

人白介素-12(P40) 亚基在巴斯德毕赤酵母中的表达^{*}

陈新华¹, 杨 林¹, 陈曲侯², 王^王章¹, 龙紫新¹
(1. 中山大学生物防治国家重点实验室/生物医药中心, 广东 广州 510275;
2. 华中师范大学昆虫研究所, 湖北 武汉 430079)

摘 要: 运用PCR技术特异性地扩增了人IL-12p40亚基cDNA的编码区序列, 得到940 bp的扩增片段, 将其克隆于毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达载体pPICZαC的Cla I, Xba I位点, 构建成重组表达质粒pPICZαC-p40。经LiCl₂转化, Zeocin抗性筛选, 得到含多拷贝p40基因的酵母工程菌*Pichia pastoris* X-33/p40, 在φ=0.5%甲醇诱导下, p40基因得到了分泌型表达, 培养上清的SDS-PAGE及Western-blot均显示表达产物相对分子质量约44 000, 与预计大小相符, 薄层凝胶扫描结果表明, 分泌型表达蛋白占培养上清总蛋白量质量的47%。

关键词: IL-12; P40亚基; *Pichia pastoris*; 表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 02-0072-04

白介素-12 (IL-12) 是人体内具有多种生物学活性的免疫调节因子, 由P35和P40两个亚基经多对二硫键连接而成。其中P40亚基基因全长20 kb, 编码区为984 bp, 其开放读码框由328个氨基酸组成, 成熟P40蛋白相对分子质量约34 700, 它可以单体或二聚体形式存在, 其功能是与细胞受体结合。目前认为P40蛋白无IL-12的生物学功能, 但可作为IL-12在体内外的调节因子, 抑制或增强IL-12的功能活性^[1]。在正常人体血液中P40蛋白以一定质量浓度存在, 但在某些病理情况下, 如多发性硬化症, 自身免疫性疾病及某些炎症等等, 血液中P40蛋白的质量浓度出现明显的变化^[2, 3]。因此, 人血液中P40蛋白的检测对于某些疾病的诊断具有重要意义。

本文以p40 cDNA为模板, 运用PCR技术特异性地扩增了p40基因中940 bp的编码区序列, 并利用*Pichia pastoris*表达系统进行了分泌型表达, 为进一步研究P40亚基的体内、体外功能以及临床应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 pEDp40质粒

包含人IL-12p40cDNA 2.3 kb的基因序列, 由本室保存。

1.2 Easy Select[™] Pichia Expression

kit 购于Invitrogen公司, 其中包括*Pichia*表达载体系列, *Pichia pastoris*菌株X-33, *E. coli*菌株Top10^F等。

1.3 工具酶与试剂

限制性内切酶, TaqDNA聚合酶, T4DNA连接酶, Qiaquick DNA回收kit, 鼠抗人P40蛋白单克隆抗体, 酶标二抗, Zeocin抗生素、生物素、酵母培养基等为Promega、Gene、GiBco、Invitrogen、华美生物工程公司产品。

1.4 引物的设计及PCR扩增

引物的核苷酸序列:

P1 AGCATCGATCATATGGGAAGTGAAGAAAG

P2 TGAAGATCTTCACTGCAGGGCACAGATGC

反应程序: 95℃变性1 min; 60℃复性1 min; 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸10 min; PCR产物经ρ=0.8%琼脂糖凝胶电泳进行分析, 用Qiaquick DNA回收kit回收和纯化。

1.5 重组表达载体的构建

DNA重组操作参照文献^[4]进行。经Zeocin抗性筛选得到含目的基因的重组表达载体。

1.6 核苷酸序列测定

利用Easy-Select Pichia Expression kit提供的5' Aox1引物和3' Aox1引物, 在ABI自动测序仪上进行序列测定。结果经DNASIS软件进行分析。

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (960059)

