

甲状旁腺激素和转铁蛋白 N 端半分子融合蛋白在毕赤酵母中的表达

Expression of Fusion Protein of Parathyroid Hormone and Transferrin N-terminal Half-molecule in *Pichia pastoris*

张 豪^{1,2}, 李晓静¹, 王德解¹, 陈 静¹, 李彦英¹, 李玉玲¹, 沈明山², 方宏清^{1*}, 陈惠鹏^{1*}
ZHANG Hao^{1,2}, LI Xiao-Jing¹, WANG De-Jie¹, CHEN Jing¹, LI Yan-Ying¹, LI Yu-Ling¹,
SHEN Ming-Shan², FANG Hong-Qing^{1*} and CHEN Hui-Peng^{1*}

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071
2. 厦门大学生命科学院, 厦门 361005
1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
2. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 利用重叠 PCR 技术将 PTH(parathyroid hormone, 甲状旁腺激素)基因与 TFN(transferrin N-terminal half-molecule, 转铁蛋白 N 端半分子)基因在体外融合,融合基因克隆至真核表达载体 pPIC9 中,转化毕赤酵母 GS115。转化子经甲醇诱导后,融合蛋白得到了表达并分泌到发酵上清液中。经 SP Sepharose F F 阳离子交换层析、Phenyl Sepharose Fast Flow 疏水层析纯化获得了纯度大于 95% 的 PTH-TFN 样品。Western blot 分析及腺苷酸环化酶实验证明融合蛋白中的 PTH 具有与抗 PTH 抗体结合能力及刺激腺苷酸环化酶的活性,铁饱和实验证明融合蛋白中的 TFN 和单独的 TFN 具有相同铁结合能力。因而 TFN 可望作为 PTH 的天然运输载体。

关键词 甲状旁腺激素, 转铁蛋白, 毕赤酵母

中图分类号 Q812;R977.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0804-05

Abstract The fused gene (PTH-TFN) of parathyroid hormone (PTH) gene and transferring N-terminal half-molecule (TFN) gene was amplified by multiple PCR and inserted into pPIC9 vector. The recombinant plasmid pPIC9-PTH-TFN was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by PEG. After methanol induction, the target protein was expressed in fermentation supernatant at high level. The fused protein PTH-TFN with purity being higher than 95% was finally obtained after purification through two-step chromatography: SP Sepharose Fast Flow and Phenyl Sepharose Fast Flow. Western blot analysis and adenylate cyclase assay proved that the fused protein exhibited the bioactivity to stimulate cAMP synthesis and the ability to bind Fe^{3+} in the Fe^{3+} saturation study as the recombinant TFN did indicating that TFN could be used as the transcellular carrier of PTH.

Key words parathyroid hormone, transferrin, *Pichia pastoris*

近年来在疾病的治疗过程中,为了提高药效减轻毒副作用,药物的定向转运、定点释放和特异性靶细胞治疗方案已引起人们极大的兴趣^[1]。人们正在

积极探索药物定向转运的可能性及其应用方案^[2]。最新研究表明转铁蛋白-转铁蛋白受体介导的定向药物转运系统已接近实用临床阶段,对肿瘤、脑部中

Received: April 11, 2005; Accepted: May 24, 2005.

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2004AA215172).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948824; E-mail: fanghongqing@yahoo.com.cn, ChenHP@nic.bmi.ac.cn

国家高技术研究与发展项目基金资助(No. 2004AA215172)。

央神经系统疾病的治疗研究也取得了令人振奋的结果^[3]。人甲状旁腺激素(human parathyroid hormone, hPTH)是由 84 个氨基酸残基组成的低分子量蛋白,是钙、磷体液平衡的主要调节因子,具有提高骨合成速率、骨质密度和骨质量的作用^[4]。人转铁蛋白(transferrin, TF)位于第 3 号染色体 Q21~25 位点上^[5],是一个能够结合铁的单体糖蛋白,作为转铁蛋白-转铁蛋白受体跨膜转运系统的成员,其主要功能是结合及运输三价铁离子,控制体液中游离铁离子浓度,提高铁的可利用率和防止铁在血液中的沉积^[6],成熟的人转铁蛋白由 679 个氨基酸残基组成,分子量约 80 kD,可分为性质相似的两个结构域 TFN 和 TFC^[7]。近年来,已有不少以转铁蛋白为天然运输配体,使其结合一些活性多肽,形成一个具有靶向功能的蛋白复合物,从而作为相应疾病靶向给药的成功报道^[8,9,10]。在此基础上,亦可利用蛋白质工程技术将蛋白药物基因偶联转铁蛋白基因生产蛋白复合物,在药物蛋白与转铁蛋白之间引入蛋白酶切位点,当蛋白复合物进入细胞后被蛋白酶酶切,释放出药物蛋白而发挥作用^[11]。

