论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0470-04

人补体受体1型活性片段SCR15-18在毕赤酵母中的表达、纯化及活性鉴定

刘高科,何 莉,杨永涛,汪正清 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 实现人补体受体1型(complement receptor type 1,CR1)活性片段SCR15-18在毕赤酵母中的分泌表达。**方法** 用PCR从原核表达质粒pET32a-sCR1-SCR15-18上扩增CR1-SCR15-18的编码基因,并克隆到毕赤酵母分泌表达质粒pPIC9,构建重组质粒pPIC9-CR1-SCR15-18,鉴定后测序;重组质粒电转化整合到毕赤酵母GS115基因组中,菌落PCR技术筛选阳性转化株;经摇瓶发酵和甲醇诱导,SDS-PAGE和Western blot鉴定目的蛋白的表达;Ni^{2+}-NTA agarose亲和层析纯化目的蛋白,并用体外抑制补体溶血反应实验测定目的蛋白的生物活性。**结果** 成功构建重组表达质粒pPIC9-CR1-SCR15-18;SDS-PAGE和Western blot证实目的基因在毕赤酵母中成功分泌表达;表达产物经镍柱快速纯化后,能够明显抑制补体的体外溶血。**结论** 在毕赤酵母中成功实现了CR1-SCR15-18蛋白的分泌表达,该蛋白具有较高的抑制补体溶血的生物活性。

关键词: 补体受体1型;毕赤酵母;分泌表达;补体溶血
中图法分类号: R392-33;R392.11;R392.2 **文献标识码:** A

Expression, purification and activity identification of SCR15-18 domain of human complement receptor 1 in *Pichia Pastoris*

LIU Gao-ke, HE Li, YANG Yong-tao, WANG Zheng-qing (Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express the short consensus repeat 15-18 (SCR15-18) domain of human complement receptor 1 (CR1) in *Pichia pastoris* as a secreted protein in order to found a base for large-scale industry fermentation. **Methods** The gene fragment of CR1-SCR15-18 was amplified by PCR from plasmid pET32a-sCR1-SCR15-18. The obtained sequence was subcloned into *Pichia pastoris* secretory expression vector pPIC9. After identification the recombinant plasmid pPIC9-CR1-SCR15-18 was electrotransported into the yeast. Positive clones were identified using colony PCR. Positive recombinants were fermented in shake flaskes and induced with methanol. The recombinant proteins were identified with SDS-PAGE and Western blot analysis. After the recombinant protein was purified by Ni-NTA agarose metal chelate affinity chromatography, inhibiting complement hemolysis testing was used to detect the biological activity. **Results** Recombinant expression plasmid pPIC9-CR1-SCR15-18 was successfully constructed. SDS-PAGE and Western blot analysis revealed that the target gene was successfully expressed in the yeast and the recombinant protein was successful secreted in the culture supernatant. After purification, the protein inhibited complement hemolysis *in vitro*. **Conclusion** CR1-SCR15-18 is successful expressed in *Pichia Pastoris* with high activity of inhibiting complement hemolysis.

Key words: complement receptor type 1; *Pichia pastoris*; secretory expression; complement hemolysis

补体系统是先天和获得性免疫的重要组成部分,其活化受到一系列膜蛋白和血浆蛋白的抑制调节,但补体异常过度活化则可以引起缺血再灌注损伤、移植反应等多种严重的疾病[1]。补体受体1型(complement receptor type 1, CR1)为补体膜调节蛋白,含有30个短同源重复序列(short consensus repeat,SCR),其中SCR15-18为CR1的活性位点之一,结合C3b抑制C3/C5转化酶,辅助I因子裂解C3b/C4b,进而抑制C5a及攻膜复合体等炎症介质的产生[2],能够在始动部位防止补体过度活化所致疾病,诸如缺血再灌注损伤等的发生、发展[3]。

本实验室已构建pET32a-sCR1-SCR15-18的原核表达质粒,但在大肠杆菌中以包涵体形式表达[4,5],在变性及复性时蛋白产量显著减少,活性降低。毕赤酵

基金项目: 国家自然科学基金(30471723);重庆市自然科学基金(2007BB5011)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471723) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5011)

