

表达食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂的毕赤酵母菌株的构建

刘堰¹, 苏畅¹, 宋小双¹, 汤雅岚², 包振鸿²

1 西南大学生命科学学院, 重庆 400715

2 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093

摘要: 食血蝙蝠(*Desmodus rotundus*)在吸食大型动物血液时能保持创口处血流的畅通。本研究根据食血蝙蝠唾液中发现的纤溶酶原激活剂(Bat-PA, 另称 DSPA α 1)的全长基因序列(GenBank Accession No. J05082), 首次在体外人工合成 Bat-PA 全长基因并亚克隆到巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达载体 pPIC9K 上; 转化毕赤酵母菌株 GS115 后, 经甲醇诱导获得 DSPA α 1 的分泌型表达, 表达条带为 47 kD; 通过抗 G418 浓度梯度筛选、毕赤酵母中小量表达后 SDS-PAGE 电泳检测以及纤维平板法测活, 筛选出高表达的 DSPA α 1 稳定菌株, 对电泳中的目的蛋白条带进行密度扫描测定, 产量达到约 30 mg/L。目前, DSPA α 1 主要来自哺乳动物细胞, 如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、胚胎卵巢肾细胞(BHK)、非洲绿猴肾细胞(COS), 代价高昂。在毕赤酵母中生产 DSPA α 1 可以降低成本, 增加产率, 为探索 Bat-PA 作为新一代溶栓剂奠定基础。

关键词: 食血蝙蝠, 纤溶酶原激活剂, 毕赤酵母, 高效表达, 纤维平板法

Construction of *Pichia pastoris* strain expressing salivary plasminogen activator from vampire bat (*Desmodus rotundus*)

Yan Liu¹, Chang Su¹, Xiaoshuang Song¹, Yalan Tang², and Zhenhong Bao²

1 School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: Vampire bat saliva contains a plasminogen activator that presumably assists these hematophagous animals during feeding. Bat-PA (H), the full-length form of Vampire Bat Salivary Plasminogen Activator (DSPA α 1), is homologous and similar efficacy to tissue-type plasminogen activator (t-PA). The strict fibrin dependence of activity is a characteristic which could be desirable in the fibrinolytic therapy. It is a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. In this study, according to the reported gene sequence (GenBank Accession No. J05082) of Vampire bat (*D. rotundus*) plasminogen activator. It was the first time to synthesize the full sequence of DSPA α 1 *in vitro* and clone it into the expression vector pPIC9K, the recombinant plasmid was linearized and transformed into *Pichia pastoris* GS115 strain. Secreted expression of recombinant DSPA α 1 was attained by methanol induction and its molecular mass is 47 kD. To get recombinant GS115 with high amount of protein, hundreds of His⁺ transformants had been screened to isolate clones resistant to high levels G418 (2–4 mg/mL), the selected clones mini-expressed in *Pichia pastoris*,

Received: August 13, 2008; **Accepted:** January 20, 2009

Supported by: Chongqing Natural Science Foundation (No. CSTC2007BB5353).

Corresponding author: Yan Liu. Tel: +86-23-68252365; E-mail: liuyan@swu.edu.cn

重庆市自然科学基金项目(No. CSTC2007BB5353)资助。

and tested their fibrinolytic activities and expressed protein bands by fibrin plate assay and SDS-PAGE. DSPA α 1 was determined by optical density after SDS-PAGE, the yield is about 30 mg per liter of fermentation culture. DSPA α 1 derived often from mammalian cells: Chinese hamster ovary (CHO) cells, Baby hamster kidney (BHK) cells, COS cells, which might be produced at high cost. In *Pichia pastoris*, it is expected to higher yield and lower cost, thus it might be able to serve as new thrombolytic candidate.

Keywords: vampire bat, plasminogen activator, *Pichia pastoris*, high expression, fibrin plate assay

吸血蝙蝠在分类学上隶属于吸血蝙蝠科、吸血蝙蝠属, 共有 3 种, 即普通吸血蝙蝠、白翼吸血蝙蝠和毛腿吸血蝙蝠。它们几乎都分布在美洲中部和南部的热带和亚热带丛林地区。吸血蝙蝠的牙齿非常特殊, 犬齿长而尖锐, 上门齿很发达, 略带三角形, 锋利如刀, 可以刺穿其他大型动物的突出部位而饱食鲜血, 而且蝙蝠吸完血液后伤口会长时间血流不止。宾夕法尼亚州西点军校 Merck Sharp & Dohme 研究室^[1]发现食血蝙蝠(*Desmodus rotundus*)唾液中含有能促使血液流动抑制血液凝固的因子, 称为食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂(Bat-PA), 其中含有 4 种形式的纤溶酶原激活剂, 即 DSPA α 1、DSPA α 2、DSPA β 和 DSPA γ , DSPA α 1, 又称 Bat-PA(H)^[2], 含有 477 个氨基酸的高分子蛋白, 相对分子质量为 4.3 kD。DSPA α 1 能以专一的单链分子催化溶栓反应, 且在结构上与人 t-PA 具有高度同源性(85%), 是新一代纤溶酶原激活剂^[3]。DSPA α 1 与 t-PA 相比, 具有更高的纤维蛋白特异性^[4]。DSPA α 1 有和 t-PA 相同的促血凝块消散能力, 但对纤维蛋白原(Fibrinogen), 纤溶酶原(Plasminogen, Pg), α 2 抗纤溶酶(α 2-antiplasmin)的消耗最小^[5, 6]。在动物实验中显示出比 t-PA 更快更持久的再灌注能力, 溶栓能力比 t-PA 强, 半衰期长 3 倍, 清除率慢 4~8 倍, 且不伴随全身性纤维蛋白原溶解, Pg 和 α 2 抗纤溶酶仅少量减少, 出血现象与 t-PA 相比减少。

