

# 表达人胰岛素前体的毕赤酵母菌株的构建

李 军 陈劲春\* 李 江 邹保华 吴为华 孙 悦

(北京化工大学化学工程学院, 北京 100029)

**摘 要:** 将人胰岛素前体(HIP)基因插入到毕赤酵母 *Pichia pastoris* 的分泌表达质粒 pPIC9 K 中, 得到分泌表达质粒 pPIC9 K/ HIP 并用电转化法转化 *P. pastoris* GS115。筛选出整合型  $\text{His}^+ \text{Mut}^s$  菌株, 进一步用 G418 筛选获得高拷贝转化子。经诱导培养后, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)证明 HIP 在毕赤酵母中能有效分泌表达。对毕赤酵母中外源基因的稳定性进行了研究, 结果表明外源基因在毕赤酵母中很稳定。

**关键词:** 人胰岛素前体; 毕赤酵母; 高拷贝; 稳定性

**中图分类号:** Q786

胰岛素是治疗 I 型糖尿病的特效必需药物, 以前主要是从猪、牛胰脏中提取, 近年来以大肠杆菌 (*E. coli*) 生产的重组人胰岛素已占领了大部分市场份额。*E. coli* 往往产生包涵体, 包涵体中目标蛋白处于变性状态, 如生产活性蛋白则需要复性再分离, 产量每升在几毫克至几十毫克左右, 很少突破几百毫克级, 且无法糖基化。毕赤酵母是一种可以用甲醇作为唯一碳源的非常规酵母, 早年用以生产单细胞蛋白, 近年来被发展成为高效表达体系, 已成功地表达了数百种蛋白<sup>[1]</sup>。毕赤酵母醇氧化酶 (Alcohol oxidase, AOX1) 基因的启动子能强力调控外源基因的表达。外源基因通过质粒整合到毕赤酵母基因组中, 结构稳定, 并可获得不同拷贝数的转化子。相同体积的培养基, 通过发酵罐改善溶氧状况后, 外源蛋白的表达量比摇瓶高 5~10 倍。利用分泌表达质粒 pPIC9 K 构建表达人胰岛素前体的 *P. pastoris* 菌株尚未见报道。本文即报道构建此菌株的初步研究成果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

含 pPIC9 K/ HIP 质粒的大肠杆菌本室保存; *P. pastoris* GS115 菌株与质粒 pPIC9 K 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 EcoRI, NotI, BamHI, AviF

I, PvuII, BglII 购于 Takara 公司; 大肠杆菌培养基 2 × YT 大豆蛋白胨质量浓度 16 g/L, 酵母抽提物质量浓度 10 g/L, NaCl 质量浓度 10 g/L, pH 值 7.0; 酵母培养基 YPD 酵母抽提物质量浓度 10 g/L, 大豆蛋白胨质量浓度 20 g/L, D-葡萄糖质量浓度 20 g/L (YPD 固体培养基加琼脂粉质量浓度 15 g/L); MD 平板 酵母氮源质量浓度 13.4 g/L, 生物素的质量浓度  $4.0 \times 10^{-4}$  g/L, D-葡萄糖质量浓度 10 g/L, 琼脂粉质量浓度 15 g/L; MM 平板 酵母氮源质量浓度 13.4 g/L, 生物素质量浓度  $4.0 \times 10^{-4}$  g/L, 甲醇体积分数 0.5%, 琼脂粉质量浓度 15 g/L; 重组酵母生长培养基 BMGY 酵母抽提物质量浓度 10 g/L, 大豆蛋白胨质量浓度 20 g/L, 1M pH 值 6.0 的磷酸钾缓冲液体积分数 0.1, 酵母氮源质量浓度 13.4 g/L, 甘油体积分数 0.01, 生物素质量浓度  $4.0 \times 10^{-4}$  g/L; 酵母诱导培养基 BMMY: 酵母抽提物质量浓度 10 g/L, 大豆蛋白胨质量浓度 20 g/L, 1 mol/L pH 6.0 的磷酸钾缓冲液体积分数 10%, 酵母氮源质量浓度 13.4 g/L, 甲醇体积分数 0.5%, 生物素质量浓度  $4.0 \times 10^{-4}$  g/L; 氨苄青霉素 (AMP)、G418 购自华美公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 pPIC9 K/ HIP 质粒的提取与酶切鉴定** 将大肠杆菌菌种接种在 10 mL 含氨苄青霉素 (AMP, 终浓度 80 μg/mL) 的 2 × YT 培养基中, 37 °C 过夜培养, 5 000 r/min, 运转 5 min 收集菌体, 按碱法提取质粒<sup>[2]</sup>。取 pPIC9 K/ HIP 质粒各 8 μL (约 10 μg) 分别加 EcoRI, NotI, BamHI, AviII, PvuII, 37 °C 酶切 2 h 后, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析。pPIC9 K/ HIP 质粒

