

t-PA cDNA 的克隆及其在毕赤酵母中的表达

涂宣林 朱运松 宋后燕

(上海医科大学分子遗传学研究室 上海 200032)

摘 要 应用 PCR 方法,在 t-PA cDNA 5'端引入合适的限制酶位点和酵母分泌信号肽,与酵母表达载体 pPIC9 重组,构建表达质粒 pSTE-Y,利用 LiCl 转化法转化酵母菌 YS108,在 MM 和 MD 平板上筛选表型,PCR 筛选 t-PA cDNA 与酵母染色体整合而形成的阳性克隆,阳性克隆经甲醇诱导表达后,用 SDS-PAGE 证明表达产物的分子量为 6kDa 左右,用酪蛋白板溶圈法测定 t-PA 的活性。Mut^s 表型菌表达产物活性最高为 2 500IU/ml, Western blot 证实表达产物具有天然 t-PA 分子的免疫原性。

关键词 t-PA, 酵母表达

学科分类号 Q789

人组织型纤溶酶原激活剂(Tissue type plasminogen activator, t-PA)特异地激活纤溶酶原转变为纤溶酶,后者能溶解血栓中的纤维蛋白,从而使血管再通,因此 t-PA 能够发挥高效、特异的溶栓作用^[1,2]。t-PA 为治疗急性心肌梗死、肺梗塞的首选药物,但价格昂贵,很难在国内推广使用。由于 t-PA 本身的结构复杂,有较多的二硫键和糖基化位点,原核表达系统不能获得有活性的 rt-PA。哺乳类细胞表达系统虽能表达有活性 rt-PA,但表达效率较低,生产工艺繁琐,周期长,成本高。此外,大肠杆菌细胞壁的脂多糖为强有力的内毒素原,而哺乳类细胞中可能存在的原癌基因或病毒 DNA,使产品的纯化和检测变得更加复杂。

酵母表达系统尤其是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)早已广泛应用^[3]。以 *S. cerevisiae* 为代表的常规酵母表达系统虽已积累大量经验,但也存在缺陷,如生长速度慢,密度不高,外源蛋白的表达,翻译后加工和分泌不够理想。近年来迅速崛起的非常规酵母表达系统部分克服了上述缺点,能高效表达外源蛋白,如 *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, 其中以 *Pichia pastoris* 表达系统最为成功。本室在 t-PA cDNA 哺乳类细胞表达质粒的基础上,对 t-PA cDNA 进行重新改建,与分泌型酵母表达质粒重组,转化甲醇营养型酵母菌,用甲醇诱导表达,经 Western blot,酪蛋白溶圈法测定活性和 SDS-PAGE 测定分子量证实表达产物为 rt-PA。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种与质粒: JM109 大肠杆菌、质粒 pUC18 为本室冻存菌; YS108 酵母菌、酵母表达

收稿日期:1997-06-23, 修回日期:1998-03-02。

载体 pPIC9, 质粒 t-PA/pcDNA3 为 t-PA cDNA 的哺乳类细胞表达质粒, 由本室构建^[4]。

1.1.2 试剂与仪器: 限制酶购自 BM 公司、BRL 公司和 Promega 公司, PCR 试剂盒购自上海 Sangon 生物工程公司, 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、明胶和 PMSF 等购自 Sigma 公司, 硝酸纤维素膜购自 BRL 公司, 兔抗人 t-PA 抗血清由本室制备, 鼠抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司(上海)。蛋白半干电转移仪购自 Bio-Rad 公司。YNB 购自 DIFCO 公司, QIAGEN Plasmid Midi Kit 购自 QIAGEN Inc. (Germany)。

1.1.3 寡聚核苷酸: 由中国科学院上海细胞所合成。

引物 1: 5'端 TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT AGG TCT TAC CAA GTG ATC
AGC 3'端

引物 2: 5'端 CAT GGA ATT CCA CGG GAG GCA 3'端

1.2 方法

1.2.1 聚合酶链反应(PCR): 参照试剂盒说明书操作^[5]。

1.2.2 SDS-PAGE^[5]: 浓缩胶 5%, 分离胶 10%, 银染色。

1.2.3 生物活性测定: 酪蛋白溶圈法^[6]。酪蛋白板的制备: 1.0% 琼脂糖, 1.5% 脱脂牛奶, 25 mg/ml 牛纤溶酶原。直接把培液上清加入打好的孔内, 观察溶圈大小并与标准 t-PA 的溶圈大小相比较, 测定表达产物的活性。