DSPA α 1 现已由基因工程重组技术制造, 并在 CHO 细胞和昆虫细胞中进行了表达^[7], 其蛋白质一级结构有 477 个氨基酸残基, 其中含有 30 个半胱氨酸, 在原核生物如大肠杆菌中表达易发生二硫键错配而丧失生物活性, 因而是非现实的。DSPA α 1 目前主要在 CHO 细胞中生产, 由哺乳动物细胞培养产生的重组蛋白, 其氨基酸顺序与天然物相同^[8], 是唯一不会引起神经细胞退化的纤溶酶^[9, 10], 并且对其在急性局部缺血性中风中的应用进行了研究, 具有

良好的效果^[11]。

虽然 DSPA α 1 的临床试验仍在进行, 尚难肯定是否优于 t-PA, 但食血蝙蝠唾液含有 4 种形式的纤溶酶原激活剂, 分别具有纤维蛋白特异性和非纤维蛋白特异性, 其结果是使食血蝙蝠可以畅通无阻地吸食大型动物的血液。这无疑是自然界一个天然实验, 4 种 Bat-PA 组分同时存在促进纤溶, 但纤维专一性和纤维非专一性成分在溶栓过程中的作用是协同或是拮抗, 研究很不充分。另外, 由于 DSPA α 1 的临床用量在几十毫克, 若以目前采用的哺乳动物细胞表达系统生产, 产量低成本高, 导致价格昂贵, 加重病人的负担。而且, 任何生物制品完成 I/II 期临床必需制备高达克数量级的样品, 进入 III 期临床要增加到千克水平。为了将 DSPA α 1 开发成对溶栓有明显有效且副作用小的药物, 需要更高数量级的样品供动物与临床实验使用。

为此, 本研究通过基因工程重组技术, 首先人工合成食血蝙蝠纤溶酶原激活剂(Bat-PA)的全长基因, 获得高效表达食血蝙蝠纤溶酶原激活剂的菌株, 以毕赤酵母表达系统替代目前哺乳动物细胞表达系统, 应用大规模发酵技术, 达到高效低廉地获得产量达到高数量级的溶栓剂 DSPA α 1 样品, 从而解决其临床用药的样品数量问题。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、质粒和宿主菌

制备抗体使用新西兰白兔 (*Oryctolagus cuniculus domestica*), 购于南京某农贸市场; *P. pastoris* GS115 (his4) 甲醇表达宿主菌, *P. pastoris* 整合型分泌表达质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; 克隆宿主菌 *E. coli* Top10, 质粒 pET28a, 表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 由本实验室保存; pUC57 购自上海生工。

1.1.2 酶和其他试剂

各类限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、pyrobestDNA 聚合酶等购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司, DNA 序列: Bat-PA(H)基因, 食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂全长基因由上海生工全长合成, 引物序列由上海博彩生物工程公司合成, Bovine Fibrinogen 购自 Sigma 公司, G418 购自北京欣经科生物技术公司, 柱离心胶回收试剂盒购自上海华舜公司, urokinase、thrombin 购自南京大学生化药厂, IPTG 购自上海捷倍思, PVDF 膜购自 Roche 公司, 分子量蛋白质标准品: 磷酸化酶 b(94 kD), 牛血清白蛋白(67 kD), 卵清蛋白(43 kD), 碳酸酐酶(30 kD), 大豆胰蛋白酶抑制剂(20 kD)和 α -乳清蛋白(14.4 kD) 购自 pharmacia 公司, 兔抗吸血蝙蝠(*Desmodus rotundus*)Bat-PA 抗血清由本室制备, 羊抗兔 IgG-HRP 购自华美上海生物工程公司, 其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 1%胰化蛋白胨, 1%氯化钠, 0.5%酵母提取液, pH 7.0; LB-AMP 培养基: LB 加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素用于 *E. coli* 的培养。RDB 平板: 1 mol/L 山梨醇, 2%葡萄糖, 1.34% YNB(Yeast nitrogen base), $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 0.005%氨基酸(L-谷氨酸, L-蛋氨酸, L-赖氨酸, L-异亮氨酸), 2%琼脂用于 Bat-PA/pPIC9K 转化 GS115 后的培养; YPD 培养基: 1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖用于 *P. pastoris* GS115(his4)的培养; MD 平板: 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 2%葡萄糖, 1.5%琼脂和 MM 平板: 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 0.5%甲醇, 1.5%琼脂用于 Mut^+ 和 Mut^s 型转化子的筛选; BMGY 培养基: 1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 1%甘油用于酵母生物量的积累; BMMY 培养基: 用 0.5%甲醇代替 1%甘油用于外源蛋白质的诱导表达。

1.2 方法

1.2.1 合成食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂全长基因

Bat-PA 基因全长序列(GenBank Accession No. J05082), 由上海 Sangon 生物工程公司体外人工全长合成, 并克隆到质粒 pUC57 中。

1.2.2 毕赤酵母表达载体 Bat-PA/pPIC9K 的构建^[12]

用 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切质粒 Bat-PA/pUC57 和

载体 pPIC9K, PCR 筛选阳性克隆, 使用 pPIC9K 上的 5'AOX1、3'AOX1 引物进行测序验证。

1.2.3 大肠杆菌表达载体 Bat-PA/pET28a 的构建^[12]

