

利用透明颤菌血红蛋白基因 vgb 改造毕赤酵母 分泌型表达载体 pPIC9K 的研究

孟志刚^{1,2}, 张 锐², 陈毓荃¹, 郭三堆²

(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘 要: 为了解决酵母发酵时贫氧限制目的蛋白表达量, 利用透明颤菌血红蛋白基因 vgb 设计毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K-vgb, 并以人乳铁蛋白基因为目的基因转入毕赤酵母 GS115。研究表明, 该表达载体具有转化操作简单、后期工程菌筛选简便、菌体耐低氧能力强、目的蛋白摇瓶表达量高等优点。该表达载体也可以通过直接替换目的基因而用于其他蛋白表达系统的开发研究。

关键词: 透明颤菌血红蛋白基因 vgb; 毕赤酵母; 表达载体 pPIC9K; 人乳铁蛋白

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2005)04-0166-05

Modification of *Pichia Pastoris*' Secretor Vector pPIC9K by Using *Vitreoscilla Hemoglobin* Gene (vgb)

MENG Zhi-gang^{1,2}, ZHANG Rui², CHEN Yu-quan¹ and GUO San-dui^{2*}

(1. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to enhance the yeast ferment expression level of target protein under hypoxic environment, we constructed a new secretor vector pPIC9K-vgb of *Pichia Pastoris* by use of *Vitreoscilla Hemoglobin* Gene (vgb) and the expression vector pPIC9K-vgbhLf by used *Human Lactoferrin* gene (hLf) as target gene. After transgenic pPIC9K-vgbhLf to the GS115, the results showed that it can simplify screening step of high level expression transformants, enhance anti-hypoxic ability of strain, and increase the expression level of hLf. This vector also can use to study on other proteins by replace the target protein gene.

Key words: *Vitreoscilla Hemoglobin* gene; *Pichia Pastoris*; Expression vector pPIC9K; *Human Lactoferrin*

甲醇营养型酵母 *Pichia pastoris* 是近年来新开发的真核表达系统, 它由于具有以下优点而被广泛地推广应用: 具有强有力的醇氧化酶 (Alcohol Oxidase, AOX1) 基因启动子; 可对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰, 从而使表达出的蛋白具有生物活性; 营养要求低; 表达的外源蛋白可分泌到胞外, 分离纯化简便; 外源基因通过质粒整合到基因组上, 基因工程菌株遗传稳定性

好; 糖基化程度低, 不产生过度的糖基化(唐元家等, 2002)^[1]; 便于工业化生产等。但是酵母为高好氧微生物, 在发酵过程中常常会因为供氧不足限制细胞密度而限制其表达量。透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla hemoglobin*, VHb) 是一种类似人血红蛋白的胞内可溶氧物质, 分子量约为 15.47 kD, 其转化酵母后可以在分子水平上提高 VHb 工程菌在高密度发酵时对低氧的利用能力, 而且胞内

收稿日期: 2005-03-23 修回日期: 2005-06-01

作者简介: 孟志刚(1978—), 男, 陕西神木人, 在读硕士生, 主要从事基因工程方面的研究。

* 通讯作者: Tel: 86-10-62136406; Fax: 86-10-62136406; E-mail: gsdui@mail.caas.net.cn

表达后不仅可以使工程菌生长速度加快,菌体表现为红色^[2~1]。因此VHb 可以用来提高酵母工程菌发酵表达量和建立酵母表达系统的筛选标志。基于以上原因笔者设计了改良的酵母分泌表达载体pPIC9K-vgb 进行研究。同时选用人乳铁蛋白基因(human lactoferrin, hLf)为目的基因对该表达载体进行了验证。人乳铁蛋白是一种具有多种生物学功能的铁结合性糖蛋白,相对分子量为80kD 左右。广泛存在于人乳、泪液、唾液、汗液、胰液和胆汁等内外分泌系统中,是人体非特异性免疫系统中重要的非抗体保护蛋白,具有广谱的抗菌、抗病毒性^[5]。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