收稿日期: 2000-05-19; 作者简介: 陈新华 (1968—), 男, 博士研究生, 通讯联系人: 王^王章

1.7 含 *p40* 基因酵母工程菌的构建

LiCl_2 转化、Zeocin 抗性筛选及表型筛选按 Easy-Select *Pichia* Expression kit 说明书进行。

1.8 *p40* 基因的诱导表达

将酵母工程菌 *Pichia pastrius* X-33/*p40* 单菌落接种于 25 mL BMGY 中 ($\rho=1\%$ 酵母膏, $\rho=2\%$ 蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸钾, pH 6.0, $\rho=1.34\%$ YNB, 4×10^{-5} 生物素, $\varphi=1\%$ 甘油), 30 $^{\circ}\text{C}$ 300 r/min 振摇培养至 A_{600} 至 2~6。室温下以 4 500 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 BMMY (BMGY 中 $\varphi=1\%$ 甘油由 $\varphi=0.5\%$ 甲醇代替) 50 mL 重悬后, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 300 r/min 培养以诱导表达, 每 24 h 补加甲醇至终体积分数为 0.5%, 并分别于 12, 24, 48, 72 和 96 h 分别收集培养物 1 mL, 12 000 r/min 离心 2 min, 转上清至洁净 EP 管中于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.9 表达产物的鉴定

参照文 [4] 的方法进行, 取不同时间培养上清进行 SDS-PAGE, 然后以鼠抗人 P40 蛋白单克隆抗体作蛋白质印迹反应, 以分析蛋白质的表达情况。

2 结果与分析

2.1 P40 蛋白编码区序列的扩增

为了获得 P40 亚基的分泌型表达, 便于表达产物的纯化, 在引物设计时, 去除了 *p40* 基因自身的信号肽编码序列, 同时消除了 *p40* 基因的终止子, 以使其与载体 pPICZ α C 3' 端 myc 表位、6xHistag 融合表达, 并在两条引物 5' 端分别引入 *Cla* I、*Xba* I 位点, 以便于克隆。PCR 扩增产物经 $w=0.8\%$ 琼脂糖凝胶检测, 发现有一条 940 bp 左右的条带 (如图 1), 与预计大小相符^[4]。

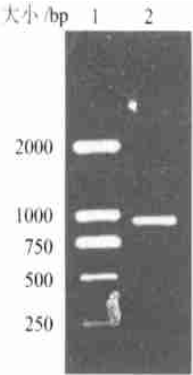


图 1 *p40* 基因编码区的 PCR 扩增结果
Fig 1 PCR amplification of *p40* gene coding region
1 DL-2000 DNA 分子标准;
2 PCR 产物

2.2 重组表达载体 pPICZ α C-*p40* 的构建

重组表达载体 pPICZ α C-*p40* 的构建路线如图

2 所示, 其中 pPICZ α C 多克隆位点上游依次为 5' Aox1 启动子区域, α -Factor 信号肽编码区, 1 个 *kex2* 及 2 个 *ste13* 信号肽切割区, 下游为 6xHis tag, 3' Aox1 转录终止区等, 将上述回收片段经 *Cla* I / *Xba* I 酶切后插入 pPICZ α C 的 *Cla* I、*Xba* I 位点之间。 *Cla* I / *Xba* I 双酶切鉴定及 PCR 扩增显示 *p40* 基因得到正确插入, 结果如图 3 所示。

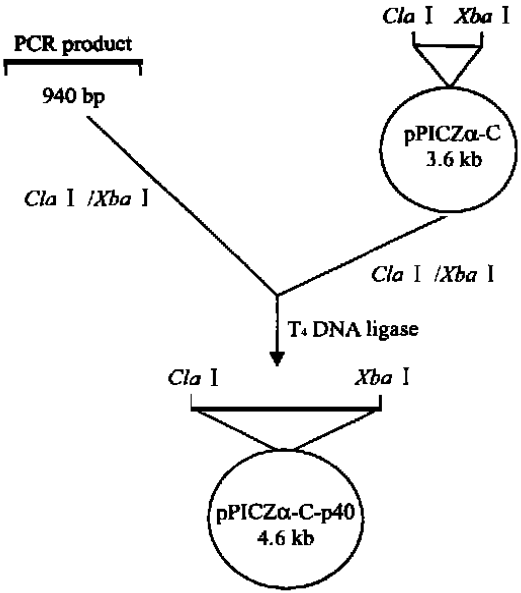


图 2 重组表达载体的构建路线图

Fig 2 Construction of the recombinant expression vector

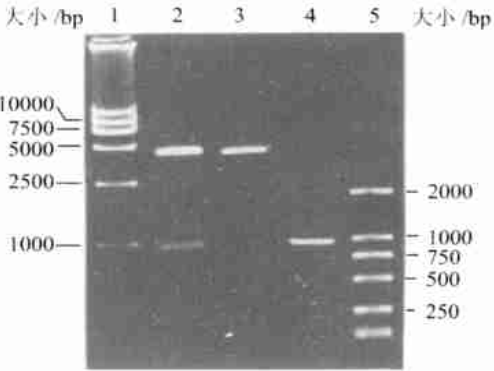


图 3 pPICZ α C-*p40* 双酶切及 PCR 鉴定

Fig 3 Characterization of pPICZ α C-*p40* *Cla* I / *Xba* I digestion and PCR amplification

