

大鼠前列腺素 D 合成酶在毕赤酵母中的表达 及其在精子中的分布

陈德宇^{1,3} 周开亚¹ 黄宇烽^{2*}

¹(南京师范大学生命科学院,南京 210097)

²(南京军区总医院生殖遗传实验室,南京 210002)

³(阜阳师范学院生物系,阜阳 230632)

摘 要 研究大鼠 L-PGDS 在毕氏酵母中的表达,探讨 L-PGDS 在大鼠精子中的分布。以大鼠睾丸 mRNA 为模板,经逆转录获得 L-PGDS 全长和成熟基因片段。将该基因片段克隆到 pPIC9 载体上,将重组表达质粒转化巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115,筛选 mut⁺ 表型,经甲醇诱导实现 L-PGDS 的分泌表达。用 SDS-PAGE 分析 L-PGDS 的分子量,用 PAS 反应鉴定糖链,用免疫组织化学法研究 L-PGDS 的分布,用 Western blot 分析重组 L-PGDS 与精浆中 L-PGDS。筛选出 4 株表达水平较高的酵母工程菌株,SDS-PAGE 分析表明,产物分子量约为 27kD;L-PGDS 主要分布在精子的头部以及尾部的上段。

关键词 前列腺素 D 合成酶, 毕赤酵母, 分布

中图分类号 Q501 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0896-05

前列腺素 D 合成酶 (Lipocalin-type prostaglandin D synthase, L-PGDS, EC5.3.99.2) 是一种双功能糖基化单体蛋白^[1], 它能转运一些亲脂性物质, 如视黄醛、类固醇等, 它还能催化 PGD₂ 的合成。PGD₂ 具有一系列的生理功能, 如调节睡眠周期、调节体温、促进脑垂体释放激素、感受伤害、阻止血小板凝集、抑制肌肉收缩/舒张、促进支气管收缩等^[2]。L-PGDS 分布在中枢神经系统、雄性生殖器官、人和猴的心脏中, 并分泌到脑脊液、精浆、血浆内^[3]。

大鼠 L-PGDS 的真核表达以及 L-PGDS 在精子表面的分布未见相关报道, 本研究以大鼠睾丸 mRNA 为模板, 经 RT-PCR 获得 L-PGDS 全长和成熟基因片段。将该基因片段克隆到 pPIC9 载体上, 将重组表达质粒转化巴斯德毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) GS115, 筛选 mut⁺ 表型, 经甲醇诱导实现 L-PGDS 的分泌表达。并用盐析和镍离子亲和层析对其纯化, 用 SDS-PAGE 分析 L-PGDS 的分子量, 用 PAS 反应鉴定糖链, 用免疫组织化学法研究 L-PGDS 在大鼠睾丸和附睾中的分布。以期 L-PGDS 的功能性研究提供研究工具。

1 材料与方 法

1.1 材 料

酵母菌株 GS115 由余龙教授惠赠, pIC9 为马百坤技师惠赠, 限制性内切酶 *Bgl* II、mRNA 提取试剂盒以及 RT-PCR 试剂盒均为 Promega 公司产品, 山梨醇、右旋糖、生物素、无氨基酸酵母氮源、Peptone、低分子量蛋白 marker 以及牛血清白蛋白均为北京欣经科生物技术公司产品。培养基 YPD、MD、MM、BMY、BMMY 均按“Invitrogen 公司操作手册”推荐方法配制。SABC 免疫组化试剂盒为博士德公司产品。

1.2 RT-PCR、基因克隆及序列分析

按 mRNA 试剂盒说明书提取大鼠睾丸 mRNA, 以 5'-GGAATTCCTCAGACACCTGCTCTACTCC-3' 和 5'-ATGCGGCCGAGTCCTGAGCCACATCAC-3' 为引物, 按照 RT-PCR 试剂盒使用说明扩增出 L-PGDS 的成熟片段, 割胶、纯化、酶切后连接到 pGEM-T 载体, 转化 DH5 α 蓝白斑筛选得到重组子, 酶切鉴定正确后进行序列测定 (由上海博亚生物技术有限公司完成)。

