

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0044-04

人 hIGF-1 在 *Pichia pastoris* 酵母中的分泌表达及表达产物的鉴定*

彭鸿娟^{1,2}, 李 明¹, 杨 林², 陈晓光¹, 陈新华², 王珣章²

(1. 第一军医大学热带军队卫生学系, 广州 510515;

2. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要: 根据人 IGF-1 (Human Insulin-like Growth Factor-1, hIGF-1) 的天然基因序列, 在尽量保存原基因序列的基础上, 将一些密码子换成 *Pichia pastoris* 酵母的偏爱密码子, 人工合成 hIGF-1 双链 DNA. 将此合成基因整合入 X-33 酵母的染色体上, 用 Zeocin⁺ 平板筛选得到重组菌株. 以胞外分泌的方式表达了 hIGF-1 蛋白, 表达产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳和 western-blot 分析, 得到该表达产物的相对分子质量约为 7 200.

关键词: hIGF-1; *Pichia pastoris*; 表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

人胰岛素样生长因子-1 (hIGF-1) 是一类多功能细胞增殖调控因子, 因在结构上与胰岛素原 (proinsulin) 具有高度同源性而得名. hIGF-1 是 70 个氨基酸组成的单链多肽^[1]. 由于 hIGF-1 具有促进生长发育、促进物质代谢及降低血糖等作用, 与糖尿病关系密切, 近年来极受重视. hIGF-1 可作为治疗胰岛素抗性的糖尿病的有效药物, 在治疗神经损伤、糖尿病、生长迟滞、骨质疏松、分解代谢疾病等多种顽疾的治疗中应用前景广阔^[2]. 重组 hIGF-1 的生产是获得 hIGF-1 的有效手段, 国内外已有在原核、真核、哺乳动物及转基因动物中表达 hIGF-1 的报道^[3-6]. 在大肠杆菌中表达 hIGF-1 所面临的困难是表达的 hIGF-1 常以无活性的包涵体形式存在, 而包涵体复性的产率往往很低. 在哺乳动物表达系统中, 用 hIGF-1 和 GH 信号肽的融合基因转染小鼠成纤维细胞并获得了表达, 但表达后信号肽不能被正确切除, N 端发生不正确的加工, 影响了 hIGF-1 与血浆内 IGF 结合蛋白的结合, 从而降低了其体内半衰期^[7]. 酵母系统表达外源基因既具有原核生物发酵快速、简便的特点, 又具有真核生物对表达蛋白进行翻译后修饰的能力. 本文报道了 hIGF-1 在毕赤酵母中的表达及鉴定.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 基因和菌株 hIGF-1 基因由大连宝生物公司合成; JM109 大肠杆菌、X-33 *Pichia*

* 基金项目: 国家 1035 资助项目

收稿日期: 2000-10-14; 作者简介: 彭鸿娟 (1971~), 女, 讲师.

pastoris 酵母菌株及分泌表达质粒 pPICZaA 均购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂和工具酶 抗生素 Zeocin、鲑精 DNA、Biotin、yeast nitrogen base 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 *Sac* I、*Xho* I、*Xba* I、*Hind* III 购自广州华运生物工程公司; RNA 酶、蛋白胨、酵母粉购自华美生物工程公司。

1.1.3 电泳、转印材料及抗体 预染蛋白 marker、PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司; 羊抗人 hIGF-1 多抗购自 SIGMA 公司。HRP 标记驴抗羊多抗购自广州华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 hIGF-1 基因的人工合成 选择分泌表达载体 pPICZaA, 根据人 hIGF-1 天然基因序列, 在不改变氨基酸序列的前提下, 将一些密码子换成 *Pichia pastoris* 酵母的偏爱密码子。在合成基因的上游加上信号肽切割位点氨基酸的编码序列 (AAAAGAGAGGCTGA AGCT), 并在两端加上与载体质粒相匹配的 *Xho* I 与 *Xba* I 酶切位点, 克隆于 pBluescript 质粒上。

1.2.2 酵母表达载体的构建 将 pBluescript-hIGF-1 及 pPICZaA 质粒分别用 *Xho* I 与 *Xba* I 双酶切并将 hIGF-1 基因连接到 pPICZaA 上, 得到 pPICZaA-hIGF-1 重组质粒。

1.2.3 重组质粒的转化及甲醇快速利用型 (Mut⁺) 及缓慢利用型 (Mut⁻) 的筛选 按试剂盒操作手册中 LiCl 转化法的步骤进行。用含 100 μ g/mL 及 500 μ g/mL Zeocin 的 YPD 平板筛选出重组酵母株 X-33/pPICZaA-hIGF-1, 及 X-33/pPICZaA 作为对照。将长出的菌落挑于 MM 及 MD 板上, 判断该菌株对甲醇的利用类型, 为诱导表达时间提供依据。