- 1 DL-15 000 DNA 分子标准;
- 2 pPICZ α C-*p40* *Cla* I / *Xba* I 的酶切产物;
- 3 pPICZ α C *Cla* I / *Xba* I 的酶切产物;
- 4 pPICZ α C-*p40* 的 PCR 扩增产物;
- 5 DL-2 000 DNA 分子标准

2.3 核苷酸序列测定

对重组表达载体 pPICZ α C-*p40* 的测序结果表

明, 亚克隆至 pPICZ α C 载体的 *p40* 基因完全正确。

2.4 含多拷贝 *p40* 基因酵母工程菌 *Pichia pastoris* X-33/*p40* 的构建

将经 *Cla*I 酶切线性化的 pPICZ α C-*p40* 重组质粒经 LiCl₂ 转化法导入 X-33 感受态细胞, 并通过同源交换插入 X-33 细胞基因组 *Aox1* 区域, 替换酵母天然的 *Aox1* 基因, 经高浓度 Zeocin (500 μ g/mL) 抗性筛选得到整合有多拷贝 *p40* 基因的酵母工程菌 *Pichia pastoris* X-33/*p40* 菌株, 经表型筛选及 PCR 证实后作表达分析。

2.5 *p40* 基因的表达与鉴定

Pichia 酵母系统采用对数生长期菌体, 通过甲醇诱导表达异源蛋白^[5], 挑取 *Pichia pastoris* X-33/*p40* 单菌落于 BMGY 中活化, 转移菌体到 BMMY 中, 于 28 $^{\circ}$ C 振荡培养, 在 $\varphi=0.5\%$ 甲醇诱导下, *p40* 基因得到分泌型表达, 分别于 12, 24, 48, 72, 96 h 收集上清进行 SDS-PAGE, 结果显示在 44 000 处有特异性蛋白条带出现, 如图 4, 用鼠抗人 P40 亚基单克隆抗体作 Western-blot 分析, 表明在 44 000 处有印迹带出现, 如图 5, 从而证明 P40 蛋白得到了分泌型表达。薄层凝胶扫描发现此表达蛋白占上清总蛋白质量的 47%, 其中 72 h 表达量最高。

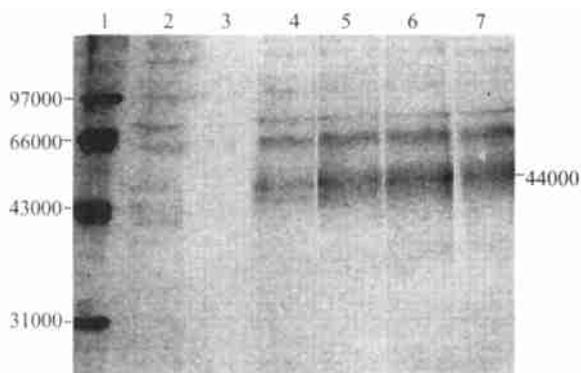


图 4 *P40* 蛋白表达时相的 SDS-PAGE 分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis for time-course expression of P40

1 中等相对分子质量标准蛋白;

2 *Pichia pastoris* X-33/ *pPICZ α C* 72 h;

3 *Pichia pastoris* X-33/ *p40* 12 h 表达上清;

4 *Pichia pastoris* X-33/ *p40* 24 h 表达上清;

5 *Pichia pastoris* X-33/ *p40* 48 h 表达上清;

6 *Pichia pastoris* X-33/ *p40* 72 h 表达上清;

7 *Pichia pastoris* X-33/ *p40* 96 h 表达上清;

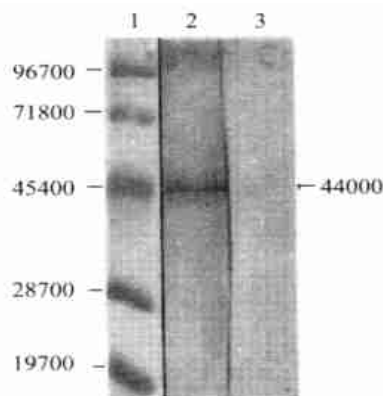


图 5 表达产物的 Western-blot 分析

Fig 5 Western-blot analysis of expression products

1 中等相对分子质量标准蛋白;

