

# 人 Mn-SOD cDNA 的克隆及其在巴斯德毕赤酵母中的表达 Cloning and Expression of Human Manganese Superoxide Dismutase cDNA in *Pichia pastoris*

凌 敏\*, 赖祥进, 谢 科

LING Min\*, LAI Xiang-Jin and XIE Ke

广西医科大学生物化学与分子生物学教研室, 南宁 530021

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

**摘 要** 以人肝细胞株(L02)总 RNA 为模板,用 RT-PCR 扩增出人锰超氧化物歧化酶(hMn-SOD) cDNA,将其插入含有 AOX1 基因启动子和  $\alpha$  分泌信号肽序列的毕赤酵母表达载体 pPIC9k,构建重组质粒 pPIC9k-MnSOD,转化毕赤酵母 GS115,筛选出整合了多拷贝 hMn-SOD 基因的 Mut<sup>+</sup> 表型菌株,摇瓶培养,0.5% 甲醇诱导表达。SDS-PAGE 分析显示,诱导 4d 的培养上清中 hMn-SOD 的表达量约为上清总蛋白的 32%,酶比活可达 247.7u/mg。hMn-SOD 在巴斯德毕赤酵母中实现了分泌性表达。

**关键词** 人锰超氧化物歧化酶,巴斯德毕赤酵母,分泌表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0478-04

**Abstract** Human manganese superoxide dismutase (hMn-SOD) cDNA was amplified by RT-PCR from total RNA of human liver cell (L02), and cloned into yeast expression vector pPIC9K containing AOX1 promoter and the  $\alpha$ -factor signal peptide sequence. The resultant pPIC9K-MnSOD was transformed to *P. pastoris* GS115, screened for Mut<sup>+</sup> carrying multiple copies of hMn-SOD. The positive transformants were fermented in flasks and induced by 0.5% methanol. After 4 days of methanol induction, the expressed hMn-SOD was up to 32% of the total proteins in the supernatant by SDS-PAGE with specific activity of 247.7u/mg.

**Key words** hMn-SOD, *Pichia pastoris*, secretory expression

超氧化物歧化酶(SOD)是一种广泛存在于生物体内的金属酶,它能够有效地清除体内氧自由基,对炎症、辐射损伤、自身免疫性疾病等均有临床疗效<sup>[1]</sup>。人超氧化物歧化酶(h-SOD)按其所含的金属种类不同可分为三类:位于胞浆的 hCuZn-SOD、位于线粒体的 hMn-SOD 和分泌到细胞外的 hEC-SOD。在 SOD 家族中 hMn-SOD 在体内具有半衰期较长、抗炎抗辐射及能抑制某些肿瘤细胞生长的优点使之更具有重要的医用价值<sup>[2]</sup>,但是由于 Mn-SOD 主要分布于线粒体内,分离纯化繁琐,而且含量少,造成来源十分有限,不能够满足研究及临床的需要。故制备 Mn-SOD 最好的方法是进行 Mn-SOD 的基因克隆和表达。

目前,国内外已有关于 hMn-SOD 基因表达的报道<sup>[3-6]</sup>,但基本上都是在大肠杆菌表达系统中进行,尚未见在酵母中表达的报道。本文在构建 hMn-SOD 大肠杆菌表达系统获得成功的基础上<sup>[7]</sup>,将 hMn-SOD cDNA 克隆于毕赤酵母表达载体 pPIC9k,并通过同源重组整合到酵母染色体上,实现了 hMn-SOD 的分泌性表达。为工业化生产 hMn-SOD 做了进一步探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *E. coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保存, *P.*

Received: November 9, 2004; Accepted: January 6, 2005.

This work was supported by a grant from the Natural Sciences Foundation of Guangxi Province (No. 9912035).

\* Corresponding author. Tel: 86-771-5355680; E-mail: lingmin70@163.com

广西自然科学基金资助(No. 9912035)。

*pastoris* GS115 及表达质粒 pPIC9K 均购自 Invitrogen 公司。

**1.1.2 主要试剂:**总 RNA 提取试剂盒、BcaBEST™ RNA PCR 试剂盒、Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制酶购自大连宝生物公司,其它试剂均购自上海生工生物工程公司。人肝细胞株 L02 由广西医科大学肿瘤研究所提供。DNA 测序委托大连宝生物公司进行。寡核苷酸引物由上海生工生物工程公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 人肝细胞总 RNA 的提取:**应用大连宝生物公司的总 RNA 提取试剂盒,参照试剂盒操作说明书进行。

