

人白血病抑制因子基因在酵母中的融合表达*

王全忠, 杨 林, 欧阳菁, 龙紫新, 王珣章

(中山大学生物医药中心//生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 用 PCR 突变的方法使人白血病抑制因子基因的终止密码子缺失, 并与质粒 pPICZaA 上的 *myc* 表位及 6 个组氨酸处于同一读码框, 构建融合表达载体 pPICZaA-hLIFTM. 通过氯化锂化学转化法使表达载体整合到毕赤巴斯德酵母 X-33 的基因组 DNA 中, 转化子经甘油增菌和甲醇诱导, 实现了 hLIF 基因在毕赤酵母表达载体系统中的表达. SDS-PAGE 检测和 Western blot 分析结果表明在相对分子质量为 61 000 处有一条人白血病抑制因子特异蛋白带. 凝胶薄层扫描分析结果显示表达的目的蛋白占培养液上清总蛋白的 33.3%. 且该表达产物具有抑制小鼠畸胎瘤细胞 F9 克隆形成的活性.

关键词: 人白血病抑制因子基因; 毕赤酵母; 融合表达; 生物活性测定

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 05-0096-04

人白血病抑制因子 (human leukemia inhibitory factor, hLIF) 是一种具有广泛生物学活性的细胞因子, 它能与其它细胞因子一起构成一个复杂的细胞因子网络, 对机体发生调控作用, 是机体防御和修复的重要成分. hLIF 的基因结构、蛋白质结构、受体及其作用机制均已得到初步研究. 尤其是在生殖系统^[1]、骨骼肌^[2]和造血系统^[3]中, 其生物学功能都充分显示了 hLIF 广阔的临床应用前景. 但是天然 hLIF 的分离提纯非常困难. 作为生产真核异源蛋白的宿主菌, 酵母融合了分子遗传操作、原核微生物的生长性质及真核蛋白的翻译后加工修饰等特点, 因而近年来已被成功地应用于多种异源蛋白的商业化生产. 其中 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母) 是第一个作为异源蛋白基因表达系统并加以应用的酵母, 但 *Saccharomyces cerevisiae* 并非表达外源基因的最理想的酵母宿主菌. 在酿酒酵母中表达产生的外源蛋白由于具有高抗原性, 被引入到哺乳动物会发生强烈的致敏反应, 因而已被禁止作为医用. 毕赤酵母产生的蛋白虽然也是 N-糖基化, 并以甘露糖居多, 但长度短得多, 一般为 8~14 个残基, 不会产生过度糖基化现象^[4], 因此在生产外源蛋白方面有明显的优势. 所以我们利用基因工程的方法, 在 hLIF 基因^[5]的羧基端融合了一个由 *myc* 表位和 6 个组氨酸形成的标签, 并使其在毕赤酵母中进行表达, 为进一步的理论研究和临

床应用打下了基础.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌种、质粒和细胞 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10F', 毕赤巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*) X-33, 载体 pPICZaA 均购自 Invitrogen 公司; 小鼠畸胎瘤细胞 F9 购自中科院上海细胞生物所; 质粒 pUC18-hLIF 为本室保存.

1.1.2 酶与试剂 所有限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺均购自 Promega 公司; RNase A、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为华美生物工程公司产品; 硝酸纤维素膜购自 Schleicher&Schuell 公司; QIA quick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司; α -factor 引物、5' AOX1 引物、3' AOX1 引物、YNB、Biotin、抗生素 ZeocinTM、Easy SelectTM Pichia Expression Kit 购自 Invitrogen 公司; AutoreadTM Sequencing Kit 购自 Pharmacia 公司.

1.2 方 法

1.2.1 PCR 扩增 参照试剂盒的说明.

1.2.2 质粒 DNA 的提取与纯化、酶切片段的制备、连接与转化、SDS-PAGE 和 Western blot 按文献 [6] 的方法进行.

1.2.3 酵母细胞的转化、酵母基因组 DNA 的提

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800108)

收稿日期: 2000-11-24; 作者简介: 王全忠 (1968-), 男, 硕士; 通讯联系人: 王珣章.

取、转化子的 PCR 鉴定、Mut 表型的筛选、酵母细胞的甘油增菌和甲醇诱导表达 按 Invitrogen 公司的 Easy Select™ *Pichia* Expression Kit 的说明进行。

1.2.4 克隆形成抑制实验 参见文献 [7].

