技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)11-1680-04

人抑制素 M 突变体在毕赤酵母中的分泌表达研究

范守城[1],张云茹[2],刘 静[1]

(1.重庆生产力促进中心,重庆 401147;2.重庆理工大学药学与生物工程学院,重庆 400050)

【摘 要】目的:构建重组人抑瘤素 M 突变体(Recombinant human mutant oncostatin M,rhMut-OSM)毕赤酵母分泌表达菌株。方法:将人抑瘤素 M 蛋白成熟蛋白编码序列同义突变成毕赤酵母偏好密码子,同时将 100 位和 217 位 Asn 突变成 Glu,消除糖基化位点,人工合成人抑瘤素突变体基因。将基因直接连接到 pPIC9 载体信号肽识别序列之后,构建毕赤酵母真核表达载体 pPIC9-rhMut-OSM,电转化毕赤酵母菌株 GS115,用 PCR 法筛选阳性克隆,SDS-PAGE 和 Western blotting 方法筛选能够稳定、高效分泌表达 rhMut-OSM 的酵母工程菌。结果:培养液上清经 SDS-PAGE 和 Western blotting 证实获得了相对分子质量约为 22 kD 的 rhMut-OSM,实现了非糖基化表达,表达量高峰出现在诱导 72 h 后,摇瓶表达量为 400 mg/L。结论:成功构建了重组人抑瘤素突变体毕赤酵母工程菌株,能稳定、高效分泌表达 rhMut-OSM。

【关键词】抑瘤素 M;突变体;毕赤酵母;分泌表达

【中国图书分类法分类号】Q 94 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-21

Research on secretory expression of human mutant oncostatin M in pichia pastoris

FAN Shou-cheng, et al

(*Chongqing Productivity Council*)

【Abstract】*Objective*: To explore the method of secretory expression of recombinant human mutant oncostatin M (rhMut-OSM) in Pichia pastoris. *Methods*: First, optimize the gene of human oncostatin M (hOSM), change Asn100 and Asn217 to Glu100 and Glu217 respectively to remove N-glycosylation recognition sites. The sequence of mature rhMut-OSM gene was obtained by synthesis, the expression vector of Pichia pastoris of pPIC9-rhMut-OSM was constructed. The recombinant plasmid was transformed into Pichia

作者介绍:范守城(1978-),男,硕士,
研究方向:分子生物工程研究。

范围广的优点,仅需混合 Lipofectamine™2000 转染试剂和目的病毒载体,加入到细胞中,无需洗涤和更换培养基,使得操作程序简化。293 细胞在健康状态时呈拉网状并贴壁形成单层细胞,随着病毒的增殖,细胞变圆脱落,即出现所谓的细胞病变效应。据此,我们可以判断重组腺病毒载体在 293 细胞中的包装情况。在 293 细胞中进行大量扩增后至第 4 代腺病毒,病毒滴度为 1×10^9 PFU/ml,经氯化铯密度梯度离心纯化后,$TCID_{50}$ 测定病毒滴度为 2×10^{11} PFU/ml,已能满足本实验需要,为下一步用于糖尿病动脉粥样硬化的干预研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Knobler H, Benderly M, Boyko V, et al. Adiponectin and the development of diabetes in patients with coronary artery disease and impaired fasting glucose[J].Eur J Endocrinol, 2006, 154(1): 87-92.

[2] Kawano T, Saito T, Yasu T, et al. Close association of hypoadiponectinemia with arteriosclerosis obliterans and ischemic heart disease[J]. Metabolism, 2005, 54(5): 653-656.

[3] Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, et al. Associations of circulating adiponectin with measures of vascular function and morphology[J].J Clin Endocrinol Metab, 2010 Apr 7. [Epub ahead of print].

[4] Dunajska K, Milewicz A, Jedrzejuk D, et al. Plasma adiponectin concentration in relation to severity of coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors in middle-aged men[J].Endocrine, 2004, 25(3): 215-221.

[5] 赵小玲,邓国宝,刘媛莉,等.2 型糖尿病大血管病变中血浆脂联素的变化[J],广东医学,2009,30(1):71-73.

[6] 王中心,陈 涛.脂联素与足背动脉内膜中膜厚度[J].中华高血压杂志,2007,15(12):1022-1026.

