

汉森酵母表达载体的构建和人血管生成抑制素基因的表达*

许奕阳 张添元 罗进贤**

(中山大学生物化学系 基因工程教育部重点实验室 广州 510275)

摘要 汉森酵母(*H. polymorpha*)是一类能以甲醇为唯一碳源和能源的甲基营养酵母,具有高表达外源基因、易于高密度发酵和工业化的特点。应用 PCR 技术扩增汉森酵母甲醇氧化酶(Methanol oxidase MOX)基因启动子和转录终止序列,并与汉森酵母 *Leu* 基因(*Hpleu2*)和人血管生成抑制素基因一起重组进大肠杆菌质粒 *pSP72* 构建了整合型表达载体 *pSMA17*,采用 *LiAc* 法将 *pSMA17* 转入汉森酵母 *A16(leu)*,筛选出阳性转化子 *H. polymorpha A16(pSMA17)*,转化子在 YPGA 培养基中培养至对数生长期后期,用甲醇进行诱导表达。ELISA 和 SDS-PAGE 分析结果证明人血管生成抑制素已获表达,表达产物分泌至培养基中。Western blot 结果显示重组的人血管生成抑制素能与抗人纤溶酶原抗血清特异结合,具有免疫原性。

关键词 汉森酵母,表达载体,血管生成抑制素,基因表达

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)05-0582-05

以毕节酵母(*Pichia pastoris*)和汉森酵母(*Hansenula polymorpha*)为代表的甲基营养酵母是一类能以甲醇为唯一碳源和能源的酵母,由于其具有高效表达外源蛋白和易于实现高密度发酵和工业化等优点,已发展成为第二代酵母表达系统^[1-2],特别是毕节酵母已作为常规系统得到广泛应用,汉森酵母比毕节酵母有较好的热耐受性(前者 30℃~43℃,后者为 30℃),且不需甲醇诱导就能高效表达外源基因,因而比 *P. pastoris* 拥有更为快速和简便的发酵生产方法^[3],但对其表达系统的研究相对较少。血管生成抑制素(Angiostatin)是近年来发现的血管生成抑制因子,它通过抑制血管内皮细胞的增殖及新生血管的形成从而抑制继发瘤的生长和转移^[4]。最近发现它能抑制小鼠 Lewis 肺癌、纤维肉瘤及人乳腺癌、前列腺癌和结肠癌的生长^[5]。本文报道汉森酵母甲醇氧化酶(MOX)启动子和转录终止序列的克隆、表达载体的构建及人血管生成抑制素基因在汉森酵母中的表达和分泌。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *E. coli* TG1 为本室保存,汉森酵母(*Hansenula polymorpha*) *A16(leu-)*及含有 MOX 基因的噬菌体 λ 47.1 克隆由荷兰 Unilever Research Laboratorium 的 Ledebor 博士惠赠,质粒 *pSP72* 为本室保存,*pUCMA30* 为本室构建,*pAYE722* 由英国 Sheffield 大学 Sudbery 博士惠赠。

* 广州市“225 科技工程”重大项目(1999-Z-004-01)资助 ** 通讯联系人

作者简介 许奕阳(1973-),女,硕士生,现在美国攻读博士学位。

收稿日期 2002-01-21,修回日期 2002-04-28

1.2 主要试剂

限制性内切酶, T4 DNA 连接酶等工具酶购自 GIBCO-BRL 公司, PCR 扩增试剂盒购自 Bohringer Mannheim 公司, DNA 序列分析试剂盒为 Promega 公司的产品, 纤溶酶原抗血清、IPTG、DAB 等为 Sigma 公司的产品, α -³²P-dATP 为北京亚辉生物工程公司生产, 辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌蛋白 A (HRP-Protein A) 为上海生物制品研究所研制, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 培养基

