

## 医学与免疫生物技术

## 豹蛙抗瘤酶的毕赤酵母高效表达、纯化及活性测定

杨刚刚<sup>1,3</sup>, 马诚凯<sup>1,3</sup>, 张全义<sup>2</sup>, 史世会<sup>2</sup>, 王泽<sup>2</sup>, 吕中原<sup>2</sup>, 王绪洋<sup>2</sup>, 许晓亚<sup>1,3</sup>,  
崔晴晴<sup>1,3</sup>, 张继红<sup>1,3</sup>, 张瑞刚<sup>1,3</sup>, 徐存拴<sup>1,3</sup>

1 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007

2 河南新乡华星药厂, 河南 新乡 453007

3 河南省-科技部共建细胞分化国家重点实验室培育基地 生物工程药物河南省工程实验室, 河南 新乡 453007

杨刚刚, 马诚凯, 张全义, 等. 豹蛙抗瘤酶的毕赤酵母高效表达、纯化及活性测定. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1632-1642.

Yang GG, Ma CK, Zhang QY, et al. Expression, purification and characterization of recombinant onconase expressed in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1632-1642.

**摘要:** 豹蛙抗瘤酶 (Onconase, ranpirnase, ONC) 对体内外多种肿瘤有很强的杀伤作用, 是当前全球重点研究的 100 种新药之一, 为获得高表达与高活性的重组豹蛙抗瘤酶 (Recombination onconase, rONC), 根据成熟 ONC 的 cDNA 序列和毕赤酵母密码子偏好性设计基因并提高其 GC 含量, 分泌信号肽采用酵母  $\alpha$  交配因子的 pre 肽, 分别构建表达载体 pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC 和 pPICZ $\alpha$ -A/ONC, 并转染毕赤酵母 X-33、GS115 和 SMD1168, 筛选阳性克隆并进行诱导表达。在摇瓶规模筛选最佳载体-宿主组合及优化培养条件之后, 进行 10 L 规模最优培养基的筛选, 发酵产物经双水相萃取偶联 G50 凝胶层析分离纯化。结果表明, pPICZ $\alpha$ -A/X-33/ONC 组合表达量优于其他组合, 且在 pH 5.5、23 °C 条件下诱导 7 d, 最高表达量达到 13 mg/L; 在 10 L 规模条件下, rONC 于 pH 5.5 的低盐基础培养基 (Lower basic salt medium, LBSM)、甲醇浓度 0.25% 条件下诱导 7 d, 最高表达量为 180 mg/L; 纯化后的 rONC 纯度  $\geq 95\%$ , 收率高于 90%; 生物活性检测发现, rONC 在体外能杀伤多种癌细胞。初步建立了 rONC 的高效表达与纯化体系, 为后续的功能和作用机理研究奠定了一定基础。

**关键词:** 豹蛙抗瘤酶, 高效表达, 双水相萃取, 活性测定

**Received:** December 13, 2014; **Accepted:** March 3, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31201093), Natural Science Foundation of Henan Province (Nos. 142300413212, 142300413227), The Major Scientific and Technological Projects of Henan (No. 111100910600).

**Corresponding author:** Cunshuan Xu. Tel: +86-373-3326001; Fax: +86-373-3325410; E-mail: cellkeylab@126.com

国家自然科学基金 (No. 31201093), 河南省自然科学基金 (Nos. 142300413212, 142300413227), 河南省重大科技攻关项目 (No. 111100910600) 资助。

网络出版时间: 2015-06-29

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150629.1218.001.html>

# Expression, purification and characterization of recombinant onconase expressed in *Pichia pastoris*

Ganggang Yang<sup>1,3</sup>, Chengkai Ma<sup>1,3</sup>, Quanyi Zhang<sup>2</sup>, Shihui Shi<sup>2</sup>,  
Ze Wang<sup>2</sup>, Zhongyuan Lü<sup>2</sup>, Xuyang Wang<sup>2</sup>, Xiaoya Xu<sup>1,3</sup>, Qingqing Cui<sup>1,3</sup>,  
Jihong Zhang<sup>1,3</sup>, Ruigang Zhang<sup>1,3</sup>, and Cunshuan Xu<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

<sup>2</sup> Henan Xinxiang Hua Xing Pharmaceutical Factory, Xinxiang 453007, Henan, China

<sup>3</sup> State Key Laboratory Cultivation Base for Cell Differentiation Regulation, Henan Engineering Laboratory for Bioengineering and Drug Development, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

**Abstract:** Ranpirnase (onconase, ONC) is a new drug, with weak RNase activity and strong cytotoxicity to various tumor cells *in vitro* and *in vivo*. This study is to obtain recombination onconase (rONC) with high bioactivity. Based on the codon preference of *Pichia pastoris*, we designed and synthesized the gene according to cDNA sequences of ONC and the  $\alpha$  mating factor's prepeptide. We screened positive clones after transforming the recombination plasmids into *P. pastoris* X-33, GSS115 and SMD1168. We screened the best combination of seven different vectors and host strains. Moreover, we optimized culture condition in shake flasks and 10 L bioreactor, and purified rONC from the supernatant after inducing it with 0.25% methanol by aqueous two-phase extraction coupling G50 molecular exclusion method. The highest rONC production was 13 mg/L in pPICZ $\alpha$ -A/X-33/ONC combination under the condition of pH 5.5 and 23 °C in shake flasks for 7 d; and that the highest rONC production was 180 mg/L when the induction is performed in the lower basic salt medium with pH 5.5 in the 10 L bioreactor for 7 d. The yield of rONC is more than 90% at a purity of above 95%. rONC can kill various tumor cells *in vitro*. The expression and purification of rONC would be useful for further investigation of this new drug.

