

人 p53 蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达

邱荣德 朱建蓓 王 垒 吉鑫松 陆长德 袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 将人 p53 基因装入 *Pichia* 分泌型质粒 pHIL-S1 中,酶切线性化后电穿孔导入酵母细胞进行整合,经筛选得到一高表达 p53 蛋白的克隆。SDS-PAGE 显示表达量约占分泌总量的 30%。ELISA 验证重组人 p53 存在免疫学活性。在诱导时就降低 *Pichia* 酵母系统水解酶活力等方面进行优化,经 FPLC 分离纯化得到约 200mg/L 表达量。

关键词 p53, *Pichia pastoris*, 基因表达

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0477-81

p53 是一种抑癌基因蛋白,由 3 个区段组成,N 端是激活转录区,中间区段可与 SV40 的 T 抗原结合,C 端有 DNA 结合功能。现普遍认为它是肿瘤抑制和细胞调控中的重要因子。p53 在癌症诊断中具有重要意义,其调控机制的阐明必将有助于肿瘤疾病的治疗,因此研究 p53 功能的论文很多。p53 活性功能的研究常常需要有足量的各种 p53 突变形式,常用的体外转译和大肠杆菌重组表达方法产量少,大肠杆菌胞内表达还存在蛋白质不能正确折叠和进行翻译后加工等问题,尝试一种简单可行的真核表达系统具有其实际意义。

毕赤酵母系统是近年来发展很快的又一个真核表达系统,它比 *Saccharomyces cerevisiae* 更适于真核蛋白表达,许多有活性的蛋白质已经在 *Pichia pastoris* 中大量表达,且有效地分泌到胞外^[1]。宿主菌 *Pichia pastoris* 为甲醇利用型酵母。它能以甲醇作为唯一碳源和能源生长。甲醇利用途径的第一个酶是醇氧化酶。生长在限量甲醇中的细胞被诱导出大量醇氧化酶,其量可占细胞总蛋白的 35% 以上。而以甘油、葡萄糖或乙醇为碳源培养的细胞,则不能检测到醇氧化酶的存在。因此根据其高效诱导和严密调控的特点,利用醇氧化酶基因(AOX1)启动子来构建表达载体,可以在宿主细胞中高效表达异源蛋白。pHIL-S1 含 AOX1 启动子和 PHO1 信号肽编码序列,我们将 p53 基因插入 AOX1 启动子和 PHO1 信号肽后的多克隆位点上,通过同源重组将组装的 DNA 片段整合到酵母染色体 DNA 上,达到 p53 蛋白的分泌表达。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 菌株和主要试剂: 酵母宿主菌 GS115(*his4Mut*⁺)、酵母表达质粒 pHIL-S1 均为 Invitrogen 公司产品。*E. coli* TG1 和克隆质粒 pTS2 为本室保存。所有使用酶均为 GIB-

COBRL 公司产品。质粒抽提和 DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司。p53 单克隆抗体为 DAKO 产品 (Clone DO-7), 羊抗鼠 IgG-HRP 购自华美生物工程公司, 低分子量标准蛋白为上海东风厂产品, 其它所有化学试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.2 主要培养基成分: MM(13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 5mL/L 甲醇, 15g/L 琼脂糖), MD(13.4g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 10g/L 葡萄糖, 15g/L 琼脂糖), YPD (10g/L 酵母膏, 20g/L 蛋白胨, 20g/L 葡萄糖), BMGY(10g/L 酵母膏, 20g/L 蛋白胨, 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0, 13.4g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 10g/L 甘油), BMMY(将 BMGY 中 10g/L 甘油代替为 5mL/L 甲醇)。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆: 常规基因操作按《分子克隆实验指南》(第二版)方法进行, 电穿孔法转化酵母细胞按文献[1]进行。

1.2.2 重组克隆的筛选: *Bgl*II 线性化 DNA 电穿孔法转化 GS115 后, 经 MD 平板筛选得到 his⁺ 重组克隆, 将每个克隆同时点种于 MD、MM 平板, 30℃ 培养 2~3d, 筛选出 MM 平板上生长较慢的 Mut^s 表型, 接种 2mL YPD 试管, 30℃ 培养过夜后制作甘油菌 -20℃ 保存。