1.2.4 Western blot^[5]: 10% SDS-PAGE, 电泳结束后, 利用半干转移仪将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 2% 明胶为封闭试剂, 兔抗人 t-PA 抗血清为一抗, HRP 标记的鼠抗兔多抗为二抗, 检测表达产物的免疫原性。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 t-PA cDNA 片段

由于 t-PA 基因和酵母表达载体的多克隆位点区的限制酶较为特殊, t-PA cDNA 的克隆分二步进行, 首先利用 PCR 获得 t-PA cDNA 5'端基因, 而 3'端基因用部分酶解的方法获得(见 2.2)。为扩增 t-PA cDNA 5'端基因, 即 t-PA5'端至第一个 EcoR I 基因并去除 5'端哺乳类细胞的信号肽顺序, 我们设计 2 个 PCR 引物, 其 5'端和 3'端分别含 Xho I 和 EcoR I 的酶解位点, 以便与载体 pPIC9 相连。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。大约在 0.6kb 有一条带, 与预计长度(0.652 kb)相符。剩余的 PCR 产物经 Klenow 补平, Xho I 和 EcoR I 双酶解后用琼脂糖凝胶电泳回收。

2.2 t-PA/pcDNA3 3'端的 EcoR I 部分酶解

t-PA 基因本身含有两个 EcoR I 酶切位点, 为保证 t-PA 基因近 3'端 EcoR I 的完整性, 应用 EcoR I 部分酶解得到 t-PA 3'端基因。t-PA/pcDNA3 经限制酶 Hind III 酶解, Klenow 补平, 再进行 EcoR I 部分酶解, 15 μ g 线性化 t-PA/pcDNA3 用 5u EcoR I 酶解, 酶解时间分别为: 0.5、1、2、4、6、8、16 min, 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果表明: 8 min 时目的条带(0.972 kb)最明显。按相同条件部分酶解并回收 0.972 kb 的条带。正丁醇, 酚/氯仿抽提纯化, 乙醇沉淀。

2.3 表达载体 pSTE-Y 的构建

2.3.1 t-PA5R/pPIC9 的构建: 将载体 pPIC9 用限制酶 Xho I 和 EcoR I 双酶解, 酶解完

全,回收线性化载体与已处理的 PCR 产物连接,转化大肠杆菌 JM109,经抗生素抗性筛选,快速抽提质粒,酶解鉴定,阳性克隆命名为 t-PA5R/pPIC9 (图 1)。

2.3.2 t-PA5R/pPIC9 的酶解回收:挑取上述阳性克隆菌至 50 ml LBA 中 37℃ 振荡培养,抽提质粒 t-PA5R/pPIC9,经 Not I 酶解, Klenow 补平,再经 EcoR I 酶解后用琼脂糖凝胶电泳回收。

2.3.3 pSTE-Y 的构建:已用 Not I 和 EcoR I 处理 t-PA5R/

pPIC9(接 2.3.2)与部分酶解产物 EcoR I-Hind III(补平)(接 2.2)相连,转化大肠杆菌 JM109,经抗性筛选并酶解鉴定,结果如图 2。Sca I : 2.6, 7.6kb; Sac I /Xho I : 1.0, 1.3, 7.3kb; Sma I /Xho I : 1.5, 8.1kb; Sal I : 9.6 kb; EcoR I : 0.5, 9.1 kb; Bgl II : 2.4, 7.2kb。

