

磷脂转运蛋白在毕赤酵母中的高效表达

马百坤, 方 蓉, 徐东刚¹, 邹民吉¹, 黄宇烽, 庄一义

(南京军区南京总医院医学检验中心, 江苏省南京市 210002; 1. 军事医学科学院基础医学研究所分子遗传室)

[主题词] 磷脂转运蛋白; 基因表达; 克隆; 聚合酶链反应; 毕赤酵母细胞

[摘要] 为深入了解磷脂转运蛋白的结构和功能, 从中国人胎肝组织总 RNA 成功克隆了磷脂转运蛋白成熟肽基因, 所得磷脂转运蛋白基因通过同源重组整合至毕赤酵母细胞染色体的醇氧化酶 AOX1 基因中, 甲醇诱导后经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示诱导表达蛋白分子量约 75 kDa, 薄层扫描显示表达蛋白占酵母蛋白总量的 28%, 为大量制备重组磷脂转运蛋白奠定了基础。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

High Level Expression of Human Phospholipid Transfer Protein in the Yeast *Pichia Pastoris*

MA Bai-Kun, FANG Rong, XU Dong-Gang¹, ZOU Min-Ji¹, HUANG Yu-Feng, and ZHUANG Yi-Yi

(Center of Medical Laboratory Sciences of PLA, Jinling Hospital, Nanjing 210002; 1. Institute of Basic Medical Science, Beijing 100850, China)

[MeSH] Phospholipid Transfer Protein; Gene Expression; Cloning; PCR; *Pichia Pastoris*

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the high level expression of human phospholipid transfer protein in the yeast *pichia pastoris*. **Methods** Total RNA was prepared from Chinese fetal liver tissue, cDNA fragment encoding human phospholipid transfer protein was amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction using specific primers, and then was integrated into the chromosomes of *pichia pastoris* GS115 via homologous recombination. Recombinant human phospholipid transfer protein was expressed under the control of the promoter of the alcohol oxidase gene(AOX1) and was detected by SDS-PAGE. **Results** Five recombinant colony among 20 colonies grown poorly on MM plates was selected which highly expressed human phospholipid transfer protein. The molecular weight of recombinant phospholipid transfer protein was estimated about 75 kDa analyzed by SDS-PAGE.

Conclusions Human phospholipid transfer protein can be high level expressed in the yeast *pichia pastoris* and the secreted recombinant human phospholipid transfer protein was in the form of the glycosylated monomer.

人磷脂转运蛋白(phospholipid transfer protein, PLTP)是由 476 个氨基酸组成的一种脂多糖结合蛋白,分子量约为 51 kDa。PLTP 通过载体介导机制特异性地介导血浆脂蛋白间磷脂的转运和交换,影响高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的大小、分布、组成和功能,而血中 HDL 的含量及其颗粒大小与心脑血管疾病的发病率间存在着密切的相关性,对 PLTP 结构与功能的研究对动脉硬化性心脑血管疾病的发病机理和防治具有重要的意义^[1]。国外的研究已逐步阐明了人磷脂转运蛋白编码基因的特点,并且成功克隆了其全长基因^[2],我们已用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法成功克隆了磷脂转运蛋白成熟肽基因片段^[3]。为了深入了解 PLTP 的结构和功能,以期通过磷脂转运蛋白在酵母表达系统中的高效表达而获取足量重组人磷脂转运蛋白,我们将

其同源重组整合至毕赤酵母细胞中进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 为本室保存菌种, pGEM-T 载体购自 Promega 公司。毕赤酵母表达系统购自美国 Invitrogen 公司;含磷脂转运蛋白基因的 T-Vector(pT-PLTP)质粒为本人构建,具体操作见文献[3]。酵母提取物(yeast extract)和蛋白胨(bacteriological peptone)购自英国 Oxid 公司;酵母无氨基酸基本氮源(YNB)购自 Difco 公司,使用前按照 Invitrogen 说明书配制成 YPD、MD、MM、BMGY 和 BMMY 等培养基。限制性内切酶 EcoRI、NotI、BglII 和 T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、pfu DNA 聚合酶、总 RNA 提取试剂盒和 RT-PCR 试剂盒均购自 Promega 公司。DNA 纯化试剂盒购自北京博大生物技术公司。基因扩增仪为美国 PE-2400,电基因导入仪为 Biorad 公司产品。