**1.2.2 引物设计与合成:**按 Beck 等<sup>[8]</sup>发表的人 MnSOD cDNA 序列,经微机分析,设计 2 个含 *EcoR* I 位点的引物:Primer 1 和 Primer 2。按 Invitrogen 公司提供的 5' AOX1 及 3' AOX1 引物序列合成 5' AOX1 和 3' AOX1 Primer(各引物序列见表 1)。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

Primer	Sequence
Primer 1	5'-AGA GAATTC AAGCAGCCTCCCGACCT-3'
Primer 2	5'-GCG GAATTCCTGCAGCATAACGATCGTGGT-3'
5' AOX1	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
3' AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

**1.2.3 RT-PCR 法扩增 hMn-SOD cDNA:**按照 BcaBEST™ RNA PCR 试剂盒推荐的方法 RT 合成 cDNA,以此 cDNA 为模板,用 Primer 1 和 Primer 2 进行 PCR。RT 的反应参数为:65℃, 1h。PCR 的扩增参数为:94℃ 2min, 60℃ 1min, 72℃ 5min 进行 30 个循环。PCR 产物经胶回收纯化后测序。

**1.2.4 酵母表达质粒 pPIC9K-MnSOD 的构建:**PCR 产物与 pPIC9K 载体分别经 *EcoR* I 酶切后连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。提取转化子的质粒用 *EcoR* I 进行酶切鉴定及用 Primer 1 和 3' AOX1 做定向 PCR,筛选出阳性克隆。阳性克隆命名为 pPIC9K-MnSOD。

**1.2.5 质粒转化 *P. pastoris* 酵母细胞:**pPIC9K-MnSOD 用 *Sac* I 单酶切线性化后,通过电脉冲法转化酵母菌 GS115。酵母转化株经 YPD 液体培养后提取染色体,用 PCR 方法验证 hMn-SOD cDNA 基因已与染色体整合。在 MM 和 MD 平板筛选出 Mut<sup>+</sup> 表型的转化株,然后在加有 G418 的 YPD 平板筛选出多拷贝的 Mut<sup>+</sup> 重组菌株(实验方法参见 Invitrogen 公司提供的 Multi-copy *Pichia* Expression kit Instruction Manual)。

**1.2.6 hMn-SOD cDNA 在 *P. pastoris* 中的诱导表达:**将筛选得到的多拷贝重组菌株(GS115/pPIC9K-MnSOD Mut<sup>+</sup>)接种于 BMGY 中培养至  $OD_{600} = 2 \sim 6$  时,离心,收集菌体。菌体用 BMMY 培养基(含 800 $\mu$ mol/L 的 Mn<sup>2+</sup>)稀释到  $OD_{600} = 1.0$ ,然后诱导培养 5d。每隔 1d 取样及补加甲醇至终浓度为 0.5%。样品离心,上清液立即加入 PMSF 至 1mmol/L, -20℃ 冻存。取上清液进行 SDS-PAGE 分析及 SOD 酶活力测定。SOD 酶活力测定采用改良的联苯三酚自氧化法<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的制备

采用 RNA 提取试剂盒制备出 RNA,经凝胶电泳可见 18S RNA 及 28S RNA 的清晰条带(图略),说明抽提的肝细胞中的总 RNA 完整未降解,为 RT-PCR 的成功创造了条件。

### 2.2 hMn-SOD cDNA 的 RT-PCR

经 RT-PCR 扩增得到 DNA 片段大小约为 630bp(Fig. 1),与预计的大小相符。测序结果与文献报道<sup>[8]</sup>一致。

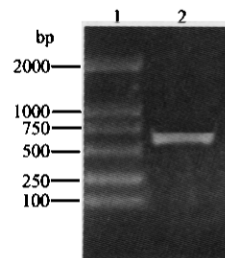


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

1: DL2000 marker; 2: PCR products.

### 2.3 酵母表达质粒 pPIC9K-MnSOD 的构建

将 RT-PCR 扩增的 MnSOD cDNA 与 pPIC9K 相连,构建了重组质粒 pPIC9K-MnSOD(Fig. 2)。此重组质粒经 *EcoR* I 酶切鉴定得到相应片段(Fig. 3),说明 hMn-SOD cDNA 基因已连到载体上。用 Primer 1 和 3' AOX1 做 PCR 验证插入方向,可扩增出一条约 750bp 片段(Fig. 4),表明插入方向正确。

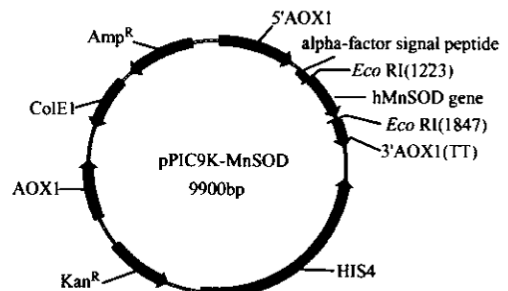


图 2 重组质粒 pPIC9K-MnSOD 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-MnSOD

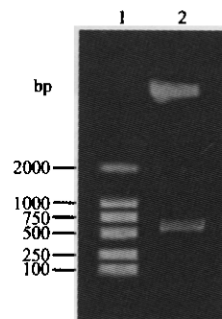


图 3 重组质粒的酶切分析

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid

1: DL2000 marker; 2: pPIC9K-MnSOD/*EcoR* I.

