性识别位点序列,以保证表达产物具有天然 N 端。通过基因重组的方法将 hepcidin 基因克隆到 pPicZαA 载体中,构建了分泌型重组酵母表达载体 pPICZαA-Hepc,经电转至毕赤酵母 GS115 中表达。使用浓度高达 1500 μg/mL 的 Zeocin 筛选得到高拷贝插入 GS115 菌株,经摇瓶发酵和甲醇诱导,上清液有明显的 hepcidin 表达,表达量达到 100 mg/L。初步抗菌特性研究表明,该表达产物对枯草芽孢杆菌有明显的抑菌作用,而对大肠杆菌抑菌效果不明显。

关键词 Hepcidin 毕赤酵母,分泌表达,抗菌活性

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0381-05

Abstract Hepcidin is a liver-expressed, small cysteine rich peptide that acts as a regulator of systemic iron homeostasis. In this work, according to the partiality codon of *Pichia pastoris*, a DNA fragment containing the coding sequence of hepcidin was designed and synthesized, especially a *Kex2* signal cleavage site was fused in 5' end of the antibacterial peptide genes. Then the modified hepcidin gene was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector plasmid pPICZα-A. After electroporation of the resulting vector, pPICZα-A-Hepc, into the yeast host strain GS115, transformants with high copy inserts were selected by 1500mg/L Zeocin selection. Under the control of the promoter AOX1 (alcohol oxidase 1), recombinant hepcidin secreted from *P. pastoris* had a molecular weight of 2.7kD. After optimization of the flask-shaking culture fermentation, the yield of hepcidin reached 100mg/L in the clarified broth. Through antibacterial assay, the recombinant hepcidin displayed obvious antibacterial activity against *Bacillus subtilis*. But it could not distinctly inhibit the growth of *E. coli* BL21(DE3).

Key words hepcidin, *Pichia pastoris*, secretion expression, antibacterial activity

Hepcidin 是一种由肝脏特异表达的富含半胱氨酸的新型抗菌肽。2000 年, Krause 等首先从人血液中分离纯化得到了由 25 个氨基酸组成的 hepcidin 小肽^[1]。2001 年, Park 等在寻找人尿液中阳离子抗菌肽的研究过程中也分离到这一小肽^[2]。与许多富

含半胱氨酸的抗菌肽类似, hepcidin 同样具有显著的抗菌作用^[1,2]。近几年的研究证实 hepcidin 对于调节机体铁离子代谢平衡发挥着重要的作用, 它可抑制肠道对铁的吸收以及单核巨噬细胞系统对铁的释放, 因此, 任何病理生理状态对体内 hepcidin 水平的

Received: November 2, 2006; Accepted: January 9, 2007.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 20576010).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64437610; E-mail: yuqnp@mail.buct.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20576010)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

改变都将导致机体铁水平的变化^[3]。此外,天然免疫、慢性感染、炎症、缺氧等状况也与 hepcidin 有着密切的关系^[4]。

随着对 hepcidin 生物学功能的深入了解,越来越多的科研工作者发现 hepcidin 基因的异常表达可能与多种疾病有关。通过大量的临床观察发现,肝脏 hepcidin 过度表达可能是许多贫血包括慢性病贫血、炎症性贫血的根本原因^[5,6]。此外,任何原因引起的肝脏 hepcidin 合成或分泌障碍,则可能是原发性和继发性铁过负荷类疾病的起因^[5],通过给予外源性 hepcidin 很有可能缓解或有效地治疗这一类疾病。因此,hepcidin 可能成为一种治疗机体铁代谢相关性疾病重要靶分子,而且其本身对于防止遗传性血色病等铁负荷增多症具有重要的医疗应用价值。虽然 hepcidin 可从尿液中分离获得,但尿液中 hepcidin 质量浓度仅为 10~30 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[2],因此,采用基因工程方法制备 hepcidin 将具有很大优势。鉴于酵母表达具有高表达、高稳定、高分泌的优点,所以本实验采用酵母表达系统,设计并构建了人 hepcidin 的分泌型表达载体,在毕赤巴斯德酵母 GS115 中进行了表达,并通过琼脂孔穴扩散法证实了其体外抗菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株:大肠杆菌 Top10F',毕赤酵母菌

```

Lys Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys
CTCGAG AAA AGA GAT ACT CAC TTC CCA ATT TGT ATT TTC TGT TGT
          ↑
Xho I       Kex2 signal cleavage
Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
GGT TGT TGT CAC AGA TCT AAG TGT GGT ATG TGT TGT AAG ACT
TGA TCTAGA
终止密码 Xba I
  