1.2 酵母表达质粒 pPIC9 磷脂转运蛋白的构建及重组子鉴定

[收稿日期] 2002-03-11 [修回日期] 2002-06-12

[作者简介] 马百坤,男,1964 年出生,浙江余姚人,讲师,医学学士,研究方向为转脂蛋白与动脉粥样硬化的分子机理研究。方蓉,女,1971 年出生,江苏南京人,学士,从事分子生物学实验研究工作。

用 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切 pT-PLTP, 条件如下: $10 \times$ Buffer D 5 μ L, pT-PLTP 和 pPIC9 质粒 10 μ L, *EcoRI* 和 *NotI* 各 1 μ L, H_2O 33 μ L, 混合后 37 $^{\circ}C$ 作用 6 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切下 1.5 kb 及 pPIC9 双酶切产物, 博大 DNA 纯化试剂盒回收备用。

目的基因片段及 pPIC9 质粒双酶切产物连接: 用如下条件连接 2 片段, $2 \times$ ligase Buffer 5 μ L, 回收

所得目的基因片段 3 μ L, pPIC9 双酶切产物 1 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 14 $^{\circ}C$ 作用 16 h。表达质粒构建如图 1(Figure 1)。

连接产物转化 DH5 α 细胞, 提取质粒后 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切鉴定, 以琼脂糖凝胶电泳分析构建的阳性克隆。

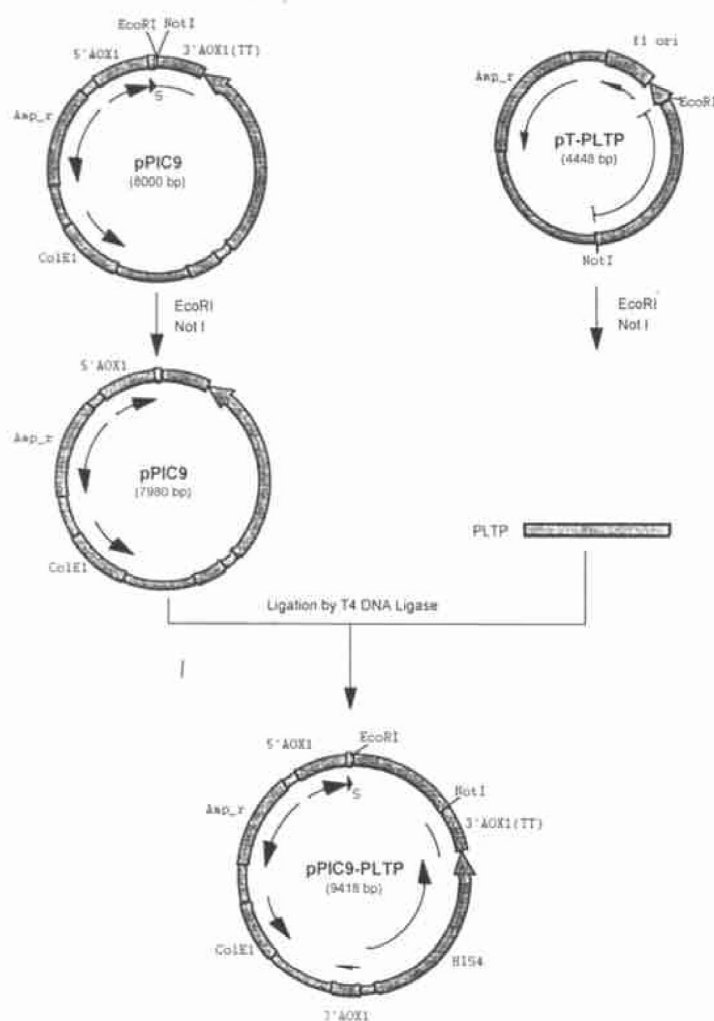


图 1. 酵母表达载体 pPIC9-磷脂转运蛋白的构建示意图。

Figure 1. Construction of pPIC9-PLTP plasmid.