本研究构建了甲状旁腺激素和人转铁蛋白 N 端半分子(TFN)的融合蛋白,克隆至真核表达载体 pPIC9 中,转入大肠杆菌 DH5,经菌落 PCR、酶切和测序证明表达载体 pPIC9-PTH-TFN 构建成功。将重组载体经 *Sac* 酶切后转化毕赤酵母 GS115,所表达的融合蛋白,经阳离子交换层析、疏水层析纯化获得了纯度大于 95% 的 PTH-TFN 样品。Western blot 分析、铁饱和实验及腺苷酸环化酶实验证明融合蛋白中的 PTH 具有与抗体结合能力及刺激腺苷酸环化酶活性,同时融合蛋白中的 TFN 具有铁饱和特性。因而 TFN 可望作为 PTH 的天然运输载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株:含 PTH 基因的质粒、含人转铁蛋白基因的质粒以及载体 pPIC9、大肠杆菌 DH5、毕赤酵母 GS115 菌株等为本实验室保存。

1.1.2 酶、引物和主要试剂:*Xho* 和 *Not* 限制酶, T4 DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶等工具酶为 TaKaRa 公司产品。质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品,玻璃奶回收试剂盒为美国 Q. BIOgene 公司产品。YNB 为 Difco 公司产品。层析介质 SP Sepharose Fast Flow 和 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 为 Amersham 公司产品。抗 hPTH 的兔多抗血清,由军事医学科

学院生物工程研究所制备;羊抗兔 IgG HRP,为北京欣经科生物技术公司产品。重组 PTH 和重组 TFN 样品为本实验室自制。

1.1.3 PCR 引物:

融合蛋白中 PTH 的 5 端引物 T1(含有 *Xho* 酶切位点): 5-CCGCTCGAGAAAAATCAGTATCAGATTCAGTTAATG-3。

融合蛋白中 PTH 的 3 端引物 T2: 5-AGAGCCACCGCCACCCTGGGATTTAGCTTTGGTTCAGA-3。

融合蛋白中 TFN 的 5 端引物 T3(含有部分 PTH 基因序列,下划线部分): 5-AAAGCTAAATCCCGAGGGTGCCGGTGGCTCTGTCCCTGATAAACTGTGA-3。

融合蛋白中 TFN 3 端引物 T4(含有 *Not* 酶切位点): 5-ATAAGAAATGCGGCCGCTTATTCATCTGTTGGGCTTCTGG-3。

1.1.4 培养基:

LB 培养基:酵母抽提物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L; YPD 培养基:1% 酵母抽提物,2% 胰蛋白胨,2% 葡萄糖; BMGY 培养基:1% 酵母抽提物,2% 胰蛋白胨,1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素,1% 甘油,100mmol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液; BMMY 培养基:1% 酵母抽提物,2% 胰蛋白胨,1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素,0.5% 甲醇,100mmol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液; MD 平板培养基:1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素,2% 葡萄糖,1.0% 琼脂; MM 平板培养基:1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素,0.5% 甲醇,1.0% 琼脂。

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白基因的克隆与表达载体的构建:以含 PTH 基因的质粒为模板,以 T1、T2 分别为上下游引物,扩增 PTH 基因;以含 TF 基因的质粒为模板,以 T3、T4 分别为上下游产物,扩增 TFN 基因;以 T1、T4 分别为上下游引物,以 PTH 基因和 TFN 基因为模板,扩增 PTH-TFN 基因。将扩增片段及 pPIC9 载体用 *Xho* 及 *Not* 双酶切后,在 T4 连接酶的催化下进行连接,连接产物转化 DH5,提取阳性转化子的重组质粒,进行双酶切及质粒 PCR 鉴定。

