

别藻蓝蛋白基因在毕赤酵母(*Pichia pastoris*) 中的表达*

任育红^{1,2,3} 葛保胜¹ 金海珠² 唐志红² 郭承华²
杨 雨¹ 秦 松¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 烟台大学生物化学系 烟台 264005;
3. 中国科学院研究生院 北京 100039)

提要 采用亚克隆方法, 将别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)基因插入到毕赤酵母整合型表达载体 pPIC6 α A 中, 再用 *Sac* 线性化, 纯化后, 用氯化锂法转化毕赤酵母菌株 X-33, 筛选表达 APC 的重组子。PCR 和序列分析表明, APC 基因已整合到酵母染色体中。重组子经甲醇诱导, 用 Western blotting 在培养基上清液检测到 APC, 表明别藻蓝蛋白(APC)在毕赤酵母中可以表达。APC 由两种亚基组成, 分子量分别为 19kDa 和 21kDa。重组子经摇瓶培养 48h 表达量达 4.4mg/L。

关键词 别藻蓝蛋白, 毕赤酵母, 表达

中图分类号 Q786

酵母属于单细胞微生物, 保留了细菌的特点, 其营养要求简单, 生长快, 操作方便, 易于培养, 低成本、高密度发酵技术也非常成熟, 具有大规模生产基因工程产品的潜力。酵母是低等真核生物, 不产生有毒物质, 毒性比细菌小; 酵母具有真核生物的亚细胞结构, 可进行很多典型的高等真核生物的蛋白翻译后加工修饰, 如糖基化、脂酰化、磷酸化以及蛋白裂解、折叠、二硫键的形成等, 因而酵母表达系统是应用最为普遍的真核表达系统之一, 在短短的 20 年中已成功地表达了大量的酶及用于药物和疫苗的蛋白质。该系统以其独有的安全、廉价的优点, 最适合于医用药物蛋白, 尤其是疫苗用蛋白的表达, 最直接的例子就是目前世界范围内使用的人甲肝、乙肝基因工程亚单位疫苗, 主要是酵母表达系统表达的蛋白(瞿礼嘉等, 1998; 丁云菲等, 2003)。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是甲醇利用型酵母菌, 是

20 世纪 80—90 年代发展起来的极具潜力的酵母表达系统, 具有高效表达、高效分泌外源蛋白和可高密度发酵、表达产物适度糖基化、稳定表达 50 代以上等特点(Brierley *et al*, 1990; Clare *et al*, 1991; Duff *et al*, 1988; Siegei, 1989; 周则迅等, 2000), 用该系统成功地表达了几百种的酶和药用及疫苗用蛋白(Zhang *et al*, 2003; Chen *et al*, 1996; Cregg *et al*, 1993)。

别藻蓝蛋白主要位于蓝藻和红藻的藻胆体中, 是一种光合作用的捕光色素蛋白。本实验室(Qin *et al*, 1998)已从蓝藻中克隆了别藻蓝蛋白基因, 并将其转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 得到重组别藻蓝蛋白。该蛋白在 *E. coli* 中有较高的表达水平, 并具有抗肿瘤及免疫增强作用(赵方庆等, 2003; 唐志红等, 2004)。

作者将别藻蓝蛋白基因插入到毕赤酵母表达载体中, 并成功整合到染色体上, 实现了该蛋

* 国家 863 计划资助项目, 2001AA6204130 号; 中国科学院知识创新项目, KZCX3-SW-215 号。任育红, 博士, 副教授, E-mail: renyuhong@126.com

通讯作者, 秦 松, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2005-04-22, 收修改稿日期: 2005-08-12

白在毕赤酵母中的表达, 本文中报道有关结果。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母表达载体 pPIC6 α A、巴斯德毕赤酵母菌株 X-33、blasticidin 购自 Invitrogen 公司(San Diego, CA, USA)。E. coli DH5 α 和质粒 pMAL-p2/APC 由本实验室保存。所有的限制性内切酶及 T4 连接酶购自 New England Biolabs (Beverly, MA, USA)。蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司(Basingstoke, UK)。酵母氮源购自 Difco 公司(Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)。碱性磷酸酶和 Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。寡核苷酸引物由上海生物工程有限公司合成。生物素购自 Sigma 公司(Steinheim, Germany)。兔抗别藻蓝蛋白多克隆抗体由本实验室制备(奥斯伯等, 2001)。