1.2.4 酵母重组体的诱导表达 挑选一株在含 500 μ g/mL Zeocin 的 YPD 平板上生长的 X-33/pPICZaA-hIGF-1 (根据试剂盒说明, 有可能是高拷贝的菌株) 及 X-33/pPICZaA 空质粒转化对照株用于诱导表达。分别于 0、22、34、46、58、70、82、94 h 取出 1 mL 培养上清, 离心后将上清与沉淀分开并冻存于 -20 $^{\circ}$ C, 留待检测表达产物用。

1.2.5 SDS-PAGE 检验诱导表达结果及 Western-blot 鉴定表达产物 将 X-33/pPICZaA-hIGF-1 在不同诱导时间收集的上清液用 SDS-PAGE 分析 (上样量为 25 μ L, 浓缩胶为 5%, 分离胶浓度为 20%)。考马斯亮蓝染色, 紫外扫描分析系统分析相对分子质量。利用半干转印仪将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上, 一抗 (羊抗人 IgG 多抗) 反应 1.5 h, 二抗 (驴抗山羊 IgG 多抗) 反应 1.5 h, DAB 显色观察。

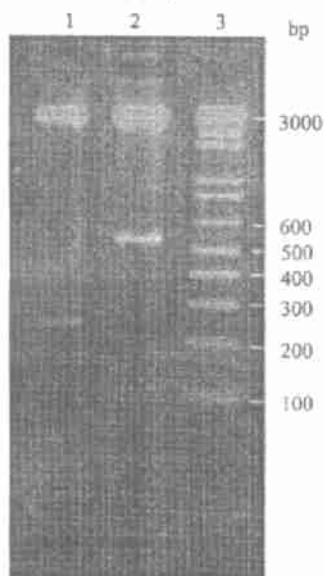


图 1 pPICZaA-hIGF-1 重组质粒的酶切鉴定图
1 pPICZaA-hIGF-1 被 *Xho* I 及 *Xba* I 酶切;
2 pPICZaA-hIGF-1 被 *Hind* III 及 *Xba* I 酶切;
3 DNA 标准

2 结果

2.1 分泌表达质粒 pPICZaA-hIGF-1 的构建及酶切鉴定

从低盐 LB Z⁺ 平板上筛选得到含 pPICZaA-hIGF-1 的 JM109 大肠杆菌, 经扩增后提质粒, 分别用两组酶进行双酶切鉴定, *Xho* I 与 *Xba* I 切后得到一个 243 bp 的片段, 而用 *Hind* III 与 *Xba* I 切后得到一个 555 bp 的片段, 与预期结果相符, 证明合成的 hIGF-1 基因已正确亚克隆入分泌表达质粒 pPICZaA 中 (见图 1)。

2.2 转化结果及甲醇快速利用型 (Mut⁺) 与甲醇缓慢利用型 (Mut⁻) 的筛选 (图略)

在 100 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin YPDS 平板上筛选出了 28 株重组酵母菌株, 而在 500 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin YPDS 平板上只筛出一株重组菌株. 甲醇利用型筛选发现所有的菌株均为 Mut⁺ 型.

2.3 SDS-PAGE 及 Western-blot 结果

500 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin YPDS 平板上筛出的重组菌株不同诱导时间表达产物的 SDS-PAGE 结果见图 2. 由图可见, 表达产物在 46 h 达到饱和, 其后的产物浓度保持在相似的水平.

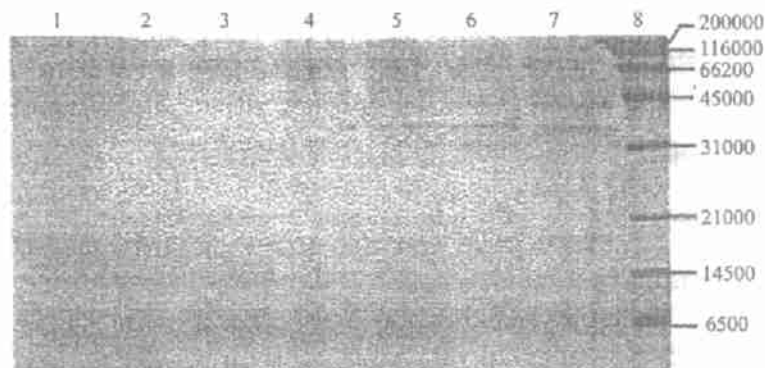


图 2 500 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin YPDS 平板上筛出的重组菌株不同诱导时间表达产物的 SDS-PAGE 图
诱导时间/h: 1 为 22; 2 为 34; 3 为 46; 4 为 58; 5 为 70; 6 为 82; 7 为 94; 8 标准蛋白

此株不同诱导时间的产物 Western-blot 图见图 3, 在 46 h 的表达产物的浓度与 96 h 的浓度相似, 因而可以印证 SDS-PAGE 的结果. 从 SDS-PAGE 及 Western-blot 的结果都可以说明该表达产物的相对分子质量约为 7 200.

