文章编号:1000-5404(2008)21-2037-04

论著

重组融合蛋白 rTMP-GH 在巴斯德毕赤酵母中表达的研究

王 崧,王军平,陈 默,许 杨,陈 芳,申明强,王艾平,粟永萍,开 丽 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 实现 TPO 模拟肽(thrombopoietin mimetic peptide, TMP)与人生长激素(human growth hormone, hGH)的重组融合蛋白 rTMP-GH 在巴氏毕赤酵母中的高效表达。**方法** 以含有 rTMP-GH 核苷酸序列的原核质粒为模板,PCR 方法获得 rTMP-GH 的编码序列,并亚克隆至载体 pPIC9K 中,将所构建 pPIC9K-rTMP-GH 表达质粒转化酵母宿主细胞 GS115,MD/MM 平板及 G418 抗性筛选高表达株,然后进行试管补料分批表达,Western blot 对表达产物进行鉴定,通过巨核细胞集落形成能力对其生物学活性进行初步检测。**结果** 成功构建 pPIC9K-rTMP-GH 表达质粒,筛选到高表达 rTMP-GH 重组融合蛋白的巴氏毕赤酵母细胞株,初步证实所表达产物具有刺激巨核细胞集落形成的能力。**结论** 成功实现了 rTMP-GH 融合蛋白在巴氏毕赤酵母中的高效表达。

关键词: rTMP-GH;毕赤酵母;表达
中图法分类号: Q513; Q949.326.1; Q78 **文献标识码:** A

Expression and identification of recombinant fusion protein of thrombopoietin mimetic peptide and growth hormone in *Pichia pastoris*

WANG Song, WANG Jun-ping, CHEN Mo, XU Yang, CHEN Fang, SHEN Ming-qiang, WANG Ai-ping, SU Yong-ping, KAI Li (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To fulfill high-efficient expression of rTMP-GH, a recombinant fusion protein of thrombopoietin mimetic peptide and human growth hormone, in *Pichia pastoris*. **Methods** cDNA fragment coding for rTMP-GH was amplified by PCR, and subsequently cloned into the expression vector pPIC9K. The linearlized plasmid pPIC9K-rTMP-GH was transformed into *Pichia pastoris* GS115 cells and screened in MD/MM plates under pressure of G418. The recombinant fusion protein rTMP-GH was identified by Western blotting, and its biological activity was analyzed by its ability on colony formation of megakaryoblasts. **Results** The pPIC9K-rTMP-GH expression plasmid was successfully constructed. GS115 cells with high expression of rTMP-GH was screened out, and the rough purified rTMP-GH showed promotive effect on megakaryoblast colony formation. **Conclusion** High-efficient expression of rTMP-GH in *Pichia pastoris* is achieved.

Key words: thrombopoietin mimetic peptide; growth hormone; *Pichia pastoris*; expression

由造血功能障碍引起的血小板减少症较为常见,而目前临床上能够有效促进血小板生成的药物不仅种类稀少,且还存在着可能产生中和性抗体、副反应突出等缺点[1,2]。血小板的前体是巨核细胞,促进巨核细胞增殖与分化可有效提升外周血血小板水平。本单位通过基因重组技术研制出一种血小板生成素模拟肽(thrombopoietin mimetic peptide, TMP)和人生长激素(human growth hormone, hGH)的融合蛋白 rTMP-GH。该融合蛋白可借助 TMP 识别并结合巨核细胞表面血小板生成素(thrombopoietin, TPO)受体,通过 TPO 受体途径(由 TMP 介导)和非 TPO 受体途径(由 hGH 介导)同时作用于巨核细胞,从而发挥靶向,协同刺激巨核细胞增殖、分化的作用,以有效促进血小板生成[3],为治疗造血功能障碍引起的血小板减少症提供一种新