**Keywords:** onconase, high-efficiency expression, aqueous two-phase extraction, activity detection

豹蛙抗瘤酶 (Onconase, ONC) 在北极豹蛙早期胚胎中首次发现, 最早命名为 P30 蛋白, 属于核糖核酸酶 A 的家族成员<sup>[1]</sup>, 对体内外多种肿瘤有很强的杀伤作用, 是第一个进入抗肿瘤临床试验的核糖核酸酶, 也是当前全球重点研究的 100 种新药之一<sup>[2-3]</sup>。ONC 由 104 个氨基酸组成, 分子量约 11.8 kDa, 等电点为 9.3, 溶解温度 ( $T_m$ ) 值为 90 °C<sup>[4]</sup>。ONC 的结构非常稳定, 含 4 个  $\alpha$ -螺旋、7 个  $\beta$ -折叠、4 个  $\beta$ -转角和 4 对二硫键。它通过静电作用结合到细胞膜表面, 再通过膜流和内吞作用进入细胞内<sup>[5]</sup>。在细

胞内, 它通过特异性降解 tRNA 而抑制蛋白质合成, 导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。同时, 它还通过促进 Caspase9 与细胞色素 C (cyt c) 结合, 活化 Caspase 3 和启动细胞凋亡级联反应, 导致细胞凋亡<sup>[7]</sup>。刘默芳课题组<sup>[8]</sup>研究发现 ONC 能特异性降解 miRNA 前体, 而对 miRNA 的成熟链无明显作用, 这为 ONC 抗肿瘤的作用机制提供了新的思路。研究表明, ONC 在有效作用剂量下, 主要作用于对数生长期的肿瘤细胞, 而对生长中的正常细胞无明显作用<sup>[9]</sup>, 同时, 它还具有机体不良反应少、免疫原性低、不易产生耐药

性等优点,是一种极具潜力的抗肿瘤药物。1996年以来,Tamir公司(前身为Alfacell公司)相继开展了对非小细胞肺癌和其他实体肿瘤的I期或II期临床试验,其对恶性间皮瘤的效果要好于阿霉素,现已在欧美国家上市<sup>[10]</sup>。

天然ONC的主要来源为北极豹蛙的卵细胞,纯化工艺主要包括:豹蛙体内受精、卵母细胞提纯、阴离子交换层析、阳离子交换层析和体积排阻等<sup>[11]</sup>,过程繁琐、耗时久、产量低且代价昂贵,难以满足产业化要求。

利用基因工程手段来进行豹蛙抗瘤酶的表达已取得一些研究进展,但在rONC的表达量、生物活性等方面仍存在一些不足,例如:原核系统由于自身缺乏修饰功能,表达的rONC不能正确折叠,产物为包涵体形式,需用变性、复性和去除N端Met等方法进行后加工处理,工艺繁琐,活性难以保证,不利于产业化<sup>[11-13]</sup>;毕赤酵母系统表达的ONC在蛋白修饰上较原核有较大优势,但表达量与原核相比较低,纯化多采用多步柱层析方法来捕获rONC,虽然保证了活性与纯度,但存在收率低(50%-60%)、成本高等缺点<sup>[14]</sup>。

本文选用毕赤酵母表达系统,根据密码子使用频率优化密码子并去除糖基化位点,使用去除pro肽的酵母 $\alpha$ 因子为信号肽<sup>[14]</sup>,人工合成基因后构建多种载体-受体菌组合,筛选高表达菌株,优化表达条件来进一步提高rONC的表达量。同时,采用双水相萃取偶联G50凝胶层析,获得纯度大于95%、收率高于90%、能杀伤多种癌细胞的rONC,有效降低生产成本,为ONC的产业化奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和基因

大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 菌株购自武汉晶赛生物工程有限公司。毕赤酵母X-33、GS115、SMD1168菌株,分泌型酵母表达载体pPIC9、pPIC9K、pPICZ $\alpha$ -A购自Invitrogen公司。ONC优化基因委托上海捷瑞生物工程有限公司合成。人肝癌细胞株7402、HeLa、RH-35细胞株菌购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心(北京)。

#### 1.1.2 试剂和工具酶

DMEM、RPMI-1640培养基、青霉素、链霉素购自Invitrogen公司。胎牛血清购自杭州天杭生物科技有限公司。MTT、DMSO购自Geneview公司。质粒快速提取试剂盒均购自鼎国生物技术有限公司。酵母基因组快速提取试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公司。限制性内切酶*Sac*I、*Bam*HI、*Bst*BI、*Eco*RI购自MBI公司。Protein ladder购自北京康为世纪生物科技有限公司和赛默飞世尔科技有限公司。ONC一抗购自武汉博士德生物工程有限公司。其他试剂为国产分析纯。

#### 1.1.3 培养基及基础培养条件

常用培养基:LB、YPD、BMGY、PTM1、PTM2等培养基参考Invitrogen公司的酵母表达手册。

基础盐培养基(Basic salt medium,BSM)(g/L):硫酸钾14.3,硫酸镁11.7,盐酸胍6,氢氧化钾3.9,硫酸钙0.9,甘油40,磷酸23.5 mL/L。