1.3 电击转化法酵母感受态细胞的制备

宿主菌 GS115 培养至 OD_{600} 约为 1.2 时, 将 200 mL 培养物于 4 $^{\circ}C$ 、2 kr/min 离心 15 min, 所得沉淀经无菌水和山梨醇溶液洗涤后悬于 0.6 mL 1.0 mol/L 的山梨醇溶液中, 取 45 μ L 细胞悬液加入 10 μ L 线性化的重组质粒, 用 BIORAD 电转化仪在 1.2 kV、10 μ F 和 200 Ω 条件下转化酵母, 电击后立即加入 1.0 mol/L 山梨醇, 取 400 μ L 涂布于 MD 平板上, 30 $^{\circ}C$ 恒温培养。

1.4 酵母重组子的筛选和酵母重组子聚合酶链反应检测

用营养缺陷型的方法检查有无外源基因的插入。将 MD 上的转化子分别点在 MD 和 MM 平板上培养, 以筛选 His $^{+}$ Mut s 表型的酵母重组子, 具体操作过程参见文献[4]。

取新鲜培养的重组子菌落溶于 10 μ L 无菌水中, 加入 30 u 的裂解酶, 25 $^{\circ}C$ 作用 45 min, 然后于沸水中处理 10 min, 取上清部分为模板进行聚合酶链

反应鉴定,同时以空载体转化的酵母重组子为对照。根据 PCR 结果判断酵母染色体中是否有 PLTP 片段的插入。

1.5 酵母重组子的诱导培养、电泳分析及诱导表达条件的优化

将酵母重组子接种于 BMGY 液体培养基中,220 r/min、30℃恒温条件下培养约 36 h 至菌体 OD₆₀₀ 约 15,2 kr/min 离心,弃上清后菌体重悬于 BMMY 液体培养基中,220 r/min、30℃恒温诱导 3~4 天,每 24 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%~1.0%。将诱导培养产物离心后取上清,加入等体积的 2×SDS 载样缓冲液,于 12% 的 SDS-PAGE 上进行电泳,分析其表达情况。将重组菌株 GS115/pPIC9-PLTP 和不含外源插入基因的空载体转化酵母对照株 (GS115/pPIC9) 同时进行诱导表达,分别在 2、3、4 和 6 天取培养上清,离心后进行 SDS-PAGE 电泳分析。观察诱导时间对蛋白表达的影响。

2 结果

2.1 pPIC9-磷脂转运蛋白的鉴定

结果如图 2 (Figure 2), 重组质粒用 E-coRI 和 NotI 双酶切后能切出 1 450 bp 目的片段和已线性化的较大质粒片段 (约 8 kb)。

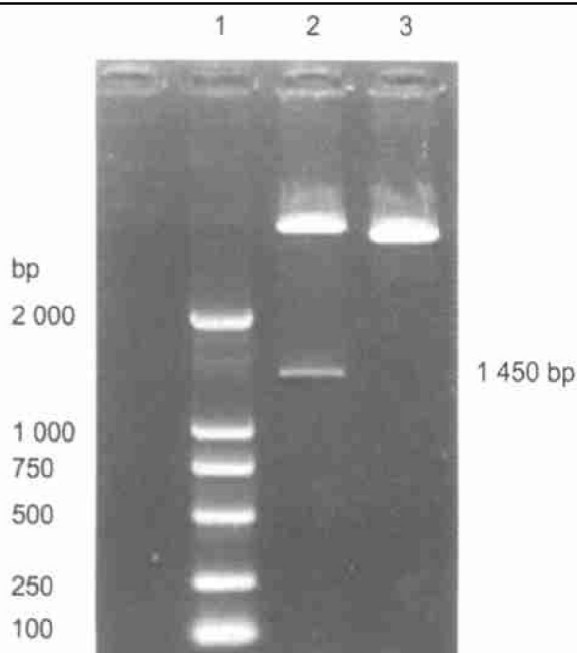


图 2. 重组子质粒的双酶切鉴定图谱。

Figure 2. Restriction pattern of pPIC9-PLTP recombinant plasmid 1: DNA marker (DL2000); 2: pPIC9-PLTP digested with EcoRI and NotI; 3: negative control (pPIC9-PLTP).

