文章编号:1000-5404(2006)06-0527-04

论著

hITF毕赤酵母表达载体的构建及分泌表达

孙 勇,彭 曦,张 勇,吕尚军,汪仕良 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建hITF毕赤酵母分泌型表达载体,表达重组hITF,为功能研究奠定基础。**方法** 通过PCR获得hITFcDNA片段,将目的基因插入酵母表达载体pGAPZαA分泌信号下游,得到重组载体pGAPZαA-hITF。*Bsp*HⅠ线性化后氯化锂转化进入X-33,Zeocin筛选转化酵母菌,PCR鉴定目的基因。阳性转化子经摇瓶表达,取上清TCA沉淀后做Tricine SDS-PAGE分析及Western blot检测。**结果** 经测序及PCR证实,hITFcDNA准确插入酵母表达载体pGAPZαA中,氯化锂转化后,重组载体通过同源重组整合进入酵母基因组中。Tricine SDS-PAGE分析证明hITF的分子量约为10×10^3,Western blot分析表明,表达蛋白具有良好的抗原性和特异性。**结论** 成功构建出酵母表达载体pGAPZαA-hITF,获得重组hITF,为深入研究hITF奠定了基础。

关键词:人肠三叶因子;毕赤巴斯德酵母;分泌表达
中图法分类号:R379;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Construction of hITF yeast expression vector and secreted expression of hITF in *Pichia pastoris*

SUN Yong, PENG Xi, ZHANG Yong, LU Shang-jun, WANG Shi-liang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct *Pichia pastoris* secreted expression vector of hITF, express recombinant hITF and underlie the base of function analyses. **Methods** The hITF gene encoding mature peptide was amplified by polymerase chain reaction, and then inserted into the downstream of the alpha-mating factor signal of the *P. pastoris* expression vector pGAPZαA. Recombinant plasmid pGAPZαA-hITF was linearized by *Bsp*HⅠ and transformed into the *P. pastoris* strain X-33 with lithium chloride. Zeocin resistant clones were chosen by YPD plates containing 100 μg/ml Zeocin and the presence of insert was identified using PCR. The positive transformants were fermented in flask and the proteins in the culture supernatant were deposited with TCA and assayed with Tricine SDS-PAGE and Western blotting. **Results** It was proved that the fragment amplified was inserted into the *P. pastoris* expression vector pGAPZαA correctly by PCR and gene sequencing. After lithium chloride transformation, the recombinant plasmid was integrated into the regions of homology within the yeast genome. Tricine SDS-PAGE analysis proved that the molecular weight of hITF was about 10×10^3 and Western blotting demonstrated that the expression proteins have good antigenicity and specificity. **Conclusion** hITF *P. pastoris* expression vector was successfully constructed and recombinant hITF was expressed. This research lay foundation for the further function studying of hITF.

Key words: human intestinal trefoil factor; *Pichia pastoris*; secreted expression

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是1991年发现的特异分布于肠道的小分子蛋白[1],它由59个氨基酸残基构成,分子量约6.7×10^3,属于三叶肽家族。ITF包含1个由38-39个氨基酸残基组成的特殊保守序列,其中的6个半胱氨酸按1~5,2~4,3~6的顺序依次形成3个二硫键,从而产生特异而稳定的三叶草型结构。该结构可确保ITF不受消化酶和pH

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2005CB522601);国家自然科学基金资助项目(30200294)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (2005CB522601) and the National Natural Science Foundation of China (30200294)
作者简介:孙 勇(1976-),男,江苏省徐州市人,硕士研究生,医师,主要从事烧伤后代谢营养方面的研究,现在徐州解放军第97医院烧伤整形科工作。电话:13594140318,E-mail:sunyong_97@sina.com
通讯作者:彭 曦,电话:(023)68754148-8056
收稿日期:2005-09-02;**修回日期**:2005-12-31

变化的影响，有利于其在肠道中发挥生物效应，即维护肠黏膜的完整性，促进受损肠道修复。由于 ITF 具有特殊的空间结构，不仅能促进肠黏膜细胞增殖，还能同肠黏液中的糖蛋白结合，稳定肠黏液，维护肠黏液屏障，因而在减轻肠道损害，促进肠道修复方面具有重要意义。

