

Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 24~ 28

- 6 Wang D, Jing N, Lin Q. Stearylamine liposome as a new efficient reagent for DNA transfection of eukaryotic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (2): 450~ 455
- 7 Spencer S C. Electroporation technique of DNA transfection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, **42** (1): 75~ 82

Comparison of Lipofection and Electroporation Gene Transfer Into Mammalian Cells. QIAN Feng, XIAO Cheng-Zu (*Institute of Biotechnology, Military Medicine Academy, Beijing 100071, China*).

Abstract The transfection of Cos-7, Vero and

Namalwa cell lines by lipofection and electroporation methods have been examined. The lipofection method was found to be better than electroporation method in terms of higher transfection and convenient use. The electroporation method is superior to the lipofection method in terms of average transfection efficiency for a wider variety of cells lines. It was found that Namalwa cells could only be transfected by electroporation method, while Cos-7 and Vero cells could be transfected by both methods.

Key words transfection, lipofection, electroporation, comparison study

基质金属蛋白酶-2 在酵母系统中表达的初步研究

丁秀云 李春海¹⁾ 朱运峰 孙丽亚 颜春洪 张立新 冯东晓 陈高明

(军事医学科学院附属医院, 北京 100850)

摘要 基质金属蛋白酶-2 (明胶酶 A) 在肿瘤侵袭和转移中具有重要作用, 为进一步研究其作用机制, 在酵母系统中表达了金属蛋白酶-2 通过 PCR 方法获得明胶酶 A 的表达序列, 酶切和测序结果证明序列正确后, 构建明胶酶 A 的表达载体 pPIC9/GelA, 电击法转化酵母得到阳性克隆. 明胶酶谱分析说明表达产物具有明胶底物特异性, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳表明, 表达产物的分子质量为 66 ku.

关键词 基质金属蛋白酶-2, 酵母, 表达

学科分类号 Q55

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是一类依赖于 Zn^{2+} 的蛋白水解酶类, 现在已经发现有 17 种金属蛋白酶, 按照它们结构、底物特异性和水解特性, 可以分为: 胶原酶、明胶酶、Stromelysin 和膜型的金属蛋白酶 (MT-MMPs). 它们能够降解细胞外基质和基底膜, 参与许多生理和病理过程 (如肿瘤细胞的侵袭和转移, 自身免疫性疾病等). 金属蛋白酶活性存在多水平的调节, 基因转录水平, 蛋白质翻译水平, 酶原激活和特异性的抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs) 等. 明胶酶包括二种: 72 ku 的明胶酶 A (MMP-2, 金属蛋白酶-2) 和 92 ku 的明胶酶 B (MMP-9, 金属蛋白酶-9). 同其他的金属蛋白酶一样, 明胶酶是以酶原的形式分泌的, 在激活时, 需要在 N 端除去大约 80 个氨基酸的前肽. 明胶酶 A 能够降解变性的胶原, 包括 IV、V、VII、X 和 VI 型胶原, 弹性蛋白等. 对于其结构的研究表明, 明胶酶 A 除了具有前肽区, 催化区和 C 端区以外, 在催化区还存在 fibronectin-like 区

域. 目前许多学者致力于明胶酶的区域结构性质和结合催化活性以及激活机制的研究, 研究表明, 明胶酶 A C 端的结构与血红素家族蛋白类似, 这个区域在与 TIMP-1 和 TIMP-2 结合中起着重要的作用, 并且对定位于细胞膜上明胶酶激活因子的作用是必需的. 而对于明胶酶整体的结构特性, 结合催化机理, 激活的机制等, 由于样本量的限制, 未能很好地进行研究. 本研究以 PCR 方法获得明胶酶 A 的表达序列, 构建明胶酶 A 的表达载体 pPIC9/GelA, 在酵母中进行了表达, 为以后明胶酶性质的进一步研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

各种限制性内切酶均购自华美公司; PCR 产物纯化试剂盒, pGEM-T 连接试剂盒, 质粒提取试剂盒, 测序试剂盒等均购自 Promega 公司; 酵母表

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-02-12, 修回日期: 1998-12-15

达系统-工程株 GS115 及表达载体 pPIC9 购自美国 INVITRIGEN 公司; JM109 菌株, HT1080 细胞由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 目的基因片段的获取:

PCR 引物的合成: 正链: 5' CTGAATTCGCG-CCGTCGCCCATCATCA3', 负链: 5' CGGAATTGTCAGCAGCCTAGCCAGT3';

PCR 反应: 100 μ l 标准反应体系, 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 72 $^{\circ}$ C 补平 10 min, 40 个循环。