3 讨 论

本研究在天然 hIGF-1 基因的基础上, 将一些在毕赤酵母中使用频率非常低的密码子换成其最偏爱的密码子, 人工合成 hIGF-1 基因. 以往主要是通过体外定点突变技术来修改密码子, 宋钢等为了在毕赤巴斯德酵母中表达人组织型纤溶酶原激活剂, 用体外定位突变技术改变了其 cDNA 的糖基化位点^[7], 但这种方法比较费时费力. 人工合成基因, 不仅快速、而且可以同时密码子进行大规模改造, 大大提高外源基因的表达水平, 但是因为人工合成基

因的费用较高, 较适合于碱基数少的基因. 表达外源基因的系统有原核表达系统、真核表达系统. 原核表达系统如大肠杆菌以发酵的方式, 快速、高效地表达外源性蛋白质, 其实际应用最为广泛, 它的缺点是不能对蛋白质进行翻译后加工. 使用真核细胞表达系统如酵母表达系统和哺乳动物细胞表达系统, 外源性 DNA 在其中可以有效地转录和翻译, 能准

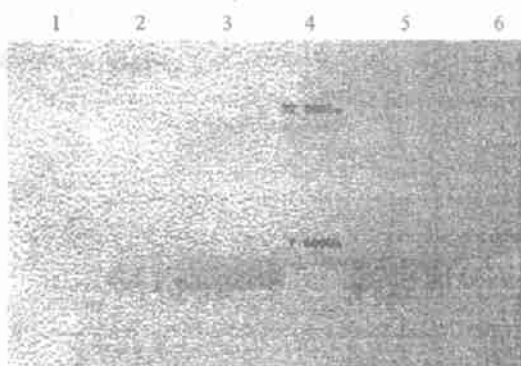


图 3 500 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin YPDS 平板上筛出的重组菌株

不同诱导时间/h 表达产物的 Western-Blot 图

1、2、3、5 X-33/pPICZaA-ICF-1

不同时间诱导表达产物

1 为 0; 2 为 22; 3 为 46; 5 为 94; 4 标准蛋白;

6 X-33/pPICZaA 株 46 h 诱导表达产物

地完成糖基化、磷酸化、二硫键的形成以及蛋白酶水解等翻译后加工过程,较忠实地表达出具有与天然蛋白质的结构和功能相似的重组蛋白。哺乳动物细胞表达系统的缺点是对培养条件要求严格、重组蛋白表达水平不能令人满意、工程造价高等。酵母是一种低等真核生物,它既具有原核生物的生长特点,又具有真核生物的分子和细胞生物学特性,能完成蛋白质的翻译后修饰。利用巴氏毕赤酵母表达系统已使多种外源基因获得表达,其特点与传统的酿酒酵母相比,具有产量高、不过度糖基化等优点^[6]。在本研究中,我们未发现所表达的hIGF-1有糖基化现象,其相对分子质量大小与预期的7.2一样,这可能与该基因没有糖基化位点有关。分泌表达的上清不需浓缩,凝胶电泳后经考马斯亮蓝染色即可看出带形。

参考文献:

- [1] SALMON W D, et al. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 1957, 49: 825 ~ 836.
- [2] PIERSON R W al. The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J Cell Physiol*, 1972; 79: 319 ~ 329.
- [3] ZINOVIEVA N, et al. Stable production of human insulin-like growth factor 1 (hIGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations. *Transgenic-Res.* 1998, 7 (6): 437 ~ 447.
- [4] 李伯良, 等. 人胰岛素生长因子 I 基因人工合成、克隆及其表达. *生物化学与生物生物学报*, 1994, 26 (2): 153 ~ 160.
- [5] 刘宝英, 等. 人胰岛素样生长因子 1 突变体的构建、表达及其鉴定. *军事医学科学院院刊*, 1999, 23 (2): 94 ~ 96.
- [6] 田生礼, 等. 人 TPO N 端结构域在毕赤酵母中的分泌表达及产物鉴定. *中华微生物学与免疫学杂志*, 1998, 18 (5):
- [7] 宋钢, 等. 人组织型纤溶酶原激活剂 cDNA 糖基化位点突变体的构建. *上海医科大学学报*, 1998, 2 (6): 403 ~ 405.

Secreting Expression of hIGF-1 in *Pichia pastoris* and Identification of the Protein

PENG Hong-juan^{*}, LI Ming, YANG Lin,
CHEN Xin-hua, CHEN Xiao-guang, WANG Xun-zhang

Abstract: According to the known sequence of hIGF-1 cDNA, we synthesized the double-chain DNA of hIGF-1 by changing the natural code of hIGF-1 amino to the favorite code of *Pichia pastoris* on the base of preserving its natural DNA sequence as closely as possible. We transformed the yeast cell-X-33 with this synthesized gene and this gene was integrated into the chromosome of the yeast. The strains of the recombinant yeast were screened with the Zeocin⁺ plate. The product was secreting expressed and its molecular weight was determined as 7 200 by SDS-PAGE and Western-blot. The amount of unpurified protein was about 49% of the total protein in the supernatant of the culture media.

Keywords: hIGF-1; *Pichia pastoris*; expression

^{*} Tropical Military Hygiene Department, The First Military Medical University, Guangzhou, 510515, China