

研究简报

PTD-NPY 融合基因的克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达

孙玉成, 周凤秋, 万家余, 高宏伟

军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

摘要: 应用重叠延伸 PCR 方法扩增 HIV-1 TAT 蛋白转导结构域(PTD)与鼠源神经肽 Y(NPY)的融合基因, 克隆目的片段并插入酵母表达载体 pPICZ α A, 构建成重组表达质粒 pPICZ α -PTD-NPY。PCR 和酶切鉴定及测序正确后, 经限制性内切酶 *Sac* I 线性化重组表达质粒并通过电转化整合到巴斯德毕赤酵母菌 GS115 的染色体基因组中。阳性重组酵母菌用含 1% 甲醇的培养基诱导其分泌表达。经过 120 h 的诱导, 取上清浓缩除盐后进行 SDS-PAGE 电泳, 表明该系统成功表达了 PTD-NPY 融合蛋白, Western blotting 实验证实表达产物具有特异性。获得真核表达的 PTD-NPY 融合蛋白, 为下一步的应用研究提供了物质基础。

关键词: 蛋白转导, 神经肽 Y (NPY), 融合基因, 克隆, 分泌表达

Cloning of PTD-NPY Fusion Gene and Its Secretory Expression in *Pichia pastoris*

Yucheng Sun, Fengqiu Zhou, Jiayu Wan, and Hongwei Gao

Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China

Abstract: The PTD-NPY fusion gene derived from HIV-1 TAT protein transduction domain and rat neuropeptide Y was amplified by overlap extension PCR, digested and subcloned into yeast expression vector pPICZ α A to construct recombinant expression plasmid pPICZ α -PTD-NPY. The cloned PTD-NPY fusion gene was identified by PCR and restriction enzyme digestion and sequenced. The exact recombinant plasmid was linearized by *Sac* I and integrated by electrotransformation into the genome of *Pichia pastoris* GS115 cells. Then, these positive recombinant yeast cells were induced by 10 mL/L methanol to express soluble PTD-NPY fusion protein. After 120 h of methanol induction, the SDS-PAGE electrophoresis result indicated PTD-NPY fusion protein was efficiently secreted into the medium. Western blotting analysis proved that the expressed fusion protein had specific NPY binding activity. The successful expression of PTD-NPY fusion protein in *Pichia pastoris* provided basis for its further application study.

Keywords: protein transduction, neuropeptide Y (NPY), fusion gene, cloning, secretory expression

神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 是目前发现的唯一能使动物摄食过多的神经肽, 参与摄食的启动与维持, 能够增进动物的食欲, 提高采食量, 充分发挥动物的生产潜力^[1]。NPY 作用于下丘脑, 增强

食欲, 富含脂肪和糖类的饲料摄入量剧增, 体内最重要的产热组织褐色脂肪组织热生成减少, 整个机体的能量消耗下降; 同时, 激活脂肪组织的脂蛋白酶, 刺激胰岛素的分泌增加, 促进甘油三酯的合成

Received: January 16, 2008; Accepted: March 14, 2008

Corresponding author: Hongwei Gao. Tel: +86-431-86985801; E-mail: gaohongweihw@hotmail.com

和在白色脂肪组织的沉积^[2]。NPY 不能通过血脑屏障, 只能在中枢神经系统水平上调节动物采食且特异刺激动物对碳水化合物的采食^[3]。人类 I 型免疫缺陷病毒(HIV-1)反式激活蛋白 Tat 蛋白转导域(Protein transduction domain, PTD)是一种在蛋白转导过程中能高效穿过生物膜的结构域, 能介导与其共价连接的多肽、蛋白质及 DNA 等分子通过细胞膜和血脑屏障^[4]。当融合蛋白转入细胞或通过血脑屏障后, 目的蛋白发挥其生物学活性, 而与其共价连接的蛋白转导域不会影响细胞的正常结构或功能, 有利于 NPY 生物学效应的发挥。*Pichia pastoris* 基因表达系统可进行蛋白质的加工、折叠及转录后修饰等^[5], 使其表达产物具有天然蛋白的生物学活性。因此, 利用甲醇营养型酵母表达系统进行 PTD-NPY 融合蛋白的分泌表达, 为其在动物生产和医疗上的应用研究奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 载体与菌株