[7] Dullaart R P, Kappelle P J, Dallinga-Thie G M.Carotid intima media thickness is associated with plasma adiponectin but not with the leptin: adiponectin ratio independently of metabolic syndrome[J]. Atherosclerosis, 2010 Mar 25. [Epub ahead of print].

[8] Bian Y F, Guo X X, Xiao C S.Protective effects of adiponectin against hypoxia/reoxygenation injury in neonatal rat cardiomyocytes[J].Sheng Li Xue Bao, 2010, 62(2): 149-55.

(责任编辑:冉明会)

pastoris GS115 via electroporation. The transformed positive strains were screened by PCR. The supernatant were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting to screen Pichia pastoris engineer strain with highly effective expression of rhMut-OSM. *Results*: SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that there was non-glyxosylated rhMut-OSM in the culture supernatant induced by methanol with 22 000 of molecular weight. The expression peak emerged after 72 h induced with expression level of 400 mg/L. *Conclusion*: Genetic Engineering Strain Expressed rhMut-OSM was constructed successfully. Pichia pastoris can express rhMut-OSM efficiently and stably.

【Key words】Oncostatin M; Mutant; Pichia pastoris; Secretory expression

抑瘤素 M(Oncostatin M,OSM)最初是 Zarling 等 1986 年从 U937 组织型淋巴瘤细胞(Histiocytic lymphoma cells,HLC)培养上清液中分离的一种对 A375 黑色素瘤细胞有生长抑制作用的因子。OSM 主要由活化的 T 淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞分泌,这种诱导分泌过程可以出现在机体的大多数组织中。OSM 属于 IL-6 家族成员,能够抑制异常细胞的功能和增殖。体外研究中,OSM 已被证明具有多种生物学活性,包括刺激造血,抑制肿瘤细胞生长,促进巨噬细胞分化,对神经营养肽的诱导作用,调节胆固醇代谢以及对骨细胞的作用[1-3]。特别是 OSM 广泛的抗肿瘤生长效应正受到广泛的关注,可抑制肺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、纤维肉瘤等,因此 OSM 作为潜在的抗肿瘤新型药物,具有很好的市场前景和研究价值。

用基因工程的方法制备 OSM,是其能进行药用开发的前期基础研究工作,但还未能取得根本性的突破。1997 年段海清等[4]在 DH5α 中进行了 OSM 初步表达,主要以包涵体形式存在,表达量占细菌总蛋白的 5%。1998 年曹勇等[5]将 OSM 成熟蛋白在 ThioFusionTM 系统中进行融合表达,融合蛋白表达量占细菌总蛋白的 15%。2001 年路萍等[6]在毕赤酵母系统 pPIC9K/GS115 中进行 OSM 分泌表达,估算目的蛋白占上清总蛋白的 70%,表达量可达到 1.37 g/L,如此高的表达量有待进一步考证。2008 年孔宁等[7]在毕赤酵母系统pPICZα C/X-33 中进行 OSM 分泌表达,摇瓶表达量只能达到 45 mg/L。这是因为外源基因在酵母中的表达受诸多因素影响,如密码子偏好性、是否为糖蛋白及糖基化类型、高级结构类型等。OSM 是来源人的基因,在酵母中表达,由于密码子偏好性及糖基化类型差异较大,导致其表达量及生物活性都会受到影响。

人 OSM 蛋白前体是 252 个氨基酸,成熟分子为 195 个氨基酸,是耐热、耐酸的单链糖蛋白,相对分子量 28 kD,有 2 对二硫键(二硫键对生物功能重要,但糖基化是非必要的)。其原核表达多以包涵体形式存在,复性存在一定难度。因此,本研究选择 pPIC9/GS115 毕赤酵母表达系统,并对 OSM 编码序列进行同义突变,变为毕赤酵母偏好密码子,并将糖基化位点进行突变进行非糖蛋白表达,希望在保持蛋白生物活性的同时,提高表达量,为该药物的进一步开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