2 结果

2.1 hLIF 基因羧基端的 PCR 突变

设计合成 3' 端引物序列: 5' - TTG TTC TAG ACA GAA GGC CTG G - 3', 将终止密码子 TGA 诱变为 TG, 并使 hLIF 基因的读码框与载体

a: 3' GGTC CGG AAG AC A GAT CTT GTT 5'
b: 5' ***** CAG GCC TTC TGA T CTA GAA CAA ***** (CAT) × 6 TGA 3'
LIF 基因部分 *** *Xba* I *myc* epitope (His)₆ ***

图 1 用于 PCR 反应的 3' 端引物设计策略

Fig.1 Strategy of 3' primer design for PCR

a: 3' Primer sequence(3' - 5') b: Partial sequence of the hLIF gene and *myc* epitope and (His)₆

2.2 融合表达载体 pPICZαA-hLIF^M 的构建与鉴定

PCR 产物经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后插入到 pPICZαA 的 *Xho* I + *Xba* I 双酶切窗口中, 构建融合表达载体 pPICZαA-hLIF^M (图 2). 用 *Xho* I + *Xba* I 进行双酶切鉴定, 证明为所需的重组质粒 (图 3). 利用 5' AOX1 引物和 3' AOX1 引物对重组的 pPICZαA-hLIF^M 进行全序列测定, 结果表明 hLIF 基因的羧基端已成功突变, 且其它碱基均与预期的相同。

2.3 表达载体 pPICZαA-hLIF^M 对毕赤酵母的转化及转化子的筛选和鉴定

将 5 ~ 10 μg pPICZαA-hLIF^M 回收纯化, 用 *Sac* I 酶切使之线性化后, 通过氯化锂化学转化法转化至宿主菌 *Pichia pastoris* X-33 中. 经 Mut 分型后, 筛选出 Mut⁺ 转化子, 提取转化子的基因组 DNA, 利用 α-factor 引物和 3' AOX1 引物进行 PCR 鉴定. 结果显示用 *Sac* I 酶切使之线性化的载体 pPICZαA-hLIF^M 已经成功地整合到酵母细胞的基因组中 (图 4). 提高培养基中抗生素 Zeocin™ 的浓度至 500 μg/mL, 筛选到 5 个含多拷贝表达单元的转化子。

2.4 hLIF^M 基因在毕赤酵母中的表达及表达产物的检测

利用甘油增菌及甲醇诱导两个步骤进行 hLIF 基因在重组酵母细胞中的表达。

pPICZαA 用于检测和纯化的 *myc* 表位及多聚组氨酸标签的读码框一致 (图 1). 用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pUC18-hLIF, 回收带 hLIF 基因的小片段, 并将其插入到 pPICZαA 的 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切窗口中, 构建得到可融合表达 hLIF 基因的重组表达载体 pPICZαA-hLIF. 以该重组质粒为模板, α-factor 引物和合成的 3' 端引物为 PCR 引物, 根据运行程序: 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 10 min 进行 PCR. 电泳结果显示, PCR 产物大小约为 575 bp, 与预期大小一致。

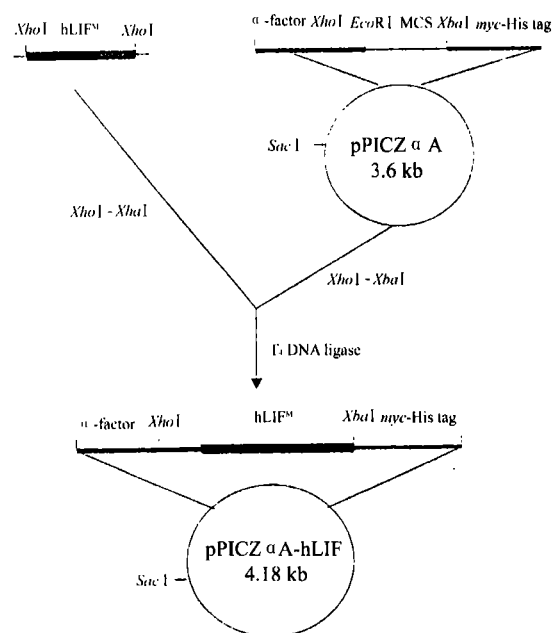


图 2 重组质粒 pPICZαA-hLIF^M 的构建

Fig.2 Construction of recombinant pPICZαA-hLIF^M

α-factor: α-factor signal sequence and priming site

MCS: multiple cloning site

myc + His tag: *myc* epitope tag and 6 × His tag

在甲醇诱导后 96 h 内不同时间取样, 重组酵母细胞培养液上清经 SDS-PAGE 检测及 Western blot 分析, 均未能见目的蛋白带. 在培养基中加入 *w* = 1% 的盐酸干酪素后, 经 SDS-PAGE 检测发现, 甲