1.2.2 毕赤酵母的转化与鉴定:将重组质粒 pPIC9-PTH-TFN 以 *Sac* 进行酶切,线性化后的重组质粒以 PEG1000 法转化毕赤酵母 GS115 细胞,转化产物先涂布 MM 平板,在 30℃ 培养 2~3d,再转至 MD 平板上,观察生长情况。以长出的 Mut⁺ 型重组酵母转化子为模板,进行菌落 PCR 鉴定,筛选含目的基因的重组子进行诱导表达分析。

1.2.3 重组酵母的诱导表达与分析: 随机挑取经菌落 PCR 鉴定含目的基因的酵母重组子 10 株, 进行诱导表达筛选。先将重组子于 YPD 培养基中活化, 再接种于 BMGY 培养基中, 30 °C, 220 r/min 培养至 OD_{600} 达 10.0 时, 离心, 将菌体转至 BMMY 培养基中, 之后每隔 12 h 加入终浓度为 0.5% 的甲醇诱导目的蛋白的表达。取表达上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 表达产物的纯化及鉴定: 诱导 60 h 后, 将菌液离心, 上清液上样于经 50mmol/L, pH5.0 柠檬酸缓冲液预平衡的 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱, 以含 0.6mol/L 氯化钠的 50mmol/L, pH5.0 柠檬酸缓冲液梯度洗脱, 收集含目的蛋白的洗脱液, 合并洗脱组分上样于以含 1mol/L, pH7.0 硫酸铵的 50mmol/L 磷酸缓冲液预平衡的 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水层析柱, 以 50mmol/L 的磷酸缓冲液梯度洗脱, 收集含目的蛋白的洗脱液。以 Lowry 法对纯化后的目的蛋白进行浓度测定, SDS-PAGE 薄层凝胶扫描分析蛋白纯度。

PTH 刺激腺苷酸环化酶活性实验参照文献 [4] 方法进行。全细胞 cAMP 浓度用酶免疫试剂盒测定 (cAMP Direct Biotrak shi EIA, 购自 R&D 公司)。

重组蛋白的 Western-blot 分析按《分子克隆实验指南》进行, 铁饱和实验按文献 [12] 进行, 测定融合蛋白在缓冲液中结合 Fe^{3+} 后 A_{280}/A_{465} 的比值, 3 次平行实验取平均值。铁饱和的转铁蛋白在 A_{465} 处有最大吸光值, 这是因为转铁蛋白饱和铁后铁-酚化化合物的存在而引起其最大吸收值的变化。

2 结果

2.1 融合蛋白表达载体的构建与鉴定

融合蛋白表达载体的构建过程示意如图 1。扩增融合蛋白基因时所用的上游引物和下游引物分别引入了 *Xho* 和 *Not* 的酶切位点, 可使 PCR 扩增片段插入到 pPIC9 穿梭载体的相应酶切位点中。然后将连接产物转化 DH5⁺, 通过 PCR 筛选阳性转化子。提取重组质粒, 进行 *Xho* 和 *Not* 双酶切鉴定 (图 2) 和测序鉴定, 结果也与预期序列完全相符, 未发生碱基突变。

2.2 酵母重组子的构建及表达筛选

毕赤酵母 GS115 为 His 缺陷型菌株, 只有重组质粒整合入其基因组表达 His 后, 菌株才能在不含 His 的选择性平板 MM 或 MD 上生长。通常, 以 *Sac* 线性化的重组质粒转化 GS115 后的重组子为

