和鼓励,在此表示衷心感谢! 本工作为国家自然科学基金(批准号:39770856)和陕西省自然科学基金(批准号:96SM35)资助项目.

参 考 文 献

1 宋振玉,刘耕陶,主编. 当代药理学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994
2 Paton W D M, Rang H P. The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. Proc Roy Soc, Ser B, 1965, 163: 1~ 44
3 徐叔云,卞如濂,陈 修, 主编. 药理实验方法学,第2版. 北京:人民卫生出版社,1994
4 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol chem, 1951, 193: 265~ 276
5 Unger K K, Gallei E. Herstellung oberflcherr-modifizierter adsorbentien. Kolloid_Z Z Polymer, 1969, 234: 1108~ 1114
6 贺浪冲,耿信笃. 一些酸性药物在正相硅胶/反相洗脱色谱中保留机理研究. 药学学报, 1998, 33(1): 42~ 47

(1998_07_13 收稿, 1998_10_21 收修改稿)

人神经生长因子β亚基的基因在 *P. pastoris* 和 *E. coli* 中的表达

范 乔④ 刘宏迪* 孙 彤 赫荣乔④
(中国科学院微生物研究所, 北京 100080; ④中国科学院生物物理研究所, 北京 100101. * 联系人)

摘要 将 *hNGFB* 基因插入甲醇营养性酵母 *P. pastoris* 分泌表达载体 pHIL-S1 和 *E. coli* 表达载体 pET-15b 中,相应转化 *P. pastoris* GS115 (Mut^+, His^-)和 *E. coli* BL21(DE3). 在不含组氨酸平板上生长的酵母转化子通过 PCR 进一步筛选阳性克隆, *P. pastoris* 重组菌株的蛋白电泳表明发酵液中有特异表达带,扫描分析占细胞外泌总蛋白的 14.4%, Western blotting 证实该分泌蛋白具有 hNGF 的免疫活性. *E. coli* 重组菌株在 IPTG 的诱导下表达融合蛋白. 电泳扫描分析表达的融合蛋白占细胞总蛋白量的 10.3%, Western blotting 检测表明具有免疫活性.

关键词 人神经生长因子 *P. pastoris* 分泌表达 pET-15b 融合蛋白

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一类对于中枢和周围神经元的存活和分化起着重要作用的神经营养因子,并且参与维系神经、免疫和内分泌系统之间的平衡[1]. 它对老年痴呆病、某些周围神经病变和脊髓损伤有治疗作用[2, 3]. NGF 是由 α, β, γ 3 种肽链以 $\alpha_2\beta\gamma_2$ 的形式, 通过非共价键结合而成的[4]. 进一步发现其中β亚单位(NGFB)具有神经生长因子完全的生物学功能, 它是由2个118氨基酸通过非共价键结合而成的二聚体,每个单位内有3组二硫键,分子量约为26 ku[5]. 从天然组织中分离到的 hNGF 极其有限,难以满足生物学功能研究和临床应用的需要. 利用基因工程的方法生产 hNGFB 制品有深远的研究和应用价值. 本文用 *P. pastoris* 和 *E. coli* 融合蛋白成功地表达了 *hNGFB* 基因. *P. pastoris* 是一类有工业化生产前途的表达体系,便于进行高密度培养和放大发酵规模[6]. 在 *P. pastoris* 体系中已经表达了许多外源蛋白[6],但至今未有关于 *hNGFB* 在该体系表达的报道. 融合蛋白表达能提高目的蛋白

的稳定性,并有利于进一步的分离纯化.