收稿日期: 2004-03-15, 修回日期: 2004-06-21。

基金项目: 南京军区总医院科研基金项目 (No. 2004078); 安徽省教育厅自然科学基金项目 (No. 2002kj236)。

* 通讯作者。 Tel: 86-25-4827110-58172; Fax: 86-25-4803061; E-mail: yfhuang@ntl-j-androl.com

1.3 重组质粒的构建及转化

将测序正确的 L-PGDS 基因克隆到 pIC9 载体上,然后用电转化法转化毕氏酵母 GS115,然后用菌落 PCR 和双酶切筛选阳性重组子,再利用重组子在 MM 和 MD 平板上生长状况比较,对其表型鉴定。

1.4 L-PGDS 的表达及纯化

接种阳性 L-PGDS 表达菌株于 10 mL BMGY 培养基中,30℃培养 36 h 至 $OD_{600} > 3.0$,按 1%接种于 1000 mL BMGY 培养基中。30℃培养 36 h 后,无菌条件下 5000 r/min 离心 10 min,去掉 BMGY 培养基,在菌体中加入 200 mL BMMY 培养基继续培养,每隔 24 h 加入 1 mL 甲醇,诱导 4d 后离心收集上清。取 200 mL 培养上清用硫酸铵盐析法沉淀浓缩上清,用 20 mL 的 PBS 缓冲液重悬沉淀,透析 24 h。再用镍离子亲和层析法按使用说明书纯化重组的 L-PGDS,得到 1 mL 纯化的重组 L-PGDS。用 Bradford 法^[4]测定纯化的 L-PGDS 的浓度。

1.5 SDS-PAGE 分析和 PAS 糖蛋白染色

取 10 μ L 用 PBS 稀释的浓度为 100 μ g/L 的 L-PGDS 点样,120V 做 SDS-PAGE 分析,考马斯蓝染色。SDS-PAGE 后的凝胶用乙酸/甲醇/水(10:35:55)固定 1 h,再置于 0.7% 过碘酸(用 5% 冰醋酸做溶剂)中 1 h,换双蒸水漂洗后,加入 50 mL 0.2% 偏亚硫酸钠(用 5% 冰醋酸做溶剂),浸泡 10 min 后更换 50 mL 0.2% 偏亚硫酸钠,再浸泡 10 min,待凝胶完全脱色。脱色后的凝胶置于希夫试剂中,直到出现红色条带;染色后,用脱色液脱去凝胶中的残留的希夫试剂。

1.6 兔抗大鼠 L-PGDS 多克隆抗体的制备与纯化

取 1.5 mL 重组 L-PGDS(100 μ g/L)与 1.5 mL 福氏完全佐剂混合研磨,在兔背部皮下注射 6~8 点,每点注射 0.2 mL,每隔 10 天加强免疫 1 次,共免疫 5 次。耳背动脉抽血,分离血清。A 蛋白亲和层析法^[5]纯化 IgG,Bradford 法测定含量。

1.7 免疫组织化学

取大鼠附睾精子,用 PBS 洗 3 次,调整精子密度为 5×10^7 /mL,涂在附有多聚赖氨酸的载玻片上,室温自然干燥,4% 多聚甲醛固定 30 min, PBST 洗 2 min \times 3 次,正常血清室温封闭 30 min,加 1:250 稀释的兔抗大鼠 L-PGDS 多克隆抗体,37℃湿盒 120 min, PBST 洗 2 min \times 3 次,加生物素标记的羊抗兔 IgG,37℃湿盒 30 min, PBST 洗 2 min \times 3 次,加 SABC,37℃湿盒 20 min, PBST 洗 4 min \times 5 次。DAB 显色,蒸馏水终止反应。甘油明胶封固。阴性对照以 PBS 取代多抗。