电转化仪为Bio-Rad 公司GenePulser;限制内切酶,rTag DNA 聚合酶购自TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶、DNA marker、蛋白中低分子量标准购自MBI 公司;胰蛋白酶,酵母提取粉为

OXOID 公司产品。酵母无氨基氮源(YNB)为Difco 公司产品;YPD、RDB、MM、MD、BMGY、BMMY 酵母培养基按照Invitrogen 公司毕赤酵母试剂盒操作手册配置。

1.2 菌株、质粒和基因

毕赤酵母GS115、大肠杆菌DH5 α 、酵母分泌表达载体pPIC9K、克隆载体PUC19、中间克隆载体pGSVHB、PUC-hLf 等由本实验室保存,其中vgb、hLf 基因由本实验室合成。

1.3 表达载体的构建

依据毕赤酵母表达的外源蛋白可分泌到胞外、分泌的内源蛋白少、外源蛋白分离纯化简便的特点,对pPIC9K 改造的基本思路是在同一载体上既实现vgb 基因在胞内表达发挥溶氧和促进菌体生长的作用,又实现了目的基因的胞外高效表达。具体方法(图1):首先BamH I 和EcoR I 双酶切pGSVHB,回收0.8kb 的vgb 和Nos Ter 终止子片段,克隆于PUCm 载体,获得PUCm-vgbNos 重组质粒。

