

人白血病抑制因子基因在巴斯德毕赤酵母中的表达

王全忠 杨 林 欧阳菁 龙繁新 王珣章*

(中山大学生物医药中心 生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘 要:将 575bp 的人白血病抑制因子基因克隆到表达载体 pPICZaA 上,构建成重组质粒 pPICZaA-hLIF。pPICZaA-hLIF 经 *SacI* 酶切使之线性化后转化到巴斯德毕赤酵母细胞 X-33 中。转化子经 Mut 表型筛选和 PCR 分析鉴定后,利用甘油增菌和甲醇诱导,实现了 hLIF 基因在毕赤酵母系统中的表达。SDS-PAGE 检测和 Western blot 分析结果表明表达产物的分子量约为 58.5kD,与天然 hLIF 大小相近,并且具有免疫原性。凝胶薄层扫描分析显示,重组 hLIF 约占上清总蛋白的 32.8%。生物活性测定结果表明,表达产物能够抑制小鼠畸胎瘤细胞 F9 克隆的形成。

关键词:人白血病抑制因子,巴斯德毕赤酵母,基因表达,生物活性测定

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0582-05

人白血病抑制因子(Human Leukemia Inhibitory Factor, hLIF)是近年来被证实的一种天然的、具有广泛生物学活性的细胞因子。hLIF 在造血系统^[1]、生殖系统^[2]、骨组织^[3]、肿瘤细胞^[4]、肌肉组织^[5]、神经组织^[6]等多种组织和细胞中调节人体的正常生理功能以及某些疾病的进程,具有广阔的临床应用前景。特别是 hLIF 对早期胚胎发育与着床的作用,已成为近年来研究的热点^[7]。但是,天然 hLIF 含量低微,且难于提取与分离。本文利用基因工程方法,将人工合成的 hLIF 基因^[8]在巴斯德毕赤酵母中得到了有效的分泌表达。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和细胞

大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10F', 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) X-33, 质粒 pPICZaA 均购自 Invitrogen 公司;小鼠畸胎瘤细胞 F9 购自中国科学院上海细胞生物研究所;质粒 pUC18-hLIF 为本室保存^[8]。

1.2 酶与试剂

限制性内切酶、*T*₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺均购自 Promega 公司;RNase A、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为华美生物工程公司产品;硝酸纤维素膜购自 Schleicher&Schuell 公司;QIA quick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司; α -factor 引物、3' AOX1 引物、YNB、Biotin、抗生素 ZeocinTM、Easy SelectTM *Pichia* Expression Kit 购自 Invitrogen 公司。

* 通讯作者

作者简介:王全忠(1969-),男,湖南省人,中山大学生命科学学院硕士,主要从事基因高效表达与调控的研究。

收稿日期:2000-11-27,修回日期:2001-03-12

1.3 方法

- 1.3.1 酵母表达载体的构建:参照 Sambrook 的方法^[9]。
- 1.3.2 酵母的转化及重组菌的鉴定:参照 Easy Select™ *Pichia* Expression Kit 的说明。
- 1.3.3 重组酵母 Mut 表型的筛选:参照 Easy Select™ *Pichia* Expression Kit 的说明。
- 1.3.4 甲醇诱导表达:参照 Easy Select™ *Pichia* Expression Kit 的说明。
- 1.3.5 表达产物的检测:参照 Sambrook 的方法^[9]。
- 1.3.6 克隆形成抑制实验:参照文献[10]的方法。

2 结果

2.1 重组质粒 pPICZαA-hLIF 的构建及鉴定

从 pUC18-hLIF 上用 *Xho*I、*Xba*I 双酶切出含 hLIF 基因的片段,并克隆到载体 pPICZαA 强启动子 P_{AOXI} 下游的 *Xho*I + *Xba*I 酶切窗口中,构建重组质粒 pPICZαA-hLIF(图 1)。用 *Xho*I、*Xba*I 双酶切鉴定,证明为所需的重组质粒(图 2)。

