

转甲状腺素蛋白基因在酵母中的表达

程 颖^{2* * *} 高卜渝¹ 宋大新² 袁汉英¹ 陈永青² 李育阳^{1* *}

(1. 复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 2. 复旦大学微生物系 上海 200433)

柳 湘 田培坤 顾健人

(上海市肿瘤研究所 上海 200031)

摘 要 用限制酶 *Bam*HI 将含人 TTR 基因的 DNA 片段(约 493bp)从质粒 pSK-TTR 上切下后并插入到分泌型载体 pHIL-SI 的 *Bam*HI 位点上,经酶切鉴定重组质粒 pHIL-SI-TTR 上的 TTR 基因插入方向正确。将 pHIL-SI-TTR DNA 用 *Bgl*II 酶切后,转入真核表达系统——毕赤氏酵母。得到的转化子经摇瓶发酵,上清液用 15% SDS-PAGE 检测,有 TTRF 的表达。经 DEAE-Sephrose F. F 离子交换柱和 SephacrylS-200 分子筛层析,得到纯化的 TTRF。体外实验表明 TTRF 对肝癌细胞有抑制作用。

关键词 转甲状腺素蛋白,分泌型载体,毕赤氏酵母,肝癌细胞

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0428-33

转甲状腺素蛋白(TTR, transthyretin)又被称为前白蛋白(PA, prealbumin),是一种由肝脏、脉络丛和眼产生的蛋白,它与转运甲状腺素和维生素 A 代谢有关。其分子量约为 54kD,由四个相同的亚单位组成耐热耐酸的四聚体^[1,2]。每个亚基为一个 127 个 aa 组成的多肽。在一种家族性的遗传病——淀粉样病变中,生殖细胞的 TTR 基因的突变可导致中枢神经和心血管系统产生大范围的淀粉样物质^[3,4]。TTR 主要由肝细胞合成,在肝脏受到损伤的病人的血清中 TTR 的含量明显降低^[5,6]。上海肿瘤研究所首次报道肝癌中 TTR 基因转录受阻,并在基因结构上存在缺陷。而且体外实验表明 TTR 对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用,因此 TTR 基因可能是与人肝癌相关的抑癌基因的候选者^[7]。由于血浆中提取 TTR 产量低、步骤繁琐,所以我们考虑用基因工程的手段大量生产 TTR。为摸索条件,我们首先在酵母中进行较为简单的转甲状腺素融合蛋白(TTRF)的表达,为今后非融合蛋白的表达打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种质粒和细胞株

携带人 TTR 基因的质粒 pSK 由上海肿瘤研究所保存;分泌型载体 pHIL-SI、大肠杆菌:INVaF':endA1 recA1 hsdR17(r⁻ m⁺)supE44λ⁻ thi-1 gyrA relA1 φ80lacZαΔm15Δ(lacZYA-argF)deoR⁺ F'和毕赤氏酵母 *Pichia pastoris* 为复旦大学保存;7721 人肝癌细胞

* 联系作者。

* * 系复旦大学微生物系九六级硕士研究生。

由上海市肿瘤研究所提供。

1.2 酶与试剂

限制酶及 T4DNA 连接酶均购自 Boehringer 公司。琼脂糖为华美公司产品。YNB 为 Difco 公司产品。所有氨基酸、生物素、甘油、甲醇、山梨醇均为华美生物公司产品。标准低分子量蛋白为丽珠公司产品。

1.3 培养基

1.3.1 大肠杆菌培养基: LB 培养基 :1% 蛋白胨 ,1% 氯化钠 ,0.5% 酵母提取粉 ;LBA 培养基 :LB 加 100 μ g/mL 氨苄青霉素。

1.3.2 酵母培养基: YEPD 培养基 :1% 酵母提取粉 ,1% 蛋白胨 ,2% 葡萄糖 ;选择培养基 :1.34% YNB(Yeast Nitrogen Base) 2% 葡萄糖 ,每升培养基中加谷氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸各 50mg ,生物素 0.4mg。BMGY 培养基 :1% 酵母提取粉 ,2% 蛋白胨、1.34% YNB ,每升培养基中含 0.4mg 生物素 ,10mL 甘油及 100mL 1mol/L 磷酸盐缓冲液。BMMY 培养基 :1% 酵母提取粉 ,2% 蛋白胨、1.34% YNB ,每升培养基中含 0.4mg 生物素 ,5mL 甲醇及 100mL 1mol/L 磷酸盐缓冲液。