2.4 pSTE-Y 的转化及阳性克隆的筛选

2 μ g pSTE-Y 质粒用 Bgl II 完全酶解, LiCl 方法转化酵母宿主菌 YS108, 转化子有 44 个, 转化效率为 22/ μ g 质粒, 经 MD[1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素, 1% 葡萄糖]和 MM [1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素, 1% 葡萄糖]和 MM[1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素, 0.5% 甲醇]平板, 筛选与基因型相符的生长表型, 凡 t-PA cDNA 与染色体 DNA 重组的酵母菌, 因醇氧化酶基因被 Bgl II 酶解破坏, 因而在 MM 平板上生长缓慢, 而在 MD 平板上则正常生长。未重组的酵母菌在 MM 和 MD 平板上均能保持相同的生长速度。观察酵母菌在 MM 和 MD 平板上的生长速度, 挑选在 MM 平板上生长慢而 MD 平板上生长快的酵母菌即表型正确的克隆, 抽提染色体 DNA, 以此染色体 DNA 为模板, 利用合成的引物扩增 t-PA cDNA 5'端基因片段, 阳性结果表明 t-PA 基因与酵母染色体同源重组, 阳性率为 1/12。如图 3。

2.5 t-PA 的诱导表达

挑取上述阳性克隆接种于 100 ml 低营养培养液 BMG[1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素, 1% 甘油]中 30℃ 快速振荡(250 r/min), 至光密度 OD₆₀₀ = 4.0 时, 离心弃除 BMG 培养液, 加入 1/5 体积的 MM20ml 作浓缩培养。每天补加体积百分数为 0.5% 的甲醇。甲醇

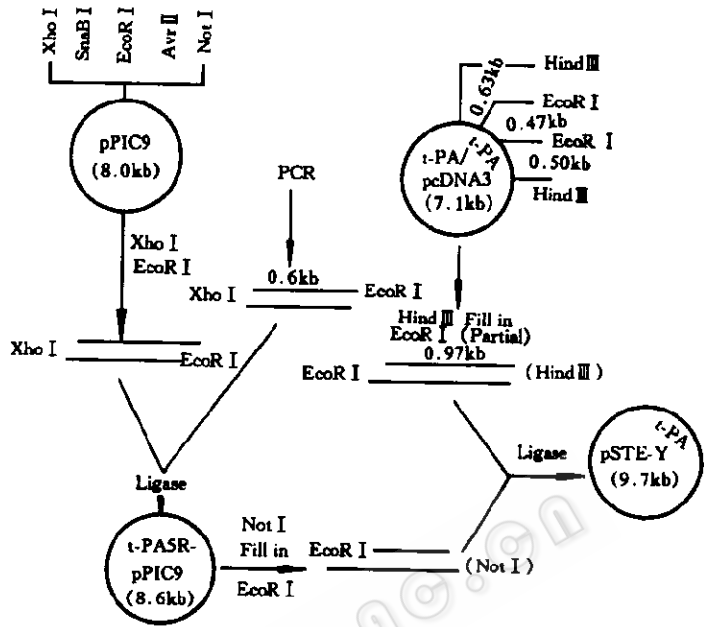


图 1 t-PA cDNA 酵母表达质粒的构建

Fig. 1 The construction of t-PA cDNA expression in *P. pastoris*

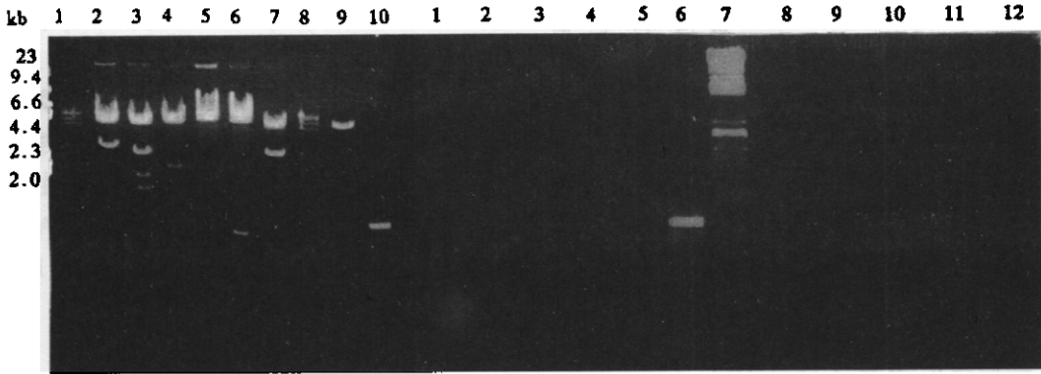


图 2 pSTE-Y 的限制酶谱分析

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of pSTE-Y

1.8: λ DNA/Hind III; 2. Sac I; 2.6 kb, 7.6kb; 3. Sac I / Xho I; 1.0 kb, 1.3kb, 7.3kb; 4. Sma I / Xho I; 1.5kb, 8.1kb; 5. Sal I; 9.6kb; 6. EcoR I; 0.5kb, 9.1kb; 7. Bgl II; 2.4kb, 7.2kb; 9. t-PA5R/pPIC9/EcoR I; 9.1kb; 10. t-PA fragment(EcoR I -EcoR I); 0.5kb