2.2 酵母菌的转化、营养缺陷筛选及聚合酶链反应

鉴定

酵母菌电转化后涂于 MD 平板上,培养 48 h 后长出 20 个菌落,分别接种于 MD 和 MM 平板,有 5 个菌落在 MM 平板上生长缓慢,即为有外源基因插入,具有正确的 His⁺ Mut^s 表型重组子。将有正确表型的重组子及空载体对照菌进行直接的聚合酶链反应检测,验证酵母染色体上确有外源基因的插入。

2.3 重组酵母的诱导表达及条件的优化

酵母重组子与空载体对照株上清蛋白相比,杂蛋白条带相对较少,在 75 kDa 位置出现对照菌没有的明显的表达条带,与产物理论值基本相符 (图 3, Figure 3)。分别调整诱导表达温度在 24℃、26℃、28℃和 30℃生长条件下,发现在 28℃表达量相对较高。同时发现诱导表达时的通气对酵母的表达具有很大的影响,在振荡速度小于 150 r/min 时培养上清中的杂蛋白条带较多,表达水平明显下降。振荡速度在 220 r/min 时重组蛋白的表达水平较高。诱导时间对分泌表达也有一定的影响,诱导第 2 天已可见表达条带;第 3 天时表达水平较高;4 天后,杂蛋白条带增多,表达水平相对降低。据此,本实验的最佳诱导表达条件为:诱导培养温度 28℃、诱导持续时间 4 天。此时 SDS-PAGE 后薄层扫描分析表明,分泌的重组 PLTP 占总分泌蛋白的 28% 以上。

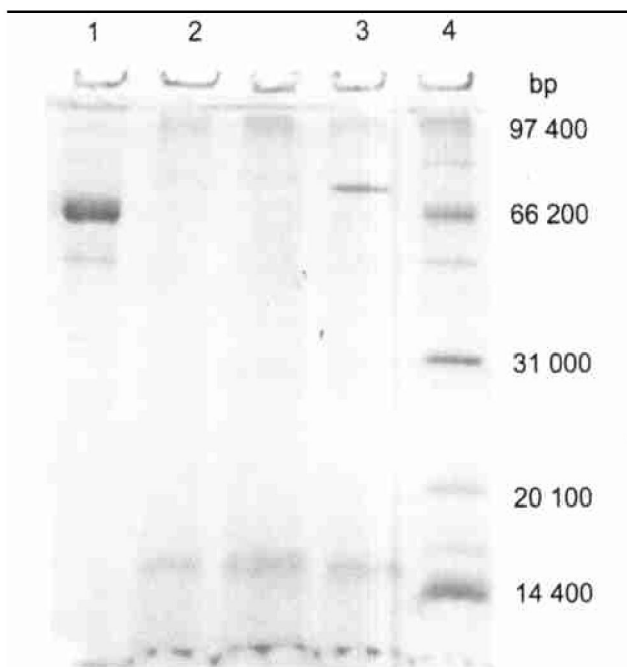


图 3. 毕赤酵母细胞 GS115/pT⁺ 磷脂转运蛋白诱导表达的结果。

Figure 3. SDS PAGE analysis of culture supernatant fraction after induction. 1: positive control (GS115/pPIC9-Alb); 2: negative control (GS115/pPIC9); 3: GS115/pPIC9-PLTP; 4: Marker.