低盐基础培养基 (LBSM)(g/L): 硫酸钾 4.55, 硫酸镁 3.73, 氢氧化钾 1.03, 硫酸钙 0.23, 六偏磷酸钠 6.5, 甘油 40。

摇瓶培养条件: 温度 28 °C, 培养转速 300 r/min, 诱导转速 200 r/min, 诱导 7 d。

发酵罐发酵条件: 发酵开始至 12 h: 温度 28 °C, 转速 400 r/min, 通气量 0.2 Nm<sup>3</sup>/h。

12 h 至开始诱导: 温度 28 °C, 转速 750 r/min, 通气量 1 Nm<sup>3</sup>/h。

开始诱导至诱导 7 d: 温度 23 °C, 转速 750 r/min, 通气量 1 Nm<sup>3</sup>/h。

#### 1.1.4 主要仪器

高速低温离心机和紫外分光光度计 (NANO Drop 2000) 购自上海赛默飞世尔科技公司。全温振荡培养箱 (211B) 购自上海智城分析仪器制造有限公司。细胞电转化仪购自 Invitrogen 公司。10 L 微生物全自动发酵罐 (Bio-10JS) 和甲醇检测流加控制器 (FC2002) 购自上海保兴生物设备有限公司。XK26 层析柱、Typhoon FLA 7 000 IP 激光扫描成像仪和 ImageQuant LAS 4 000mini 超灵敏化学发光成像仪购自美国 GE 公司。ELx800 酶标仪购自美国 Biotek reader 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *ONC* 基因的序列优化与载体构建

通过 NCBI 查询 *ONC* 基因序列 (AF332139.1), 分析该基因毕赤酵母密码子偏好性, 利用在线序列优化工具 (<http://www.evolvercode.net>) 对 *ONC* 核苷酸序列进行设计, 按何庆方法<sup>[14]</sup>采用去除 pro 肽的  $\alpha$  交配因子为信号肽, 根据毕赤酵母密码子的碱基使用频率优化密码子组成序列并提高 GC 含量, 序列

全长 ( $\alpha$  交配因子 pre 肽+*ONC*) 为 598 bp, 优化序列由上海捷瑞生物工程有限公司进行全基因合成, 并分别构建 3 种分泌型毕赤酵母表达载体 pPIC9/*ONC*、pPIC9K/*ONC*、pPICZ $\alpha$ -A/*ONC*。

### 1.2.2 工程酵母菌的制备与筛选

分别提取 pPIC9/*ONC*、pPIC9K/*ONC*、pPICZ $\alpha$ -A/*ONC* 重组质粒, *Sac* I 酶切进行线性化, 电转化至新鲜制备的酵母感受态细胞, 其中将 pPICZ $\alpha$ -A/*ONC* 转至毕赤酵母 X-33 感受态细胞, 将 pPIC9/*ONC*、pPIC9K/*ONC* 分别转至毕赤酵母 GS115、SMD1168 和 X-33 中, 方法参考 Invitrogen 公司毕赤酵母表达手册进行。其中含抗性载体为 pPIC9K (G418) 和 pPICZ $\alpha$ -A (博来霉素, Zeocin), 组氨酸缺陷型宿主菌为 GS115 和 SMD1168, 载体与宿主菌株进行组合后需要至少一方具有抗性或筛选标记方可进行阳性克隆筛选, 实际共得到 7 种载体-宿主组合, 依次为: pPICZ $\alpha$ -A/X-33、pPIC9/GS115、pPIC9K/GS115、pPICZ $\alpha$ -A/GS115、pPIC9/SMD1168、pPIC9K/SMD1168、pPICZ $\alpha$ -A/SMD1168。转化后菌液涂布不同抗性平板进行筛选, 其中转化 pPIC9、pPIC9K 的菌液涂布组氨酸缺陷型平板, pPICZ $\alpha$ -A 涂于含 100  $\mu$ g/mL 博来霉素、pH 7.5 的 YPD 平板。28 °C 倒置培养 3 d, 挑取单克隆进行扩大培养, 分别提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, PCR 产物送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序验证。

随机挑选 7 个组合鉴定正确的菌种分别接种到 10 mL YPG/50 mL 三角瓶中, 于 28 °C、250 r/min 振荡培养 18–24 h, 当 *OD*<sub>600</sub> 值达到 10 时, 按 1% 接种至 100 mL BMGY/1 L 三角瓶中, 继续于 28 °C、280 r/min 培养 24 h 后, 加入终

浓度为 1% (V/V) 的甲醇进行诱导培养, 培养条件更改为 23 °C、200 r/min。每 12 h 补加一次甲醇, 补加量为发酵液体积的 1% (V/V)。诱导 7 d 后, 发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min 后保留上清, Bradford 法测定上清蛋白浓度, 取 1 mL 上清 TCA 处理后进行 15% SDS-PAGE 检测 (下同), 用 Typhoon FLA 7 000 IP 激光扫描成像仪对蛋白条带进行灰度扫描, 软件 Image Quant TMTL 分析目的条带所占比例进行定量, 确定表达量最高的载体-受体菌组合。

