

人 GDNF 在甲醇酵母及家蚕幼虫中的表达

陈哲宇^{1,2} 黄爱军¹ 何 成¹ 路长林¹ 吴祥甫²

(第二军医大学神经生物学教研室 上海 200433)

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 将人胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因克隆入酵母分泌型表达载体 pPIC9K 中,酶切线性化后电穿孔导入酵母细胞进行整合,经 G418 筛选得到多拷贝转化子,甲醇诱导表达。将人 GDNF 基因克隆入昆虫病毒转移载体 pBacPAK8 中,与线性化 Bm-BacPAK6 修饰病毒基因组 DNA 共转染家蚕细胞,经体内重组,筛选到重组病毒。用重组病毒感染家蚕幼虫 5d 后收集血淋巴。SDS-PAGE 和蛋白质印迹杂交结果证实了酵母培养上清液及家蚕幼虫血淋巴中含有 GDNF 蛋白。活性研究表明,甲醇酵母及家蚕幼虫表达的 GDNF 蛋白能促进多巴胺能神经元的存活和突起生长。

关键词 胶质细胞源性神经营养因子,甲醇酵母,重组家蚕核型多角体病毒,基因表达,多巴胺能神经元

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)05-0561-05

胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)能特异性促进多巴胺能神经元存活^[1],同时又是一种运动神经元营养因子^[2],并且在多巴胺能神经元或运动神经元受到损伤后,能促进其修复和再生。近年来的研究表明,GDNF 极有希望用于帕金森氏病、脊髓侧索硬化症等神经系统退行性疾病的治疗^[3,4]。

天然的 GDNF 含量极低,给分离纯化带来相当的困难。因此,不少实验室致力于寻找一个合适的表达系统,从而表达出大量有活性的 GDNF 蛋白。我们已克隆了 GDNF 基因并在大肠杆菌得到高表达^[5]。但是,GDNF 在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在,需变复性后才具有生物活性。同时,大肠杆菌表达系统还存在内毒素污染等问题,因而影响了表达产物的临床应用。甲醇酵母(*Pichia pastoris*)及杆状病毒表达系统因其稳定、高效、表达量高、能正确完成蛋白质翻译后加工而成为理想的真核蛋白表达系统^[6,7]。本文介绍的工作就是将人 GDNF 基因在 *Pichia pastoris* 及家蚕幼虫中进行表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和质粒:大肠杆菌 TG1、家蚕

BmN 细胞、修饰的家蚕核型多角体病毒 Bm-Bac-PAK6 DNA、转移载体 pBacPAK8 为本实验室保存。pBSK-GDNF 质粒为本实验室构建并保存。GS115 酵母菌株和 pPIC9K 表达载体购自 Invitrogen。

1.1.2 酶与试剂:限制酶、T4 DNA 连接酶、G418、低熔点琼脂糖、Lipofectin 试剂、切口平移探针标记试剂盒、BCIP、NBT 为 Gibco BRL 公司产品。Taq DNA 聚合酶为生工公司产品。鸡抗人 GDNF 多抗、碱性磷酸酶耦联的羊抗鸡 IgG 及 GDNF ELISA 检测试剂盒为 Promega 公司产品。Hybond-N 膜及[α -³²P]-dCTP 购自 Amersham。X-gal 及 poly-L-lysine 购自 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基:MY(13.4g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素,20g/L 葡萄糖,15g/L 琼脂糖),MM(13.4g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素,5mL/L 甲醇,15g/L 琼脂糖),YPD(10g/L 酵母膏,20g/L 蛋白胨,20g/L 葡萄糖,15g/L 琼脂糖),BMGY(10g/L 酵母膏,20g/L 蛋白胨,0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0,13.4g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素,10g/L 甘油),BMMY(将 BMGY 中 10g/L 甘油替代为 5mL/L 甲醇),含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基及 B27 无血清培养基用于多巴胺能神经元培养,含 10% 胎牛血

清的 1×TC100 培养基用于 BmN 细胞培养。

1.2 方法

1.2.1 基因操作：质粒抽提、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应、细菌转化、SDS-PAGE、Western 印迹等技术均参照文献 [8] 略加修改进行。

