

应用原位双膜法快速筛选人 Flt3 配体 甲醇酵母高表达转化子*

张艳丽 陈松森** 杨克恭 狄旭 熊安琪 张友鸿

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学院)

摘要 原位双膜法是一种基于免疫原理的快速筛选高表达甲醇酵母转化子的方法, 即首先将固体培养基上的菌落转印至醋酸纤维素薄膜上, 再利用硝酸纤维素薄膜原位捕获穿过醋酸纤维素薄膜的菌落分泌蛋白, 然后用免疫方法检测与硝酸纤维素薄膜结合的蛋白。利用此法筛选到人 Flt3 配体 (hFL) 的甲醇酵母高表达转化子, 液体诱导表达量约 20 mg/L。ELISA 结果证明, 原位双膜法所得的菌落染色强度与该菌落液体诱导表达水平正相关。蛋白质印迹结果显示, 培养上清在 25 ku 处有明显杂交条带, 而对照组杂交呈阴性, 且表达量随诱导天数增加。原位双膜法是一种良好的筛选方法, 可以快捷、准确地筛选高表达酵母转化子。

关键词 人 Flt3 配体 (hFL), 表达, 巴斯德毕赤酵母, 原位双膜筛选法

学科分类号 Q78

巴斯德毕赤甲醇酵母是一种有效的外源基因表达系统, 目前已表达外源蛋白 200 多种^[1,2]。但是毕赤酵母每个转化子表达外源蛋白的能力差异极大, 寻找高表达转化子的工作极为费时费力。1997 年 McGrew 等^[3]创建原位双膜筛选法, 他们首先将固体培养基上的菌落转移到醋酸纤维素薄膜上, 再利用硝酸纤维素薄膜原位捕获穿过醋酸纤维素薄膜的菌落分泌蛋白, 然后用免疫方法检测与硝酸纤维素薄膜结合的蛋白, 其染色强度直接反映菌落的蛋白分泌量。原位双膜筛选法较 G418 抗性等其他筛选方法更为快捷、准确。

Flt3 配体 (fms-like tyrosine kinase-3 ligand, FL) 是 1993 年新发现的造血细胞生长因子, 它对造血干/祖细胞的增生、分化、动员、维持及长期重建具有重要作用^[4]。最近发现, FL 能明显地促进细胞毒 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞特别是树突状细胞等免疫系统细胞的增生^[5]。患肿瘤小鼠经 FL 治疗后, 可产生明显的抗肿瘤作用^[6,7]。本文构建了膜外区可溶型 hFL 的酵母表达质粒, 并用原位双膜筛选法得到较高表达的酵母转化子, 表达量约 20 mg/L。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、酶和主要试剂: 大肠杆菌 DH5α 细胞株由本室保存。GS115 酵母菌株和 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶,

Pfu DNA 聚合酶, DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司、上海 Sangon 公司及 Boehringer Mannheim 公司; 单链寡核苷酸片段由上海 Sangon 公司合成; 由 TaKaRa 公司进行 DNA 序列测定。低分子量标准蛋白购自 Pharmacia 公司。兔抗 hFL 多克隆抗体为 Strathmann Biotech 公司产品。碱性磷酸酶 (AP) 标记羊抗兔 IgG 购自北京邦定泰克生物技术有限公司。

1.1.2 培养基: MD/-His 平板 (13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 20 g/L 葡萄糖, 15 g/L 琼脂糖), YPD (10 g/L 酵母粉, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖, 平板加入 15 g/L 琼脂糖), BMGY (10 g/L 酵母粉, 20 g/L 蛋白胨, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 10 g/L 甘油), BMMY (将 BMGY 中 10 g/L 甘油替换为 5 ml/L 甲醇, 平板加入 15 g/L 琼脂糖)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增目的基因片段: 根据 hFL 膜外区 156 个氨基酸残基的 cDNA 序列, 设计并合成 12 条 53~60 bp 的单链寡核苷酸。其中第一条含 Xho I 酶切位点, 采用酵母嗜好密码子, 第十二条含 EcoR I 切点。共经过 4 轮 PCR 反应, 逐步扩增

* “十五”国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA212171)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-65296433, E-mail: zh_yanli@yahoo.com

收稿日期: 2001-07-23, 接受日期: 2001-10-18

出编码 hFL 膜外区的 DNA 片段. 扩增产物的回收、纯化采用分子克隆常规方法进行.