### 1.2.3 摇瓶发酵的最优条件实验

取上述表达量最高组合的菌株活化后接种至 10 mL YPG /50 mL 三角瓶, 于 28 °C、250 r/min 培养 18–24 h。当  $OD_{600}$  达到 10 时, 按 1%接种至 100 mL BMGY/1 L 三角瓶中。培养基的 pH 分别为 5.0、5.5、6.0。在 28 °C、300 r/min 培养 24 h 后, 加入终浓度为 1% (V/V) 的甲醇开始诱导。诱导温度分别设置为 20 °C、23 °C、26 °C, 每 12 h 补加一次甲醇, 转速调整为 200 r/min。诱导 7 d 后取上清测定蛋白浓度, 终浓度 10% TCA 处理 1 mL 上清进行 SDS-PAGE, 检测 rONC 的表达情况, 蛋白条带进行灰度扫描和定量, 实验重复 3 次。

### 1.2.4 10 L 发酵的最适培养基实验

取上述表达量最高组合的菌株活化后接种至 10 mL YPG/50 mL 三角瓶, 于 28 °C、250 r/min 培养 18–24 h。当  $OD_{600}$  值达到 10 时, 按 1%接种到 200 mL YPG /1 L 三角瓶中。当  $OD_{600}$  值达到 20 时, 取 400 mL 菌液分别加入 5 L BSM 培养基和 5 L LBSM 培养基的 10 L 发酵罐中, 培养基中分别加入 5 mL PTM1, 依据摇瓶优化得到的最佳发酵条件进行条件设定, 流加氨水和磷酸控制 pH 为 5.5, 调节通气量控制溶氧, 按

发酵罐初始培养条件培养, 当初始培养基甘油耗尽时按 DO 关联进行甘油补加, 当菌体密度达到 600 左右时停止补甘油。饥饿 1 h 后开始甲醇诱导, 每升甲醇含 20 mL PTM2 培养基, 诱导过程中控制 DO 为 20%, 温度 23 °C, 甲醇浓度 0.25%, 诱导 7 d 后测定上清蛋白浓度, 取 50  $\mu$ L 上清进行 SDS-PAGE, 蛋白条带进行灰度扫描和定量, 检测 rONC 的表达情况。

### 1.2.5 rONC 的分离纯化

以下步骤非特殊要求, 均在 4 °C 或冰上进行, 优化后纯化条件如下:

双水相萃取: 取 10 L 罐诱导 7 d 发酵液, 于 4 °C、4 000 $\times$ g 离心 30 min 收集上清, 每升上清加入 308 g  $K_2HPO_4$ , 搅拌至  $K_2HPO_4$  完全溶解后边搅拌边缓慢加入 372 mL 无水乙醇, 将混合体系置于分液漏斗中–20 °C 过夜, 形成上、中、下 3 层, 上层经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 5 kDa 膜包超滤后进行 G50 凝胶过滤层析。

凝胶过滤层析: 层析柱型号 XK26, 层析填料 Sephadex G50, 装填量为 150 mL, 取 50 mL 浓缩蛋白上样 (约 25 mg), 以 1 mL/min 的流速上样至平衡 (20 mmol/L  $Na_2HPO_4$  溶液, pH 9.5) 后的 G50 凝胶过滤层析柱 (2.6 cm $\times$ 20 cm), 用 20 mmol/L  $Na_2HPO_4$  溶液 (pH 9.5) 进行洗脱, 紫外检测仪监控全程, SDS-PAGE 分析各组分。

### 1.2.6 Western blotting 分析

取不同组合菌株诱导 7 d 的 rONC 上清进行 SDS-PAGE, 用电转仪将所测蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上, 转膜结束后用脱脂奶粉封闭过夜, 与 ONC 兔抗人一抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 再与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 超敏 ECL 底物发光显色, 用 ImageQuant LAS 4000mini 扫

描仪进行扫描分析。

### 1.2.7 SRB 法测定 rONC 对癌细胞活性的影响

人肝癌 7402 细胞的培养基为 RPMI-1640 培养基, HeLa 和 RH-35 细胞的培养基为 DMEM 培养基, 均含 10% 的胎牛血清、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 U/mL), 用 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期的细胞, 将细胞稀释至  $5 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下培养 24 h, 弃去培养基, 分别加入 200  $\mu$ L 含不同浓度 rONC 的培养基, 设置无药物处理的对照组和不接种细胞的调零组。于药物处理细胞 24 h 后, 保留培养基的基础上每孔加入 50  $\mu$ L、4  $^{\circ}$ C 预冷的三氯醋酸溶液 (终浓度 10%) 进行固定。静置 5 min 放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱 1 h, 注意保持平板水平。弃去上清液, 用去离子水充分清洗至少 5 次, 甩干水分, 充分干燥至少 12 h。室温避光条件下, 每孔加入 100  $\mu$ L 4% 的 SRB 溶液 (0.2 g SRB 粉末溶于 50 mL 1% 醋酸), 锡纸包裹平板放置 15 min。弃去上清液, 1% 醋酸清洗 5 遍以上, 要求将多余的染料洗净为止, 继续放置空气中充分干燥, 干燥时间至少 24 h, 实验全过程注意防止灰尘污染。每个孔加入 10 mmol/L Tris 溶液 (pH 10.5) 150  $\mu$ L, 置于振荡器上轻轻振荡, 保证其充分溶解, 室温放置 5 min, 上述操作均需锡纸包裹, 避光操作。置酶标仪于波长 490 nm 检测各孔吸光度值 ( $A$  值)。每个实验组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC、pPICZ $\alpha$ -A/ONC 的鉴定

