



## TIMP-2 在毕赤酵母中的克隆与表达\*

闫训友<sup>1,2,3</sup> 赵洪亮<sup>1</sup> 张惟广<sup>2</sup> 薛冲<sup>1</sup> 刘志敏<sup>1\*\*</sup>

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)<sup>1</sup> (廊坊师范学院生物系 廊坊 065000)<sup>2</sup>  
(西南农业大学食品科学学院 重庆 400716)<sup>3</sup>

**摘要:** 为了克隆人基质金属蛋白酶组织抑制剂-2 (TIMP-2) 基因, 并在 *Pichia pastoris* 中表达, 根据 GenBank 上的 TIMP-2 的氨基酸序列和毕赤酵母偏爱密码子, 通过化学合成和 PCR 相结合的方法获得了人的 TIMP-2 基因全长序列, 构建了 pPIC9-T2 表达载体, 电击转化到毕赤酵母, 通过表型筛选和诱导表达得到蛋白表达工程菌, 并对表达产物进行了分离纯化和生物学活性分析。

**关键词:** TIMP-2, 毕赤酵母, 表达, 活性

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0001-06

### Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) in *Pichia pastoris*\*

YAN Xun-You<sup>1,2</sup> ZHAO Hong-Liang<sup>1</sup> ZHANG Wei-Guang<sup>2</sup> XUE Chong<sup>1</sup> LIU Zhi-Min<sup>1\*\*</sup>

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)<sup>1</sup>  
(Biology Department Langfang Normal College, Langfang 065000)<sup>2</sup>  
(College of Food Science, Southwest Agricultural University Chongqing 400716)<sup>3</sup>

**Abstract:** To construct human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and express it in *P. pastoris*. The sequence was designed according to the amino acid sequence of the TIMP-2 and high-level expression sequences of *P. pastoris*. We gained the TIMP-2 gene by artificially synthesis method. The gene was cloned into pPIC9 to construct a recombinant vector pPIC9-T2. The vector was transformed into *P. pastoris* by electroporation, through phenotype selection and induced with methanol we get the expression cell. Separation, purification and bioactivity analysis of the expressed products was performed.

**Key words:** TIMP-2, *Pichia pastoris*, Express, Activity

基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 是降解细胞外基质的重要酶类, 几乎能降解细胞外基质的所有成分, 基质金属蛋白酶现已发现 26 种, 统称为基质金属蛋白酶家族, MMPs 能通过破坏基质的降解平衡而促进肿瘤细胞突破基底膜和细胞外基质构成的组织屏障作用, 从而侵袭周围组织。基质金属蛋白酶组织抑制剂 (Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs) 是 MMPs 的天然抑制物, 是一组能抑制 MMP 活性的多功能因子家族, 目前已经在人体内发现有 4 种 TIMP<sup>[1,2]</sup>。由于 TIMPs 是 MMPs 天然的抑制剂, MMPs 在肿瘤侵袭和转移中具有独特的靶点, 使得 TIMPs 成为研究抑制肿瘤

\* 国家重大科技专项平台课题基金资助 (No. 2002AA2Z345B)

Project Grant by National High Technology Program (No. 2002AA2Z345B)

