

研究报告

重组瑞替普酶在毕赤酵母中的表达

张旦旦¹ 窦文芳¹ 赵军¹ 史劲松¹ 许正宏^{2*}

(1. 江南大学药学院制药工程研究室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】瑞替普酶(重组组织纤溶酶原激活物, rtPA)被认为是第三代安全有效的溶栓剂, 以 pPIC9K 为载体, 以 3 种不同表型的毕赤酵母(*Pichia pastoris*)为宿主, 探索适合 rtPA 分泌型表达的最佳体系。【方法】以质粒 pET28a-rtPA 为模板, 设计特异性引物, PCR 扩增目的基因 *rtPA*, 插入分泌型表达载体 pPIC9K 中, 获得重组表达质粒 pPIC9K-rtPA。重组质粒经限制性内切酶 *Sal* I 线性化后, 电击转化至 3 种不同表型的 *P. pastoris* (GS115、SMD1168、KM71) 中进行组成型表达; 重组表达体系进行甲醇诱导表达, 对产物进行 Western blot 鉴定, 并采用纤维蛋白平板溶圈法测定其活性。【结果】重组蛋白分子量约为 43 kD; rtPA-GS115 和 rtPA-KM71 均在 39 kD 处有特异性条带, 且前者在 32 kD 处有轻微降解条带, 而后者并无此现象; rtPA-SMD1168 无降解现象, 且 rtPA-SMD1168 比活性较 rtPA-GS115 高 27%; rtPA-KM71 表达量和活性均为最低。【结论】从重组蛋白生物活性出发, *P. pastoris* SD1168 可作为 rtPA 的最佳表达体系, 在控制宿主蛋白酶活性、减少产物降解的前提下, *P. pastoris* GS115 也是 rtPA 表达的优选体系。

关键词: 瑞替普酶, 组织纤溶酶原激活物, 毕赤酵母, 纤溶活性

Expression of recombinant reteplase in *Pichia pastoris*

ZHANG Dan-Dan¹ DOU Wen-Fang¹ ZHAO Jun¹ SHI Jin-Song¹ XU Zheng-Hong^{2*}

(1. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Reteplase (rtPA, recombinant tissue plasminogen activator) is considered as the third generation of safe and effective thrombolytic agent. In order to explore the suitable system for secretory expression of rtPA, the *rtPA* gene was expressed in three different phenotypes of *Pichia pastoris* with pPIC9K as the vector. [Methods] The *rtPA* gene was obtained from plasmid pET28a-rtPA and inserted into the secretory expression vector pPIC9K. The recombinant plasmid pPIC9K-rtPA was digested with restriction endonuclease *Sal* I and then transformed into *P. pastoris*

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA022204C)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@163.com

Received: March 08, 2017; Accepted: May 22, 2017; Published online (www.cnki.net): June 02, 2017

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2012AA022204C)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@163.com

收稿日期: 2017-03-08; 接受日期: 2017-05-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-02

GS115, SMD1168 and KM71, respectively. The positive clones were screened on MD-G418 plates and verified by PCR. The expression of rtPA in the recombinant strains were induced with methanol, and analyzed by Western blot and fibrin agarose plate. **[Results]** The molecular weight of recombinant proteins was about 43 kD; both rtPA-GS115 and rtPA-KM71 had a specific band at 39 kD, and the former had a slight degradation band at 32 kD, while the latter did not; rtPA-SMD1168 showed no degradation. The specific fibrinolytic activity of rtPA-SMD1168 was 27% higher than that of rtPA-GS115, while the expression and activity of rtPA-KM71 displayed the lowest level among tested samples. **[Conclusion]** According to the expression of fibrinolytic activity, *P. pastoris* SMD1168 was proven to be the best expression system. On the premise of controlling the activity of protease and reducing the degradation of products, *P. pastoris* GS115 was selected as the preferred system for rtPA expression.