作者简介: 刘高科,男,湖南省永州市人,硕士研究生,主要从事感染与免疫方面的研究。电话:(023)68752239, E-mail:lgk259@tom.com
通信作者: 汪正清,电话:(023)68752242,E-mail:wangzhengqing1953@126.com

收稿日期: 2008-07-16;**修回日期:** 2008-09-01

母表达外源基因时不仅可以有效地转录和翻译,准确地完成蛋白功能必需的翻译后修饰[6,7],而且因培养基中不产生内毒素和致癌因子,在制药方面具有独特的优势,商业价值巨大[7]。此外,酵母可以高细胞密度培养,蛋白纯化简单[7]。因此,用毕赤酵母来表达人 CR1-SCR15-18,拟为其工业发酵提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

酵母表达质粒 pPIC9 由复旦大学生命科学研究院吕红教授惠赠;大肠杆菌 DH5α、工程菌 pET32a-sCR1-SCR15-18/BL21 和 *P. pastoris* GS115(his$^-$,mut$^+$)为本室构建或保存;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司;工具酶购自 TaKaRa 公司;TA-02 6×His 抗体、HRP 标记二抗购自中杉公司;镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)购自 Qiagen 公司;其他试剂为进口或国产分析纯。培养基均按《Invitrogen 公司操作手册》推荐方法配制。

1.2　目的基因的扩增

以重组质粒 pET32a-sCR1-SCR15-18 为模板,根据质粒 pPIC9 的酶切位点设计引物,在上游引物通过 *Xhol* Ⅰ酶切位点把目的片段连在信号肽的后面,下游引物加入 TAG 终止密码、6×His 标签和 *Not* Ⅰ酶切位点。上游引物 P1:5′-*GCC*CTCGAG-AAAAGAGAGGCTGAAGCTCACTGTCAAGCCCCAG-3′,下游引物 P2: 5′-*ATA*GCGGCCGCCTAGTGATGGTGATGGTGATGGCAGCT-TGGTAAC-3′(酶切位点和保护碱基分别以下划线和斜体标记),引物由上海英骏公司合成。HS DNA Polymerase 扩增,反应条件 95 ℃ 5 min,98 ℃ 10 s,54 ℃ 10s,72 ℃ 30 s,25 个循环,72 ℃ 5 min。

1.3　表达载体 pPIC9-CR1-SCR15-18 的构建

PCR 产物试剂盒回收 PCR 产物,*Xhol* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切 PCR 产物和质粒 pPIC9(37 ℃过夜酶切),电泳回收酶切产物。将目的片段和质粒按 3.5∶1 在 T_4 连接酶的作用下 16 ℃连接 16 h。连接产物化学转化至 DH5α 感受态细胞,Amp 抗性筛选阳性重组子。用 *Xhol* Ⅰ单酶切、*Not* Ⅰ与 *Xhol* Ⅰ双酶切以及 PCR 鉴定重组质粒,并委托上海英骏公司测序。

1.4　重组质粒电转化毕赤酵母 GS115 及重组子的筛选

pPIC9-CR1-SCR15-18 用 *Sac* Ⅰ线性化后凝胶回收,取出 5~10 μg 与 80 μl 毕赤酵母 GS115 感受态细胞混合,转入 0.2 cm电转杯,冰浴 5 min,于 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪电转化。电击条件:电压 1 500 V,电容 25 μF,电阻 200 Ω。转化结束后立即加入 1 mol/L 的冰浴山梨醇 1 ml,涂布 MD 培养基平板,30 ℃孵育。同时将质粒 pPIC9 线性化后电转入毕赤酵母 GS115 作为后续实验的对照。

1.5　PCR 鉴定阳性转化子

取 5 μl 过夜菌液,4 000×*g* 离心 5 min,30 μl 灭菌水洗菌体,4 000×*g* 离心 5 min,10 μl 灭菌水重悬菌体,微波煮 4 min,-20 ℃冰冻 2 min 作为模板,pPIC9/GS115 作为阴性模板,线性化重组质粒 pPIC9-CR1-SCR15-18 作为阳性对照模板,P1 和 P2 作为引物,*rTaq* DNA Polymerase 扩增,反应条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,30 个循环,72 ℃ 5 min,PCR 产物电泳鉴定。

