文章编号:1000-5404(2005)14-1481-03

论著

人毛乳头细胞HSPC016基因在毕赤酵母中的表达和鉴定

邹 锋[1],郝 飞[1],宋志强[1],易 勇[2],杨希川[1],杨 斌[1],叶庆佾[1] (第三军医大学:[1]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,[2]医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建人毛乳头细胞HSPC016基因的真核表达载体,诱导其表达并对目的蛋白基本生物学特性进行鉴定。**方法** 用PCR从pET-28a(+)/HSPC016中扩增出195 bp目的基因,克隆至酵母表达载体pPIC9K质粒,经酶切鉴定后转化毕赤酵母菌GS115,G418-YPD平板筛选高拷贝转化子,甲醇诱导表达后进行Western blot检测和目的蛋白N-端氨基酸测序鉴定。**结果** 用PCR成功扩增出目的基因;pPIC9K/HSPC016转化GS115用G418-YPD平板筛选高拷贝转化子,甲醇诱导后,SDS-PAGE电泳鉴定:目的蛋白相对分子量约为7.2×10^3,与理论预测值相吻合;UVP扫描表明目的蛋白表达率约18%;Western blot检测具有良好的免疫反应性;N-端氨基酸测序结果与预期序列完全一致。**结论** HSPC016基因能通过酵母表达载体pPIC9K及宿主菌GS115进行高效、正确地表达,为研究HSPC016基因在真核细胞水平表达的生物学意义奠定了基础。

关键词:毛乳头细胞;HSPC016基因;毕赤酵母,真核表达
中图法分类号:R322.991;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Expression and identification of HSPC016 gene of human dermal papilla cell by Pichia pastoris expression system

ZOU Feng[1], HAO Fei[1], SONG Zhi-qiang[1], YI Yong[2], YANG Xi-chuan[1], YANG Bin[1], YE Qing-yi[1] ([1]Department of Dermatology, Southwest Hospital, [2]Department of Clinical Biology and Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct and express the gene of HSPC016, and to study the basic biological properties /characteristic of the HSPC016 gene expression products. **Methods** The HSPC016 gene was amplified from the plasmid of pET-28a(+)/HSPC016 by PCR. The gene was subcloned into the plasmid pMD-18T and digested by two restriction enzymes of *Not* Ⅰ and *Eco*R Ⅰ. After purified, the HSPC016 gene was inserted into the prokaryotic expression vector pPIC9K. The pPIC9K/HSPC016 was transformed into P. pastoris GS115 strain by electroporation and recombinant protein was expressed after induced by methanol. The N-terminal amino acid residual sequencing of the protein was made after SDS-PAGE analysis. **Results** The HSPC016 gene was successfully cloned into pPIC9K. The results of SDS-PAGE showed that the molecular weight of the expressed product was 7.2×10^3, and the expression rate was about 20%. The result of the N-terminal amino acid residual sequencing is identical to that of the molecular design. **Conclusion** HSPC016 gene was successfully constructed and well expressed in Pichia pastoris expression system.

Key words: human dermal papilla cell; HSPC016 gene; Pichia pastoris; eukaryotic expression

毛乳头位于毛囊底部,为含血管的间充质成分[1]。在胚胎期,真皮间充质细胞产生调节因子诱导基板形成是毛囊发育的始动因素,然后基板产生调节因子诱导间充质细胞凝集生长形成毛乳头,这些凝集性生长的间充质细胞作用于毛囊表皮细胞而最终完成毛囊的发育[2]。一般认为毛乳头细胞在胚胎毛囊的发育及成年毛囊的周期性生长过程中具有重要作用。因此毛乳头细胞是毛囊研究的中心环节之一[3]。造血干细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)相关基因HSPC016是复旦大学学者在人造血干细胞中发现的新基因[4],而我们首次发现了HSPC016作为上调表达基因在凝集性生长状态人毛乳头细胞差异表达

