

研究简报

重叠延伸 PCR 法克隆人脂联素基因及其在毕赤酵母中表达

张变玲¹, 张儒², 姬婧媛¹, 薛柯¹, 荆二勇¹, 张展鹏¹, 尉亚辉¹

1 西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 西安 710069

2 湖南工程学院化学化工系, 湘潭 411104

摘要: 利用重叠延伸 PCR 法克隆出人脂联素基因, 连接至克隆载体 pGEM-T 中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 通过测序对其进行序列分析后, 进一步构建毕赤酵母表达载体 pPIC3.5K-ADPN, 通过电击法转化毕赤酵母 GS115, 转化的重组酵母菌用甲醇诱导外源基因表达。经 PCR、Southern blotting 鉴定, 获得了重组毕赤酵母菌株; 经甲醇诱导人脂联素基因表达, Western blotting 杂交鉴定证明人脂联素基因已经在毕赤酵母中成功表达。结果表明重叠延伸 PCR 法准确方便克隆出人脂联素基因, 在 30°C, 1% 甲醇诱导 48 h, 人脂联素基因在巴斯德毕赤酵母中的表达最佳。

关键词: 人脂联素, 重叠延伸 PCR, 巴斯德毕赤酵母, Southern blotting, Western blotting

Cloning of Human Adiponectin Gene by PCR-driven Overlap Extension and Expression in *Pichia pastoris*

Bianling Zhang¹, Ru Zhang², Jingyuan Ji¹, Ke Xue¹, Eryong Jing¹, Zhanpeng Zhang¹, and Yahui Wei¹

1 Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2 Department of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China

Abstract: Gene of human adiponectin (ADPN) was cloned by PCR-driven overlap extension. The ADPN gene was linked into pGEM-T vector. After the sequence was determined, the ADPN gene was subcloned into expression vector pPIC3.5K to yield the recombinant expression vector pPIC3.5K-ADPN. The recombinant plasmid was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation, then the recombinant strain was identified by PCR and Southern blotting. After induction by methanol, ADPN was expressed in GS115, then the protein was identified by Western blotting. The results showed that the ADPN was expressed successfully. The optimum conditions of expression were 30°C and 1% methanol inducing 48 h.

Keywords: human adiponectin, PCR-driven overlap extension, *P. pastoris*, Southern blotting, Western blotting

脂联素(Adiponectin, ADPN)亦被称为 28 kD 凝胶结合蛋白, 是脂肪组织分泌的与细胞外基质相互作用的细胞因子。近年来其在肥胖、胰岛素抵抗和

2 型糖尿病发病机制中的作用已倍受关注。研究发现其具有调节体内能量平衡、提高胰岛素敏感性、增加脂肪酸氧化、提高葡萄糖摄取量、改善胰岛素

Received: December 4, 2007; Accepted: December 20, 2007

Supported by: Key Financing Projects of Shanxi Province (No. 05JS47).

Corresponding author: Yahui Wei. Tel: +86-29-88302199; E-mail: weiyahui@163.com

陕西省重点攻关项目(No. 05JS47)资助。

抵抗、抗动脉粥样硬化、抗炎等作用^[1-4], 但其作用机制仍不清楚。目前研究主要采用大肠杆菌等原核细胞表达, 而原核生物不能对表达产物进行翻译后加工及修饰, 不能得到更为接近人体结构的脂联素蛋白。也有研究用植物表达脂联素, 但其也有表达量低、周期长、生产不方便等缺点^[5]。为了进一步研究脂联素的结构功能和作用机理, 本研究采用重叠延伸 PCR 法克隆人脂联素基因编码序列, 研究人脂联素基因在巴斯德毕赤酵母中的表达, 以便开辟人脂联素表达研究的新途径。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 血液

正常人血液采自陕西省人民医院。

1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存, 毕赤酵母菌株 GS115、质粒 pPIC3.5k 购自 Invitrogen 公司, pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.1.3 主要试剂

Ex-Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、dNTP 均购自 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成; Southern blotting 试剂盒购自 Roche 公司; 人脂联素单克隆抗体(鼠抗)购自 ALEXIS 公司; β -actin 抗体(兔抗)购自北京博奥森生物技术有限公司; 羊抗鼠、羊抗兔单克隆抗体 IgG (二抗)及 Western blotting 化学发光底物均购自 Pierce 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重叠延伸 PCR 法克隆人脂联素基因

