

# 神经营养索-3 基因的人工合成及其在毕赤酵母中的分泌性表达

张朝春 梁伟锋 杨希才\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 根据人神经营养索-3 (Human neurotrohin-3, hNT-3) 的基因序列, 把编码氨基酸的密码子转换成毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 偏爱的形式, 设计了 10 条 36~59nt 的寡聚核苷酸引物, 通过 5 次连续 PCR 反应, 获得了人工合成的 NT-3 cDNA 片段 (简称 NT-3b 基因)。将合成的 NT-3b 基因克隆到 pPIC9K 质粒上, 获得重组表达载体 pPIC9K-NT-3b。将重组表达载体 pPIC9K-NT-3b 和 pPIC9K-hNT-3 分别电击转化宿主毕赤酵母 GS115 菌株, 经筛选得到重组转化子。不同转化子经甲醇诱导, 表达产物进行 SDS-PAGE 检测、Western blot 检测和 ELISA 分析, 结果表明, NT-3b 基因和 hNT-3 基因成功获得分泌性表达, 从整体水平上, 使用偏爱密码子的 NT-3b 基因在毕赤酵母 GS115 菌株中的表达明显优越于 hNT-3 基因 ( $\chi^2 = 4.334$ ,  $P < 0.05$ )。表达量在诱导后 72~96h 最高, 达到 31mg/L 左右。

**关键词** 神经营养索-3, 毕赤酵母, 偏爱密码子, 基因合成, 分泌性表达

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2004)02-0210-05

神经营养索-3 (Neurotrohin-3, NT-3) 是神经营养因子家族的主要成员之一, 它是分子量约为 14kD, 含 3 个二硫键, 等电点大于 9 的碱性蛋白<sup>[1]</sup>。对交感神经元、感觉神经元、大脑皮层的上运动神经元、脊髓前角运动神经元以及大脑基底部的乙酰胆碱能神经元<sup>[2]</sup>等都发挥重要的生物作用。因而 NT-3 可能对神经疾病和神经损伤等具有治疗作用。NT-3 在体内的含量极低, 天然大量提取难度很大, 成本昂贵。因此, 通过基因工程手段大量表达 NT-3 成为 NT-3 基础和功能研究的重要途径之一。

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是近年来迅速发展的一种表达系统, 它具有 AOX1 强启动子, 可利用甲醇进行严格调控表达; 并且其自身分泌的背景蛋白很少, 有利于外源蛋白的纯化。此外, 毕赤酵母对表达的外源蛋白进行加工和修饰, 是一种理想的真核蛋白表达系统<sup>[3,4]</sup>。本研究根据 Jones 等<sup>[5]</sup>报道的 hNT-3 基因序列, 把编码人神经营养索-3 氨基酸的密码子转换成毕赤酵母偏爱的密码子, 人工合成基因, 采用毕赤酵母 GS115 菌株作为表达宿主, 试图提高 NT-3 的表达量。

## 1 材料和方法

### 1.1 酶和化学试剂

DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 高保真 Pfu 酶购自北京天为时代公司;

一抗 Anti-human NT-3 pAb, 酶联二抗 Anti-Chicken IgY HRP 购自 Promaga 公司; 抗生素 G418 购自 Sigma 公司; 其他试剂为国产或进口分析纯。

### 1.2 质粒、菌株和培养基

大肠杆菌 JM109、重组表达载体 pPIC9K-hNT-3 为本实验室保存。酵母表达载体 pPIC9K、受体菌 GS115、培养基 YNB 购自 Invitrogen 公司。培养基 YPD-G418 平板 (每升含 10g 酵母提取物, 20g 蛋白胨, 20g 葡萄糖, 其中含有不同浓度的抗生素 G418); BMGY (每升含 10g 酵母提取物, 20g 蛋白胨, 100mmol/L  $K_3PO_4$ , 13.4g YNB, 0.0004g Biotin, 10mL 甘油); BMMY (用 5mL/L 甲醇取代 BMGY 中 10mL/L 甘油)。

### 1.3 基因合成

**1.3.1 引物设计** 根据 Jones 等<sup>[5]</sup>报道的 hNT-3 基因序列, 按照毕赤酵母偏爱密码子表<sup>[6]</sup>把编码人神经营养索-3 氨基酸的密码子转换成毕赤酵母偏爱的形式。人工合成 10 条寡聚核苷酸引物, 即正链 5 条 F1-F5, 反链 5 条 R1-R5, 长度分别在 36~59nt 之间。引物序列如下:

F1 5'-AAGCAATACTTCTACGAGACTAGATGTAAGGAG  
GCTAGACCACTCAAGAACGGTTGCAG-3';

F2 5'-ACTGTTTTGGCTGAGATCAAGACCGGTAACCTC  
TCCAGTCAAGCAATACTTCTACGA-3';

F3 5'-GACAAGTCTTCTGCTATCGACATTAGAGGTCA

\* 通讯作者。Tel 86-10-62625603; E-mail: yangxc@sun.im.ac.cn

作者简介 张朝春 (1975-) 男, 广东汕头人, 硕士研究生。

收稿日期 2003-06-23, 修回日期 2003-08-26

CCAGGTCAC TGT TTTGGGTGAGA-3' ;  
F4 5'-AGTACTCTGTTTGTGACAGTGA GTC TTTGTGG  
GTTACCGACAAGTCTTCTGCTA-3' ;  
F5 5'-GCTGAGCACAAGTCTCACAGAGGTGAGTACTC  
TGT TTTGTGAC-3' ;  
R1 5'-AAGTCTTGCACTGAGAGTTC CAGTGC TTTGTGCG  
TCAATACCTCTGCAACCGTTCTTGAC-3' ;  
R2 5'-TTATTGTTCTCAGAAGTCAAAGCTCTGACGTA  
GCTTTGGGAAGTCTTGCACTGAGAG-3' ;  
R3 5'-AGGAAGTGTCTGATTCTGATCCATCTCCAACCA

ACCAACTTATTGTTCTCAGAAGT-3' ;  
R4 5'-AGGTTCTACCGATCTTTCTAGACAAAAGCACAG  
ACACAGGAAGTGTCTGATTCT-3' ;  
R5 5'-GGGGCGGCCCGCAATTCTTAGGTTCTACCGAT  
CTTT-3'。

F1 与 F2 ,F2 与 F3 ,F3 与 F4 ,F4 与 F5 ,R1 与 R2 ,  
R2 与 R3 ,R3 与 R4 ,R4 与 R5 之间分别存在长度为  
17 ~ 19nt 的相同序列片段。各引物在基因中的位置  
见图 1。引物由上海申友公司合成。

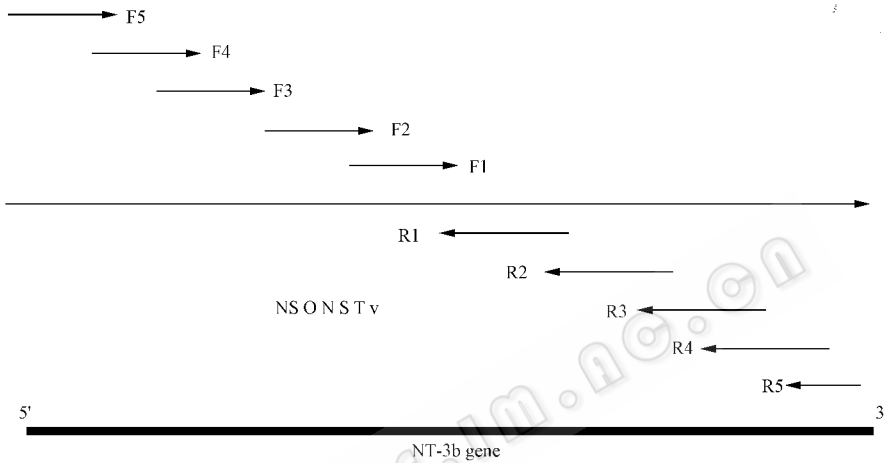


图 1 NT-3b 基因的合成

Fig.1 Diagram of gene synthesis of NT-3b gene

**1.3.2 PCR 扩增合成 NT-3b 基因** :如图 1 所示 ,取  
引物 F1 和 R1 各 25pmol 进行 PCR 反应 ,反应体积  
50μL ,反应条件 :94℃ 4min ;94℃ 1min ,52℃ 30s ,72℃  
30s ,共 25 个循环 ,72℃ 10min。反应后取 0.1μL 反应  
产物做为模板 ,以 F2 和 R2 为引物 ,进行第 2 次 PCR  
反应 ,反应条件 :94℃ 4min ;94℃ 1min ,52℃ 30s ,72℃  
30s ,共 25 个循环 ,72℃ 10min。反应后再取 0.1μL 反  
应产物作为模板 ,以 F3 和 R3 为模板进行第 3 次  
PCR ,反应条件同第 2 次 PCR 反应。依此类推 ,连续  
进行 5 次 PCR 反应。

