维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0250-03

人瘦素在毕赤酵母中的表达及其分离纯化

刘先俊[1]，刘方欣[2]，漆洪波[3]，邹全明[4]

（1.重庆医科大学基础医学院生化教研室 重庆 400016；2.重庆医科大学基础医学院核医学教研室 重庆 400016；
3.重庆医科大学第二临床学院妇产科 重庆 400010；4.第三军医大学检验系临床免疫教研室 重庆 400038）

【摘 要】目的：为了获得人Leptin（瘦素或瘦蛋白）而进一步研究其生理作用、作用机制与病理意义。方法：采用逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）方法，从人腹部皮下脂肪组织中分离脂肪细胞总RNA，经逆转录、PCR扩增出肥胖基因的编码序列（Ob基因cDNA），再克隆到表达载体pPICZα中，在毕赤酵母菌株GS115中表达。结果：PCR的扩增产物长度为462bp，克隆后的表达产物，经SDS-PAGE证实，约为分子量为17kD的特异蛋白条带，与人瘦素的理论预计值相符合，经放免法测定，表达量达到36mg/L。通过其多聚组氨酸接头与金属镍螯合的亲和层析法纯化表达蛋白，在SDS-PAGE上呈现分子量为17kD的单一蛋白条带。结论：通过基因工程手段已成功表达出人瘦素并分离纯化得到纯度较高的人瘦素。

【关键词】人瘦素；毕赤酵母；表达

【中国图书分类法分类号】R786 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-10-30

Human leptin expressed in pichia pastoris yeast and purification

LIU Xianjun, et al

(Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the structure, function and pathological action of leptin. The human leptin was expressed in pichia pastoris yeast. *Methods*: The cDNA encoding human leptin was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using directly total RNA as template which was isolated from human abdomen fatty cells. The recognition sequence GAATTC of restriction enzyme *EcoR*I was joined to the 5' end of primer 1 and recognition sequence CGGCCG of restriction enzyme Not I to the 5′ end of Primer 2. The PCR product (cDNA fragment) was inserted into expression vector (pPICZα), expressed in pichia pastoris yeast GS115. *Results*: The PCR product is 462bp ,In SDS-PAGE, expressed protein was showed as one specific band, whose molecular weight is 17kD. The protein has been purified by using affinity chromatography with the polyhistidine tag binding to Ni^{2+}. *Conclusion*: The cDNA of human leptin has been successfully expressed in pichia pastoris yeast.

【Key words】Human leptin; Pichia pastoris yeast; Expression

Leptin（瘦蛋白）是脂肪组织Ob基因（Obese gene，肥胖基因）的表达产物，经血循环到达全身各组织器官，与其受体结合而发挥作用。Leptin受体分布的广泛性也预示着Leptin可能具有多样的生理作用[1]，除可调节机体的能量代谢外，还与动物的发育、生殖等有关，但其作用机制及更多的其它生理作用尚待进一步阐明。

毕赤酵母（Pichia Pastoris yeast）是近年迅速发展起来的一种表达宿主。由于其独特的优越性，已在多种基因工程表达蛋白质中得到广泛应用。本文采用RT-PCR技术，从人腹部皮下脂肪组织中扩增获得编码人肥胖基因的cDNA片断，克隆至毕赤酵母表达载体—pPICZα中，得到人瘦素的体外表达，通过其多聚组氨酸接头与金属镍螯合的亲和层析法纯化表达蛋白，获得在SDS-PAGE上呈现分子量为17kD的单一蛋白条带的人瘦素。现将结果报导如下。

1 材料和方法

1.1 人皮下脂肪组织细胞中总RNA的分离提取

外科手术取人皮下脂肪组织，用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿法分离细胞总RNA[2]，通过琼脂糖电泳（含溴化乙锭0.5μg/ml）鉴定，紫外分光光度计（UV-265，日本岛津产）测定RNA的浓度。

作者介绍：刘先俊（1964- ），男，讲师，硕士。
主要研究方向：肥胖基因及其相关研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 逆转录与PCR扩增

参照文献已发表的人Ob基因cDNA的核苷酸序列而设计一对用于PCR扩增人Ob基因cDNA的寡核苷酸引物[3]，在引物的5′-末端分别引入限制性内切酶EcoRI和Not I的酶切位点，因而，PCR扩增后的产物中，其5′-末端含有限制性内切酶EcoRI的酶切位点，3′-末端含有限制性内切酶Not I的酶切位点，以便于随后的克隆用。引物由上海生工公司合成，引物的核苷酸序列如下：