对 pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC、pPICZ $\alpha$ -A/ONC 重组质粒进行酶切、PCR 和测序鉴定, 结

果表明, pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC 用 *Sac* I 单酶切后出现一个 10 000 bp 左右条带 (图 1A), pPICZ $\alpha$ -A/ONC 用 *Sac* I 单酶切后出现一个 3 500 bp 左右条带 (图 1B)。pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后出现一个 9 000 bp 和一个 312 bp 左右条带 (图 1A), pPICZ $\alpha$ -A/ONC 用 *Bst*B I 和 *Eco*R I 双酶切后出现一个 3 000 bp 和一个 312 bp 左右条带 (图 1B)。利用载体通用引物进行 PCR 扩增, 产物理论大小为 598 bp, 测序结果表明, 结果与预期基因序列一致。

### 2.2 转化子验证及重组蛋白表达

用电转化方法将线性化的 pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC、pPICZ $\alpha$ -A/ONC 质粒分别转入

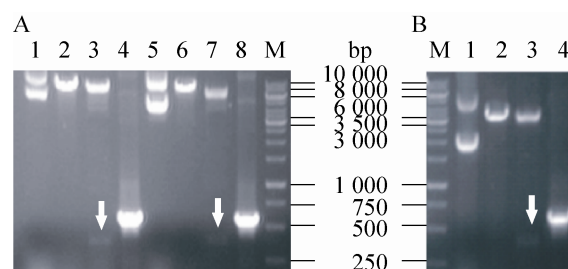


图 1 重组质粒的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmids pPIC9/ONC and pPIC9K/ONC (A), pPICZ $\alpha$ -A/ONC (B). (A) 1–4: identification of recombinant plasmids pPIC9/ONC; 1: recombinant plasmid; 2: enzyme with *Sac* I; 3: double enzyme digestion with *Bam*H I and *Eco*R I; 4: PCR; 5–8: identification of recombinant plasmids pPIC9K/ONC. 5: recombinant plasmid; 6: enzyme with *Sac* I; 7: double enzyme digestion with *Bam*H I and *Eco*R I; 8: PCR. (B) 1–4: recombinant plasmids pPICZ $\alpha$ -A/ONC's digest; 1: recombinant plasmid; 2: enzyme with *Sac* I; 3: double enzyme digestion with *Bam*H I and *Eco*R I; 4: PCR; M: DNA molecular weight standard (DL10 000).

X-33、GS115、SMD1168 感受态细胞, 经过涂板-培养-筛选等过程获得单克隆。扩大培养后提取酵母基因组 DNA, 分别以基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物的正确性, 结果如图 2 所示, 重组菌株的模板均能扩增出 598 bp 的特异条带和 2 200 bp 的酵母自身条带 (图 2A)。测序结果表明, 特异条带的序列与预期一致, 表明 *ONC* 已成功整合入毕赤酵母基因组中。每个组合随机挑取若干单克隆进行摇瓶诱导表达, 取诱导 7 d 发酵液上清进行 SDS-PAGE 检测发现, 在 11.8 kDa 左右有高表达蛋白条带 (图 2B)。用 Western blotting 检测发现, 该条带呈现 *ONC* 阳性 (图 2C)。

### 2.3 摇瓶规模表达条件的优化

选取表达量最高组合 (pPICZ $\alpha$ -A/X-33/*ONC*) 菌株在 1 L 摇瓶规模进行不同培养基 pH 和诱导温度的表达条件优化, 结果如图 3 所示, 诱导 7 d 时, r*ONC* 的最佳表达条件为: 23 °C、pH 5.5, 经蛋白浓度测定和灰度扫描确定最高表达量达到 13 mg/L。

### 2.4 10 L 规模不同培养基对 r*ONC* 表达的影响

取表达量最高菌株进行活化和扩大培养, 当  $OD_{600}$  值达到 20 时, 分别取 400 mL 扩大培养的菌液, 接种到分别含 5 L BSM 和 5 L LBSM 的 10 L 发酵罐中, 培养基 pH 设定 5.5。待菌体密度达到 600 左右时进行开始补甲醇, 诱导 7 d 后, 取 50  $\mu$ L 发酵液上清进行 SDS-PAGE 检测。结果表明, 诱导 7 d 时, r*ONC* 在 LBSM 培养基的表达量高于 BSM 培养基 (图 4), r*ONC* 定量后达到 180 mg/L。