**1.4 重组表达载体的构建和序列测定**

PCR 产物经回收、纯化 ,用 *EcoR*Ⅰ 酶切后 ,与用  
*EcoR*Ⅰ 和 *SnaB*Ⅰ 双酶切的 pPIC9K 载体连接 ,转化  
大肠杆菌 JM109 ,重组质粒经测序分析正确 ,获得的  
重组表达载体命名为 pPIC9K-NT-3b。重组质粒序列  
由上海申友公司测定。

**1.5 毕赤酵母的电击转化和筛选**

重组表达载体 pPIC9K-NT-3b 与本实验室保存  
的重组表达载体 pPIC9K-NT-3 分别用 *Sal*Ⅰ 酶切线  
性化后 ,电击转化毕赤酵母( *P. pastoris* )GS115 菌

株。毕赤酵母的电击转化和筛选根据 Invitrogen 公  
司的 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 进行。获得的  
转化子在含有不同浓度的抗生素 G418( 1mg/mL ,  
2mg/mL ,3mg/mL )的 YPD 平板上进一步筛选。

**1.6 重组酵母的培养和诱导**

重组酵母转化子于 BMGY 中 ,30℃ 培养 24h ,离  
心收集菌体 ,转移至 BMMY 中 ,30℃ 诱导 5d ,每隔  
24h 添加 0.5% 的甲醇和取样分析。

**1.7 表达产物的 ELISA 分析**

取诱导第 5d 上清液用 CBS 包被 4℃ 过夜 ,以空  
载体上清液作为阴性对照。洗涤后加入一抗 ,37℃  
2h ,TBST 洗涤 3 次 ,加入二抗 ,37℃ 2h。TBST 洗涤 3  
次 ,加入底物 OPD 显色 ,在酶标仪上测定 *OD*<sub>490</sub>。以  
*P/N* ≥ 2.1 为阳性依据。数据比较通过 *x*<sup>2</sup> 检验。

**1.9 表达产物的 SDS-PAGE 分析**

SDS-PAGE 分析按照参考文献 7 操作。

**1.10 表达产物的 Western blot 分析鉴定**

Western blot 按照参考文献 7 操作。一抗 Anti-  
human NT-3 pAb 为 1 : 500 稀释 ,酶联二抗 Anti-  
Chicken IgY HRP 为 1 : 1000 稀释。

## 2 结果

### 2.1 NT-3b 基因的人工合成和克隆

为使表达产物的 N 端不附带多余的氨基酸残基,NT-3b 基因的第一个密码子 TAC 没有被设计合成,而用 pPIC9K 载体经 *Sna*B I 酶切后形成的 TAC 代替。按照图 1 所示,基因从中部开始合成。5 次 PCR 产物的 1.5% Agarose 电泳结果显示(图 2),产物的大小与预期的结果一致。PCR 产物用 *Eco*R I

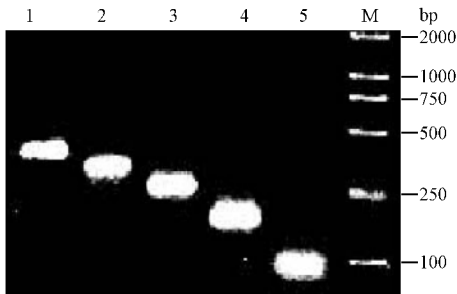


图 2 基因合成中的 PCR 产物

Fig. 2 PCR products of gene synthesis of NT-3b gene  
M. Maker ; 1. Product of the fifth PCR 2. Product of the fourth PCR 3. Product of the third PCR 4. Product of the second PCR ; 5. Product of the first PCR.