收稿日期: 2003-06-01

第一作者: 男, 1977 年生, 助教

\*通讯联系人

E-mail: lijun@mail.buct.edu.cn

电转化 GS115 按 Invitrogen 说明书进行<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 转化子的筛选** 将 MD 平板上长出的 His<sup>+</sup> 克隆用灭菌牙签分别点种在 MM, MD 平板上, 30 °C 培养 2~4 d。MD 平板上生长速度明显快于 MM 平板上生长速度的克隆即为 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 克隆。

**1.2.3 高拷贝转化子的筛选** 将获得的 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 转化子分别点种在 G418 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 4.0 mg/mL 的 YPD 平板上, 30 °C 培养 3~6 d, 能耐受 4.0 mg/mL G418 的克隆被选出, 进行诱导表达<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 HIP 的诱导表达** 将选定的转化子接入 5 mL YPD, 30 °C, 130 r/min 摇床培养至吸光度  $A = 1.3 \sim 1.5$  ( $\lambda = 600$  nm)。取 0.5 mL 转接入 20 mL 生长培养基 BMGY, 30 °C, 130 r/min 摇床培养 24 h, 此时  $A = 20$  ( $\lambda = 600$  nm)。5 000 r/min, 运转 5 min 收集菌体, 分别用无菌水 20 mL, 10 mL 洗涤菌体两次, 离心去上清, 菌体转接入诱导培养基 20 mL BM-MY, 30 °C, 130 r/min 摇床培养 4 d, 每隔 24 h 取样 200  $\mu$ L 并加入 200  $\mu$ L 25% 甲醇溶液诱导表达。样品离心后取 20  $\mu$ L 上清液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (16.5% 胶)。

**1.2.5 外源基因的稳定性研究** 重组菌株经过一个表达周期后, 取 0.5 mL 菌液作为种子进行下一轮诱导表达, 如此累计 8 轮, 对第八轮 HIP 是否表达进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。取不同代次的 YPD 重组菌液 10  $\mu$ L 稀释涂布 YPD 平板, 挑取 100 个单菌落, 分别点种在选择性 MD 平板、含 0.5 mg/mL G418 的 YPD 平板与非选择性 YPD 平板上, 比较三种平板上菌落数, 考察外源基因的缺失率<sup>[5-6]</sup>。

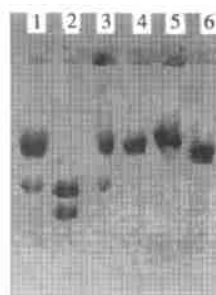
## 2 结果与讨论

### 2.1 pPIC9 K/ HIP 质粒的酶切鉴定

pPIC9 K/ HIP 质粒的酶切结果与预期一致 (图 1)。提取质粒中还有线性 DNA, 由图 1 可见 (1) 出现两条谱带, 根据质粒酶谱 EcoRI, NotI, BamHI 有一个酶切位点, 4, 5, 6 均只有一条谱带, PVu 有 3 个酶切位点, 应该切成四段, 但两条片段较小看不到谱带, (2) 只有两条谱带, Avr 没有酶切位点; (3) 显示质粒没有切开。

### 2.2 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 转化子的筛选

GS115 是组氨酸缺陷型 (His<sup>+</sup>), pPIC9 K 质粒和宿主染色体上的 AOX1 基因发生同源重组,



1. pPIC9 K/ HIP; 2. pPIC9 K/ HIP/ PVu ; 3. pPIC9 K/ HIP/ Avr ; 4. pPIC9 K/ HIP/ EcoRI; 5. pPIC9 K/ HIP/ NotI; 6. pPIC9 K/ HIP BamHI

图 1 质粒 pPIC9 K/ HIP 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pPIC9 K/ HIP by endonuclease digestion

AOX1 被取代。pPIC9 K 质粒上有一个 HIS4 基因和一个卡那霉素抗性基因, 阳性转化子可以在缺乏组氨酸的 MD 培养基和含有 G418 的 YPD 培养基上生长, 而在以甲醇为唯一碳源的 MM 培养基上生长缓慢。电转化效率高, 条件合适可以获得几百个甚至数千个重组克隆<sup>[7]</sup>, 本研究获得了 1 600 多个克隆, 挑取其中生长较大的 85 个克隆进行了 MM 平板、MD 平板的筛选 (图 2)。5 株为假阳性, 其余 80 株进行了 G418 的梯度筛选 (图 3)。获得 2 株在 2 mg/mL G418 上生长的菌株, 其拷贝数可达 5 个<sup>[4]</sup>。