毕赤酵母表达载体 pPICZαA 和 *P. pastoris* 表达菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司; pMD-18T Simple Vector 为 TaKaRa 公司产品; 大肠杆菌 *E. coli* DH5α 由本室保存。

1.2 主要酶与试剂

各种限制性内切酶、*Ex Taq* 酶、DL2000 DNA Marker、PMSF、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、中分子量蛋白质标准等购自 TaKaRa 公司; D-葡萄糖、山梨醇、生物素、组氨酸、预染超低分子量蛋白质标准、SDS、Tris 等均购自 Sigma 公司; YNB、胰蛋白胨、酵母提取物、酪蛋白胨等均购自 GIBCOL 公司; ZeocinTM 为 Invitrogen 公司产品; 抗 NPY 单克隆抗体购自 ABNOVA 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体、Western blotting 膜封闭液、增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒等均为 TIANGEN 公司产品。

1.3 PTD-NPY 融合基因的克隆

将 GenBank 中编码 HIV-1 反式激活蛋白 Tat 蛋

白转导域与鼠神经肽 Y 成熟肽及肠激酶消化位点的核苷酸序列合并(图 1), 根据重叠延伸 PCR 原理及毕赤酵母密码子偏好性^[6], 在不改变氨基酸序列的条件下设计并合成了 1 条上游引物 P1 和 3 条下游引物 P2、P3 和 P4, 引物序列如下:

P1: 5'-GAATTCTATGGTAGGAAGAAACGTCGACAGCGTCGTCGGTACCCCTCCAAGCCGGAC-3'; P2: 5'-TCTGGCCATGTCCTCTGCTGGCGCGTCCTCGCCCGGATTGTCCGGCTTGGAGGGGTACC-3'; P3: 5'-GTGATGAGATTGATGTAGTGTTCGAGAGCGGAGTAGTATCTGGCCATGTCCTCTGCTG-3'; P4: 5'-TCTAGAGAATCATCTCATCTTTATATCTCTGTCTGGTGATGAGATTGATGTAGTG-3'。其中上游引物 P1 的 5'端引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物 P4 的 5'端引入 *Xba* I 酶切位点。通过 3 次 PCR 反应重叠延伸扩增目的片段, 其中第 1 次 PCR 反应中引物 P1 和 P2 互为模板; 第 2 次 PCR 反应以第 1 次 PCR 产物 100 倍稀释液为模板, 引物为 P1 和 P3; 第 3 次 PCR 反应以第 2 次 PCR 产物 100 倍稀释液为模板, 引物为 P1 和 P4。PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 分别在 60°C、62°C、63°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min。

PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目的片段, 直接与 pMD-18T Simple Vector 16°C 连接过夜, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5α, 通过 α-互补的蓝白斑筛选挑选重组子, 经 PCR 和酶切鉴定确定阳性重组质粒。

1.4 PTD-NPY 融合表达载体的构建

PCR 和酶切鉴定正确的阳性重组克隆质粒分别用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后, 回收目的片段 PTD-NPY, 并与同样双酶切回收的表达载体 pPICZαA 在 16°C 连接过夜, 转化感受态 *E. coli* DH5α 菌株, 提取质粒, PCR 和双酶切鉴定正确后送上海联合基因科技有限公司测序, 并将获得的阳性重组表达质粒命名为 pPICZα-PTD-NPY。

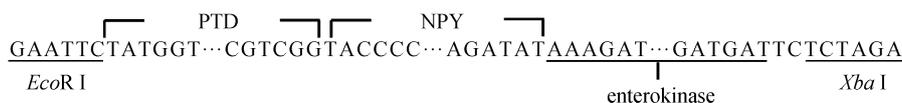


图 1 PTD-NPY 融合基因核苷酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of PTD-NPY fusion gene

1.5 重组表达质粒的线性化和电转化酵母细胞

取 5~10 μg 鉴定和测序正确的 pPICZ α -PTD-NPY 重组表达质粒, 用 *Sac* I 单酶切使之线性化, 琼脂糖凝胶电泳回收 3.7 kb 片段, -20°C 保存备用。