使用引物 up primer(5'-CCGGAATTCGCATATGGTGTGGCCTGCAG-3', 下划线为 *Eco*R I 酶切位点)和引物 down primer(5'-CCGCTCGAGTTATGGGCGCATGTTGTCTCG-3', 下划线为 *Xho* I 酶切位点), PCR 扩增 Bat-PA 片段, 插入到 pET28a 载体中。PCR 筛选阳性克隆, 并进行测序验证。

1.2.4 DNA 序列测定

由上海联合基因博彩公司用 ABI 377 或者 3700 自动测序仪完成。

1.2.5 重组质粒转化毕赤酵母 GS115

Bat-PA/pPIC9K 质粒 DNA 用 *Sac* I 酶切线性化, 电击转化 GS115。操作参见 Invitrogen Kit 手册。

1.2.6 *P. pichia* 菌落 PCR 直接鉴定重组子^[12]

1.2.7 筛选 PCR 阳性克隆的 *Mut* 基因型

将 RDB 板上生长的克隆同时接种于 MD、MM 平板上, 若该克隆在 MD 和 MM 板上都能生长, 则为 Mut^+ 型, 即甲醇利用快型; 若该克隆只能 MD 板上生长, 则为 Mut^s 型, 即甲醇利用慢型。不同的 *Mut* 基因型, 表达的方法也不同。

1.2.8 G418 筛选多拷贝 *P. pastoris* 工程菌^[13]

1.2.9 *P. pastoris* 中外源蛋白的小量诱导表达

将筛选出的 $\text{His}^+ \text{Mut}^+$ 单克隆诱导表达。操作参见 Invitrogen Kit 手册。

1.2.10 蛋白质的定量分析^[14]

1.2.11 SDS-PAGE 分析

Grab-it 2.5 和 Gelwork(UVP)软件进行密度扫描定量分析。

1.2.12 Western Blotting 分析^[12]

1:200 稀释兔抗 Bat-PA 多克隆抗体(用重组质粒 Bat-PA/pET28a、*E. coli* BL21(DE3)和新西兰白兔自制), 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG。

1.2.13 重组 Bat-PA 的活性测定^[15]

2 结果

2.1 重组质粒 Bat-PA/pPIC9K 的构建及筛选

在体外人工合成 Bat-PA 的全长基因序列(图 1), 并克隆到质粒 pUC57 的多克隆位点中, 用 *Xho* I 和

EcoR I 双酶切获得目的基因 Bat-PA(图 2)。

毕赤酵母表达载体质粒 pPIC9K 有 2 个 *Xho* I 酶切位点和一个 *EcoR* I 酶切位点, 首先对该质粒进行 *Xho* I 部分酶切, 每 10 min 检测一次, 50 min 后质粒完全酶切, 从而确定 *Xho* I 部分酶切时间为 20 min,

胶回收大片段(图 3A), 再用 *EcoR* I 完全酶切获得连接用 pPIC9K。将目的基因连接到 pPIC9K 上, 连接产物转化大肠杆菌 TOP10, 菌落 PCR 筛选阳性重组子(图 3B)。对其中的一个阳性克隆做正反向测序, 结果表明序列与目的基因一致, 构建正确。

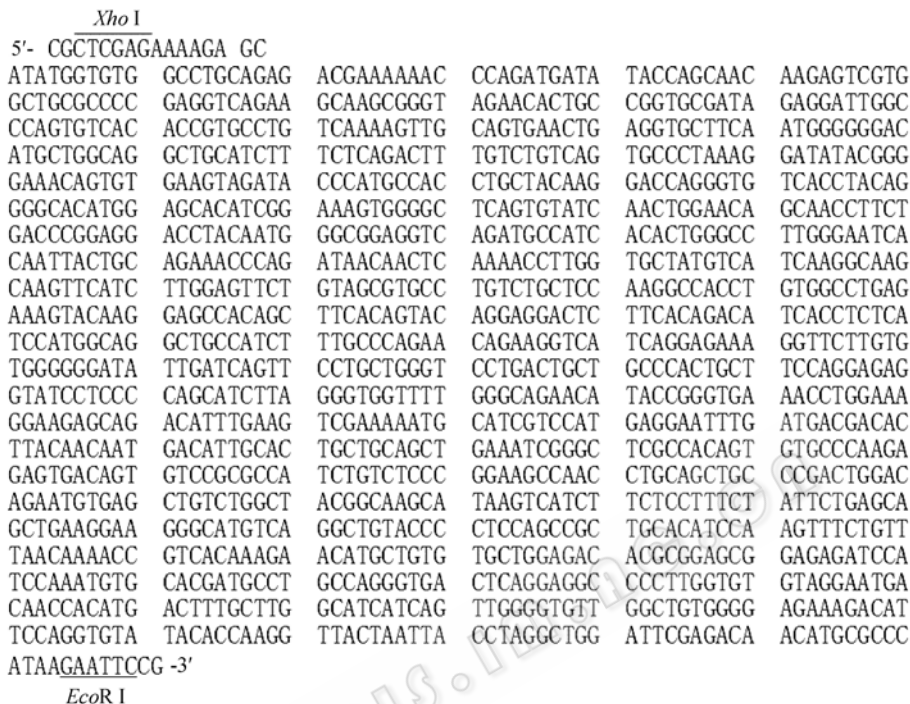


图 1 人工合成的 Bat-PA 全长基因序列
Fig. 1 Bat-PA full-length gene sequence for synthesis.