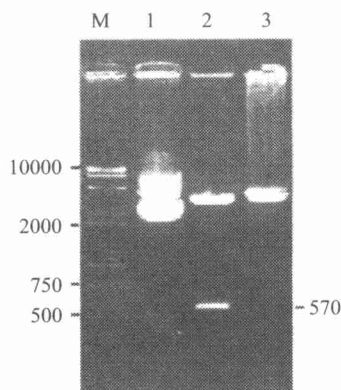


图3 重组质粒 pPICZαA-hLIF^M 的酶切鉴定

Fig.3 Characterization of recombinant pPICZαA-hLIF^M by *Xho* I / *Xba* I digestion

M DNA marker; 1 pPICZαA-hLIF^M;
2 pPICZαA-hLIF^M / *Xho* I / *Xba* I ;
3 pPICZαA-hLIF^M / *Sac* I

醇诱导 24 h 后即有表达产物出现,其相对分子质量约为 61 000,与预期的大小相符.诱导 48 h 后表达量最高.

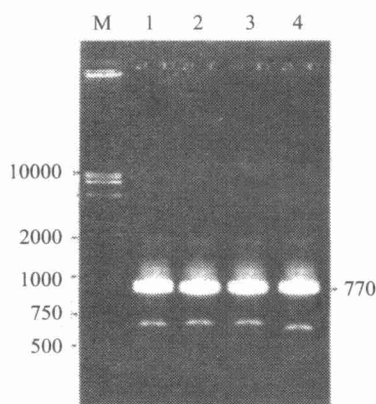


图4 重组酵母转化子的 PCR 切鉴定

Fig.4 Characterization of recombinant transformants by PCR
M DNA marker;

1~4 酵母转化子基因组 DNA 的 PCR 产物

Western blot 分析结果显示,培养液上清中 61 000 有一条人白血病抑制因子特异性反应带,而作为阴性对照的酵母培养液上清的免疫印迹结果为阴性(图 5).

2.5 表达效率测定

将诱导表达 48 h 的培养液上清的 SDS-PAGE 凝胶经用日本岛津 CS 双波长薄层扫描仪扫描检测可知,重组 hLIF 约占上清中可溶蛋白的

33.3%.

2.6 生物活性测定

克隆形成试验结果表明:当小鼠畸胎瘤细胞 F9 培养液含有 $\varphi = 2\%$ 表达培养液上清时,表达产生的 hLIF 对约 32% 的细胞克隆形成有明显的抑制作用.

3 讨论

糖类是体现大分子抗原性的重要物质.糖链与多肽形成糖蛋白,在机体中发挥重要的生物学功能.糖蛋白中的糖链和肽链的连接不是任意的,一定结构特征的糖链只能和肽链中特定的氨基酸残基相连.最常见的连接方式有两种:N-糖苷键和 O-糖苷键.分泌蛋白上的糖类结构具有菌特异性.酿酒酵母分泌的重组蛋白的 N-Asn 相连的寡糖链长达 50~150 个甘露糖残基,且核心寡糖链末端多以 α -1,3 聚糖形式连结^[4].在酿酒酵母中表达产生的外源蛋白被引入到哺乳动物会发生强烈的致敏反应,不适宜作为医用.毕赤酵母产生的蛋白不会产生过度糖基化现象^[4],因此在生产外源蛋白方面有明显的优势.Gearing 等曾将人白血病抑制因子基因在酿酒酵母细胞中表达,其产物的相对分子质量为 67 000~150 000^[8],而天然的 hLIF 大小为 58 500.本实验利用毕赤酵母表达的 hLIF 相对分子质量与天然产物的大小相近,并具有明显的均一性.同时,表达产物的糖基化程度较低,由此可推测毕赤酵母细胞和高等真核细胞中蛋白的糖基化过程具有相似性,利用毕赤酵母细胞生产的重组将有利于临床应用的研究.