1.2.2 编码目的片段的连接与转化: 具体操作参照文献 [1]。

1.2.3 编码片段的测序: 采用 Sanger 的双脱氧测序法。

1.2.4 酵母重组质粒的转化: 采用电击法, 电压 1 247 kV, 时间 19.97 ms. 具体操作见手册。

1.2.5 SDS-PAGE 和明胶酶谱分析: SDS-PAGE: 具体操作参照文献 [2]。

明胶酶活性的酶谱分析: 配制 10% 的聚丙烯酰胺, 其中含 0.1% 明胶. 将培养上清与上样缓冲液混合后直接上样, SDS-聚丙烯酰胺电泳参照文献 [2]。电泳结束后, 剥离凝胶, 以蒸馏水漂洗后, 移入 100 ml 2.5% Triton X-100 溶液中, 摇床上低速摇动以洗脱 SDS. 30 min 后, 换新的 Triton X-100 继续洗脱 30 min. 蒸馏水洗, 凝胶移入 100 ml 明胶酶缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L CaCl₂, 1 μ mol/L ZnCl₂) 中, 37 $^{\circ}$ C 温育 12~16 h. 0.1% 考马斯亮蓝染色, 脱色液 (甲醇: 水: 冰醋酸= 45: 45: 10) 脱色至出现明显清晰的负染酶带^[3]。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建和鉴定

PCR 扩增产物经纯化后, 直接连接到 pGEM-T 载体上, 构建 pGEM-T/GelA 重组质粒, 用于测序, 测序结果与文献报道一致 (结果未给出)。pGEM-T/GelA 经 *Eco*R I 酶切后, 连接到用同样酶切的 pPIC9 上构建表达重组质粒 pPIC9/GelA. 构建过程见图 1。

重组质粒的酶切图谱鉴定: 用 *Eco*R I, *Xho*I 和 *Bam*H I 分别进行重组质粒的单酶切和双酶切鉴定, 从图 2 可以看出, 重组质粒所插入的片段大小为 1 900 bp 左右, 插入方向与表达载体的阅读

框架一致。

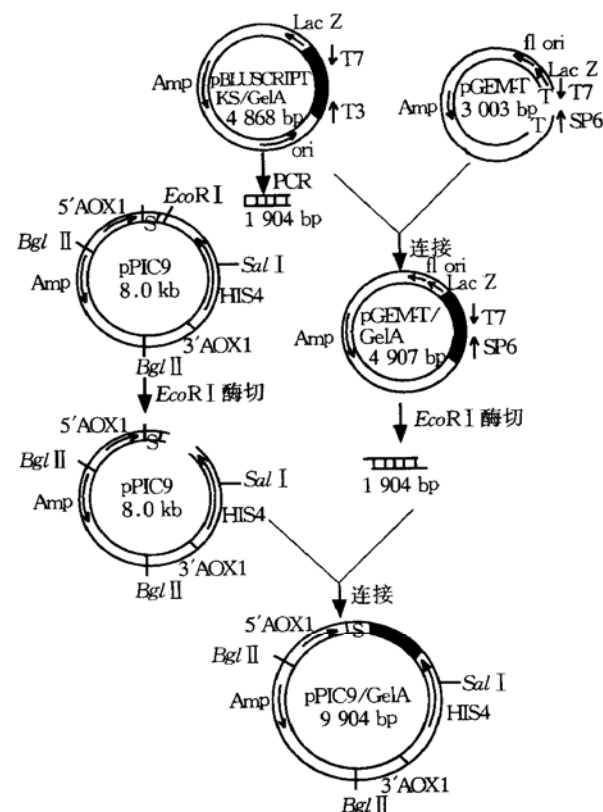


图 1 重组质粒的构建

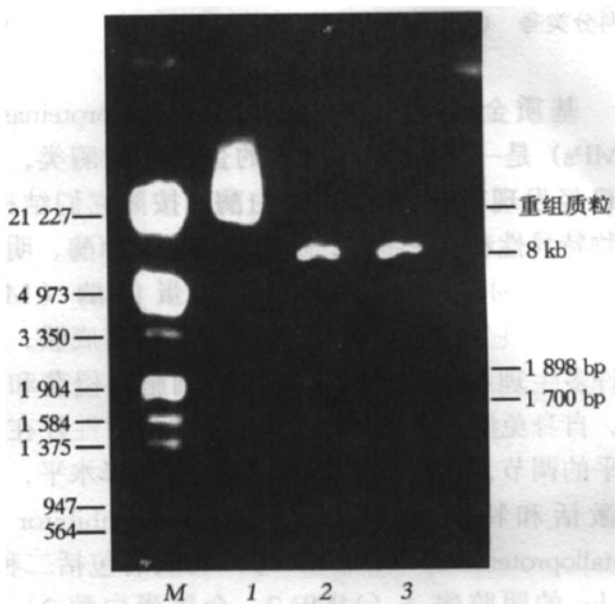


图 2 质粒酶切鉴定

M: λ DNA *Eco*R I / *Hind* III 双酶切; 1: 转化质粒; 2: 转化质粒 *Eco*R I 酶切; 3: 转化质粒 *Xho*I 和 *Bam*H I 双酶切。