参照 Easy SelectTM Pichia Expression Kit (Version G) 操作说明书, 将酵母菌 GS115 制备成感受态, 取出 80 μL 与 10 μg 线性化的重组表达质粒 pPICZ α -PTD-NPY 混合, Bio-Rad GenePulser 电转仪于 1500 V、25 μF 和 200 Ω 条件下电转化, 立即加入 1 mL 1 mol/L 冰浴山梨醇。转化的酵母细胞涂布 YPD 平板 (ZeocinTM 抗性浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 30°C 培养 2~4 d。

1.6 阳性整合重组克隆的筛选

随机挑取白色酵母单菌落于 2 mL MD 培养基中 $28\sim 30^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 按照 TIANGEN 生化科技有限公司酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (目录号: DP307-02) 操作说明书提取酵母基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板, 分别以融合基因特异性引物和酵母表达载体通用引物, 并以空白表达载体转化的重组酵母菌基因组作为对照, 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 以鉴定线性化重组表达质粒在酵母基因组中的整合情况。PCR 鉴定阳性的重组子用于诱导表达。

1.7 阳性酵母重组克隆的活化和甲醇诱导表达

接种阳性重组酵母单菌落于 5 mL YPD 液体培养基 (ZeocinTM 抗性浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中, 30°C 培养过夜。按 1:50 转接于新鲜的 2 mL BMGY 培养基中, 30°C 、250 r/min 条件下震荡培养至菌液 $OD_{600}=2\sim 6$, 4000 r/min 室温离心 5 min, 弃上清, 15 mL BMMY 培养液悬浮细胞沉淀至 $OD_{600}=1.0$, 28°C 、250 r/min 条件下诱导表达培养, 每 24 h 补加甲醇至终浓度 1%, 连续培养 120 h, 室温最大转数离心 20 min 后收集上清, 超滤浓缩、透析除盐后 -20°C 保存。

1.8 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测

取浓缩除盐的培养上清与等量的 SDS-PAGE 上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min 后上样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 转膜进行 Western blotting 鉴定。

2 结果

2.1 PTD-NPY 融合基因的克隆

重叠延伸 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电

泳, 以 DNA DL2000 Marker 为分子质量标准, 获得了大小为 170 bp 的扩增带, 与预期大小相符, 表明成功扩增到 PTD-NPY 融合基因, 如图 2 所示。

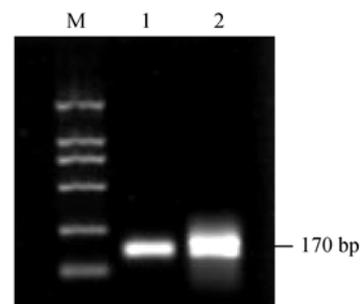


图 2 PTD-NPY 融合基因重叠延伸 PCR 扩增结果
Fig. 2 Result of PTD-NPY fusion gene amplified by overlap-extension PCR

M: DNA DL 2000 marker; 1, 2: PCR product of PTD-NPY fusion gene

2.2 重组表达质粒的鉴定

重组表达载体转化大肠杆菌, 提取质粒, 用融合基因特异性引物进行 PCR 扩增获得了目的条带 (如图 3 所示); 用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切重组表达质粒 pPICZ α -PTD-NPY, 获得了分别与融合基因大小相符和与空载体大小相符的 2 条带 (图 4), 结果显示 PTD-NPY 融合基因已正确插入表达载体中的相应酶切位点。测序结果表明重组表达载体中 PTD-NPY 融合基因序列与已知序列完全符合, 未发现突变的碱基, 且密码子阅读框正确, 表明成功构建含有 PTD-NPY 融合基因的重组酵母表达质粒 pPICZ α -PTD-NPY。

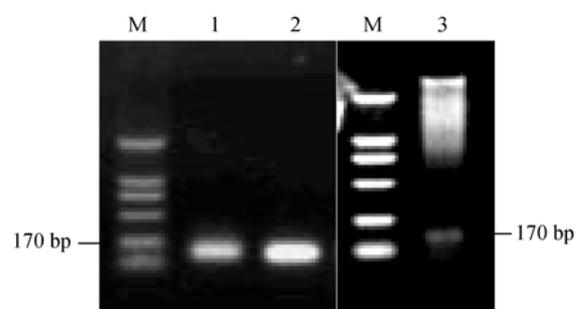


图 3 重组表达质粒 PCR 与双酶切鉴定结果
Fig. 3 Identification of recombinant expression vector by PCR and double enzyme digestion