Keywords: Reteplase, Tissue plasminogen activator, *Pichia pastoris*, Fibrinolytic activity

血栓性疾病, 如急性心肌梗塞(AMI)、深静脉血栓、脑血栓等, 发病率很高且呈逐年上升的趋势, 此类疾病具有很高的致残率和致死率, 而溶栓治疗是主要疗法。组织纤溶酶原激活物(Tissue type plasminogen activator, tPA)又称血管纤溶酶原激活物或外激活物, 是由血管内皮细胞产生的一种蛋白质, 由 527 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 65 kD, 可特异性地溶解血凝块中不溶的纤维蛋白^[1-2]。tPA 作为第 2 代溶血栓药物的代表, 具有人体内天然的蛋白质结构, 对人体无明显的免疫原性, 且具有良好的溶血栓活性与特异性, 但其在血液中的半衰期只有 5 min, 临床治疗所需剂量高达 50–100 mg, 大剂量注射和反复注射 tPA, 不仅使患者经济负担沉重, 而且有颅内出血、周身纤溶性出血倾向等副作用^[3-4]。

为延长 tPA 半衰期、降低出血性等副作用, 德国 Boehringer Mannheim 公司针对 tPA 的特点, 利用定点突变技术研制出 tPA 的突变体, 即重组瑞替普酶(Reteplase, rtPA), 包含了原 tPA 序列中的 1–3 位及 176–527 位氨基酸, 相对分子量为 39 kD。与 tPA 相比, rtPA 与纤维蛋白的亲合力减弱^[5], 与血凝块表面的结合可逆, 因此在某个部位发生作用后, 还可作用于其他部位, 且 rtPA 删除了可与肝细胞结合的 EGF 区, 使其可在血液循环中保留更长的时间而不被清除。rtPA 在治疗血栓时, 具有半衰期长、溶栓效率高、副作用小等优点, 被认为

是第三代安全、有效的溶栓药物^[6]。

大肠杆菌体系具有遗传背景成熟、生长速率快、周期短、生产成本低等特点, 目前对 rtPA 表达体系的研究多集中于大肠杆菌表达体系。本研究前期构建了 rtPA 原核表达体系 *Escherichia coli* BL21(DE3) pET28a-rtPA, 但大肠杆菌是原核生物, 表达外源蛋白时, 不能对蛋白质进行翻译后修饰, 使得重组蛋白的生物学活性较低, 且复性和纯化工艺复杂、回收率低、成本较高。胡立强等^[7]在大肠杆菌(表达载体 pET28a)和毕赤酵母(表达载体 pPIC9K)中表达可溶性重组蛋白 RC28 时发现, 重组毕赤酵母所得目标蛋白得率较重组大肠杆菌低, 但抗病毒活性却是重组大肠杆菌的 2 倍, 与天然蛋白接近, 表明毕赤酵母体系虽然操作略显繁琐, 培养周期略长, 但毕赤酵母作为真核表达体系, 可以对重组蛋白进行表达、加工、折叠和翻译后修饰等, 可大大提高所表达重组蛋白的生物学活性。邹敏等^[8]以巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 为表达体系, 对重组瑞替普酶进行了较为系统的研究, 发现宿主细胞本身分泌蛋白酶, 导致目标蛋白有不同程度的降解; 方曙光等^[9]在研究温度对 rtPA 表达的影响时发现, 乙醇脱氢酶(AOX)和蛋白酶活性直接关系到 rtPA 的表达强度和降解程度。本研究以 3 种不同表型的毕赤酵母为表达宿主(蛋白酶缺陷菌株 *P. pastoris* SMD1168、弱 AOX 菌株 *P. pastoris* KM71、强

AOX 菌株 *P. pastoris* GS115), 构建 rtPA 表达体系, 探索不同表达体系中 rtPA 的表达活性, 分析蛋白酶和 AOX 对 rtPA 表达的影响, 寻找最佳表达体系。

1 材料与方 法

1.1 菌种和质粒

所用的菌株和质粒如表 1 所示。

1.2 主要试剂和仪器

T4 DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); 小量质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收及纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司(上海生工); 凝血酶、纤维蛋白原、tPA 抗体, 上海源叶生物科技有限公司; 纤溶酶原、rtPA 标准品(stPA), 中国药品生物制品检定所; 蛋白定量检测试剂盒、SDS-PAGE 试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂为进口或国产分析纯生化试剂。凝胶成像系统、电穿孔仪、基因扩增仪、电泳仪, Bio-Rad 公司; 台式高速冷冻离心机、移液器, 德国 Eppendorf 公司。

1.3 培养基

MD 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 不含氨基酸的酵母氮基(YNB) 13.4, 生物素 0.000 4。固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉, 1.0 mol/L 山梨醇, 4.0 mg/mL G418, 用于毕赤酵母基因工程菌的筛选。BMGY