1.6　目的蛋白在摇瓶水平的诱导表达

挑取 4 个阳性转化子菌落和 1 个 pPIC9/GS115 转化子菌落,接种于 5 ml BMGY 培养基,4 层灭菌纱布封口,30 ℃、250 r/min 培养 18 h,*D*(600)为 2~6,2 000×*g* 离心 5 min 后用 20 ml BMMY 培养基重悬菌体,4 层灭菌纱布封口,30 ℃、250 r/min 培养,每 24 小时补加无水甲醇至终浓度为 0.5%,同时留取 BMGY 培养基 72 h 诱导上清 2 ml 分析蛋白表达情况。

1.7　目的蛋白的鉴定

三氯乙酸浓缩蛋白 100 倍[8]后行 10% SDS-PAGE。电泳完毕后,半干转印 15 V,35 min。转膜后,5% 牛血清白蛋白封闭过夜,TBST 洗膜 3 次,6×His 抗体(1∶500)37 ℃振荡孵育 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,HRP 标记二抗(1∶5 000)37 ℃振荡孵育 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,DAB 显色。

1.8　目的蛋白的纯化

诱导后的菌液 9 000 r/min 离心 15 min,取上清,硫酸铵沉淀浓缩蛋白[8],蛋白沉淀用 1~2 倍沉淀体积的缓冲液 A(50 mmol/L NaH_2PO_4,300 mmol/L NaCl, pH 8.0)溶解,并用该缓冲液 4 ℃透析 24 h 除残留的硫酸铵,然后进行 Ni^{2+}-NTA 树脂亲和层析:缓冲液 A 平衡柱子,缓冲液 B(50 mmol/L NaH_2PO_4,300 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗杂蛋白,缓冲液 C(50 mmol/L NaH_2PO_4,300 mmol/L NaCl,300 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗目的蛋白。纯化的目的蛋白溶液在灭菌去离子水中 4 ℃ 透析 24 h 除盐,冷冻干燥保存。

1.9　目的蛋白生物活性分析

常规滴定溶血素,制备豚鼠血清、2% 山羊红细胞[9]。凝血板各孔预先加入 0.1 ml 1∶60 的豚鼠血清,分别与 0.1 ml 不同浓度的目的蛋白(分别为 1 mg/ml,500、250、125、50、1 μg/ml)37 ℃孵育 20 min,然后加入 0.2 ml 2 U 的溶血素和 0.2 ml 0.2% 的山羊红细胞。并设立正常溶血阳性对照和溶血素、血清、蛋白、缓冲液阴性对照,各对照孔用缓冲液补足体积。37 ℃ 放置 30 min 后 4 ℃静置观察结果。

2　结果

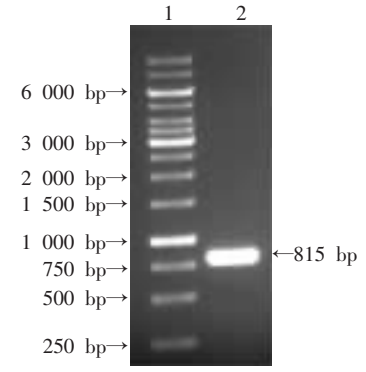
2.1　目的基因 CR1-SCR15-18 的克隆及重组质粒 pPIC9-CR1-SCR15-18 的鉴定

以本室构建的 pET32a-sCR1-SCR15-18 重组质粒为模板,pET32a 作为阴性对照,扩增出含 6×His 标签的目的基因(756 bp),PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 1 条特异 DNA 条带,与设计的片段大小(815 bp)相符(图 1)。从获得的阳性转化子中抽提质粒进行单、双酶切和 PCR 鉴定,单酶切条带约 9 000 bp,双酶切条带为约 8 000 bp 的大片段和约 815 bp 的小片段(图 2),与理论计算值(815 bp)相符合。PCR 结果显示有 1 条约 815 bp 的条带。测序结果显示,重组质粒序列与设计完全一致,CR1-SCR15-18 阅读框准确插入表达载体的信号肽序列之后。

