

· 论 著 ·

人肺表面活性相关蛋白 A1 在 甲醇酵母的胞内表达

王霞¹, 封志纯¹, 兰和魁¹, 任大明², 杜江¹

(1. 第一军医大学附属珠江医院儿科, 广东 广州 510282; 2. 复旦大学遗传所, 上海 200433)

[摘 要] 目的 研究人肺表面活性相关蛋白 A1 (SP-A1) 在甲醇酵母中的胞内表达。方法 将编码正常人肺表面活性相关蛋白 A1 基因的 cDNA 克隆至甲醇酵母的胞内, 表达载体 pPIC3.5K, 构建了重组质粒 pPIC3.5K/SPA1, 电穿孔方法转化至酵母宿主菌 GS115 和 KM71, 用 PCR 方法筛选阳性转化子, 并用斑点印迹法、G418 方法筛选多拷贝转化子, 经甲醇诱导表达, SDS-PAGE 和 Western 印迹法鉴定表达产物。结果 SP-A1 基因在甲醇酵母中成功的表达了蛋白质, SDS-PAGE 分析证实目的蛋白分子量为 32 kD, 可被 SP-A 多克隆抗体特异识别。结论 人组织特异 SP-A1 蛋白可在甲醇酵母中高效表达, 表达产物具有免疫源性。

[关 键 词] 人肺表面活性相关蛋白 A1; 甲醇酵母; 表达

[中图分类号] Q785 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)06-0466-04

Intracellular Expression of Human Pulmonary Surfactant-Associated Protein in Methylophilic Yeast, *Pichia Pastoris*

WANG Xia, FENG Zhichun, LAN He Kui, et al.

Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To study the expression of pulmonary surfactant-associated protein A1 (SP-A1) in Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. **Methods** The cDNA encoding SP-A1 derived from the healthy adult's lungs was cloned into the pPIC3.5K, an intracellular expression vector of *Pichia pastoris*, and then transformed into *Pichia pastoris* by electroporation. The PCR fast detection method and G418 resistance method were used to screen the positive transformants and the multiple-copy transformants, respectively. SP-A1 intracellular expression was induced by methanol. SDS-PAGE and Western blotting were applied to detect the characteristics of the product. **Results** SP-A1 gene was highly expressed in *Pichia pastoris*. The molecular weight of the protein was 32 kD by SDS-PAGE analysis. Anti-SP-A polyclonal antibodies could specifically recognize SP-A1 protein. **Conclusions** The human tissue-specific SP-A1 protein can be highly expressed in Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris* and the products can show antigenicity.

Key words: Pulmonary surfactant-associated protein A1; *Pichia pastoris*; Expression

人肺表面活性相关蛋白 A1 (surfactant protein A, SP-A) 是由肺 II 型细胞分泌的一种磷脂蛋白复合物, 具有维持肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 活性、稳定 II 型细胞内外 PS 水平, 调节局部免疫和炎症反应, 调控其他相关基因转录等多种生理功能^[1~4]。目前使用的 SP-A 均是从动物肺组织及人羊水中提取的^[5~6], 制备较困难, 价格昂贵, 因此, 利用基因工程技术生产 SP-A 具有重要的

理论意义及实用价值。

甲醇酵母 (*pichia pastoris*) 是一种真核表达系统, 和细菌相比, 它可以实施真核生物的加工过程, 如蛋白质的糖基化, 二硫键的形成和蛋白质的折叠。与酿酒酵母 (*saccharomyces cerevisiae*) 相比, *Pichia pastoris* 更适合于表达真核蛋白, 能更好的分泌外源蛋白。现已有多种蛋白质在该系统中高效表达。

虽已成功地在大肠杆菌和酿酒酵母中表达了

[收稿日期] 2002-05-06; [修回日期] 2002-08-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (No. 36970770), 广东省自然科学基金资助课题 (No. 950558)