培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母粉 10.0, 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), YNB 13.4, 甘油 10 mL, 生物素 0.000 4, 用于毕赤酵母基因工程菌的培养。BMMY 培养基: BMGY 培养基添加 20 g/L 甲醇, 用于毕赤酵母基因工程菌的诱导表达。大肠杆菌培养用 LB 培养基, 酵母培养用 YPD 培养基^[10]。

1.4 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作参考文献[11], 大肠杆菌感受态的制备采用上海生工超级感受态制备试剂盒; 毕赤酵母感受态制备和转化方法参考文献[10]。

1.5 rtPA 毕赤酵母表达体系的构建方法

1.5.1 目的基因 rtPA 扩增: 根据 *rtPA* 的基因序列, 设计上下游引物 P1、P2。引物由上海生工合成。P1: 5'-GGGGTACGTAGAGAAAAGAATGTCTTATCAGGGAAAC-3' (*SnaB* I); P2: 5'-GGGGGCGGCCGCTCACGGTCGCATGTTGTC-3' (*Not* I)。

以质粒 pET28a-rtPA 为模板, P1、P2 为引物, 扩增 *rtPA* 基因, PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times ExTaq DNA 聚合酶缓冲液 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上游引物(100 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物(100 μ mol/L) 2 μ L, 模板 2 μ L, 10 \times ExTaq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 34.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。所得目的片段两端带 *SnaB* I 和 *Not* I 限制性酶切位点。

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> JM109		Stored in this lab
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28a-rtPA	Kan ^R , lac, rtPA-expression	Stored in this lab
<i>P. pastoris</i> GS115	His ⁻ , Mut ⁺	Stored in this lab
<i>P. pastoris</i> KM71	His ⁻ , Mut ^s	Stored in this lab
<i>P. pastoris</i> SMD1168	His ⁻ , Mut ⁺ , protease-deficient	Stored in this lab
<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9K-rtPA	His ⁺ , Mut ⁺ , rtPA-expression	This study
<i>P. pastoris</i> KM71/pPIC9K-rtPA	His ⁺ , Mut ^s , rtPA-expression	This study
<i>P. pastoris</i> SMD1168/pPIC9K-rtPA	His ⁺ , Mut ⁺ , protease-deficient, rtPA-expression	This study
pMD19-T vector	T-vector, Amp ^R , lacZ, 2.7 kb	TaKaRa
pPIC9K	Amp ^R , Km ^R , Mobilizable <i>E. coli</i> vector, 9.3 kb	Stored in this lab
pPIC9K-rtPA	pPIC9K with rtPA fragment, 10.4 kb	This study

1.5.2 克隆质粒 pMD19-T-rtPA 的构建: 将扩增得到的 *rtPA* 基因连接至 pMD19-T 载体, 连接体系及条件参考 TaKaRa pMD19-T Vector Cloning Kit 说明书; 将连接产物转化至 *E. coli* JM109 中, 经蓝白斑筛选、*Sna*B I 和 *Not* I 双酶切验证, 获得阳性转化子; 提取重组质粒 pMD19-T-rtPA, 送上海生工测序。

1.5.3 重组表达质粒 pPIC9K-rtPA 的构建: 提取重组质粒 pMD19-T-rtPA 和穿梭质粒 pPIC9K, 分别利用限制性内切酶 *Sna*B I 和 *Not* I 进行双酶切, 应用上海生工的胶回收试剂盒回收并纯化线性片段 *rtPA* 和 pPIC9K, 将 *rtPA* 连接至质粒 pPIC9K, 连接体系及条件参考 TaKaRa T4 DNA 连接酶说明书。连接产物转化至 *E. coli* JM109 中, 经抗性筛选, *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切验证, 获得阳性转化子 *E. coli* JM109 pPIC9K-rtPA。

1.5.4 重组毕赤酵母的构建: 提取重组质粒 pPIC9K-rtPA, *Sal* I 酶切使质粒线性化, 反应体系 (100 μ L): 乙酰化 BSA 10 μ L, 10 \times Buffer H 10 μ L, 重组质粒 pPIC9K-rtPA 40 μ L, *Sal* I (10 U/ μ L) 3 μ L, ddH₂O 37 μ L。37 $^{\circ}$ C 恒温 4 h, 反应液经电泳、回收、纯化得到线性化片段 pPIC9K-rtPA, 应用电击转化法分别转化至 *P. pastoris* GS115、KM71、SD1168 感受态细胞中, 转化液涂布于 MD-G418 平板, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 48–72 h, 挑取单菌落, 经 PCR 验证获得阳性转化子, 即重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-rtPA、*P. pastoris* KM71/pPIC9K-rtPA、*P. pastoris* SD1168/pPIC9K-rtPA。

