

研究报告

# 鲈鱼生长激素在甲醇酵母中的胞内表达

陈丹 杨丰 王玮 徐洵<sup>1)</sup>

(国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

**摘要** 甲醇酵母 *pichia pastoris* 是一种理想的真核蛋白高水平表达系统. 将鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 生长激素基因克隆到酵母整合型质粒载体 pHIL-D2, 经转化 his4 缺陷型酵母 GS115, 用 PCR 方法筛选阳性转化子, 并用斑点印迹法筛选多拷贝转化子, 经甲醇诱导表达, SDS-PAGE 和蛋白质印迹杂交结果证实了表达产物为重组的鲈鱼生长激素.

**关键词** 鲈鱼生长激素, *pichia pastoris*, 胞内表达

**学科分类号** Q78

鱼生长激素是由鱼脑下垂体前叶分泌的一种单链蛋白质, 它具有促进鱼的生长发育, 加速蛋白质合成和脂类降解的生理功能. 由于它在鱼类养殖业领域具有极大的应用价值, 因而越来越受到重视. 利用基因重组技术生产鱼类生长激素, 为鱼类养殖业的快速发开展辟了新的途径.

甲醇酵母 *pichia pastoris* 具有 AOX1 的强启动子, 可用甲醇进行简单而精确的调控. 并且 *pichia* 可进行大体积高密度培养, 可以得到很高的表达量. 此外, *Pichia* 的蛋白质加工方式和高等真核生物类似, 因而成为理想的真核蛋白表达系统. 现已有多种蛋白质在该系统中得以高效表达<sup>[1,2]</sup>. 本文介绍的工作就是将鲈鱼生长激素基因在 *pichia* 中进行胞内表达.

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

XL1-Blue 及 pBluescript 购自 STRATAGENE; *Pichia pastoris* expression kit 购自 Invitrogen, 包括 GS115 酵母菌株和 pHIL-D2 表达载体, 5' AOX1 引物 P305 和 3' AOX1 引物 P303; DIG DNA labeling and detection kit 购自 Boehringer Mannheim; 标准鲈鱼生长激

素由本实验室从大肠杆菌工程菌表达产物纯化获得; 鼠抗鲈鱼生长激素抗体由本实验室制备; 羊抗小鼠 IgG-HRP 购自华美生物工程有限公司.

### 1.2 构建载体

以本实验室已有的鲈鱼生长激素基因<sup>[3]</sup>为模板, 用引物 P105: 5'-AAA GAA TTC ATG CAG CCA ATC ACA GAG AAG-3', P103: 5'-GGG GAA TTC TAC AG (AG) GTG CAG TT (AG) GC (CT) TC-3' 进行 PCR 扩增反应, 反应条件: 94 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 30 s; 30 个循环.

PCR 扩增产物用 EcoR I 酶切、纯化, 与 pBluescript 连接, 转化进 XL1-Blue 感受态细胞, 提取质粒, 用 EcoR I 酶切筛选含 GH 片段的重组载体 pBS-GH, 并将 GH 片段与 pHIL-D2 穿梭载体连接, 转化进 XL1-Blue<sup>[4]</sup>. 以 P105, P303 为引物, 直接菌落 PCR 确证 GH 片段在 pHIL-D2 中的正确连接方向, 提取重组穿梭载体 pHIL-GH.

### 1.3 转化酵母细胞

pHIL-GH 用 Not I 酶切成线性, 以电转

<sup>1)</sup>通讯联系人.

收稿日期: 1997-01-29, 修回日期: 1997-08-04

化方法将线性载体转化进 GS115 酵母菌株 (参见 *Pichia* expression kit instruction manual. Invitrogen).

### 1.4 筛选阳性转化子

在单菌落上挑取部分酵母菌于 5 μl 1% 蜗牛酶/SCE 溶液, 30℃ 轻摇 1 h, 酶解破壁, 99℃ 加热 15 min 后稀释至 20 μl, 取 2 μl 作模板, 以 P105, P103 为引物进行 PCR 反应. 总反应体积为 20 μl, Taq 酶量为 2 U. 95℃ 加热 2 min 后, 94℃ 30 s; 50℃ 1 min; 72℃ 30 s; 2 个循环, 紧接着 94℃ 30 s; 50℃ 30 s; 72℃ 30 s; 38 个循环. 取 10 μl 于 2% 琼脂糖电泳鉴定扩增产物.