1 材料与方法

( ) 菌种、质粒及培养基. *E. coli* 菌种TG1, HB101和Top10F′(本实验室)用于载体的构建. *P. pastoris* GS115(His⁻, Mut⁺)(购自Invitrogen公司)和*E. coli* BL21 (DE3)(本实验室)作为宿主细胞用于外源基因的表达. 酵母表达载体pHIL-S1和PCR™2.1T-Vector购自Invitrogen公司. *E. coli* 表达载体pET-15b是Novagen公司产品. LB培养基用于*E. coli*的培养. 酵母转化子在不含组氨酸的合成培养基RD(1 mol/L sorbitol, 1% dextrose, 1.34% YNB, 0.000 04% biotin, 0.005% aa, 2% agar)上筛选, 酵母细胞在BMG培养基(100 mmol/L K_3PO_4, 1.34% YNB, 0.000 04% biotin, 1% glycerol)中生长, 在BMM(100 mmol/L K_3PO_4, 1.34% YNB, 0.000 04% biotin, 0.5% methanol)培养基中诱导表达, 在MD(1.34% YNB, 0.000 04% biotin, 1% dextrose, 2% agar)和MM(1.34% YNB, 0.000 04% biotin, 0.5% methanol, 2% agar)固体培养基上鉴定酵母细胞的表型Mut^+或Mut^S.

( ) 基因重组操作和PCR扩增. 基因重组操作参考文献[7]. 为了得到和载体匹配的酶切位点并保证阅读框架的一致性,按照本实验室克隆的*hNGFB*[8]的序列设计:引物1(5′端), 5′-GACTCGAGAA TCATCATCCC ATCCC-3′;引物2(5′端), 5′-AGGTCGACTC ATCATCATCC CATCCC-3′;引物3(3′端), 5′-ACGGATCCCT ATCTCACAG CTTCC-3′. 为了对酵母表达载体进行测序及鉴定酵母阳性转化子,按照表达载体pHIL-S1上的*AOX1*序列合成引物:引物4(5′端), 5′-GACTGGTTCC AATTGACAAG C-3′. PCR条件:94℃变性, 1 min; 55℃退火, 1 min; 72℃延伸, 1 min;共30个循环.

( ) *P. pastoris* 重组菌株的筛选及诱导表达. 重组质粒电转导入酵母细胞[9],在RD平板上生长的酵母转化子再提取总DNA[10],用引物3和引物4进行PCR扩增进一步筛选阳性克隆. 重组菌株接种于BMG中,28~30℃摇瓶培养,生长至菌体浓度A_{600nm}= 2~6, 3 000×g离心5 min收获细胞,去上清,菌体悬浮于BMM中,28~30℃继续培养,每24 h加1次甲醇,在0, 24, 36, 72, 96 h等时间点取1 mL发酵液,离心菌体,用0.1% SDS-12% PAGE分析产物.

( ) *E. coli* 培养及IPTG诱导表达. 参见文献[12].

( ) 重组hNGF的Western blotting. 按文献[7]的方法将重组蛋白电转至硝酸纤维素膜上. 用Anti-mouse NGFB Ab作为第1抗体,酶联第2抗体为Anti-Rabbit IgG HRP,加入邻苯二胺进行显色.

2 结果

2.1 重组表达载体pSNGF和pET15b-NGF的构建

pHIL-S1是外泌型表达载体. 乙醇氧化酶*AOX1*启动子调控目的基因的表达,磷酸酶*PHO1*信号肽基因位于目的基因的N端,并含有*PHO1*切割位点(图1). 为使阅读框架一致,在*hNGFB*编码序列N端加上2个碱基AA插入pHIL-S1的*Xho* iv位点,构建表达载体pSNGF(图2). 以引物4对重组转化子融合基因编码序列的5′进行测序,结果表明,结构基因以正确的阅读框架插入PHO1信号肽的下游.

pET-15b载体带有T7 RNA多聚酶启动子,*hNGFB*基因插入带有6个组氨酸和凝血酶切割位点的编码区下游,构成融和基因(图1). 外源基因的表达受IPTG的调控. 设计在*Xho* iv和

BamH iv位点插入外源基因(图 2) , 筛选出 4 个重组质粒, 分别命名为 pENGF1, 2, 3, 4.