引物1：TATGAATTCCAGTGCCTATCCAGAAAGTC
EcoRI

引物2：TTTCGGCCGAGAGCATTCAGGGCTAACATC
Not I

RT-PCR采用Promega公司的试剂盒（Access RT-PCR system）。在50μl的反应体系中含上述引物各50pmol/L，四种dNTP各50μmol/L，RNA模板约0.5克，AMV逆转录酶5单位，Tfl DNA聚合酶5单位。反应按48℃ 45min（逆转录），94℃ 2min（灭活逆转录酶），94℃30s、60℃ 60s、68℃ 120s在DNA热循环仪（Perkin-Elmer公司产品）中进行40次循环，最后一次循环在68℃保温10min（PCR）。取产物5μl和DNA分子量标准同时在1%琼脂糖凝胶（含溴化乙锭0.5μg/ml）上电泳，紫外灯下观察结果。

1.3 PCR产物克隆

采用Invitrogen公司的Pichia Eastcomp™ Transformation kit，将PCR产物20μl直接用限制性内切酶Not I和EcoRI双酶切，同时，将载体pPICZα用限制性内切酶Not I和EcoRI双酶切后，DE-81滤纸回收。再将上述酶切后的PCR产物与载体通过T_4DNA连接酶（Promega）连接起来，用限制性内切酶BglⅡ线性化后，转化感受态的毕赤酵母菌株GS115。

毕赤酵母是一种能利用甲醇为其唯一碳源的酵母。在仅有甲醇存在时，会诱导其产生大量的利用甲醇的酶—醇氧化酶（AOX），通常以醇氧化酶基因的启动子作为外源基因表达的启动子而表达外源基因（图1）。

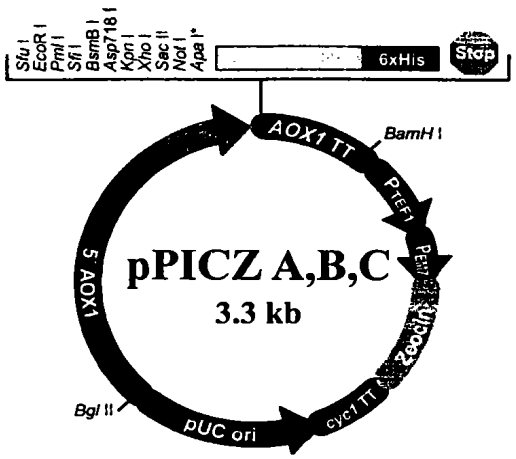


图1 毕赤酵母表达载体—pPICZ

1.4 筛选和表达

在含Zeocin（Invitrogen）的YPD平板（1%酵母提取物、2%胰蛋白胨、2%葡萄糖和2%琼脂）上经30℃培养后挑选单个菌落，再分别在BMGH和BMMH平板上鉴定Mut^+或Mut^s表型（BMGH：1%硫酸铵、0.34%酵母氮碱、0.04%组氨酸、4×10^{-5}%生物素、1%甘油、0.1mol/L磷酸盐缓冲液pH6.0；BMMH：除用0.5%甲醇代替甘油外，余同BMGH）。挑取单菌落接种至3ml BMGH（含Zeocin 100μg/ml）中，30℃振荡（250～300r/min）培养过夜，转种至100mlBMGY（BMGH加1%酵母提取物、2%胰蛋白胨），约24h培养后（培养条件同前），离心（5000r/min、5min、室温）收集菌体，用50 ml BMMH重新悬浮，继续培养72h（培养条件同前），每隔24h加入甲醇至终浓度0.5%以维持诱导。培养结束，离心（8000r/min、20min、4℃）收集上清液，15% SDS-PAGE电泳分离、考马斯亮兰染色[4]。

1.5 人瘦素的放免检测

将离心后的培养上清液用瘦素放免检测试剂盒(中国原子能科学研究院同位素研究所)检测瘦素表达量为36mg/L。

1.6 分离纯化

根据表达产物末端多带的六聚组氨酸接头，采用其与金属镍螯合的亲和层析法进行分离纯化。将上述离心后的培养上清液用超滤浓缩法（截留分子量为5000, Millipore）浓缩约10倍后，用镍螯合的亲和层析法（QIAexpress® Ni-NTA蛋白亲和纯化系统，Qiagen）经一步纯化，浓缩纯化液后，SDS-PAGE电泳检测。

2 结 果

2.1 人Ob基因cDNA的获得

用人腹部皮下脂肪组织提取的RNA，RT-PCR后，其产物的琼脂糖凝胶电泳结果（图2）显示，扩增产物的分子量大小为462bp，与理论预计大小相符合。

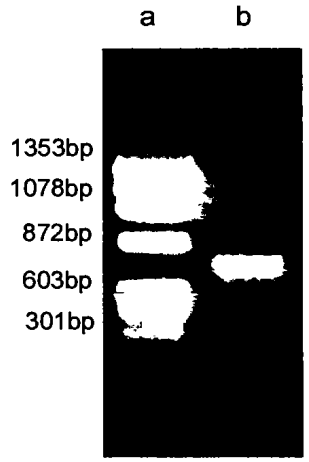


图2 ob基因RT-PCR的琼脂糖电泳结果

Lane a: Marker(Φx174RFDNA/HaeⅢ, Promega);