根据 NCBI 上登陆号为 NM_004797.2 的人脂联素 cDNA 序列设计引物扩增编码人脂联素的第二外显子(1~212 bp)和第三外显子(213~735 bp)序列, 在第二外显子序列的上游引物加上 Kozak 序列 GCCACC, 并根据重叠延伸法使引物 2 down 和 3 up 的划线部分 19 个碱基完全互补。引物为: 2 up 5'-GCCACCATGCTGTTGCTGGGAGCTGTTCTA-3', 2 down 5'-CCAATAAGACCTGGATCTCCTTTCTCA C CC-3'; 3 up 5'-GAGATCCAGGTCTTATTGGTCTCT AAGGAG-3', 3 down 5'-TCAGTTGGTGTTCATGGTA GAGAAGAAAGCC-3'。

用天根生化科技(北京)有限公司生产的血液基

因组 DNA 提取试剂盒从人全血中提取人基因组 DNA, 以其为模板, 分别以 2up/2down, 3up/3down 为引物, 扩增人脂联素基因的第二和第三外显子片段。扩增反应条件均为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 45 s, 61°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。分别胶回收上轮 PCR 的 2 个产物, 并以其等摩尔比例的混合物适当稀释后作为模板, 以 2up/3down 为引物, 94°C 预变性 5 min; 94°C 45 s, 61°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。第一次循环后 2 个片段在互补的部位会准确拼接并且延伸得到编码人脂联素基因的 2 条完整的链, 在后续的循环中以人脂联素基因的 2 条链为模板, 以 2up/3down 为引物, 大量扩增人脂联素基因。再将产物连接到 pGEM-T 载体上, 并转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 及双酶切初步鉴定正确后, 将含重组质粒 pGEM-T-ADPN 的阳性菌株送上海奥科生物公司进行测序。测序结果进入 NCBI 用 Blastn 程序比对。

1.2.2 酵母表达载体 pPIC3.5k-ADPN 的构建

重新设计合成分别带有 BamH I 和 EcoR I 两种酶切位点的 ADPN 引物, p1: 5'-AACGGGATCCCG CACCATGCTGTTGCTGGGAGCTGTT-3', p2: 5'-C GGAATTCCGTCAGTTGGTGTTCATGGTAGAGAA G-3'。以 pGEM-T-ADPN 为模板, p1、p2 为引物, 扩增出 5'端和 3'端分别带有 BamH I 和 EcoR I 两种酶切位点的 ADPN 基因, 然后用这 2 种酶切后连接至毕赤酵母表达载体 pPIC3.5k 中, 重组表达载体 pPIC3.5k-ADPN 转化大肠杆菌 DH5 α 并利用其上携带的氨苄青霉素抗性基因筛选出抗性菌株后做 PCR 及双酶切鉴定。图 1 为构建的重组表达载体示意图。

1.2.3 毕赤酵母转化和重组子的筛选

用 Sac I 线性化重组质粒 pPIC3.5k-ADPN, 按文献 [6] 方法制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 然后电击法转化。电击后酵母菌涂于 MD 平板上, 置于 28°C 培养 2~4 d, 进行营养缺陷型筛选, 长出的菌落即为转化子。

1.2.4 重组子 PCR 及 Southern blotting 鉴定

随机挑取 5 个 MD 平板上筛选出的重组菌落(依次记为 1、2、3、4、5 号)在液体 MD 培养基中 28°C、250 r/min 摇瓶培养后, 提取基因组 DNA, 以 5'AOX1 引物: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' 和 3'AOX1 引物: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 作为引物进行 PCR 鉴定, 反应条件为: 94°C 预变性 5

min; 94°C 1 min, 54°C 45 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

设计引物 p3: 5'-CCTGGTGAGAAGGGTGAGAAAGGAGATCCA-3', p4: 5'-CCAGTGGAGCCATCATAGTGGTTTTGCTGA-3', 并以人脂联素全长 PCR 产物为模版, 扩增出人脂联素基因编码区中间 260 bp 长的片段, 胶回收纯化后, 采用随机引物标记法进行 DIG 标记后作为杂交探针。1~5 号重组菌的基因组 DNA 经 PCR 鉴定后, 用 *EcoR* I 消化, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳后采用毛细管法转移至尼龙膜; 接着按 Roche 公司的 DIG 标记检测试剂盒说明书进行后续杂交及显色等操作。