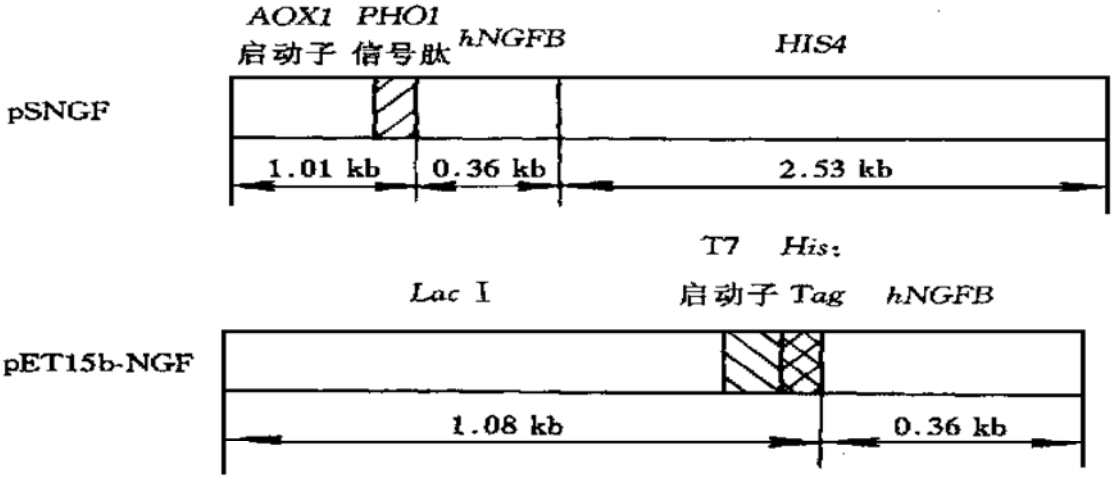


图 1　hNGFB 表达载体结构模式图

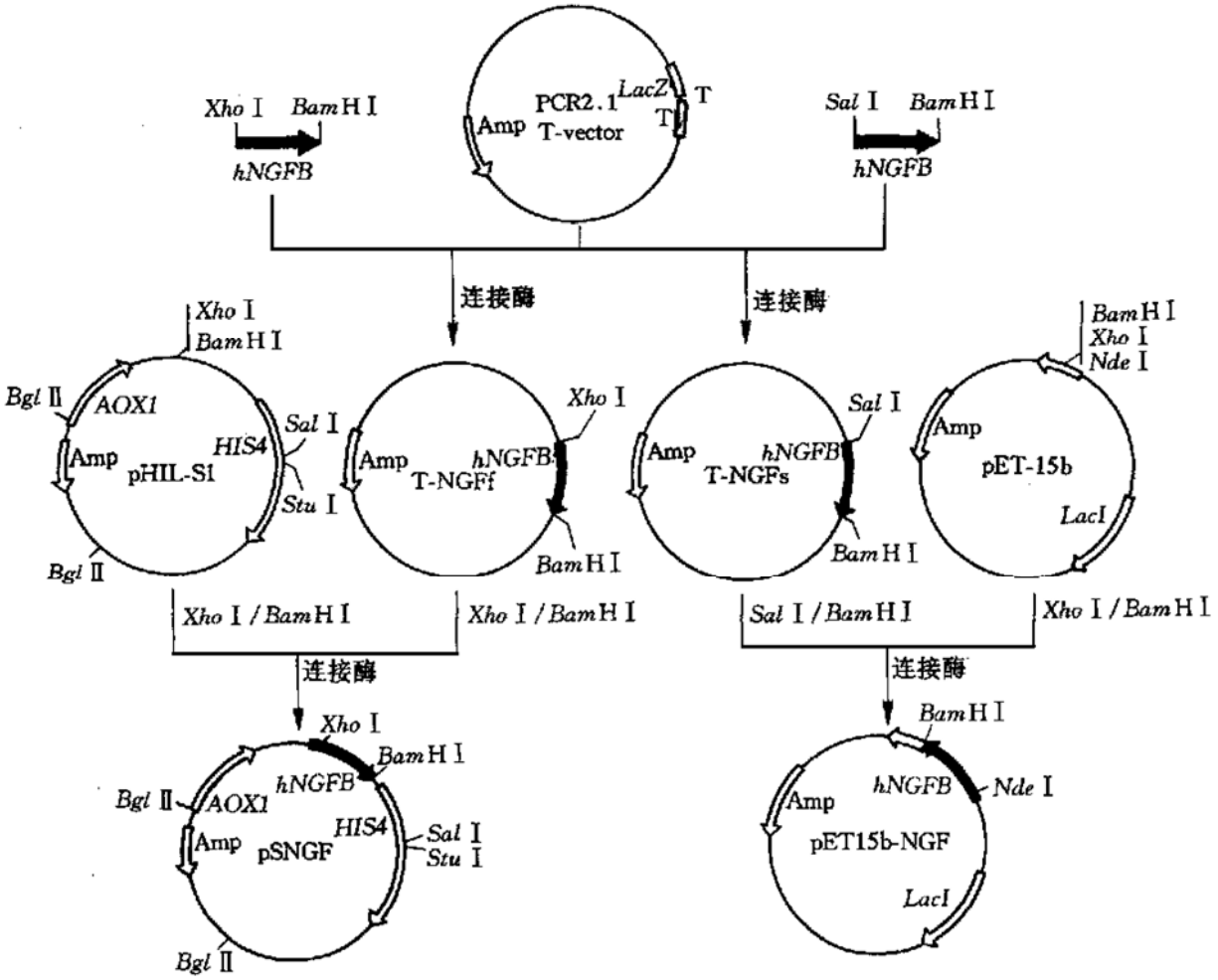


图 2　表达载体 pSNGF 和 pET15b-NGF 的构建示意图

2.2　重组质粒 pSNGF 导入 *P. pastoris* 及其表达

hNGFB 是本实验室从人胎脑总 DNA 中克隆得到的, 由于该基因属单纯外显子结构, 故可直接用于表达.

以电转法将外源 DNA 导入 *P. pastoris*. 首先大量提取重组质粒 pSNGF 和载体 pHIL-S1, 为增加外源 DNA 的同源整合机率, 用 *Bgl* ㊦酶切使质粒线性化. 在不含组氨酸的 RD 平板上生长的转化子部分是假阳性, 与外源 DNA 的丢失有关[12]. 用 PCR 进一步筛选, 5′ 端以 *AOX1* 引物4 , 3′ 端以 *hNGF* 引物 3 为引物, 能够扩增出约 510bp 大小的 DNA 则表明 *hNGF* 已整合到染色体上(图 3), 得到 6 个阳性转化克隆. 转化菌株按先后顺序分别接种到 MM, MD 平板上的对应位置, 根据菌落在 MM, MD 平板上生长情况, 鉴定转化子的表型. 在 MM 上生长正常为 Mut^+, 在 MM 上生长缓慢为 Mut^S. 6 个阳性转化菌株均为 Mut^+ .