本实验利用的载体 pPICZαA 其多克隆位点前带有 α -factor 信号肽序列,该信号肽序列在分泌过程中可被有效切除,加之 *Pichia pastoris* 仅分泌很低水平的自身蛋白,更有利于重组 hLIF 的分离纯化.羧基端的 myc 表位及多聚组氨酸也为后期的检测和纯化工作提供了方便.虽然羧基端多出了 22 个氨基酸,但 Western blot 分析结果显示,融合表达的 hLIF 同样具有免疫原性;生物活性测定实验结果也表明,重组表达产物对小鼠畸胎瘤细胞 F9 的克隆形成有明显的抑制作用.加之,表达的 hLIF 约占上清中可溶蛋白的 33.3%,因而具有产业化潜力.

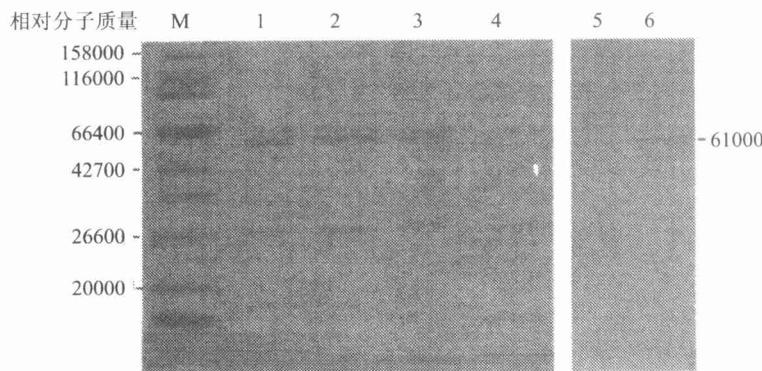


图5 表达产物 hLIF 的 SDS-PAGE 检测和 Western blot 分析

Fig.5 SDS-PAGE and Western blot analysis of the expressed hLIF

M Mid-range protein molecular marker;

1 ~ 3 SDS-PAGE of supernatants from cultured recombinant cells transformed by pPICZαA-hLIF^M from 36, 48, 72 h;

4 SDS-PAGE of supernatants from cultured cells transformed by pPICZαA from 48 h;

5 Western blot of supernatants from cultured cells transformed by pPICZαA;

6 Western blot of supernatants from cultured recombinant cells transformed by pPICZαA-hLIF^M

参考文献:

- [1] ARICI A, ENGIN O, ATTAR E, et al. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(6): 1908 - 1915.
- [2] KUREK J B, BOWER J J, ROMANELLA M, et al. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration[J]. Muscle Nerve, 1997, 20(7): 815 - 822.
- [3] MAYER P, GEISLER K, WARD M, et al. Recombinant human leukemia inhibitory factor induces acute phase proteins and raises the blood platelet counts in nonhuman primates[J]. Blood, 1993, 81(12): 3226 - 3233.
- [4] GRINNA L S, TSCHISTIL R H. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1989, 5: 107 - 115.
- [5] 杨林, 王全忠, 吴无畏, 等. 人白血病抑制因子(hLIF)基因的人工合成[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(增刊): 86 - 89.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANITIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: CSH Press, 1989. 1 - 200.
- [7] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养(第二版)[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996. 183 - 184.
- [8] GEARING D P, GOUGH N M, NICHOLAS M, et al. Recombinant method for making leukemia inhibitory factor [M]. United States Patent, 1995.

Fusion Expression of Human Leukemia Inhibitory Factor Gene in Yeast

WANG Quan-zhong, YANG Lin, OUYANG Jing, LONG Qing-xin, WANG Xun-zhang

(Biopharmaceutical Center, State Key Laboratory for Biological Control,

Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The termination codon of human leukemia inhibitory factor gene was deleted by PCR mutation, in order to put the gene into the same reading frame together with the *myc* epitope and 6 × His tag in the expression vector pPICZαA. The constructed expression vector pPICZαA-hLIF^M was integrated into the genomic DNA of *Pichia pastoris* X-33. SDS-PAGE and Western blot analysis of the culture supernatants showed that hLIF gene were expressed as a 61 000 fused protein with the desired immunogenicity. Density scanning of the SDS-PAGE gel revealed that the targeted protein accounted for 33.3% of the total protein in the supernatants and reached highest level after 48hrs of methanol induction. The expressed products can inhibit the clone formation of murine's teratoma cells F9.

Keywords: human leukemia inhibitory factor gene; *Pichia pastoris*; fusion expression; bioactivity assay