细菌培养用 LB 培养基, 酵母培养和筛选用的 YNB、SC、YPD 及 YPEG 培养基的配方见文献 [6]。

1.4 质粒的提取、酶解、回收、DNA 连接、转化大肠杆菌等基因操作

按文献 [7] 的方法进行。

1.5 PCR 扩增

以 *H. polymorpha* MOX cDNA 为模板, 扩增条件为第一循环变性 94℃ 3min, 退火 55℃ 1min, 延伸 72℃ 1min; 以后每个循环 94℃ 1min, 退火 55℃ 1min, 延伸 72℃ 1min, 共 30 个循环。

1.6 PCR 产物的克隆和序列分析

PCR 产物经纯化和酶切鉴定后, 克隆至质粒 pSP72 进行测序, 方法参照 Promega 公司 Tag Track 测序试剂盒提供的程序进行。

1.7 酵母转化

参照 Bogdanova 的方法^[8]。

1.8 人血管生成抑制素基因在 *H. polymorpha* A16 中的诱导表达

将转化子接种于 YPEG 培养基中, 37℃ 振荡培养至对数生长期, 添加甲醇至终浓度 1% 进行诱导, 以后每隔 24h 添加甲醇一次。

1.9 表达产物的 ELISA 分析

将发酵上清液按 20 μ L/孔的量加于酶标板孔中, 对照孔加等体积的含空载体的培养上清液, 37℃ 放置 2h, 倾去样品, 每孔加 200 μ L 封闭液, 37℃ 放置 2h, 倾去封闭液, 加 100 μ L 1:250 稀释的纤溶酶原抗血清, 37℃ 放置 1h, 用洗涤液洗三次, 每次 5min, 再加 100 μ L 1:50 稀释的二抗-HRP-protein A, 37℃ 放置 1h, 洗三次, 每次 5min, 加酶反应底物 A 和 B 各 50 μ L, 室温避光放置 10min, 加 50 μ L 2mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 观察结果, 黄色为阳性。根据颜色深浅进行定量分析。

1.10 表达产物的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

按 Sambrook 等^[7]的方法, SDS-PAGE 用 5% 的浓缩胶, 10% 的分离胶。免疫印迹分析以羊抗人纤溶酶原抗血清为第一抗体, HRP-Protein A 为第二抗体。

2 结果和讨论

2.1 MOX 基因启动子和终止子序列的克隆和序列分析

根据已发表的 MOX 基因及其 5' 端及 3' 端非编码序列设计引物, 扩增 MOX 基因起始密码前 820bp 的启动子和终止密码后 300bp 的终止子序列, 合成启动子和终止子两对引

物如下：

MOX 启动子引物：

5'端引物 5'-CCAAGCTTA GAA GCT GCC AAC GCT CGG AAC-3'

Hind III

3'端引物 5'-CCCGTCGACTTT GTT TTT GTA CTT TAG ATT GAT G-3'

Sal I

MOX 终止子引物：

5'端引物 5'-CCG GAT CC T AAG GAG ACG TGG AAG GAC ATA CC-3'

Bam HI

3'端引物 5'-CCG AAT TCC TCA ATC TCC GGA ATG GTG ATC-3'

Eco RI

然后以 λ 47.1-MOX 为模板经 PCR 反应分别扩增出两段 DNA 序列, 酶切分析鉴定其长度与预期的启动子和终止子大小一致后, 分别克隆至质粒 pSP72, 进行 DNA 序列测定, 其序列与已发表的 MOX 启动子和终止子序列相同。