1.3.3 细胞培养基: DMEM 培养基 :含三抗(100u/mL 青霉素、100mg/mL 链霉素、3 μ g/mL 两性霉素)及 10% 小牛血清。

1.4 方法

1.4.1 有关质粒 DNA 抽提、酶切、回收、连接和转化等均按参考文献 [8] 操作。

1.4.2 大肠杆菌重组质粒 pHIL-SI-TTR DNA 的酶切鉴定及其对毕赤氏酵母的转化: 大肠杆菌的重组质粒 pHIL-SI-TTR DNA 用 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切鉴定 ,然后经 *Bgl*II 酶切 ,分离纯化后用电转化法对毕赤氏酵母进行转化。

1.4.3 菌体的诱导表达: 将筛选得到的毕赤氏酵母转化子分别接种于 50mL BMGY 生长培养基中 30 $^{\circ}$ C、振荡过夜至 OD_{600} 为 2~6。菌液 5000r/min ,离心 5min ,去上清用 15mL BMMY 酵母培养基悬浮细胞 ,30 $^{\circ}$ C 振荡培养 ,持续 5d ,每天在剩余的培养基中加入甲醇至终浓度为 0.5% ,最后样品 5000r/min 离心 ,取上清 , -20° C 保存。

1.4.4 SDS-PAGE 检测 TTRF 的表达量: 15% 的分离胶 ,电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色 ,胶用电泳成像系统扫描、分析。预计 TTRF 的分子量约为 18kD。

1.4.5 产物的分离提纯: 样品用蒸馏水稀释后 ,上样于用 20mmol/L PBS 缓冲液预平衡的 DEAE-Sepharose F. F. 离子交换柱 ,用含 50mmol/L 氯化钠的 PBS 缓冲液洗脱 ,收集 TTR 融合蛋白峰。把收集的样品再过短的 DEAE-Sepharose F. F. 柱达到浓缩的目的 ,含蛋白的浓缩液最后过 Sephacryl S-200 分子筛 ,达到与色素分离的目的。

1.4.6 蛋白浓度的测定: 用福林-酚法测定蛋白浓度 ,具体操作见参考文献 [9] ,测得浓度为 480 μ g/mL。

1.4.7 抑制肿瘤活性的测定: 将 10^3 个 7721 肝癌细胞分别接种在含 0.1 μ mol/L RA(维甲酸) 1μ g TTRF、 1μ g TTRF + 0.1 μ mol/L RA、5 μ g TTRF、5 μ g TTRF + 0.1 μ mol/L RA 以及 10% 的小牛血清的 DMEM 培养基中。于 5% 二氧化碳 ,37 $^{\circ}$ C 培养 ,分别于 48、72、96、120、144h 消化细胞 ,用台盼蓝染色后计数活细胞 ,每样本作 3 个孔重复 ,每孔计数 2 次 ,取其平均值作生长曲线。

2 结果与讨论

2.1 TTR 表达载体的构建

用限制酶 *Bam*HI 将含人 TTR 基因的 DNA 片段从质粒 pSK 上切下并回收,将该片段克隆到表达载体 pHIL-SI 上,然后转化大肠杆菌。由于 DNA 片段插入 pHIL-SI 载体存在正向反向插入两种可能性,而反向插入不能正确表达,故须对转化子的重组质粒 DNA 作酶切鉴定。经 *Eco*RI 和 *Sal*I 等一系列的酶切鉴定得到一个 TTR 单拷贝的正向插入的转化子。重组质粒 pHIL-SI-TTR 的构建如图 1。来自 pSK 的含 TTR 的 DNA 片段再插入 pHIL-SI 的 *Bam*HI 位点后具有正确的阅读框架,最终表达并分泌到酵母胞外的是比天然 TTR 多 35 个氨基酸的融