1.2.2 酵母细胞的转化及阳性转化子的筛选：重组酵母表达载体经酶切线性化后，电穿孔法转化 GS115 酵母菌株，将已经电转化的 GS115 酵母菌涂布于 MD 平板上，30℃ 培养。将在 MD 培养基上生长的 GS115 酵母菌用涂布器刮下，再涂布 10⁵ 个细胞至含不同 G418 浓度（0.5mg/mL，1.0mg/mL，1.5mg/mL，2.0mg/mL，3.0mg/mL）的 YPD 平板上以筛选多拷贝阳性转化子。3~5d 后，挑取多个在 YPD 平板上生长良好的酵母菌落，影印到 MD 平板上，以排除假阳性。

1.2.3 昆虫细胞转染和重组病毒的筛选：共转染参照 Lipofectin 产品说明书进行。其中，线性化的家蚕核型多角体病毒 Bm-BacPAK6 DNA 500ng，重组转移载体 DNA 10μg，二者比例为 1:20。铺斑参照文献 [9] 进行。具体操作是共转染后的细胞于 27℃ 培养 1 周，收集共转染液分别做 1×10⁻³，1×10⁻⁴ 和 1×10⁻⁵ 稀释，感染正常 BmN 细胞 1h 后，铺上含 0.2g/L X-gal 的低熔点琼脂糖于 27℃ 培养。4d 后出现蓝色和白色空斑，挑取多个白斑于 96 孔板中 27℃ 培养 3d。裂解细胞，以 [α-³²P]-dCTP 标记的 GDNF cDNA 探针进行点杂交。阳性重组病毒再如上进行第二轮空斑筛选，以得到纯的重组病毒。扩增待用。

1.2.4 重组病毒的 Southern 杂交：参照文献 [8] 方法略加修改进行。提取重组病毒 DNA，分别用 BamHI、HindIII 及 BamHI、HindIII 双酶切后，在 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳分离酶切片段，将 DNA 印迹转移至尼龙膜上，紫外交联固定后，用 [α-³²P]-dCTP 标记的 GDNF cDNA 探针进行杂交，洗膜后压片进行放射自显影。

1.2.5 酵母菌的诱导表达：接种筛选到的酵母阳性转化子，在 BMGY 培养基中 30℃ 振荡培养 16~20h 至 A₆₀₀ 为 2~6，离心收集菌体，用 BMMY 培养基稀释至 A₆₀₀ 为 1 后诱导表达，每隔 24h 补加甲醇至终浓度为 0.5%，3d 后，离心收集酵母培养上清。

1.2.6 GDNF 在家蚕幼虫中的表达：在 5 龄家蚕幼虫的节间膜皮下注射 10μL 重组病毒粒子（1×10⁷ pfu/mL），对照组注射等量的亲本病毒 Bm-BacPAK6。接种 5d 后，收集蚕的血淋巴，-20℃ 保存待

测。

1.2.7 表达产物的活性鉴定：利用 GDNF 能促进体外原代培养的多巴胺能神经元存活及分化进行生物活性测定。多巴胺能神经元原代培养参照文献 [10] 进行。取胎鼠中脑多巴胺能神经元做原代培养，调整细胞密度为 4×10⁵ 个/mL，接种于预先用多聚赖氨酸（poly-L-lysine，Sigma）包被好的 24 孔培养板，每孔的加入量为 0.5mL。培养板置 CO₂ 培养箱（含 5% CO₂），37℃ 培养。培养至第 2 天，更换为 B27 无血清培养基，同时实验组加入 10μL 的酵母阳性转化子表达上清或 5μL 蚕血淋巴，对照组加入等体积转有空载体 pPIC9K 的 GS115 表达上清或亲本病毒 Bm-BacPAK6 感染的家蚕幼虫血淋巴，每隔 3~4d 换液 1 次，保持同样条件继续培养至第 14 天，观察多巴胺能神经元的形态及数目，并按常规方法进行酪氨酸羟化酶（TH）的免疫细胞化学染色。