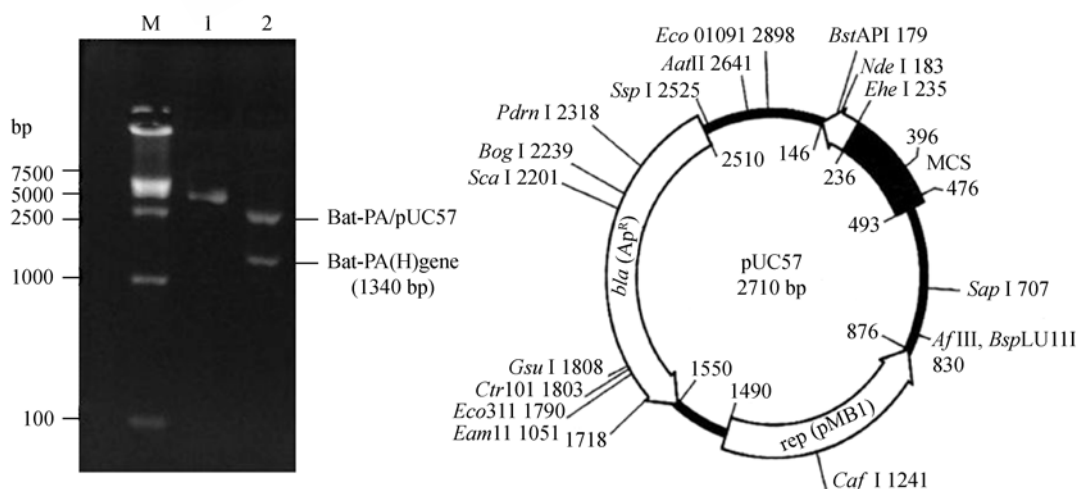


图 2 载体 pUC57 和 Bat-PA 目的基因酶切电泳图
Fig. 2 Diagram of vector and Bat-PA gene cutted from pUC57. M: DNA marker DL15000; 1: plasmid Bat-PA/pUC57; 2: digestion of plasmid Bat-PA/pUC57 with *Xho* I and *EcoR* I.

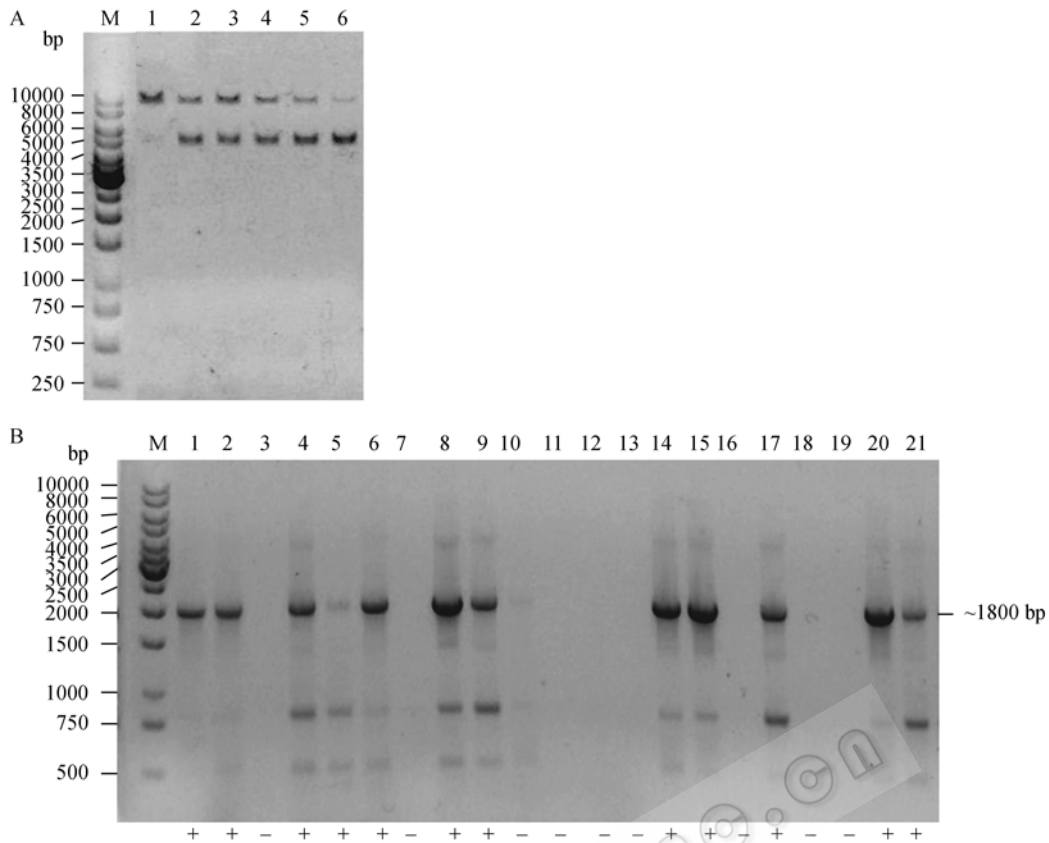


图3 *Xho* I 分部酶切质粒载体 pPIC9K 图示(A)及菌落 PCR 筛选含有 Bat-PA 的 TOP10 阳性重组子(B)

Fig. 3 Partial digestion of plasmid pPIC9K with *Xho* I for construction. (A) M: DNA marker; 1: plasmid pPIC9K; 2-6: digestion pPIC9K with *Xho* I in 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, respectively. (B) PCR screening for pPIC9K-Bat-PA/TOP10 positive clones. M: DNA marker; 1-21: PCR amplification screening for positive recombinant clones respectively, the arrow at ~1800 bp indicated the PCR product of α -MF signal-Bat-PA expression cassette in positive transformants using 5' and 3' AOX1 primers, "+", "-" represented positive and negative clones respectively, positive clones were as follows: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 14, 15, 17, 20, 21.

