

# 人微小纤溶酶原基因在甲醇营养型酵母中的表达\*

宋 钢 官孝群 宋后燕

(上海医科大学基础医学院分子遗传研究室 上海 200032)

**摘 要** 用 PCR 方法扩增人微小纤溶酶原(Microplasminogen, mplg)cDNA, 与分泌型酵母表达载体 pHIL-D8 重组, 构成受醇氧化酶基因(AOX1)的启动子与转录终止区控制的酵母表达质粒, 然后转化 GS115 酵母菌, 经表型筛选、PCR 扩增筛选阳性克隆, 然后以甲醇诱导表达, mplg 分泌至培养液, 以酪蛋白-琼脂糖平板溶圈法、发色底物法检测, mplg 显示出纤溶活性。

**关键词** 微小纤溶酶原, 酵母表达

**分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0211-14

人纤溶酶原(Plasminogen, Plg)是人体纤溶系统的关键成分之一, 经纤溶酶原激活剂(Plasminogen activator, PA)激活后, 转变为纤溶酶(Plasmin, Plm), 不仅发挥纤溶作用, 溶解血栓, 而且参与体内一系列与蛋白质水解有关的生理、病理过程, 如炎症、组织重建、排卵、肿瘤细胞浸润与转移等<sup>[1-3]</sup>。因此, 对 Plg 结构和功能的深入研究不仅有助于人们了解 Plg 在纤溶系统中的重要地位, 也可为研制新型溶栓剂、抗炎、抗肿瘤等提供新思路。

天然的 Glu-Plg 是具有多个结构域的糖蛋白, 由 N 端多肽(NTP)、5 个同源的三角区(K<sub>1</sub>-K<sub>5</sub>)、丝氨酸酶活性中心区(SP)组成, 经 PA 激活后, 在 Arg<sub>560</sub>-Val<sub>561</sub> 特异性裂解, 形成由二硫键维系的活性双链纤溶酶。人 mplg 是 Plg530-790 位间的由 261 个氨基酸组成的肽链, 有 6 对二硫键, 不包括 Plg 的 NTP、K<sub>1</sub>-K<sub>5</sub> 区, 但保留了 SP 区, 被激活后, 形成 mplm, 具有 Plm 的纤溶活性<sup>[4]</sup>。由于 Plg 分子量很大且非常柔韧, 难以获得完整晶体, 故其精确结构的确定受到限制, 影响了结构和功能的深入研究, 而研究 Plg 和 PA 相互作用的困难更大<sup>[5]</sup>。mplg 分子量较小, 较易制备晶体, 且保留了 Plg 的活性区, 因此我们选择 mplg 为研究对象。

本文通过去除 PlgN 端多肽及 5 个三角区, 获得分子量仅 32kD 的 mplg。在进一步纯化后, 将用于 plg 激活机制、PA 结构和功能研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 JM109、pBS-S1 质粒为本室保存, 酵母菌 GS115、pHIL-D8 表达载体由陈因良教授提供, 寡聚核苷酸由 Sangon 生物工程公司合成, 核酸工具酶购自 BRL 和 Promega 公司, PCR 试剂盒购自 Sangon 生物工程公司, 序列分析试剂盒购自 USB 公司,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 103-13-01-02)。

收稿日期: 1997-12-29, 修回日期: 1998-12-10。

dATP 购自北京亚辉公司。兔抗人 Plg 抗血清、纤溶酶原活性测定试剂盒由本室自制。

### 1.2 PCR 扩增 mplg cDNA

根据 N、C 端氨基酸顺序设计引物,引物分别含有限制酶 *Bam*H I、*Eco*R I 位点,以含全长 Plg cDNA 的质粒 pBS-S<sub>1</sub> 为模板,PCR 扩增人微小纤溶酶原基因,琼脂糖电泳分析产物。产物经 Klenow 酶补平、*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶解后、与 pUC19 重组,限制性酶鉴定、DNA 序列分析<sup>[6]</sup>。

### 1.3 酵母表达质粒 pHDM LG 的构建

PCR 产物经 Klenow 酶补平、*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶解后,与 pHIL-D8 载体重组,重组质粒转化大肠杆菌 JM109,扩增,限制性酶鉴定,筛选阳性克隆。阳性克隆命名为 pHDM LG。