1.2.2 重组表达质粒 pPIC9K-hFL 的构建: 将回收的 PCR 产物和 pPIC9K 分别用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切, 然后用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化宿主菌 DH5 α , 用 Kana 筛选.

1.2.3 质粒转化酵母宿主菌: 重组表达质粒 pPIC9K-hFL 经 *Sal*I 线性化后, 取 5~10 μ g 与 GS115 感受态酵母菌 80 μ l 混合, 转入 0.2 cm 电转杯, 冰浴 5 min 后, 利用 BioRad 电转仪 (1500 V, 25 μ F, 200 Ω) 进行电转, 然后将菌液涂布于 MD/-His 选择平板上, 30 $^{\circ}$ C 孵育 2~3 d, 观察转化子生长.

1.2.4 双膜原位筛选高表达转化子: 将醋酸纤维素薄膜置于 MD/-His 平板的 His $^{+}$ 转化子菌落上, 用涂布棒轻压使醋酸纤维素薄膜完全湿润并赶尽气泡, 使所有菌落转移到醋酸纤维素薄膜上. 在 BMMY 板上置一同样大小的硝酸纤维素薄膜, 并将醋酸纤维素薄膜菌落向上置于硝酸纤维素薄膜上. 30 $^{\circ}$ C 孵育 18 h 后, 将醋酸纤维素薄膜移至 MD/-His 平板上, 4 $^{\circ}$ C 保存. 将硝酸纤维素薄膜取下, 6% 小牛血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, TBS-T (Tris-NaCl 缓冲液加 0.05% 吐温 20) 洗 3 次 (每次 10 min). 兔抗 hFL 多克隆抗体 (0.1 mg/L) 室温孵育 2 h, TBS-T 洗膜 3 次. 然后羊抗兔 IgG-AP (2 U/ml) 室温孵育 2 h, TBS-T 洗膜 3 次. 在 15 ml 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸/氮蓝四唑 (BCIP/NBT) 底物缓冲液中加入 50 μ l BCIP 和 99 μ l NBT, 室温反应 5 min 后, 用含 5 mmol/L EDTA 的 PBS 终止反应.

1.2.5 酵母菌的诱导表达: 将筛选到的酵母阳性转化子接种到 BMMY 中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 16~18 h 至 A_{600} 为 2~6, 离心收集菌体, 用 BMMY 培养基稀释至 A_{600} 为 1 后诱导表达, 每隔 24 h 收集部分酵母培养上清, 并补加甲醇至终浓度为 1%, 诱导 4 d 后, 离心收集酵母培养上清.

1.2.6 酵母培养上清 ELISA 及蛋白质印迹: 方法参见文献 [8].

2 结 果

2.1 hFL DNA 片段的合成和重组表达载体的构建

12 条单链寡核苷酸经 4 轮 PCR 后得到编码 hFL 膜外区的 DNA 片段, 经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切, 与经同样处理的 pPIC9K 连接, 构建得到重组表达质

粒 pPIC9K-hFL (图 1). 经测序结果正确.