ITF 对受损肠黏膜的疗效得到了肯定，大量动物实验证明[2,3]，它是一种具有潜在药用价值的短肽，目前多采用基因工程的方法获取重组 ITF。1999 年国内有肠三叶因子在大肠杆菌中表达的报道，表达量 3～4 mg/L[4]。目前国外有酵母表达的报道，其产量约 100 mg/L[5]。鉴于采用原核表达系统 ITF 产量低、活性差，而国外采用的是第 1 代酵母表达系统，无法大规模生产，为此本研究拟利用第 2 代酵母表达系统表达 ITF。首先克隆 hITFcDNA，构建 hITF 酵母分泌型表达载体，再转化酵母细胞，获得稳定整合菌株，表达重组 hITF，为 ITF 的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、酶和主要试剂

酵母表达载体 pGAPZαA、大肠杆菌 TOP10、酵母 X-33 及 Zeocin 购自 Invitrogen 公司；质粒 pSG5-hITF 由法国 Catherine Tomasetto 教授提供，该质粒包含 hITF 全长 cDNA；限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ和 *Taq* 酶、T_4 连接酶均购自 TaKaRa 公司；限制性内切酶 *Bsp*H Ⅰ购自 New England Biolabs 公司；Lyticase 购自北京天为时代公司；小分子量蛋白标准购自重庆玛根医药有限公司公司；抗 His-tag 抗体为 Santa 公司产品；HRP 标记的二抗为北京鼎国产品；α-因子及 3′-AOX 引物购于上海博亚生物技术有限公司；其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 培养基

大肠杆菌培养基：低盐 LB 培养基，1% 蛋白胨，0.5% 氯化钠，0.5% 酵母提取物；选择培养基为上述培养基加上 25 μg/ml Zeocin。酵母培养基：YPD 培养基，1% 酵母提取物，2% 蛋白胨(Peptone)，2% D-葡萄糖；选择培养基为上述培养基加上 100 μg/ml Zeocin。

1.3 目的基因片段的扩增

以软件 Primer Premier 5.0 设计引物，由上海博亚生物技术有限公司合成。P1：5′-GAGAGAATTCCACCACCACCACCACCACGAGGAGTACGTGGGCCTGTC-3′，引入 *Eco*R Ⅰ酶切位点；P2：5′-TTTAGCGGCCGCTCAGAAGGTGCATTCTGCTTC-3′，引入 *Not* Ⅰ位点。上游引物酶切位点后面引入 6 个组氨酸标签，以便于后期的检测、纯化。以 Catherine Tomasetto 教授提供的质粒 pSG5-hITF 为模板，用设计的引物进行 PCR 扩增。PCR 条件：94 ℃变性 5 min；94 ℃ 45 s、62 ℃ 45 s、72 ℃ 1 min 共 30 个循环；72 ℃ 7 min。产物于 1.2 % 琼脂糖凝胶上电泳鉴定纯度和分子量的大小。

1.4 连接、转化及筛选

回收 PCR 反应产物，然后用 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ对回收的 PCR 产物和质粒 pGAPZαA 分别进行双酶切。凝胶电泳法分别回收载体和目的基因双酶切产物，紫外分光光度计上检测载体和目的基因双酶切产物量，然后按 1∶10 的摩尔比混合，加入 T_4 连接酶，4 ℃反应过夜。将连接产物转化感受态 TOP10，低盐 Zeocin 平板筛选。挑选阳性克隆，提取质粒 DNA，*Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切验证后送测序。

1.5 pGAPZαA-hITF 质粒转化酵母菌

将重组质粒用 *Bsp*H Ⅰ单酶切，浓缩回收，调节浓度至 5～10 μg/50 μl。挑取 X-33 单菌落接种到 50 ml YPD 培养基中，30 ℃摇菌过夜(24～28 h)培养到 *OD*(600)值为 0.8～1.0(10^8/ml)；收获细胞，用 25 ml 无菌水洗涤 1 次，室温下 1 500 ×*g* 离心10 min；重悬细胞于 1 ml 100 mmol/L LiCl 溶液中，将悬液转入1.5 ml离心管；离心机最大速度离心 15 s 沉淀菌体，重悬菌体于400 μl 100 mmol/L LiCl 溶液中；按 50 μl/管分装，立即进行转化；对于每 1 个转化，按以下顺序加入：50% PEG3350 240 μl、1 mol/L LiCl 36 μl、2 mg/ml 单链鲑鱼精 DNA 25 μl、5～10 μg/50 μl 质粒 DNA，剧烈旋涡混匀直至沉淀菌体完全分布均匀(约 1 min)，30 ℃水浴孵育 30 min，42 ℃水浴热休克 20～25 min，6 000～8 000 r/min 离心收集酵母菌体(吸出液体)，重悬酵母于 1 ml YPD 培养基，30 ℃摇床孵育；1～4 h 后，取 25～100 μl 菌液铺选择性培养基平板，于 30 ℃培养 2～3 d鉴定。