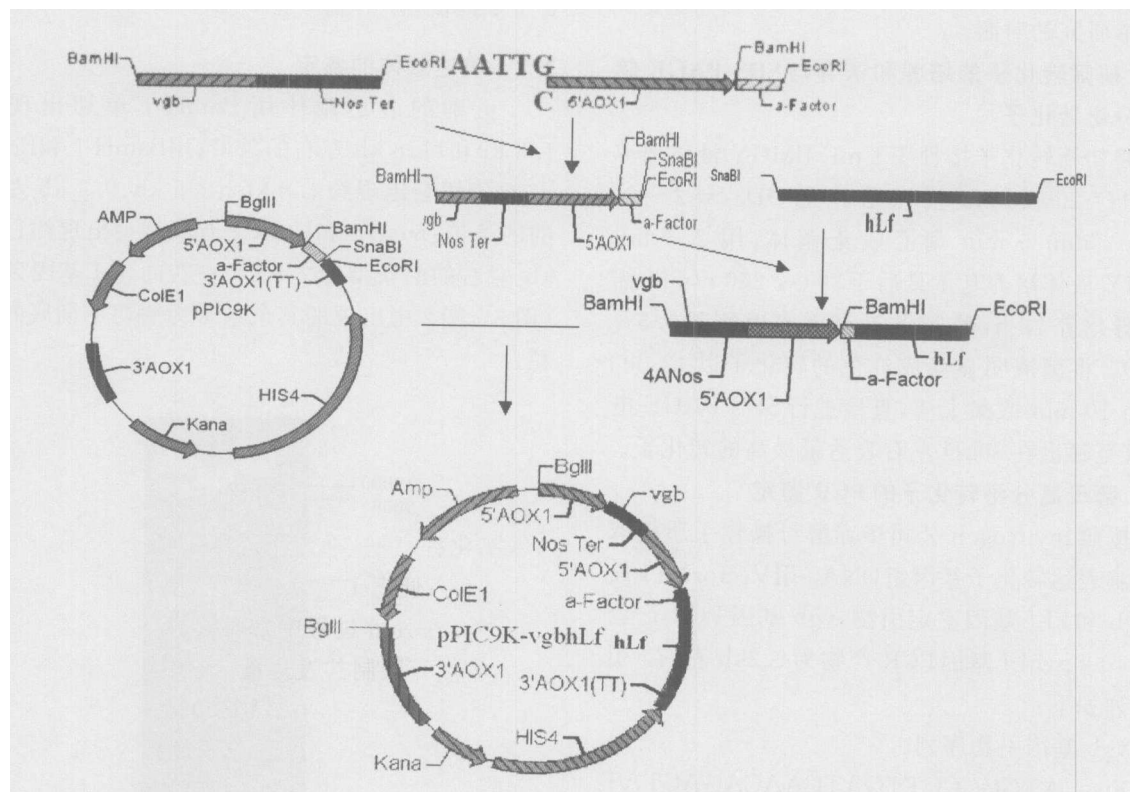


图1 表达载体构建图

Fig. 1 Construction of expression vector

然后用Bgl II 与EcoR I 双酶切pPIC9K,回收1.2kb 的5'AOX1 与 α -Factor 信号肽片段,在Bgl II 粘端添加Linker(同时钝化Bgl II 与EcoR I 位点)后克隆于EcoR I 单酶切脱磷处理的PUCm-

vgbNos 质粒中,用BamH I 鉴定连接方向,挑取顺向连接的克隆子PUCm-vgbNosAOX1。由于在5'AOX1 与 α -Factor 信号肽片段末端有一SnaB I 酶切位点,并与 α -Factor 阅读框一致;在PUCm-

vgbNosAOX1 的 BamH I 前端有一 Hind III 位点。所以用 Hind III 和 SnaB I 将 2kb 的 vgbNosAOX1 插入到 PUCm-hLf 重组质粒,然后对该重组质粒 PUCm-vgbhLf 用 EcoR I 完全酶切、BamH I 部分酶切将 vgb + Nos + 5'AOX1 + α -Factor + hLf (3.2kb) 片段插入 EcoR I 和 BamH I 双酶切的 pPIC9K 中,获得酵母表达载体 pPIC9K-vgb hLf。

1.4 酵母的转化与初筛

按照 Invitrogen 公司毕赤酵母试剂盒操作手册制备酵母 GS115 感受态细胞,将 Sal I 线性化的重组质粒 pPIC9K-vgbhLf 通过电击转化转入感受态细胞。迅速涂布于 RDB 再生平板上,30℃ 培养直至转化子出现。用牙签挑取转化子同时点种于 MM 和 MD 固体培养基,并对 MM 平板用 PARAFILM 膜封口,30℃ 培养。4 d 后选取在 MD 上生长正常(表型为 His⁺ mut⁺),在 MM 上生长较快的转化子为初筛阳性克隆子进行培养和诱导表达筛选。

同时转化空载体 pPIC9K,并将筛选到的菌株作为本研究的对照。

1.5 初筛转化子的培养和诱导与 SDS-PAGE 筛选高分泌转化子

将初筛转化子接种于 1 mL BMGY 液体培养基,30℃ 250 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ = 2~6; 5 000 r/min 5 min 离心收集菌体,用 2.5 mL BMMY 液体培养基重悬后于 30℃, 250 r/min 摇床诱导培养 72 h,每 24 h 补充无水甲醇至 0.5% (v/v)。将菌液明显变成红色的转化子以 12 000 r/min 10 min 收集上清,直接进行 SDS-PAGE 电泳,直至筛出在 80kD 左右表达量最高的转化子。

1.6 酵母高分泌转化子的 PCR 鉴定

按照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册提取高分泌表达转化子基因组 DNA。用 VectorNTI 设计 vgb 和 hLf 基因鉴定引物,vgb 基因 PCR 产物约为 400bp, hLf 基因 PCR 产物为 2.2kb 左右。引物序列如下:

vgb 基因引物序列

Fp: ATGGGCCTTGATCAACAGACTATC; Rp: AAGCTTACTCAACAG CTTGAGC。

hLf 基因引物序列

Fp: CCAAGCTTCTGCAGGCTTGTCTTC CTCGTCCTGC;