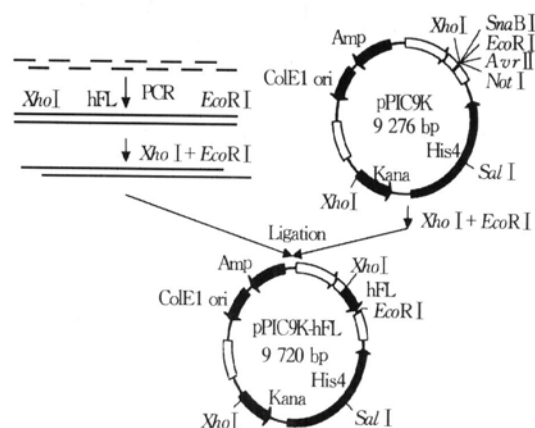


Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-hFL

2.2 双膜原位杂交筛选高表达 hFL 的转化子

电转时用不同的细胞浓度铺 MD/-His 板, 每板得到 100~1000 个转化子. 酵母菌落被转到醋酸纤维素薄膜上以后, 置于 BMMY 平板上, 30 $^{\circ}$ C 诱导表达. 两者之间的硝酸纤维素薄膜将透过醋酸纤维素薄膜的酵母外泌 hFL 捕获, 根据免疫显色的强弱鉴定转化子表达水平的高低, 各染色点对应于醋酸纤维素薄膜的相应菌落, 不同菌落的显色强度有明显差异 (图 2), 而且有许多菌落在硝酸纤维素薄膜上找不到相应染色点, 说明这些菌落基本无表达.

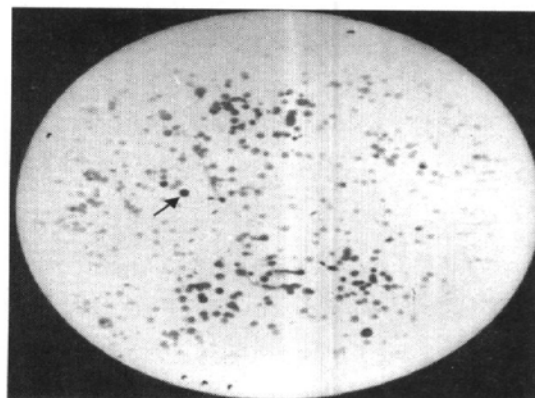


Fig. 2 FL expressed from individual transformants

The arrow shows an intensely stained colony

2.3 ELISA 检测

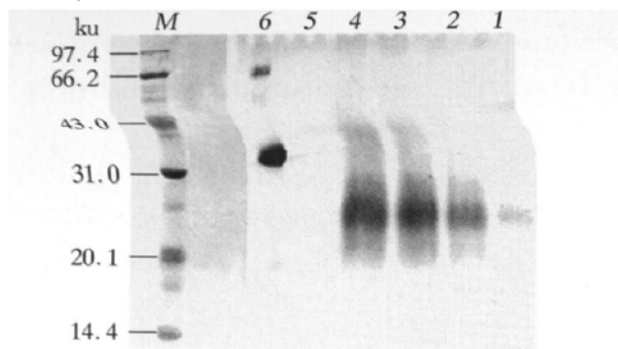
从醋酸纤维素膜上挑选 10 个强染色和 1 个弱染色的菌落进行液体培养, 培养上清稀释 1 倍后进行 ELISA 检测, 结果证明强染色转化子均表达 hFL 膜外区, 且染色强度与液体诱导表达水平正相关 (表 1).

Table 1 Correlation of staining intensity on film to expression in liquid culture

Staining intensity	ELISA
GS115/ pPIC9K	0.01
Strong (1~ 10)	1.125~ 1.468
Weak	0.520

2.4 蛋白质印迹

强染色转化子经甲醇诱导 24 h、48 h、72 h、96 h 的酵母培养上清蛋白质印迹结果显示, 在 25 ku 处有明显杂交条带, 而对照组杂交呈阴性, 说明酵母表达产物能与兔抗 hFL 多克隆抗体结合, 且表达量随诱导天数增加。杂交条带分子质量约为 25 ku, 而 *E. coli* 表达的 hFL 膜外区分子质量约为 17 ku, 说明酵母表达的该蛋白质可能有糖基化。

**Fig. 3** Western blot of culture supernatant of intensely stained colony

1: induced for 24 h; 2: induced for 48 h; 3: induced for 72 h; 4: induced for 96 h; 5: GS115/ pPIC9K induced for 96 h (negative control); 6: Trx-FL expressed in *E. coli* (positive control).