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)(2007AA02Z152);全国博士学位论文作者专项基金(200362)
Supported by the National High-tech Research and Development Plan of China ("863" Project, 2007AA02Z152) and the Special Fund for the Authors of Excellent Doctoral Dissertation of China (200362)
作者简介:王 崧,男,湖北省谷城市人,硕士研究生,助教,主要从事药物开发和药物活性方面的研究。电话:(023)68753661, E-mail: gunnm1981@163.com
通信作者:王军平,电话:(023)68752283
开 丽,电话:(023)68753661
收稿日期:2008-01-25;修回日期:2008-02-27

的可能途径。

本研究在保持生物学活性的前提下，构建基于巴氏毕赤酵母表达系统的 rTMP-GH 重组蛋白表达菌株，旨在为进一步开发及规模化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

质粒载体 pPIC9K、酵母菌 GS115 购自美国 Invitrogen 公司，Dami 细胞购自上海细胞生物研究所。

1.2 主要仪器与试剂

Pyrobest™ DNA 聚合酶 PCR 试剂盒、T 载体克隆试剂盒、T_4 DNA 连接酶、DNA 标准购自 TaKaRa（大连）公司；*Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ等内切酶，购自美国 New England BioLabs 公司；G418 购自德国 Roche 公司。酵母提取物、胰蛋白胨、右旋糖、无氨基酸酵母氮源购自美国 Oxford 公司；兔抗 hGH 多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG、蛋白质预染标准购自北京中杉金桥生物技术有限公司；hGH（商品名：赛高路）为深圳科兴生物公司产品；TMP 及引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。引物 1：5′-ACTGAATTCATCGAAGGTCCGACTCTGCGTC-3′；引物 2：5′-AGCGCGGCCGCTTAGAAGCCACACGACCCTTC-3′。

1.3 pPIC9K-rTMP-GH 表达载体的构建

我室前期工作中已成功构建基于大肠杆菌表达系统的 rTMP-GH 表达菌株[3]，从中提取质粒，用引物 1、2，行 PCR 扩增，反应体系为：10 × PCR 反应缓冲液 10 μl，高保真 Pyrobest DNA 聚合酶 5 U。反应条件为：95 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，32 个循环；72 ℃ 延伸 5 min，10 ℃ 放置 10 min。将 PCR 产物经 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切，产物经回收、纯化后与经相同双酶切的 pPIC9K 载体连接[4]，得到重组质粒命名为 pPIC9K-rTMP-GH。

1.4 表达质粒转化酵母宿主菌

将巴斯德毕赤酵母 GS115 制备成感受态，取 40 μl 与 0.1 μg 经 *Sac* Ⅰ单酶切线性化的重组表达质粒混合，转入 0.2 cm 电转杯，用 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪器与 1.5 kV，25 μF，200 Ω 条件下电转化，冰浴 10 min 后加入 500 μl 1 mol/L 山梨醇，涂布菌液于 MD/His^- 选择平板（13.4 g/L 酵母氮元，20 g/L 葡萄糖，20 g/L 硫酸铵，4×10^{-4} g/L 生物素，15 g/L 琼脂粉），30 ℃培养 2 ~ 3 d[5]。

1.5 多拷贝整合转化子的筛选与鉴定

按文献[4 - 6]方法，由 MD/His^- 平板上挑取 His^+ 菌落。经 YPD（10 g/L 酵母提取物，20 g/L 胰蛋白胨，20 g/L 葡萄糖）液体培养基 30 ℃培养 24 h，接种于 MD/MM（0.5% 甲醇代替葡萄糖，其余同 MD 平板）平板，筛选 Mut^+ 表型。取 His^+/Mut^+ 菌株经 YPD 液体培养基 30 ℃培养 24 h，接种于含 G418 5 mg/ml 的 YPD 固体培养基（YPD 液体培养基中加入 20 g/L 琼脂粉），筛选高抗性多拷贝整合转化子[7]。所得菌株经 YPD 液体培养基 30 ℃培养 24 h，取菌液 1 ml，按文献[6]方法及前述 PCR 条件做菌体 PCR，取阳性扩增产物进一步测序鉴定。