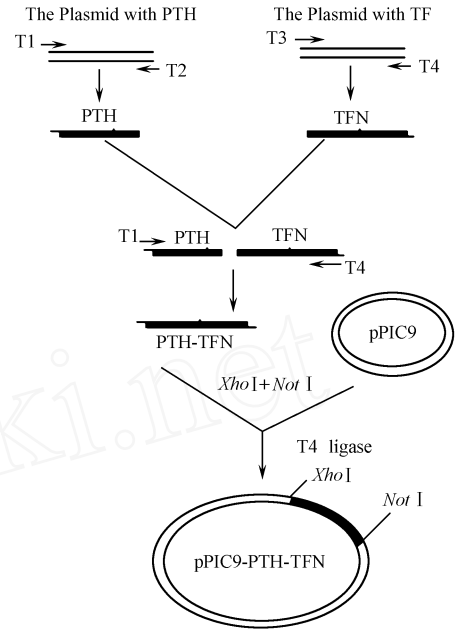


图 1 表达载体 pPIC9-PTH-TFN 的构建

Fig. 1 Scheme for the construction of the expression vector pPIC9-PTH-TFN

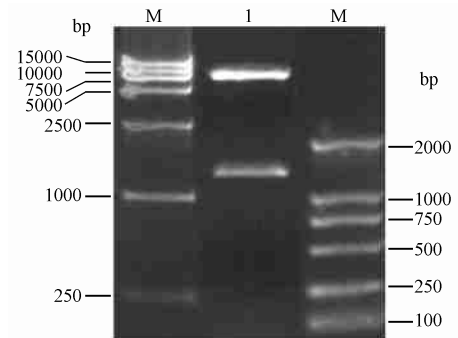


图 2 表达载体 pPIC9-PTH-TFN 的限制性酶切

Fig. 2 Restriction analysis of the expression vector pPIC9-PTH-TFN

M: DNA molecular weight marker; l: pPIC9-PTH-TFN/*Xho* + *Not*.

Mut⁺型, 即甲醇利用型。筛选时, 挑选出既能在 MM 平板上生长, 又能在 MD 平板上生长的重组子, 便为 Mut⁺型。

从 MD 平板上挑取转化重组子 10 株, 在 BMMY 培养基中于 30 °C, 220 r/min 培养, 每隔 12 h 补加 0.5% (V/V) 甲醇诱导目的蛋白表达。诱导表达 60 h 后, 离心取上清作 SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝 G-250 染色。其中有 8 株重组子的培养液上清中在相对分子量约 47kD 处有一明显的表达带, 与融合蛋白 PTH-TFN 的分子量相吻合。

2.3 表达产物的纯化及鉴定

2.3.1 重组融合蛋白的纯化: 重组融合蛋白 PTH

TFN 分别经离子交换层析、疏水层析两步纯化后,取各步层析的蛋白收集液进行 SDS-PAGE,结果如图 3,薄层凝胶扫描送军事医学科学院生物医学分析中心进行,结果显示两步纯化后重组蛋白的纯度为 95%,由图 3 中可看出,融合蛋白在纯化过程中有部分降解。以 Lowry 法测得其蛋白浓度分别为 0.2 mg/mL,总蛋白的回收率为 20.1%。

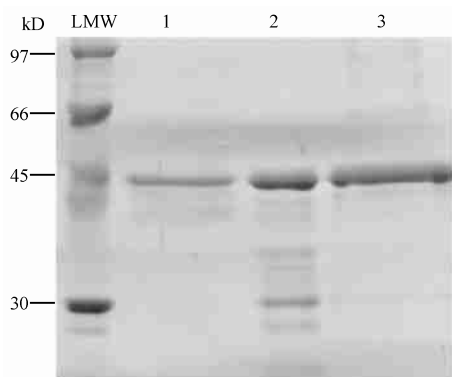


图 3 PTH-TFN 表达及纯化 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified PTH-TFN and TFN

1: PTH-TFN Phenyl Sepharose F F; 2: PTH-TFN SP Sepharose F F;

3: PTH-TFN supernatant.

2.3.2 Western blot 分析及体外腺苷酸环化酶刺激试验:纯化后的 PTH-TFN 进行 Western blot 分析,结果(图 4)显示重组蛋白 PTH-TFN 可与重组人 PTH 单抗发生免疫反应。

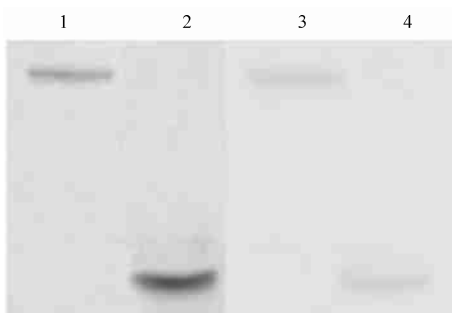


图 4 重组融合蛋白 PTH-TFN 的纯化结果及 Western blot 分析

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified PTH-TFN protein

1: SDS-PAGE electrophoresis of purified PTH-TFN;

2: SDS-PAGE electrophoresis of PTH;

3: Western blot of PTH-TFN; 4: Western blot of purified PTH.