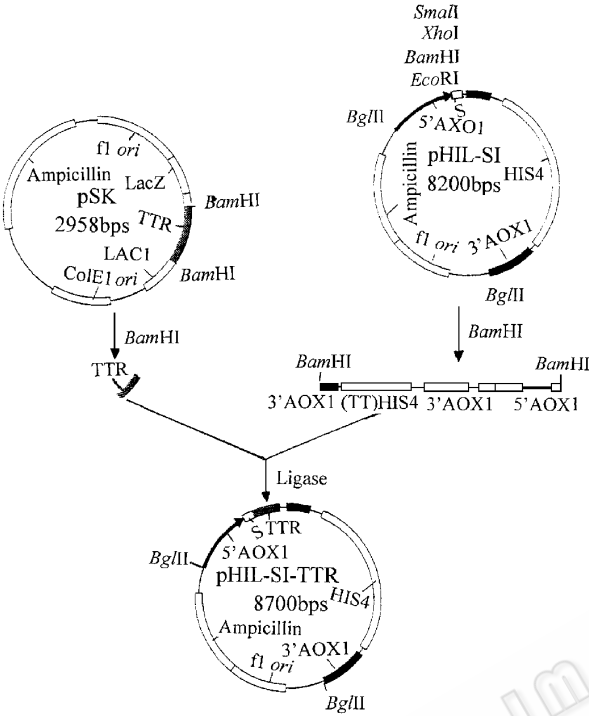


图 1 TTR 表达载体的构建

Fig.1 Construction of the TTR expression vector

合 TTR(TTRF)。TTR 基因融合部分的核苷酸序列总计 105bp 编码 35 个氨基酸,详解见图 2。

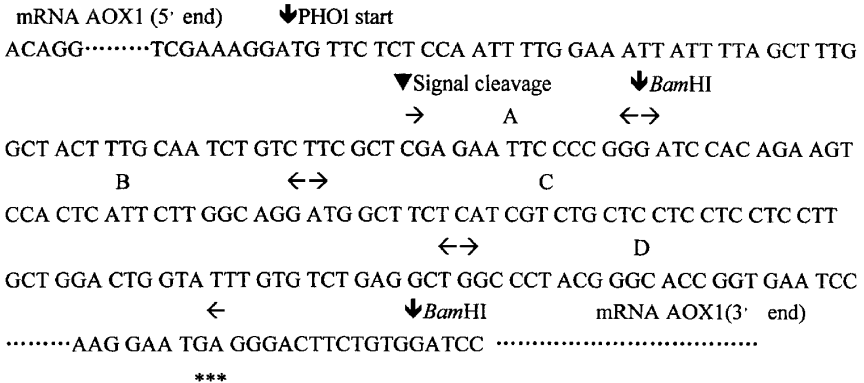


图 2 重组质粒 pHIL-SI-TTR 中 TTR 基因融合部分示意图

Fig.2 Fusion portion of TTR gene in recombinant plasmid pHIL-SI-TTR

- A. Nucleotide sequence of PHO1 signal peptide from pHIL-SI(14bp);
- B. Nucleotide sequence from pSK(31bp);
- C. Nucleotide sequence of TTR signal peptide(60bp);
- D. Nucleotide sequence of mature TTR

2.2 TTR 的高效表达

提取上述转化子的重组质粒 pHIL-SI-TTR DNA, 经 *Bgl*II 酶切, 回收带有 TTR 基因的大片段, 电转化毕赤氏酵母。在含甲醇选择培养基上挑出生长缓慢的若干转化子, 分别进行发酵培养和诱导, 离心、收集上清。进行 SDS-PAGE 检测, 以诱导前的培养液上清为对照, 并和低分子量 marker 相比较, 结果如图 3。图中毕赤氏酵母转化子样品在 20kD 和 14.4kD 之间有一条明显的蛋白条带, 经扫描成像系统分析该条带分子量为约 18kD 的蛋白, 而对照在该位置并无条带, 因此初步确定这是 TTR 融合蛋白条带。由于融合部分共计 35 个氨基酸(见图 2), 故分子量比天然的 TTR(14kD)大 4kD 左右, 理论上约为 18kD。所以该条带的分子量与理论上计算得到的分子量也相符。此外我们还进行发酵条件的摸索。在得到优化表达条件后, 进行扩大培养, 发现扩大培养比小规模的培养表达量更高, 最高可达总分泌蛋白的 22.9%。这可能与通气条件较好有关, 另外菌体的绝对数也增多了。这为进一步的分离纯化奠定了基础。