1.6 表达菌株的试管诱导表达

接种单克隆菌落于 10 ml BMGY 培养基中（10 g/L 酵母提取物，20 g/L 胰蛋白胨，100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0，13.4 g/L 酵母氮元，4×10^{-4} g/L 生物素，1% 甘油），30 ℃培养 24 h，$D(600) \approx 3.0$，离心收集菌体，用 20 ml BMMY 培养基（0.5% 甲醇替代 1% 甘油，其余成分同 BMGY 培养基）重悬，诱导表达 72 h，在 12、24、48、60、72 h 各取样 5 ml，离心收集上清，-20 ℃保存，并补甲醇至终浓度为 0.5%。用 Bradford 法监测上清总蛋白含量变化。表达上清液经透析脱盐，抽干浓缩 5 倍，经 12% SDS-PAGE 电泳观察目的蛋白表达，并用 Bio-Rad 凝胶扫描成像系统进行图像分析。

1.7 表达产物的 Western blot 分析

表达上清液经前述方法行 SDS-PAGE 电泳后，以 Bio-Rad 半干转印仪 15 V，60 min 转印 PVDF 膜，封闭过夜。由于 TMP 与人 TPO 完全不同源，无免疫原性，故使用兔抗 hGH 多克隆抗体对本融合蛋白进行分析。以兔抗 hGH 多克隆抗体为一抗，按1∶200 稀释，37 ℃孵育 3 h。以辣根酶标记山羊抗兔 IgG 为二抗，按 1∶5 000 稀释，37 ℃孵育 3 h，DAB 显色。

1.8 表达产物的粗纯化

表达上清经 3k 中空纤维膜以浓缩系数 5、置换系数 6 进行超滤脱盐，经阴离子交换粗纯化。

1.9 表达产物生物学活性初步检测

在巨核细胞株——Dami 细胞培养体系中加入终浓度为 100 ng/ml 粗纯化的酵母表达上清 rTMP-GH，培养 7 d 进行巨核细胞集落计数。按照国内外通用的标准：≥3 个细胞组成的巨核细胞集落形成单位（CFU-MK）定为 1 个普通集落，≥40 个细胞并含有 2 ~ 3 个集落中心所组成的巨核细胞爆式集落形成单位（BFU-MK）定为 1 个爆式集落[8]。

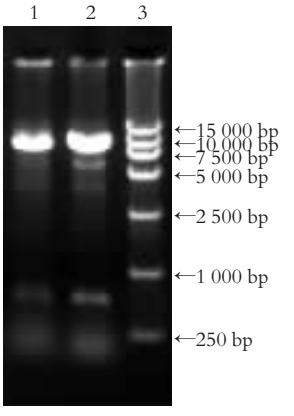
1.10 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 pPIC9K-rTMP-GH 重组表达质粒的构建与鉴定

rTMP-GH 的 PCR 产物与 pPIC9K 质粒载体连接后转化大肠杆菌感受态细胞，得到重组质粒 pPIC9K-rTMP-GH。经 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切鉴定和 DNA 测序分析，证实所得阳性重组质粒与预期设计完全相符（图 1）。



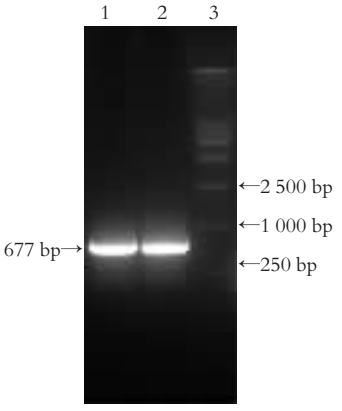
1，2：pPIC9K-rTMP-GH 质粒 *Eco*R Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切；3：DNA 标准