2.2 *Pichia pastoris* 表达菌株的构建与筛选

转化 *P. pastoris* 前首先用 *Sal* I 或 *Sac* I 酶切大量 Bat-PA/pPIC9K 质粒(约 10 μ g), 线性化 DNA(图 4)通过原生质球法或电转化法转化到 *P. pastoris* 菌株 GS115, 通过同源重组产生稳定的转化子。用组氨酸缺陷性 RDB 板初步筛选生长起来的 His⁺阳性重组子, 一般只有发生同源重组的菌株才能在 RDB 板上生长, 菌落 PCR 筛选以确保是阳性重组子(图 5)。

2.3 G418 平板筛选高拷贝重组 *Pichia pastoris* 菌株

经 MM、MD 平板筛选发现, 克隆在 2 个板上均能生长, 说明阳性克隆都是 Mut⁺型。再用 G418 浓度梯度平板筛选高拷贝克隆(图 6)。G418 浓度梯度筛选 96 \times 2 个克隆, 结果: 抗 G418 浓度 2.0 mg/mL: 2', 17', 24', 29', 33', 37', 38', 39', 45', 51'; 抗 G418 浓度 3.0 mg/mL: 2[#], 37[#], 53[#], 72[#], 75[#], 80[#]; 抗 G418 浓度 4.0 mg/mL: 37[#]、72[#]。

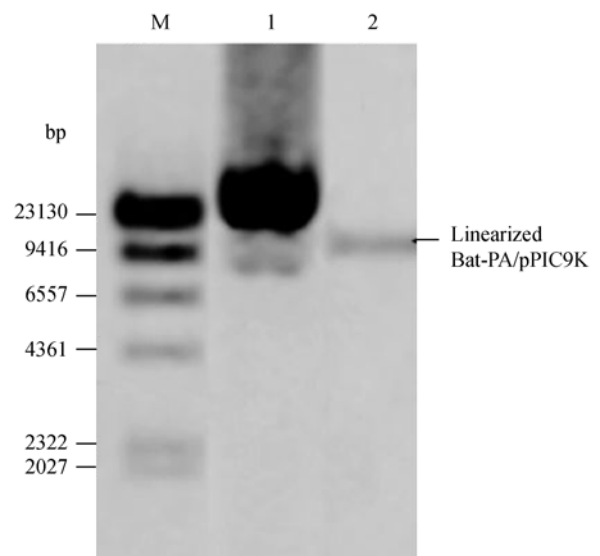


图4 *Sac* I 单酶切重组质粒 Bat-PA/pPIC9K

Fig. 4 Recombinant plasmid Bat-PA/pPIC9K *Sac* I digestion. M: λ -Hind III digest DNA marker; 1: plasmid Bat-PA/pPIC9K; 2: linearized Bat-PA/pPIC9K with *Sac* I.

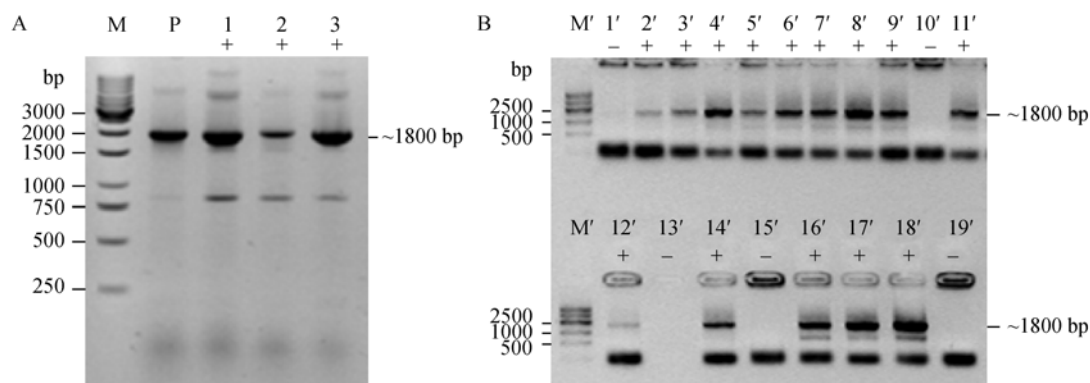


图 5 酵母菌落 PCR 筛选电转化阳性重组子

Fig. 5 Yeast PCR screening after *Sac* I digestion and electroporation. (A) M: DNA marker; P: positive control, PCR cycles were performed when plasmid Bat-PA/pPIC9K as template; 1-3: yeast PCR screening for pPIC9K-Bat-PA/GS115 positive clones. (B) M': DNA marker; 1'-19': yeast PCR screening for pPIC9K-Bat-PA/GS115 positive clones, the arrow at ~1800 bp indicates the PCR product of α -MF signal-Bat-PA expression cassette in positive transformants using 5' and 3' AOX1 primers. "+", "-" represented positive and negative clones respectively.