1.6 PCR 鉴定酵母转化子

挑单菌落于 10 μl 无菌水中，加入 2.5 μl Lyticase (10 U/μl)，30 ℃孵育 30 min，再置－70 ℃中 10 min，取 5 μl 裂解物为模板，以 α－因子及 3′ AOX 引物进行 PCR 扩增；PCR 条件：95 ℃变性 10 min；94 ℃ 45 s、62 ℃ 45 s、72 ℃ 1 min 共 30 个循环；72 ℃，7 min。

1.7 小量表达

将筛选出来的重组克隆接种到 10 ml YPD，30 ℃振荡培养过夜；取 0.1 ml 的过夜培养物接种到含有 50 ml YPD 的 250 ml 的锥型瓶中，30 ℃振荡培养；3 d 后取 1 ml 表达培养物到 1.5 ml EP 管中，室温 12 000 r/min 离心 3 min。转移上清到离心管，－80 ℃保存备用。

1.8 TCA(三氯乙酸)沉淀、Tricine SDS-PAGE 电泳分析表达产物

取上清 1 000 μl 于离心管中，加入 1/9 体积的 100% TCA，颠倒 10 次混匀，置于冰浴中大于 0.5 h，15 000 ×*g* 离心 10～20 min，倒掉上清，加入 200 μl 冰冷的丙酮，洗去管底和管壁残余的 TCA，15 000 ×*g* 离心 10～20 min，倒掉上清，重复丙酮清洗 1 次。倒置离心管，37 ℃烘箱 10～20 min，待管底无明显液体残留，加入 100 μl 上样缓冲液，100 ℃加热 10 min 溶解沉淀。Tricine SDS-PAGE 检测 ITF 的表达，Tricine 胶按照《精编分子生物学实验指南》制备，电泳后用考马斯亮蓝染色，并用凝胶成像系统照相。

1.9 表达产物的 Western blot 鉴定

Tricine SDS-PAGE 电泳结束后，凝胶经 Bio-Rad 电转仪转

移至 PVDF 膜，用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，1∶500 的一抗（来源于兔的 his-tag 多克隆抗体）4 ℃孵育过夜，用 TBST 洗 4 次（每次 15 min），1∶1 000 二抗（HRP 标记的羊抗兔 IgG）37 ℃孵育 1 h，TBST 再次洗涤 4 次，化学发光法显色。

2　结果

2.1　重组质粒的构建和鉴定

重组质粒的构建策略如图 1。用设计的 PCR 引物进行扩增，产物经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳显示出单一条带，且分子量与理论值一致（220 bp）。将扩增的片段插入酵母表达载体 pGAPZαA 中，重组质粒以 *Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切，电泳显示重组质粒酶切产物呈现出两条带，且插入片段条带为 212 bp 左右，与理论值完全一致（图 2）。重组质粒送上海博亚生物技术有限公司进行测序，测序结果证实重组质粒构建成功，命名为 pGAPZαA-hITF。