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200249)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200249)
作者简介:邹 锋(1972-),男,四川省西充县人,硕士,医师,主要从事皮肤毛囊疾病方面的研究。电话:(023)68765416
通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416
收稿日期:2005-02-25;**修回日期**:2005-05-04

cDNA 文库中的表达[5]。为获得重组表达的 HSPC016 基因产物，我科前期已经成功构建了重组子 pET-28a(+)/HSPC016。本研究将目的基因 HSPC016 克隆至酵母表达载体 pPIC9K，经转化诱导获得了较好的表达效果。为进一步研究其真核表达产物的生物学意义奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pET-28a(+)/HSPC016 的构建已于前期实验完成；质粒 pPIC9K 和 GS115 酵母菌购自美国 Invitrogen 公司；*E. coli* DH5α 菌株由我校临床微生物及免疫学教研室提供。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的 HSPC016 序列及实验目的设计扩增引物，分别在上游引物和下游引物 5′端加入 *Not*Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切位点，同时分别设计起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。正链：5′-CGGAATTCATGTCCGGCCGCGAAGG-3′；负链：5′-ATAA-GAATGCGGCCGCTTACTTTTTGCCAGATTTC-3′。引物由上海博亚生物技术有限公司合成，PAGE 方式纯化。

1.3 HSPC016 基因 PCR 扩增

以 pET-28a(+)/HSPC016 质粒为模板，100 μl 反应体系混匀离心处理后，加入 30 μl 石蜡油，94 ℃预变性 5 min，然后加入 1 μl *Taq* DNA 聚合酶(3 U/μl)，按 94 ℃ 1 min，55 ℃ 2 min，72 ℃ 2 min，循环 35 次，最后 72 ℃延伸 5 min。反应完毕后取 3 μl 产物在 1.0 % 琼脂糖凝胶中进行电泳分析。

1.4 pPIC9K/HSPC016 重组质粒的构建及酶切鉴定

用低熔点琼脂糖凝胶法纯化回收 PCR 扩增的 DNA 片段，通过 T_4 连接酶与 pMD18-T 连接形成 pMD18-T/ HSPC016，将连接产物转化 *E. coli* DH5α，经 Amp^+ 筛选及质粒抽提，酶切鉴定，得到阳性重组子；再用 *Not* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切 pMD18-T/ HSPC016 及 pPIC9K，用低熔点琼脂糖凝胶法分别纯化回收目的片段和载体片段，将两片段在 T_4 连接酶作用下于 14～16 ℃连接 16 h；把连接产物转化 *E. coli* DH5α，经 Amp^+ 及质粒少量抽提电泳筛选，酶切鉴定，得到阳性重组子 pPIC9K/HSPC016。

1.5 重组质粒 pPIC9K / HSPC016 的线性化、转化 GS115、PCR 及 YPD-G418 筛选阳性转化子

将 *Sal* Ⅰ线性化的重组表达质粒 pPIC9K / HSPC016 电转化 GS115 (BioRad Gene Pulser 1 500 V，25 μF，200 Ω)，转化后的菌液涂布于 MDPHis-(1134 % YNB，0.000 04% 生物素，2 % 葡萄糖，115 % 琼脂) 选择平板上，30 ℃培养 2 d，筛选出 His- Mut + 表型转化子，然后在 MM(1.34 % YNB，0.000 04 % 生物素，0.15 % 甲醇，1.5 % 琼脂) 和 MD 选择平板上筛选，再用 PCR(用设计引物和试剂盒自带 AOX 引物分别扩增出约 195、668 bp 的预期条带)鉴定，最后通过 YPD-G418 (2 mg/ml) 筛选出生长良好的菌株作为表达株。

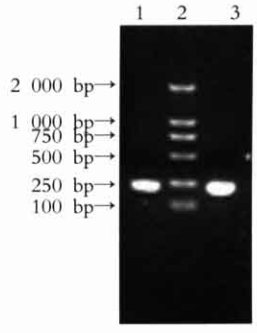
1.6 目的蛋白的诱导表达、Western blot 及 N-端氨基酸测序鉴定

G418-YPD 平板筛选出的高拷贝转化子用甲醇诱导表达(BMMY：YP 70%、ddH_2O 10%、10 × YNB 10%、500 × Biotion 0.2%、10 × 甲醇 10%)，SDS-PAGE 检测，UVP 扫描后分析目的蛋白表达率并初测其分子量。将诱导表达的样品 SDS-PAGE 电泳后转 NC 膜和 PVDF 膜，NC 膜用丽春红染色标记分子量 Marker 后用于 Western blot 分析(兔抗 HSPC016 的多抗为一抗，羊抗兔 HRP-IgG 做酶标二抗)；PVDF 膜用考马斯亮蓝染色，脱色后切下目的蛋白条带用塑料袋密封后送至中国医学科学院基础医学研究所用全自动测序仪进行 N-端氨基酸序列分析。