最后将这两段序列重组进同一质粒获得含 MOX 启动子和终止子的重组质粒 pSM13 (图省略)。

2.2 含人血管生成抑制素的表达载体 pSMA17 的构建

从质粒 pAYE722 上用 *Eco* RI 和 *Bgl* II 将汉森酵母的 *leu2* 基因切下, 插入 pSM13 的 *Eco* RI, *Bgl* II 位点得到含 *leu2* 基因的质粒 pSML12 (*leu2* 基因是作为筛选的标记, 因为 *H. polymorpha* A16 是 *leu*⁻ 的, 也是整合的同源序列)。然后用 *Sal* I 和 *Bam* HI 从质粒 pUC-MA30 上切下 MF α 因子的信号序列及人血管生成抑制素基因并接到 pSML12 的 *Sal* I 和 *Bam* HI 位点, 即在 MOX 启动子和终止子之间, 获得含人血管生成抑制素的整合型分泌表达载体 pSMA17 (图略)。

2.3 人血管生成抑制素基因在汉森酵母 A16 中的分泌表达

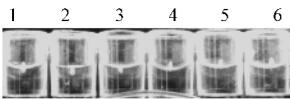


图 1 *H. polymorpha* A16 (pSMA17) 表达产物的 ELISA 分析

Fig.1 ELISA analysis of expression product of *H. polymorpha* (pSMA17)

1 ~ 5 indicate times after induction of 0, 12, 24, 36, 48h, 6 is the control (pSML12) for 36h.

用 LiAc 转化法将整合型表达载体 pSMA17 经 *Sac* I 线性化后半部转入汉森酵母 A16 (*leu*⁻), 在不含亮氨酸的 SC 培养基中, 37°C 200r/min 振荡培养 48h, 获得转化子 *H. polymorpha* A16 (pSMA17), 同时将空载体 pSML12 转化 A16 得到 *H. polymorpha* (pSML12) 作为对照。将重组转化子 *H. polymorpha* (pSMA17) 及不含人血管生成抑制素基因的 A16 (pSML12) 接种于含 100mL YPGE 的 500mL 锥形瓶中, 37°C 250r/min 振荡培养至细胞进入对数生长后期 (约 48h) 加甲醇至终浓度为 1% 进行诱导, 此后每隔 24h 添加甲醇一次, 每 12h 取样一次, 进行 ELISA 分析, 结果如图 1。从图上可见诱导 24h 可检出 hAGN 的分泌表达, 36h 上清液中的 hAGN 含量最高, 48h 后含量开始下降, 而对照菌 HpA16 (pSML12) 在相同条件下诱导 36h 仍呈阴性反应 (无色), 说明 hAGN 已在 HpA16 (pSMA17) 中表达, 表达产物分泌至胞外。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

将诱导表达 36h 的发酵上清液透析后进行 SDS-PAGE 分析,图 2-A 的结果显示 HpA16 (pSMA17) 在分子量约 50kD 处有一条新的蛋白带,而对照菌(pSML12)以及诱导前上清在相应的位置上没出现这条带。根据凝胶光密度积分扫描分析和蛋白含量测定,估算其分泌量约为 50mg/L(摇瓶发酵)。

SDS-PAGE 凝胶转移至 NC 膜后,以人纤溶酶原抗血清为第一抗体进行 Western blot 分析,结果显示经诱导的工程菌 HpA16(pSMA17)蛋白样品能与入纤溶酶原抗血清特异结合。(图 2-B)

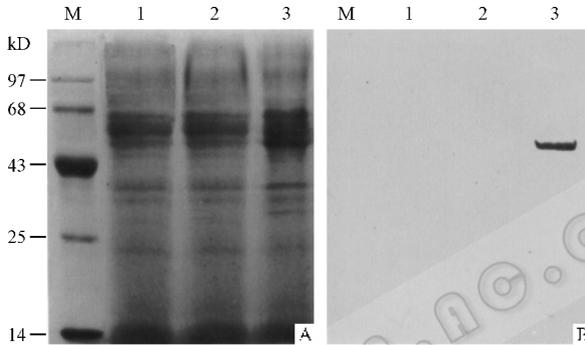


图 2 表达产物的 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析

Fig. 2 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of expression product

M: Protein marker; 1: HpA16 (pSMA17) non-induced; 2: HpA16 (pSML12) induced; 3: HpA16 (pSMA17) induced.