1.6 重组菌的诱导表达方法

挑取 MD-G418 平板上的阳性转化子, 划线分离 3 次以上获得纯菌落; 取单菌落接种于 50 mL BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 36 h 左右至对数中后期; 取种子液 5 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加入 15 mL BMMY 培养基重悬细胞; 将重悬细胞转移至无菌的三角瓶中, 于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min

下进行诱导培养; 每 24 h 补加甲醇至终浓度 1%, 使甲醇总添加浓度为 5%, 持续诱导培养 96 h。培养液经 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清为粗蛋白液。

1.7 发酵液中 rtPA 的检测

(1) 发酵液中蛋白总量的检测采用上海碧云天生物技术有限公司的蛋白定量检测试剂盒; (2) 按照试剂盒方法配制 12% 的 SDS-PAGE, 进行发酵样品的非还原性电泳, 每孔上样量为 10 μ L, 电泳结束后对表达产物进行 Western blot 鉴定^[12]; (3) rtPA 活性鉴定采用改良的纤维蛋白平板溶圈法^[3], 取制好的纤维蛋白平板 (1.0% 琼脂糖凝胶、1 mg/mL 纤维蛋白原、0.1 U/mL 凝血酶), 按需在平板上打孔 ($\Phi=2$ mm–4 mm), 每孔内注入 0.04 U (4 μ L) 纤溶酶原、10 μ L 发酵上清或 rtPA 标准品并以 PBS 补足 20 μ L; 将平板置恒温培养箱内, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 h。分别测量溶圈相互垂直的两直径 D_1 与 D_2 , 以其乘积的对数 ($\lg D_1 D_2$) 为纵坐标, 以 stPA 单位活性 (0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 U) 的对数为横坐标, 绘制标准曲线, 并线性拟合得 $y=0.399 6x+2.705$, 其相关系数为 0.981 2。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pMD19-T-rtPA 和 pPIC9K-rtPA 的构建

质粒 pPIC9K 为毕赤酵母分泌型表达载体, 重组表达质粒构建过程如图 1 所示, 经 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切验证, 克隆质粒 pMD19-T-rtPA (图 1B) 和表达质粒 pPIC9K-rtPA (图 1C) 构建成功。将重组质粒 pPIC9K-rtPA 送上海生工测序, *rtPA* 基因序列与预期完全一致, 表明表达载体 pPIC9K-rtPA 构建成功。

2.2 重组菌 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-rtPA、SMD1168/pPIC9K-rtPA、KM71/pPIC9K-rtPA 的构建