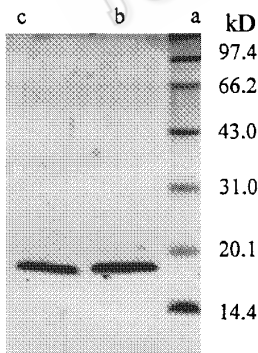


图 4 TTR 融合蛋白分离纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified TTRF

- a. Protein molecular weight markers
b c. Purified fusion TTRF by sephacryl S-200

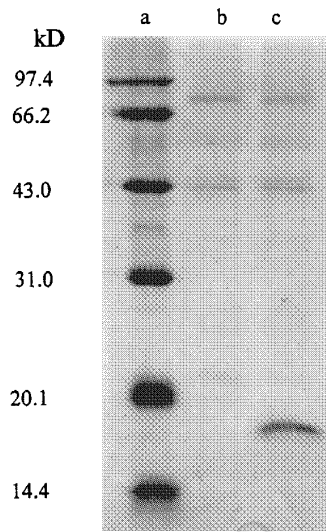


图 3 毕赤氏酵母转化子表达产物的 SDS-PAGE 分析图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of products of yeast *Pichia pastoris* transformants

- a. Sample from yeast *Pichia pastoris* transformants ;
b. Protein molecular weight marker ;
c. Sample from host cells

2.3 TTR 融合蛋白的分离纯化

由于发酵液上清中含蛋白较少, 故不用硫酸铵沉淀, 直接过 DEAE-Sepharose F. F. 离子交换柱, 用 PBS 缓冲液预平衡柱, 并用含 0.05mol/L 氯化钠的相同缓冲液洗脱, 融合的 TTR 蛋白和色素被同时洗脱下来。走 SDS-PAGE 电泳后观察, 发现蛋白含量较低, 收集的样品体积偏大, 故进行了进一步的浓缩以便通过分子筛得到很好的分离。浓缩后的样品过分子筛后能很好地与色素分离。纯化产物的凝胶电泳见图 4。

2.4 蛋白活性的测定

将 10^3 的 7721 肝癌细胞接种在含 $0.1\mu\text{mol/L}$ RA、 $1\mu\text{gTTRF}$ 、 $1\mu\text{gTTRF} + 0.1\mu\text{mol/L}$ RA、 $5\mu\text{gTTRF}$ 、 $5\mu\text{gTTRF} + 0.1\mu\text{mol/L}$ RA 以及 10% 的小牛血清的 DMEM 培养基中, 于 2 3 4 5 6 天计数, 结果如表 1 所示。由统计结果分析可知, 从第 3 天起各剂量组与对照组之间就有明显的差别, 即第 3 天开始, TTRF 对肝癌

表 1 TTR 融合蛋白对肿瘤细胞的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of TTRF on the growth rate of hepatoma cells

Dosage	Cell counts at different time intervals($\times 10^3$)				
	48h	72h	96h	120h	144h
Control	5.2 \pm 0.85	8.7 \pm 2.11	10.9 \pm 1.68	15.9 \pm 0.75	22.8 \pm 3.23
RA(0.1 μ mol/L)	3.2 \pm 1.25	4.5 \pm 1.25	4.5 \pm 1.24	2.4 \pm 0.63	4.0 \pm 0.81
TTRF(1 μ g)	4.0 \pm 2.04	6.7 \pm 1.24	8.0 \pm 1.12	6.1 \pm 0.82	12.2 \pm 0.85
TTRF(1 μ g)+RA(0.1 μ mol/L)	3.0 \pm 0.56	4.7 \pm 0.75	4.2 \pm 1.35	2.5 \pm 1.12	3.5 \pm 0.58
TTRF(5 μ g)	5.2 \pm 2.09	7.0 \pm 1.16	8.3 \pm 0.45	9.3 \pm 4.43	9.4 \pm 2.15
TTRF(5 μ g)+RA(0.1 μ mol/L)	3.2 \pm 0.25	4.2 \pm 1.03	3.5 \pm 1.47	2.2 \pm 0.75	3.2 \pm 0.48