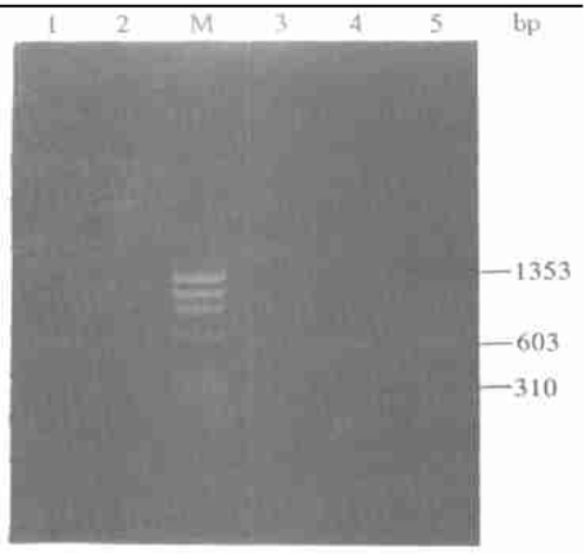


图 3　酵母转化子的 PCR 扩增

M ——• X174/*Hae* ㉔Marker, 1 ——81 号酵母转化子, 2 ——对照(含空载体), 3~ 5 ——酵母转化子 75, 80, 83 号

甲醇诱导 72 h 之后, 走 0. 1SDS-12% PAGE 蛋白胶, 银染染色表明 pSNGF81 在 14 ku 左右有特异表达带, 其他阳性转化菌株和对照均没有(图 4). 进一步用 Western blotting 鉴定, 表明有同样大小的特征带, 与电泳结果一致(图 5). Warren 等人[13] 曾报道 hNGFB 与兔抗鼠的 NGFB 的多抗有交叉免疫反应, 表明不同种属的 NGFB 有免疫应答相似性, 我们的结果也证明了这一点. 经积分扫描分析, 表达的目的蛋白占细胞总蛋白的14. 4%.

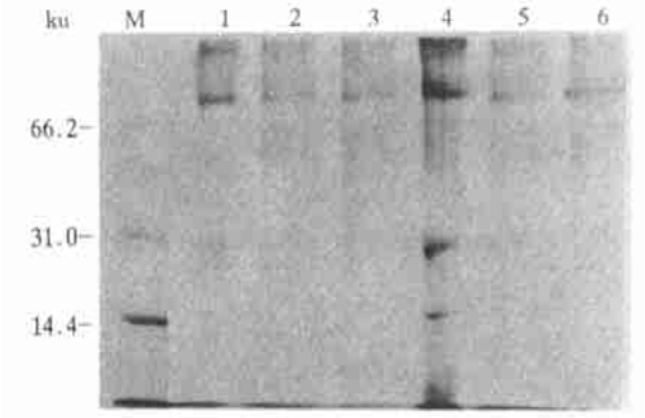


图 4　重组酵母菌 pSNGF 外泌表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M ——蛋白分子量 Marker; 1 ——对照(含 pHIL_S1 空载体); 2~ 6 ——分别为重组 75, 80, 81, 83, 85 号克隆

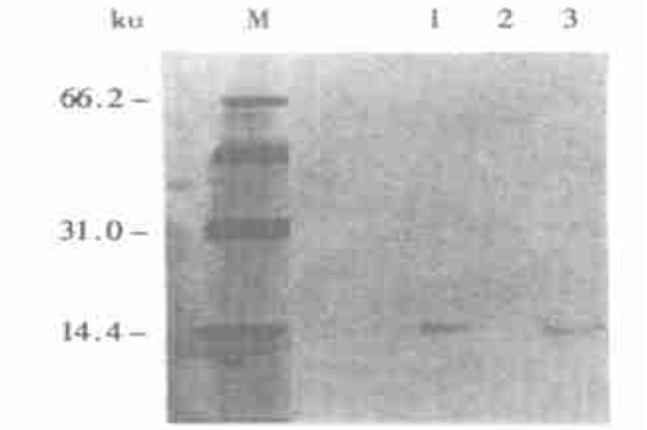


图 5　重组酵母菌 Western blotting 鉴定

M ——蛋白分子量 Marker, 1 ——阳性对照 mNGFB, 2 ——pSNGF 80 号转化子作为阴性对照, 3 ——pSNGF 81 号转化子

2. 3　质粒 **pET15b-NGF** 在 ***E. coli*** 菌株 **BL21(DE3)** 中的表达

4 个重组质粒 pENGF1~ 4 和对照 pET15b 同时转入 *E. coli* BL21(DE3) , BL21(DE3) 带有 T7 RNA 多聚酶基因, 在 IPTG 的诱导下 T7 RNA 多聚酶大量产生, 因而开启了外源基因的表达. 诱导 2. 5 h, 菌体离心等体积上样, 结果表明 4 个重组质粒在 16. 0 ku 左右处均有特异表达带, 而对照则没有(图 6). 菌体超声破碎后, 上清与沉淀同时走 SDS-PAGE 电泳, 表明 hNGFB 融合

蛋白以可溶和包含体两种形式表达.