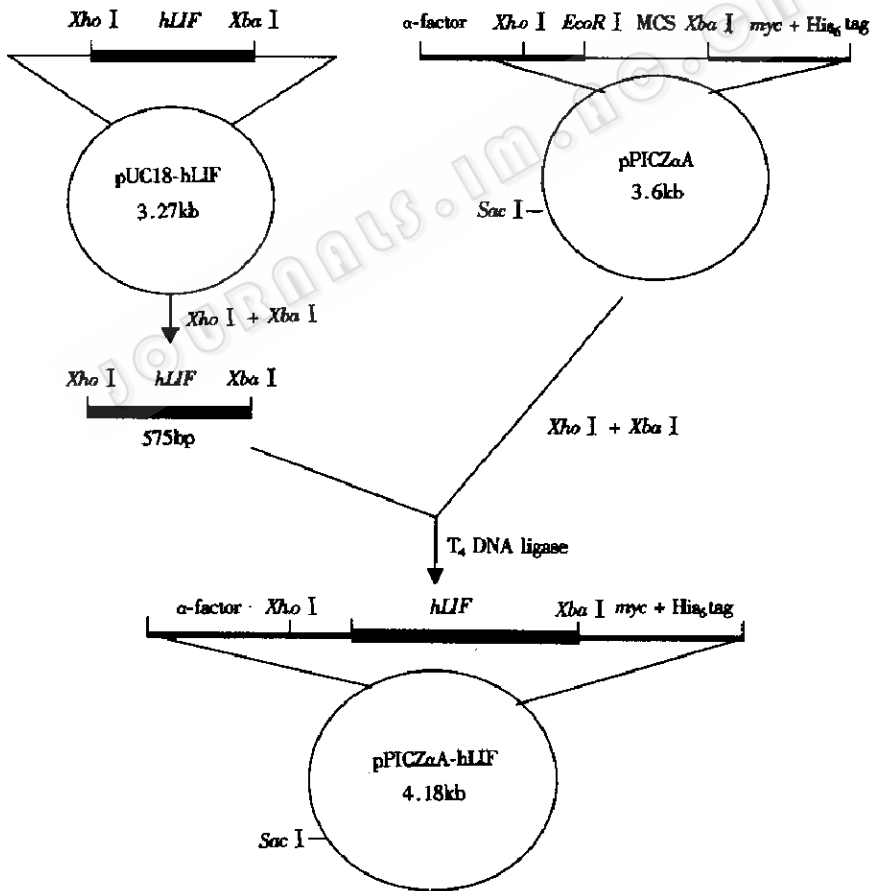


图 1 重组质粒 pPICZαA-hLIF 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant pPICZαA-hLIF

2.2 重组质粒 pPICZ α A-hLIF 对毕赤酵母的转化及转化子的筛选和鉴定

将 5~10 μ g pPICZ α Z-hLIF 回收纯化,用 *Sac*I 酶切使之线性化后,通过氯化锂法转化宿主菌 *Pichia pastoris* X-33,从中筛选出 Mut⁺ 转化子,提取转化子的基因组 DNA,利用 α -factor 引物和 3' AOX1 引物进行 PCR 鉴定。结果显示用 *Sac*I 酶切使之线性化的重组质粒 pPICZ α A-hLIF 已经成功地整合到酵母细胞的基因组中(图 3)。提高培养基中抗生素 ZeocinTM 的浓度至 500 μ g/mL,筛选到 5 个含多拷贝表达单元的转化子。

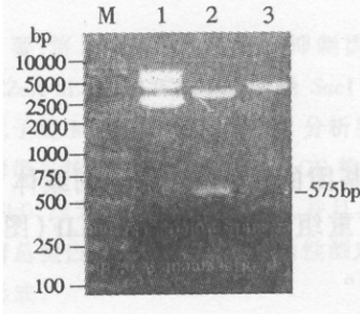


图 2 重组质粒 pPICZ α A-hLIF 的酶切鉴定

Fig.2 Characterization of pPICZ α A-hLIF by

*Xba*I/*Xba*I digestion

M. DNA marker; 1. pPICZ α A-hLIF;

2. pPICZ α A-hLIF/*Xho*I + *Xba*I;

3. pPICZ α A-hLIF/*Sac*I.

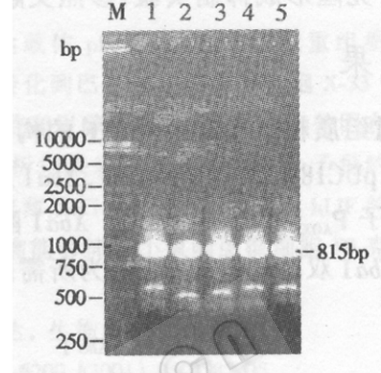


图 3 重组酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig.3 Characterization of recombinant transformants by

PCR

M. DNA marker; 1~5. PCR products of

transformants genomic DNA.