2.2 重组质粒的转化和阳性克隆的筛选

由于酵母表达系统为整合表达, 根据同源重组原理, 我们用 *Sal*I 将重组载体进行了线性化, 然

后电击法转化酵母, 经组氨酸缺陷培养基培养, 共有 105 个克隆, 转化效率为 1×10^4 。通过对酵母培养上清明胶酶谱电泳进行活性筛选, 从 30 个克隆中筛选出 2 株阳性克隆, 结果见图 3。

从图 3 可以看出, 9 号克隆的表达产物具有明胶酶活性, 共有两条带, 一条是未降解的酶原形式, 一条是活性形式。

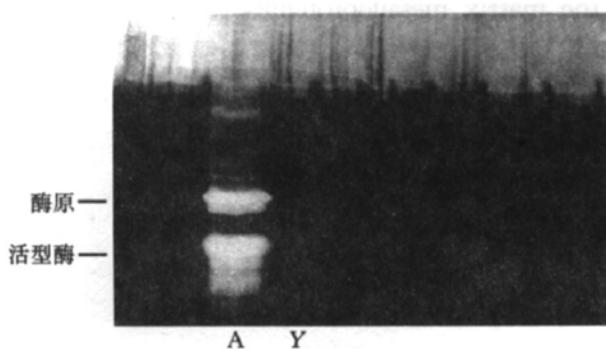


图 3 阳性克隆的酶活鉴定
Y: 阴性对照; A: 9 号克隆。

2.3 表达产物的活性检测和 SDS PAGE

利用明胶酶谱的电泳的方法, 从培养上清中取样检测产物活性, 结果如图 4 所示。图 4 的结果说明产物中明胶酶活性较高, 1 μ l 的培养上清中即能检测到活性。对表达产物的 SDS-PAGE 的分析结果表明, 产物的分子质量在 66 ku 左右 (图 5)。

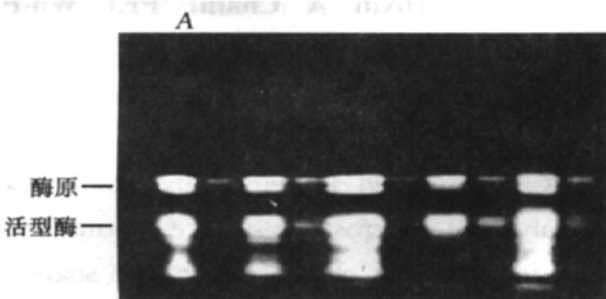


图 4 酵母表达上清的明胶酶活性分析
A: 上样量为 1 μ l。

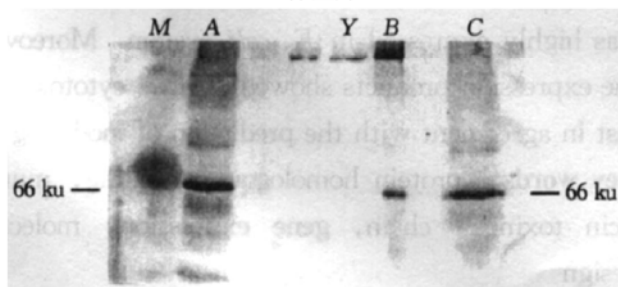


图 5 酵母表达上清的 SDS PAGE (银染)

M: BSA; A: 9 号克隆; B: 29 号克隆; C: 29 号克隆;
Y: 阴性对照。

3 讨 论

金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 在肿瘤细胞的侵袭和转移过程能够降解细胞外基质和基膜, 因而具有重要意义。目前有人在酵母中表达小鼠明胶酶 B^[4], 在 *E. coli* 中的表达也有报道, 且表达产量较高^[5]。对于明胶酶 A, 大多数学者从高分泌的肿瘤细胞中直接纯化, 或者构建表达载体转化工程细胞, 进行表达。这些方法一方面表达产量低, 另一方面细胞培养成本高, 不利于大量生产。本研究应用酵母系统表达金属蛋白酶-2, 在培养上清中能检测到明胶酶的活性, 而且活性较高, 说明酵母系统能用于明胶酶的表达。但是, 在表达产物中, 有明胶酶的活性形式存在, 即明胶酶有部分将降解, Koti 等^[6]的研究表明, 降解发生在 N 端, 是由蛋白质的过量水解造成的。另外, 我们在研究培养时间与表达产量的关系时发现, 随着培养时间的加长, 降解的量也增加, 分析酵母的代谢产物可能对酶原的激活有作用, 随着培养时间的加长, 代谢产物随之积累, 造成明胶酶降解量的增加。