2.5 酵母工程菌的遗传稳定性分析

将 HpA16(pSMA17) 与另一株自主复制型质粒的 HpA16(YRpMA19) 转化株分别接种于 2mL YPD 培养基中,37℃ 振荡培养过夜,再将过夜培养物 40 μ L 接种到新鲜 YPD 中,37℃ 培养过夜,如此连续培养两次,约经历 150 个世代后取样涂平板,分离单菌落,随机挑起单菌落分别点种于亮氨酸缺陷的 SC 选择培养基及 YPD 完全培养基上,37℃ 培养 2d,在 YPD 上生长而在 SC 上不能生长者即为亮氨酸基因丢失的菌落,结果显示整合型质粒整合进宿主基因组后质粒非常稳定,丢失率接近零(0.3%),而自主复制型质粒的丢失率达到 60.4%。

参 考 文 献

- [1] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J, et al. *Yeast*, 1992, **8**: 423 ~ 488.
- [2] Romanos M A. *Curr Opin Biotechnology*, 1995, **6**: 527 ~ 533.
- [3] Gellissou G, Piontek M, Dahlems U, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**: 46 ~ 54.
- [4] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. *Cell*, 1994, **79**: 315 ~ 328.
- [5] O'Reilly M S, Holmgren L, Chen C. *Nature Medicine*, 1996, **2**: 689 ~ 692.
- [6] 罗进贤, 李政海, 李文清. 中国科学(C 辑), 1998, **28**: 50 ~ 55.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [8] Bogdanova A I, Agaphonov M O. *Yeast*, 1995, **11**: 343 ~ 353.

Construction of Integrative Expression Vector and Expression of Human Angiostatin in *Hansenula polymorpha**

Xu Yiyang Zhang Tianyuan Luo Jinxian**

(Department of Biochemistry ,The key laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education ,
Zhongshan University ,Guangzhou 510275 ,China)

Abstract : *Hansenula polymorpha* is a methylotrophic yeast which can grow on methanol as the sole source of carbon and energy and is characterized by its easy manipulation in industry. The construction of an integrative expression vector and the expression of angiostatin in *H. polymorpha* have been described. The methanol oxidase (MOX) gene promoter and terminator of *H. polymorpha* was amplified by PCR and recombined with its leu gene and angiostatin gene on plasmid pSP72 resulting in the integrative vector pSMA17 which was then transformed into *H. polymorpha* A16 (leu-). The positive transformant HpA16 (pSMA17) was screened on SC medium without leucine. HpA16 (pSMA17) was grown on YPGE medium to late log phase and induced with methanol. ELISA and SDS-PAGE results show that angiostatin was expressed and the expressed product secreted into the medium at 50mg/L fermentation broth (in the flasks). Western blot analysis indicates that the recombinant angiostatin specifically reacts with antiserum against human plasminogen.

Key words : *Hansenula polymorpha* , Expression vector , Angiostatin , Gene expression.

* Project supported by " 225 " Science and Technology Program of Guangzhou

** Corresponding author

《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”

近期,中国科学技术部公布了我国期刊进入“中国期刊方阵”的名单。全国共有 716 种期刊进入了“中国期刊方阵”,其中“双高”期刊 40 种;“双奖”期刊 58 种;“双百”期刊 122 种;“双效”期刊 496 种。《微生物学报》入选“双百”期刊方阵。

“中国期刊方阵”的建设是现阶段我国期刊出版事业发展的需要,是推进新世纪我国期刊发展的战略性举措,它将促进我国期刊“精品战略”的实施。

《微生物学报》编委会感谢各级领导的关心,感谢广大作者、读者对本刊办刊工作的大力支持。我们将更好地贯彻国家有关办刊工作的各项政策、法规和法令,进一步提高刊物质量,为我国的经济建设服务,为使期刊尽快走向世界做出积极贡献。