2.3 hLIF 基因在毕赤酵母中的表达及表达产物的检测

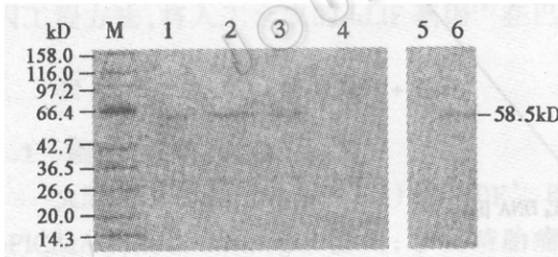


图 4 表达产物 hLIF 的 SDS-PAGE 检测和 Western blot 分析

Fig.4 SDS-PAGE and Western blot analysis of the expressed hLIF

M. Mid-range protein molecular marker; 1~3. SDS-PAGE of supernatants from cultured recombinant cells transformed by pPICZ α A-hLIF from 36, 48, 72h; 4. SDS-PAGE of supernatants from cultured cells transformed by pPICZ α A from 48h; 5. Western blot of supernatants from cultured cells transformed by pPICZ α A; 6. Western blot of supernatants from cultured recombinant cells transformed by pPICZ α A-hLIF.

通过甘油增菌及甲醇诱导使 hLIF 基因在重组酵母细胞中表达。在甲醇诱导后 96h 内的不同时间点取样。重组酵母细胞培养液上清经 SDS-PAGE 检测及 Western blot 分析,都看不到特异的 hLIF 蛋白带。在培养基中加入 1% 的盐酸干酪素后,经 SDS-PAGE 检测发现,甲醇诱导 24h 后即有表达产物出现,其分子量约为 58.5kD,与预期的大小相符。诱导 48h 后表达量最高(见图 4)。Western blot 分析结果显示,培养液上清中 58.5kD 有一条人白血病抑制因子特异性反应带,而作为阴性对照的酵母培养液上清的免疫印迹结果为阴性(图 4)。

2.4 表达效率及表达量的测定

将诱导表达 48h 的培养液上清的 SDS-PAGE 凝胶经用日本岛津 CS 双波长薄层扫描

仪扫描估测可知, hLIF 约占上清中可溶性蛋白的 32.8%。根据考马斯亮蓝结合法测定得知, 上清中可溶蛋白的总浓度为 1.6g/L, 因此 rhLIF 的表达量约为 524.8mg/L。

2.4 生物活性测定

克隆形成试验结果表明: 当小鼠畸胎瘤细胞 F9 培养液含有 2% 的表达培养液上清时, 表达产生的人白血病抑制因子对约 35.1% 的细胞克隆形成有明显的抑制作用(表 1)。

表 1 rhLIF 抑制小鼠畸胎瘤细胞 F9 的克隆形成

Table 1 rhLIF inhibit the clone formation of murine's teratoma cells

Laboratory time	1	2	3	4	5	6	7
Numbers of the clonal formation in 100 F9 cells in control group	99	98	99	97	96	99	98
Numbers of the clonal formation in 100 F9 cells in laboratory group	66	65	65	64	66	66	67
Cell numbers of the clonal inhibition by rhLIF	34	35	35	36	34	34	33
Efficiency of inhibition/ %	34.3	35.7	35.3	37.1	35.4	34.3	33.7
Average efficiency of inhibition/ %				35.1			