参 考 文 献

- 1 J 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 金冬雁等译, 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社 (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd. Beijing: Science Press), 1995. 34~60
- 2 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术, 北京: 高等教育出版社 (LU S D. Current Protocols for Molecular Biology, Beijing: Publish House of Advanced Education), 1993. 381~385
- 3 Heussen C, Dowdle E B. Electrophoretic analysis of plasminogen activator in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. *Analyt Biochem*, 1980, **102** (1): 196~202
- 4 Masure S, Paemen L, van AELST I, *et al.* Production and characterization of recombinant active mouse gelatinase B from eukaryotic cells and *in vivo* effects after intravenous administration. *Eur J Biochem*, 1997, **244** (1): 21~30
- 5 Pourmotabbed T, Solomon T L, Hastly K A, *et al.* Characteristics of 92KD type IV collagenase/gelatinase produced by granulocytic leukemia cells: structure, expression of cDNA in *E. coli* and enzymic properties. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1204** (1): 97~107
- 6 Koti S, Robert G B, Keith E K, *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **1909** (1): 55~62

Primary Study of Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in Yeast *Pichia pastoris*. DING Xiur Yun,

LI Chun-Hai, ZHU Yun-Feng, SUN Li-Ya, YAN Chun-Hong, ZHANG Li-Xin, FENG Dong-Xiao, CHEN Gao-Ming (*Research Clinic, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*).

Abstract Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) plays important role in tumor invasion and metastasis. MMP-2 is expressed in yeast expression system for further studying its function mechanism. The expression sequence of MMP-2 (gelatinase A) have been obtained by PCR amplifying, restriction

enzyme cut and sequencing analysis demonstrate that the sequence is correct. The expression vector pPIC9/GelA containing gelatinase A sequence is constructed and transformed the yeast *Pichia pastoris*. The gelatin enzymography demonstrate that recombinant protein secreted by transformant yeast is capable of degrading gelatin and the molecular weight of the matrix metalloproteinase-2 is 66 ku in SDS-PAGE.

Key words matrix metalloproteinase-2, *Pichia pastoris*, expression

(上接第 272 页, Continued from page 272)

Q-Sepharose 一步就获得了较高纯度的蓖麻毒素 A 链突变体.

2.5 mRTA 对 HSB2 细胞的细胞毒作用

细胞毒测定结果表明, mRTA 在为 10^{-6} mol/L 时, 对 HSB2 细胞的杀伤率达到 31%, 说明我们所表达的 mRTA 是具有生物学活性的, 只是其毒性比完整的蓖麻毒素 A 链 (它在 10^{-6} mol/L 时可达到 60% 的杀伤率) 有所降低. 所以, 进一步改善预测模型, 设计出更合理的 mRTA, 使其能具有更强的毒性, 是我们努力的目标.

参 考 文 献

- 1 Lord J M, Roberts L M, Robertus J D, *et al.* Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*, 1994, **8** (2): 201~ 208
- 2 Sambrook J, Frish E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 16~ 69
- 3 Day P J, Ernst S R, Frankel A E, *et al.* Structure and activity of an active site substitution of ricin a chain. *Biochemistry*, 1996, **35** (34): 11098~ 11103
- 4 Blunder T L, Sibanda B L, Sternberg M J E, *et al.* Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 1987, **326** (6111): 347~ 352

- 5 Mackay D H, Cross A J, Hagler A T. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. New York: Plenum Press, 1989. 317~ 330

The Modeling, Expression and Activity Study of Mutant Ricin Toxin A Chain. PEI Wu-Hong, FENG Jian-Nan, LEI Hong-Xing, LI Yan, SHEN Bei-Fen (*Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Combined protein homologous modeling with analysis of electrostatic surface potential energy, mutant ricin toxin A chain, which was suggested to be bioactive, was designed. The gene of ricin toxin A chain was amplified by PCR and inserted in pKK223-3 to construct a prokaryotic expression vector, which was highly expressed in *E. coli* system. Moreover, the expression products showed obvious cytotoxicity, just in agreement with the prediction of modeling.

Key words protein homologous modeling, mutant ricin toxin A chain, gene expression, molecular design