M: DNA DL2000 marker; 1, 2: PCR products; 3: double enzyme digestion products

2.3 阳性整合重组菌株的筛选

提取重组酵母菌基因组 DNA 作为模板, 利用酵母

表达载体通用引物(5'AOXI 和 3'AOXI)和目的基因特异性引物进行 PCR 扩增, 产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳, 筛选含有目的基因片段的重组酵母菌株。从图 4 可以看出, 用表达载体通用引物, 阳性重组菌扩增出 696 bp (526+170)的片段, 而空载体对照菌只扩增出 526 bp 片段; 从图 5 可以看出, 用融合基因特异性引物, 阳性重组菌扩增出 170 bp 的目的片段, 而对照菌未扩增出目的条带, 表明线性化的 pPICZ α -PTD-NPY 与酵母菌 GS115 染色体基因组成功重组。

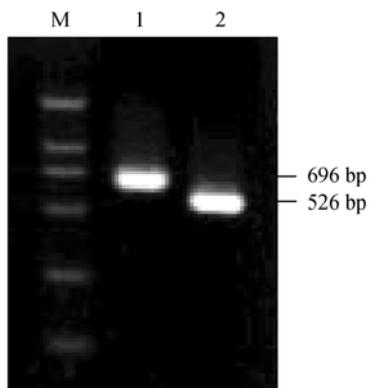


图 4 重组酵母基因组 DNA 表达载体通用引物 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR result of yeast DNA amplified with universal primer
M: DNA DL2000 marker; 1: positive yeast, 696 bp fragment; 2: control yeast, 526 bp fragment



图 5 酵母基因组 DNA 融合基因特异性引物 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR result of yeast DNA amplified with specific primer
M: DNA DL2000 marker; 1: positive yeast, 170 bp fragment; 2: PCR result of control

2.4 PTD-NPY 融合蛋白的诱导表达

挑取 pPICZ α -PTD-NPY 阳性重组酵母菌及 pPICZ α 对照菌落, 用 1%甲醇连续诱导 120 h 后离心取上清, 超滤浓缩透析除盐后, 进行 15% SDS- PAGE 电泳。由图 6 可见, 重组菌诱导表达上

清液在分子量约 9.37 kD 处有明显特异性条带出现, 而转入空载体的对照菌未见该条带。表明 pPICZ α -PTD-NPY 阳性重组酵母菌分泌表达了 PTD-NPY 融合蛋白。

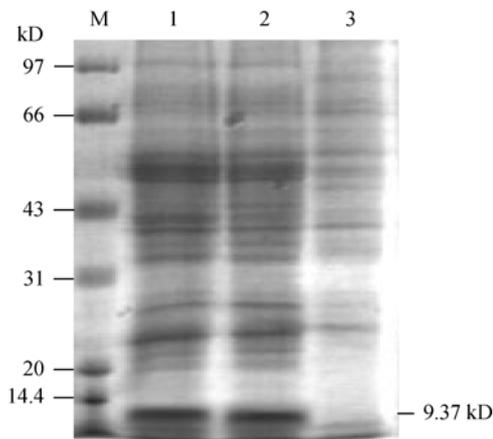


图 6 重组酵母诱导表达上清的 SDS-PAGE 结果
Fig. 6 SDS-PAGE Analysis of Recombinant Yeast Supernatants

M: Middle MW Protein Marker; 1, 2; Induced Positive Recombinant Yeast Supernatant; 3: Induced Control Yeast Supernatant

2.5 PTD-NPY 融合蛋白的鉴定

阳性重组菌及对照菌的诱导表达上清超滤浓缩透析除盐后, 进行 SDS-PAGE 电泳并转印到硝酸纤维素膜以后, 用抗 NPY 单克隆抗体进行结合后显色, 由图 7 可见, 在 9.37 kD 处出现一着色条带, 而其他部位和对照无着色。进一步确证阳性重组酵母菌分泌表达了具有免疫活性的 PTD-NPY 融合蛋白。