酶切后,与用 *Sna*B I 和 *Eco*R I 双酶切的 pPIC9K 载体连接,转化大肠杆菌 JM109 菌株。挑取阳性转化子,提取质粒,用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切,可切出 360bp 左右的片段,表明表达载体的构建是正确的。

合成的 NT-3b 基因,经测定序列,与预期结果完全一致,同 hNT-3 基因比较,357nt 中改变了 65 个碱基,占全序列的 18.2%;119 个氨基酸中有 62 个氨基酸的密码子被替换为适合毕赤酵母高效表达的密码子,占全序列的 52.1%;G + C 由 50.8% 变为 46.4%。

### 2.2 NT-3b 和 hNT-3 在毕赤酵母中的表达及表达产物的 ELISA 和 SDS-PAGE 分析

取两种重组表达载体转化后获得的重组转化子各 18 个(抗 1mg/mL,2mg/mL,3mg/mL G418 的转化子各 6 个)为一组,进行诱导培养。重组酵母 30℃ 诱导培养 5d。取第 5d 表达上清进行 ELISA 分析,阴性对照的  $OD_{490}$  为 0.119,以  $P/N \geq 2.1$  为阳性依据,36 个转化子都呈阳性,说明 NT-3b 基因和 hNT-3 基因在毕赤酵母中获得了分泌性表达。根据  $OD_{490}$  的大小将 36 个转化子分为  $+(0.25 \leq OD_{490} < 0.50)$  和  $++(0.50 \leq OD_{490})$  两个等级(表 1)。

表 1 表达产物的 ELISA 分析

Table 1 ELISA analysis of the expression product

Group	$OD_{490}$		
	+	++	Total
Transformants of pPIC9K-NT-3b	8*(0.330 ± 0.0266)	10(0.965 ± 0.101)	18(0.6943 ± 0.0955)
Transformants of pPIC9K-hNT-3	15(0.373 ± 0.0644)	3(0.632 ± 0.088)	18(0.4086 ± 0.0321)

\* Number of transformants.

两组数据通过  $\chi^2$  检验,结果显示,整体水平上,使用偏爱密码子的 NT-3b 基因在毕赤酵母中的表达明显优越于 hNT-3 基因( $\chi^2 = 4.334, P < 0.05$ )。用 15% SDS-PAGE 分析两组中 3 个表达量最高的转化子的上清液,电泳图谱表明在 14kD 左右处出现外源目的蛋白带(图 3),分子量与理论值一致。用 Bandscan 软件分析电泳图谱,结果表明 NT-3b 基因的表达比 hNT-3 提高了 11 倍左右。

将表达量最高的转化子诱导培养 5d,每隔 24h 取样。上清液用 15% SDS-PAGE 电泳分析。电泳结果用计算机软件 Bandscan 分析,甲醇诱导的分泌型表达产物随时间的变化而递增。第 2d 出现表达产物,第 4d 表达量最高,达到 31mg/L 左右,占总蛋白的 40.6%,第 5d 表达量略有下降,可能是表达产物被蛋白水解酶降解的缘故(图 4)。

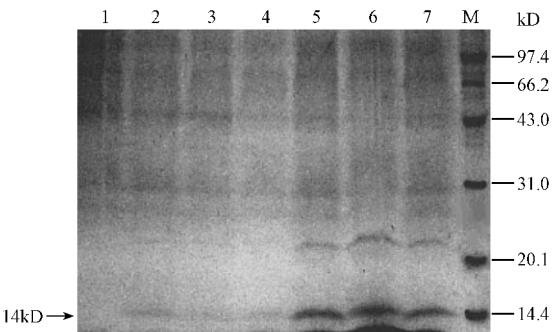


图 3 NT-3b 基因和 hNT-3 基因在毕赤酵母中的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression product of NT-3b gene and hNT-3 gene in *P. pastoris*

M. Marker ; 1. Control ; 2 ~ 4. Different transformants of pPIC9K-hNT-3 ; 5 ~ 7. Different transformants of pPIC9K-NT-3b.

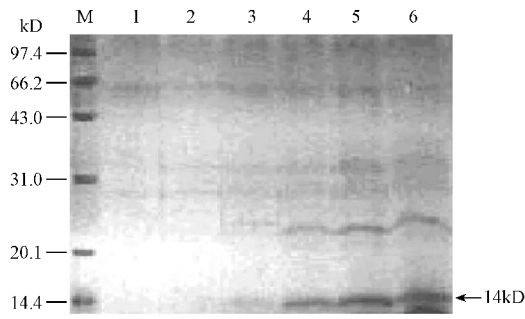


图 4 NT-3b 基因在毕赤酵母中不同时间段的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression product of NT-3b gene indifferent time in *P. pastoris*  
M. Marker ;1. Control 2 ~ 6. The expression product of the transformant in 1 2 3 4 and 5d.