[作者简介] 王霞 (1964-), 女, 硕士, 主治医师, 现在广州军区广州总医院儿科工作。

SP-A1^[7~8],并在甲醇酵母中进行了分泌表达,但表达不稳定或表达水平不高,不能达到工业化生产的要求。本研究改变表达系统,探讨 SP-A1 在甲醇酵母胞内表达的可能性。将编码正常人 SP-A1 基因的 cDNA 克隆^[9]至甲醇酵母的胞内表达的载体 pPIC3.5K 中,成功地构建了重组质粒 pPIC3.5K/SP-A1,转化酵母宿主菌 GS115、KM71,获得 SP-A1 的胞内表达,为 SP-A 的进一步分离纯化和功能研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pPIC3.5K,酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115, KM71 和 GS115 Albumin, GS115 β -Gal 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 Top10F, pPUC19/spa1 由本实验室保存。EcoRI, SalI, SnaBI 等限制酶, RNaseA, Taq 酶、T4DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim 和华美生物工程公司;DNA 测序由上海生工公司完成;低分子量标准蛋白质为上海西巴斯生物技术开发公司产品;一抗为山羊抗人 SP-A 多克隆抗体,二抗为兔抗山羊抗体,由 CHEMICON International Inc. 公司购买;酵母培养基 Peptone, YNB(W/O)为 Difco 公司产品。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 目的基因的扩增

分别用两对引物扩增目的基因,一对是目的基因引物:(+)5'-GATTACGTAAACGTAAATGTGGCTGTGCCCTCTG3', (-)5'-GCGGAATTCGAATTTCGAACCTCACAGATGGTCAAG3';另一对为载体的外框引物,即 5'-AOX1:5'-GACTACGTATG GTTCCAATTGA CAAGG-3', 3'-AOX1:5'-GCA GAATTC AA TGGCA TTCTGACA TCG-3',上游引物引入 SnaBI 位点,下游引物引入 EcoRI 位点。PCR 产物经 EcoRI/SnaBI 酶切后用试剂盒纯化目的片段。

1.3 酵母重组表达载体的构建及鉴定

目的载体的限制酶切分析与片段回收:将表达载体 pPIC3.5K 扩增后经 EcoRI/SnaBI 酶切,纯化试剂盒回收大片段。将目的基因、载体大片段及 T4DNA 连接酶于 16℃连接 12 h,转化大肠杆菌 TOP10F',挑取阳性菌落抽提转化子质粒 DNA,经 SnaBI 和 EcoRI 双酶切及 PCR 鉴定,鉴定正确的质粒用引物 5'-AOX1:5'-GACTGGTTC-CAATTGACAAAGG-3', 3'-AOX1:5'-GCAAAATG-

GCA TTCTGA CATCG-3' 进行 DNA 序列分析。

1.4 酵母菌株的转化

pPIC3.5K/SP-A1 及亲本质粒 pPIC3.5K 扩增后用 SalI 酶切成线性,以电转化方法将线性载体转化进酵母菌株(参见 *Pichia expression kit instruction manual*, Invitrogen)。

1.5 酵母总 DNA 的提取及 PCR 分析

提取酵母总 DNA,用目的基因引物和 AOX1 引物进行重组质粒的 PCR 扩增。

1.6 高拷贝数整合的筛选和表型的鉴定

根据对 G418 抗性不同筛选出高拷贝重组子(参见 *Pichia expression kit instruction manual*, Invitrogen)。

1.7 SP-A1 在 *P. pastoris* 中的表达及鉴定

挑选培养基上重组的 His⁺ Mut^s 单菌落,接种于 100 ml BMG 的摇瓶中,28℃250 rpm/min 振荡、培养过夜至 OD₆₀₀ = 2 - 6,4℃离心 3 000 rpm/min ×5 min,去上清,沉淀细胞用 30 ml BMMY 重悬,置于 250 ml 摇瓶中继续培养,每 24 h 加 100%甲醇诱导至终浓度 0.5%,并取样 1 ml 离心,上清中取 200 μl 置于 Sephadex G25 中离心,收集管中上清约 130 μl 冻干浓缩至 20 μl,SDS-PAGE 电泳;沉淀中加入 100 μl 中止液及 0.3 g 玻璃珠,振荡 3 min,离心,留取上清,SDS-PAGE 电泳。其中一株表达产物进行 Western blotting 检测,一抗为羊抗人 SP-A 多克隆抗体,二抗为兔抗羊单克隆抗体。