为探索 rtPA 的最佳毕赤酵母表达体系, 以 3 种

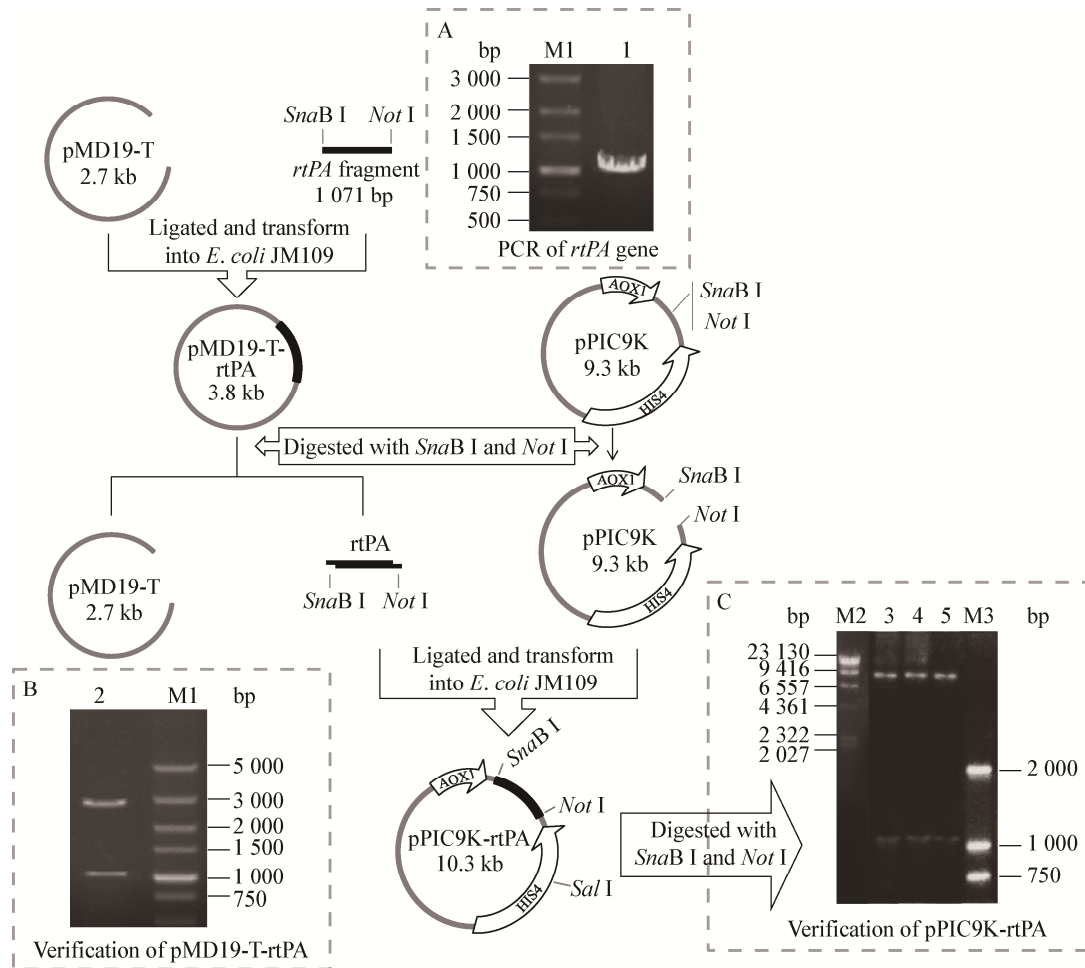


图 1 重组质粒 pMD19-T-rtPA 和 pPIC9K-rtPA 的构建与验证

Figure 1 Construction and verification of recombinant plasmid pMD19-T-rtPA and pPIC9K-rtPA

Note: M1: DL5000 marker; M2: λ -Hind III marker; M3: DL2000 marker; 1: *rtPA*; 2: Digestion bands of pMD19-T-rtPA; 3-5: Digestion bands of pPIC9K-rtPA.

不同表型的 *P. pastoris* GS115、SMD1168 和 KM71 为表达宿主，以分泌型表达质粒 pPIC9K 为载体，构建 3 种毕赤酵母分泌表达体系。以限制性内切酶 *Sal* I 消化重组质粒 pPIC9K-rtPA，使其线性化(目的条带约 10.3 kb)，并将其分别电击转化至 3 株毕赤

酵母的感受态细胞中，转化物涂布于 MD-G418 平板，于 30 °C 培养 48-72 h 至长出单菌落；挑取单菌落，以 P1、P2 为引物进行菌落 PCR 验证(图 2)，结果表明重组菌构建成功。挑取阳性菌落在 MD-G418 平板上分离纯化 3 次以上得到纯菌落。

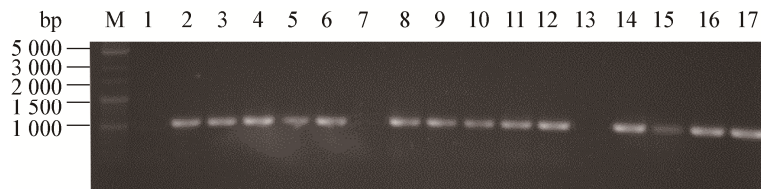


图 2 重组菌的菌落 PCR 验证

Figure 2 PCR verification of recombinant strains

Note: M: DL5000 DNA marker; 1: *P. pastoris* GS115; 2-6: Transformant of *P. pastoris* GS115; 7: *P. pastoris* SMD1168; 8-12: Transformant of *P. pastoris* SMD1168; 13: *P. pastoris* KM71; 14-17: Transformant of *P. pastoris* KM71.