Rp: TTACGAATTCGAGCTCGAGTTACT TCCTG。

反应条件: 94℃, 5 min; 94℃, 45 s; 58℃, 45 s; 72℃, 45 s; 30 个循环。

1.7 VHB 蛋白 SDS-PAGE 分析和活性检测

将转化子 48 h 诱导培养后 12 000 r/min, 5 min 收集菌体按照 Invitrogen 公司胞内蛋白检测方法提取酵母总蛋白进行 15% SDS-PAGE 电泳检测 VHB。采用差示光谱法检测 VHB 蛋白的活性(Dikshit, Webster, 1988)^[6]。

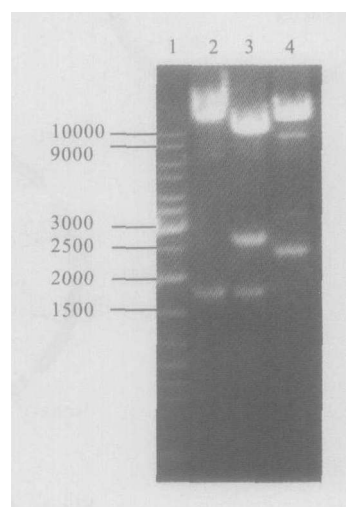
1.8 贫氧条件对菌体生长影响的研究

将对照和分泌型转化子各设一个正常组和贫氧组在 10 mL BMGY 三角瓶中 28℃ 培养 48 h, 然后 4 000 r/min, 5 min 离心收集菌体在 10 mL BMMY 三角瓶中诱导培养 48 h。正常组为 8 层纱布封口, 贫氧组为 PARAFILM 膜封口, 每间隔 12 h 取样测定 OD₆₀₀ 值。同时测定高分泌表达克隆子诱导培养后正常组和贫氧组上清液的 OD₂₈₀ 值, 从而确定 vgb 基因是否对菌体生长和蛋白表达有增强作用。

2 结果与分析

2.1 表达载体的鉴定

正确的表达载体用 BamH I 单切出现约 1.8 kb 和 11.8 kb 左右的条带; 用 BamH I 和 EcoR I 双酶切会出现约 1.8 kb、2.5 kb、9.3 kb 左右的条带; SnaB I 和 EcoR I 双酶切会出现约 11.3 kb 左右的条带和 2.3 kb 左右的 hLf 基因条带(图 2), 图 2 中出现的其余条带为酶切不彻底的质粒。



1. MBI marker; 2. pPIC9K-vgbhLf digested by BamH I;
3. pPIC9K-vgbhLf digested by BamH I + EcoR I;
4. pPIC9K-vgbhLf digested by EcoR I + SnaB I

图 2 pPIC9K-vgbhLf 鉴定

Fig. 2 Identification of pPIC9K-vgbhLf

2.2 高分泌转化子的筛选与PCR 检测

vgb 经诱导表达后可以在低氧条件下促进菌体的生长,所以我们挑取了 200 个在 MD 上生长正常而在 PARAFILM 膜封口 MM 上生长较快的克隆子经培养和诱导表达,共筛出 32 个菌体为红色的克隆子。然后对其上清液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳筛选,最后筛选出 8 号、14 号、16 号、31 号和 60 号 5 个高分泌转化子,其中 31 号为表达量最高。按照 1.6 方法提取对照(GS115/pPIC9K)和 31 号克隆子(GS115/pPIC9K-vgbhLf)基因组进行 PCR 检测。结果(图 3)表明 31 号克隆子在 2.3 kb 和 400 bp 左右均扩增出与目的基因大小相等的条带,而转 pPIC9K 的对照克隆子没有扩增出条带。表明 hLf 基因和 vgb 基因已整合入 31 号重组子基因组中,而且 31 号重组子摇瓶诱导的 hLf 表达产物经 SDS-PAGE 电泳光密度扫描其表达量达到 30 mg/L。