2 结果

2.1 重组表达载体的鉴定

重组质粒用 SnaBI 和 EcoRI 限制性酶切分析可切出目的片段。见图 1。重组质粒经目的基因引物及 AOX1 引物扩增分别得到 850 bp 及 1 600 bp 的片段。见图 2。测序结果证实所克隆的 SPA 1 基因读框及序列完全正确,说明成功构建 pPIC3.5K/SP-A1 表达载体。

2.3 酵母转化结果

2.3.1 整合酵母的鉴定 SPA 转化子用目的基因引物扩增得到 1 200 bp 目的片段;AOX1 引物扩增分别扩增出 2 200 bp 和 1 600 bp 两段片段,空载体 AOX1 引物扩增出 2 200 bp 和 250 bp 两段片段,目的基因引物则未扩增出片段。见图 2。表明转化成功。

2.3.2 表型的鉴定 用 SalI 线性化质粒转化的 GS115,其表型为 His⁺ Mut⁺ 有 167 个菌落,表型为 His⁺ Mut^s 有 28 个菌落,两者之比约 6:1,可见所获

得的转化子绝大部分是利用 AOX1 启动子的快速生长型。

2.3.3 高拷贝整合菌株的筛选 梯度 G418 平板从 0.5 mg/ml 开始, 逐渐增加到 3.0 mg/ml。菌落最大的 G418 抗性浓度为 2 mg/ml, 数量很少, 大部分为 1.5 mg/ml。

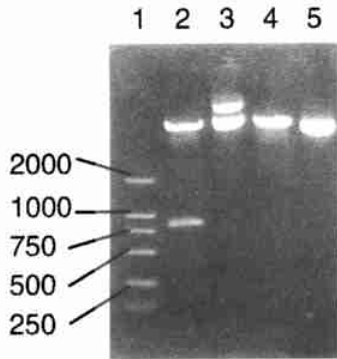


图1 pPIC3.5K/SP-A1 和 pPIC3.5K 的限制性酶切

Fig 1 Digestion of pPIC3.5K/SP-A1 and pPIC3.5K with SnaB I and EcoR I

1. DNA marker; 2. Digestion of pPIC3.5Kspa with SnaB I and EcoR I; 3. pPIC3.5Kspa; 4. Digestion of pPIC3.5K with SnaB I and EcoR I; 5. pPIC3.5k



图2 pPIC3.5K/SP-A1 和 pPIC3.5K 的 PCR

Fig 1 PCR of pPIC3.5K/SP-A1 and pPIC3.5K

1, 8. DNA Marker; 2, 3. spa 重组子 Recombinant pPIC3.5/SP-A1; 4, 5. 空载体重组子 pPIC3.5K; 6, 7. 质粒 pPIC3.5K/SP-A1; 2, 4, 6. Primer of AOX1; 3, 5, 7. Primer of SP-A1 gene

2.4 表达产物的初步鉴定

重组 Mut^s 菌株在 0.5% 甲醇诱导时开始表达, 随着时间的增加, 目的蛋白表达量逐渐增多, 诱导 144 h 达最大表达量, 分子量约为 32 kD, 上清中无分泌的蛋白条带。见图 3, 4。用羊抗人多克隆抗体(1:300)与表达的 SP-A1 进行 Western blotting, 出现了特异的反应条带, 表明所表达的蛋白质为 SP-A1。

1 2 3 4 5

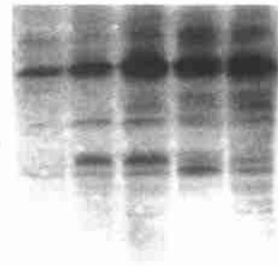


图3 SP-A1 的 SDS-PAGE(8%)

Fig 3 SDS-PAGE (8%) analysis of the SP-A1 expressed in *P. pastoris*

1. 阴性对照(空载体重组子 pPIC3.5K); 2, 3, 4, 5. Recombination SP-A1.