3 讨论

长期以来的研究认为, 磷脂转运蛋白和胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 共同参与调节血浆中脂质的转运, 修饰 HDL 的大小和组成^[1], 但其机理还不十分清楚。血中 HDL 的含量及其颗粒大小与心脑血管疾病的发病率之间存在着密切的负相关性^[4,5]。近来 Kawano 等^[4]运用转基因手段, 从转基因动物实验中证明, 磷脂转运蛋白基因敲除小鼠完全丧失了转磷脂功能, 使血中 HDL 含量明显降低, 表明至少在对磷脂的转运功能上磷脂转运蛋白不同于胆固醇酯转运蛋白。胆固醇酯转运蛋白主要转运甘油三酯却没有转运磷脂功能, 而磷脂转运蛋白参与转运和交换脂蛋白中的磷脂, 可见磷脂转运蛋白和胆固醇酯转运蛋白之间并无功能上的相同之处, 所以磷脂转运蛋白对从组织中转运出多余的磷脂和胆固醇起着主要的作用。对磷脂转运蛋白深入的生物学功能及作用机理研究、建立磷脂转运蛋白定量检测方法对心血管疾病的预防和治疗具有重要的价值。有报导显示, 人的卵巢、胎盘及睾丸等组织中也能检测到高含量的磷脂转运蛋白 mRNA, 提示磷脂转运蛋白可能在生育和胚胎发育方面也有一定的调节作用^[2,5]。所以国外近年来对磷脂转运蛋白的研究已逐渐成为热点, 并已取得了一定的进展, 对人磷脂转运蛋白编码基因的特点已逐步阐明, 但临床实验方面还缺少足够有力的证据, 对其功能和作用机制还缺乏深入的研究。国内至今未见磷脂转运蛋白基础及临床方面的研究报导。

我们尝试用毕赤酵母系统表达人磷脂转运蛋白。酵母菌是一类单细胞真核生物, 它既有原核生物生长快、培养廉价和便于基因操作的特点, 又有典型的真核生物分子生物学特性, 特别是能利用自身的分泌系统分泌表达外源蛋白。其中的甲基营养型的巴氏毕赤酵母细胞, 具有能高密度生长及有效分泌外源基因表达产物, 且分泌产物无过度糖基化等特点。毕赤酵母表达系统使用的醇氧化酶基因 (AOX1) 启动子为强诱导型启动子, 可有效地调控外源基因的高表达。该系统使用整合型载体, 可将外源基因整合到酵母染色体上, 从而获得遗传稳定的

重组子。所以用毕赤酵母系统表达人磷脂转运蛋白, 一方面解决了在原核表达系统中难以表达大于 1 kb 长度外源蛋白的技术难题; 另一方面亦可解决原核表达时可能存在的密码子偏性、表达量低及不能对外源蛋白进行翻译后修饰等问题。本实验在克隆磷脂转运蛋白成熟肽基因片断的基础上, 通过同源重组整合至毕赤酵母细胞染色体的醇氧化酶 AOX1 基因中, 甲醇诱导后成功实现了体外高效表达人磷脂转运蛋白。为大量发酵制备重组磷脂转运蛋白奠定了基础。

成熟磷脂转运蛋白多肽由 476 个氨基酸组成, 理论计算分子量为 54 kDa, 血清分离所得成熟肽磷脂转运蛋白为 81 kDa, 本实验由所得人重组磷脂转运蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 其分子量约为 75 kDa, 其中的不一致推测是由于磷脂转运蛋白肽链中含有 6 处 N-糖基化位点的原因, 如其它真核表达系统一样, 毕赤酵母体外表达系统在分泌外源蛋白时, 并不能对其进行完全准确的修饰。尽管如此, 因为酵母菌是一类单细胞真核生物, 具有原核生物生长快、培养廉价、便于基因操作等优点, 又有典型的真核生物分子生物学特性, 特别是能利用自身的分泌系统分泌表达外源蛋白, 所以越来越多的被应用于外源重组蛋白的表达应用上。我们的这一体外高效表达工作为大量制备重组磷脂转运蛋白及今后对磷脂转运蛋白的结构、生物学功能研究和进一步探讨磷脂转运蛋白在脂蛋白代谢中的作用打下基础。

[参考文献]

- [1] Huuskonen J, Ehnholm C. Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 2000, **11** (3): 285-289
- [2] Albers, Gertrud W, Marian C, et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein. *Biochimica Biophysica Acta*, 1995, **1258** (1): 27-34
- [3] 马百坤, 庄一义, 李克, 等. 中国人磷脂转运蛋白基因克隆及序列分析. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 448-450
- [4] Kawano K, Qin SC, Lin M, et al. Cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein have nonoverlapping functions in vivo. *J Biol Chem*, 2000, **275** (38): 29 477-481
- [5] Buchter D, Behre HM. Effects of testosterone suppression in young men by the gonadotropin releasing hormone antagonist cetrorelix on plasma lipids, lipolytic enzymes, lipid transfer proteins, insulin, and leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1999, **107** (8): 522-529

(此文编辑 朱雯霞)