Lane b:RT-PCR product.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 人瘦素的体外表达

SDS-PAGE结果表明：含编码人瘦素cDNA的重组毕赤酵母经BMGY扩增、甲醇诱导后，在分子量约为17kD处出现一条特异的蛋白质条带（图3d），而在甲醇诱导前却未见相应蛋白质条带（图3c）。说明含编码人瘦素cDNA的重组毕赤酵母表达菌株能表达出重组蛋白—人瘦素。

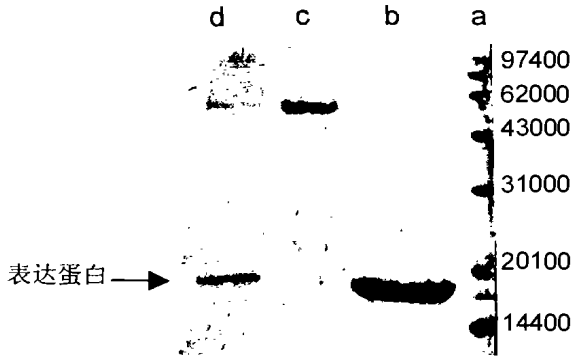


图3 SDS-PAGE分析毕赤酵母表达的人瘦素

a: 蛋白质分子量标准（低分子量标准蛋白质，上海西巴斯生物技术开发有限公司）

b: 与镍离子螯合的亲和层析法纯化后的人瘦素（浓缩约50倍后）

c: 甲醇诱导前的上清液（浓缩约10倍后）

d: 甲醇诱导后的培养上清液（上样量20μl）

2.3 分离纯化结果

根据毕赤酵母工程菌的表达产物末断所含的6聚组氨酸尾，采用其与金属镍螯合的亲和层析法纯化后的SDS-PAGE结果显示，呈现单一条带（图3b）。

3 讨 论

用我们所设计的引物，用人腹部皮下脂肪组织脂肪细胞总RNA为模板，经RT-PCR，可扩增出人Ob基因的cDNA序列，由于设计引物时已引入限制性内切酶的酶切位点，因此，将PCR产物用内切酶酶切后可直接克隆到毕赤酵母表达载体（pPICZα）中，在毕赤酵母GS115中表达出人Ob基因的编码产物-Leptin。

有关特殊蛋白的相应编码基因的克隆，目前大多采用mRNA的逆转录、RT-PCR得到不含内含子的相应编码序列，再将后者克隆到表达载体中，对相应蛋白进行表达。本法克隆有许多优越性如可在PCR引物设计时引入限制性内切酶的识别序列以方便随后的克隆用；目的基因片断不含内含子的相应编码序列等。我们也采用该方法，在体外表达了人瘦素，经SDS-PAGE检测，表达蛋白的分子量为17kD，与人瘦素的理论预计值相符。但需要进一步检测其活性。

毕赤酵母表达系统是近年来发展起来的主要用于表达真核基因的基因工程表达载体，已在多种真核基因的表达中得到广泛应用并发现其具有许多原核表达载体所没有的优点[5]。如容易表达、表达蛋白容易分离纯化、可对表达的外源蛋白进行翻译后的加工修饰、营养要求低、培养基价格低廉、有利于工业化生产、可高密度发酵培养、外源蛋白表达量高、糖基化程度低等。有资料报道[6]，在毕赤酵母表达系统中的表达产量可达12g/L，因而非常适合产业化。从我们的表达水平来看，目前仅能达到36mg/L。根据文献报道[7]，高产量的关键因素之一是工程菌的高拷贝。下一步的工作是筛选含高拷贝的工程菌株，为进一步实现基因工程生产人瘦素的产业化准备。

参 考 文 献

[1] Tartaglia L, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin reception,OB-R[J]. Cell, 1995;83: 1263-1271.

[2] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocycyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987;162:156-159.

[3] Murakami T, Shima K. Cloning of rat obese cDNA and its expression in obese rats^{+}[J]. Biochemical and Biophysical research communications, 1995;209: 944-952.

[4] 汪家政，范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2000; 77-101.

[5] 王会文，赵晓瑜. 甲醇酵母表达系统[J]. 生命的化学，2000; 20: 271-273.

[6] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in Pichia pastoris strains containing multiple tandem integrations of the gene[J]. Biotechnology, 1991; 9(5):455-460.

[7] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review[J]. Yeast, 1992;8:423-488.