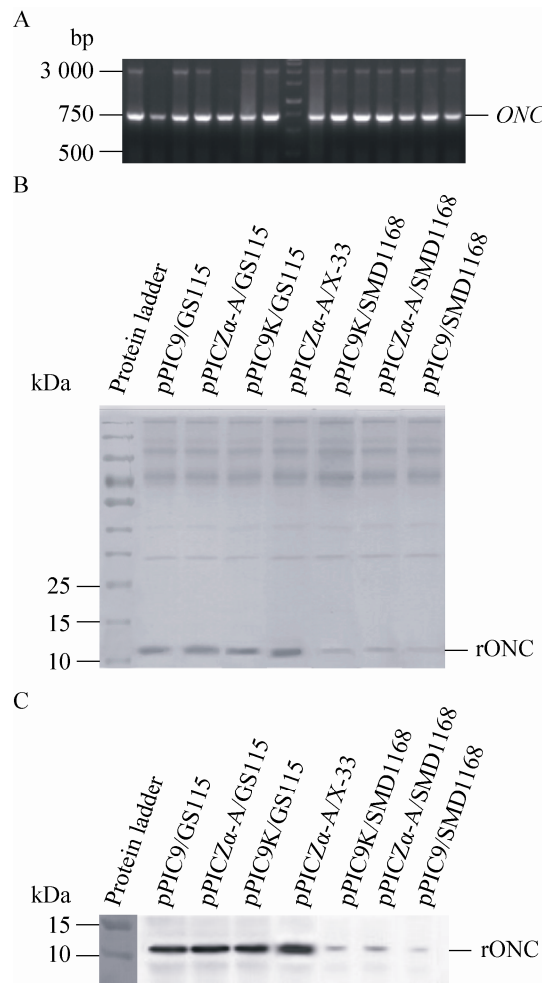


图 2 r*ONC* 的菌株鉴定图

Fig. 2 Identification of r*ONC* strains. (A) Genome PCR electrophoresis. (B) SDS-PAGE result of the r*ONC*. (C) Western blotting of r*ONC*.

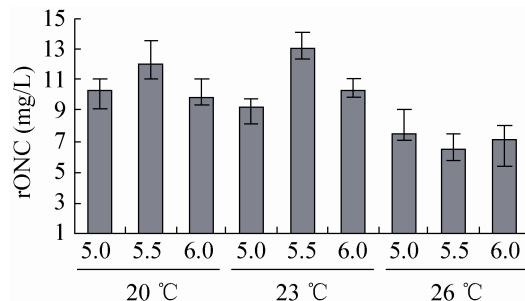


图 3 不同 pH 和温度对 r*ONC* 表达量的影响

Fig. 3 Effect of different pH and the induction temperature on the expression of r*ONC*.



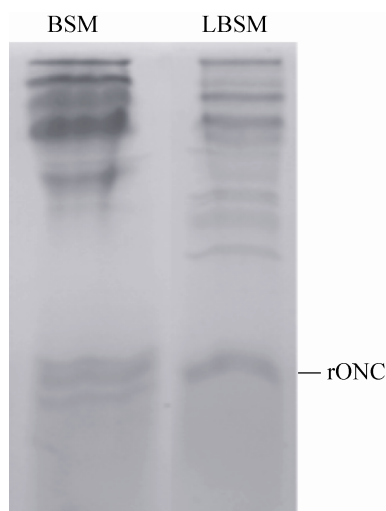


图 4 不同培养基对 rONC 表达量的影响

Fig. 4 Effect of different medium on the expression of rONC.

## 2.5 rONC 的分离纯化

取诱导 7 d 发酵液, 于 4 °C、4000×g 离心 30 min, 收集上清, 上清经双水相萃取后形成上、中、下 3 层, 用 SDS-PAGE 分别检测 3 层的蛋白分布情况 (图 5B)。取上层 (rONC 所在层) 进行 0.22 μm 过滤和 5 kDa 超滤。样品经 G50 凝胶层析进一步分离纯化, 如图 5A 所示, 在凝胶层析过程出现 2 个蛋白洗脱峰 (P1 和 P2)。SDS-PAGE 结果显示, rONC 主要分布在洗脱液峰 2 里, 灰度扫描后进行定量分析, rONC 的纯度大于 95%, 收率高于 90% (图 5B)。

## 2.6 rONC 的活性测定

不同浓度的 rONC 处理细胞后, SRB 法检测细胞的活力, 结果表明, 2.5–10 μmol/L 的 rONC 处理 RH-35、7402 和 HeLa 细胞后 24 h, 细胞活力受到明显抑制, 表明 rONC 对多种肿瘤细胞具有杀伤作用, 且杀伤作用与剂量依赖效应, 对 RH-35、7402、HeLa 细胞的 IC<sub>50</sub> 依次为: 7.78、6.55、2.33 μmol/L。

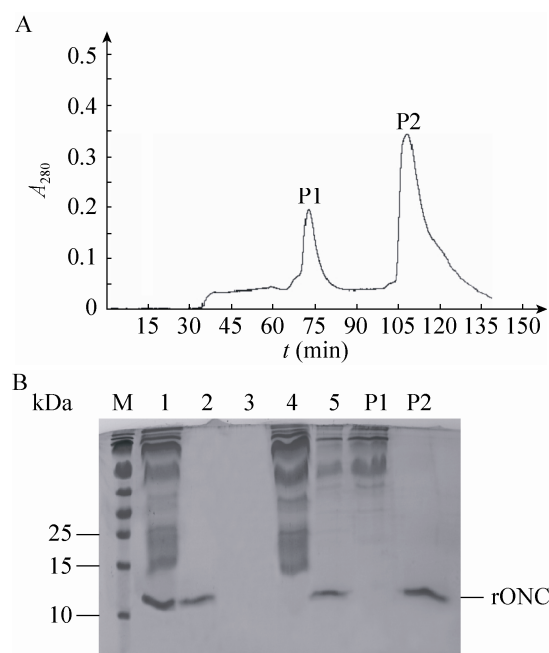


图 5 rONC 凝胶过滤层析的检测谱图(A)及 SDS-PAGE 纯度鉴定(B)

Fig. 5 The molecular exclusion of the purified recombinant ONC (A) and SDS-PAGE result of the purified rONC (B). M: protein ladder; P1: the first peak; P2: the second peak; 1: the total proteins of the supernatant fermented; 2: total proteins in the upper of aqueous two-phase; 3: total proteins in the middle of aqueous two-phase; 4: total proteins in the lower of aqueous two-phase; 5: samples.