2 结果

2.1 HSPC016 基因的 PCR 扩增

采用 PCR 技术从 pET-28a(+)/HSPC016 质粒中扩增出 HSPC016 的 ORF，1.0 % 琼脂糖凝胶电泳可见 1 条约 200 bp 的清晰条带，大小与预计(195 bp)相符(图 1)。



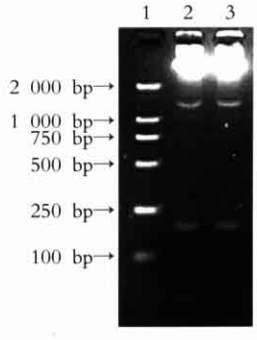
1，3：PCR product；2：λDNAP *Hind* Ⅲ marker

图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig 1 Identification of the PCR product by DNA agarose gel electrophoresis

2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

PCR 产物通过 T-A 克隆构建 pMD18-T/ HSPC016，以引物设计中加入的 *Not* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切位点将 pMD18-T/ HSPC016 中的目的片段切下，在 T_4 连接酶作用下与同样酶切回收处理的 pPIC9K 载体连接，得到重组质粒 pPIC9K/ HSPC016。质粒抽提后用 *Not* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切鉴定，出现约 195 bp DNA 目的片段，与预计大小一致(图 2)。



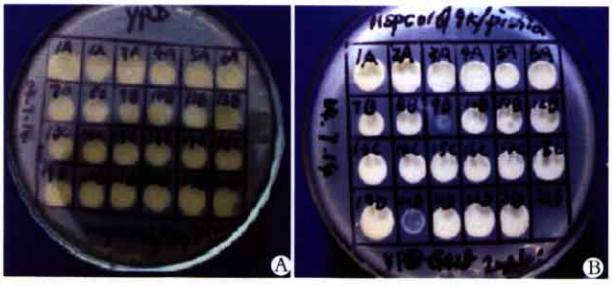
1：λDNAP *Hind* Ⅲ marker；2，3：Recombinant plasmid pPIC9K/ HSPC016 digested by *Not* Ⅰ and *Eco*R Ⅰ

图 2 重组质粒 pPIC9K/ HSPC016 酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant plasmid pPIC9K/HSPC016

2.3　重组质粒 pPIC9K/HSPC016 的线性化、转化 GS115 、PCR 及 YPD-G418 阳性转化子的筛选

被 *Sal* Ⅰ线性化的重组表达质粒 pPIC9K / HSPC016 用电穿孔法转化至 GS115，经 MM、MD 选择平板筛选出生长良好的菌株作为表达株，然后由 PCR 进一步鉴定（分别扩增出了约 195、668 bp 的条带），最后经 YPD-G418 筛选出阳性转化子（1# ~8#、10# ~19#、21# ~23#）（图 3）。



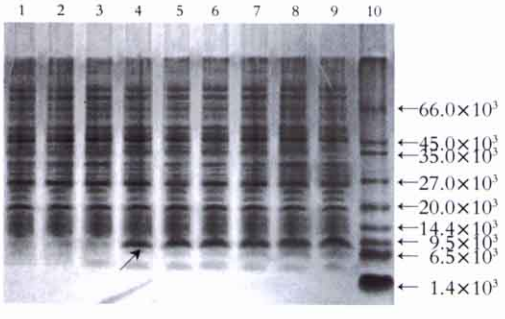
A：YPD（negative control）；B：YPD-G418（2 mg/ml）（Positive）