图 3 PCR 鉴定 t-PA cDNA 与染色体 DNA 的重组

Fig. 3 Analysis of the integration of

t-PA cDNA to the chromosome DNA

1-6. The different transformants
8-12. The different transformants
7. λ DNA/Hind III + EcoR I

诱导后培养 5 d, 按如下时间分别取样(h): 0, 12, 24, 36, 48, 60, 84, 106, 130。取样 1 ml, 离心弃沉淀, 上清置 -20°C 保存。无外源基因的空白载体 pPIC9 转入宿主菌 YS108 作为阴性对照, 同样条件诱导表达。

2.6 表达产物的鉴定

2.6.1 SDS-PAGE 鉴定: 浓缩胶 5%, 分离胶 10%。直接取培养液上清与 $2\times$ 上样缓冲液等体积混合后取 $40\mu\text{l}$ 上样, 作 SDS-PAGE 电泳, 银盐染色, 结果显示在 60kDa 左右出现一条表达条带, 而空白对照无此条带如图 4。在加 PMSF 作为蛋白酶抑制剂的蛋白表达中, 蛋白条带多, 但表达的蛋白浓度相似; 甲醇诱导后作 SDS-PAGE, 比较不同时间表达产物 rt-PA 条带, 表明诱导后第 3 天条带最明显。

2.6.2 活性测定: 取诱导后第 3 天培养液上清 $20\mu\text{l}$ 直接点在酪蛋白板上的孔内, 37°C , 湿盒过夜, 通过与标准 t-PA 的溶圈大小作对比, 测定 rt-PA 的生物活性, 结果表明 rt-PA 具有溶栓活性且在诱导表达后第 3 天为最高, 其中的 1 株酵母菌表达 rt-PA 的最高活性达到 2500 IU/ml 培养液, 如图 5。

2.6.3 免疫原性测定: 诱导后第 3 天的培养液上清上样, 10% SDS-PAGE, 半干转移至硝酸纤维

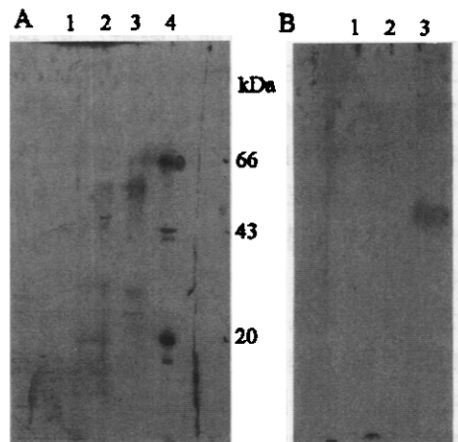


图 4 培养液上清 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析

Fig. 4 SDS-PAGE (A) and Western Blot analysis (B) of rt-PA expressed in *Pichia pastoris*

1. Negative control; 2 and 3. rt-PA expressed in *Pichia pastoris*; 4. MW marker

膜,以 2% 脱脂牛奶作封闭试剂,封闭 90 min 后加入抗人 t-PA 抗血清,4℃ 过夜,洗涤处理,加入鼠抗兔 IgG 的酶标抗体。最后在 DAB、H₂O₂ 下显色,结果表明:在表达条带处出现了能被抗 t-PA 多抗所识别的蛋白,即表达条带具有 t-PA 的免疫原性(图 4)。

3 讨 论

由于酵母菌不能充分识别和利用哺乳类细胞分泌信号肽,因此我们用酵母 α 因子前导肽作为分泌信号而取代了 t-PA

的哺乳类细胞信号肽,在设计 PCR 引物时,去除了 5' 端信号肽,直接从结构基因开始,同时为避免 PCR 反应时,尽量减少碱基的错配,仅拷贝 5' 端 600bp,此外 t-PA 基因较为特殊,在 5' 端无合适的限制酶,故利用 EcoRI 部分酶解消化 t-PA/pcDNA3,表达质粒的构建分两步进行,但保证每个步骤的连接均有粘性末端(或 2 个不同末端或者 1 个为粘性末端,1 个为平端),使克隆效率大大提高。部分酶解务必注意酶量的使用量,质粒 DNA 的准确量,控制反应时间是成功与否的关键因素。