2 结果

2.1 GDNF 重组酵母表达载体及重组转移载体的构建

通过 PCR 方法在 GDNF 基因的 5' 端引入 SmaI 位点，在其 3' 端引入 NotI 位点，用 SmaI、NotI 双酶切后与先经 SnaBI、NotI 双酶切的 pPIC9K 连接，利用 SmaI 及 SnaBI 都产生平末端的特性构建重组酵母表达载体 pPIC9K-GDNF（图 1），目的基因前有 α-Factor 的信号肽顺序，测序证明其阅读框正确。

重组转移载体 pBacPAK-GDNF 如图 2 所示，经

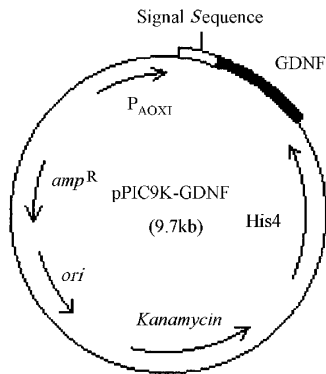


图 1 重组酵母表达载体 pPIC9K-GDNF 的结构图
Fig.1 Schematic representation of the pPIC9K-GDNF recombinant *Pichia* expression vector
The GDNF gene was ligated into pPIC9K *Pichia* expression vector utilizing *Sma*I and *Not*I sites

酶切、测序鉴定正确。

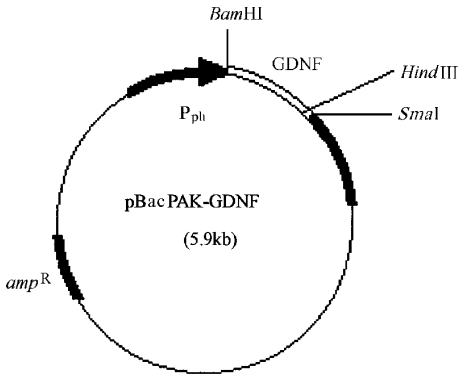


图 2 重组转移载体 pBacPAK-GDNF 的结构图

Fig.2 Schematic representation of the pBacPAK-GDNF recombinant transfer vector.

The GDNF gene was ligated into pBacPAK8 baculovirus transfer vector utilizing *Bam*HI and *Sma*I sites

2.2 多拷贝酵母重组转化子的筛选

*Sal*I 酶切线性化重组酵母表达载体 pPIC9K-GDNF 后,电转化酵母菌 GS115,含 AOX1-GDNF 和 HIS4 序列的片段通过同源重组插入整合至酵母基因组中的组氨酸脱氢酶(*HIS4*)基因。由于 pPIC9K 载体含有细菌 Kanamycin 基因,它能使酵母细胞对 G418 产生抗性,对 G418 抗性的程度大致取决于 Kanamycin 基因整合的数目。因此,我们可以通过不同浓度的 G418 筛选来获得多拷贝的转化子。本实验中我们在含 2mg/mL G418 的 YPD 平板上筛选到两个多拷贝(3~5 拷贝)转化子。提取此两酵母克隆的基因组 DNA 为模板,以 5'AOX1 引物及 3'AOX1 引物进行 PCR 扩增均能扩增出 2.2kb (野生型 AOX1 基因)及 900bp(400bpGDNF 基因加 492bp AOX1 旁侧序列)两条条带,证明 GDNF 基因已整合入重组酵母转化子的基因组中(参见 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit Manual, Invitrogen)。将这两个重组转化子分别接种到 MM 及 MD 平板上进行表型鉴定,皆为甲醇利用正常型(*Mut*⁺)。

2.3 重组家蚕核型多角体病毒的筛选和鉴定

重组转移载体 pBacPAK-GDNF 与经酶切线性化的 Bm-BacPAK6 DNA 共转染 BmN 细胞,铺斑筛选。第一轮铺斑挑出 24 个白斑,经 GDNF 斑点杂交筛选,选其中阳性斑进行第二轮纯化,得到纯化的单一重组病毒 BmNPV-GDNF。重组病毒 BmNPV-GDNF 经 Southern blot 鉴定证明 GDNF 基因的确已整合入 BmNPV 病毒基因组中(图 3)。