1.2 毕赤酵母表达质粒的构建及转化

质粒 pMAL-p2/APC 用 *EcoR* 酶切、纯化得到含 APC 基因的片段, 与经 *EcoR* 酶切的载体 pPIC6 α A(碱性磷酸酶去磷酸化)连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 用含 50 μ g/ml Blasticidin 的 LB 平板(1%蛋白胨、0.5%酵母膏、1%氯化钠、1%琼脂)筛选转化子, 提取转化子质粒, 用 *EcoR* 酶切筛选获得重组质粒 pPIC6 α A/APC。用 5' AOX1 引物(5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3')和 3' AOX1 引物(5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3')扩增重组质粒并测序以确定重组质粒中 APC 基因的插入方向。PCR 反应体系包括: 0.2 μ l Taq DNA 聚合酶, 2.5 μ l 10 \times 缓冲液, 3.0 μ l MgCl₂, 5 μ l dNTP, 1 μ l 5' AOX1 引物, 1 μ l 3' AOX1 引物, 1 μ l 模板 DNA(重组质粒 pPIC6 α /APC), 用超纯水调至终体积 25 μ l。反应条件为 94 变性 4min, 接 35 个循环的 94 变性 1min, 55 退火 1min, 72 延伸 2min, 最后在 72 延伸 10min。PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 回收并由上海博亚公司测定序列。

用 *Sac* 消化重组质粒使其线性化, 纯化后, 用氯化锂法转化毕赤酵母菌株 X-33, 用含 300—700 μ g/ml Blasticidin 的 YPD 平板(2%蛋白胨, 1%酵母膏, 2%葡萄糖, 1%琼脂)筛选转化子, 提取抗 Blasticidin 的 X-33 菌株的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增以证明 APC 基因是否整合到酵母染色体中。PCR 反应体系和反应条件同上, 所用引物包括: APC 的 5'端引物 APP1(5'-CTG GAT CCT TAA TGA GTA TCG-3'), APC 的(亚基的 3'

端引物)APP2 (5'-ACG CTG CAG AAA GAC TGA AT-3')和 3'AOX1 引物(5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3')。

1.3 APC 的诱导表达和鉴定

将转化子接种于 100ml BMGY 培养基(1%酵母粉, 2%蛋白胨, 100mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.0, 1.34% YNB, 1.61 μ mol/L 生物素, 1%甘油)中, 30 振荡培养至 OD₆₀₀ = 5—7。5000r/min 离心菌液 5min, 去上清。用 20ml BMMY 培养基(除用 0.5%甲醇代替 1%甘油外, 其他成分同 BMGY 培养基)悬浮菌体, 30 振荡培养 5 天, 每天取样用于 ELISA 方法测定 APC 含量(奥斯伯等, 2001), 在剩余的培养基中加入甲醇至终浓度为 0.5%。用 Western blot 方法鉴定 APC(Sambrook *et al.*, 1989)。O-型和 N-型糖基化位点数分别用 Yin-yang 法和 Gupta 法预测(Blom *et al.*, 1999)。

2 结果

2.1 毕赤酵母表达质粒的构建及转化

质粒 pMAL-p2/APC 经 *EcoR* 酶切得到含 APC 基因的片段, 与经 *EcoR* 酶切的载体 pPIC6 α A 连接得到毕赤酵母表达质粒 pPIC6 α A/APC, 经转化和筛选得到转化子。提取质粒, 用 *EcoR* 酶切得到 1.1kb 的 DNA 片段(图 1), 大小与 APC 基因一致。以 pPIC6 α A/APC 为模板, 用 5' AOX1 和 3' AOX1 引物进行 PCR 扩增得到 1.6kb 的 DNA 片段(图 2), 其大小相当于 APC 基因、 α -factor 序列和 *aox* 的 3' 部分序列的总和, 序列分析结果表明 APC 基因正向插入且开放阅读框正确。