1.2.3 重组克隆的表达: 将筛选出的 his⁺ Mut^sp53 克隆接种 2mL YPD 试管, 30℃ 300 r/min 培养过夜, 以 1% 接种入含 50mL BMGY 的 250mL 三角瓶。30℃ 300 r/min 培养至 OD₆₀₀3~6。常温 5000r/min 离心 4min。收集的菌体用 10mL BMMY 悬浮后 25℃ 300 r/min 开始诱导。每 24h 补加甲醇到 0.5%。诱导 2d 后 4℃ 15000 r/min 离心 10min, 上清液立即加入 PMSF (苯甲基磺酰氟) 至 1mmol/L, -20℃ 冻存。上清液取 10μL 进行 10% SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 p53 蛋白的 ELISA 检测: 酶标板孔中加入 p53 诱导上清液 200μL, 另以生理盐水作对照, 4℃ 放置过夜; 第二天用 PBST (0.02mol/L pH7.2 磷酸缓冲液, 含 0.5mL/L Tween 20) 缓缓冲洗孔穴 3 次, 每次 5min; 每孔加入封闭液 (0.2g/L 牛血清白蛋白, 0.02mol/L pH7.2 磷酸缓冲液) 200μL, 37℃ 保温 1h; 同上用 PBST 洗 3 次; 每孔加入 200μL P53 单克隆抗体 (1:1000), 37℃ 保温 1h; 同上用 PBST 洗 3 次; 每孔加入羊抗鼠 IgG-HRP 200μL, 37℃ 保温 1h; 同上用 PBST 洗 3 次; 每孔加入显色底物 (H₂O₂ 和邻苯二胺) 200μL, 室温放置 30min 后, 加入 50μL 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。测定各孔的 A₄₉₂。

2 实验结果

2.1 p53 表达载体的构建

本室保存的克隆质粒 pTS2 含部分 pHIL-S1 序列, 其中包括氨苄抗性基因、5' AOX1 启动子、PHO1 信号肽和 3' AOX1 转录终止序列, PHO1 后的多克隆酶切位点中包含有 *Nco*I 和 *Bam*HI。用 *Nco*I 和 *Bam*HI 双酶切 pTS2 质粒 DNA, 回收线性 DNA 大片段, 与末端匹配的 p53 基因连接并转化 *E. coli* TG1 感受态细胞。*Nco*I 和 *Bam*HI 酶切初步筛选重组克隆。经 DNA 序列分析验证重组克隆中 p53 基因两端序列, 得到一完全正确的克隆 pTS2-p53。将序列正确的 pTS2-p53 用 *Sca*I 和 *Bam*HI 切下并回收含 p53 片段, 与相应酶切后的 pHIL-S1 大片段连接, 转化 *E. coli* TG1 感受态细胞, 经 *Nco*I 和 *Bam*HI 酶

切验证得到重组克隆 pHIL-S2-p53(图 1)。

2.2 外源基因整合酵母细胞

表达载体内 5' AOX1、3' AOX1 在 *Pichia pastoris* 中存在同源序列。用 *Bgl* II 线性化 pHIL-S2-p53, 以期含 AOX1-p53 和 HIS4 序列的片段通过同源重组替代酵母基因组中的醇氧化酶(AOX1)基因。将约 10 μ g 线性化 DNA 按照文献[1]方法电穿孔转化组氨酸合成缺陷型酵母 GS115(*his4* Mut⁺), 通过组氨酸缺乏的 MD 平板筛选得到大量 *his*⁺ 重组克隆。所得 *his*⁺ 克隆点种 MM 平板以检验天然 AOX1 基因是否存在, 通过 MM 平板上甲醇缓慢利用表型筛选得到 *his*⁺ Mut^sp53 重组克隆。

2.3 重组 p53 蛋白的表达

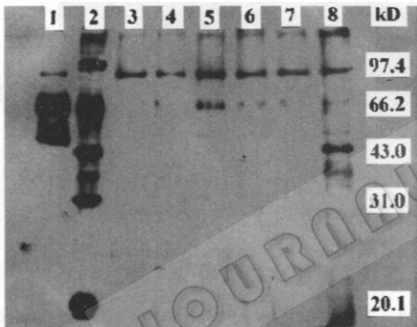


图 2 p53 重组克隆的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.2 Analysing the expression of p53 recombinants by SDS-PAGE

1. GS115(HSA, Mut⁺) control
2. LMW Markers;
3. Supernatant of non-induced p53 recombinant
- 4~8. Different p53 recombinants