```

株 GS115(*His⁻*, *Mut⁺*),克隆载体质体 pMD18T-simple, pPICZ α A 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶与主要试剂:各种限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司,Zeocin 购自 Invitrogen 公司,DNA 提取和凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN BIOTECH 公司。肽分子量标准蛋白购自 Amersham Biosciences。其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 DNA 序列片段的设计与合成人 Hepcidin 氨基酸序列:DTDFPICIFCCGCGCHRSKCGMCCKT。首先根据 hepcidin 氨基酸序列和毕赤酵母密码子偏好性^[7],在不改变氨基酸序列的条件下,设计出适合于在毕赤酵母中表达的 hepcidin DNA 编码序列,为了构建 hepcidin 在毕赤酵母中的分泌蛋白表达载体,使分泌表达的目的蛋白的 N 端和 C 端能够与天然 hepcidin 小肽完全一致,在目的基因编码序列的 5' 端引入 KEX2 基因产物(*Kex2*)的特异性识别位点序列,并在 hepcidin 编码序列的 3' 端设计有终止密码子,最后在序列的两端分别引入 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点。所设计的 DNA 片段由北京三博远志生物工程公司合成,合成目的片段被克隆于 pMD18T-simple 载体上。

设计 DNA 序列如下:

表 1 Hepcidin 天然与设计合成 DNA 序列比较

Table 1 Comparison of native and synthesized hepcidin DNA sequence

N	GAC	ACC	CAC	TTC	CCC	ATC	TGC	ATT	TTC	TGC	TGC	GGC	TGC
S	GAT	ACT	CAC	TTC	CCA	ATT	TGT	ATT	TTC	TGT	TGT	GGT	TGT
	<i>Asp</i>	<i>Thr</i>	<i>His</i>	<i>Phe</i>	<i>Pro</i>	<i>Ile</i>	<i>Cys</i>	<i>Ile</i>	<i>Phe</i>	<i>Cys</i>	<i>Cys</i>	<i>Gly</i>	<i>Cys</i>
N	TGT	CAT	CGA	TCA	AAG	TGT	GGG	ATG	TGC	TGC	AAG	ACG	
S	TGT	CAC	AGA	TCT	AAG	TGT	GGT	ATG	TGT	TGT	AAG	ACT	
	<i>Cys</i>	<i>His</i>	<i>Arg</i>	<i>Ser</i>	<i>Lys</i>	<i>Cys</i>	<i>Gly</i>	<i>Met</i>	<i>Cys</i>	<i>Cys</i>	<i>Lys</i>	<i>Thr</i>	

N: native; S: synthesized.

1.2.2 表达载体 pPICZ α A-Hepc 的构建:根据 pMD18T-simple 载体以及目的基因序列,通过计算机辅助设计并合成一对扩增引物,从 pMD18T-simple-

Hepc 中 PCR 扩增出含有 hepcidin 序列的 DNA 片段。PCR 产物及 pPICZ α A 质粒分别用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后经琼脂糖电泳纯化回收所得目的片段。将载

体片段与目的片段在体外连接,转化感受态细胞 *E. coli* Top10F', 在含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的低盐固体 LB 培养基上选择转化子,重组质粒 pPICZ α A-Hepc 经 *Xho* I 酶切电泳鉴定阳性克隆, DNA 测序验证序列的正确性。