体外腺苷酸环化酶刺激实验结果显示,重组融合 PTH-TFN 的刺激 cAMP 形成的能力大约为重组 PTH 的 1/10。说明在 C 端融合的转铁蛋白对 PTH 的结构功能有一定的影响。

2.3.3 铁饱和实验:重组融合蛋白 PTH-TFN 和重组

蛋白 TFN 在缓冲液中结合 Fe^{3+} 后,分别测定 A_{280} 和 A_{465} ,计算比值,表 1 结果显示重组融合蛋白以及重组 TFN 的 A_{280}/A_{465} 比值与文献报道的标准值 21.5 相当,说明融合蛋白中的 TFN 具有较强的铁结合能力。

综合分析 Western blot,腺苷酸环化酶实验及铁饱和实验的结果,表明融合蛋白中的 PTH 具有与抗 PTH 抗体结合能力及刺激腺苷酸环化酶活性,其中的 TFN 也具有铁饱和的特性。

表 1 PTH-TFN, TFN 铁饱和和实验后的光吸收值

Table 1 Absorption value of recombinant PTH-TFN and TFN after Fe^{3+} saturation

TFN			PTH-TFN		
A_{280}	A_{465}	(A_{280}/A_{465})	A_{280}	A_{465}	(A_{280}/A_{465})
0.212	0.010	21.2	0.212	0.010	21.2
0.216	0.010	21.6	0.214	0.009	23.8
0.212	0.009	23.6	0.215	0.010	21.5
0.215	0.010	21.5	0.213	0.009	23.7

3 讨论

毕赤酵母系统作为真核表达系统,可对外源蛋白进行翻译后的加工和修饰;营养要求低,生长快,大规模高密度发酵工艺成熟,便于工业化生产。许多不能在酿酒酵母和昆虫细胞表达系统中进行表达的蛋白也能在巴斯德毕赤酵母表达系统中得到很好的表达^[13]。本实验中使用的表达载体 pPIC9 具有强有力的醇氧化酶 1 (AOX1) 启动子,能够实现外源基因的高效表达。该载体中还含有 -因子信号肽序列及与之相连的 KEX2 酶切位点序列,它们可将外源蛋白分泌至胞外并将 -因子信号肽切除^[14]。

在纯化过程中,主要的杂蛋白来自目的蛋白的降解物及色素,还有少部分的内源蛋白。由于降解蛋白与目的蛋白性质相近,在进行第一步阳离子交换层析后,仅去除了大部分色素及少数杂蛋白,可见,目的蛋白在纯化过程中发生了部分降解。经过第二步的疏水层析后杂蛋白才基本去除,目的蛋白得到较好的纯化,纯度达 95%。对纯化后的重组融合蛋白 PTH-TFN 进行的 Western blot 分析、体外腺苷酸环化酶刺激试验及铁饱和实验的结果表明,融合蛋白中的 PTH 具有与抗体结合能力及刺激腺苷酸环化酶活性,而 TFN 具有铁饱和的特性。体外生物活性测定结果也同时说明,C 端融合的转铁蛋白对 PTH 的结构功能有影响,也许在两个分子之间加上