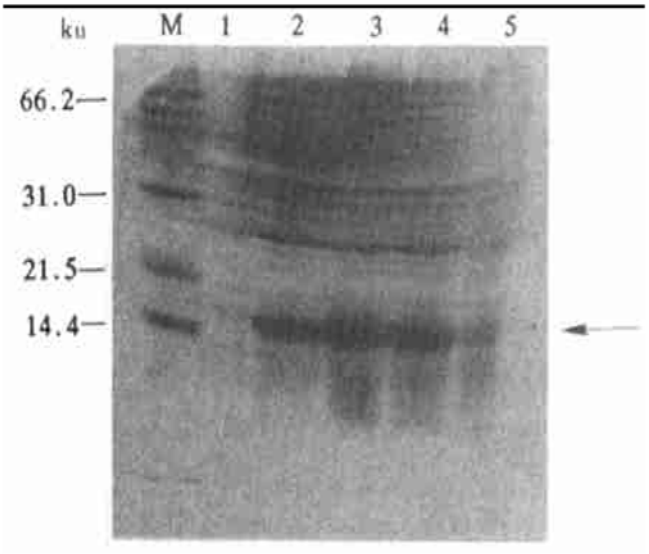


图 6 重组菌株 pET15b-NGF 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M ——蛋白分子量 Marker, 1 ——阴性对照(含 pET15b 空载体), 2~ 5 ——分别为重组菌株 pENGF1~ 4(箭头所示)

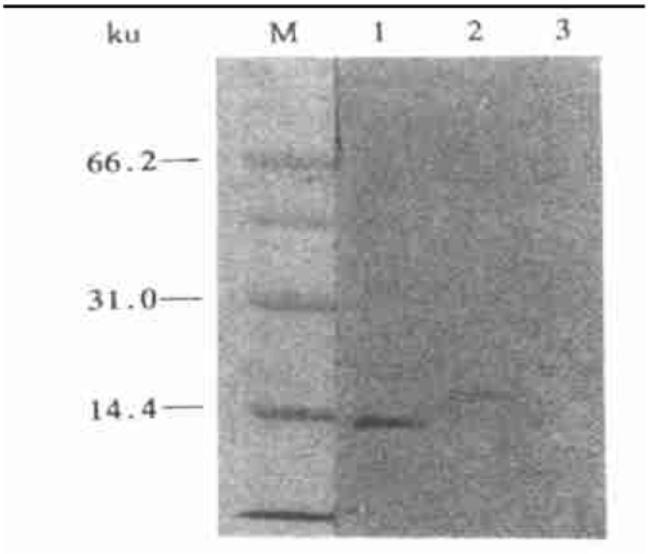


图 7 重组 *E. coli* 的 Western blotting 鉴定

M ——蛋白分子量 Marker, 1 ——阳性对照 mNGFB, 2 ——pENGF1 克隆, 3 ——阴性对照

进一步用 Western blotting 鉴定. 结果表明, 约 16.0 ku 的表达蛋白带与 mNGFB 抗体有免疫反应, 产生特征带, 作为阳性对照的 mNGFB 在 13.3 ku 左右有特征带(图 7). SDS-PAGE 电泳谱带扫描分析表达的融合蛋白占细胞总蛋白的 10.3%.

3 讨论

用基因工程的方法生产 hNGFB 是人们一直关注的问题. 1992 年, Negro 等人[14]报道用噬菌体启动子 $\lambda p_R p_L$ 表达 hNGFB, 约占细胞总蛋白的 3%. 在酵母系统中, hNGFB 的表达仅在 *S. cerevisiae* 中有报道. 1993 年, Nishizawa 等人[15]报道, 利用 α-因子作为信号肽分泌表达量为 1 μg/mL.