2.2　重组毕赤酵母转化子的筛选及目的蛋白的表达鉴定

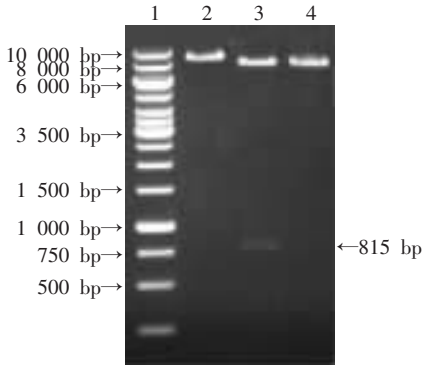
挑取 6 株 His$^+$/Mut$^+$ 表型的多拷贝转化酵母克隆和 1 株转化 pPIC9 的酵母克隆,增菌后作为模板 PCR 扩增。电泳结果显示有 4 个重组子转化克隆均扩增出约 815 bp 的目的片段,与理论值相符(图 3)。结果表明 CR1-SCR15-18 基因已经整合到

酵母 GS115 基因中。



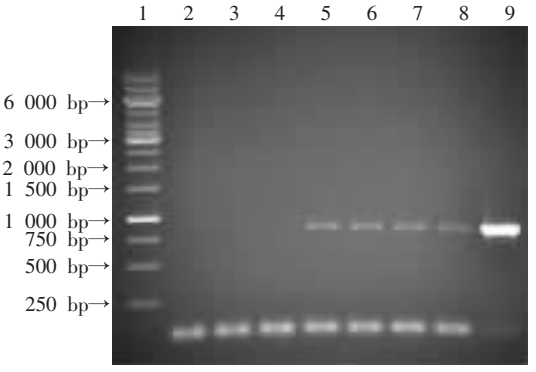
1:DNA 标准(DL 10 000);2:目的片段 CR1-SCR15-18

图 1 目的基因 CR1-SCR15-18 PCR 产物电泳结果



1:DNA 标准(DL 10 000);2:重组质粒 pPIC9-CR1-SCR15-18 经 *Xhol* Ⅰ酶切;3:重组质粒 pPIC9-CR1-SCR15-18 经 *Xhol* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切;4:pPIC9 经 *Xhol* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切

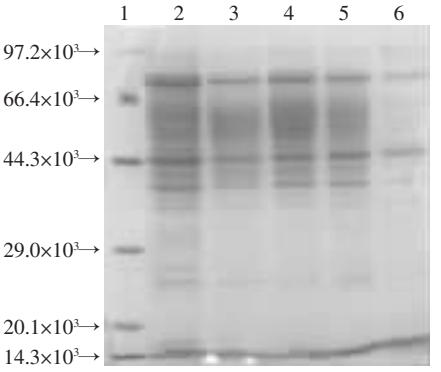
图 2 重组质粒 pPIC9-CR1-SCR15-18 酶切鉴定结果



1:DNA 标准(DL 10 000);2:pPIC9/GS115 对照;3 - 8:重组子 pPIC9-CR1-SCR15-18/GS115;9:pPIC9-CR1-SCR15-18 对照

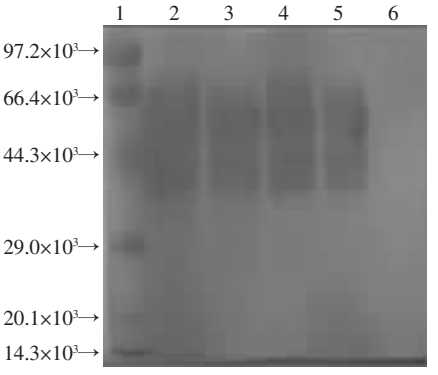
图 3 重组毕赤酵母转化子 PCR 鉴定电泳结果

4 个 pPIC9-CR1-SCR15-18/GS115 重组子经 0.5% 甲醇诱导 72 h 后的表达上清,经三氯乙酸浓缩沉淀、SDS-PAGE 电泳,诱导表达上清在(40 ~ 60) × 10^3 处出现了弥散的宽带,而 pPIC9/GS115 诱导表达上清未见弥散的条带(图 4)。Western blot 结果显示:4 个 pPIC9-CR1-SCR15-18/GS115 重组子诱导表达上清在(40 ~ 60) × 10^3 处出现了弥散的宽带,与 SDS-PAGE 电泳结果相一致,pPIC9/GS115 诱导表达上清无任何条带(图 5)。