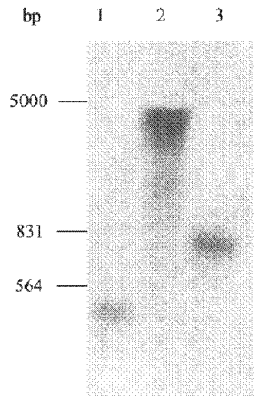


图 3 重组家蚕核型多角体病毒 BmNPV-GDNF 以 GDNF 为探针进行的 Southern 杂交图谱

Fig.3 Recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus BmNPV-GDNF southern blot hybridization with GDNF as the probe

1. *Bam*HI/*Hind*III 2. *Hind*III 3. *Bam*HI

2.4 GDNF 在酵母中的表达

选取重组转化酵母菌及转有空质粒 pPIC9K 的对照菌株分别在摇瓶中进行甲醇诱导表达,4d 后,离心收集培养上清。样品经 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,可以看到在 16kD 处有一表达条带(图 4),大小与根据氨基酸残基推算出的 GDNF 理论分子量一致。蛋白质印迹杂交结果在 16kD 处有明显杂交条带而对照组杂交呈阴性,说明酵母细胞表达产物能与鸡抗人 GDNF 抗体结合。用 Promega 公司的 GDNF ELISA 检测试剂盒检测酵母细胞培养上清中 GDNF 的表达量为 10~12μg/mL。

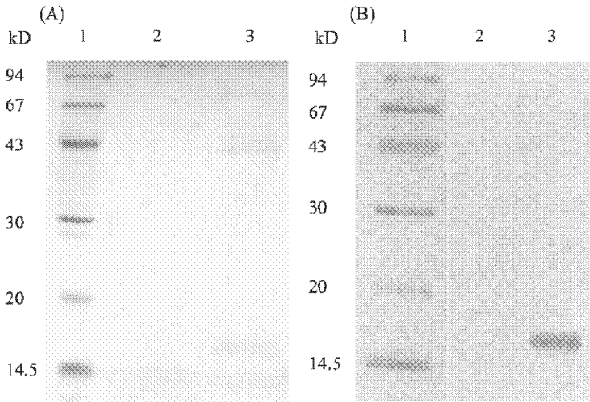


图 4 GDNF 在甲醇酵母中表达的 SDS-PAGE(A) 及 Western blot(B)分析

Fig.4 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of GDNF expressed in *Pichia pastoris*

1. Protein molecular weight marker 2. Proteins expressed in *Pichia pastoris* transformed with pPIC9K 3. Proteins expressed in *Pichia pastoris* transformed with pPIC9K-GDNF

2.5 GDNF 在家蚕幼虫中的表达

取感染重组病毒 BmNPV-GDNF 5d 的家蚕血淋巴进行 SDS-PAGE 分析,发现与对照组相比,感染 BmNPV-GDNF 病毒的家蚕血淋巴有一条 18kD 及一条 19kD 的表达条带,比 GDNF 根据氨基酸残基推算出的理论分子量 16kD 大(图 5),Western blot 分析此两条带均能与抗人 GDNF 抗体发生免疫反应。

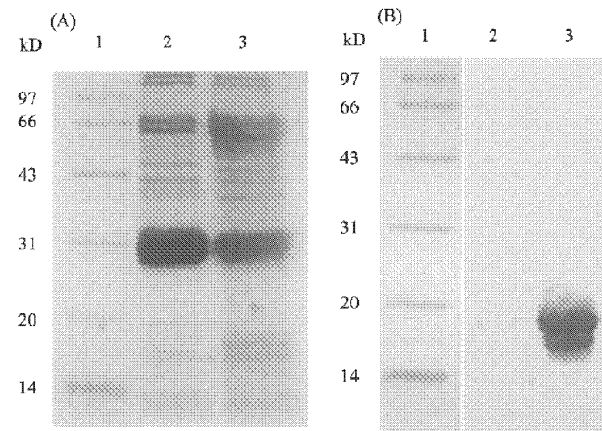


图 5 GDNF 在家蚕幼虫中表达的 SDS-PAGE(A) 及 Western blot(B) 分析

Fig.5 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of GDNF expressed in hemolymph of Silkworm larvae