2.3 表达产物的 Western blot 鉴定

分别取诱导第 4d 的相同体积上清液 ,经 15% SDS-PAGE 后 ,Western blot 鉴定。结果显示 ,pPIC9K-NT-3b 转化子和 pPIC9K-hNT-3 转化子的表达上清在 14kD 左右处都出现特异性反应带 ,分子量与理论值一致(图 5)。这说明使用偏爱密码子的 NT-3b 基因和 hNT-3 基因都获得了分泌性表达。

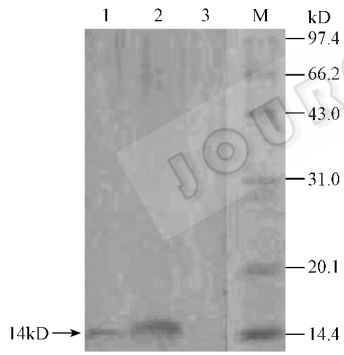


图 5 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of the expression product  
M. Marker ; 1. Expression product of hNT-3 gene ;  
2. Expression product of NT-3b gene 3. Control.

3 讨论

目前 ,毕赤酵母表达系统的应用非常广泛 ,很多蛋白在毕赤酵母中可以高效表达 ,许多难于用其它系统表达的蛋白也在这一系统中得到成功的表达 ,如表皮生长因子( EGF)在酿酒酵母中表达量为 7.4μg/mL ,在毕赤酵母中表达量达到 450μg/mL ,表达量提高约 60 倍<sup>[8]</sup>。虽然运用的都是相同的 AOX1 启动子 ,但是对于不同的外源蛋白 ,表达量是千差万别的。例如 ,同样在毕赤酵母中表达 ,破伤风毒素 C

片段表达量可达到 12g/L<sup>[9]</sup> ,而 β-cryptogein 的表达量仅约为 1 ~ 5mg/mL<sup>[10]</sup>。影响毕赤酵母外源表达的因素主要有两方面 :一方面 ,表达条件对表达量高低的影响很重要 ;另一方面 ,外源基因序列本身的内在特性也起着重要的作用 ,主要包括 mRNA 5'端非翻译区的序列和长度、A + T 组成以及密码子的使用频率。在用毕赤酵母表达植物酶时 ,将在酵母中使用频率为零的精氨酸密码子突变为使用频率较高的密码子 ,表达量提高了 37 倍<sup>[11]</sup>。

国外有在大肠杆菌和昆虫细胞<sup>[12]</sup>等表达系统表达 NT-3 的报道 ,但是其表达量很低。国内有学者用酿酒酵母和昆虫杆状病毒<sup>[13]</sup>等表达系统来表达 NT-3 ,表达量仍然不够理想。迄今国内外尚未有用毕赤酵母表达 hNT-3 的报道。毕赤酵母表达系统对外源基因的表达在密码子使用上有偏爱性 ,赵翔等<sup>[6]</sup>分析了在毕赤酵母中表达的 28 个蛋白编码基因(来自 GenBank)的同义密码子使用情况 ,推断出毕赤酵母含有 19 个高效表达密码子。这些密码子的使用对从翻译水平上分析外源基因的表达有重要的作用。本研究把编码 hNT-3 氨基酸的密码子转换成毕赤酵母(*P. pastoris*)偏爱的形式 ,人工合成 NT-3b 基因。在相同的培养条件下 ,整体水平上 ,使用偏爱密码子的 NT-3b 基因与 hNT-3 基因在毕赤酵母中的表达差异极显著 ,大约提高了 11 倍左右 ,表明外源基因密码子的选用对其表达量高低有相当重要的影响。本研究为人工合成基因、优化基因密码子提高表达量提供有益的思路 ,同时为开展 NT-3 的基础研究和临床应用打下了基础。