1:蛋白质标准;2 - 5:4 个 pPIC9-CR1-SCR15-18/GS115 重组子;6:pPIC9/GS115

图 4 pPIC9-CR1-SCR15-18/GS115 重组子诱导表达上清浓缩后 SDS-PAGE 电泳图

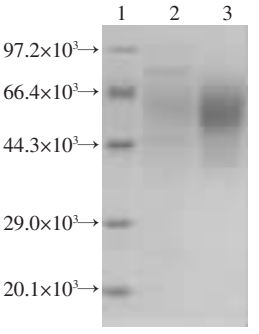


1:蛋白质预染标准;2 - 5:4 个 pPIC9-sCR1-SCR15-18/GS115 重组子;6:pPIC9/GS115

图 5 pPIC9-CR1-SCR15-18/GS115 重组子诱导表达上清 Western blot 鉴定结果

2.3 目的蛋白的纯化

蛋白经硫酸铵浓缩沉淀后,蛋白溶液呈淡黄色,上柱时,穿过峰很高,用高浓度的咪唑洗脱,得到目的蛋白峰,蛋白电泳结果显示蛋白纯度高(图 6)。

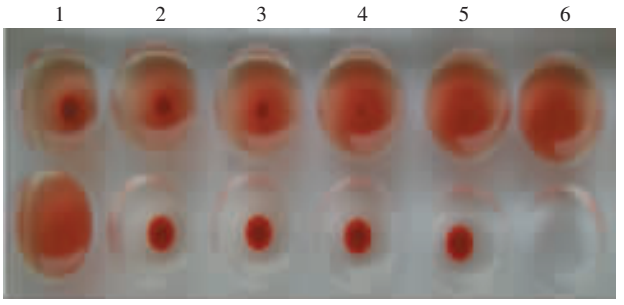


1:蛋白质标准;2:纯化前的表达上清;3:纯化后的 CR1-SCR15-18 蛋白

图 6 CR1-SCR15-18 蛋白的纯化电泳图

2.4 目的蛋白的生物活性

体外抑制补体溶血反应实验表明,1 mg/ml 蛋白基本上抑制了补体溶血反应,只有少量细胞溶解,随着蛋白浓度的降低,蛋白抑制补体溶血的能力随之减弱,浓度达 50 μg/ml 时只有极少量的血细胞保持完好而沉降,1 μg/ml 的蛋白已失去抑制补体溶血能力(图 7)。



A1:蛋白浓度为 1 mg/ml;A2 – A6:蛋白浓度分别为 500、250、125、50、1 μg/ml;B1:溶血孔;B2 – B5 为阴性对照孔

图 7　CR1-SCR15-18 蛋白抑制补体溶血的活性测定

3　讨论

CR1 含有 30 个 SCR,并有 3 个活性位点,分别位于 SCR1-3、SCR8-10 和 SCR15-17,其中基于 SCR1-3 活性位点的研究国外已有报道[10]。本实验克隆的活性位点 SCR15-18 在结构和功能上和 SCR8-10 完全同源,具有跟 CR1 相似的生物活性[2]。本实验室的研究发现 CR1-SCR15-18 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中对心肌具有明显的保护作用[11],因此,其在抑制补体活化领域具有很好的应用前景。