\*\* 通讯作者 Tel: 86-10-66948823, Fax: 86-10-63833524, E-mail: liuzhm@vip.sina.com

收稿日期: 2005-03-10, 修回日期: 2005-05-26

转移的热点, 并可能成为新的抑制肿瘤生长的药物; 其中, TIMP-2 既能结合无活性状态的又能结合激活状态的 72kD IV型胶原, 而且可以终止金属蛋白酶家族所有成员的水解活性, 在针对肿瘤侵袭和转移的研究中, TIMP-2 的研究备受关注。近年来, 甲醇营养型酵母表达系统的研究得到迅速发展, 此系统具有高表达、高稳定、高分泌的特点, 其宿主菌巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 自身蛋白分泌量少, 高活性外源蛋白分泌量大, 利于下游分离、纯化操作, 能大规模发酵生产, 是一种适宜表达外源基因的真核表达系统已成功地用来表达了许多蛋白质。本文利用基因工程方法, 将人工合成的 TIMP-2 基因在巴斯德毕赤酵母中得到了有效的分泌表达, 并测定其生物学活性。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、巴斯德毕赤酵母菌 GS115 均由本室保存; 质粒 pPIC9 由本室保存; 含有 MMP-2 的质粒 (pET-MMP-2) 由军事医学科学院二所王清明教授惠赠; 限制性内切酶、*Taq*DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、质粒快速提取试剂盒分别购自华美公司、北京博大公司和上海生工生物工程公司, 引物由上海博亚公司合成; 分离纯化介质 Sephadex G-75 购自 Pharmacia 公司。

### 1.2 PCR 引物设计和合成

根据 GenBank 报道的 TIMP-2 的氨基酸序列和毕赤酵母偏爱密码子, 设计了 24 条 PCR 引物, 见表 1, 其中 22 条寡核苷酸序列用于 PCR 扩增目的基因 (正向引物 11 条分别为 F1 ~ F11、反向引物 11 条分别为 R1 ~ R11), 其中 Fn 和 Rn 内部都有 25 个 bp 的反向互补序列<sup>[1]</sup>。2 条引物用于克隆至 pPIC9 质粒中 (上游引物 E1 含有 *Xho* I 酶切位点, 下游引物 E2 含有 *Eco*R I 酶切位点)。

表 1 合成 TIMP-2 引物

Name	Oligonucleotides
F 1	TGTTCTCTTCCCACTCCACCCACAACAAGCTTCTGTAAACGCTGACGT
F 2	CGTTATCCGTGCTAAGGCTGTCTCCGAGAAGGAGGCTCGACTCCGGTAACG
F 3	ACATCTACGGTAACCAATCAAGCGTATCCAATACGAGATCAAGCAAATC
F 4	AAGATGTTCAAGGCTCCAGAGAAGGACATCGAGTTCATCTACACGGCTCC
F 5	ATCCTCGGTCTCTGTGGTGTCTCCTTGGACGTGGCTGTAAGAAGGAGT
F 6	ACTTGATCGGTGCTAAGGCTGAGGGTGACGGTAAGATGCACATCACCTTG
F 7	TGTGACTTCATCGTCCCATGGGACACCTTGTCCACCACCCAAAAGAAGTC
F 8	CTTGAAACCACGGTTACCAAATGGGTTGTGACTGTAAGATCACCCGTTGTC
F 9	CAATGATCCCATCTTACATCTCCTCCCCAGACGACTGTTTGTGGATGGAC
F10	TGGGTACCCGAGAAGAACATCAACGGTCAACCAAGCTAAGTTCCTTCGGCTTG
F11	TATCAAGCGTTCGACGGTTCCTGTGCTTGGTACCGTGGTGTCTGCTCCAC
R 1	GGAGACAGCCTTAGCACGGATAACGACGTCAGCGTTACAGAAAGCTTGT
R 2	CGCTTGATTGGGTTACCGTAGATGTGTTACCGGACTCGACCTCCTTCTC
R 3	CCTTCTCTGGACCCTTCAACATCTTGATTGGTTGATCTCGTATTGGATA
R 4	GGAGACACCACAGACAGCGGAGGATGGAGCGGTGTAGATGAACTCGATGT
R 5	CCCTCAGCCTTACCAGCGATCAAGTACTCCTTCTTACCACCGACGTCCAA
R 6	TGTCCCATGGGACGATGAAGTCAACACAAGGTGATGTGCATCTTACCGTCA
R 7	ACCCATTTGGTAACCGTGGTTCAAGGACTTCTTTTGGGTGGTGGACAAGG
R 8	GAGGAGATGTAACATGGGATCATTTGGACAACGGGTGATCTTACACTCACA
R 9	CGTTGATGTTCTCTCGGTGACCCAGTCCATCCACAAACACTCGTCTGGG
R 10	ACAGGAACCGTCCGAACGCTTGATACAAGCGAAGAACTTAGCTTGGTGC