### 1.5 筛选多拷贝转化子

提取 PCR 结果为阳性的酵母转化子染色体 DNA (参见 *Pichia* expression kit instruction manual. Invitrogen). DNA 样品经分光光度法定量后, 取 0.5 μg 点在尼龙膜上, 杂交和检测方法参见 Dig DNA labeling and detection kit 说明书.

### 1.6 表型检测

转化子接种 MD 和 MM 培养液, 30℃ 培养, 在 MM 中生长快的为 Mut<sup>+</sup>, 生长慢的为 Mut<sup>s</sup> (参见 *Pichia* expression kit instruction manual. Invitrogen).

### 1.7 表达、电泳、蛋白质印迹杂交

接种单菌落开始利用甲醇进行诱导 (参见 *Pichia* expression kit instruction manual. Invitrogen). 诱导完毕后, 吸取 100 μl 菌液, 离心去上清, 沉淀用 1% 蜗牛酶/SCE 37℃ 轻摇 3 h 破壁, 再离心去上清, 加入 100 μl 电泳样品缓冲液, 取 10 μl 进行 SDS-PAGE 电泳.

电泳后, 用扩散转移法将分离产物转移到硝酸纤维素膜上, 然后进行蛋白质印迹杂交<sup>[5]</sup>, 一抗与二抗的稀释比均为 1: 1000.

## 2 结果与讨论

### 2.1 pBS-GH 及 pHIL-GH 的构建

先用 PCR 方法使鲈鱼生长激素基因 (572 bp) 克隆进 pBluescript 质粒中, 构建成

pBS-GH, 然后酶切出该片段连接到穿梭质粒 pHIL-D2 中, 构建成 pHIL-GH (图 1, 图 2).

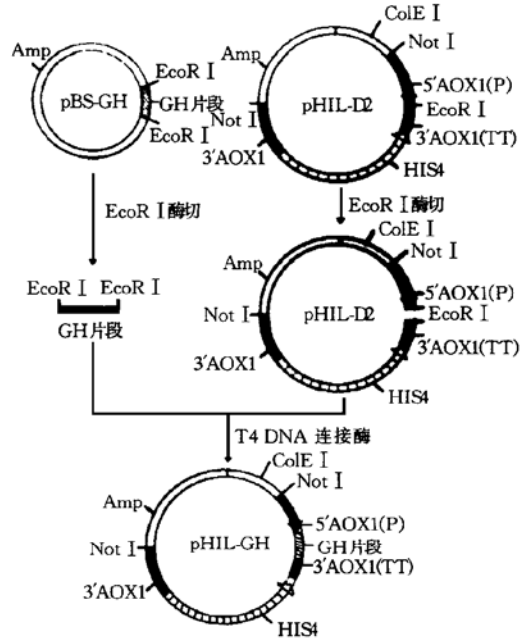


图 1 鲈鱼生长激素基因表达载体构建示意图

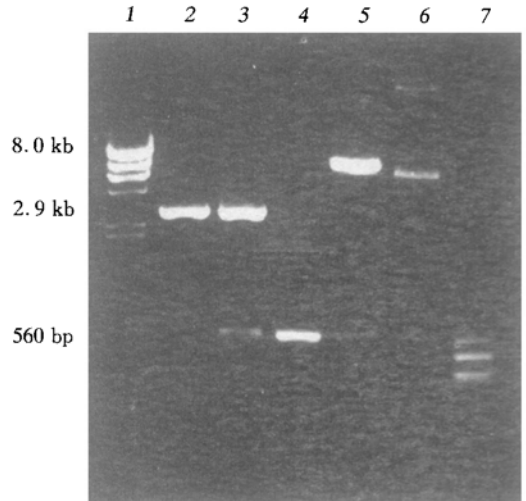


图 2 鲈鱼生长激素基因在 pBluescript 及 pHIL-D2 中的克隆

1: 分子质量标准, λ phage/Hind III; 2: pBluescript/EcoRI; 3: pBS-GH/EcoRI; 4: 引物 P105 及 P103 扩增出的 GH 片段; 5: pHIL-GH/EcoRI; 6: pHIL-D2/EcoRI; 7: 分子质量标准, pGEM-3Zf/Hae III.