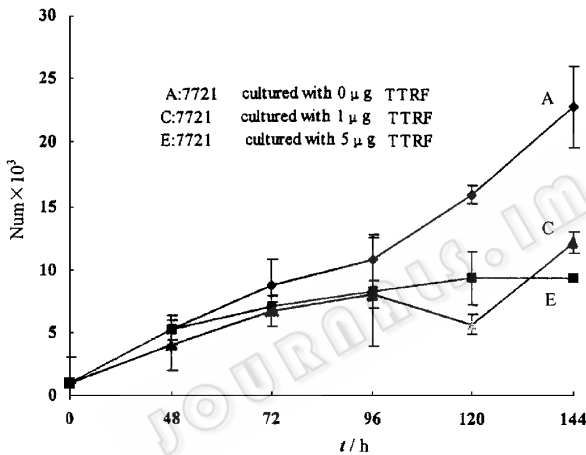


图 5 肿瘤细胞的生长曲线

Fig. 5 Growth rate of 7721 cells treated with TTRF

细胞就有明显的抑制作用。在只含 TTRF 的两个剂量组均有明显的抑制作用,但抑制效果差别不大,这两组的生长曲线如图 5 所示。说明低剂量的 TTRF 就对肿瘤细胞有抑制作用。在含 RA 的三个剂量组中对肿瘤的抑制效果均很明显,但没能反映出 RA 和 TTRF 的协同作用,可能是 RA 的剂量过高导致的结果,实验设计有待进一步改进。通过本实验可初步证明在酵母中表达的 TTR 融合蛋白是有生物活性的,这为下一步非融合的 TTR 基因工程的生产摸索了条件并提供了依据。

参 考 文 献

- [1] S. Tawara, M. Nakazato, K. Kangawa *et al.* *Biochem. Biophys Res Commun*, 1983, **116**: 880~888.
- [2] 顾健人等. *中国科学(B辑)*, 1991(4): 403~407
- [3] P. P. Costa, A. S. Figueira, F. R. Braw. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**: 4499~4503.
- [4] M. Pras, F. Prelli, E. C. Franklin *et al.* *Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 539~542.
- [5] 陈人骏. *中华医学检验杂志*, 1985, **83**: 151~153.
- [6] 孟宪镛等. *中华消化杂志*, 1984, **4**(2): 101~102.
- [7] Chao Tin Liu, Yao Jin, Daizong Li *et al.* *Cell Research*, 1994, **4**: 89~96.
- [8] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [9] 北京大学生物系生物化学教研室. *生物化学实验指导*. 北京: 人民教育出版社, 1979, pp. 73/74.

Expression of Transthyretin Gene in Yeast *Pichia pastoris*

Cheng Ying² Gao Buyu¹ Song Daxin² Yuan Hanying¹ Chen Yongqin² Li Yuyang^{1*}

¹(Institute of Genetics Fudan University ,Shanghai 200433)

²(Department of Microbiology ,Fudan University ,Shanghai 200433)

Liu Xiang Tian Peikun Gu Jianren

(Shanghai Cancer Institute , Shanghai 200032)

Abstract Plasmid pSK-TTR was digested by *Bam*HI and the DNA fragment containing TTR gene (Transthyretin) was cloned into the *Bam*HI site of secretion vector pHIL-SI-TTR. In right orientation and frame. After the recombinant plasmid pHIL-SI-TTR was digested by *Bgl*II ,the larger fragment of it was transformed into yeast *Pichia pastoris*. The SDS-PAGE analysis showed that the yeast transformants could express and secret TTRF. The pure TTRF could be obtained by DEAE-Sepherose F. F. chromatography and SephacrylS-200 chromatography. The *vitro* test showed inhibition of the growth of hepatoma cells by TTRF obtained from our experiments.

Key words Transthyretin, secretion vector, *Pichia pastoris*, hepatoma cell