### 1.4 pHDM LG 的转化及阳性克隆筛选

以 *Not* I 将 pHDM LG 线性化,然后用 LiCl 方法转化 GS115, mplg 基因通过同源重组与酵母染色体整合,经 MD(葡萄糖最低限度培养基)和 MM(甲醇最低限度培养基)平板筛选甲醇利用慢的表型克隆,所得克隆经 YPD 培养液培养后,抽取酵母染色体,PCR 扩增,验证 mplg 基因已与酵母染色体整合。

### 1.5 pHDM LG 在 *Pichia pastoris* 中的表达

挑取阳性克隆数个,并以仅转入空载体 pHIL-D8 的 GS115 克隆作对照,接种于 BMG(甘油最低限度缓冲培养基)培养液中,培养至  $OD_{600nm}$  2~6 时,离心,弃去培养液,沉淀以 0.1 体积的 BMM(甲醇最低限度培养基)培养液进一步培养,0.5% 甲醇诱导培养 7 d,每 24 h 取样,并补加甲醇,维持甲醇浓度 0.5%。15% SDS-PAGE 鉴定表达产物,以抗 Plg 兔抗血清进行 Western blot 分析表达产物免疫原性,另取培养液上清,去除盐类和甲醇,与 t-PA 37℃ 共孵育后,点酪蛋白-琼脂糖平板各孔中,继续 37℃ 孵育至溶圈出现,并同时用发色底物法测定各样品活性。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 扩增 mplg 基因

琼脂糖电泳显示扩增片段约 800bp。图 1 序列分析证明所得片段与文献报道 mplg cDNA 顺序相符,且阅读框架正确。

### 2.2 表达质粒的酶切分析

*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切,得 792bp 片段;*Eco*RV 酶切,得 1.1kb 片段。证实获得 pHDM LG 表达质粒(图 2)。

### 2.3 SDS-PAGE 鉴定表达产物及 Western blot 分析免疫原性

如图 3 所示,表达菌在 32kD 处有一浓集的条带,而仅转入空载体的对照菌未见此条带。诱导后第 2、3 天的培养上清电泳后,半干转移至 PVDF 膜,以 5% 脱脂牛奶作封闭剂,然后依次与兔抗人 Plg 抗血清、羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体孵育,最后在 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下显色,在膜相当于表达条带处出现了特异性着色,证明表达条带具有 Plg 的免疫原性(图 3)。

### 2.4 表达产物活性分析

酪蛋白-琼脂糖平板溶圈法显示从诱导第 1 天起就有活性 mplg 的表达,至第 3~4 天达到高峰。发色底物法测定结果与溶圈法一致(图 4)。

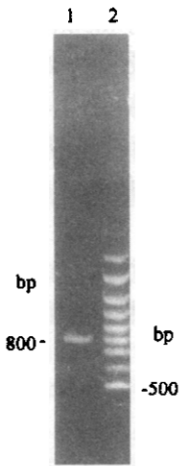


图 1 PCR 扩增产物的鉴定

Fig. 1 Analysis of PCR product  
1. PCR product; 2. DNA marker

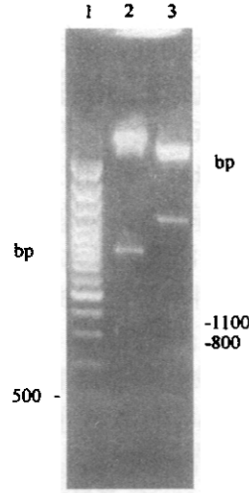


图 2 质粒 pHDMLG 的 DNA 限制酶片段分析

Fig. 2 Analysing DNA restrictive enzyme fragments of pHDMLG  
1. DNA marker; 2. *Bam*HI + *Eco*RI : 800bp; 3. *Eco*RV : 1.1kb

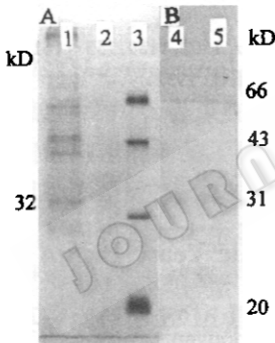


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳及分析

Fig. 3 Analysing the expression product by SDS-PAGE(A) and Western blot analysis(B)

1. Total protein of pHDMLG/GS115 after induction (96h)
2. Total protein of pHIL-D8/GS115 after induction(96h)
3. Marker, 4, 5. Total protein of pHDMLG/GS115 after induction(48h, 72h)