1. Protein molecular weight marker ;

2. Hemolymph infected with BmNPV-PAK6 ;

3. Hemolymph infected with BmNPV-GDNF

2.6 表达产物的活性鉴定

表达产物用原代培养的多巴胺能神经元测活。取胎鼠中脑多巴胺能神经元做原代培养,在培养第 2 天换用(含 2% B27 的)无血清培养基以抑制神经胶质细胞的生长及排除血清成分对神经元生长的影响。体外培养的多巴胺能神经元在培养的 5~10d 要经历一个自然死亡的过程。在培养的第 14 天镜下观察多巴胺能神经元,并进行 TH 免疫细胞化学染色。发现对照组中多数神经元已萎缩、死亡,存活的多巴胺能神经元胞体较小,突起细短。而加表达 GDNF 的酵母培养上清及感染重组病毒 BmNPV-GDNF 的家蚕幼虫血淋巴的实验组中存活的多巴胺能神经元数目较多,神经元胞体粗壮,突起较长,未出现核偏位、核萎缩等神经元衰老死亡迹象(图 6)。说明酵母细胞及家蚕幼虫表达的 GDNF 蛋白能促进多巴胺能神经元的存活及突起生长。

3 讨论

GDNF 因其对神经元较强的保护作用及有可能

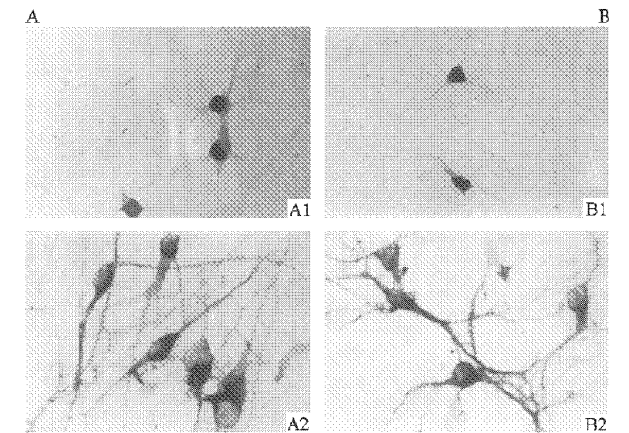


图 6 甲醇酵母(A)及家蚕幼虫(B)表达的 GDNF 对原代培养的多巴胺能神经元的作用

Fig.6 Effect of GDNF expressed in *Pichia pastoris*(A) and silkworm larvae(B) on the morphology of TH⁺ neurons.

Dissociated midbrain cultures were incubated for 14 days with *Pichia* culture medium or hemolymph of silkworm larvae and processed for TH immunocytochemistry (×120)

A₁ B₁ Control ; A₂ B₂ GDNF

应用于神经退行性疾病的治疗而日益受到人们的关注。不少实验室致力于寻找一个合适的表达系统大量生产 GDNF 蛋白。我们实验室也已开展了 GDNF 在大肠杆菌中的表达工作,但 GDNF 在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在,需变复性后才具有生物活性。于是我们尝试 GDNF 在甲醇酵母及杆状病毒这两种真核蛋白表达系统中的表达。

Pichia pastoris 表达系统为 80~90 年代发展起来的极具潜力的酵母表达系统,已成功地表达了数十种外源蛋白。GDNF 基因与分泌型表达载体 pPIC9K 重组,以 α -Factor 为信号肽,进行分泌表达,不需要破菌,有利于蛋白下游纯化。*Pichia pastoris* 可进行高密度发酵培养,而且利用甲醇就可以进行简单而精确的调控,成本低廉,有利于大量表达蛋白。