## 2.2 转化

pHIL-GH 经 Not I 酶切后, 使载体变小并线性化, 有利于提高转化效率, 产生定点整合. 由于酵母细胞壁的缘故, 较难吸收外源 DNA, 用常规的 LiCl 转化方法, 5~10  $\mu\text{g}$  DNA 只有 1 个转化子, 而用电转化的方法, 每微克 DNA 可有 20~40 个转化子.

## 2.3 筛选

由于酵母细胞壁较厚, 不能直接进行菌落 PCR 筛选. 因此我们建立了改良的菌落 PCR 快速检测方法, 共筛选了 254 个转化子, 其中 52 个呈阳性. 提取这些阳性转化子的染色体 DNA 及 6 个阴性转化子的染色体 DNA, 用地高辛标记的 GH 片段探针进行杂交, 杂交结果显示 52 个阳性转化子均有杂交信号 (图 3 中 1, 2, 3), 而 6 个阴性转化子均无杂交信号 (图 3 中 4), 验证了 PCR 方法的可靠性. 同

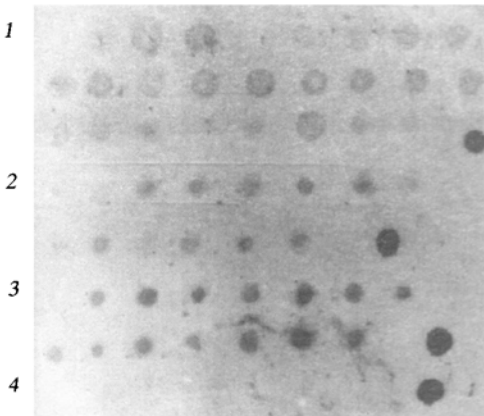


图 3 染色体 DNA 杂交图

1~3: 阳性转化子; 4: 阴性转化子. 每组第一个为空白对照, 最后一个为阳性对照.

时也说明了有相当一部分的转化子只转入了 HIS4 片段, 而 GH 片段未转入, 可能有 3 个原因: a. 以 HIS4 做筛选标记时, 当一块平板上涂布的菌量大于  $10^6$  时, 容易出现假阳性<sup>[6]</sup>, 而我们每块板上约涂布  $10^8$  个细胞; b. 外源 DNA 可能受到感受态细胞的部分降解, 或在电转化时的高压下被打断, 而产生单独的 HIS4 片段. 由于受体细胞染色体内含有的 his4

的同源序列, 该序列为 HIS4 中间缺失的一段, HIS4 可能通过双交换的方式整合到该位点, 产生转化子, 却不含生长激素片段; c. 可能是完整的 DNA 片段整合到染色体上, 而使染色体上同时带有 his4 和 HIS4 两个同源片段, 经染色体内交换, 而吐出 GH 片段<sup>[7]</sup>. 因 DNA 起始量是相同的, 所以认为杂交信号越强则目的基因的拷贝数越多, 根据杂交结果, 选取 10 个杂交信号最强的转化子, 进一步进行表型测定.

## 2.4 表型鉴定

这 10 个多拷贝转化子经过表型测定, 其中 7 个为甲醇利用正常型 ( $\text{Mut}^+$ ), 3 个为甲醇利用缓慢型 ( $\text{Mut}^s$ ). 理论上说, 以 Not I 将整个表达盒切下, 将发生双交换而将 AOX1 取代, 而产生  $\text{Mut}^s$  的表型. 但一些研究表明, 只有 5%~35% 的为  $\text{Mut}^s$ <sup>[8]</sup>, 这说明大部分仍为单交换插入. 可能是由于转化后, 经分子间连接成环, 单交换插入同源区, 这也解释了多拷贝  $\text{Mut}^s$  转化子形成的原因<sup>[9]</sup>.

## 2.5 表达产物鉴定

选取杂交最亮的正常型菌株 (命名为 J33), 缓慢型菌株 (命名为 J34) 和空白对照菌株 GS115 分别在摇瓶中进行甲醇诱导, 6 d 后, J33、J34 与 GS115 酵母株密度  $A_{600}$  分别为 11、9 及 8. 样品经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 可以看到与标准鲑鱼生长激素对应处有一条带 (图 4). 标准鲑鱼生长激素量是  $1 \mu\text{g}$ , 根据染色亮度判断 10  $\mu\text{l}$  上样液 (相当于 10  $\mu\text{l}$  发酵液) 至少含有  $1 \mu\text{g}$  重组鲑鱼生长激素, 因此表达量为 100 mg/L 发酵液. *pichia* 一般的表达量为 1 g/L, 表达量低的原因可能实验室发酵通气性不好, 使 AOX1 的表达量降低, 导致甲醇利用率降低, 减缓酵母生长, 达不到很高的密度. 而据报道条件适宜时, *pichia* 的生长密度  $A_{600}$  最高可达 400.