图 3　YPD-G418（2 mg/ml）平板筛选高拷贝转化子（1# ~8#、10# ~19#、21# ~23#）

Fig 3　Selection of multi-copy transformants by YPD-G418 plate

2.4　目的蛋白的诱导表达、Western blot 及 N-端氨基酸测序鉴定

重组表达质粒 pPIC9K/ HSPC016 经 BMMY 诱导表达后进行 SDS-PAGE ，UVP 图像分析，可见在相对分子量约 7.2×10^3 处有新的蛋白条带出现，与推定目的蛋白 Mr 为 7.255×10^3 基本相符，目的蛋白表达率约 18%（图 4）。经 Western blot 检测，发现与抗 HSPC016 多克隆抗体有特异性免疫反应，着色条带明显。将转至 PVDF 膜上目的蛋白条带送中国医学科学院基础医学研究所用全自动测序仪进行 N-端氨基酸序列分析。所测 N-端 5 个氨基酸依次为甘氨酸-蛋氨酸-丝氨酸-甘氨酸-精氨酸（GMSGR），与实验设计序列完全吻合。



1：Recombinant strain pPIC9K/HSPC016 before induction；2 - 9：Recombinant strain pPIC9K/HSPC016 induced for 0，5，10，20，30，40，50，60 h；10：Protein molecular weight marker. The arrow points to the target protein of HSPC016

图 4　SDS-PAGE 检测目的蛋白表达

Fig 4　Expression of target protein detected by SDS-PAGE

3　讨论

毛囊是一个周期性地经历着生长期、退行期和休止期循环变化的皮肤附属器官[6]。在毛囊生长的调控过程中，其中心环节是上皮-间充质间的相互作用[7]。毛乳头是毛囊的主要间充质成分，毛乳头构成了毛囊生长的微环境，毛乳头细胞通过旁分泌或自分泌的机制发送或接收信号，从而调节毛囊的发育和周期性生长[8]。

毛乳头细胞在毛囊发育及其在成年毛囊周期性生长调控中发挥作用的分子机制是毛囊研究的重要内容[9]。HSPC016 基因为凝集性生长人毛乳头细胞的特异性表达基因。对于一个新基因而言，获取其重组蛋白，是进一步对基因功能进行深入研究所必需的。毕赤酵母（Pichia pastoris）表达系统是近几年兴起的真核高效表达系统，具有营养要求简单，表达外源蛋白产量高，能保持表达产物正确空间构象等优点[10]。因此本研究采用毕赤酵母表达体系，通过构建真核表达质粒并进行转化诱导，获得了 HSPC016 基因的真核表达产物，为临床探索治疗毛囊疾病的手段和措施提供了新的实验依据。

参考文献：

[1] Hardy M H. The secret life of the hair follicle[J]. Trends Genet, 1992, 8(2): 55 - 61.

[2] Oro A E, Scott M P. Splitting hairs: dissecting roles of signaling systems in epidermal development[J]. Cell, 1998, 95(5): 575 - 578.

[3] Bratka Robia C B, Mitteregger G, Aichinger A, *et al*. Primary cell culture and morphological characterization of canine dermal papilla cells and dermal fibroblasts[J]. Vet Dermatol, 2002, 13(1): 1 - 6.

[4] Zhang Q H, Ye M, Wu X Y, *et al*. Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34 + Hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Genome Res, 2000, 10(10): 1546 - 1560.

[5] 宋志强，郝　飞，杨希川，等. 毛乳头细胞凝集性生长差异表达基因的筛选及分析[J]. 中华皮肤科杂志，2003，36(9)：513 - 515.

[6] Cotsarelis G. Hair follicle development, cycling and stem cells[J]. Prog Dermatol, 1998, 32(1): 1 - 8.

[7] Trueb R M. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia[J]. Exp Gerontol, 2002, 37(8 - 9): 981 - 990.

[8] Almond Roesler B, Schon M, Schon M P, *et al*. Cultured dermal papilla cells of the rat vibrissa follicle. Proliferative activity, adhesion properties and reorganization of the extracellular matrix *in vitro*[J]. Arch Dermatol Res, 1997, 289(12): 698 - 704.

[9] Sleeman M A, Murison J G, Strachan L, *et al*. Gene expression in rat dermal papilla cells: analysis of 2529 ESTs[J]. Genomics, 2000, 69(2): 214 - 224.

[10] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45 - 66.

（编辑　周　芳）