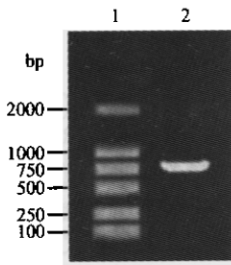


图4 重组质粒的PCR鉴定

Fig.4 PCR of recombinant plasmid

1: DL2000 marker; 2: pPIC9K-MnSOD.

#### 2.4 多拷贝整合转化子的筛选

酵母转化株的染色体用 Primer 1 和 Primer 2 进行 PCR 检测,得到 630bp 大小的特异片段(图略),表明转化子基因组中已整合有 hMn-SOD cDNA 基因。

载体 pPIC9K 含有 Kan<sup>r</sup> 基因,使得甲醇酵母阳性转化子能抗 G418,可依靠基因剂量效应,以对 G418 的抗性水平快速筛选出高拷贝整合的转化子。本实验将 Mut<sup>+</sup> 表型的转化子分别对应地点到逐步增高 G418 浓度(0.25, 0.50, 0.75, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00g/L)的 YPD 平板上培养,最后获得了能抗 2.00g/L G418 的多拷贝重组菌株。

#### 2.5 表达产物的 SDS-PAGE 分析及 SOD 酶活力测定

将筛选得到的重组克隆诱导培养 5d,每隔 1d 取样。12% SDS-PAGE 分析诱导后的上清液,可见所诱导的重组克隆中,除对照(未诱导)以外都有一条诱导出来的明显的异源蛋白条带(Fig.5),其分子量约为 22kD,与理论上的 hMn-SOD 大小一致。其中诱导 4d 得到的异源蛋白条带最粗,经凝胶光密度扫描分析,此异源蛋白条带的含量约占分泌蛋白总量的 32%。以联苯三酚法和 Folin-酚试剂法分别测定各上清液的 SOD 酶活力及蛋白质含量,结果表明各上清液中都有 SOD 酶活力,其中以诱导 4d 得到的酶比活最高,达到 247.7u/mg。

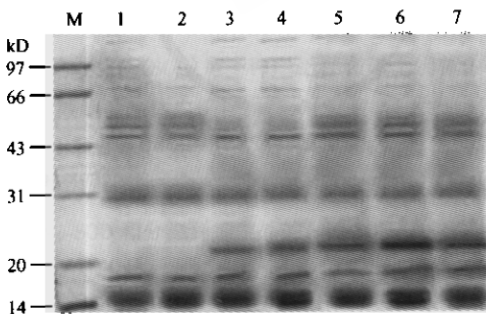


图5 重组酵母培养物上清的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of supernatant of recombinant *Pichia*

M: protein marker; 1: GS115 control; 2: un-induced; 3~7: induced for 1, 2, 3, 4, and 5 days, respectively.

### 3 讨论

hMn-SOD 是一个位于第 6 号染色体长臂 2 区 5 带(6q25)的由核基因编码的、分子量约为 22kD 的抗氧化酶,具有活性的 hMn-SOD 蛋白最后定位于线粒体基质<sup>[10]</sup>。hMn-SOD 基因

的表达既因细胞受到辐射、氧化或还原试剂、细胞因子、病毒感染等因素的刺激而显著提高,也可随细胞的癌变而大幅度降低<sup>[11,12]</sup>,表明 hMn-SOD 诱导表达对机体防护氧胁迫及预防肿瘤的发生具有重要作用。因此,hMn-SOD 无论是剂型、用药途径还是临床应用范围都是相当广泛的。

