

山蛭素 Hs 基因在甲醇毕赤酵母中表达

谭恩光, 梁迎健

(中山医科大学生物化学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】山蛭素基因在甲醇毕赤酵母中表达。【方法】利用 PCR 点突变方法改造山蛭素基因, 将山蛭素基因克隆到 pGEM-T easy 载体中。对重组质粒测序, 构建了毕赤酵母表达载体 pPICZB-Hs, 然后转化有活性的 GS115 酵母菌株, 筛选表达酵母菌株 GS115, 摇瓶发酵。【结果】改造的山蛭素基因在重组酵母中表达, 重组蛋白质具有对凝血酶抑制活性。【结论】利用 PCR 点突变方法能改造山蛭素基因, 并能在毕赤酵母中表达。

关键词: 山蛭素; 基因扩增; 序列分析; 基因表达; 点突变

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)01-0021-03

Expression of Haemadin Hs Gene in Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris* TAN En-guang, LIANG Ying-jian.
(Department of Biology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To study the expression of Hs gene in methylophilic yeast *pichia pastoris*. 【Methods】Haemadin gene (from *Haemadipsa sylvestris*, Hs gene) was modified with PCR site-directed mutagenesis methods. Hs gene was cloned into pGEM-T easy vector. The recombinant plasmid was sequenced. The expression vector pPICZB-Hs was constructed. Competent GS115 yeast strain was transformed by chemical transformation method based on the use of PEG. The expression GS115 yeast strain was selected. Flask fermentation of recombinant yeast was carried out. 【Results】Hs gene was successfully modified. Modified Hs gene was expressed in recombinant yeast. The recombinant protein had thrombin inhibitory activity. 【Conclusion】Hs gene can be modified with PCR site-directed mutagenesis methods and can express in yeast *pichia pastoris*.

Key words: haemadin; gene amplification; sequencing analysis; gene expression; point mutation

蛭素是目前最强的抗血栓天然活性物质, 在医学上有重要应用价值。对于水蛭素及其基因研究较多^[1~3]。随着水蛭素研究的深入, 人们把注意力集中到研究以哺乳动物为主要吸血对象的山蛭。1993年 Burkhard 从印度山蛭 *Haemadipsa sylvestris* 分离出山蛭素, 并确定了山蛭素也是凝血酶特异性抑制剂, 测定了它的 N'端 45 个氨基酸序列。通过 cDNA 序列分析, 山蛭素是由 57 个氨基酸组成的单链多肽, 相对分子质量为 5 000, 并构建 cDNA 文库, 用 RACE-PCR 法从 cDNA 文库中扩增出山蛭素 cDNA 片段, 把山蛭素基因克隆入 pMAL 载体在大肠杆菌中表达^[4]。我国对山蛭素研究虽较早, 1988 年杨光敏等^[5]从盐源山蛭 (*Haemadipsa yanyuanensis*) 通过乙醇丙酮初步分离出有抗凝活性的物质。1998 年赵荣乐等^[6]从盐源山蛭通过肝素琼脂糖、亲和层析和超速离心分离出抗凝血蛋白, 并证明是凝血酶特异性抑制剂, 但并没有测定其氨基酸序列、克隆和表达。国内外山蛭素基因仍停留在原核生物表达。由于真核生物毕赤酵母具有高表达、高稳定、高分泌的优点^[7,8]。

本研究通过 PCR 点突变技术改造山蛭素基因, 在毕赤酵母中表达获得有抗凝活性的表达产物, 为进一步高效表达提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 pBSKS-Hs; Amp^r, 带有 Hs 基因, 由德国 Burkhard Kroger 博士惠赠。E. coli DH5 α ; 质粒受体菌, 中国热带作物生物技术国家重点实验室保存。E. coli Top10F'; 质粒受体菌, 从 Invitrogen 公司购买。PGEM-T easy Vector 购自 Promega 公司。pPICZB 购自 Invitrogen 公司。毕赤酵母 GS115 (his4) 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶、生化试剂 主要购自上海生物工程公司及 Promega, Sigma, Biolab 等生化公司。