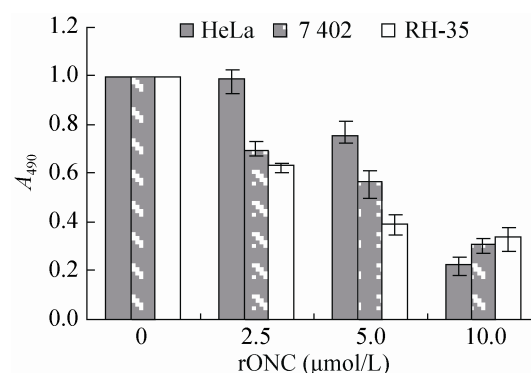


图 6 rONC 对 RH-35、7402、HeLa 细胞的抑制作用

Fig. 6 The inhibition effect of ONC on RH-35, 7402 and HeLa cells.



### 3 讨论

长期的进化过程使得不同物种在各自的进化史中形成了自己独特的符合其基因组的密码子使用法则。当外源蛋白在受体生物内表达时,首先要考虑外源基因密码子与宿主基因密码子的使用差异,这种差异容易引起基因的甲基化,从而造成基因沉默或蛋白表达量很低,要针对宿主物种密码子的使用偏好性对外源基因进行优化,以便于外源蛋白的高表达<sup>[15-17]</sup>,通过密码子优化来提高外源基因在不同宿主内表达效率的研究也屡见不鲜<sup>[18-21]</sup>。

为获得高表达和高活性的 rONC,本文首先依据毕赤酵母密码子的使用频率优化 ONC 基因的密码子构成并提高 GC 含量,突变 ONC 内部的糖基化位点,避免表达过程中的过度糖基化问题。同时采用去除 pro 信号肽的酵母通用信号肽方法来提高 rONC 的表达量,并避免出现蛋白信号肽切割不完全问题。本文分别构建表达载体 pPIC9/ONC、pPIC9K/ONC、pPICZ $\alpha$ -A/ONC,转染毕赤酵母 X-33、GS115、SMD1168,筛选得到 7 种载体-受体菌组合,诱导后发现 rONC 表达量最高的载体-受体菌组合为 pPICZ $\alpha$ -A/X-33,不同载体受体菌组合对蛋白的表达量有较大影响。首先 pPICZ $\alpha$ -A 载体较小,长度仅为 pPIC9、pPIC9K 的 1/3,转化操作和染色体的整合相对较易;同时 X-33 为野生型菌株,对外源蛋白具有更强的分泌和适应能力<sup>[22]</sup>,外源蛋白的高表达可能为两种因素综合作用的结果。表达产物经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定表达正确。

以筛选的高表达菌株为研究对象,在 1 L

摇瓶规模下研究不同 pH 和诱导温度对 rONC 的表达水平的影响,确定 pH 5.5、诱导温度 23 °C 为 rONC 最优表达条件,诱导 7 d 时的表达量最高达到 13 mg/L,较优化前提高了 40%。

依据摇瓶表达条件进行 10 L 规模下不同培养基的发酵,由于培养基无机盐成分差别较大,因此,考察培养基对重组蛋白的表达影响十分必要,LBSM 表达量要高于 BSM 培养基,诱导 7 d 达到 180 mg/L,高于已有文献报道<sup>[14]</sup>的最高量 150 mg/L。由于培养基成分较复杂,影响外源蛋白表达的原因尚不明确,所以针对不同外源蛋白的表达进行培养基的选择十分必要。

Ariel<sup>[23]</sup>曾利用乙醇/磷酸氢二钾双水相体系对溶菌酶、胰凝乳蛋白酶原、DNA 聚合酶等模式蛋白进行萃取,取得了很好的分离效果,蛋白的生物活性也得到了较好的保证。与传统纯化技术相比,双水相萃取具有操作条件温和、时间短、可连续操作、易回收、易放大等显著优势,具有很好的工业化前景。本文首次对发酵液中的 rONC 采用双水相方法萃取,萃取后的 rONC 主要集中在上层,菌体和绝大部分杂蛋白分布在中下层,取得了极佳的纯化效果,同时有效去除了大部分色素和蛋白酶,可避免蛋白酶等对重组蛋白的降解<sup>[24-25]</sup>。根据萃取后样品特点选择 G50 凝胶过滤层析进一步纯化,去除样品中剩余少量杂蛋白、残存乙醇、磷酸盐以及色素等,最终得到了收率高于 90%、纯度 $\geq 95\%$ 的 rONC,相比传统的多步提纯方法显著提高了纯化效率和蛋白收率。

本文用 SRB 法测定 rONC 对多种癌细胞增殖的影响,结果发现 rONC 能显著杀伤多种癌细胞,与文献报道结果一致<sup>[10-14]</sup>,具有良好的