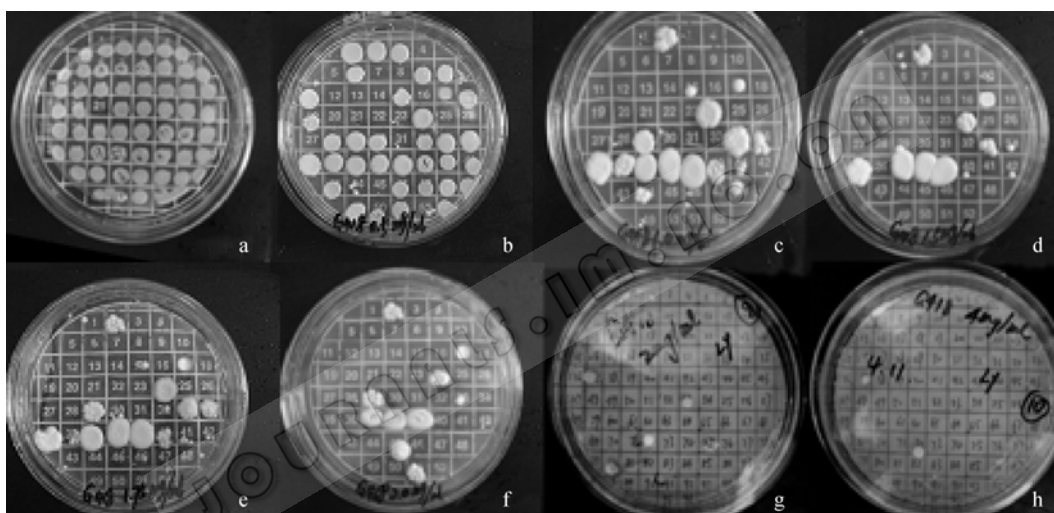


图 6 G418 筛选高拷贝重组子

Fig. 6 G418 screening recombinants with high copies. a-h; G418: 0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.75 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 4.0 mg/mL respectively.

2.4 SDS-PAGE 及纤溶平板测活法分析高表达重组 *Pichia pastoris* 菌株

G418 浓度梯度平板筛选后, 将上述获得的抗 G418 浓度 2.0 mg/mL 及其以上浓度的克隆小量表达, 表达上清用三氯乙酸沉淀蛋白浓缩 15 倍后, SDS-PAGE 电泳检测高表达菌株(图 7)。发现 17'、24'、72[#]克隆表达量较高, 用纤溶平板测定小量表达的 Bat-PA 的纤溶活性, 从生物学功能上做进一步的分析筛选。

筛选出的高拷贝高表达克隆小量表达后, 用纤维蛋白平板测定纤溶活性表明, 原生质球 Kit 转化

得到的 17', 24' 克隆和电转得到的 2[#], 37[#], 53[#], 72[#] 克隆具有高纤溶活性(图 8), 结合 SDS-PAGE 分析的结果, 将 17'、24'、72[#] 作为工程菌保存。

2.5 Western blotting 分析表达的食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂(Bat-PA)

将构建好的表达载体 Bat-PA/pET28a 转化 *E. coli* (DE3), 得到 Bat-PA 包涵体, 用该包涵体免疫新西兰兔, 制备到 Bat-PA(H) 的兔多克隆抗体, Western blotting 的结果显示, 在相应位置出现特异的免疫条带(图 9), 说明在毕赤酵母中表达的 Bat-PA(H), 其分子量在 45~47kD 的范围内。

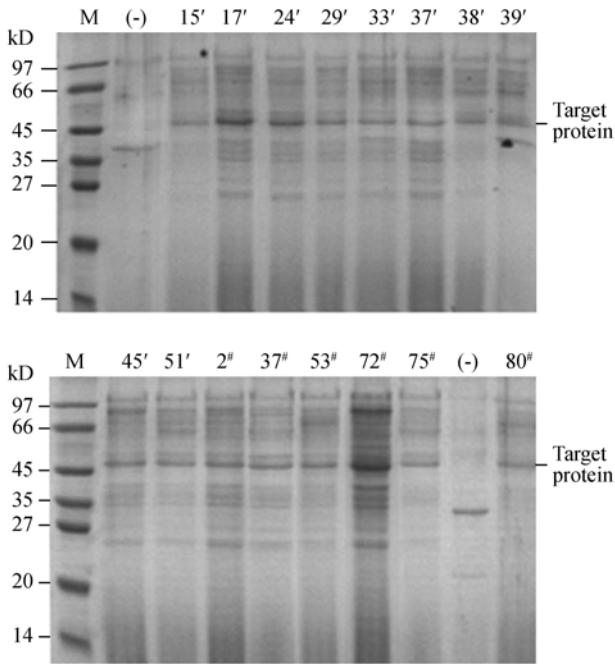


图7 SDS-PAGE 筛选高表达重组菌株

Fig. 7 SDS-PAGE screening high expression recombinant strain. M: protein marker; (-): negative control expressed GS115; other lanes: expressed Bat-PA recombinant strains with resistant to high levels G418 (2–4 mg/mL) respectively and expression levels in 17', 24' and 72# strains were about ~25% of total secreted proteins.

3 讨论

食血蝙蝠全部分布在中、南美洲,它能够畅通无阻地吸食大型哺乳动物的血液,主要是因为它的唾液里含有与组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)同源的

物质,利用这种物质可望研制出治疗缺血性脑梗死的药物。研究发现食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂 Bat-PA(H), 又称 DSPA α 1, 有望成为治疗缺血性脑梗死的新型溶栓剂,目前在白鼠身上进行的实验结果令人鼓舞。作为治疗缺血性脑梗死的治疗药物现在主要是 t-PA, 但 t-PA 只适用于早期,必须在脑梗死发生 3 h 以内用药。DSPA α 1 可以在脑梗死发生最长 9 h 以内用药,对大脑的损伤较小,而且其活性与 t-PA 相差无几。DSPA α 1 主要是在哺乳动物细胞中表达,如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、胚胎卵巢肾细胞(BHK)、非洲绿猴肾细胞(COS)等,生产成本较高。这些结果促使研究人员寻找一种高效低廉地获得 DSPA α 1 的生产“线”,为其临床应用奠定基础。体外人工合成食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂 Bat-PA 全长基因序列(即 DSPA α 1),并构建毕赤酵母高效表达菌株,以期在毕赤酵母系统中表达与纯化,从而获得 DSPA α 1 正是出于这样的目的。