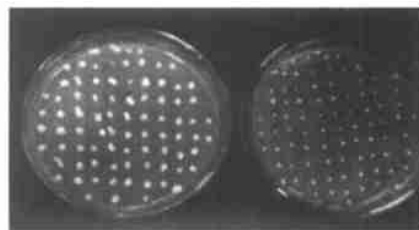


图 2 重组子在 MD、MM 平板上的生长对照

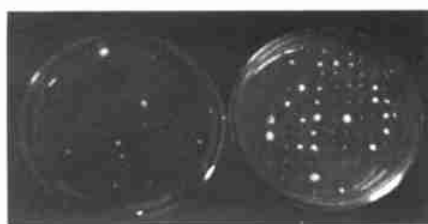
Fig. 2 Comparison of recombinant growth on MD and MM plates

### 2.3 表达产物 HIP 的 SDS-PAGE 分析

20  $\mu$ L 诱导培养液上清进行 SDS-PAGE (图 4), 经凝胶成像系统软件分析, 目标蛋白的相对分子质量和理论设计值一致, 验证了目标蛋白表达的正确性, 表达的 HIP 量逐渐增大, 72 h 达到 275 mg/L。

### 2.4 外源基因稳定性研究

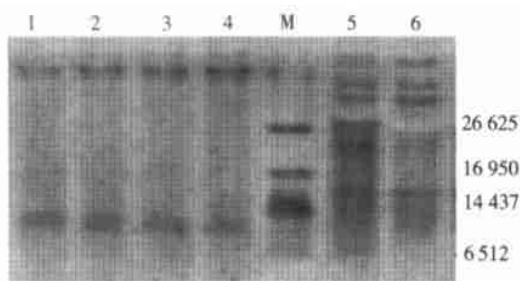
外源基因是以整合到宿主染色体上的方式转化到毕赤酵母中的, 选择性与非选择性平板的对照传代研究进行 50 代, 外源基因的缺失率为 0。连续诱导 8 代, 都可以实现 HIP 的诱导表达 (图 4), 由图 4



(左:1.0 mg/ mL G418 右:0.5 mg/ mL G418)

图 3 重组子在含 G418 不同的平板上的生长对照

Fig. 3 Comparison of recombinant growth on plates with different G418 concentrations (left: 1.0 mg/ mL G418 right:0.5 mg/ mL G418)



1. 8代诱导 72h; 2. 诱导 72h; 3. 诱导 48h; 4. 诱导 24h; M. 低相对分子质量蛋白标准物; 5. GS115 诱导液; 6. 空载质粒诱导液

图 4 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis result of expressed proteins  
可见外源基因的稳定性非常高。

### 3 结论

毕赤酵母是近年来发展起来的高效表达体系,其电转化、筛选方法简单可靠,外源基因在重组菌株中相当稳定,表达效率高,利于下游分离纯化,是一

种很有潜力的真核表达系统。本研究成功构建了拷贝数 5 的表达 HIP 的重组毕赤酵母,由于外源基因拷贝数和目标蛋白表达量之间并非线性关系,对不同拷贝数的重组菌株有必要作进一步的表达测定,如何提高重组蛋白的表达量和重组蛋白的分离纯化是本研究能否工业化的关键。本实验室将对此进行进一步的探索研究。

### 参 考 文 献

- [1] 闫亚军,陈劲春. 利用转基因毕赤酵母高表达小分子药用多肽的研究[J]. 北京化工大学学报,2002,29(4): 1-3
- [2] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯 J. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫 译. 第二版. 北京:科学出版社,1993
- [3] Invitrogen. Pichia expression kit[M]. California: Invitrogen,2000
- [4] Carol A Scorer, Jeffrey J Clare, William R McComble, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of Pichia pastoris for high-level foreign gene expression[J]. Bio/ technology,1994,12:181-184
- [5] 黄志立,罗立新,杨汝德,等. 纳豆激酶基因重组质粒在大肠杆菌与毕赤酵母中的稳定性[J]. 广东药学院学报,2001,17(4):254-259
- [6] 刘麟,陈宇光,谈立松,等. 人血管内皮细胞生长抑制因子在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达[J]. 生物技术通讯,2001,12(2):85-87
- [7] 蔡传奇,方荣祥. 毕赤酵母基因操作技术的改进及其在水蛭素表达中的应用[J]. 生物工程学报,2001,17(2):155-160

## Construction of recombinant HIP Pichia pastoris strains

Li Jun Chen Jin-chun LI Jiang Zou Bao-hua Wu Wei-hua Sun Yue

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** The human insulin precursor (HIP) gene was inserted into the plasmid pPIC9 K of Pichia pastoris to obtain secretory plasmid pPIC9 K/ HIP. After electroporation of Pichia pastoris GS115 ( $\text{His}^- \text{Mut}^+$ ), some high-copy transformants ( $\text{His}^+ \text{Mut}^s$ ) were picked up by G418. SDS-PAGE analysis indicated the efficient expression and secretion of HIP. The stability of HIP gene in the recombinant Pichia pastoris was studied and the results showed that the recombinant plasmid had good stability in Pichia pastoris.

**Key words:** human insulin precursor; Pichia pastoris; high-copy; stability

(责任编辑 云志学)