图 1 pPIC9K-rTMP-GH 的酶切鉴定

2.2 多拷贝整合转化子的筛选与检测

为了获得更高的拷贝数，我们在筛选过程中采用了较高的

G418 筛选压力(5 mg/ml),并将第 1 轮筛选中表达量较高的菌株制成感受态,重组质粒二次转化,然后用 8 mg/ml G418 再筛选。最终得到的表达菌株通过 PCR 检测可得到 677 bp 大小的特异片段,表明基因组中确实整合有编码融合蛋白 rTMP-GH 的序列(图 2)。



1,2:阳性菌株的 rTMP-GH PCR 扩增产物;3:DNA 标准

图 2　重组表达菌株的 PCR 鉴定

2.3　重组蛋白的诱导表达

阳性重组菌株经过试管 96 h 补料分批表达,分别于诱导后 12、24、36、48、60、72 h 共 6 个时相点对上清中蛋白总量进行测定,结果显示在 48 h 重组蛋白表达量达到峰值(图 3)。对诱导前及诱导后 12、24、36、48、60 h 共 6 个时相点的上清液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,结果显示在相对分子质量 24 000 处有表达蛋白条带,且在 48 h 该条带浓度达到峰值(图 4)。

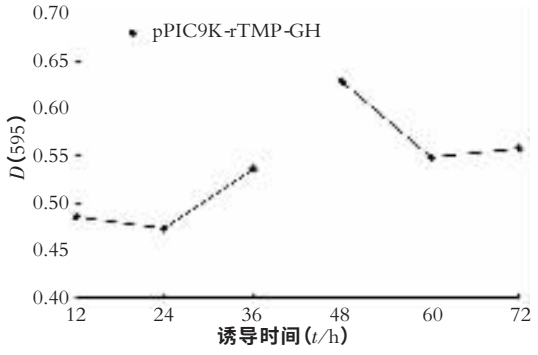


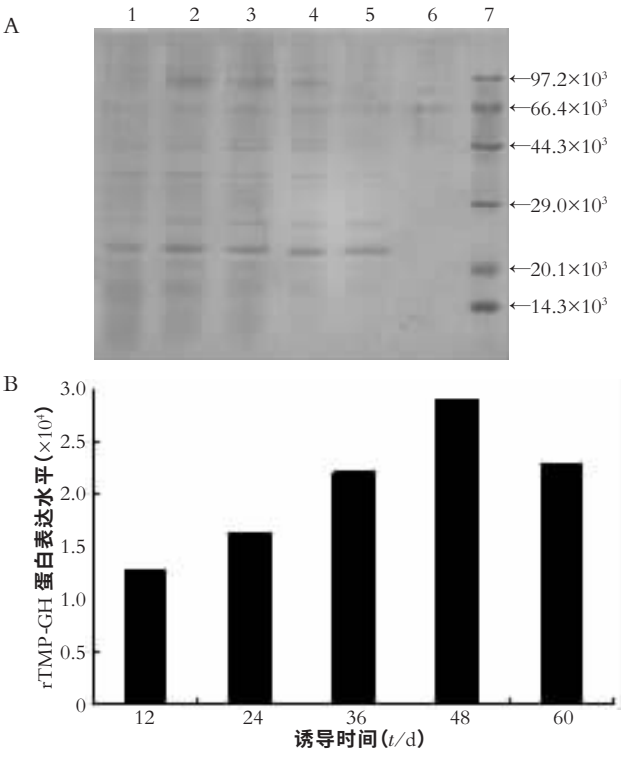
图 3　不同诱导时间 rTMP-GH 蛋白的表达变化

2.4　表达产物的 Western blot 鉴定

Western blot 分析结果显示,诱导后的表达上清在相对分子质量 24 000 处有一特异条带,相对分子质量大小与 rTMP-GH 的理论值相一致,诱导前上清中无此条带,表明阳性重组酵母菌株中有融合蛋白 rTMP-GH 的分泌表达(图 5)。