1.2.3 重组 pPICZ α A-Hepc 质粒转化毕赤酵母 GS115 及高表达转化菌的筛选 含有 hecpudin 基因的重组质粒经 *Sac* I 线性化后,经 Bio-Rad 电转仪电击转化 GS115。电击条件:电压 2000V,电容 25 μF ,电阻 200 Ω 。酵母感受态的制备参照文献 [8]。在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的固体 YPDS 培养基上筛选转化克隆。高表达菌株使用 500、1000、1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 浓度梯度筛选。

1.2.4 重组转化酵母的 PCR 鉴定 挑取转化酵母单菌落于 3mL YEPD 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 250~300r/min 振荡培养 16~18h,12000r/min,离心 10min,收集菌体,抽提转化酵母的总 DNA。然后以总 DNA 为模板,以 primer1 5' TGCTGCTAAAGAAGAAGGGG 3' 和 primer2: 5' GCAAATGGCATTCTGACATC C 3' 为上下游引物进行 PCR 扩增。

1.2.5 重组 *P. pastoris* 菌在摇瓶中的诱导表达 挑取重组 *P. pastoris* 接种到 BMGY 中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、250r/min 振荡培养约 18 h 至 OD_{600} 达到 2~6,室温 4000r/min 离心 5min,将菌体用 BMMY(含 1% Casaminoacids)重悬至 OD_{600} 约为 1.0,28 $^{\circ}\text{C}$ 、250r/min 振荡培养,进行甲醇诱导表达,每隔 12h 取样,同时补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%。所取样液经 10000g 离心 2~3min 将上清移置新的灭菌离心管中,于液氮中保存。

1.2.6 重组表达 hecpudin 的 Tricine-SDS-PAGE 重组 hecpudin 的分子量只有 2.7kD,理论上分子量低于 15kD 的多肽在常规 Tris-甘氨酸电泳系统中难以得到理想的电泳分辨率^[7]。因此,使用 Tricine(三羟甲基氨基甘氨酸)代替甘氨酸作为终止离子,并增加了甘油,使重组 hecpudin 小肽得到了较好的分辨率及带型。

1.2.7 重组 hecpudin 生物活性的初步测定 重组 hecpudin 抑菌活性测定采用琼脂孔穴扩散法^[9]:将处于对数生长期的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌悬浮液 15 μL 与 55 $^{\circ}\text{C}$ 的 LB 固体培养基 25mL 混匀后铺平板,等其凝固后,用经过高压灭菌过的打孔器(直径 5mm)打孔,滴加 50 μL 待测表达上清样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,以同体积的 pPICZ α -A 空载体转化酵母表达蛋白为阴性对照。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建和鉴定

以 pMD18T-simple-Hepc 质粒为模板进行 PCR 反应,扩增出含有 hecpudin 序列的 DNA 片段。PCR 产物经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后与 pPICZ α A 连接,经电转化转入 *E. coli* Top10F' 保存。获得重组质粒 pPICZ α A-Hepc 经 PCR 与酶切分析,得知目的基因已插入质粒载体中,经 DNA 序列分析,得知插入基因序列与设计序列完全一致,测序结果如下: TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGT TATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTA AAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGATACTC ACTTCCCAATTTGTATTTTCTGTGTGGTGTGTTG TCACAGATCTAAGTGTGGTATGTGTTGTAAGACT TGATCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGA ATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATGAGTTT GTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTC。其中黑体部分为目的基因序列,下划线部分为酶切位点。

2.2 重组 pPICZ α A-Hepc 质粒的转化及高表达转化菌的筛选

用于筛选酵母表达菌株的标记 Zeocin 对细菌、真菌、植物细胞、哺乳动物细胞都具有广泛的毒性。重组质粒经 *Sac* I 线性化后,经 Bio-Rad 电转仪电击转化毕赤酵母宿主菌 GS115,转化后的菌液涂布于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的固体 YPDS 培养基上筛选转化克隆。对单拷贝插入的酵母菌工作浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,使用 Zeocin 500、1000、1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度筛选高拷贝插入的酵母菌,最终在 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下得到若干个单菌落,逐一进行表达研究。

2.3 重组转化酵母的 PCR 鉴定(图 1)