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)表达系统是上世纪 80 年代初期发展起来的一种新型的外源蛋白表达系统,它既具有原核表达系统操作简易、易于培养、生长速度快、表达量高、成本低等优点^[16],作为真核生物,毕赤酵母还可以进行类似哺乳动物细胞的蛋白翻译后修饰,如信号肽的加工、蛋白质折叠、二硫键的形成、糖基化和磷酸化修饰等^[17]。在大多数酵母中,寡糖链通过增加甘露糖残基得到延长。在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中每个寡糖链平均包括

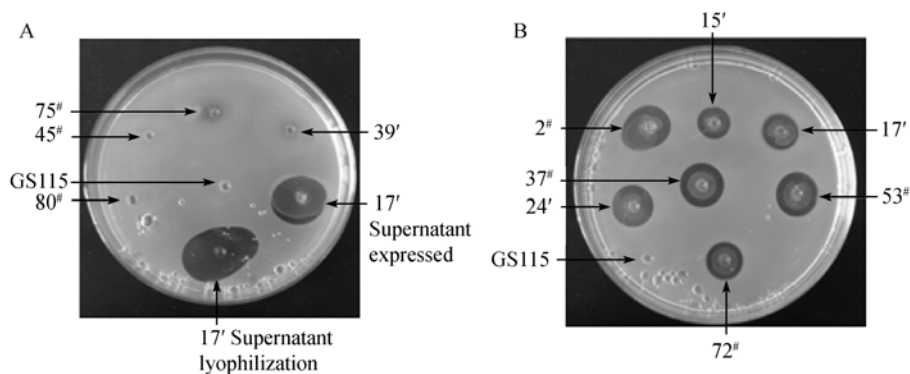


图8 纤溶平板裂解法测定表达的 Bat-PA 纤溶酶原激活剂

Fig. 8 Lysis of fibrin plates with expressed Bat-PA plasminogen activator. After the selected clones mini-expressed in *Pichia pastoris* and test expressed protein bands by SDS-PAGE, their fibrinolytic activities by fibrin plate assay. (A) 17' expressed supernatant and 17' supernatant lyophilization show higher activities; GS115 as negative control; 39', 45', 75', 80# show no activities. (B) 2#, 37#, 53#, 72#, 15', 17', 24' show activities; GS115 as negative control.

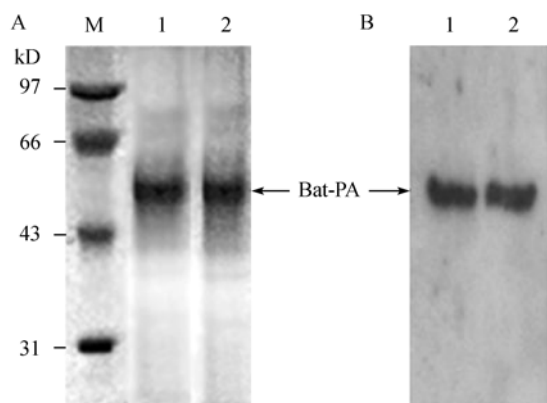


图 9 表达的 rBat-PA 的 SDS-PAGE(A)和 Western blotting(B)分析

Fig. 9 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of rBat-PA expression. (A) Analysis of rBat-PA expression. 1, 2: supernatant sample from recombinants; M: protein marker. (B) Western blotting. 1, 2: supernatant sample from recombinants.

50~150 个通过 α -1, 3 键连接的甘露糖残基。而在 *P. pastoris* 中, 寡糖链上增加的甘露糖残基数目较少并且缺少发生在 *S. cerevisiae* 外部寡糖链上的 α -1, 3 键连接。因此 *P. pastoris* 中的糖基化可能与哺乳动物细胞中的情况相似。已有研究表明^[7], 在 CHO 表达系统和 Sf9 昆虫细胞表达中, 两者对表达的重组蛋白 DSPA α 1 糖基化模式完全不同, CHO 细胞来源的 DSPA α 1, 与天然的 DSPA α 1 一样, 含有复杂的糖链结构, 为含有唾液酸这种复杂的糖结构和富含甘露糖的糖结构或者两者都有的混合类型; 而昆虫细胞来源的 DSPA α 1 含有高甘露糖结构, 但两者的酶活性完全相同且在酶活特异性上未见明显差异。糖基化会对 *P. pastoris* 中表达的外源蛋白产生一定的影响。尽管 *P. pastoris* 中有可能发生过度糖基化而且糖基化的模式有待进一步确定, 本研究发现 DSPA α 1 在 *P. pastoris* 中能高效稳定表达并纯化, 同时具有高纤溶活性, 可见这种糖基化却并不影响分泌表达的 DSPA α 1 的天然构象和生物学活性, 因此可以说明 *P. pastoris* 系统与 CHO 细胞系统表达的 DSPA α 1 在结构和功能上基本一致。另外, 食血蝙蝠唾液纤溶酶原激活剂的第 2 种形式-DSPA α 2 在毕赤酵母中已成功表达^[18], 构建过程中对载体 pPIC9K 进行了重构, 插入一段人巨细胞病毒增强子序列 (HCMV), 使其表达量大大提高, 表达量约为 25 mg/L, 但纤溶活性较 DSPA α 1 低。DSPA α 1 在含增强子的 CHO 细胞中的表达量为 60 mg/L, 本实验