生物学活性, 为进一步研究 rONC 的生物学作用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Porta C, Paglino C, Mutti L. Ranpirnase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. *Biologics*, 2008, 2(4): 601–609.
- [2] Darzynkiewicz Z, Carter SP, Mikulski SM, et al. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet*, 1988, 21(3): 169–182.
- [3] Ardelt W, Mikulski SM, Shogen K, et al. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem*, 1991, 266(1): 245–251.
- [4] Ardelt W, Shogen K, Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(3): 215–225.
- [5] Johnson RJ, Chao TY, Lavis LD, et al. Cytotoxic ribonucleases: the dichotomy of coulombic forces. *Biochemistry*, 2007, 46(36): 10308–10316.
- [6] Chang CH, Gupta P, Michel R, et al. Ranpirnase (frog RNase) targeted with a humanized, internalizing, anti-Trop-2 antibody has potent cytotoxicity against diverse epithelial cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(8): 2276–2286.
- [7] Iordanov MS, Ryabinina OP, Wong J, et al. Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1983–1994.
- [8] Qiao M, Zu LD, He XH, et al. Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors. *Cell Res*, 2012, 22(7): 1199–1202.
- [9] Makarov AA, Ilinskaya ON. Cytotoxic ribonuclease: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett*, 2003, 540(1/3): 15–20.
- [10] Tian X, Wang QC, Shen RL, et al. Latest advances in the research and development of onconase. *Chin J Cell Biol*, 2010, 32(6): 927–934 (in Chinese).  
田雪, 王庆诚, 沈如凌, 等. Onconase 研究与开发的最新进展. *中国细胞生物学报*, 2010, 32(6): 927–934.
- [11] Hu XJ. Expression of ribonuclease-onconase and its fusion proteins[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).  
胡晓珺. 核糖核酸酶 Onconase 及其融合蛋白的表达[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [12] Wang N, Tang XJ, Xiong SP, et al. Preparation and characterization of recombinant ranpirnase. *Acta Univ Med Nanjing: Nat Sci*, 2013, 33(8): 1034–1038 (in Chinese).  
汪楠, 唐小军, 熊四平, 等. 重组豹蛙酶的制备及其生物学特性分析. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(8): 1034–1038.
- [13] Guo H, Xu DS, Wang QC. Study on optimization of dilution renaturation condition of RNase onconase. *Chem Bioeng*, 2013, 30(10): 57–60 (in Chinese).  
郭红, 徐殿胜, 王庆诚. 核糖核酸酶 Onconase 的稀释复性条件优化研究. *化学与生物工程*, 2013, 30(10): 57–60.
- [14] He Q. Secretory expression of glycosylated and aglycosylated mutein of onconase from *Pichia pastoris* using different secretion signals and their purification and characterization[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2009 (in Chinese).  
何庆. 糖基化和非糖基化 Onconase 在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达、纯化与活性鉴定[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
- [15] Mellitzer A, Weis R, Glieder A, et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Micro Cell Fact*, 2012, 11: 61.
- [16] Sygmund C, Gutmann A, Krondorfer I, et al. Simple and efficient expression of *Agaricus meleagris* pyranose dehydrogenase in *Pichia*

- pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94(3): 695–704.
- [17] Abad S, Nahalka J, Winkler M, et al. High-level expression of *Rhodotorula gracilis* D-amion acid oxidase in *Pichia pastoris*. Biotechnol Lett, 2011, 33(3): 557–563.
- [18] Zhou ZL, Lin ZM, Geng LL, et al. Comparison of codon optimizations of *cryIAh1* gene in rice. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1187–1194 (in Chinese). 周宗梁, 林智敏, 耿丽丽, 等. 水稻中 *cryIAh1* 基因密码子优化方案的比较. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1184–1194.
- [19] Zelasko S, Palaria A, Das A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems. Protein Expr Purif, 2013, 92(1): 77–87.
- [20] Spatz SJ, Volkening JD, Mullis R, et al. Expression of chicken parvovirus VP2 in chicken embryo fibroblasts require codon optimization for production of naked DNA and Vecored meleagrid herpesvirus type 1 vaccine. Virus Genes, 2013, 47(2): 259–267.
- [21] Park S, Pack SP, Lee J. Expression of codon-optmiazed phosphoenolpyruvate carboxylase gene from *Glaciecola* sp. HTCC2999 in *Escherichia coli* and its application for C4 chemical production. Appl Biochem Biotech, 2012, 167(7): 1845–1853.
- [22] Cao MC, Xu JY, Luo LC, et al. Cloning of Glucoamylase(*glaA*) gene from *A. niger* and its expression in *P. pastoris* X-33. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(14): 8226–8230, 8306 (in Chinese). 曹慕琛, 徐健勇, 罗立超, 等. 黑曲霉糖化酶基因的克隆及其在毕赤酵母 X-33 中的表达. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8226–8230, 8306.
- [23] Louwrier A. Model phase separations of proteins using aqueous/ethanol components. Biotechnol Tech, 1998, 12(5): 363–365.
- [24] Tian MY. Aqueous two-phase extraction of serum albumin and enzymes[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2009 (in Chinese). 田明玉. 双水相萃取白蛋白和酶的初步研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [25] Zhang F. The integration process of aqueous two-phase extraction and chromatography for seperation and purification of recombinant human serum albumin[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2011 (in Chinese). 张帆. 双水相萃取偶联柱层析分离纯化重组白蛋白[D]. 大连: 大连理工大学, 2011.

(本文责编 郝丽芳)