1.2.5 人脂联素基因的诱导表达和 Western blotting 检测

取 1~5 号重组酵母菌株 GS115/pPIC3.5k-ADPN 分别接种于 25 mL BMGY 培养基中, 30°C 250 r/min 培养 30 h 左右, 至其 OD_{600} 约为 2.0, 5 000 r/min 离心 8 min, 收集菌体后重悬于 40 mL BMMY 培养基中, 再加入 1% 的甲醇。28°C~30°C, 250 r/min 培养, 期间每隔 24 h 补加 1% 的甲醇。第一次加甲醇的时间点记为 0 h, 菌体取样时间点分别为 6、12、24、36、48、60 h。

所取菌样采用文献[6]方法提取总蛋白, 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 然后在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温封闭膜 2 h, 人脂联素及 β -actin 混合一抗 4°C 过夜孵育, 含 0.05% Tween-20 的 PBS 室温洗膜 3×10 min, 混合二抗室温孵育膜 2 h, TBS 缓冲液洗膜 3×10 min。最后在酶联生色底物中孵育 3 min 后 X 胶片曝光。

2 结果与分析

2.1 人脂联素基因的克隆及测序

根据人脂联素 cDNA 序列(NCBI 上序列号为 NM_004797.2)分别设计两外显子引物, 经过 2 次 PCR 引物扩增, 得到了 2 个外显子片段。从图 2 可看出泳道 1~4 大小为 230 bp 左右, 和人脂联素第二外显子大小一致; 泳道 5、6 大小为 530 bp 左右, 和人脂联素第三外显子大小一致, 由此可以初步确定扩增到人脂联素的第二和第三外显子片段。经拼接 PCR 后, 图 3 泳道 1、2 作为对照是脂联素的第三外显子, 大小为 530 bp 左右, 泳道 3、4 是拼接产物, 大

小为 740 bp 左右, 和人脂联素 cDNA 大小基本一致, 可以初步确定克隆出人脂联素 cDNA 片段。

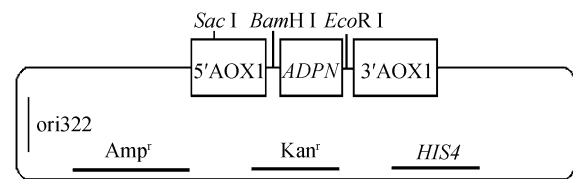


图 1 重组表达载体 pPIC3.5k-ADPN

Fig. 1 Binary plasmid vector used for transforming *P. pastoris*

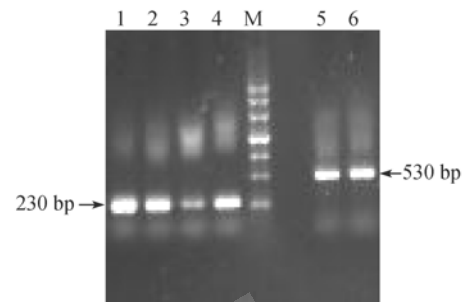


图 2 PCR 扩增人脂联素基因第二和第三外显子

Fig. 2 PCR amplification of two exons of human ADPN gene

1~4: the second exon of human ADPN gene; M: DNA marker; 5,6: the third exon of human ADPN gene

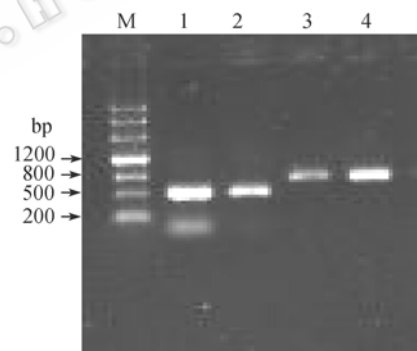


图 3 两外显子悬挂连接结果

Fig. 3 Splicing results of two exons

M: DNA marker; 1,2: the third exon of human ADPN gene; 3,4: splicing results of two exons

将克隆的 cDNA 片段连接至 pGEM-T 载体后送上海奥科生物公司测序, 测序结果和人脂联素 cDNA 序列比对, 结果表明克隆的人脂联素基因和该序列完全一致, 同源性达 100%。表明克隆得到的人脂联素基因序列完全正确。

2.2 表达载体 pPIC3.5k-ADPN PCR 及双酶切鉴定

从含 pPIC3.5k-ADPN 的 DH5 α 阳性菌中提取 pPIC3.5k-ADPN 质粒, 然后对其进行 PCR 及 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 从图 4 看出重组的 pPIC3.5k-ADPN 经 PCR 及双酶切都可以得到大小为 740 bp 左