续表 1

R 11	TGGGTCTCGATGTCCAAGAAGCTCTTGCTTTGGTGGAGCAGCACCCAGGTACCAAGC
E 1	CCCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAGGCTTCTTCCTGTTCCCCAGTCCACCCAC
E 2	GGGAATTCTCATTATGGGTCTCGATGTCCAAGAAGCTCT

### 1.3 目的基因 TIMP-2 的获得

目的基因的获得通过 PCR 反应<sup>[3,4]</sup>使 F1 ~ F11、R1 ~ R11 各为模板, 通过一次 PCR 即可得到目的基因。PCR 条件为: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 40s, 55 个循环; 72℃ 延伸 10min。

### 1.4 重组 TIMP-2 表达载体的构建和表达

**1.4.1 酶切转化:** 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 PCR 产物和 pPIC9 载体, 电泳纯化, 回收酶切的基因片段和载体, 然后用 T4DNA 连接酶进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 37℃ 培养 16h 后通过 PCR 鉴定, 挑选阳性克隆送上海博亚公司测序。

**1.4.2 诱导表达:** 将构建好的表达载体 pPIC9-T2 经 *Bgl* II 线性化后电击转化到毕赤酵母 GS115 宿主菌中, 毕赤酵母的电击转化按照 Invitrogen 公司进行。用选择性培养基 MD 筛选转化子。将阳性转化子接种到 5mL YPD 液体培养基中, 30℃ 培养过夜后, 再转接到 BMGY 液体培养基中, 待甘油消耗尽后加入 0.5% 的甲醇进行诱导, 诱导大约 60h 后离心收集上清, 进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.5 表达产物的分离纯化

**1.5.1 发酵液上清的粗纯化:** 分别取 20%、40%、60% 和 80% 饱和度的硫酸铵, 缓慢且均匀的加到发酵液上清中, 搅拌至硫酸铵完全溶解; 然后将浑浊液在 4℃ 静置 4 ~ 6h; 最后用 8,000 ~ 10,000r/min 离心 30min, 去上清保留沉淀。

**1.5.2 分子筛过滤:** 将 40% 饱和度的硫酸铵沉淀蛋白用 0.1mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液悬浮。用 0.1mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液平衡 Sephadex G-75 分子筛, 收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE。

### 1.6 重组 TIMP-2 的生物学活性测定

**1.6.1 MMP-2 (明胶酶) 蛋白的获得:** MMP-2 蛋白的获得参照文献 [5]。

**1.6.2 反向明胶酶谱测定目的蛋白活性<sup>[6]</sup>:** 配制 12% 的 SDS-PAGE, 内含 2g/L 的明胶 (Sigma 公司) 和 1g/L 的 MMP-2, 分别取 30 $\mu$ L 阳性克隆、阴性对照酵母表达上清液, 加入 10 $\mu$ L 不含巯基乙醇的非还原上样缓冲液电泳, 电泳完毕后, 凝胶片在 2.5% 的 Triton-100 中洗脱 SDS, 洗 2 次共 1h, 然后转移到明胶酶缓冲液 (pH7.6, 50mmol/L Tris-HCl, 200mmol/L NaCl, 5mmol/L CaCl<sub>2</sub>) 中, 37℃ 孕育过夜 10h, 凝胶用 0.5% 的考马斯亮蓝 G-250 染色, 20min 后脱色。

**1.6.3 溶圈法测定目的蛋白活性:** 配制明胶琼脂平板, 内含 1% 的琼脂, 1% 的明胶, 用明胶酶缓冲液溶解琼脂和明胶, 琼脂冷却后和明胶混匀, 铺制平板, 分别加入 MMP-2 蛋白液, 然后加入 TIMP-2 目的蛋白, 37℃ 孕育 10h, 平板在 0.5% 的考马斯亮蓝 G-250 染色, 20min 后脱色。