大肠杆菌 TOP 10F'、质粒 pPIC9 和毕赤酵母菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司;兔抗人 OSM 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的羊抗兔抗体购自北京鼎国生物公司;PCR 引物合成、重组人抑瘤素 M 突变体(Recombinant human mutant oncostatin M,rhMut-OSM)基因合成及 DNA 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;CIAP 去磷酸化酶购自 Promega 公司。PCR 仪及电穿孔仪 Micro Pulser购自 BIO-RAD 公司;恒温培养箱及恒温摇床为 Forma 公司产品。

1.2 OSM 基因合成

根据 GenBank 中人 OSM 基因序列(登录号:CAG30420)分析可知,人类 OSM 的 cDNA 编码 252 个氨基酸残基的肽链,N 端是 25 个疏水残基的信号肽,经蛋白酶裂解后产生 1 个 227 个氨基酸残基的 OSM 前体(Pro-OSM),再由蛋白酶从 C 末端裂解掉 31 个残基后生成 196 个残基的成熟 OSM,成熟 OSM 的生长抑制活性是 Pro-OSM 的 5~60 倍。成熟的 OSM 有两个潜在的 N- 糖基化位点。

人工合成 OSM 成熟蛋白分子为 195 个氨基酸,并将 100 位和 217 位 Asn 突变成 Glu,以消除在酵母中表达的糖基化位点。同时兼顾密码子偏好(http://www.kazusa.or.jp/codon/),将密码子同义突变成毕赤酵母偏好的密码子。并将 OSM 成熟蛋白 N 端序列与毕赤酵母 α 信号肽识别序列直接连接(N 端氨基酸序列:-EKRAAIGSCSKEYR,方框表示识别序列),以便分泌表达产物 N 端序列和天然 OSM 成熟蛋白的 N 端氨基酸序列保持一致。将设计好序列进行全基因合成,并在合成的核酸序列 5'端引入 *Xho* Ⅰ酶切位点,3'端入引入两个终止密码子和 *Not* Ⅰ酶切位点。

1.3 pPIC9-rhMut-OSM 酵母分泌表达载体的构建

将合成 rhMut-OSM 基因的克隆载体用 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切,琼脂糖电泳回收合成的基因片段。同时将毕赤酵母表达载体 pPIC9 用 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切,琼脂糖电泳回收线性载体。将回收的 rhMut-OSM 基因片段和 pPIC9 载体用 T4 DNA 连接酶连接过夜,转化 TOP 10F'。转化子用 PCR验证,验证引物为基因特异引物。PCR 反应参数:94℃预变性 3 min,然后经过 30 个循环(94℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72℃ 30 S),72℃延伸 10 min 结束反应。PCR 验证正确后,再送测序进一步验证。测序正确后即作为毕赤酵母表达载体。

表 1 PCR 验证引物

引物名称	引物序列(5'-3')
5'-3'端	ATAGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACC
3'-5'端	TTATCATCTCCGGCTCCGGTTCGGG

1.4 pPIC9-rhMut-OSM 转化与阳性克隆筛选

将 pPIC9-rhMut-OSM 重组质粒用 *Sal* Ⅰ酶切线性化，并用 CIAP 进行去磷酸化处理。取 10 μg 线性化重组质粒用电击法转化毕赤酵母 GS115。电转化按照毕赤酵母试剂盒操作手册进行。转化液先涂于以葡萄糖为碳源的 MD 营养缺陷型培养基，30℃培养，筛选有外源基因插入的转化子。在转化平板上挑取 6 个单克隆菌落接种于 10 ml BMGY 培养基中（酵母提取物 1%；蛋白胨 2%；磷酸缓冲液 100 mmol/L，pH6.0；无氨基酵母氮碱 1.34%；生物素 4×10^{-5}%；甘油 1%），在 28℃，250 r/min 振摇培养，待菌体处于对数生长期（A_{600}=2~6）时，冻存部分菌种同时离心回收少量菌体，煮－冻－煮法提取酵母基因组 DNA，用基因特异引物（Forward/Reverse）进行 PCR 鉴定，筛选阳性克隆，并以未转化的酵母菌基因组 DNA 和 pPIC9 空质粒转化的酵母菌基因组 DNA 作对照。PCR 反应参数：94℃预变性 5 min，然后经过 35 个循环（94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 40 S），72℃延伸 10 min 结束反应。鉴定为阳性克隆的菌株，将对应收集的菌体重悬于 20 ml BMMY 培养基（酵母提取物 1%；蛋白胨 2%；磷酸缓冲液 100 mmol/L，pH 6.0；无氨基酵母氮碱 1.34%；生物素 4×10^{-5}%；甲醇 0.5%）中诱导表达 120 h，其间每 24 h 收集 1 ml 培养液上清用于分析鉴定 rhMut-OSM 的表达情况，同时补加甲醇使其终浓度维持在 0.5%和灭菌超纯水以保持培养液体积不变。