右 DNA 片段, 和理论大小一致, 表明重组 pPIC3.5k-ADPN 表达载体构建成功。

2.3 重组酵母筛选与鉴定

2.3.1 重组酵母基因组 PCR 及 Southern blotting 鉴定结果

提取 1~5 号重组酵母菌基因组, 以酵母 AOX1 引物 PCR 检测, 从图 5 可以看出, 1~5 号菌均扩增出 900 bp 左右的条带, 同理论大小一致。对 1~5 号菌的 Southern blotting 结果如图 6, 其中泳道 1~5 分别是 1~5 号菌 DNA 杂交结果, 6 是阴性对照, 7 是阳性质粒对照。结果表明人脂联素基因已整合进 1~5 号毕赤酵母基因组中。

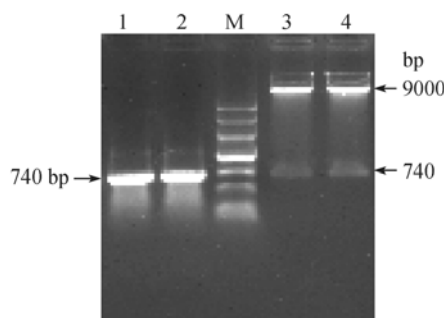


图 4 pPIC3.5k-ADPN PCR 和酶切鉴定

Fig. 4 PCR and restriction analysis of pPIC3.5k-ADPN

1, 2: PCR products of pPIC3.5k-ADPN; M: DNA marker;
3, 4: pPIC3.5k-ADPN digestion with *EcoR* I and *Bam* H I

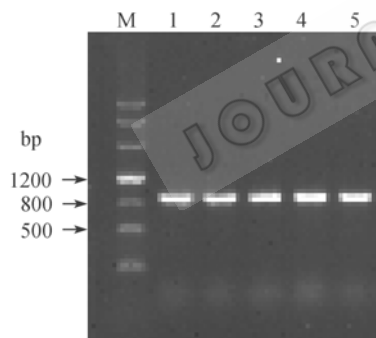


图 5 重组酵母 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant *P. pastoris* by PCR

M: DNA marker; 1~5: PCR products of recombinant *P. pastoris* DNA

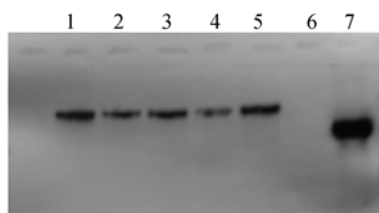


图 6 重组酵母 Southern blotting 结果

Fig. 6 The results of Southern blotting of recombinant *P. pastoris* 1~5: genome DNA of recombinant *P. pastoris*; 6: genome DNA of *P. pastoris*; 7: pPIC3.5k-ADPN plasmid

2.3.2 人脂联素的诱导表达和 Western blotting 杂交鉴定

对 Southern blotting 鉴定阳性的重组酵母菌株经诱导表达培养, 并分别在不同的时间点取样提取其总蛋白。进行 Western blotting 检测, 并以 β -actin 作为内参。图 7A 为 1 号菌经甲醇在不同诱导时间诱导结果, 从图 7A 可以看出甲醇诱导 48 h 时, 人脂联素表达量最高。之后, 又对 1~5 号菌在诱导 48 h 时所提蛋白进行 Western blotting 比较, 图 7B 结果表明 1、2、3 号菌株的表达量较高, 其中 2 号菌的表达量最高。可以作为后续实验的优良菌株。

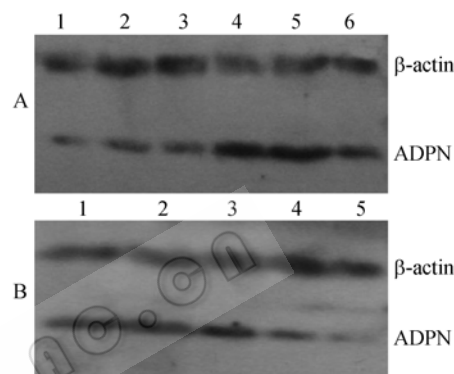


图 7 Western blotting 结果

Fig. 7 Results of Western blotting

(A) 1~6: results of strain 1 after 6, 12, 24, 36, 48, 60 h induction respectively; (B) results of strain 1~5 after 48 h induction respectively; β -actin (43 kD); human adiponectin (28 kD)