上清液, 结果表明, 起始 pH 值为 3.0, SDS-PAGE 图谱显示 80kD 以下几乎未见任何蛋白条带, 而起始 pH8.0 时 p53 表达量则明显高于 pH6.0(图 3A)。说明起始 pH 对重组 p53 蛋白的表达有非常重要的影响。ELISA 分析表明, pH 值为 8.0, p53 蛋白的表达量比 pH6.0 时提高了 50% 以上(图 3B)。

pH8.0 条件下蛋白的条带较多, 我们在 BMMY(pH8.0) 诱导期加入 PMSF、Pepstatin A(抑胃肽 A)和 EDTA(乙二胺四乙酸二钠)(图 4), 结果 PMSF 和 Pepstatin A 作用不明显, 而加入 EDTA 明显抑制蛋白的表达。

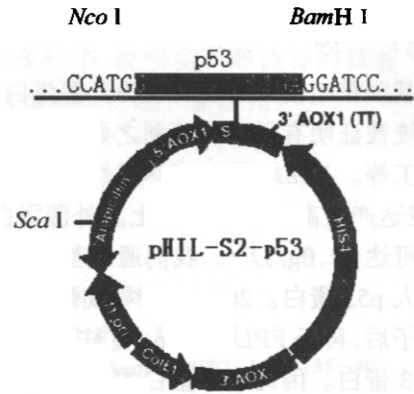


图 1 表达载体 pHIL-S2-p53 的构建

Fig.1 Construction of expression vector pHIL-S2-p53

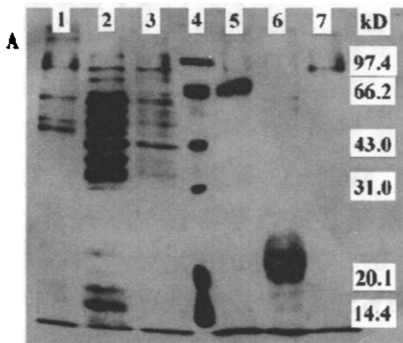
his⁺ Mut^s p53 重组克隆按照 1.2.3 部分所述方法用甘油培养基 BMGY 培养, 所得菌体经含 0.5% 甲醇的 BMMY (pH6.0) 诱导 48h。10% SDS-PAGE 电泳分析诱导后的上清液, 可见所诱导的重组克隆中, 有一个诱导出明显的异源蛋白条带(图 2), 其分子量约为 43kD, 与理论上 p53 cDNA 编码蛋白大小一致。SDS-PAGE 电泳图谱经计算机软件扫描分析表明, 此异源蛋白条带的含量约占分泌蛋白总量的 30%。ELISA 检测此诱导上清液存在免疫活性(图 3B)。

2.4 重组 p53 发酵条件的优化

用盐酸或氨水将诱导培养基 BMMY 的 pH 值由 6.0 调到 3.0、4.5 和 8.0, 同时以 pH6.0 为对照, 25 $^{\circ}$ C 诱导 48h。观察 pH 值对诱导表达的影响。10% SDS-PAGE 分析诱导

3 讨 论

基因重组技术的发展使得外源蛋白的重组表达有了更多的选择。经典的大肠杆菌表达系统被证明有很多的不利之处,例如表达蛋白产量低、难以纯化、对真核蛋白不能翻译后加工等。*Pichia* 酵母表达系统对真核蛋白的表达有很强的优势,主要表现在其易于操作、表达产量高和易于纯化上。外源蛋白在 *Pichia* 中表达成功的报道很多^[1,2],表达量最高的可达 12.0g/L^[3]。我们通过基因重组的方法,在 *Pichia* 酵母系统中高效表达得到了重组人 p53 蛋白。200mL 诱导发酵液先经孔径 10kD 超滤膜超滤浓缩并去除 10kD 以下小分子后,再经 FPLC(Mono Q 柱)分离,对水透析后真空冷冻干燥得到约 40mg 较高纯度的 p53 蛋白。因此 p53 蛋白的表达量可达 200mg/L。



B

Sample (200 μ L)	pH3.0	pH4.5	pH6.0	pH8.0
A ₄₉₂	0.143	0.341	0.478	0.740

图3 SDS-PAGE 和 ELISA 分析 pH 对 p53 表达的影响

Fig. 3 Analysing the influence of initial pH on the expression product by SDS-PAGE(A) and ELISA(B)

1. Supernatant of non-induced p53 recombinant;
- 2~3. Supernatant after induction (pH 8.0, 6.0);
4. LMW markers; 5. GS115(HSA, Mut⁺) control;
- 6~7. Supernatant after induction (pH4.5, 3.0)