2.3 重组蛋白表达情况分析

3种重组菌按1.6中的方法进行诱导表达,取发酵上清液,以Western blot验证蛋白合成情况(图3),结果显示目标蛋白质分子量约为43 kD,较理论分子量(39 kD)大,可能为糖基化所致;重组菌*P. pastoris* GS115/pPIC9K-rtPA和KM71/pPIC9K-rtPA均在39 kD处出现特异性条带,可能为未经糖基化的目标蛋白或糖基化后又降解的蛋白条带,前者在32 kD处有轻微降解条带,而后者并无此现象,由此可见,前者的表达量和降解程度均较后者大,说明在宿主自有蛋白酶的作用下,降解程度与表达量成正比;而重组菌*P. pastoris* SMD1168/pPIC9K-rtPA表达产物无降解现象,说明宿主蛋白酶缺失可有效避免目标蛋白的降解。

2.4 重组蛋白的活性检测

重组菌*P. pastoris* GS115/pPIC9K-rtPA、SMD1168/pPIC9K-rtPA、KM71/pPIC9K-rtPA诱导表达所得重组蛋白分别为rtPA-GS115、rtPA-SMD1168、rtPA-KM71,表达量分别为256、174、105 mg/L

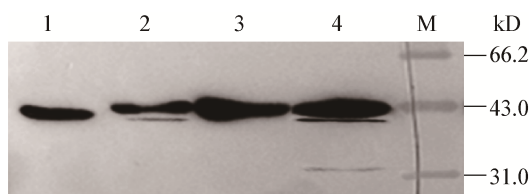


图3 重组菌发酵液的Western blot鉴定

Figure 3 Western blot of recombinant strains fermentation supernatant

Note: M: Marker; 1: stPA (39 kD); 2: Fermentation supernatant of *P. pastoris* KM71/pPIC9K-rtPA; 3: Fermentation supernatant of *P. pastoris* SMD1168/pPIC9K-rtPA; 4: Fermentation supernatant of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-rtPA.

(表2)。采用纤维蛋白平板法半定量检测表达产物活性,结果如图4所示:纤维蛋白平板上均出现溶圈反应,表明重组菌所表达产物均有溶栓活性,其中rtPA-GS115与rtPA-SMD1168的溶圈半径相近,生物活性也相近,分别为 2.99×10^4 U/L和 2.60×10^4 U/L,而后者比活性较前者高27%(表2),分析原因为重组蛋白降解导致rtPA-GS115的部分失活,说明目标蛋白的完整性直接决定了其生物活性;rtPA-KM71表达量和活性均为最低,说明强AOX启动子更有利于目标蛋白的表达。

3 结论与讨论

近年来,对于rtPA的研究多集中于*E. coli*表达体系,众多的自由巯基使该蛋白在*E. coli*中表达时极易发生二硫键的错配,造成目标蛋白错误折叠,以不溶且无活性的包涵体形式存在于细胞内,需要通过体外重折叠复性来恢复其天然构象^[13-14]。王俊雄等^[14]构建了*E. coli* rtPA表达体系,包涵体产量达到1.7 g/L,在800 μg/mL蛋白复性液中,目标蛋白复性收率仅为13%,即目标蛋白的实际产

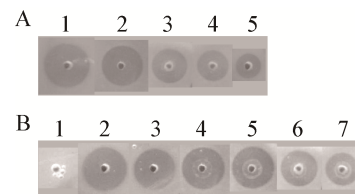


图4 rtPA的溶圈反应

Figure 4 Fibrin agarose plate assay of rtPA

Note: A1-A5: stPA (0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.031 25 U); B1: Fermentation supernatant of *P. pastoris* GS115; B2-B3: Fermentation supernatant of *P. pastoris* GS115/pPIC9K-rtPA; B4-B5: Fermentation supernatant of *P. pastoris* SMD1168/pPIC9K-rtPA; B6-B7: Fermentation supernatant of *P. pastoris* KM71/pPIC9K-rtPA.

表2 发酵上清液蛋白总量和rtPA活性

Table 2 Total protein and rtPA activity of fermentation supernatant

Strains	Total protein (mg/L)	rtPA activity ($\times 10^4$ U/L fermentation supernatant)	rtPA activity (U/mg protein)
<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9K-rtPA	256±16	2.99±0.21	117±0.7
<i>P. pastoris</i> SMD1168/pPIC9K-rtPA	174±23	2.60±0.18	149±9.3
<i>P. pastoris</i> KM71/pPIC9K-rtPA	105±12	1.12±0.19	90±5.4

