

# 人胰激肽原酶在毕赤酵母中的分泌表达

袁新清 陈劲春\*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘要:** 人胰激肽原酶(hPK)编码基因由本实验室设计、合成,并重组构建成表达质粒 pPIC9k-hPK。经电穿孔将该质粒转化毕赤酵母 GS115(His<sup>-</sup> Mut<sup>+</sup>),筛选 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup>型高拷贝菌株,摇瓶诱导表达重组 hPK。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析确定表达重组蛋白相对分子质量为37 500,产量达 40 mg/L,质量分数占总蛋白的 30%以上。初步浓缩的重组 hPK经测定具有酶活性,表明其在毕赤酵母中得到了正确的表达,每 mL 酶活达 0.717 nmol/s。

**关键词:** 重组人胰激肽原酶;毕赤酵母;表达

**中图分类号:** Q786

胰激肽原酶(Pancreatic Kallikrein, PK)又可叫做胰激肽释放酶<sup>[1]</sup>,具有广泛的药用价值。目前成品药主要是以猪、牛胰脏为原料分离得到,产率低,原料受限,并造成环境污染。目前国内外均有报道利用大肠杆菌、动物细胞表达人胰激肽原酶,但存在着目标产物无活性、产量低等问题<sup>[2-3]</sup>。

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是嗜甲醇型酵母,与大肠杆菌不同,毕赤酵母能对要表达的多肽和蛋白质进行翻译后加工处理,如糖基化等,更接近于哺乳动物细胞;同动植物表达系统相比,操作简单,外源蛋白可分泌至胞外,酵母本身分泌的蛋白成分少,有利于表达重组蛋白进一步的分离纯化。1998年, Hedy Chan 等人<sup>[4]</sup>用毕赤酵母表达人组织激肽释放酶,但产量仅为 30 mg/L,为了提高表达产量,本实验室将 pPIC9 载体改为 pPIC9 K 载体;采用毕赤酵母偏爱密码子;在氨基酸序列不变的前提下,构建了含人胰激肽原酶(hPK)基因的酵母表达质粒,并在毕赤酵母中进行了表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

酵母穿梭表达载体(*Pichia*-*E. Coli*) pPIC9 K, *Pichia Pastoris* 表达菌 GS115(His4<sup>-</sup> mut<sup>+</sup>),购自 Invitrogen 公司;目的基因由本实验室设计、合成并

构建成表达载体。

### 1.2 工具酶及其它试剂

限制性内切酶,购自 Takara 公司;中相对分子质量标准蛋白,购自上海普洛麦格生物产品公司。

N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE),Sigma 公司产品。胰激肽原酶标准品由常州千红药业提供。其余试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 方法

**1.3.1 重组质粒的构建** 合成目的基因经 *Sna*B 和 *Not* 内切酶消化后,与经同样内切酶处理的 pPIC9 K在 T4DNA 连接酶的作用下连接形成 pPIC9 K-hPK,并对 pPIC9 K-hPK 进行酶切图谱及测序进行鉴定。证实与设计完全相符。此构建过程见图 1。具体操作包括质粒的抽提、酶切及低熔点琼脂糖电泳均按[5]中的方法进行。

**1.3.2 电穿孔转化与阳性克隆及高拷贝转化子的筛选** 按 *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, USA) 方法将酵母菌 GS115 制备成感受态,取 100 μL 与 0.3 μg Bgl 线性化的重组质粒混合,按照说明书方法进行电转化,转化产物涂布 MD 平板,28~30 培养 2 d 后转化子开始出现。将转化菌落分别对应点在 MM 和 MD 选择平板上,筛选在 MM 上生长缓慢而在 MD 平板上生长良好的菌株。即可筛选到 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 表型菌株。由于 pPIC9 K 含有一个卡那霉素的抗性基因,其转染的宿主菌能够耐受 G418,转入外源基因的拷贝数增多,宿主耐受 G418 的量就越高,再将 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 转化子点接在分别含 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/mL G418 的 YPD 平板上,30 培养一周,可筛选出耐受 G418 的高拷贝转化子。