## 2 实验结果

### 2.1 表达载体的构建

通过一步 PCR 的方法扩增出目的基因片段。扩增产物经琼脂糖电泳鉴定在约 618bp

处有一明显扩增片段, 见图1。酶切鉴定表明目的基因已经克隆到 pPIC9 载体中见图2。

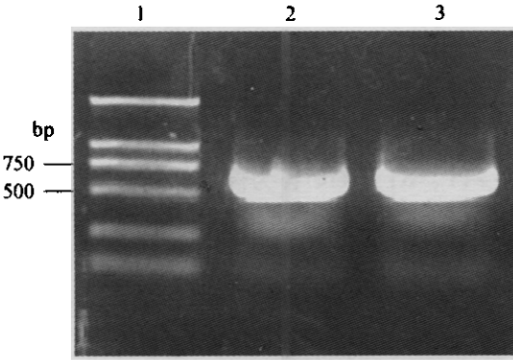


图1 TIMP-2 基因扩增鉴定

1 DNA marker DL2000, 2, 3 PCR products

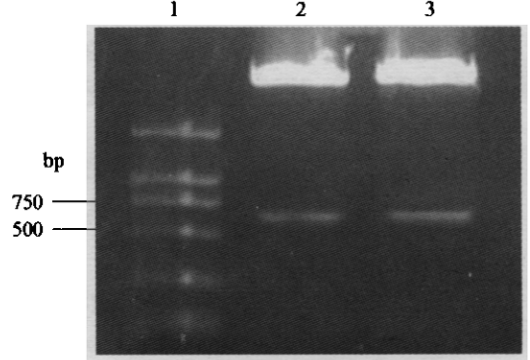


图2 重组质粒酶切鉴定

1 DNA marker DL2000, 2, 3 pPIC9-T2 by *XhoI* and *EcoRI*

### 2.2 TIMP-2 在毕赤酵母中的表达

挑选 MD 平板上 6 个克隆, 于 30mL BMGY 与 BMMY 培养基中诱导表达, 实验结果见图 3。1 号 (Lane 2) 是阳性克隆, 目的蛋白表达条带明显。将此阳性酵母转化子在摇瓶培养基内进行诱导表达, 进一步实验结果表明在不同诱导时间点的 TIMP-2 蛋白表达量有一定变化, 随着诱导时间的增加, 目的蛋白量有增长趋势, 诱导 60 h 后变化不大, 这与蛋白降解有关。

### 2.3 重组蛋白的分离纯化

工程菌经过 2L 摇瓶培养, 诱导表达 60h, 发酵上清液加硫酸铵至 40% 饱和度, 大部分目的蛋白被沉淀下来, 并且去除了大部分杂蛋白。经过分子筛凝胶过滤, 达到进一步纯化的目的。将各步骤的洗脱液进行 15% SDS-PAGE 分析, 在 22.1kD 左右明显可见经过纯化后目的蛋白条带, 见图 4 (Lane 6)。

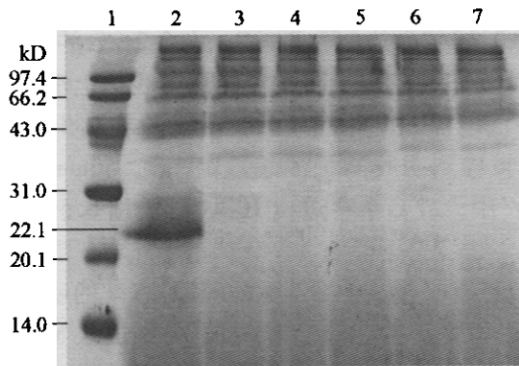


图3 SDS-PAGE 鉴定 TIMP-2 在毕赤酵母中的表达

1 Protein marker, 2 24h supernatant of GS115 TIMP-2 conditioned medium 30 $\mu$ L, 3-7 Negative comparison 24h supernatant of GS115 30 $\mu$ L