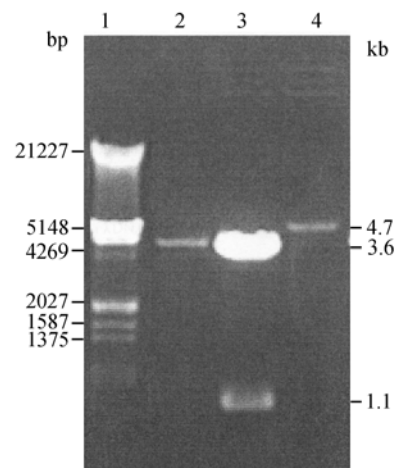


图 1 重组质粒 pPIC6 α A/APC 的酶切鉴定
Fig.1 Identification of pPIC6 α A/APC by endonuclease digestion
1: λ DNA *Hind* + *EcoR* 双酶切 marker; 2: 经 *EcoR* 酶切的 pPIC6 α A; 3: 经 *EcoR* 酶切的 pPIC6 α A/APC; 4: 经 *Sac* 酶切的 pPIC6 α A/APC

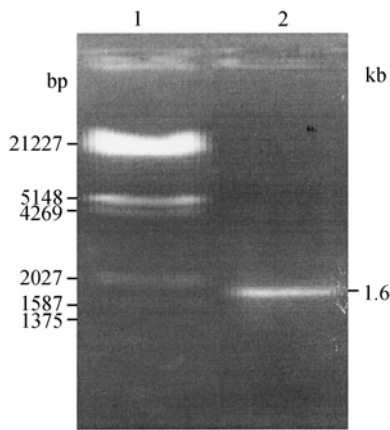


图2 pPIC6 α A/APC的PCR扩增产物的1%琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 1% agarose gel electrophoresis analysis of the product of pPIC6 α A/APC amplified by PCR
1: λ DNA *Hind* + *EcoR* 双酶切 marker; 2: pPIC6 α A/APC的PCR扩增产物

用 *Sac* 消化的重组质粒转化毕赤酵母菌株 X-33 后, 筛选得到转化子, 提取其基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 用 APP1 引物和 APP2 引物扩增得 0.5kb 的 DNA 片段(图 3), 其大小与 APC 的 α 亚基基因大小一致, 用 APP1 和 3' *AOX1* 引物扩增得 1.3kb 的 DNA 片段(图 3), 其大小与 *apc* 大小一致, 后者经纯化和序列测定结果显示 *apc* 已完全整合到酵母基因组中, *apc* 由 996bp 构成, 其中 α 亚基基因含有 510bp, β 亚基基因含有 486bp, 两个亚基基因的 G+C% 分别为 56.4% 和 56.1%。

由 APC 的核苷酸序列推出 APC 由 330 个氨基酸组成, 经预测含有 5 个 O 型糖基化位点, 2 个

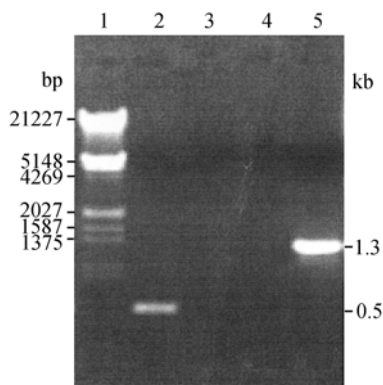


图3 毕赤酵母工程菌基因组 DNA 的 PCR 分析

Fig.3 PCR assay of recombinant yeast genomic DNA
1: λ DNA *Hind* + *EcoR* 双酶切 marker; 2、5: 分别用 APP1 和 APP2 引物以及 APP1 和 3' *AOX1* 引物对转化子基因组 DNA 进行 PCR 扩增的产物; 3、4: 分别用 APP1 和 APP2 引物以及 APP1 和 3' *AOX1* 引物对 X-33 基因组 DNA 进行 PCR 扩增的产物

位于 α 亚基, 3 个位于 β 亚基; 有 1 个 N 型糖基化位点位于 β 亚基。

2.2 APC 的表达与鉴定

用 ELISA 方法检测 APC 在 BMMY 培养基中的表达情况(图 4), 结果显示 APC 的表达水平在 48h 时达到 4.4mg/L, 用 Western blot 分析毕赤酵母的培养基上清(图 5), 结果表明 APC 是由两种亚基构成, 分子量分别为 19kDa 和 21kDa。