在未加增强子的情况下表达量大约可达 30 mg/L。故在以后的研究中可考虑插入一段合适的增强子序列 (如 HCMV) 以期获得更高表达量。

外源蛋白在毕赤酵母 (*P. pastoris*) 中的分泌表达需信号肽的引导。外源蛋白的天然分泌信号常不能被酵母表达系统完全利用, 故多采用酵母自身的信号肽^[19]。本研究在构建重组表达载体时设计除去了 DSPA α 1 本身的信号肽序列, 采用了属于酵母自身的 α -MF。蛋白质在分泌的过程中, 通过形成二硫键进行自我折叠并通过切除部分肽段成熟。纯化得到的 DSPA α 1 分子量约为 47 kD, 与天然来源的 DSPA α 1 分子量相似^[1]; 纤溶平板法测活显示其高纤溶活性(纯化过程及测活结果另文发表)。而一般在 CHO 细胞中表达的 DSPA α 1, 带有自身的一段信号肽序列, 故其分子量为 52 kD, 如果切除此信号肽序列成熟, 两者分子量基本相同。

REFERENCES

- [1] Gardell SJ, Duong LT, Diehl RE, *et al.* Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1989, 264(30): 17947-17952.
- [2] Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, *et al.* The plasminogen activator family from the salivary gland of the vampire bat *Desmodus rotundus*: Cloning and expression. *Gene*, 1991, 105: 229-237.
- [3] Kratzschmar J, Haendler B, Bringmann P, *et al.* High-level secretion of the four salivary plasminogen activators from the vampire bat *Desmodus rotundus* by stably transfected baby hamster kidney cells. *Gene*, 1992, 116(2): 281-284.
- [4] Bergum PW, Gardell SJ. Vampire bat salivary plasminogen activator exhibits a strict and fastidious requirement for polymeric fibrin as its cofactor, unlike human tissue-type plasminogen activator: A kinetic analysis. *J Biol Chem*, 1992, 267(25): 17726-17731.
- [5] Gardell SJ, Hare TR, Bergum PW, *et al.* Vampire bat salivary plasminogen activator is quiescent in human plasma in the absence of fibrin unlike human tissue plasminogen activator. *Blood*, 1990, 76(12): 2560-2564.
- [6] Hare TR, Gardell SJ. Vampire bat salivary plasminogen activator promotes robust lysis of plasma clots in a plasma milieu without causing fluid phase plasminogen activation. *Thromb Haemost*, 1992, 68: 165-169.
- [7] Petri T, Langer G, Bringmann P, *et al.* Production of vampire bat plasminogen-activator DSPA alfa1 in CHO and insect cells. *J Biotechnol*, 1995, 39(1): 75-83.
- [8] Verstraete M, Lijnen HR, Collen D. Thrombolytic agents in development. *Drugs*, 1995, 50: 29-42.

- [9] Liberatore GT, Samson A, Bladin C, *et al.* Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke*, 2003, **34**(2): 537–543.
- [10] Reddrop C, Moldrich RX, Beart PM, *et al.* Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) inhibits tissue-type plasminogen activator-induced potentiation of excitotoxic injury. *Stroke*, 2005, **36** (6): 1241–1246.
- [11] Pugsley M, Petersen KU, Gupta S, *et al.* Recombinant desmodus salivary plasminogen activator (desmoteplase) in acute ischemic stroke. *Stroke*, 2006, **37**(2): 656–656.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [13] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology*, 1994, **12**(2): 181–184.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248.
- [15] Marsh NA, Gaffney PJ. Rapid fibrin plate-method for plasminogen activator assay. *Thromb Haemostasis*, 1977, **38**(2): 545–551.
- [16] Siegel RS. Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng*, 1989, **34**: 403–404.
- [17] Borgheresi RA, Palma MS, Ducancel F, *et al.* Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris*. *Toxicon*, 2001, **39**: 1211–1218.
- [18] Wei ZR, Wang YJ, Li GQ, *et al.* Optimized gene synthesis, expression and purification of active salivary plasminogen activator α_2 (DSPA α_2) of *Desmodus rotundus* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2008, **57**(1): 27–33.
- [19] Pan X, Cao GW, Ke CW, *et al.* Structure and function of vascular endothelial growth factor and its related proteins. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1999, **31**(4): 357–361.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

基因表达谱数据挖掘方法研究

黄德双 著

978-7-03-023680-7 ¥ 88.00 2009年3月出版

基因表达谱数据挖掘可以帮助人们发现新的疾病亚型，提高复杂疾病诊断的正确率。因此，发展高效实用的基因表达谱数据处理方法具有十分重要的实际意义。本书首先介绍生物信息学中基因芯片和基因表达谱等一些基本概念，然后利用 Relief、Fisher 判别、Wilcoxon 和 Kruskal Wallis 秩和检验方法、信噪比方法、主成分分析方法、因子分析方法、独立分量分析方法、经典粗糙集和邻域粗糙集、人工神经网络和集成神经网络、小波包变换和离散余弦变换、遗传算法和遗传规划、流形学习、张量分析等方法，系统研究了基于基因表达谱的肿瘤亚型数据挖掘方法(包括特征提取与分类识别等)。设计多种基因表达谱分类识别算法，并结合 SVM、NSC、FLDA、DLDA 等多种分类器及集成分类器，进行大量的基因表达谱分类识别实验，以图和表的形式给出大量实验结果，同时对各种方法的性能进行比较。系统研究基于基因调控概率的肿瘤基因表达谱数据挖掘方法，结合 Filter 和 Wrapper 两种特征选择方法的优点，研究基于支持向量机和惩罚策略(SVPS)的肿瘤关键基因选择算法。设计基于标准遗传算法和多目标遗传算法的集成基因表达谱特征选择方法。

本书适合国内高校和科研院所生物和信息领域中从事生物信息学教学和研究的教师、高年级本科生、研究生和科技人员，对于其他与生物信息学研究有关及有志于从事这一领域研究的计算机科研人员也是必备的参考读物。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>