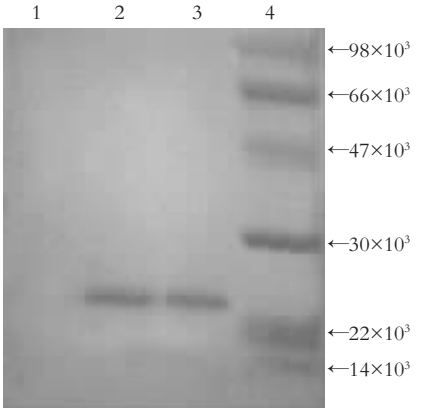
2.5　rTMP-GH 对 Dami 细胞集落形成能力的影响

在 Dami 细胞培养体系中分别加入终浓度为 100 ng/ml 的 TMP、hGH 和 rTMP-GH,培养 7 d 后行巨核细胞集落计数。结果表明:与对照组相比,TMP、hGH 组和 rTMP-GH 组的 CFU-MK 和 BFU-MK 均明显增加(表 1),差异有统计学意义($P<0.01$),且 rTMP-GH 的作用更加突出。提示 rTMP-GH 具有较强的促进巨核细胞集落形成能力。



A:蛋白电泳图　1:诱导 60 h;2:诱导 48 h;3:诱导 36 h;4:诱导 24 h;5:诱导 12 h;6:诱导前;7:蛋白质标准　B:定量分析结果,以 rTMP-GH 蛋白量吸光度值×面积($Int\times mm^2$)表示蛋白表达水平

图 4　12% SDS-PAGE 电泳诱导后不同时相点 rTMP-GH 蛋白的表达变化



1:诱导前上清液;2:诱导后上清液;3:rTMP-GH 标准品;4:蛋白质预染标准

图 5　Western blot 鉴定 rTMP-GH 的表达

表 1　Dami 细胞经 rTMP-GH 作用 7 d 后的细胞集落计数($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组	TMP 组	hGH 组	rTMP-GH 组
CFU-MK	1 452.7 ± 103.4	1 702.5 ± 113.4[a]	2 014.8 ± 125.3[a]	2 452.3 ± 197.2[a]
BFU-MK	96.3 ± 7.9	106.2 ± 9.4[a]	113.8 ± 10.2[a]	133.4 ± 12.1[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

3　讨论

由造血功能障碍引起的原发性和继发性血小板减少症在临床上较为常见。在众多升血小板方案中,造

血生长因子的应用最受推崇,其中 TPO 和白细胞介素-11(IL-11)效果最为显著。但是,由于通过基因工程制备并聚乙二醇化的巨核细胞生长与发育因子(rh-MGDF,由人 TPO 分子 N 端的 163 个氨基酸组成)在临床试用过程中可诱导产生中和性 TPO 抗体[1],使得重组人 TPO 至今未得到美国 FDA 的批准。重组人 IL-11(rhIL-11)虽然在 1997 年就已经获得美国 FDA 的批准应用于临床,但由于经常出现浮肿、心律失常、头晕、骨膜炎等副反应,且常需与其他细胞因子伍用,使其应用受到了一定限制。

TPO 模拟肽(TMP)是美国学者 Cwirla 等[9]通过噬菌体表面展示技术筛选到的一种与天然 TPO 生物活性相似的短肽,仅由 14 个氨基酸残基组成,与 TPO 完全不同源。体外实验证实,该短肽与 TPO 受体 c-Mpl 有很高的亲和力,能够刺激 TPO 细胞依赖株(Ba/F3/c-Mpl)增殖与分化[9]。但该短肽相对分子质量太小,难以通过基因工程方法制备,且进入体内后很容易被降解,因而其体内应用效果并不理想。