1.8 Western blot

剪碎大鼠附睾,2000 g 离心 10 min,收集精浆,各取 10 μ L 精浆和纯化的重组 L-PGDS, SDS-PAGE 后,电转移致硝酸纤维膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,兔抗大鼠 L-PGDS 抗血清(1:50 稀释)孵育,4℃冰箱过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:400 稀释)37℃孵育 1 h, DAB 显色。Olympus 数码相机成相。

1.9 纯化蛋白的生物学活性检测

参照 Tanaka 等^[5]的方法,分别对视黄酸溶液(10 μ mol/L)、L-PGDS 溶液(1 mg/mL)及视黄酸与 L-PGDS 的混合液(所用缓冲液均为 0.5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)进行 250~450 nm 范围内的吸收波谱扫描。

2 结果

2.1 L-PGDS 的扩增结果及序列分析

L-PGDS cDNA 编码 190 个氨基酸,编码区由 570bp 组成。去除编码信号肽的 66 个碱基后,再加上氨基端编码组氨酸的 18 个碱基及酶切位点,共 556bp。PCR 扩增出了 550bp 左右的 DNA 片段,PCR 产物与预期大小一致(见图 1)。PCR 扩增片段与 T 载体连接后,双酶切可见目的片段。测序结果表明,目的片段的序列与 Urade 等报道的大鼠脑 L-PGDS cDNA 完全一致。

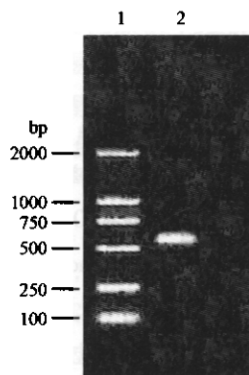


图 1 PCR 扩增 L-PGDS 基因的琼脂糖电泳分析

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of L-PGDS DNA

1: DNA marker; 2: PCR product of L-PGDS

2.2 工程菌的构建

将 pPIC9 用 *Eco*R I、*Not* I 酶切,回收大片段;pGEM-T/L-PGDS 经 *Eco*R I、*Not* I 双酶切后,回收小片段;将回收的大小片段连接后得到重组质粒 pPIC9/L-PGDS,转化 *E. coli* DH5 α 。随机挑取 10 个氨苄抗性菌落,提取质粒后进行 PCR 扩增,均为阳

性。为了确证外源基因的存在,用 *EcoR* I、*Not* I 进行双酶切鉴定(见图 2),在 570bp 处可见目的条带。用限制性内切酶 *Bgl* II 对质粒 pPIC9/L-PGDS 进行酶切消化,酶切产物在 1% 的凝胶上电泳后,可见酶切反应完全。pPIC9/L-PGDS 被切割成 6.1 kb 和 2.4 kb 的两个片段,而 pPIC9 被切割成 5.6 kb 和 2.4 kb 的两个片段。线性化的 pPIC9/L-PGDS 经电穿孔仪转化 GS115 后,获得约 30 个 His⁺ 菌落。随机挑取 10 个菌落,进行菌落 PCR 鉴定,获得 8 个阳性克隆。

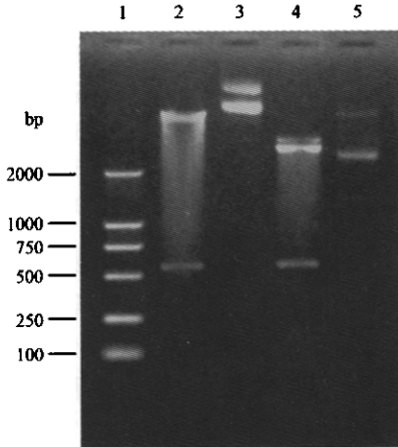


图 2 重组质粒的双酶切分析

Fig. 2 Restriction pattern of the recombinant plasmids

1: DNA marker; 2: recombinant plasmids of pPIC9/L-PGDS digested by *EcoR* I and *Not* I; 3: plasmids of pPIC9/L-PGDS; 4: recombinant plasmids of pGEM-T/L-PGDS digested by *EcoR* I and *Not* I; 5: plasmids of pGEM-T/L-PGDS