1 2



图4 SP-A1 的 SDS-PAGE(8%)

Fig 4 SDS-PAGE (8%) analysis of the SP-A1 expressed in *P. pastoris*

1. Recombination SP-A1; 2. Molecular weight markers (66 Kd, 43 kD, 31 kD, 20 kD).

3 讨论

甲醇酵母在蛋白质表达方面具有明显的优点而得到广泛应用。它是一种真核表达系统, 可对表达的蛋白进行加工折叠和翻译后修饰, 较之昆虫和哺乳动物表达系统成本要低得多; 适合于高密度培养, 表达量高。甲醇营养型酵母的重要特性是能利用甲醇作为唯一碳源和能量来源, 因为甲醇能诱导甲醇代谢所需的酶如乙醇氧化酶 (alcohol Oxidase, AOX), 而用葡萄糖、甘油或乙醇作为碳源时, AOX 则几乎不表达, 这样可减少外源蛋白质对菌株的毒性作用, 达到高密度发酵的作用。已有多种外源基因, 包括人血清白蛋白、人 EGF、鼠 EGF 等在甲醇酵母中高水平表达^[10]。

用酵母表达异源蛋白时, 有多种表达载体可供

选择。pPIC3.5K是穿梭质粒,属胞内表达,允许多拷贝目的基因整合至酵母染色体上,多克隆位点有5个单酶切位点:BamHI, SnaBI, EcoRI, AvrII 和 NotI;且包含有卡那霉素抗性基因,用于酵母和大肠杆菌中对 G418 抗性多拷贝插入的筛选。用 SalI 线性化 pPIC3.5K/SP-A1 的多数重组子是利用 AOX1 基因启动子的 HIS4Mut⁺,少数为 HIS4Mut^s。用电转化得到的转化子 G418 抗性绝大部分为 0.5~1.5 mg/ml, 2.0~4.0 mg/ml 高水平抗性则很少。

对于胞内表达蛋白,优先考虑用 HIS4Mut^s 表型,因为它的醇氧化酶水平低,表达的蛋白更容易纯化。用 KM71 HIS4Muts 重组子摇瓶培养,经 SDS-PAGE 和 Westernblotting 鉴定,证实 SP-A1 在胞内表达,第5天表达量最高。虽然转化的目的基因中信号肽仍然存在,但酵母并未识别,所以上清中未见分泌的目的蛋白。这为进一步寻找高效表达菌株、SP-A 的纯化和功能研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Mariencheck WI, Savov J, Dong Q, et al. Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa* [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4 Pt 1): L777 - 786.
- [2] Rosseau S, Hammerl P, Maus U, et al. Surfactant protein A downregulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes [J]. *J Immunol*, 1999, 163(8): 4495 - 4502.
- [3] Harrod KS, Trapnell BC, Otake K, et al. SP-A enhances viral clearance and inhibits inflammation after pulmonary adenoviral infection [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(3 Pt 1): L580 - 588.
- [4] Strong P, Kishore U, Morgan C, et al. A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid [J]. *J Immunol Methods*, 1998, 220(1 - 2): 139 - 149.
- [5] Kuroki Y, Sano H. Functional roles and structural analysis of lung collectins SP-A and AP-D [J]. *Biol neonate*, 1999, 76 (Suppl 1): 19 - 21.
- [6] Floros J, Hoover RR. Genetics of the hydrophilic Surfactant protein A and D. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1408(2 - 3): 312 - 322.
- [7] 兰和魁,封志纯,黄建生,等. 人 SP-A1 基因在大肠杆菌中的表达及产物的分离纯化 [J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(4): 227 - 230.
- [8] 兰和魁,封志纯,黄建生,等. 人肺表面活性相关蛋白 A1 在酿酒酵母中表达、纯化及活性分析 [J]. *生物工程学报*, 2001, 17 (4): 410 - 413.
- [9] 姬毅,封志纯,黄建生,等. 人肺表面活性物质 cDNA 克隆及序列分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(3): 153 - 155.
- [10] Clare JJ, Romanos MA, Koymen FB, et al. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: High level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies [J]. *Gene*, 1991, 105(2): 205 - 212.

(本文编辑:俞燕)

消息 ·

中国当代儿科杂志论著栏目改为英文版的通告

本刊遵照“反映当代,面向世界”的宗旨,为了更好地与国际交流,把我国儿科界的优秀论文推向世界、同时也将国外的新进展及时地介绍给国内的同道,从2003年(第5卷)起将优秀的论著改用英文全文加以中、英文摘要发表。也将国外专家撰写的论文和综述用英文全文加以中、英文摘要的形式发表。考虑到我国实际情况,本刊编辑部将为广大作者提供中译英的有偿服务。有关稿件要求及收费情况欢迎与本编辑部联系。

中国当代儿科杂志编辑部

2002年12月