近年来,包括我们在内的一些国内外研究人员发现,应用重组人生长激素(rhGH)可以显著促进肿瘤放,化疗及再生障碍性贫血等患者的造血重建过程,尤其在促巨核细胞增殖和血小板生成方面有着一定的疗效[10,11]。然而,由于 hGH 具有广谱促细胞生长作用,要想使其对某一特定组织或细胞的作用突出,必须要加大使用量,不仅增加了使用成本,还会带来其他不良影响。

为此,我所通过基因重组技术将 TMP 与 rhGH 进行了融合。通过大肠杆菌表达系统表达制备出了一种新型融合蛋白 rTMP-GH。一方面,通过与 hGH 融合,使得 TMP 能够通过基因工程方法制备,且显著延长了其半衰期;另一方面,hGH 可在 TMP 引导下靶向作用于巨核细胞,有效提高 hGH 的生物利用度,从而降低用量,减轻毒副作用。前期工作显示,rTMP-GH 融合蛋白具有突出的骨髓组织偏向分布性,说明 TMP 在其中发挥了靶向引导作用[3]。并且,该融合蛋白能够在体外促进巨核细胞增殖、分化,提示其具有广阔的开发及应用前景。

相对于大肠杆菌原核表达系统,甲醇营养型巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 外源基因表达系统兼有原核系统良好的可操作性和真核系统翻译后加工的双重优点,是真核外源基因表达的理想宿主。加上其适于高密度培养,发酵条件简单,可分泌表达,无过度糖基化,为真核蛋白的工业化生产与纯化提供了极大方便[12,13]。因此,我们认为有必要尝试 rTMP-GH 重组融合蛋白在巴斯德毕赤酵母表达系统中的表达与制备。

通过本研究,我们成功获得了能够高效、稳定表达 rTMP-GH 重组融合蛋白的巴斯德毕赤酵母菌株,并初步证实了利用该菌株所表达的重组融合蛋白 rTMP-GH 具有显著促进巨核细胞增殖、分化的生物活性,为该融合蛋白的进一步开发、高密度发酵及规模化生产奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] Li J, Yang C, Xia Y, *et al*. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin[J]. Blood, 2001, 98(12): 3241 – 3248.

[2] Li J, Shen L, Li Y, *et al*. Recombinant human interleukin-11 for treatment of chemotherapy- induced thrombocytopenia in patients with gastrointestinal cancer[J]. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2007, 6(5): 450 – 452.

[3] 邵　波, 艾国平, 王军平, 等. 新型升血小板因子静脉注射在小鼠体内的靶向性实验研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(18): 1679 – 1680.

[4] 王　蒙, 杨　媛, 杨峥嵘, 等. 人 TALL-1 基因在毕赤酵母中的分泌表达与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 494 – 497.

[5] 应　革,吴淑华,王　静,等. 重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达人乳铁蛋白的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2004,18(2):181 – 185.

[6] 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(2): 193 – 200.

[7] Scorer C A, Clare J J, McCombie W R, *et al*. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of Pichia pastoris for high-level foreign gene expression[J]. Biotechnology (N Y),1994, 12(2): 181 – 184.

[8] 许　杨, 王军平, 赵景宏, 等. 重组融合蛋白 rTMP-GH 对体外培养巨核细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 1 – 4.

[9] Cwirla S E, Balasubramanian P, Duffin D J, *et al*. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine[J]. Science, 1997, 276(5319): 1696 – 1699.

[10] Hanley M B, Napolitano L A, McCune J M. Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1170 – 1179.

[11] Carlo-Stella C, Di Nicola M, Milani R, *et al*. Age- and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone[J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 171 – 178.

[12] Bathurst I C. Protein expression in yeast as an approach to production of recombinant malaria antigens[J]. Am J Trop Med Hyg, 1994, 50(4 Suppl): 20 – 26.

[13] 项贵明, 杨峥嵘, 粟永萍, 等. 重组小鼠凝血因子Ⅷ毕赤酵母表达载体的构建及整合体的筛选[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2009 – 2011.

(编辑　王小寒)