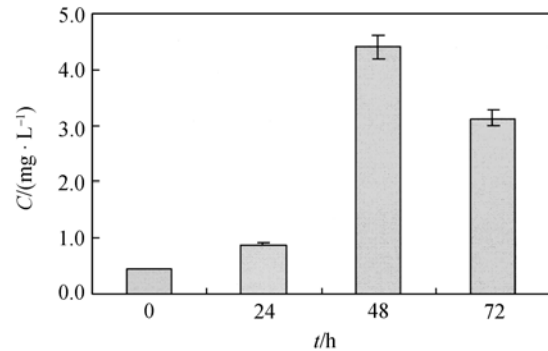


图4 APC 在毕赤酵母中的表达量

Fig.4 Expression level of APC in *P. pastoris*

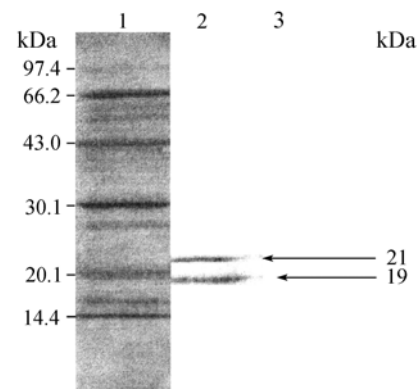


图5 APC 的 Western blotting 分析

Fig.5 The Western blotting analysis of APC

1. Marker; 2. 转化子的培养上清; 3. X-33 菌的培养上清

3 讨论

本实验室用 *E. coli* 表达 APC, 经过培养条件的优化后, 经摇瓶培养 APC 的产率为 0.35g/L, 采用 5L 自动发酵罐用 DO-stat 补料流加方式发酵 16h 后, 每升发酵液中 APC 含量可达 3.52g(赵方庆等, 2003; 唐志红等, 2004)。在本实验中用毕赤酵母表达 APC 的表达量为 4.4mg/L, 远低于 *E. coli* 的表达量。影响毕赤酵母表达的因素很多, 包括外源基因自身的影响, 外源基因拷贝数, 表达产物的稳定性, 发酵条件等。外源基因的密码子主要在翻译水平上影响基因的表达。尽管各种生物使用的密码子都大同小异, 但巴斯德毕赤酵母

也有特殊的密码子偏好趋向。如果外源基因中含有稀有密码子,则在翻译过程中会产生瓶颈效应而影响表达。赵翔等(2000)分析了毕赤酵母的优势密码子,发现与酿酒酵母基本一致。各种外源蛋白在毕赤酵母表达系统中的不同表达水平与外源基因的密码子有一定关系。在酵母中表达量较高的基因往往采用的是酵母所偏爱的密码子。在所有的 61 个密码子中有 19 个是毕赤酵母所偏爱的(赵翔等, 2000), 高表达的基因几乎毫无例外地使用这 19 个偏爱密码子。*apc* 共由 332 个密码子构成, 其中包含 40 个毕赤酵母偏爱密码子, 毕赤酵母偏爱密码子的使用率为 12%, 偏爱密码子的使用率低, 可能是造成表达量较低的主要原因。外源蛋白自身的理化特点也影响其表达和分泌。由于蛋白质在内质网和高尔基体中被加工修饰后的去向由蛋白质自身特点决定, 一般不分泌的蛋白很难使其分泌。因此外源蛋白的空间构象、糖基化位点、水溶特性、氨基酸组成和其他的理化特点以及蛋白酶的水解特点都影响毕赤酵母对其分泌。