收稿日期: 2004-03-02

第一作者: 女, 1979 年生, 硕士生

\*通讯联系人

E-mail: datou2399@sina.com

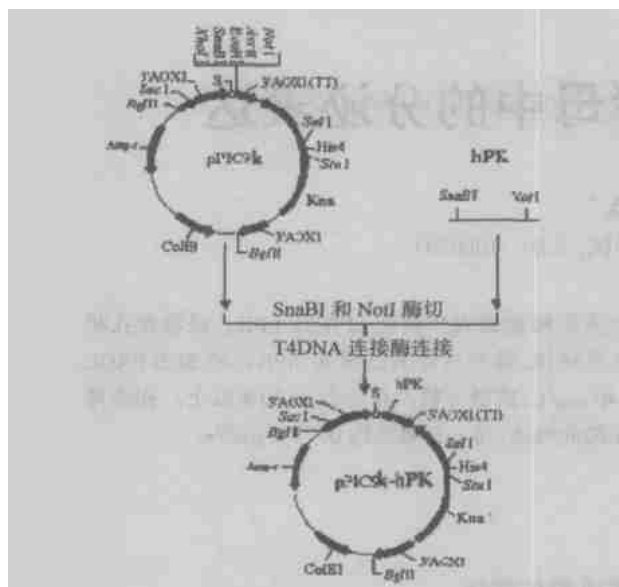


图1 重组质粒 pPIC9k-hPK 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant pPIC9k-hPK

**1.3.3 诱导表达及 SDS-PAGE 电泳分析** 接种筛选的转化子于 2 mL YPD 液体培养基中, 30 °C 下, 200 r/min (下同) 培养过夜; 取 0.5 mL 转入 50 mL BMGY 培养基中, 30 °C 下培养至  $A_{600} = 6 \sim 8$ , 离心收集菌体, 去离子水洗, 然后重悬于 10 mL BMMY 培养基中, 28 °C 下培养 4 d, 每 24 h 加 1% (体积分数) 甲醇, 在 0, 24, 36, 72, 96 h 等时间点各取 1 mL 发酵液, 离心去除菌体取上清, 12% 的 SDS-PAGE 凝胶检测重组蛋白表达结果。考马斯亮蓝法测定 96 h 上清液中总蛋白质量浓度。用 Gel-Pro 3.1 图像处理软件进行电泳谱图测定目的蛋白的相对分子质量和表达水平。

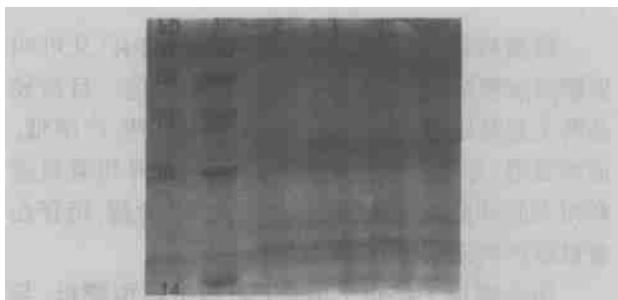
**1.3.4 表达重组人胰激肽原酶活性测定** 诱导结束后, 5 000 r/min 下离心 20 min 去菌体, 收集上清于 Microcon 超滤管 YM-10 进行超滤浓缩。浓缩约 10 倍后收集于透析袋内在 0.02 mol/L, pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液中 4 °C 下透析过夜, 更换缓冲液几次。取出与 Factor Xa 在 22 °C 下反应 6 h 切去重组人胰激肽原酶前端小肽, 利用 YM-10 超滤分离除去前端小肽, 得到暴露活性中心的成熟重组人胰激肽原酶, 作为供试品溶液测定其酶活性单位。

胰激肽原酶 (PK) 对人工合成底物, 如 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE) 起酯解作用。酶促反应前后, 于波长 253 nm 处吸收度的增值  $\Delta A$  与 PK 的浓度在一定范围内呈线性关系。按照文献 [6] 的方法测定 hPK 的效价。

## 2 结果

由于受体酵母为 His<sup>-</sup> 缺陷型 (His<sup>-</sup>), 在不加 His 的培养基上不生长, 只有整合得到重组酵母才能正常生长。整合会破坏受体酵母的醇氧化酶基因, 重组酵母在以甲醇作为碳源的培养基中不能正常生长。pPIC9K 质粒上带有 his 基因和卡那霉素抗性基因, 所以转化后的阳性克隆可以在 MD 平板和含有 G418 的 YPD 平板上生长, 在以甲醇为唯一碳源的 MM 上则生长缓慢, 以此作为筛选标志本实验室获得 20 个重组阳性克隆和 3 个高拷贝菌株。

对筛选到的高拷贝转化子进行 BMGY/BMMY 诱导表达, SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 结果见图 2。



1. 标准蛋白; 2 - 5. 诱导时间为 24, 48, 72, 96 h

图2 人胰激肽原酶的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis result of expressed hPK 相对分子质量 37 500 处可观察到单一谱带, 且图中随时间进程谱带浓度逐渐加深变细, 表明重组蛋白的表达质量分数随时间进程增大, 到 96 h 占发酵液上清总蛋白的 32%。考马斯亮蓝法测得此时上清液中总蛋白质量浓度为 126 mg/L, 则重组 hPK 产量约为 40 mg/L。