一段柔性 linker 能够提高融合蛋白刺激腺苷酸环化酶的活性。总之,PTH-TFN 融合蛋白的构建可以为 PTH 通过小肠进入体内提供一条新的途径,这为研究基于转铁蛋白-转铁蛋白受体转运系统的药物运输模型奠定了较好的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Li H, Sun H, Qian ZM. The role of the transferrin-transferrin receptor system in drug delivery and targeting. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, **23**(5) : 206 - 209
- [2] Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*, 1998, **392**(6679 suppl) :5 - 10
- [3] Qian ZM, Li HY, Sun HZ *et al.* Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological Reviews*, 2002, **54**(4) : 561 - 587
- [4] Fang HQ(方宏清), Dai HM(戴红梅), Li YY(李彦英) *et al.* High expression and characterization of human parathyroid hormone in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**(1) :102 - 106
- [5] Miller YE, Jones C, Scoggin C *et al.* Chromosome 3q(22-ter) encodes the human transferrin receptor. *Am J Hum Genet*, 1983, **35**(4) :573 - 583
- [6] Sun H, Li H, Sadler PJ. Transferrin as a metal ion mediator. *Chem Rev*, 1999, **99**(9) : 2817 - 2842
- [7] Faulk WP, Taylor CG, Yeh CJ *et al.* Preliminary clinical study of transferrin-ardriamycin conjugate for drug delivery to acute leukemic patients. *Mol Biother*, 1990, **2**(1) :57 - 60
- [8] Dalmastri C, Valenti P, Visca P *et al.* Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. *Microbiologica*, 1998, **11**(3) :225 - 230
- [9] Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ *et al.* Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(7) :1769 - 1773
- [10] Xia CQ, Wang J, Shen WC *et al.* Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozocin-induced diabetic rats. *J Pharmcol Exp Ther*, 2000, **295**(2) :594 - 600
- [11] Ali SA, Joao HC, Hammerschmid F *et al.* Transferrin trojan horse as a rational approach for the biological delivery of therapeutic peptide domain. *J Biol Chem*, 1999, **274**(34) :24066 - 24073
- [12] Steinlein LM, Graf ST, Ikeda RA. Production and purification of N-terminal half-transferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 1995, **6**(5) :619 - 624
- [13] Cregg JM, Cereghino JL, Shi JY *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, **16**(1) :23 - 52
- [14] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Rev*, 2000, **24**(1) :45 - 66

生物反应器研究新进展

转基因动物生物反应器是生物反应器的重要内容,利用它可生产人类所必需的珍贵的医药产品或保健产品,人们把这类生物反应器称为“活体制药工厂”,有广阔的开发应用前景。目前最受关注的主要有:

(1) 用于生产药用蛋白质。白俄罗斯与俄罗斯两国研究人员正在建构的“工程山羊”用于生产乳铁蛋白(40g/L),该蛋白具有很好的消炎、杀菌作用,还可以制成治疗心血管病的药物制剂,这样可降低乳铁蛋白药物的价格,预计于2007年在明斯克市进行规模生产。我国青岛一家公司与中国科学院遗传与发育生物学研究所等单位的研究人员通过细胞核移植技术获得克隆奶山羊,羊奶中含有外源干扰素,可研制抗乙肝病毒等特效药,此克隆奶山羊作为“动物乳腺生物反应器”生产的药用蛋白,有活性高、产量大等优势。(2) 用于生产抗癌物质。英国牛津一家公司和苏格兰研究院合作通过基因工程技术建构成新型“工程母鸡”,生下的蛋含有大量抗癌物质,可用于治疗恶性黑色素瘤,这是他们首次在“工程母鸡”生下蛋的蛋白中获得具有治疗作用的鸡蛋白,可见,生物反应器在制造药用蛋白方面具有优势;另外,还可以有针对性地按需求生产具有重要保健功能的产品,直接食用或许能起到重要的保健功能。日本、英国等国家曾在这方面开展富有成效的研究,“工程鸡”生产溶菌酶(英国)、人血凝因子、tPA等(日本),这些都值得引起注意。(3) 用于人造骨髓。目的是生产骨髓干细胞,尽管它有很强的实用价值,但这方面的研究还不够深入。“骨髓生物反应器”与“转基因动物反应器”有所不同。它是根据需要而设计的“某某生物反应器”,是仿生学研究的产物,如人造骨髓细胞,如果其功能如同骨髓干细胞一样的话,则有可能实现“人造骨髓细胞”工厂化,大量生产骨髓细胞,特别是骨髓干细胞,将为各种血液病如贫血、白血病、骨髓细胞缺陷等的治疗开辟一条新途径。

总之,生物反应器的研究开发是现代生物技术实现产业化的一个关键环节。不论是传统的发酵罐设备,还是新兴的组织培养反应器,或是新构建的“转基因动物生物反应器”,以及“人造生物反应器”等,都是为索取高品位产物、实现产物商品化和产业化服务。对于以“工程生物”获取商品化产物直至产品,如果其质量、效力以及安全性有保障,则扩大其生产规模、实现产业化是大有希望的。

(柯 为)