量仅为 221 mg/L, 王伟等^[15]研究了原核表达体系中 rtPA 包涵体的复性方法, 最优条件下复性收率也仅为 20%; 褚孝发等^[16]引入二硫键异构酶 DsbC 介导 rtPA 折叠过程中错配二硫键的异构, 从而使其在 *E. coli* 中的可溶性蛋白表达率提高到 60%, 但重组蛋白产量仅为 70 mg/L。相较 *E. coli* 表达系统, *P. pastoris* 基因表达系统能使产物有效分泌至细胞外并适当糖基化, 蛋白表达量及活性表现较好^[17], 邹敏等^[8]构建了 *P. pastoris* GS115 表达体系, 高密度表达条件下 rtPA 的最高产量可达 487 mg/L, 且为可溶性表达, 经一步亲和层析即得到高纯度目标蛋白^[18], 纯化路径短、收率高, 更有利于控制生产成本和生产效率。目前已经有 400 多种外源蛋白在毕赤酵母系统得到有效表达, 被认为是最安全有效的酵母表达系统。

本研究中所用的 *P. pastoris* 均为目前常用的表达系统, 其中 *P. pastoris* GS115 含有 AOX1 和 AOX2 两个启动子, 能够在含有甲醇的培养基上快速生长(Mut⁺, methanol utilization plus phenotype); 菌株 *P. pastoris* KM71 的 AOX1 启动子被 *S. cerevisiae* ARG4 基因插入失活, 因此, 只能利用较弱的 AOX2 进行甲醇的代谢, 在甲醇作为碳源时生长缓慢(Mut^s, methanol utilization slow phenotype); 菌株 *P. pastoris* SMD1168 为蛋白酶缺陷型(Protease-deficient), 该表达系统可防止外源蛋白被宿主蛋白酶降解, 从而保持完整的生物学活性^[19]。本研究通过分泌型表达载体 pPIC9K, 在上述 3 种不同表型的 *P. pastoris* 中成功构建 rtPA 表达体系, 经鉴定 rtPA 蛋白分子量约为 43 kD, rtPA-GS115 和 rtPA-KM71 均在 39 kD 处有特异性条带, 可能为未经糖基化的目标蛋白或糖基化后又降解的蛋白条带, 具体来源尚有待研究; rtPA-GS115 在 32 kD 处有轻微降解条带, 而 rtPA-SMD1168 无降解现象, 且 rtPA-SMD1168 比活性较 rtPA-GS115 高 27%, 说明宿主蛋白酶缺失可有效避免目标蛋白的降解, 保持产物的生物学活性; rtPA-KM71 表达量和活性均为最低, 说明强

AOX 启动子更有利于目标蛋白的表达, 但高表达也加速了产物的降解。

综上所述, 从产物活性角度分析, *P. pastoris* SD1168 可作为 rtPA 的最佳表达体系; 邹敏等^[8,20]通过改变 *P. pastoris* GS115 的诱导培养条件, 抑制蛋白酶活性, 有效控制了 rtPA 的降解, 因此, 在控制宿主蛋白酶活性、减少产物降解的前提下, *P. pastoris* GS115 也是 rtPA 表达的优选体系。

参 考 文 献

- [1] Li M, Ma AY, Wang YJ, et al. The site-directed mutagenesis of rPA(K) and transient expression of its eukaryotic expression vector in COS-7[J]. Journal of Ningxia University (Natural Science Edition), 2008, 29(4): 340-342 (in Chinese)
李敏, 马爱瑛, 王玉炯, 等. rPA(K)的定点突变及其真核表达载体在 COS-7 细胞中的瞬时表达[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2008, 29(4): 340-342
- [2] Li SJ, Shi RZ, Bai YP, et al. Targeted introduction of tissue plasminogen activator (TPA) at the AAVS1 locus in mesenchymal stem cells (MSCs) and its stable and effective expression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 437(1): 74-78
- [3] Zhou XY. Construction of a Reteplase, its mutants and expression in *E. coli* and CHO cells[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2006 (in Chinese)
周雪艳. 瑞替普酶(rPA)及其突变体的构建和在大肠杆菌与 CHO 细胞中的表达研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2006
- [4] Laing ST, Moody MR, Kim H, et al. Thrombolytic efficacy of tissue plasminogen activator-loaded echogenic liposomes in a rabbit thrombus model[J]. Thrombosis Research, 2012, 130(4): 629-635
- [5] Marcos-Contreras OA, Ganguly K, Yamamoto A, et al. Clot penetration and retention by plasminogen activators promote fibrinolysis[J]. Biochemical Pharmacology, 2013, 85(2): 216-222
- [6] Yang ZH, Zhou XH, Zhu JM. An overview of development of thrombolytic drugs[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2015, 28(8): 875-879 (in Chinese)
杨正浩, 周晓红, 朱俊铭. 溶血栓药物的发展概况[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(8): 875-879
- [7] Hu LQ, Zheng W, Zhong Y, et al. Comparison of expression and activity of antiviral protein RC28 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. China Biotechnology, 2017, 37(1): 14-20 (in Chinese)
胡立强, 郑文, 钟芝, 等. 抗病毒蛋白 RC28 在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达及活性比较[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(1): 14-20
- [8] Zou M, Chu J. Expression of reteplase in recombinant *Pichia pastoris*[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 15(3): 172-175 (in Chinese)