3 讨论

P. pastoris 体系的特点在于表达菌在从摇瓶到大容积高密度发酵罐扩大培养的过程中, 其特定的生产力没有减少^[11]。所以人们不断优化小规模试管和摇瓶培养的条件, 使其尽可能与发酵罐中预期的条件接近。表达条件的优化对表达水平的提高至关重要。本实验从以下几方面对培养条件进行了优化: 培养物的体积不超过容器总体积的 30%; 培养温度始终保持在 28℃ ~ 30℃; 在甲醇诱导过程中, 瓶口避免用不透气的材料封闭, 而选用 4 层医用纱布, 以保证足够的通气量; 添加有足够缓冲能力的培养基缓冲液, 使产物的蛋白质降解降低到最小程度; 添加相当量的胰蛋白胍以防止产物降解并同时提供蛋白质合成与分泌所需的氨基酸和能量。尽管如此, 重组酵母菌培养 96h 后, 培养液上清的 SDS-PAGE 中仍难以看到所需的目的蛋白带, 但在培养基中加入 1% 盐酸干酪素后, 表达量明显提高。这说明方法改进前表达产物绝大部分被蛋白酶降解, 而后添加的盐酸干酪素中的部分小肽作为蛋白酶的底物在一定程度上抑制或者减弱了蛋白酶对白血病抑制因子的降解, 从而起到稳定表达产物的作用。表达产生的人白血病抑制因子能有效分泌到胞外, 且表达量较高, 约占培养液上清中总蛋白的 32.8%; 生物活性测定结果表明表达产物对小鼠畸胎瘤细胞 F9 细胞克隆形成有明显的抑制作用。因而, hLIF 基因在毕赤巴斯德酵母中的表达研究具有十分重要的应用价值。

Gearing 等曾将人白血病抑制因子基因在酿酒酵母细胞中表达, 其产物的分子量为 67 ~ 150kD, 有明显的糖基化现象, 且产物的糖基化程度不一^[12]。本实验利用毕赤酵母表达的 hLIF 分子量与天然产物的大小相近, 具有明显的均一性, 并且表达产物的糖基化程度较低, 这都将有利于进一步的临床应用研究。

本实验利用的载体 pPICZaA 其多克隆位点前带有 α -factor 信号肽序列, 该信号肽序列

在分泌过程中可被有效切除,利于表达的重组人白血病抑制因子有效分泌到细胞外;加之 *Pichia pastoris* 仅分泌很低水平的自身蛋白,为下游的分离纯化工作提供了方便^[10]。

参 考 文 献

- [1] Verfaillie C. *Blood*, 1991, **77**(2): 263 ~ 270.
- [2] Mathialagan N, Robeerts R M. *Indian J Physiol Pharmacol*, 1994, **38**(3): 153 ~ 162.
- [3] Evans D B. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **199**(1): 220 ~ 226.
- [4] Heymann D, Godard A, Rahe S, et al. *Cytokine*, 1995, **7**(2): 111 ~ 117.
- [5] Vakakis N, Bower J, Austin L, et al. *Neurochem Int*, 1995, **27**(4 ~ 5): 329 ~ 335.
- [6] Schoser B G. *Neuroreport*, 1998, **9**(12): 2843 ~ 2846.
- [7] Senturk L M, Arici A. *Am J Reprod Immunol*, 1998, **39**(2): 144 ~ 151.
- [8] 杨 林, 王全忠, 吴无畏, 等. 中山大学学报, 1996, **38**: 86 ~ 89.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Manitis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1 ~ 200.
- [10] 刘 斌, 王 为, 薛 辉, 等. 细胞培养中的研究方法. 见: 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养. 第二版. 西安: 世界图书出版社, 1996. 183 ~ 186.
- [11] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 905 ~ 910.
- [12] Gearing D P, Gough N M, Nicholas M, et al. Recombinant method for making leukemia inhibitory factor. United States Patent 5427925. 1995.
- [13] Barr K A, Hopkins S A, Sreekrishna K. *Pharm Eng*, 1992, **12**: 48 ~ 51.

EXPRESSION OF HUMAN LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR GENE IN *PICHIA PASTORIS*

Wang Quanzhong Yang Lin Quyang Jing Long Qingxin Wang Xunzhang

(Biopharmaceutical Center, State Key Laboratory for Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The 575bp artificial synthesized human leukemia inhibitory factor (hLIF) gene was cloned into vector pPICZαA and the constructed expression vector pPICZαA-hLIF was linearized by *Sac*I and transformed into *Pichia pastoris* X-33. After the screening for Mut phenotype and the PCR analysis of the transformants, hLIF gene expressed in *Pichia pastoris*. SDS-PAGE and Western blot analysis of the culture supernatants showed that hLIF gene could express as 58.5kD protein with the desired immunogenicity. Density scanning of the SDS-PAGE gel revealed that the targeted protein accounted for 32.8% of the total protein in the supernatants. The expressed products can inhibit the clone formation of murine's teratoma cells.

Key words: Human leukemia inhibitory factor, *Pichia pastoris*, Gene expression, Bioactivity assay