1.2 DNA 的制备与纯化

质粒 DNA 小量和大量制备和纯化, 按文献[9]进行。

1.3 蛭素基因 Hs 的改造

为了使 Hs 基因在毕赤酵母中进行高效表达,

收稿日期: 2001-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3880068; 39160017)

作者简介: 谭恩光(1936-), 男, 广东阳江人, 教授。

故要将 Hs 基因进行改造:①在起始密码子 ATG 之前增加 1 个 *Pml* I 酶切位点,终止密码子 TAA 之后增设 *Kpn* I 酶切位点,两端增加 GC 碱基。②在 ATG 之后,增设 1 个 Ala 密码子 GCG,在 *Pml* I 位点与 ATG 之间还增加 ACG 3 个碱基。③LYS 的酵母偏爱密码子 AAG 替换 AAA。根据 Hs 序列及要求设计如下一对引物:

Primer 1: 5' GC CAC GTG ACG ATG GCG TTC TCA ACA AAG ATG TT 3'; Primer 2: 5' GC GGT ACC TTA CTT TTC TTC TTC ATC 3'.

按如下参数设立 PCR 扩增 Hs 基因体系:

SddH₂O(灭菌双蒸水)35.5 μL, 10×反应缓冲液 5.0 μL, 4×dNTP 混合液(2.5 mmol/L)2.5 μL, 引物 1(10 μmol/L)2.0 μL, 引物 2(10 μmol/L)2.0 μL, DNA 模板(25 mg/L)2.0 μL, *Taq* DNA 多聚酶 1 μL(3 U), 总反应体积 50 μL。混匀上述溶液, 5 000×g 离心 30 s, 95 °C 变性 5 min, 随后按如下反应条件进行 35 次循环扩增: 94 °C 变性 60 s; 50 °C 复性 30 s; 72 °C 延伸 30 s。结束后于 72 °C 再延伸 10 min, 置于 20 °C 保存。取 5 点样于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查。PCR 产物纯化与回收按文献 [9] 进行。

1.4 Hs 基因的克隆和测序

感受态细胞 *E. coli* DH5α 的制备, 连接转化, 重组质粒 pT-Hs 的筛选和鉴定, 均按“分子克隆实验指南”进行。pT-Hs 基因测序在 ABI 377 DNA 自动测序仪进行。

1.5 Hs 基因的表达

1.5.1 Hs 基因表达的纯化及鉴定、重组 Hs 基因片段酶切回收、纯化、连接、转化及鉴定均按“分子克隆实验指南”进行。重组表达载体线性化参照 *Pichia Pastoris* Expression Kit 操作手册。pPICZB-Hs 线性化按下列参数进行: pPICZB-Hs 10.0 μL (30 μg), 10×缓冲液 10.0 μL, SddH₂O 78.0 μL, *Sac* I 2.0 μL, 总体积 100 μL。线性化表达载体的纯化, 回收按“分子克隆实验指南”进行。

1.5.2 感受态酵母 GS115 的制备 转化酵母 GS115, 重组子间接 PCR 扩增鉴定, 重组酵母 GS115 的表达, 重组酵母发酵产物的检测都参照 *Pichia Pastoris* Expression 手册进行。发酵上清液的预处理:①将发酵培养液放在 4 °C, 5 000 r/min($r = 12$ cm)10 min;②去细胞, 上清液调 pH 值为 7.5, 90 °C 水浴 15 min, 立即冰浴冷却;③以 8 000 r/

min, 4 °C 离心 15 min, 取上清液。-40 °C, 以真空干燥器浓缩, 将样品浓缩 10 倍。

1.5.3 发酵上清液的活性检测 在 3 个试管中各加入 0.2 mL pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液; 转化空酵母及重组酵母上清液, 分别作标准管对照管和试验管。各加入 5 mL/L 纤维蛋白原 5 mL 与凝血酶 0.05 mL(3.3 U)。加酶后立即记录底物由可溶性纤维蛋白原转化变为不溶的纤维蛋白所需的时间, 标准管控制在 12~14 s 内视为正常, 待测管转变时间大于 1 min 视为有抗凝血活性。