- 邹敏, 储炬. 基因重组毕赤酵母表达瑞替普酶的研究[J]. 药物生物技术, 2008, 15(3): 172-175
- [9] Fang SG, Chu J, Huang L, et al. Effects of temperature on expression of reteplase in *Pichia pastoris*[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(4): 11-15 (in Chinese)
方曙光, 储炬, 黄立, 等. 温度对巴斯德毕赤酵母表达瑞替普酶(Reteplase)的影响[J]. 工业微生物, 2007, 37(4): 11-15
- [10] Dou WF. Construction, expression and purification of the long-term fusion protein GGH and its preliminary pharmacodynamic and pharmacokinetics[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2008 (in Chinese)
窦文芳. 长效融合蛋白 GGH 的构建、表达、纯化及其初步药效学和药代动力学[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2008
- [11] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Translated by Huang PT. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2002: 1595-1596 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 1595-1596
- [12] He YY, Luo XG, Ni M, et al. Expression of reteplase in *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2015, 30(1): 19-24 (in Chinese)
何影影, 罗学刚, 倪萌, 等. 瑞替普酶在乳酸乳球菌中的表达[J]. 天津科技大学学报, 2015, 30(1): 19-24
- [13] Obukowicz MG, Gustafson ME, Junger KD, et al. Secretion of active kringle-2-serine protease in *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 1990, 29(41): 9737-9745
- [14] Wang JX, Guan YX, Yao SJ. Preparation of recombinant reteplase inclusion bodies in *E. coli* and its refolding *in vitro*[J]. CIESC Journal, 2015, 66(2): 709-716 (in Chinese)
王俊雄, 关怡新, 姚善泾. 重组瑞替普酶包涵体制备及其体外复性[J]. 化工学报, 2015, 66(2): 709-716
- [15] Wang W, Zou WY, Fan QL, et al. Reteplase fusion protein: expression, purification and the effect of chaperones on its renaturation[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2013(11): 1287-1291 (in Chinese)
王伟, 邹文艺, 范清林, 等. 瑞替普酶融合蛋白的表达、纯化及分子伴侣对其复性的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2013(11): 1287-1291
- [16] Zhuo XF, Guan YX, Yao SJ. Soluble expression of recombinant reteplase in *Escherichia coli* by co-expression of disulfide bond isomerase DsbC[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2015, 29(3): 600-606 (in Chinese)
褚孝发, 关怡新, 姚善泾. 二硫键异构酶 DsbC 介导重组瑞替普酶在 *E. coli* 中可溶表达[J]. 高校化学工程学报, 2015, 29(3): 600-606
- [17] Cregg JM, Cereghino L, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Molecular Biotechnology, 2000, 16(1): 23-52
- [18] Wang YY, Chen GJ, Qiao G, et al. Preparation of r-ETI affinity chromatography media and its application on purification of reteplase[J]. Food and Drug, 2005, 7(4): 34-36 (in Chinese)
王艳艳, 陈冠军, 乔刚, 等. 重组 ETI 亲和树脂的制备及其纯化瑞替普酶的研究[J]. 食品与药品, 2005, 7(4): 34-36
- [19] Ramón R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 130(1): 39-46
- [20] Zou M, Fang SG, Huang L, et al. Control of reteplase degradation during expression process by *Pichia pastoris*[J]. Industrial Microbiology, 2006, 36(2): 7-11 (in Chinese)
邹敏, 方曙光, 黄立, 等. 重组毕赤酵母表达瑞替普酶(Reteplase)过程中的降解控制[J]. 工业微生物, 2006, 36(2): 7-11