蛋白质印迹杂交结果见图 5. 重组的 J33 表达产物与纯化的 *E. coli* 表达产物均能与鼠抗鲑鱼生长激素抗体结合, 且杂交带处于同一位置, 而空白对照菌株 GS115 杂交呈阴性,

确证表达产物为重组鲈鱼生长激素蛋白.

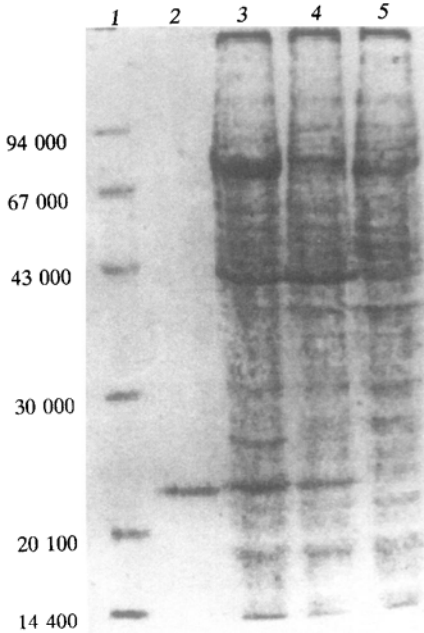


图4 表达产物的 SDS PAGE 图

1: 分子质量标准; 2: 标准鲈鱼生长激素 (阳性对照); 3: J33 酵母菌株表达产物; 4: J34 酵母菌株表达产物; 5: GS115 酵母菌株表达产物 (阴性对照).

1 2 3

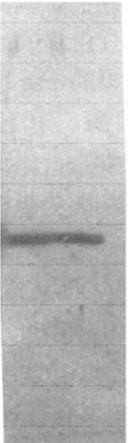


图5 重组表达产物蛋白质杂交图

1: J33 酵母菌株表达产物; 2: 标准鲈鱼生长激素 (阳性对照); 3: GS115 酵母菌株产物 (阴性对照).

## 参 考 文 献

- 1 Tschopp J F, Brust P F, Cregg J M *et al.* Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucl Aci Res, 1987, **15** (9): 3859~ 3875
- 2 Clare J J, Romanos M A, Royment F B *et al.* Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high level secretion

using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. Gene, 1991, **105**: 205~ 212

- 3 杨 丰, 郑 斌, 徐 洵. 三种鱼类生长激素 cDNA 基因结构的比较研究. 生物化学与生物物理学报, 1995, **27** (5): 537~ 542
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T A. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory press, 1989. 1. 53~ 1. 84
- 5 Harlow E, Lane D. Antibodies: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 479~ 510
- 6 Sreekrishna L, Tschopp J F, Fuke M. Invertase gene (SUC2) of *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant marker for transformation of *Pichia pastoris*. Gene, 1987, **59**: 115 ~ 125
- 7 Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast cell. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, **75**: 1292~ 1293
- 8 Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R *et al.* High level expression, purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *pichia pasoris*. Biochemistry, 1989, **28** (9): 4117~ 4125
- 9 Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P *et al.* High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple integrations of the gene. Bio/technology, 1991, **9** (may): 455~ 460

**Intracellular Expression of *Lateolabrax japonicus* Growth Hormone in Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*.** CHEN Dan, YANG Feng, WANG Wei, XU Xun (*The 3rd Institute of Oceanography, State Oceanic Administration (SOA), Xiamen 361005, China*).

**Abstract** The methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* heterologous gene expression system was utilized to produce attractive levels of a variety of intracellular and extracellular proteins of interest. *Lateolabrax japonicus* growth hormone gene was cloned into the yeast integrative vector pHIL-D2, which was then transformed into his4 mutant yeast GS115. PCR fast detection methods was performed to screen the positive transformants and dot-blotting was used to screen the multiple-copy transformants. Via inducing AOX1 promoter by methanol, growth hormone could be expressed intracellularly. SDS-PAGE and Western blot were applied to confirm the product.

**Key words** *Lateolabrax japonicus* growth hormone, *Pichia pastoris*, intracellular expression