2 结果

2.1 改造的 Hs 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示(图 1), 只呈一条 0.24 kb 的特异带, 特异性很强, 初步证明改造成功。

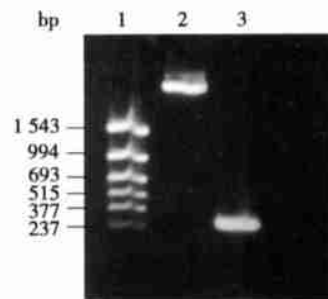


图 1 改造的 Hs 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR modified Hs gene

Lane 1: PCR marker; Lane 2: pBSKS-Hs; Lane 3: Result of PCR amplification on pBSKS-Hs

2.2 重组质粒 pT-Hs 鉴定

重组质粒 pT-Hs 双酶切和 PCR 扩增, 结果如图 2。第 2 条带从 pT-HS 中扩增的 PCR 产物约为 0.24 kb 特异性带; 第 4 条带 pT-HS 经 *Kpn* I + *Pml* I 双酶切的产物呈 2 条带, 其中一条为 0.24 kb 特异性带。这都与预期的 PCR 扩增产物大小一致, 表明改造后的 Hs 基因已克隆入 T 载体。

2.3 改造后的 Hs 基因测序结果

大量抽提 pT-Hs, 纯化后, 用 ABI 377 DNA 自动测序仪进行测序, Hs 基因 DNA 序列如下, 测序结果表明改造的 Hs 基因与设计要求一致, 证明 PCR 技术改造 Hs 基因成功(图 3)。

2.4 重组表达载体 pPICZB-Hs 的鉴定

用 *Kpn* I 和 *Pml* I 双酶切和 PCR 扩增鉴定, 按原设计要求, 重组表达质粒双酶切与 PCR 扩增

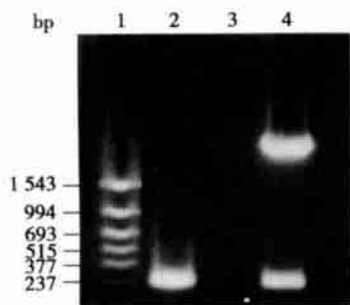


图 2 重组质粒 pT-HS 的 PCR 扩增和用 *Kpn* I + *Pml* I 酶切

Fig. 2 PCR amplification and digestion of r-plasmid with *Kpn* I + *Pml* I

Lane 1: PCR marker; Lane 2: Result of PCR; Lane 3: PCR control of plasmid-T; Lane 4: digestion of r-plasmid with *Kpn* I + *Pml* I

```

Pml I      Start Codon  Ala
          |             |
GC CAC.GTG ACG AIG GCG TTC TCA ACA AAG ATG TTT GTT GTT TTT GTT
GCA GTT TGC ATC TGC GTA ACT CAG TCT ATA AGA TTT GGA ATG GGC AAA
GTT CCA TGC CCA GAT GGC GAA GTG GGA TAC ACT TGC GAC TGT GGG
GAA AAG ATT TGT TTG TAT GGA CAA AGC TGC AAT GAT GGT CAA TGC TCA
GGT GAT CCT AAA CCA AGC AGT GAA TTC GAA GAA TTT GAA ATT GAT
GAA GAA GAA AAG TAA CCA TGG CG
          Kpn I
  