从研究现状来看,hMn-SOD 基因工程的一些实验研究已经取得了可喜的成果,主要是运用大肠杆菌表达系统。在大肠杆菌中表达 hMn-SOD,虽然发酵时间短,表达水平高,但发酵时需用 IPTG 诱导,成本昂贵,且表达产物通常以包涵体形式存在于胞内,分离纯化困难,不利于工业化生产。而本文利用酵母来表达 hMn-SOD,表达水平虽较大肠杆菌低,但可用甲醇做诱导,成本低廉,且表达产物可分泌到培养液,为工业化生产和纯化提供了极大的方便。*Pichia* 重组菌株根据 AOX1 基因的完整与否分为 Mut<sup>+</sup> (Methanol utilization plus) 和 Mut<sup>-</sup> (Methanol utilization slow) 两种表型,外源蛋白在哪种表型的表达量更高,需要作进一步验证。本文曾比较 Mut<sup>+</sup> 和 Mut<sup>-</sup> 分泌 SOD 酶的量及活性,发现并无明显区别,不过由于 Mut<sup>+</sup> 表达高峰的时间过于漫长(6~8d),不经济,因此我们选择 GS115 的 Mut<sup>+</sup> 型作为宿主,经甲醇诱导培养 4d 后,SOD 酶的表达量达到最大,时间并不太长,而且工程菌稳定,适于实验室研究和工业化中试生产。

外源基因的拷贝数是影响其表达量的一个重要因素。一般来讲,整合的拷贝数越多,表达量越高,但不是绝对的,有时高 G418 抗性和低 G418 抗性对表达量并没有影响,拷贝数多了甚至可引起表达量下降。本研究对大量的不同 G418 抗性转化子做表达筛选时发现,随着 G418 抗性的增加,表达量也随着增加,高 G418 抗性转化子的表达量明显高于低 G418 抗性转化子。

人 MnSOD 在毕赤酵母中的表达量约占分泌蛋白总量的 32%,相对于某些外源蛋白表达量达到 50%<sup>[13]</sup> 来说偏低。其原因之一可能是,hMn-SOD 基因中的部分密码子对毕赤酵母而言是稀有密码子。有报道<sup>[14]</sup> 指出,在生物体 61 个遗传密码中只有 25 个为酵母偏好,在酵母中表达量较高的基因往往大量采用酵母所偏好的密码子。因此,如果能将 hMn-SOD 基因中的某些密码子突变为酵母所偏好的密码子,就有可能提高表达量。

外源基因在酵母的表达还要受培养条件如通气量、培养基、温度、培养基初始 pH 值、甲醇含量、诱导前 OD 值等多方面因素的影响。这些工作将在以后进一步研究,力争获得高效分泌 hMn-SOD 的工程菌。

#### REFERENCES(参考文献)

- [1] Wong GHW. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cells*, 1989, 58:923-934
- [2] Church SL, Grant JW, Ridnour LA *et al.* Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:3113-3124
- [3] Takahashi S, Makino T, Asanagi M *et al.* Recombinant plasmid for human manganese superoxide dismutase manufacture with *Escherichia coli*. *Eur Pat App*, EP462, 1991, 836

- [ 4 ] Gorecki M, Beck Y, Hartman JR *et al*. Recombinant human superoxide dismutase: production and potential therapeutical uses. *Free Rad Res comm*. 1991, **12**:401 - 410
- [ 5 ] Luo XY(骆训懿), Zhou LJ(周丽君), Chen XS(陈晓穗) *et al*. Cloning, sequencing and expression of human manganese superoxide dismutase gene cDNA. *Progress in Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 1996, **23**(4):349 - 352
- [ 6 ] Shi HJ(施惠娟), He HJ(贺华君), Yuan QS(袁勤生) *et al*. Cloning and expression of human manganese superoxide dismutase cDNA. *Acta Biochemical et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 1999, **31**(6):707 - 710
- [ 7 ] Ling M(凌敏), Xie K(谢科). Expression of human manganese superoxide dismutase gene in *E. coli*. *Journal of Guangxi Medical University*(广西医科大学学报), 2004, **21**(4):476 - 477
- [ 8 ] Beck Y, Oren R, Amit B *et al*. Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(21):9076
- [ 9 ] Xie WH(谢卫华), Yao JF(姚菊芳), Yuan QS(袁勤生). Improve to determination of superoxide dismutase by pyrogallol self-oxidation method. *Pharmaceutical Industry*(医药工业), 1988, **19**(5):217 - 219
- [ 10 ] Church SL, Grant JW, Ridnour LA *et al*. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase to 6q25 by fluorescence *in situ* hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics*, 1992, **14**:823 - 831
- [ 11 ] Oberley LW. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys*, 1987, **54**:69 - 79
- [ 12 ] Daret KS, John CH. Complementary DNA encoding human colour cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res*, 1991, **51**:939 - 951
- [ 13 ] Joan LC, James M, Cregg T *et al*. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Review*, 2000, **24**:45 - 66
- [ 14 ] Paul M, Sharp K. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowerly expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1986, **14**(3):5125 - 5143