2.3 L-PGDS 的表达、纯化

将表达菌扩大培养并诱导,培养上清经硫酸铵沉淀后重悬并透析,产物用镍离子金属螯合层析纯化。最后用 4 mL 洗脱液 III (50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑) 洗脱层析柱,分 4 次收集洗脱液。各取 10 μL 稀释后纯化后蛋白用 15% SDS-PAGE 电泳。结果见图 3,纯化的 L-PGDS 的分子量为 27 kD,与理论值相一致。Bradford 法测得第 2 次收集的纯 L-PGDS 的浓度为 2800 μg/mL。

2.4 L-PGDS 的糖蛋白鉴定

取第 3 次收集的纯 L-PGDS 10 μL, 15% SDS-PAGE 凝胶电泳后,经希夫试剂染色,结果见图 4, 27 kD 处的蛋白条带染成了红色,提示重组的 L-PGDS 是糖蛋白,含有糖链。

2.5 L-PGDS 在精子表面的分布

免疫组织化学结果提示 L-PGDS 主要分布在大鼠精子的头部以及精子尾部上段。

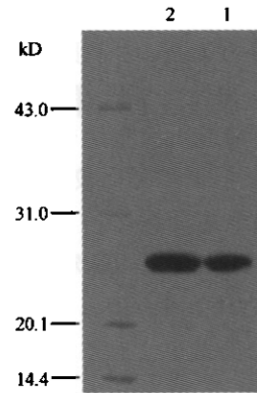


图 3 重组 L-PGDS 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant L-PGDS

1, 2: selected L-PGDS from the first and second time, respectively



图 4 L-PGDS 的 PAS 反应

Fig. 4 PAS reaction of L-PGDS

2.6 Western 印迹

分别取 10 μL 精浆(去除精子的附睾液)和重组 L-PGDS 经 SDS-PAGE 后,常规方法做 Western blot,结果见图 5,重组的 L-PGDS 的相对分子量为 27 kD,而大鼠精浆中的 L-PGDS 相对分子量约为 26.5 kD。提示,大鼠精浆中的 L-PGDS 与重组的 L-PGDS 存在着不同的糖链结构。

2.7 重组 L-PGDS 的生物学活性

L-PGDS 是一种双功能蛋白,除可催化合成 PGD₂ 产外,亦可结合和运输类视色素。L-PGDS 与全反视黄酸和全反视黄醛结合后,它们的波谱发生红移。由于目前用于检测 L-PGDS 酶活性的方法均为放免法,此法仅限于国外几个实验室供研究用。鉴于此,我们观察了视黄酸与重组 L-PGDS 结合后的波谱扫描情况。视黄酸的吸收峰为 340nm,与重组蛋白结合后,波谱发生了红移,吸收峰为 372nm (见图 7)。这一结果与文献[5]报道的基本一致,证实重组 L-PGDS 具有生物学活性。

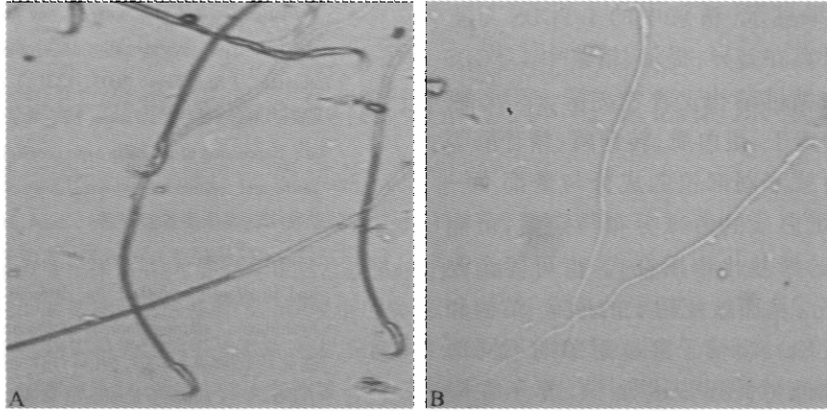


图5 免疫组化染色结果

Fig.5 Result of immunohistochemistry

A: localization of L-PGDS on the surface of rat sperm(× 40)