```

图 3 改造的 Hs 基因序列

Fig. 3 Sequence of modified Hs gene

时产生一条 0.24 kb 左右的条带, 表明重组表达载体构建成功。

2.5 表达载体 pPICZB-Hs 转化酵母 GS115

采用间接 PCR 扩增, 从转化酵母中扩增到约 0.24 kb 左右片段, 表明转化酵母成功。

2.6 发酵上清液 Hs 基因产物活性检测

标准管和对照管由纤维蛋白原转变为纤维蛋白质的所需时间小于 14 s, 试验管超过 1.5 min 未见明显转变, 显示出表达产物有抗凝活性。

3 讨论

与水蛭素基因比较, 山蛭基因研究较少, 目前为止山蛭素基因仍停留在原核生物大肠杆菌中表达。真核生物毕赤酵母是个优秀表达体系, 具有高表达、高稳定、高分泌的特点。本研究通过 PCR 点突变改造山蛭素基因, 使山蛭素基因适于在毕赤酵母中表达。结果表明, 改造的山蛭素基因在重组酵母中表达, 表达产物对凝血酶有抑制活性。本研究能获得预期结果, 关键因素之一是改造山蛭素基因, 只有改造山蛭素基因成功, 才能获得有活性基因表达产物。改造山蛭素基因是一个严谨过程, 通常在山蛭素基因序列两端要加入与克隆和插入表

达载体相关的酶切位点, 要调节一些密码子, 多一个或少一个密码子都可能影响改造山蛭素基因是否成功(有活性)。如终止密码之前 AAA 要改为 Lys 的酵母偏爱密码子的 AAG, 才能适合于该表达体系, 否则就可能提前终止转录, 就会少一个氨基, 使表达产物无生物活性。

水蛭素主要来自欧洲医蛭 (*Hirudo medicinalis*) 和东南亚的牛蛭, 两者均为水生蛭类, 但前者为水蛭属 (*Hirudo*), 后者为牛蛭属 (*Hirudinaria*), 二者同科不同属。而山蛭则是陆生蛭类, 属山蛭科 (*Haemadipsidae*) 山蛭属 (*Haemadipsa*), 山蛭与上述二种水蛭亲缘关系较远。山蛭主要以陆生野生哺乳动物为吸血对象, 其中包括人类。山蛭叮咬吸血凶狠, 叮咬过的伤口流血时间长^[10]。因此, 我们认为山蛭素在医学上更适用于抗人类血液凝固, 而且抗凝血力较强。山蛭素与水蛭素在氨基酸组成上没有明显的同源性, 水蛭素一般 65~66 个氨基酸组成的单链多肽, 相对分子质量为 7, 山蛭素为 57 氨基酸组成的单链多肽, 相对分子质量为 5, 可能是分类位置和生态习性不同所致。我们下一步就进行表达产物纯化及高效表达研究。

参考文献:

- [1] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of thrombin[J]. *Methods Enzymol*, 1970, 19: 924.
- [2] Dodt J, Muller H, Seemuler U. The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific[J]. *FEBS Lett*, 1984, 165(2): 180.
- [3] Scacheri E. Novel hirudin variants from the leech *hirudinaria manillensis*. amino acid sequence, cDNA cloning and genomic organization[J]. *Eur J Biochem*, 1993, 214(3): 295.
- [4] Stube K H, Kroger B, Bialojan S, et al. Isolation, sequence analysis and cloning of haemadin, an anticoagulant peptide from an Indian leech[J]. *Biochem*, 1993, 268(12): 8590.
- [5] 杨光敏, 王凤监, 罗雅, 等. 从山蛭中提取抗凝血物质试验初报[J]. *预防医学情报杂志*, 1988, (1): 30.
- [6] 赵荣乐, 程新, 周耘. 盐源山蛭抗凝血蛋白的分离及抗凝特性分析[J]. *北京师范大学学报*, 1998, 34(1): 115.
- [7] 周国理, 黄炯列, 姚其方, 等. 白蚊伊蚊溴氰菊酯抗药性株 CYP6 基因 cDNA 片断克隆与鉴定[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(1): 1.
- [8] 韦嘉, 杨林, 姚集鲁. 乙型肝炎病毒核心基因克隆及其重组体的构建[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(3): 199.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *分子克隆实验指南* [M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 456~490.
- [10] 谭恩光. 海南山蛭的生长、摄食和生殖[J]. *海南大学学报*, 1992, 10(1): 16.

(编辑 刘清海)