1.5 rhMut-OSM 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

取甲醇诱导表达前和诱导表达后 24~120 h 的培养液上清进行 12%浓度胶的 SDS-PAGE，观察诱导表达情况。选取表达量高峰点，同时以相同处理的 GS115 原始菌株，pPIC9-rhMut-OSM/GS115 空质粒转化菌株做对照，SDS-PAGE 后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上，以兔抗人 OSM 抗体为一抗，HRP 标记的羊抗兔抗体为二抗进行免疫印迹。

SDS-PAGE 胶用凝胶成像仪测算 rhMut-OSM 占上清总蛋白中的百分含量。上清总蛋白含量用 Lowry 法测定，牛血清白蛋白作标准。

2 结 果

2.1 pPIC9-rhMut-OSM 表达载体的构建

人成熟蛋白 OSM cDNA 连入 pPIC9 质粒中 5'AOX1 启动子下游。并将 N 段序列与质粒分泌性信号肽识别序列 Glu-Lys-Arg 直接相连。分泌性信号肽可在 OSM 分泌至细胞外时由宿主菌特定的蛋白水解酶自行切除。这样保证 rhMut-OSM 与天然成熟 OSM 蛋白 N 端序列保持一直，利于保持蛋白的生物活性。

随机挑选了 3 个 TOP 10F'转化子，用引物 Forward 和 Reverse 进行 PCR 验证。结果如图 1 所示，3 个菌株均在约 600 bp 扩出条带，与理论值 580 bp 相当，任挑选 1 个进行测序验证，结果与设计序列一直，并实现了在 100 位和 217 位的 Asn 突变成 Glu。此载体用于后续实验酵母转化。

2.2 rhMut-OSM 酵母工程菌的筛选

使用 rhMut-OSM 基因特异引物 Forward 和 Reverse，用 PCR 鉴定 rhMut-OSM 基因在毕赤酵母 GS115 染色体上的整合情况，并以未转化的毕赤酵母菌株 GS115 和 pPIC9 空质粒转化的毕赤酵母菌株 GS115 作对照。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析，阴性对照、GS115 原始菌株以及 pPIC9/GS115 空质粒未见特异性电泳条带出现。筛选的 6 个酵母转化子中，有 5 个扩出长度约 600 bp 的特异性扩增条带，有 1 个条带不明显，是因为酵母用冻融法制备 DNA 效率低，从而影响 PCR 扩增效率。如图 2 所示，证明成熟 rhMut-OSM 基因已经稳定整合到酵母基因组中。

2.3 rhMut-OSM 表达分析

取甲醇诱导前和诱导表达后 24~120 h 的培养液上清进行 SDS-PAGE 分析，甲醇诱导表达后的培养液上清在相对分子质量约为 22 kD 处出现相应的考马斯亮兰染色条带，并且其表达量随着诱导时间的延长而逐渐增加，到 72 h 表达量达到高峰（见图 3）。Western blotting 结果显示 OSM 转化子菌株在 22 kD 位置出现阳性条带，与非糖基化的 OSM 成熟蛋白的理论分子量一致（http://www.proteomics.com.cn/tools/mwcal），糖基化蛋白分子量为 28 kD[8]，而且原始菌株和空质粒转化子对照均没有出现条带（见图 4）。从图 3 可看出 hMut-OSM 基因在 GS115 毕赤酵母中成功分泌表达，且将糖基化位点突变后，成功实现了非糖基化表达。

SDS-PAGE 胶进行蛋白百分含量分析，结果表明：诱导 72 h 表达量达到高峰期，rhMut-OSM 占上清总蛋白的 60%以上。从 Lowry 法测定的上清总蛋白浓度估算，rhMut-OSM 表