在本实验中, 用 *P. pastoris* 成功地表达了 hNGFB, 占细胞外泌总蛋白的 14.4%. 在酵母系统中, α-因子信号肽使用最广, 本实验表明用 PHO1 信号肽引导外源基因的表达也是有效的, hNGF 分泌至胞外, 信号肽被切除. 我们发现改变诱导时培养基的 pH 值, 有利于提高外源蛋白的产量. 本实验中, hNGF 的表达最适的 pH 值约为 5~ 6 左右, 在诱导后 3~ 4 d 表达量达到最大.

重组质粒通过电转导入 GS115, 在不含组氨酸的平板上需进一步筛选得到阳性菌株, 一般是用原位菌落杂交筛选阳性转化子, 周期较长. 而本实验中采用 PCR 方法, 证明能有效的快速筛选阳性克隆.

线状化的表达载体与宿主染色体发生同源重组通过两种方式: 插入和取代. 用 *Bgl* Ⅱ酶切的线状 DNA 转化进入宿主细胞, 该片段易在 *AOX1* 位点发生双交换, 染色体上 *AOX1* 基因被外源基因取代, 而成为 Mut^S 表型, 若发生插入则为 Mut^+. 本实验中得到的转化子都为 Mut^+, 这表明外源 DNA 并没有取代染色体上 *AOX1* 基因, 而是更易发生插入. 这可能与宿主细胞对断裂双链的修复作用有关[12].

本实验用 pET-15b 在 *E. coli* 成功地表达了 hNGF 融合蛋白, 占细胞总蛋白的 10.3%, 用融合基因的形式表达目的蛋白能简化纯化步骤, 并且有可能避免以包含体的形式表达. hNGF 融合蛋白可通过凝血酶切除 N 端多肽, 表达蛋白的活性需进一步测定.

P. pastoris 与 *E. coli* 系统相比有更多的优点, 表达产物分泌出细胞外, 更接近于自然状态. 而且 *P. pastoris* 自身外泌蛋白少为进一步提取提供了便利条件. 酵母菌长期的工业生产发酵模式也为最终的工业化生产奠定了基础.

参 考 文 献

1 Levi-Montalcini R, Toso R D, Valle F D, et al. Update of the NGF saga. J Neuro Sci, 1995, 130: 119~127
2 Hefti F. Nerve growth factor(NGF) promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transection. J Neurosci, 1986, 5: 2155~2162
3 Williams L R, Varon S, Pertrson G M, et al. Continuos infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 9231~9235
4 Angeletti R H, Bradshaw R A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68: 2417~2420
5 Ullrich A, Grav A, Beramn C, et al. Human β-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. Nature, 1983, 303: 821~825
6 Romans M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Current Opinion in Biotechnology, 1995, 6: 5327~5331
7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
8 华中慰, 刘宏迪, 郭建容, 等. 人神经生长因子基因克隆. 科学通报, 1991, 22(8): 1745~1747
9 Becker D M, Guarente L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. Methods in Enzymology, 1991, 194: 182~186
10 Philippsen P, Stotz A, Scherf C. DNA of *Saccharo cerevise*. Methods in Enzymology, 1991, 194: 169~175
11 Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology, 1990, 185: 69~89
12 Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strain containing multiple tandem integration of the gene. Biotechnology, 1991, 9: 455~460
13 Warren S L, Fanger M, Neet L E. Inhibition of biological activity of mouse beta nerve growth factor by monoclonal antibody. Science, 1980, 210: 910~912
14 Negro A, Martini I, Bigon E, et al. Synthesis of the biologically active β-subunit of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. Gene, 1992, 110: 251~256
15 Nishizawa M, Ozawa F, Higashizaki T, et al. Biologically active human and mouse nerve growth factors secreted by the yeast *Saccharom cerevise*. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38: 624~630

(1998-07-07 收稿)