杆状病毒表达系统需要体内重组,而常规的空斑筛选法由于重组效率很低,因此筛选很困难。本文则采用酶切线性化病毒,由于只有发生了同源重组的重组病毒才会经补救复活而增殖,而且 lacZ 被取代,重组病毒噬斑由蓝色变为白色。所以,这种方法大大提高了重组病毒的筛选效率。由于杆状病毒表达系统能对其所表达的外源蛋白进行糖基化、乙酰化、磷酸化等蛋白质翻译后加工修饰^[7],GDNF 分子中又有两个糖基化位点,我们分析家蚕幼虫所

表达的 GDNF 蛋白分子量稍大于理论值且具有 18kD、19kD 两条条带是因为家蚕细胞对 GDNF 蛋白进行了糖基化修饰,并且这种糖基化修饰不均一所致。家蚕在我国已有几千年的饲养历史,在野外已丧失了独自生存的能力,以家蚕表达外源基因具有简单、便宜、安全的优点,被誉为生物工程基因产品的“微发酵罐”。但由于家蚕血淋巴中蛋白成分较复杂,增加了其所表达的 GDNF 蛋白下游纯化工

作的难度。

综上所述,我们成功实现了 GDNF 在甲醇酵母及家蚕幼虫中的表达。表达的 GDNF 蛋白具有较强的生物活性,能明显促进多巴胺能神经元的存活与分化,这为深入开展 GDNF 基础和临床研究打下了良好的基础。相比之下,*Pichia pastoris* 表达系统由于生产成本低廉、易于操作、蛋白下游纯化方便而更适合于 GDNF 蛋白的大量生产。

参 考 文 献

[1] Lin L-F H ,Doherty D H ,Lile J D *et al.* *Science* ,1993 **260** :1130~1132
[2] Henderson C E ,Phillips H S ,Pollock R A *et al.* *Science* ,1994 **266** :1062~1064
[3] Lapchak P A ,Miller P J ,Jiao S *et al.* *Neurodegeneration* ,1996 **5** :197~205
[4] LI L X ,WU W T ,Lin L-F H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1995 **92** :9771~9775
[5] 陈哲宇 ,路长林 ,吴祥甫等 . *生物化学与生物物理学报* ,1999 **31**(2) :207~210
[6] Clare J J ,Romanos M A ,Royment F B *et al.* *Gene* ,1991 **105** :205~212
[7] Donald J D ,Malcolm J F ,Francis J C . *Biochemistry* ,1990 **29** :5584~5590
[8] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T . *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* 2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
[9] Summers M D ,Smith G E . *A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedure* . Texas Agriculture Experiment Station ,Bulletin No. 1555 ,1987
[10] Henry H K ,Catherine M . *J Neurochem* ,1991 **57** :458~464

Expression of Human GDNF in Methyltrophic Yeast
Pichia pastoris and Silkworm Larvae

CHEN Zhe-Yu^{1 2} HUANG Ai-Jun¹ HE Cheng¹ LU Chang-Lin¹ WU Xiang-Fu²

¹(Department of Neurobiology ,The Second Military Medical University ,Shanghai 200433)

²(Shanghai Institute of Biochemistry ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031)

Abstract The cDNA encoding glial cell derived neurotrophic factor(GDNF) was cloned into the *Pichia* expression vector pPIC9K and then transformed into his4 mutant yeast GS115 by electroporation. Multicopy transformants were screened by various G418 concentrations and induced by methanol. The human GDNF gene was cloned into the baculovirus transfer vector pBacPAK8. The recombinant transfer vector pBacPAK-GDNF was coinfectd with linear Bm-Bac-PAK6 DNA into BmN cells. The recombinant virus was screened and plaque-purified. The silkworm larvae were infected with the recombinant virus and collected 5 days later. SDS-PAGE and Western blot confirmed that GDNF was expressed in *Pichia* culture medium and silkworm larvae hemolymph. The GDNF protein expressed in *Pichia* and silkworm larvae could significantly promote the survival and neurite outgrowth of dopaminergic neurons.

Key words Glial cell derived neurotrophic factor ,*Pichia pastoris* ,recombinant bombyx mori nuclear polyhedrosis virus , gene expression ,dopaminergic neuron