

毕赤酵母高效表达血小板源生长因子研究

李培旺, 冯争名, 蒋丽娟, 孙友平

(湖南省林业科学院, 中国湖南 长沙 410004)

摘要: 血小板源生长因子 (PDGF)是由多种细胞产生的肽类生长因子,在细胞培养、皮肤溃疡的治疗以及化妆品添加剂中有很重要的作用。将编码 PDGF 基因克隆到表达载体 XI-1-Blue 上,通过电转化整合到毕赤酵母的基因组中,在毕赤酵母三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP)启动子的作用下,表达 PDGF 蛋白,其分子质量为 30 kD 左右,估计其表达量为 80 ~ 100 mg/L。采用 MTT 法也证实其生物学活性与天然 PDGF 蛋白非常相似。

关键词: 血小板源生长因子; 毕赤酵母; GAP 启动子

中图分类号: Q948.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2005)04-0346-05

Studies on the High Effective Expression of Platelet-derived Growth Factor (PDGF) in the *Pichia pastoris* Yeast

LI Pei-wang, FENG Zheng-ming, JINAG Li-juan, SUN You-ping

(Hunan Forestry Academy, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: Platelet-derived growth factor, peptide growth factor, plays an important role in cell cultivation and the treatment of skin ulceration and is an important additive of cosmetic. PDGF gene was cloned into the *Pichia Pastoris* expression vector XI-1-Blue, then transformed into chromosome of *Pichia Pastoris* SMD1168 strain by electroporation and expressed by the action of promoter GAP. The expressed PDGF protein has a molecular weight of about 30 kD and its expression capacity is from 80 ~ 100 mg/L. Activity measurement of PDGF protein produced from *Pichia Pastoris* Yeast by the method of MTT showed that its biological activity was similar to the natural PDGF protein.

Key words: platelet-derived growth factor (PDGF); *Pichia Pastoris* Yeast; promoter GAP

(Life Science Research, 2005, 9(4): 346 ~ 350)

血小板源生长因子 (PDGF)是由多种细胞产生的肽类生长因子,如血小板、单核巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、胎盘和胚胎细胞、系膜细胞及一些转化了的细胞等^[1],其生物学特征主要表现为:1)促进细胞分裂效应,能刺激多种细胞如血管平滑肌细胞^[2, 3]、成纤维细胞^[4]、内皮

细胞^[5]、胶质细胞^[6]的分裂增生,通过刺激胶原合成和胶原酶的活化作用调节胞外基质的更新^[7] 2)对成纤维细胞、平滑肌细胞和中性粒细胞有趋化性 3)血管收缩效应^[8]等等。在细胞培养、皮肤溃疡的治疗以及化妆品添加剂中有很重要的作用。

成熟的 PDGF 是同型或异型二聚体,由 A, B

收稿日期: 2005-03-16; 修回日期: 2005-08-28

作者简介:李培旺(1978-),男,湖南宜章人,湖南林业科学院助理研究员;孙友平(1979-),男,湖南宁乡人,湖南林业科学院助理研究员,从事资源生物学与生物技术方面的研究工作, Tel: 0731-5311387, Fax: 0731-5578706, E-mail: syppp_79@163.com.

两条肽链通过二硫键连接形成, 分子质量为 28 ~ 35 kD. 主要有 3 种形式: PDGF-AA, PDGF-AB 和 PDGF-BB. A 链分子质量为 16 kD, B 链分子质量为 14 kD^[1].

血小板源生长因子基因能在大肠杆菌^[9]中获得表达. 作者也曾用大肠杆菌表达血小板源生长因子, 但包涵体的复性费时费力, 而且没有活性. 而毕赤酵母用于表达外源蛋白时具有^[10]: 1) 能在以甲醇为唯一碳源和能量来源的培养基上快速生长并达到很高浓度; 2) 表达胞内和胞外外源蛋白皆可; 3) 高效表达高稳定性、高活性的外源蛋白等优点, 已被广泛应用. 但由于 pPIC 系列表达载体中甲醇启动子需甲醇诱导才能表达, 在药物或化妆品添加物生产中有很大的局限性. 因此, 本实验选用由 pGAP 载体组成的毕赤酵母表达系统来表达 PDGF, 其主要优点是载体以三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP) 为启动子, 在葡萄糖诱导下能高效表达外源蛋白^[11].

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和细胞株

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) SMD1168 菌株、PPIC-a-PDGF 质粒, 老鼠 NIH3T3 细胞株均购自 Invitrogen 公司; XI-blue-1 菌株由本实验室保存.