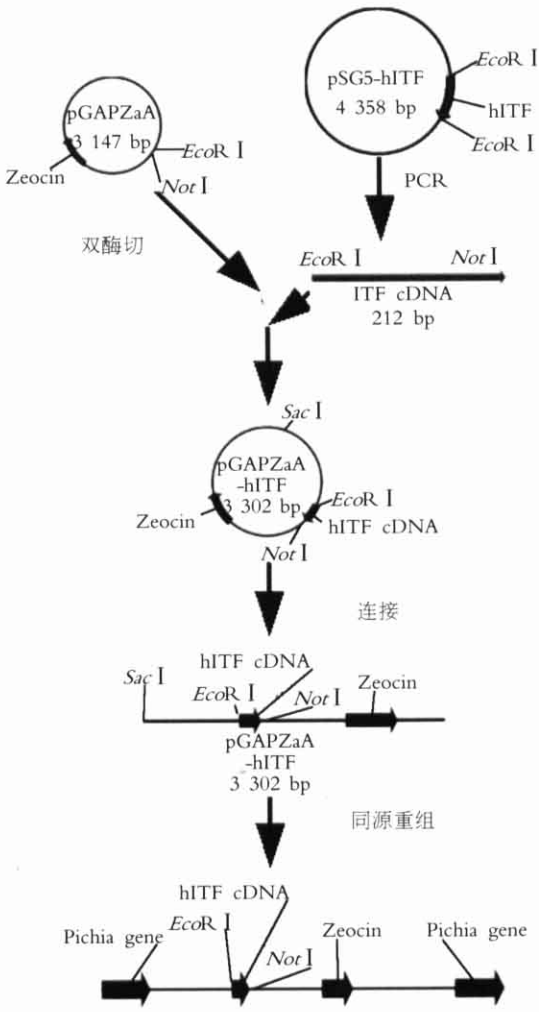


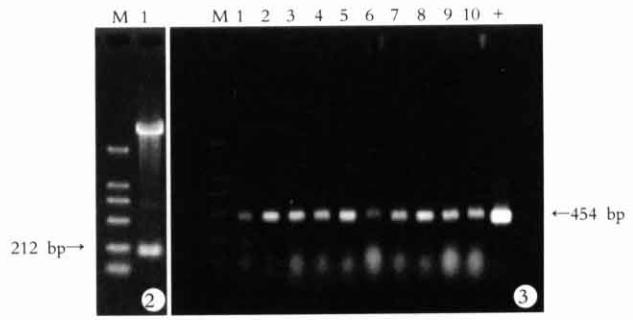
图 1　pGAPZαA-hITF 表达载体的构建示意图

2.2　X-33 的转化

重组质粒 pGAPZαA-hITF 经 *Bsp*H Ⅰ线性化，氯化锂转化进入 X-33 感受态，在 Zeocin（100 μg/ml）抗性的 YPD 平板上培养 2～3 d，共得到数 10 个阳性转化菌落。

2.3　PCR 筛选阳性酵母转化子

挑选在 Zeocin（100 μg/ml）抗性的 YPD 平板上生长的 10 个菌落进行 PCR 鉴定，以 α-因子及 3′-AOX 引物进行 PCR 扩增，结果 10 个菌落均扩增出正确条带（454 bp）（图 3）。



M：DL2000 标准；1：*Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切

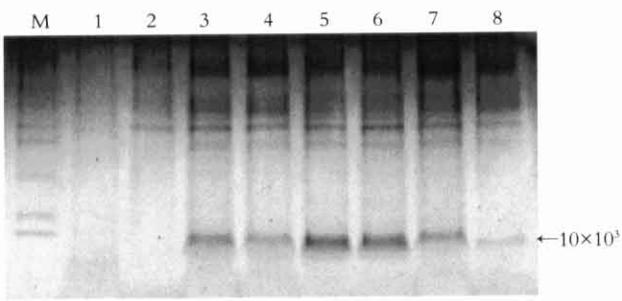
图 2　重组质粒酶切鉴定

M：DL2000 标准；1-10：10 个酵母转化子菌落 PCR；+：阳性对照

图 3　酵母菌落 PCR

2.4　Tricine SDS-PAGE 分析表达产物

考马司亮蓝染色电泳图（图 4）显示，6 个酵母转化子均表达出新生特异性条带，相对分子量约为 10×10^3，而未转化酵母菌没有该条带产生。

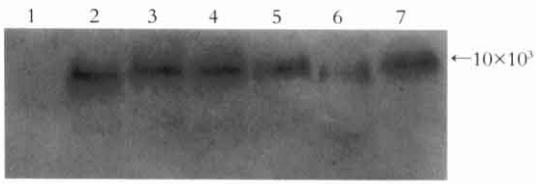


M：蛋白标准（66、45、35、27、20、14.4 × 10^3）；1：背景（培养基，浓缩）；2：阴性对照（酵母空菌落表达 3 d 后，浓缩）；3－8：6 个酵母转化子表达上清（3 d，浓缩）