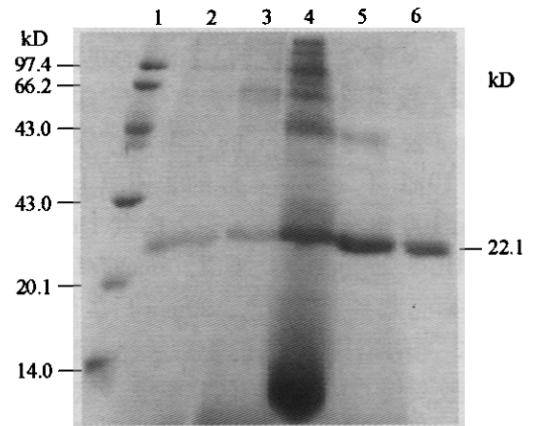


图4 经过各步纯化 TIMP-2 蛋白 SDS-PAGE 图谱

1 Protein marker, 2, 3 Supernatant of the expressed products of TIMP-2, 4 TCA precipitation, 5 40% sulfate precipitation, 6 Superdex G-75 molecular sieve chromatography

## 2.4 重组蛋白理化性质的鉴定

重组蛋白 N 端氨基酸序列的测定: 重组 TIMP-2 经 SDS-PAGE 分析, 电转移至 PVDF 膜上, 染色脱色后剪下目的条带做 N 末端氨基酸残基进行了测定分析 (军科院仪器测试分析中心测序)。测定结果显示样品 N 末端的氨基酸序列为 E-A-E-A-C, 与本实验设计的 TIMP-2 序列相一致。

## 2.5 重组蛋白生物活性测定

**2.5.1 溶圈法测目的蛋白生物学活性:** 在铺制的平板中, 用打孔器均匀打孔, 加入 MMP-2 和 TIMP-2 蛋白样品。由于琼脂平板中含有明胶, 在考马斯亮蓝的染色作用下呈蓝色的背景, 加入的明胶酶可以降解明胶, 而 TIMP-2 可以抑制明胶酶 (MMP-2) 降解明胶, 结果见图 5。

**2.5.2 反向明胶酶谱测定目的蛋白活性:** 在非变性条件下对重组 TIMP-2 用反相酶谱法测定其活性。由于电泳胶中含有明胶酶 MMP-2 和酶的作用底物——明胶, 在 TIMP-2 电泳条带经过的位置应当出现因与 MMP-2 相互作用而抑制明胶被降解的蛋白复合物条带 (可被考马斯亮蓝染为蓝色), 而没有 TIMP-2 的地方则为明胶被降解出现的不能被考马斯亮蓝染色的白色背景。图 6 显示 3, 4 号克隆出现明显蓝色条带。

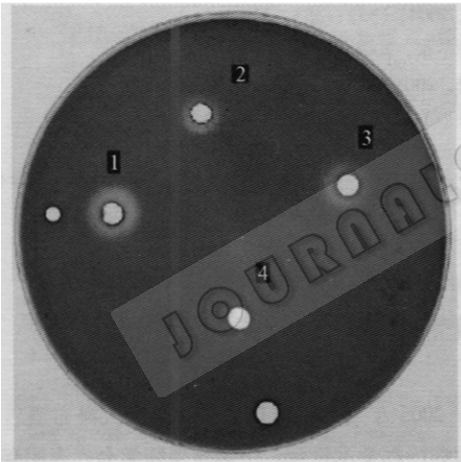


图 5 琼脂糖平板检测 TIMP-2 活性

1 10 $\mu$ L MMP-2 only, 2 10 $\mu$ L MMP-2 and 10 $\mu$ L TIMP-2, 3 10 $\mu$ L MMP-2 and 5 $\mu$ L TIMP-2, 4 10 $\mu$ L MMP-2 and 20 $\mu$ L TIMP-2