参 考 文 献

[ 1 ] Levi-Montalcini R. The NGF thirty-five years later. *Science* ,1987 , 237 :1154 - 1162.  
[ 2 ] Koliatsos V E , Price D L , Gouras G K , et al . Highly selective effects of nerve growth factor , brain-derived neurotrophic , and neurotrophin-3 on intact and injured basal forebrain magonocellular neurons. *J Comp Neurol* ,1994 , 343 ( 2 ) 247 - 254.  
[ 3 ] Cregg J M , Vedick T S , Raschke W C . Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* . *Biotechnology* , 1993 , 11 905 - 910.  
[ 4 ] 李 艳 ,王正祥 ,诸葛健 . 酵母作为外源基因表达系统的研究进展 . *生物工程进展* ,2001 , 21 ( 2 ) :10 - 14.  
[ 5 ] Jones K R , Reichardt L F . Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1990 , 87 ( 20 ) :8060 - 8064.  
[ 6 ] 赵 翔 ,霍克克 ,李育阳 . 毕赤酵母的密码子用法分析 . *生物工程学报* ,2000 , 16 ( 3 ) :308 - 311  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

[ 7 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. 金冬雁等 ,译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京 科学出版社 ,1992.

[ 8 ] Clare J J , Romanos M A , Rayment F B , et al. Production of EGF in yeast : high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* , 1991 , **105** 205 – 212.

[ 9 ] Clare J J , Rayment F B , Romanos M A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* ,1991 **9** 455 – 450.

[ 10 ] Michael J , Donohue O. Overexpression in *Pichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus. *Protein Expr Purif* , 1996 **8** 254 – 261.

[ 11 ] 姚 斌 张春义 范云六 ,等. 高效表达具有生物学活性的植酸酶的毕赤酵母. 中国科学( C 辑 ) ,1998 **28**( 3 ) 237 – 243.

[ 12 ] Negro A , Avella A , Grand C ,et al. Production and characterization of recombinant rat BDNF and NT-3 from insect cell. *J Neurochem* , 1994 **62**( 2 ) 471 – 477.

[ 13 ] 穆 越 刘 红 张 杰 ,等. 人神经营养-3 在昆虫杆状病毒表达系统中的表达. 科学通报 ,1998 **43**( 15 ) :1631 – 1634.

Synthesis of Human Neurotrohin-3 Gene and Its Expression in *Pichia pastoris*

ZHANG Chao-Chun LIANG Wei-Feng YANG Xi-Cai\*  
( Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract** : A 357bp DNA fragment encoding Human neurotrohin-3 ( hNT-3 ) was generated by five rounds of PCR from a total of ten 36 ~ 59nt oligoes after modification of the original sequence to the optional codon usage of *Pichia pastoris*. The gene( called *NT-3b* gene )was cloned into pPIC9K to construct a recombinant vector pPIC9K-NT-3b. This recombinant vector and another recombinant vector pPIC9K-NT-3 containing the *hNT-3* gene were transformed into *P. pastoris* strain GS115 respectively by electroporation. The transformants were induced by methanol and the expression product were analyzed by SDS-PAGE , Western blot and ELISA. The results showed that soluble NT-3 were secreted into culturesupernatant .The *NT-3b* gene is better than the *hNT-3* gene for expression in the GS115 yeast strain(  $\chi^2 = 4.334$  ,  $P < 0.05$  ) and the expression level was higher between 72 ~ 96h after induction , reaching about 31mg/L.

**Key words** :Neurotrohin-3 , *Pichia pastoris* , Optimal codons , Synthesis of gene , Secretary expression

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62625603 ; E-mail :yangxc@sun.im.ac.cn  
Received date 06-23-2003

《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编	李季伦	院 士	中国农业大学生物学院				
副主编	谭华荣	研究员	中国科学院微生物研究所				
	陆德如	研究员	第二军医大学遗传研究所				
	王敖全	研究员	中国科学院微生物研究所				
	曲音波	教 授	山东大学生命科学学院				
	徐建国	研究员	中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所				
编 委	( 按姓名拼音排序 , * 2003 年 7 月新增补 )						
	蔡永峰	陈永青	程 池	东秀珠	范云六	郭 俊	胡福泉
	胡远扬	黄 力	陆承平	闵 航	钱世钧	邵一鸣	盛 军
	唐 宏	田 波	王 平	* 王华明( USA )	谢 红	杨苏声	翟中和
	* 张耀平( USA )	郑天凌	朱宝泉	诸葛健			
编 辑	王晋芳	王 敏					