B: negative control(× 40)

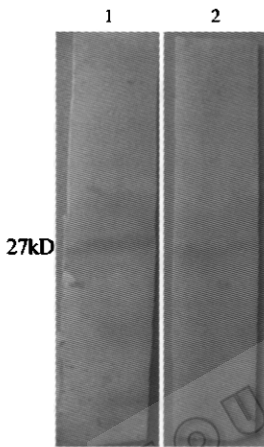


图6 Western blot 结果

Fig.6 Result of Western blot

1:recombinant L-PGDS; 2:L-PGDS in seminal plasma

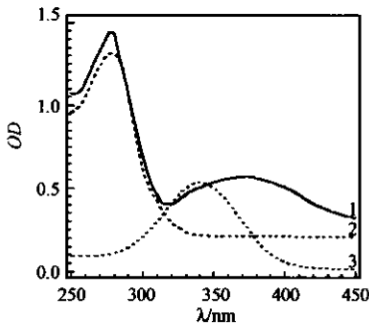


图7 视黄酸结合重组 L-PGDS 后的波谱扫描

Fig.7 UV maximum shift of all-trans retinoic acid by L-PGDS

1: L-PGDS and retinoic acid; 2: L-PGDS; 3: retinoic acid

胞生长快、易于培养、遗传操作简单等原核生物的特点,又具有真核生物时表达的蛋白质进行正确加工、修饰、折叠等功能,非常有利于真核基因的表达^[6]。*Pichia pastoris*(毕赤巴斯德酵母)为宿主的外源基因表达系统近年来发展最为迅速,应用也最为广泛,此系统已经成功表达了一系列有重要生物学活性的蛋白质。毕赤酵母系统的广泛应用,原因在于该系统除了具有一般酵母所具有的特点外,还有以下几个优点:(1) 具有醇氧化酶 AOX1 基因启动子,这是目前最强、调控机理最严格的启动子之一;(2) 表达质粒能在基因组的特定位点以单拷贝或多拷贝的形式稳定整合;(3) 菌株易于进行高密度发酵,外源蛋白表达量高;(4) 毕赤酵母中存在过氧化物酶体,表达的蛋白贮存其中,可免受蛋白酶的降解,而且减少对细胞的毒害作用。

黄宇烽等^[7]对 L-PGDS 做了原核表达,但 L-PGDS 是一种糖蛋白,大肠杆菌不能对其进行糖基化修饰,可能会对 L-PGDS 的生物学活性及免疫原性产生影响。我们通过毕赤酵母表达出来的大鼠 L-PGDS,经过 PAS 反应,被染成了红色,提示表达出来的 L-PGDS 带有糖链。至于原核表达的 L-PGDS 与真核表达的 L-PGDS 在免疫学活性与生物学活性上是否有较大的差异,还需要进一步的验证。

Gerena RL 等^[8]发现在公牛精子顶体的顶端也分布有 L-PGDS,未见其它动物精子表面 L-PGDS 分布的相关报道。我们的研究发现 L-PGDS 主要定位于大鼠精子的头部以及精子尾部近精子的一半左右。至于 L-PGDS 在精子发育的不同阶段上的定位与定量上是否有差异,以及这种差异与精子的发育是否相关等问题还需要进一步探讨。