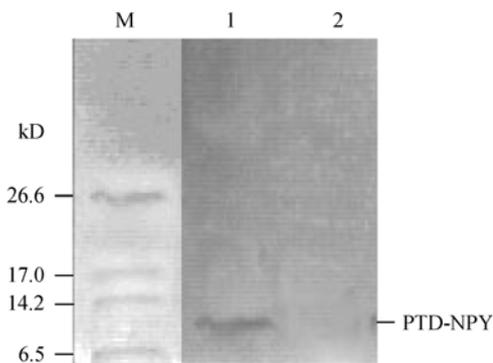


图 7 重组酵母诱导表达上清的 Western blotting 分析
Fig. 7 Western Blot Analysis of Recombinant Yeast Supernatants

M: prestained ultra-low M_w protein marker; 1: supernatant of positive recombinant yeast induced by 1% methanol; 2: supernatant of control yeast induced by 1% methanol

3 讨论

重叠延伸 PCR 技术(Gene splicing by overlap extension PCR, 简称 SOE PCR)由于使用了具有互补末端的引物,使 PCR 产物形成了重叠链,从而在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸,将不同来源的扩增片段重叠拼接起来^[7]。此技术利用 PCR 技术能够在体外进行有效的基因重组,而且不需要内切酶消化和连接酶处理,可利用这一技术很快获得其它依靠限制性内切酶消化的方法难以得到的产物。可简单迅速地将 2 个或 2 个以上异源基因 DNA 片段拼接在一起,用于融合基因的构建。本研究应用此项 PCR 技术成功构建了人源 PTD 与鼠源 NPY 的融合基因。

P. pastoris 基因表达系统是一种新型外源基因表达系统,兼有原核细胞良好的可操作性及真核表达系统的许多优点,如进行蛋白质的加工、折叠、转录后修饰等,而且酵母比哺乳动物细胞和病毒表达系统操作更简单迅速,费用也更便宜^[5]。毕赤酵母利用甲醇作为唯一的碳源,它有 2 个醇氧化酶基因 AOX1 和 AOX2,该基因具有很强的启动活性,毕赤酵母表达系统正是利用该启动子来启动外源蛋白的表达,并将其分泌到培养基中,分离纯化简便,因而是一种较为理想的真核蛋白表达系统^[8,9]。

NPY 是目前发现的唯一能使动物摄食过多的神经肽。应用 PTD 介导与其共价连接的 NPY 通过血脑屏障, NPY 发挥其生物学效应,作用于下丘脑,增进动物的食欲,提高采食量,从而充分发挥动物的生产潜力。迄今为止,国内外应用毕赤酵母表达外源蛋白及有关 NPY 生物学功能研究的报道较多,但未见有表达 PTD-NPY 融合蛋白及其生物学效应

研究的报道。本研究应用 pPICZ α A 表达载体,将应用重叠延伸 PCR 技术获得的 PTD-NPY 融合基因插入并整合到毕赤酵母菌 GS115 染色体基因组中,用 1%甲醇成功诱导其分泌表达,为其下一步在动物生产和医疗上的应用研究打下物质基础。

REFERENCES

- [1] Kalrasp, Dube MG, Pu SY, *et al.* Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 1999, **20**(1): 68–100.
- [2] Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 2004, **25**: 473–504.
- [3] Kalra SP, Dube MG, Sahu A, *et al.* Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 10931–10935.
- [4] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, *et al.* *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 1999, **285**: 1569–1572.
- [5] Borgheresi RA, Palma MS, Ducancel F, *et al.* Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris*. *Toxicon*, 2001, **39**(8): 1211–1218.
- [6] Zhao X, Huo KK, Li YY. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2000, **16** (3): 308–311. 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. *生物工程学报*, 2000, **16**(3): 308–311.
- [7] Horton RM, Cai ZL, Ho SN, *et al.* Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTech*, 1990, **8**(5): 528–535.
- [8] Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **79**(4): 438–449.
- [9] Sreerishna K, Brankamp RG, Kropp KE, *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**(1): 55–62.