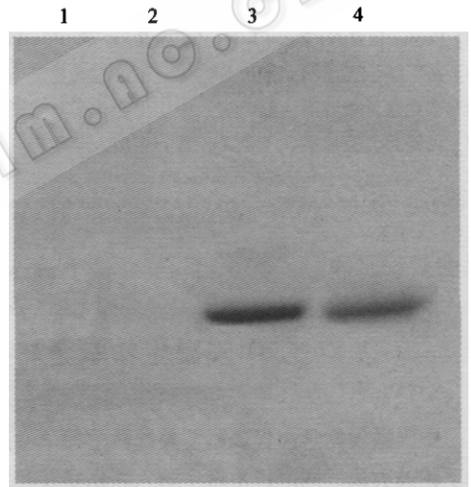


图 6 明胶酶谱检测 TIMP-2 活性

1, 2 TIMP-2 Expressed negative clone, 3, 4 TIMP-2 expressed positive clone

## 3 讨论

毕赤酵母表达系统是近几年建立的一种真核表达系统。由于它既具有原核表达系统, 如常用的大肠杆菌表达系统繁殖迅速、费用低廉及操作方便的特点; 又具有真核表达系统能对表达的蛋白质进行正确加工、折叠及适度糖基化, 重组蛋白易于纯化它可以利用甲醇作为惟一的能源和碳源, 强启动子 AOX1 严格地受甲醇的诱导, 使外源基因的表达易于调控的优点, 而且毕赤酵母表达系统更适用于从摇瓶到大容积高密度发酵罐扩大培养的过程中<sup>[4]</sup>, 已越来越广泛地用于蛋白质的大量表达。

本实验我们成功地利用人工合成全 TIMP-2 基因, 并在毕赤酵母中得到表达, 明胶

酶谱和融圈实验表明具有较高生物学活性的蛋白。在目的基因拼接过程中,我们通过一次 PCR,扩增出 618bp 合成目的基因,在 618bp 的全长基因扩增过程中,只有一个位点发生突变,而且发生突变的位点只发生在两个片段的接头处,由于我们设计的基因片段都相互有多个碱基相重合,利用包含错误接头在内的另一段引物即可一次纠正。与目前国内通用的化学拼接法相比具有很多优点:不需要对合成引物进行磷酸化;较全合成基因而言,此方法由于不需要合成目的基因的全部序列,节省合成费用;易于验证合成结果,基因合成每一步都可以通过相应的 PCR 反应来验证合成的片段是否正确,找出失败的原因;实验操作简单易行,且快速;对合成出错修正较为方便,一旦基因合成出错,可以采用重叠延伸 PCR 对出错位点予以纠正<sup>[3,7]</sup>。另外由于采用了高保真的 DNA 聚合酶 pfu,它的出错率仅为普通 *Taq* 酶的 1/12,因此,大大减少了基因合成的出错率。本实验为进一步 TIMP-2 的结构与功能研究及产业化研究奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] William G, Stetler S, Henry C, *et al.* J Biol Chem, 1989, **264** (29): 17374 ~ 17378.
- [2] Robert V, Hideaki N. Circ Res, 2003, **92**: 827 ~ 839.
- [3] Willem P C S, Andreas C, Kim D H, *et al.* Gene, 1995, **164**: 49 ~ 53.
- [4] Fernanda O N, Paulo L H, Isaias R, *et al.* Protein Exp Pur, 2004, (35): 353 ~ 359.
- [5] 高 媛,王清明,范国才,等. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, **17** (5): 631 ~ 635.
- [6] 李克勤,李春海,颜春洪. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, **17** (2): 160 ~ 164.
- [7] 贝锦龙,王瑾雯,王徇章,等. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42** (1): 114 ~ 118.