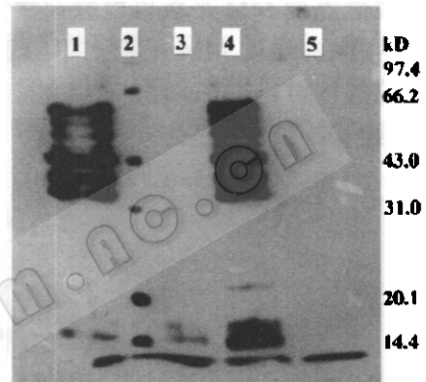


图4 添加抑制剂对 p53 表达的影响

Fig. 4 Influence of inhibitors on p53 expression

1. p53 recombinant without inhibitor;
2. LMW marker;
3. p53 recombinant non-induced control;
4. 60 μ mol/L PMSF + 1.5 μ mol/L pepstatin A;
5. 60 μ mol/L PMSF + 1.5 μ mol/L pepstatin A + 5 μ mol/L EDTA

用毕赤酵母系统表达异源蛋白,经常遇到的问题是胞外蛋白水解酶问题^[4~8]。由于 *Pichia* 工程菌通过甲醇诱导后,胞外发酵液中存在许多蛋白水解酶,所表达重组蛋白会部分甚至全部被降解而得不到很高的表达量。这个问题对表达多肽类小分子尤为明显。因此控制表达条件是获得重组蛋白高效表达的重要环节。如何解决这个问题已有很多文献报道,Romanos 等^[5]认为可以通过诱导时添加保护剂、添加抑制剂、选择最佳诱导时间和选用蛋白酶缺陷的宿主等来解决。本文研究 p53 蛋白的表达时发现,通过改变诱导的起始 pH,可使表达量提高 50% 以上(图 3)。最近 Jonsson 等^[9]在研究 *Pichia* 表达时也获得了类似的结果,表明诱导时 pH 值的控制可能是 *Pichia* 系统高效表达重组蛋白的关键之

—[9]。我们发现将 pH 值由 6.0 调至 3.0 和 4.5 的 BMMY 培养基经 48h 诱导后, pH 值分别上升到 4.0 和 5.5, 而起始 pH 为 8.0 的则改变较小, 说明在甲醇诱导的过程中, pH 值存在动态的变化。p53 重组克隆的最佳诱导 pH 值还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Invitrogen, *Pichia Expression Kit Instruction Manual (Version E)*.
- [2] R.G. Buckholz, M.A. Gleeson. *Bio/Technology*, 1991, 9(11):1067~1072.
- [3] J.J. Clare, F.B. Rayment, S.P. Ballantine. *Bio/Technology*. 1991, 9(5):455~460.
- [4] M. Holmquist, D. C. Tessier, M. Cygler. *Protein Expression and Purification*, 1997, 11(1):35~40.
- [5] M.A. Romanos, C.A. Scorer, J.J. Clare. *Yeast*, 1992, 8(6):423~488.
- [6] J.J. Clare, M.A. Romanos, F.B. Rayment. *Gene*, 1991, 105(2):205~212.
- [7] K. Sreekrishna, R.H. Potenz, J.A. Cruze. *J. Basic Microbiol.*, 1988, 28(4):265~278.
- [8] M. Tsujikawa, K. Okabayashi, M. Morita. *Yeast*. 1996, 12(6):541~553.
- [9] L.J. Jonsson, M. Saloheimo, M. Penttila. *Current Genetics*, 1997, 32(6):425~430.

Expression of Recombinant Human p53 in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*

Qiu Rongde Zhu Jianbei Wang Lei

Ji Xinsong Lu Changde Yuan Zhongyi

(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract Recombinant human p53 protein was produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* here. Using *Nco*I and *Bam* HI, human p53 cDNA was inserted into the *Pichia* expression vector pHIL-S1. The constructed plasmid, pHIL-S2-p53, was linearized by *Bg*1 II, and then transformed into *Pichia pastoris* GS115(his4Mut) by electroporation. Through selection of Mut^r phenotype and expressing clones, a high expression transformant was obtained. In addition, the influences of the initial pH during cultivation and the addition of protease inhibitors on p53 expression of the recombinant cells were investigated. The p53 were separated from the broth and purified by ultrafiltration and Mono Q-FPLC. About 200mg of purified p53 with the immune competence under ELISA assay was produced from 1L broth.

Key words p53, *Pichia pastoris*, gene expression