2 *Pichia pastoris* X-33/ *pPICZ α C* 72 h 表达上清;

3 *Pichia pastoris* X-33/ *p40* 72 h 表达上清

3 讨论

Pichia pastoris 表达系统是近年建立起来的一种新型真核表达系统。该系统不仅表达产量高, 具有真核表达系统的蛋白质翻译后修饰功能, 而且操作简便、快速^[6], 因而愈来愈受到人们的重视。本文利用该系统成功地表达了人 IL-12 P40 亚基, 培养上清的 SDS-PAGE 及 Western-blot 均显示了分泌型表达蛋白的相对分子质量为 44 000, 而以 *pPICZ α C* 空载体对照转化菌则检测不到蛋白条带, 采用薄层凝胶扫描分析了不同时间的表达情况, 发现在甲醇诱导 48 h 后 *p40* 蛋白表达量有一较大的提高, 其中 72 h 的表达量最高。实验中对增加起始菌浓度以增加表达量做了一些尝试, 发现起始菌浓度增加后, 表达量确有增加, 与文献报道一致^[7]。本实验对 *Pichia pastoris*/*p40* 工程菌的构建及表达, 为下一步研究 P40 蛋白的体内、体外功能及临床应用打下了基础。

(下转第 100 页)

Sequence Analysis and Characterization of a Novel cDNA Clone

ZHAO Gui-jun¹, HUANG Yu-shan¹, XIANG Meng-qing², Zhong Xiao-fen¹, XU An-long¹

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Pediatrics, Center for Advanced Medicine,

The State University of New Jersey at Rutgers, New Jersey. USA)

Abstract: A novel cDNA was discovered through the screening of a human fetal heart library. Genbank searching and blasting suggested that the cDNA sequence probably encodes a novel protein belonging to A—Kinase Anchoring Protein (AKAP) family and its predicted protein sequence shows 71% similarity with AKAP95. RII—binding site in its 3' terminal was also found by Blasting with Genbank database. The sequence was found to be included in Cosmid R33907 and F20900 originated from Q13.1 locus in Chromosome 19, suggesting that this gene locate in Q13.1 on Chromosome 19 and interestingly neighbors with AKAP95.

Keywords: novel cDNA; PKA; AKAP; BLAST

(上接第 74 页)

参考文献:

- [1] 梁国栋. 白细胞介素-12 的研究进展[J]. 病毒学报, 1997, 13(3): 291—295.
- [2] HEESSEN C, SIEVERDING F, SCHOSER B G, et al. Interleukin-12 is detectable in sera of patients with multiple sclerosis: association with chronic progressive disease course? [J]. Eur J Neural, 1999, 6(5): 519—596.
- [3] SAM H, STEVENSON M M. Early IL-12 p70, but not p40, production by splenic macrophages correlates with host resistance to blood-stage plasmodium chabaudi AS malaria[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 117(2): 343—349.
- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning[M]. A laboratory manual, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [5] MCGREW J T, LEISKE D, DELL B, et al. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: Use of a rapid method to detect high-level expressing transformants[J]. Gene, 1997, 187: 193—200.
- [6] CREGG J M, HIGGINS D R. Production of foreign protein in yeast *Pichia pastoris*[J]. Canadian J, 1995, 73(Batary Supp): 5981—5987.
- [7] 邱荣德, 李士云, 陈俊刚, 等. 重组人血清白蛋白在 *Pichia pastoris* 中的表达与纯化[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 33(1): 59—62

Expression of Human IL—12 P40 Subunit in *Pichia pastoris*

CHEN Xin-hua¹, YANG Lin¹, CHEN Qu-hou², WANG Xun-zhang¹, LONG Qing-xin¹

(1. State Key Lab for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Institute of Entomology, Central-China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: A 940 bp coding fragment of human IL-12 p40 gene was amplified via PCR technique and then cloned into *Pichia pastoris* expression vector pPICZαC. After transforming the linearized recombinant expression vector into the yeast strain X-33, we obtained the engineered yeast strain *Pichia pastoris* X-33/p40. The p40 gene was secretly expressed after induction with 0.5% methanol. Both the result of SDS-PAGE and Western-blotting proved a 44 000 protein band in the supernatant of medium. Gel scanning revealed the expression product accounted for 47% of the total supernatant protein.

Keywords: hIL-12 P40 subunit; *Pichia pastoris*; expression