抽提转化酵母的总 DNA,然后以总 DNA 为模

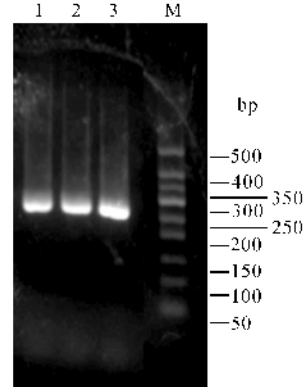


图 1 重组质粒的 PCR 鉴定电泳图

Fig. 1 The PCR results of recombinant plasmid

板以 primer1、primer2 分别为上下游引物进行 PCR 扩增,PCR 产物应为 285bp,结果如图 1。PCR 产物进行 DNA 测序与设计序列完全一致,表明 hepcidin 基因序列已经整合到酵母 GS115 基因组中。

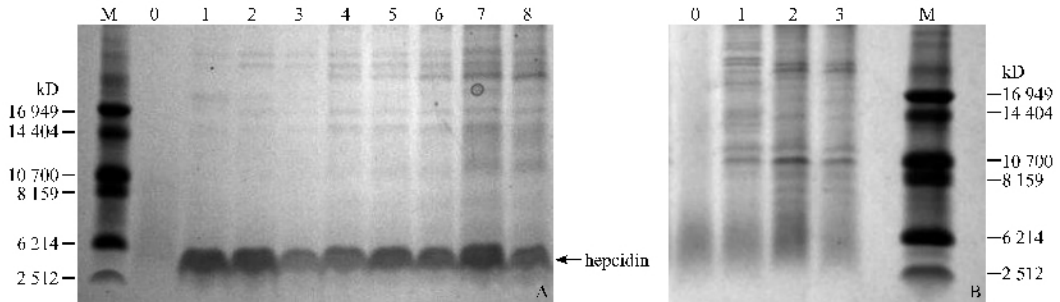


图 2 重组 hepcidin(A)和 *Pichia pastoris* GS115/pICZ α -A 上清(B)的 Tricine-SDS-PAGE
Fig. 2 The Tricine-SDS-PAGE of recombinant hepcidin(A) and *Pichia pastoris* GS115/pICZ α -A(B)

A. M: molecular weight markers; 0: uninduced clarified broth;
1~8: cells after 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96h induction respectively.
B. M: molecular weight markers; 0: uninduced clarified broth;
1~3: cells after 12, 24, 48h induction respectively.

处出现条带(图 2A)与天然 hepcidin 分子量大小一致。

2.5 生物活性的检测

以琼脂糖扩散法测定重组 hepcidin 对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抗菌效果,结果显示重组 hepcidin

2.4 Hepcidin 的 Tricine-SDS-PAGE 结果

在 Tris-Tricine 电泳系统中,重组表达 hepcidin 得到较理想的电泳分辨率和带型(图 2A)。Tricine-SDS-PAGE 结果显示,经甲醇诱导表达上清在 2.7kD

对枯草芽孢杆菌有明显的抑菌作用(图 3),而对大肠杆菌无抗菌效果。测定的重组 hepcidin 抗菌能力与 Krause 等报道的结果一致^[1],表明制备的重组 hepcidin 具有生物活性。

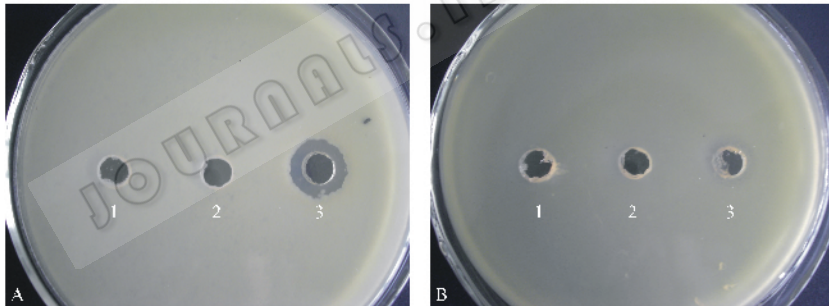


图 3 重组 hepcidin 的抑菌活性测定

Fig. 3 Detection of the antibacterial activity of recombinant hepcidin

A: against *Bacillus subtilis*, B: against *E. coli* BL21(DE3).