我们运用离心、洗涤等方法去除非甲醇性碳源,进而用甲醇诱导 t-PA 的表达。P_{AOX1} 属于强启动子,其控制下的外源基因能得到高效表达,*Pichia pastoris* 表达系统已成功地表达多种外源蛋白,如:人血清白蛋白、肿瘤坏死因子和人白细胞介素 2^[3,7,8]。研究中所使用的酵母表达系统属于分泌型表达载体系统,使下游纯化工作变得异常方便,特别适合于表达二硫键多的蛋白质。

Pichia pastoris 的糖化位点为 Asn-X-Ser/Thr,与哺乳类细胞的糖化位点一致,不过糖化方式不一致,其糖链较长,但糖的成分较为简单,无半乳糖和唾液酸。虽然哺乳动物细胞和酵母表达系统存在不同的糖化方式,但本文表达的 t-PA 活性仍然很高^[9],推测 t-PA 的活性主要与 t-PA 的多肽链相关。此外对 *Pichia pastoris* 表达系统而言,小规模摇瓶诱导表达的条件远没有优化,表达量也低许多,我们已通过发酵罐高密度发酵对表达条件进行了初步的摸索。

参 考 文 献

- 1 Rijken D C, Grenvel E. *J Bio Chem*, 1986, **261**:3098~3102
- 2 Holvet P, Lijnen H R, Colen D. *Eur J Biochem*, 1986, **158**:173~177
- 3 Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. *Yeast*, 1992, **8**:423~488
- 4 彭鲁英,涂宜林,宋后燕等. *上海医科大学学报*, 1996, **23**:163~165
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989
- 6 Loskutoff D J, Van Mourik J A, Erickson L A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**:2956~2960
- 7 Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R. *Biochemistry*, 1989, **28**:4117~4125

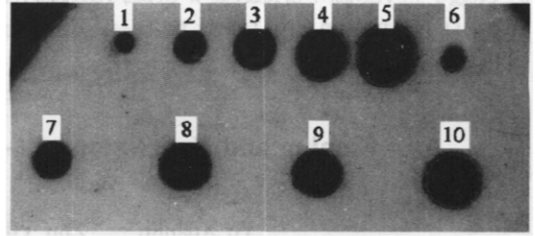


图 5 酪蛋白板溶圈法测定表达产物 rt-PA 的活性

Fig. 5 Milk agarose plate assay for rt-PA activity
1~5. Positive control(0, 12.5, 25, 50, 100IU/ml);
6. Negative control; 7~10. The different transformant

- 8 Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. *Bio/Technology*, 1993, **11**:905~910
- 9 Parekh R B, Dwek R A, Rudd P M. *Biochemistry*, 1989, **28**:7670~7679
- 10 Melnick L M, Turner B G, Puma P. *J Biol Chem*, 1990, **265**:801~807

Cloning and Expression of t-PA cDNA in *Pichia pastoris*

Tu Xuanlin Zhu Yunsong Song Houyan

(*Department of Molecular Genetics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*)

Abstract A suitable restriction enzyme site and yeast secretion peptide sequence was introduced into the 5' terminal of t-PA cDNA by PCR. Recombinant plasmid, pSTE-Y, was constructed by inserting t-PA cDNA fragment into yeast expression vector pPIC9. The expression plasmid, pSTE-Y, was transformed yeast YS108 with lithium chloride method. Phenotypes of transformants were screened in MM and MD plates. The positive transformants were proved with PCR and ensured the integration of t-PA cDNA into yeast chromosome DNA. Transformants containing t-PA cDNA were induced by methanol for the expression of rt-PA. SDS-PAGE showed that the molecular weight of the expression product was about 60 kDa. The biological activity of the expression product measured by fibrin plate was more than 2500 IU/ml. The immunogenicity of the rt-PA was confirmed by Western blot.

Key words t-PA, cloning, expression in yeast © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>