3 讨论

与大肠杆菌相比,酵母是低等真核生物,具有细

Western blot 结果显示,精浆中的 L-PGDS 与重组的 L-PGDS 分子量存在差异,提示、精浆中 L-PGDS 与重组的 L-PGDS 在糖链结构上存在差异。附睾液包含组织液、金属阳离子、蛋白质、转糖酶、糖苷酶等物质,这些物质在附睾不同部位的成分与量都不一样。附睾不同部位蛋白质的特殊分布与定量,可能会改变精子膜蛋白的糖基化作用方式,也可能会改变精子膜蛋白的成分,从而改变精子的形态、结构和功能,影响精子的成熟。当精子穿越附睾的不同部位时,逐步获得运动能力并逐步成熟^[9]。至于在附睾的不同部位以及在附睾发育的不同阶段,L-PGDS 的糖基化作用方式是否改变以及糖基化作用方式的改变与精子的结构功能是否相关等问题,也需要进一步研究。

免疫组织化学结果和 Western blot 结果也提示,我们表达的 L-PGDS 具有很强的生物学活性。我们可以用它作为研究工具,进一步研究 L-PGDS 与各类男性不育疾病之间的关系,并探讨 L-PGDS 的功能。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Leone MG, Haq HA, Saso L. Lipocalin-type prostaglandin D synthase: which role in male fertility? *Contraception*, 2002, 65(4): 293 - 295
- [2] Irikura D, Kumasaka T, Yamamoto M *et al.* Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, a somnogen-producing enzyme. *J Bio Chem*, 2003, 133(1): 29 - 32
- [3] Chen DY(陈德宇), Huang YF(黄宇烽), Lu HM(陆惠敏) *et al.* Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene in rat testis and epidymis. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*(中国兽医科技), 2004, 34(5): 55 - 57
- [4] Yang GL(杨桂兰), Guo XP(郭学平). Comparison of Lowry's and Bradford's method for determination of protein in sodium hyaluronate. *Chinese Journal of Biochemical Pharamaceutice*(中国生化药物杂志), 2003, 24(3): 131 - 133
- [5] Tanaka T, Urade Y, Kimura H *et al.* Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem*, 1997, 272(25): 15789 - 15795
- [6] Deng BB(邓兵兵), Fang HQ(方宏清), Xue C(薛冲) *et al.* Secretary expression of the deleted variant of human hepatocyte growth factor (hdHGF) in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2001, 17(5): 590 - 594
- [7] Chen DY(陈德宇), Huang YF(黄宇烽), Zhou KY(周开亚). Structure, localization and characterization of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *National Journal of Andrology*(中华男科学), 2004, 10(2): 134 - 138
- [8] Gerena RL, Irikura D, Eguchi N *et al.* Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. *Biol Reprod*, 2000, 62(3): 547 - 556
- [9] Mrade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam Horm*, 2000, 58(2): 89 - 120

Expression of Rat L-PGDS by *Pichia pastoris* and Distribution of L-PGDS on Sperm

CHEN De-Yu^{1,3} ZHOU Kai-Ya¹ HUANG Yu-Feng^{2*}

¹(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

²(Laboratory of Reproduction and Genetics, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing 210002, China)

³(Department of Biology, Fuyang Normal College, Fuyang 230632, China)

Abstract To investigate the expression of rat L-PGDS by *Pichia pastoris* and to study the distribution of L-PGDS on sperm. The cDNA of rat Lipocalin-type prostaglandin D synthase was cloned by RT-PCR using mRNA of rat testis as template. The L-PGDS cDNA was inserted into plasmid pPIC9 and transformed into *Pichia pastoris* GS115 cells. Using SDS-PAGE to analysis the molecular weight of L-PGDS, immunohistochemical method was performed to study the distribution of L-PGDS on sperm, and Western blot method was performed to study the specific of L-PGDS. The molecular weight of recombinant L-PGDS is 27kD. L-PGDS is mainly distributed on sperm.

Key words lipocalin-type prostaglandin D synthase, *Pichia pastoris*, distribution

Received: 03-15-2004

This work was supported by Grant form Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing(No.2004078) and the National Science Foundation of Anhui (No.2002kj236).

* Corresponding author. Tel: 86-25-4827110 ext 58172, Fax: 86-25-4803061; E-mail: yfhuang@ntl-j-androl.com