1: the control of supernatant of *Pichia pastoris* GS115/pICZ α -A; 2: negative contrast of supernatant of *Pichia pastoris* GS115;
3: supernatant of *Pichia pastoris* GS115/pICZ α -A-Hep.

3 讨论

由于天然 hepcidin 为一种激素类多肽,人体正常生理状态下体内含量很低,如果通过从人尿液或是血液中分离提取,不但成本高且获取困难,若通过化学合成法,由于 hepcidin 小肽分子具有 4 对二硫键,使得合成比较困难,合成后的收率低、不易纯化且价格相当昂贵,同样无法满足对其生物学功能的进一步研究和临床应用的需要。鉴于 hepcidin 基因较小,故采用人工合成的方法来获得目的基因,然后再通过基因工程方法构建基因重组菌进行微生物发酵来大量生产 hepcidin,可以有效解决上述问题,无

论是对其研究还是医学及药用价值开发更具有实际意义。

有关 hepcidin 及其生理学作用的基础性研究国内外已有了很大的进展,但很少有利用基因工程方法生产 hepcidin 的研究性报道。到目前为止,只有张怀^[9]、Gerardi^[10]等人采用大肠杆菌进行了融合表达。鉴于原核表达系统存在的一些弊端以及 hepcidin 自身的特点和用途,如果采用真核表达系统且将产物分泌到胞外将会是一种更为理想的方式。因此本文采用了酵母表达载体 *Pichia pastoris* 成功地分泌表达了人铁调节激素 hepcidin。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)由于兼有原核

细胞良好的可操作性和真核系统的翻译后加工、修饰的特点,且发酵条件简单,表达水平高,适合高密度培养,为工业化和纯化提供极大的方便^[1]。为了提高 hepcidin 在毕赤酵母中的表达效率,我们根据人 hepcidin 的氨基酸序列,通过选用毕赤酵母偏好密码子,天然 N 端设计等改造措施进行了基因全序列人工合成,然后构建并获得了 hepcidin 在酵母中的高效分泌表达菌株。所表达的 hepcidin 为含有 25 个氨基酸的小肽,分子量大小为 2.7 kD 与理论值一致,这对后续大批量生产 hepcidin 用于动物实验以及相关药物开发方面奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Krause A, Neitz S, Magert HJ, *et al.* LEAP-1, a novel highly disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*, 2000, **480** :147 - 150.
- [2] Park CH, Valore EV, Waring AJ, *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Biol Chem*, 2001, **276** :7806 - 7810.
- [3] Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, *et al.* Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2002, **29** (3) 327 - 335.

- [4] Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, *et al.* The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *Biol Chem*, 2002, **277** (40) 376597 - 376603.
- [5] Vyoral D, Petr' ak J. Hepcidin : A direct link between iron metabolism and immunity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, **37** :1768 - 1773.
- [6] Sun JJ(孙坚军). Hepcidin and inflammation&anemia. *Medical Recapitulate* (医学综述) 2005, **11** (3) 216 - 218.
- [7] Zhao X(赵翔), Huo KK(霍克克), Li YY(李育阳). Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese J of Biotechnology*(生物工程学报) 2000, **16** (3) 308 - 311.
- [8] pPICZαA, B and C. Catalog no. V195220 of Invitrogen. Carlsbad, California : Invitrogen 2004.
- [9] Zhang H, Yuan QP, Zhu YP, *et al.* Expression and preparation of recombinant hepcidin in *Escherichia coli*. *Protein Expression & Purification*, 2005, **41** :409 - 416.
- [10] Gerardia G, Biasiotto G, Zanellaa I, *et al.* Recombinant human hepcidin expressed in *Escherichia coli* isolates as an iron containing protein. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2005, **35** :177 - 181.
- [11] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 1993, **11** (8) 905 - 910.