图 4　表达产物的 Tricine SDS-PAGE 分析

2.5　Western blot 鉴定表达产物

通过免疫印迹（图 5），表明 6 个酵母转化子有特异性条带产生，而未转化酵母菌没有表达，说明表达蛋白具有良好的抗原性和特异性。



1:阴性对照(酵母空菌落);2-7:6个酵母转化子

图5 表达产物的 Western blot 鉴定

3 讨论

毕赤酵母表达系统是应用最为广泛的酵母表达系统,近年来发展非常迅速,目前已利用此系统表达了一系列有重要生物学活性的蛋自质,如破伤风毒素片段C、肠激酶、乙肝表面抗原、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、白介素-11[6]等。其主要的优点有:①外源基因整合在酵母基因组上,可以稳定存在;②高效分泌表达质粒能将外源蛋白表达后,进行翻译后加工处理,将外源蛋白分泌到细胞外,不但提高表达蛋白的活性,而且有利于产物的纯化;③菌株易于进行高密度发酵,外源蛋白表达量高,适于大规模工业生产 。pGAPZαA 是作为新一代的毕赤酵母分泌表达载体,具有组成性启动子 P_{GAP}(三磷酸甘油醛脱氢酶启动子)[7],由于发酵工艺应该更为简单,而同时其产量很高,所以成为代替 P_{AOX1}(醇氧化酶启动子)的最有潜力的启动子,更为重要的是该组成型启动子不需甲醇诱导,所以表达作为药用的蛋白避免了甲醇污染、发生火灾的危险[8]。同时,pGAPZαA 含有 Zeocin 抗性筛选标记基因,重组转化子可直接用 Zeocin 进行筛选,大大简化了重组转化酵母的筛选过程。

肠三叶因子由于其特殊的稳定空间构象,从而使其具有抵抗酸碱、消化酶的作用,所以空间构象对于肠三叶因子的生理作用至关重要。大肠杆菌表达的重组肠三叶因子缺乏必要的折叠、修饰等后期加工,因此该蛋白的活性大大降低,而且产量有限。国外用于表达肠三叶因子的酵母为第1代酿酒酵母,该方法存在无法工业化生产及表达不稳定等不足。本研究采用第2代毕赤巴斯德酵母,从而避免了重组蛋白活性不足及产量低的缺点。设计引物时在上游引物添加组氨酸标签,以便于后期的检测和纯化,而且组氨酸标签较小,不会影响肠三叶因子的空间构象。扩增出 hITF 成熟肽序列后,经 *Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切并插入到质粒 pGAPZαA 信号肽下游,构建出酵母表达载体 pGAPZαA-hITF。α 因子信号肽序列位于酵母表达载体 pGAPZαA 中,这段小分子多肽确保目的蛋白穿出酵母细胞壁,分泌进入培养上清,α 因子信号肽可在分泌过程中被酵母自身蛋白水解酶切除。双酶切及测序均证明表达载体构建成功,*Bsp*H Ⅰ单酶切使表达载体线性化,通过氯化锂转化进入毕赤巴斯德酵母 X-33。Zeocin 筛选出阳性克隆,PCR 证明目的基因和表达载体发生了同源重组,即获得了带有目的基因的转化子。研究表明,目的蛋白的基因组一旦整合进入酵母染色体中就很难脱落,即使在没有抗生素的选择压力下,也可以稳定的表达。本研究总共筛选出 10 株、含有 hITF 基因的酵母菌珠。任选其中 6 株进行小量表达,Tricine SDS-PAGE 电泳显示重组 hITF 表观分子量为 10×10^3,标准 hITF 分子量为 6.7×10^3,增加部分的分子量为 his 标签、酵母蛋白水解酶作用后增加的氨基酸残基和外源蛋白糖基化所致。根据 Tricine SDS-PAGE 电泳图,观察到第3、4号转化子表达产量较高,可以用作后期的大规模表达。Western blot 分析表明表达蛋白具有良好的抗原性和特异性。通过以上分析,本研究构建了 hITF 的毕赤巴斯德酵母表达载体,成功利用酵母表达系统高效表达了目的蛋白,为后续的大规模表达、纯化及功能研究奠定了基础。

参考文献:

[1] SUEMORI S, LYNCH-DEVANEY K, PODOLSKY D K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(24): 11017-11021.

[2] BECK P L, WONG J F, LI Y, *et al*. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor[J]. Gastroenterology, 2004, 126(3): 796-808.

[3] 董秀云, 周丽雅, 林三仁, 等. 小肠三叶因子保护胃黏膜促进溃疡愈合的实验研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2003, 35(6): 639-641.

[4] 王 蔚, 口如琴; 李今媛, 等. 人小肠三叶因子在大肠杆菌中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(5): 724-728.

[5] THIM L, WOLDIKE H F, NIELSEN P F, *et al*. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast[J]. Biochemistry, 1995, 34(14): 4757-4764.

[6] 孙 瑛, 李 辉, 田方曦, 等. 毕赤酵母表达重组人白细胞介素11的连续培养研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 91-93, 100.

[7] 路 蓉, 安云庆. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其分泌型蛋白表达的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2004, 3(1): 43-47.

[8] 易绍萱, 吴 军, 贺伟峰, 等. 人 CTLA4 胞外区突变体在毕赤酵母中的高效表达[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1902-1905.

(编辑 王 红)