3 讨 论

外源基因在酵母表达中一个关键环节是高表达株的筛选。一般的液体培养基筛选量过大, 并且耗时过长, 因此人们渴望找到一种可靠且快速的筛选高表达株的方法。质粒 pPIC3K 与 pPIC9K 在表达盒中增加了一拷贝 kana 抗性基因, 因此有多拷贝 pPIC3K 或 pPIC9K 整合的转化子能够抗较高浓度的 G418^[9]。但是, 整合的拷贝数增多不一定使其表达量随之增高, 而且某些拷贝在整合时目的基因有可能丢失, 仅剩 G418 抗性。因此 G418 浓度的

抗性在很多情况下并不能真实反映表达量。Laroche 等^[10]用 96 孔板培养酵母并进行诱导表达, 相对提高了效率。原位双膜筛选用免疫方法对酵母分泌物进行检测, 直接筛选高表达的转化子, 且每次筛选几百个转化子, 免疫显色后各菌落的外泌蛋白量之间的对比非常明显、直观, 可以直接挑选染色深的菌落进行液体培养基诱导表达, 并进行 ELISA 检测。结果表明, 所筛选的高表达菌落与实际液体培养基诱导表达情况相符。原位双膜筛选法的特点是必须应用已知蛋白的相应抗体进行筛选, 因此, 对于尚无抗体的新蛋白质无法应用, 而且相对比较昂贵。但是, 原位双膜筛选法可以大大简化酵母高表达转化子的筛选工作, 值得推广。

参 考 文 献

- 1 Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotech, 2000, **16** (1): 23~52
- 2 欧阳立明, 张惠展, 张嗣良. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27** (2): 151~154
Ouyang L M, Zhang H Z, Zhang S L. Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (2): 151~154
- 3 McGrew J T, Leiske D, Dell B, *et al.* Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expression transformants. Gene, 1997, **187** (2): 193~200
- 4 Lyman S D, James L, Bos T V, *et al.* Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. Cell, 1993, **75** (6): 1157~1167
- 5 Antonyamy M A, Thomson A W. FLT3 ligand (FL) and its influence on immune reactivity. Cytokine, 2000, **12** (2): 87~100
- 6 Lynch D H, Andreason A, Maraskovsky E, *et al.* Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses *in vivo*. Nature Med, 1997, **3** (2): 625~631
- 7 Peron J M, Esche C, Subbotin V M, *et al.* Flt3 ligand administration inhibits liver metastases: role of NK cells. J Immun, 1998, **161** (11): 6164~6170
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989, 1.21~6.32
- 9 Scorer C A, Clare J J, McCombie W R, *et al.* Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. Biotechnology, 1994, **12** (2): 181~184
- 10 Laroche Y, Storme V, Meutter J D, *et al.* High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Biotechnology, 1994, **12** (11): 1119~1124

In situ* Two-film Method for Rapid Screening of *Pichia pastoris* Transformants Expressing High-level Human Flt3L

ZHANG Yan-Li, CHEN Song-Sen^{**}, YANG Ke-Gong, Di Xu, XIONG An-Qi, ZHANG You-Hong

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract *Pichia pastoris* is a system to express a lot of foreign proteins, however the expression levels of transformants vary widely from one to one clone. *In situ* two-film method is a rapid method based on immunology to screen *Pichia pastoris* transformants expressing high-level protein, in which yeast colonies are lifted from solid culture onto a cellulose acetate film. Then a nitrocellulose film is used to capture the secreted proteins that pass through the cellulose acetate film. The proteins binding on the nitrocellulose film are stained by immunology methods. *Pichia pastoris* transformants expressing high-level hFL are obtained by using this method, and the expression level in liquid culture is about 20 mg/L. The result of ELISA shows that the staining intensity is correlated to the expression level in liquid culture. Western blot of culture supernatant shows obvious band at 25 ku, while the control doesn't show any band. The expression quantity increases as the inducing time increases.

Key words human fms-like tyrosine kinase 3 ligand (hFL), expression, *Pichia pastoris*, *in situ* two-film method

* This work was supported by a grant from state 863 High Technology R & D Project of China (2001AA212171).

* Corresponding author. Tel: 86-10-65296433, E-mail: zh_yanli@yahoo.com

Received: July 23, 2001 Accepted: October 18, 2001