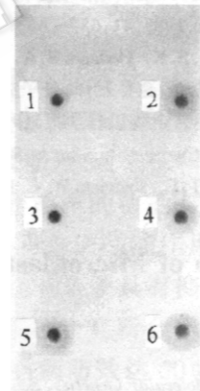


图 4 溶圈法鉴定表达产物的纤溶活性

Fig. 4 Identification of fibrinolysis activity of expression product

1. Supernatant of culture of pHIL-D8/GS115(96h)
2. Human Plg, 3~6. Supernatant of culture of pHDMLG/GS115(24h, 48h, 72h, 96h)

### 3 讨 论

我室曾用大肠杆菌表达系统实现了 *mplg* 基因的高表达<sup>[7]</sup>, 但由于大肠杆菌作为原核生物, 不具备蛋白质翻译后加工能力, 因此不能形成有活性的表达产物, 蛋白复性成为关键问题。Mplg 具 6 对二硫键, 复性十分困难, 虽经努力, 复性后显示出纤溶活性, 但活性很低。Pichia pastoris 表达系统是近几年来发展起来的极具潜力的酵母表达系统<sup>[8~9]</sup>。

*Pichia pastoris* 既具有真核生物蛋白翻译后加工的能力, 又拥有原核生物易于培养、繁殖快、操作简便的特点, 因而我们采用此系统进行了表达, 获得了活性的 mplg, 避免了复性问题。*Pichia pastoris* 系统表达载体种类繁多, 可选择不同宿主表型及多种染色体整合方式, 孰优孰劣, 目前尚无定论<sup>[8]</sup>。我们将 mplg 基因与分泌型表达载体 pHIL-D8 重组, 以酸性磷酸酯酶 1 (PHO1) 信号肽作为分泌信号进行分泌型表达, 一方面基于蛋白一级结构中不具有酵母 PHO1 信号肽识别位点, 且无糖链加工位点, 另一方面 *Pichia pastoris* 本身分泌蛋白量很少, 作分泌表达可大大方便下游工作。

我们发现培养条件的控制对提高表达水平, 获得活性蛋白十分重要。如在 pH 3~5 时 mplg 表达水平最高, 但在 pH 4 时基本失活, 所以我们通过调整缓冲液的配比使 pH 维持在 5 左右。此外, 溶氧、甲醇用量等亦很重要。

由于 *Pichia pastoris* 很容易进行大规模培养, 我们正在进行发酵罐水平的高密度表达工作, 以获得大量的高纯度 mplg, 为 mplg 结构和功能研究提供条件。

### 参 考 文 献

- [1] B. Wiwan, D. Collen. *Nature*. 1978, **272**: 549~550.
- [2] E. J. P. Brommer, G. Dooijewaard, B. A. C. Dijkmans. *Thromb Haemosta*, 1992, **68**: 180~184.
- [3] P. Burtin, M. C. Fondaneche. *J. Natl. Cancer Inst.* 1988, **80**: 762~765.
- [4] L. Pattly. *Cell*. 1985, **41**: 657~663.
- [5] C. P. Ponting, S. K. Holland, S. A. Ledinhdn. *Biochimica Biophysica Acta*. 1992, **1159**: 155~161.
- [6] J. 萨姆布鲁克著, 金冬雁译, 分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] 沈俊卿, 宋后燕. 生物工程学报, 1997, **13**(1): 65~69.
- [8] M. Romanos. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995, **6**: 527~533.
- [9] J. M. Cregg, T. S. Vedvick, W. C. Raschke. *Biotechnology*. 1993, **11**: 905~910.

## Expression of Microplasminogen in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*\*

Song Gang Guan Xiaoqun Song Houyan

(Department of Molecular Genetics, School of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

**Abstract** To produce microplasminogen which has potential fibrinolytic activity, recombinant plasmid pHDMLG was constructed by inserting of mplg cDNA originated from pBS-S1 into yeast expression vector pHIL-D8 at *Bam*HI and *Eco*RI sites, then transformed into GS115 cells. Positive clones were selected with MD、MM plates and confirmed by PCR. Several clones were incubated in BMG media and induced by 0.5% methanol in BMM media. The expression product mplg was secreted into medium. 32kD band appeared in SDS-PAGE. The immunogenicity of the mplg was confirmed by Western blot. mplg activity in the culture reached maximum in 3~4 days. mplg cDNA clone was successfully expressed in *Pichia pastoris*.

**Key words** Expression of mplg cDNA clone, *Pichia pastoris*

\* Supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development(No. 103-13-01-02).