参 考 文 献

- 丁云菲, 刘 勇, 戴长柏, 2003. 巴斯德毕赤酵母研究进展. 生命科学, 15(1): 26—30
- 周则迅, 袁汉英, 何 炜, 2000. 乙肝病毒表面抗原 SA-28 融合基因在酵母中的组成型表达. 复旦学报(自然科学版), 39(3): 264—268
- 赵 翔, 霍克克, 李育阳, 2000. 毕赤酵母的密码子用法分析. 生物工程学报, 16(3): 308—311
- 赵方庆, 唐志红, 林 凡等, 2003. 表达 rAPC 大肠杆菌的高密度发酵及纯化产物的抑瘤活性. 高技术通讯, 2: 29—32
- 唐志红, 秦 松, 吴少杰等, 2004. 镭普克的制备及对小鼠 H₂₂ 肝癌的抑制作用. 高技术通讯, 3: 83—86
- 瞿礼嘉, 顾红雅, 胡 苹等, 1998. 现代生物技术导论. 第一版. 北京: 高等教育出版社, 217—227
- 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 等著, 颜子颖, 王海林译, 2001. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 414—417, 432—435
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S, 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. Journal of Molecular Biology, 294(5): 1351—1362
- Brierley R A, Bussineau C, Kossan R *et al*, 1990. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: Bovine lysozyme. Ann New York Acad Sci, 589: 350—362
- Chen Y, Krol J, Cino J *et al*, 1996. Continuous production of thrombomodulin from a *Pichia pastoris* fermentation. J Chem Tech Biotechnol, 67: 143—148
- Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P *et al*, 1991. High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene. Bio/Technology, 9: 455—460
- Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C, 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technology, 11: 905—910
- Duff S J B, Murray W D, 1988. Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biotechnology and Bioengineering, 31: 44—49
- Qin S, Kojima H, Kawata Y *et al*, 1998. Cloning and sequencing of allophycocyanin (*apc*) genes from *Spirulina maxima* (Cyanophyta). Chin J Oceanol Limnol, 16(Suppl): 6—11
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*, 1989. Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19—22, 55—56, 888—897
- Siegei R S, 1989. Methylotrophic yeast *Pichia pasteur* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. Biotechnology and Bioengineering, 34: 403—404
- Zhang Linghua, Wang Jing, Yoshiyuki Ohta *et al*, 2003. Expression of the inulinase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. Process Biochemistry, 38(8): 1209—1212

EXPRESSION OF ALLOPHYCOCYANIN GENE IN *PICHTIA PASTORIS*

REN Yu-Hong^{1,2,3}, GE Bao-Sheng¹, JIN Hai-Zhu², TANG Zhi-Hong², GUO Cheng-Hua²,
YANG Yu¹, QIN Song¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, 264005; 3. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

Abstract Allophycocyanin is a photosynthetic light-harvesting pigment-protein complex located in the phycobilisomes of cyanobacteria and red algae. The allophycocyanin gene was transferred into *Escherichia coli* in our laboratory. The recombinant APC has high expression levels and anticancer and immunity-enhancing effects. The methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* has proved to be an outstanding host for high-level production of both secreted and intracellular proteins. The present study is to construct allophycocyanin expression vectors of *P. pastoris* and express new recombinant APC in order to screen stronger antitumor protein. A DNA fragment coding APC was obtained from plasmid pMAL-p2/APC digested by *EcoR* I and cloned into the *EcoR* I site of the vector pPIC6 α A. The constructed expression plasmid pPIC6 α A/APC digested by *EcoR* I was analyzed with agarose gel electrophoresis and PCR. The result showed that the correct Open Reading Frame of APC was obtained. The constructed expression plasmid was digested by *Sac* I. The linearized DNA was transformed into *P. pastoris* strain X-33 by Lithium Chloride. The transformants were selected on YPD plates containing the appropriate concentration of blasticidin. The genomic DNA isolated from the recombinant X-33 strain was used for PCR. The PCR product was detected on 1% agarose electrophoresis gel. Two bands at 0.5kb (using primer APP1 and APP2) and 1.3kb (using primer APP1 and primer 3' *AOXI*) in size were shown, which correspond to the size of alpha subunit of APC and APC respectively. Bigger fragments were purified and sequenced. The result showed the intact nucleotide sequence of APC had integrated into the yeast genome. The nucleotide sequence of APC gene consisted of 996bp including 510bp of the alpha subunit and 486bp of beta subunit. The content of G+C is 56.4% for α subunit and 56.1% for β subunit. APC consisted of 330 amino acids. The expression of rAPC in BMMY medium was determined by ELISA method. The highest expression yield of rAPC in the BMMY medium was 4.4mg/L at 48h. The Western blot analysis of the cultured supernatant of the yeast indicated that the recombinant allophycocyanin was expressed. APC consisted of two kinds of subunits with the molecular weight of 21kDa and 19kDa respectively.

Key words Allophycocyanin, *Pichia pastoris*, Expression