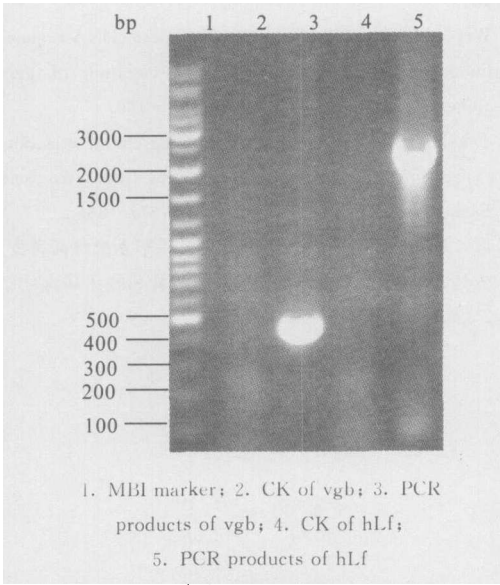


图 3 PCR 鉴定 GS115/pPIC9K-vgbhLf
Fig. 3 PCR identify GS115/pPIC9K-vgbhLf

2.3 VH_b 的检测

提取 31 号菌株和对照菌株的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明(图 4),对照(泳道 2)在 14kD 附近无带,而转 pPIC9K-vgbhLf 的 31 号菌株(泳道 3)有明显的带,说明 VH_b 蛋白在胞内已经表达。VH_b 蛋白与 CO 结合后在 420nm 光波处会出现强吸收峰,形成典型的 VH_b 特征曲线,而共存的干扰物质在这种条件下不发生光吸收性质的改变,依据此原理所得的对照和 31 号菌株差示光谱图(图 5),表明胞内表达的 VH_b 蛋白有活性。