利用 BAEE 酯解法测定酶活。测得经初步浓缩的粗品 hPK, 1 mL 酶活性为 0.717 nmol/s。

## 3 讨论

本实验室利用已获得广泛认可的毕赤酵母表达系统, 构建并且筛选得到具有人胰激肽原酶基因的 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 表型菌株, 以甲醇为唯一碳源, 对其进行诱导培养, 实现了人胰激肽原酶的胞外表达。浓缩后 10 倍后 1 mL 酶活达到 0.717 nmol/s。发酵液上清中重组蛋白 hPK 含量较高, 摇瓶表达占总蛋白的 30% 以上, 产量为 40 mg/L。

在利用毕赤酵母表达外源基因的菌株、培养条件等逐渐成熟的情况下, 构建高表达的载体是提高

外源基因表达量的关键因素。采用了 pPIC9K 质粒,可通过提高 G418 的浓度筛选到高拷贝转化子,为 hPK 的高表达提供了潜力和可能。表达结果显示,同 Hedy Chan 表达的 hPK 电泳谱图相比,本研究表达的目标产物条带下方杂带要少得多(图 2),证明该改造效果明显。采用毕赤酵母偏爱密码子,可以适应 tRNA 的同工受体及宿主的反义密码子摇摆位置处被修饰的核苷酸的丰度,同时也有利于翻译的二级结构的形成。本文在采用毕赤酵母偏爱密码子构建表达载体的基础上,表达重组人胰激肽原酶产量达 40 mg/L,较前人的 30 mg/L 提高了 30%,证实选用偏爱密码子对提高表达水平较为有效。

本文的产量没有质的提高,为进一步提高重组 hPK 的表达产量,本实验室将对 hPK 的 mRNA 5' 非翻译区(5' UTR)进行改造,选取适当长度的 5' UTR;维持 hPK 的 mRNA 5' -UTR 尽可能与 Aox1 mRNA 5' -UTR 相似<sup>[7]</sup>;以期获得最佳重组蛋白产量。另外,尽量优化培养条件,提高菌株的生物量来提高重组 hPK 的产量也是努力的方向。

### 参 考 文 献

- [1] Coatanza Emanuelli, Paolo Madeddu. Human tissue kallikrein: A new bullet for the treatment of ischemia [J]. Current Pharmaceutical Design, 2003(9): 589 - 597
- [2] Hsieng S Lu, Hsu el-Rong, Louise I Lu, et al. Isolation and characterization of human tissue kallikrein produced in *Escherichia coli*: Biochemical comparison to the enzymatically inactive prokallikrein and methionyl kallikrein [J]. Protein Expression and Purification, 1996(8): 215 - 226
- [3] 李体远, 蔡筱谚, 戴 勇. 人组织激肽释放酶基因在哺乳动物细胞中的表达 [J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(6): 65 - 68
- [4] Hedy Chan, Eric B Springman, James M Clark. Expression and characterization of human tissue kallikrein variants [J]. Protein Expression and Purification, 1998(12): 361 - 370
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 J. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 金冬燕, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1987
- [6] 何兆雄, 唐永业, 张天民, 等. 动物生化制药基础 [M]. 北京: 中国商业出版社, 1985, 289 - 292
- [7] 聂东宋, 梁宋平, 李 敏. 外源蛋白在巴氏毕赤酵母中高效表达的策略 [J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2001, 22(3): 40-44

## Secretory expression of human pancreatic kallikrein in *Pichia pastoris*

Yuan Xin-qing Chen Jing-chun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Pancreatic kallikrein (PK) mentioned in the article has remarkable effect on the treatment of hypertension and thrombosis. Human pancreatic kallikrein (hPK) possesses a potential commercial value due to its characterization of higher effective and more compatible than PK from animal tissue. In the study, a DNA fragment encoding hPK was synthesized and inserted into the plasmid pPIC9K to construct the expression vector pPIC9K-hPK and following transformed the host cell yeast *Pichia pastoris* GS115 by means of electroporation. By a serial screening His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> positive clones and multi-copy transformants were identified. One of clones was cultured in flask for the expression of human pancreatic kallikrein *in vitro*. The band of molecular weight about 37 500 was observed on SDS-PAGE, and the recombinant hPK was about 30 % of total soluble proteins by gel analysis. The yield of fully active enzyme was about 40 mg/L. After concentration by ultrafiltration, it was proved that hPK was exactly expressed in *Pichia pastoris* and the enzyme activity reached 0. 717 nmol/s per ml.

**Key words:** recombinant human pancreatic kallikrein; *Pichia pastoris*; expression

(责任编辑 云志学)