我们在本室构建的原核表达质粒 pET32a-sCR1-SCR15-18[4]的基础上构建真核表达质粒 pPIC9-CR1-SCR15-18,pPIC9 自带信号肽 α-factor 能够引导外源基因在酵母中分泌表达,同时在蛋白的 C 末端加入了 6×His 标签,即可方便纯化,又可用于目的蛋白的检测。甲醇利用型毕赤巴斯德酵母能准确地完成翻译后修饰,如正确折叠、二硫键的形成、糖基化和蛋白水解的修饰,较客观地表达与天然蛋白质的结构和功能相近的正确折叠的可溶性重组蛋白[7]。与其他表达系统相比,毕赤酵母不但培养简单、生长快速、成本低、容易改造、安全可靠并可以实现高密度发酵,具有更大的商业价值[6,7,12]。重组质粒电转化整合到酵母 GS115 染色体 DNA 中,PCR 鉴定筛选到了 4 个阳性转化子,经甲醇诱导,均实现了蛋白的分泌表达。CR1-SCR15-18 蛋白的相对分子质量约为 29×10^3,但是 SDS-PAGE 和 Western blot 结果均显示目的蛋白在 $(40\sim60)\times10^3$ 处出现了弥散的宽带,其原因是 CR1 有多个潜在的糖基化位点[13],蛋白在翻译后修饰过程中出现了不均一的糖基化,这一现象在酵母表达外源蛋白时相当普遍[6]。例如毕赤酵母分泌表达的转化酶最长的寡聚糖链约含 30 个甘露糖残基,而用酿酒酵母表达则平均含有 50 ~ 150 个甘露糖残基,前者相对分子质量为 $(85\sim90)\times10^3$,后者为 $(100\sim140)\times10^3$[14],电泳侧会有很长的拖尾现象。诱导表达上清用硫酸铵浓缩,利用 6×His 标签通过 Ni^{2+}-NTA agarose 亲和层析纯化目的蛋白,效果已经十分理想,可以实现蛋白的快速、有效纯化。用凝血板体外检测目的蛋白抑制补体溶血反应的活性,CR1-SCR15-18 重组蛋白抑制补体溶血的能力随着浓度的增大呈升高的趋势,呈现了良好的生物活性。虽然糖基化与蛋白功能、蛋白稳定性密切相关,过多的糖链仍可能具有很强的抗原性,因此可以通过 N-内切糖苷酶 F 或其他酶等去除糖基、利用基因工程突变糖基化位点或在表达时加入糖基化抑制剂等方法解决过糖基化问题[14]。

本实验成功构建了 pPIC9-CR1-SCR15-18 真核表达载体,并在毕赤酵母中分泌表达,得到了较高纯度的目的蛋白,体外活性实验显示,该蛋白具有良好的抑制补体溶血的活性,为下一步工作奠定了基础。

参考文献:

[1] Mollnes T E, Kirschfink M. Strategies of therapeutic complement inhibition[J]. Mol Immunol, 2006, 43(1 – 2): 107 – 121.

[2] Krych-Goldberg M, Atkinson J P. Structure-function relationships of complement receptor type 1[J]. Immunol Rev, 2001, 180: 112 – 122.

[3] Lazar H L, Bokesch P M, van-Lenta F, *et al*. Soluble human complement receptor 1 limits ischemic damage in cardiac surgery patients at high risk requiring cardiopulmonary bypass[J]. Circulation, 2004, 110(11 Suppl 1): II274 – II279.

[4] 罗　雪, 汪正清. 人 sCR1 结合 C3b 结构域基因的克隆及在大肠杆菌中高效表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(15): 1151 – 1154.

[5] 谭　兵, 张德纯, 汪正清. 重组人可溶性补体受体 1 型 SCR15-18 片段表达纯化及生物活性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 892 – 895.

[6] Daly R, Hearn M T. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. J Mol Recognit, 2005, 18(2): 119 – 138.

[7] Yin J, Li G, Ren X, *et al*. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes[J]. J Biotechnol, 2007, 127(3): 335 – 347.

[8] 汪家政, 范　明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 115 – 125.

[9] 陶义训. 免疫学和免疫学检验[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 133 – 140.

[10] Souza D G, Esser D, Bradford R, *et al*. APT070 (Mirococept), a membrane-localised complement inhibitor, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury[J]. Br J Pharmacol, 2005, 145(8): 1027 – 1034.

[11] 谭　兵, 兰阳军, 张德纯, 等. 重组人可溶性补体受体 1 型 SCR15-18 片段对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(11): 1037 – 1040.

[12] Blanchard V, Gadkari R A, George A V, *et al*. High-level expression of biologically active glycoprotein hormones in Pichia pastoris strains-selection of strain GS115, and not X-33, for the production of biologically active N-glycosylated 15N-labeled phCG[J]. Glycoconj J, 2008, 25(3): 245 – 257.

[13] Kirkitadze M D, Krych M, Uhrin D, *et al*. Independently melting modules and highly structured intermodular junctions within complement receptor type 1[J]. Biochemistry, 1999, 38(22): 7019 – 7031.

[14] 王　勇, 刘哲伟. 毕赤酵母表达外源基因研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(1): 62 – 66.

(编辑　张　维)