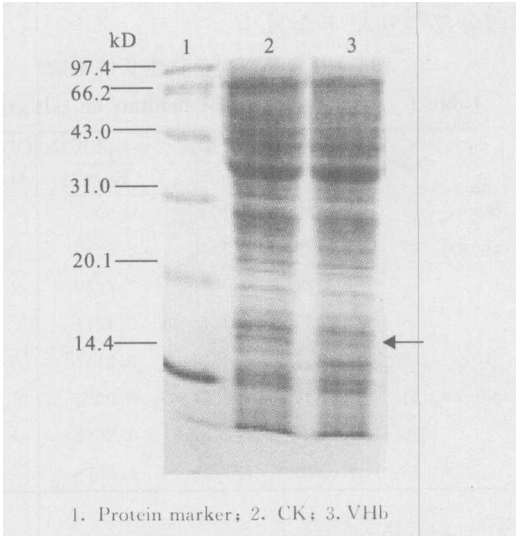


图 4 VH_b 蛋白电泳
Fig. 4 SDS-PAGE of VH_b

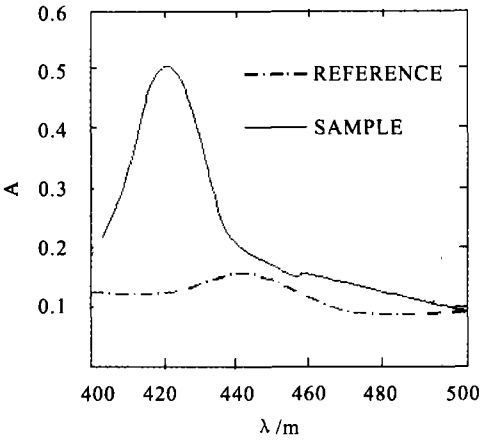


图 5 VH_b 活性检测结果
Fig. 5 Verification result of VH_b activity

2.4 贫氧条件对菌体生长影响的研究

在贫氧条件下 VH_b 的表达可以增加菌体生长量和外源蛋白的表达量^[2,1]。按照 1.11 方法培养和诱导后菌液稀释 5 倍后测定 OD₆₀₀ 值(表 1),在正常和贫氧条件下转 pPIC9K 的对照和转 pPIC9K-vgbhLf 的 31 号菌株诱导前的菌体密度基本一致,说明在 vgb 基因不表达的情况下两种菌株的生长不存在差别;而在诱导后正常条件下 31 号菌株的菌体密度略高于转 pPIC9K 的菌体密度,在贫氧条件下前者的菌体密度显著高于后者,说明 vgb 基因的表达有助于菌体的生长。同时测定 31 号菌株在正常条件和贫氧条件下诱导表达上清液的总蛋白量(稀释 10 倍后 OD₂₈₀ 的值),正常条件下 OD₂₈₀ = 2.6983,贫氧条件下 OD₂₈₀ = 2.6953。表明在两种条件下总蛋白分泌表达量基本一致,即转 vgb 基因的克隆子在贫氧条件下蛋

白分泌表达量不会减少。

表 1 贫氧条件对菌体生长的影响

Table 1 Effects of hypoxic habitats on cell growth

	Time	pPIC9K-vgbHLf(OD ₆₀₀)		pPIC9K(OD ₆₀₀)	
		Normal	Hypoxic	Normal	Hypoxic
Before	12	0.1620	0.1097	0.0965	0.0924
induced	24	2.7223	2.2386	2.5259	2.1321
	36	3.3079	3.0071	3.3239	2.9130
	48	3.1769	3.2115	3.4211	3.1940
After	12	3.5254	3.4204	3.5152	3.2935
induced	24	3.9954	3.8204	3.9952	3.1201
	36	4.3392	4.3002	4.2842	3.6435
	48	4.6204	4.5922	4.6049	3.9365

3 讨论

本研究结果表明对表达载体 pPIC9K 的改造是成功的;该表达载体同时在胞内胞外表达两种蛋白,胞内表达的蛋白促进胞外目的蛋白的分泌表达;一次转化即可以实现表达两种蛋白,简化了分子操作;采用对 MM 培养基封口方法和诱导后菌体表现为红色的特征,从表观上可以直接进行转化子的初筛和高分泌转化子的复筛,从而减轻了筛选工作量,扩大了筛选克隆子的数量,提高筛选效率;在正常条件下人乳铁蛋白摇瓶表达量为 30 mg/L,明显高于应革等^[7]报道的摇瓶表达量;分泌表达的总蛋白在正常条件和贫氧条件下表达量基本一致等优点均说明该表达载体具有很好的

研究价值。此外该表达载体也可以通过直接替换目的基因和转化后高效筛选的方法实现对基因功能的快速鉴定,以及用于开发研究多种蛋白的高密度发酵表达系统。

参考文献:

- [1] 唐元家,余柏松.巴斯德毕赤酵母表达系统[J].国外医药抗生素分册,2002,23(6):246~251.
- [2] Wang Q L, Zhang R, Ni W C, *et al.* Expression of Vitreoscilla Hemoglobin and Nitrilase in the Yeast *Pichia Pastoris* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(5):730~735.
- [3] Yu H M, Sheng Z Y. Progress in research of Vitreoscilla hemoglobin and Vitreoscilla hemoglobin gene [J]. Acta micorbiol Sinica, 1999, 39(5):478~482.
- [4] Khosla C, Bailey JE. The Vitreoscilla hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide and genetic expression in *Escherichia coli* [J]. Mol Gen Genet, 1988, 21(4):158~161.
- [5] Wei X. Characterization of the complete cDNA sequence of human neutrophil lactoferrin and isolation of genomic clones [J]. Blood, 1988, 72(2):155~160.
- [6] Dikshit K I, Webster D A. Cloning characterization and expression of the bacterial globin gene from Vitreoscilla in *Escherichia coli* [J]. Gene, 1988, 70:377~386.
- [7] 应革,吴淑华,王静,等.重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达人乳铁蛋白的研究[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(2):181~185.