3 讨论

3.1 重叠延伸 PCR 克隆人脂联素基因

人脂联素基因共有 2 个内含子, 将基因分成 3 个外显子, 其中第一外显子在人脂联素表达中几乎没有作用, 只有第二和第三外显子起决定性作用, 目前表达的脂联素中基本采用第二第三外显子作为起始基因, 单纯采用反转录的方法比较难以获得。在该研究中采用重叠延伸 PCR 的方式, 能快速获得目的基因, 不仅克服了 RT-PCR 中必须依赖 mRNA 的问题, 而且有很高的效率^[7]。同时在实验中发现, 该方法克隆目的基因需要注意以下问题: 1) 引物设计对 PCR 扩增至关重要, 2 up, 2 down 引物和 3 up, 3 down 引物要合理设计, 才能保证第二外显子和第三外显子的准确性, 使得第二外显子和第三外显子片段在融合位点正确得以拼接。此外, 因为人基因组比较复杂, 为了保证开始从基因组中能正确扩增并拼接出目的基因, 所以在设计拼

接引物时没有加酶切位点。2) 两轮 PCR 中反应条件对扩增的特异性有很大的影响, 由于第二轮的扩增主要是以第一轮扩增的 2 个产物作为模板, 2 个产物的大小不同, 很容易导致模板的摩尔数量有较大的差异, 在扩增时候需要考虑引物和模板的比例关系, 一般需使模板的摩尔数相同, 并进行适当的稀释, 使引物和模板的比例在 $10^8:1$, 这样才能有效保证扩增到目标片段。

3.2 人脂联素基因的表达

天然人脂联素在人体中含量很低, 直接提取效率低, 不易纯化且成本高。通过重叠延伸 PCR 法方便扩增等到人脂联素第二外显子和第三外显子, 并方便准确的拼接而获得包含起始密码子和终止密码子的基因片段, 同时在起始密码子前添加 Kozak 序列^[8,9], 使其能够有效的在酵母细胞中表达。在实验中获得 5 株重组酵母菌株, 经 Western blotting 检测发现目的蛋白的表达量有很大差别, 菌株 1、2、3 表达量较高, 菌株 4、5 表达量很低, 其可能原因是前 3 个菌株整合多个目的基因, 而且不影响到基因的表达, 可以有效的提高蛋白的表达量。Hasslacher M. 等人曾报道^[10], 发酵条件对重组酵母表达有很大的影响, 实验采用分批流加式的培养, 能够较好的提高表达效率。由于巴斯德毕赤酵母受甲醇诱导表达, 对发酵过程中对甲醇诱导条件进行探讨, 结果发现, 甲醇诱导 48 h 后表达的效率达到最高, 采用 Western blotting 检测发现甲醇诱导表达的蛋白具有抗原性, 能与相应的抗体结合。在实验中为了使表达蛋白检测更加准确, 参考文献方法^[11]采用 β -肌动蛋白做为内参蛋白, 准确的测定了人脂联素蛋白的表达情况。

本研究选用巴斯德毕赤酵母作为人脂联素表达体系, 现已筛选出 3 株表达人脂联素水平较高的菌株, 均表达出 28 kD 外源蛋白, 和理论大小一致。随后将其发酵条件进行进一步优化, 以提高外源蛋

白表达水平, 为后续相关实验研究提供可靠的实验基础。

REFERENCES

- [1] Masruda M, Shimomura I, Sata M. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis: the missing link of adipo-vascular axis. *Biol Chem*, 2002, **277**: 37487–37491.
- [2] Berg AH, Combs TP, Du X, *et al*. The adipocyte secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 2001, **7**: 947–953.
- [3] Fruebis J, Tsao TS, Jawrschi S. Protein cleavage product of 30 kD adipocyte comolement related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 2005–2010.
- [4] Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, *et al*. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)*, 1996, **120**(4): 803–812.
- [5] Thomas B, Toshiyuki T, Atsushi M. Production of mouse adiponectin, an anti-diabetic protein, in transgenic sweet potato plants. *Plant Physiol*, 2005, **162**: 1169–1176.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 88–395.
- [7] Karin LH, Larry RP. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature*, 2007, **2**(4): 924–932.
- [8] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, **44**(2): 283–92.
- [9] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(20): 8125–48.
- [10] Hasslacher M, Schall M, Hayn M, *et al*. High level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropica rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif*, 1997, **11**: 61–71.
- [11] Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **259**: 523–526.