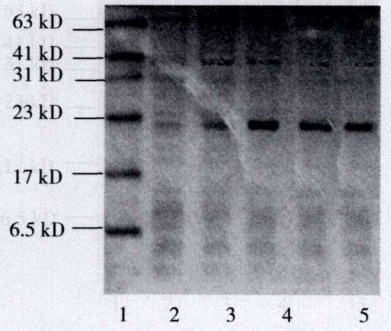
1. 阴性对照；2~4. 转化菌株；5. DNA Marker

图 1 PCR 验证 pPIC9-rhMut-OSM/TOP 10F' 转化菌



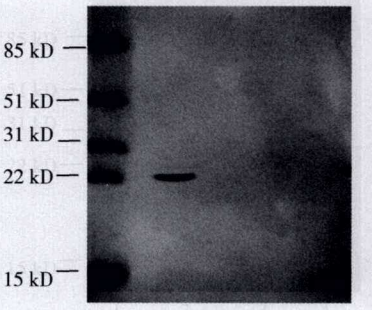
1~6. 6 个转化子；7. GS115 原始菌株；8. pPIC9/GS115 空质粒转化子；9. 阴性对照；10. DNA Marker

图 2 pPIC9-rhMut-OSM/GS115 转化菌株筛选



1. 蛋白质 Marker；2~6. 分别是甲醇诱导 24、48、72、96、120 h 的上清液

图 3 rhMut-OSM 的 SDS-PAGE 分析



1. 预染蛋白质 Marker；2. pPIC9-hMut-OSM/GS115 诱导 72 h 上清；3. pPIC9/GS115 诱导 72 h 上清；4. GS115 原始菌株诱导 72 h 上清

图 4 rhMut-OSM 的 Western blotting 分析

达量可达到 400 mg/L，摇瓶规模产量提高近 9 倍。

3 讨 论

本研究采用毕赤酵母真核表达体系表达 rhMut-OSM 蛋白，该表达体系具有操作简单、表达率高、遗传稳定、发酵工艺成熟等优点。此系统表达蛋白理论上与天然 OSM 蛋白具有相同 N 端序列，当然需要进一步的 N 端测序验证。通过优化密码子、突变糖基化位点为非糖蛋白、采用毕赤酵母表达系统 pPIC9/GS115，使人 OSM 基因更利于表达。就目前的报道看，摇瓶表达量 40~50 mg/L[7]，本研究将表达量提升了近一个数量级，摇瓶规模产量就可达 400 mg/L，表达产物便于纯化，更加适合工业化大规模生产。且将糖基化位点突变后，实现了非糖基化表达，消除因糖基化造成的微观不均一性，利于质量控制，对以后作为药物开发具有重要的意义。Western blotting 方法证实重组表达的 rhMut-OSM 与天然表达的 OSM 具有相同的免疫活性，为后续研究其体内外生物学活性提供前提条件。但突变后的 OSM 的生物活性和免疫原性是否发生变化，需要后续进行体外和体内实验研究进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Pelletier J P, Martel-Pelletier. Oncostatin M: foe or friend[J]? Arthritis Rheum, 2003, 48: 3301-3303.

[2] Jorcyk C L, Holzer R G, Ryan R E. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells[J]. Cytokine 2006, 33(6): 323-336.

[3] Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, et al. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(3): 177-183.

[4] 段海清，张兆山，董自正，等. 抑瘤素 M cDNA 的克隆及表达研究[J]. 生物化学杂志，1997，13(3)：259-263.

[5] 曹 勇，李淑琴，张兆山，等. 抑瘤素 -M(OSM)在原核系统中的表达[J]. 军事医学科学院院刊，1998，22(2)：88-92.

[6] 路 萍，吕 星，邢瑞云. 抑瘤素 M 在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. 军事医学科学院院刊，2001，25(1)：39-41.

[7] 孔 宁，牟旭鹏，韩 冬，等. 人抑瘤素 M 在毕赤酵母中的高效分泌表达[J]. 吉林大学学报(医学版)，2008，34(1)：42-45.

[8] 胡志清，缪竞诚. 抑瘤素 M 的研究进展[J]. 上海医学，2008，31(8)：602-604.

（责任编辑：张学颖）

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127