1.2 酶和试剂

限制性内切酶 *Xba* I、*Xho* I、*Spe* I、*Pfu* DNA 聚合酶和 T_4 连接酶均购自 NewEngland (Biolab) 公司; Zeocin 抗生素购自 Invitrogen 公司; 甘油、葡萄糖购自鼎国生物试剂公司.

1.3 培养基

LB 培养基见文献 [12], YPD、FBS 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册.

1.4 引物设计

根据 PGAP-Z-a-B 的多克隆位点序列和 PDGF 的基因序列设计出一套引物如下:

5' - ACATATCTCGAGATGAATCGCTGCTGGGCGCT

3' - TCGAATACTAGTCCCTAGGTCCAAGGCTCT

1.5 重组质粒构建

以 PPIC-a-PDGF 为模板, 以引物 1、2 用 PCR 方法扩增出 PDGF 基因, 程序为 95 °C 预变性 45 s、接着进行 30 个循环 (95 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min) 的扩增, 最后 72 °C 温育 10 min. 纯化 PCR 产物, 用 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切 16 h, 对照空白质粒用 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切 16 h, 在 T_4 连接

酶的作用下连接. 连接产物转化到 XI-1-Blue 中, 用 PCR 和 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定阳性重组菌落, 鉴定后提取质粒.

1.6 转化毕赤酵母

将冻存的毕赤酵母 SMD1168 菌株接种到 YPD 平板上, 30 °C 培养直到单克隆菌落出现, 挑取单克隆菌落制备感受态细胞, 取 10 μ g 已提取的质粒, 用 *Avr* II 将质粒线性化, 然后与 50 μ L 的感受态细胞混合, 在电转化杯中通过脉冲电流转化后加入 500 μ L YPD 培养基, 在 30 °C 温浴 2 h, 涂布在含 100 mg/L 的 Zeocin 的 YPD 平板上, 在 30 °C 培养直到单克隆菌落形成.

1.7 高效表达菌株的筛选以及目的蛋白的鉴定

挑取多个 Zeocin 抗性的阳性克隆, 分别接种到 5 mL 的 YPD 培养基中, 30 °C 下摇床培养 24 h, 然后离心 (12 000 r/min), 将菌体转入 5 mL 含 4% 甘油的 Fbs 培养基中, 30 °C 摇床培养 72 h, 离心, 收集上清, 取 1 mL 的上清液, 加入 1 mL 20% 的 TCA 溶液, 4 °C 放置 30 min, 室温下 12 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清, 用 300 μ L 的丙酮清洗沉淀, 轻轻地吸去丙酮, 在室温下让丙酮挥发干净, 用 20 μ L 的 1 倍 Loading Buffer 溶解沉淀, 用 SDS-PAGE 电泳检测. SDS-PAGE 脱净颜色后, 通过 mini trans-Blot 电转移系统以 100 V、2 h 的参数电转移到硝酸纤维素膜上通过抗体 (鼠抗人和兔抗鼠) 标记显色、鉴定.

1.8 外源蛋白在毕赤酵母中高效表达的稳定性及最佳表达条件

1.8.1 外源蛋白在毕赤酵母中高效表达的稳定性

将 1.7 中筛选到的高效表达菌株进行继代培养, 每传 10 代挑取单克隆菌落检测外源蛋白在毕赤酵母高效表达菌株中表达的稳定性, 检测方法如 1.7, 共传 50 代.

1.8.2 基本培养基的选择

挑取 1.7 所筛选出的菌体分别以相同的量接种到 100 mL 的 YPD、含 4% 甘油的 FBS、含 2% 葡萄糖的 FBS 4 种培养基中, 在 30 °C 下摇床培养 96 h. 然后, 进行外源蛋白检测, 检测方法同 1.7.

1.8.3 培养时间优化

挑取 1.7 所筛选出的菌体分别以相同的量接种到 100 mL 含 4% 甘油的 FBS 的培养基中, 在 30 °C 下摇床培养, 48 h 起每 12 h 取样电泳检测, 共取 6 次. 检测方法同 1.7.

1.8.4 补料影响

将 1.7 中筛选出菌体转移到 50 mL 含 4% 甘油的 FBS 中, 在 30 °C 摇床培养, 以不补料为对照, 分别进行每 12 h 补料, 共 6 次; 每 24 h 补料, 共 3 次以及 40 h 补料一次培养. 检测方法同 1.7.

1.9 PDGF-BB 蛋白的活性检测

取继代 4~6 次的鼠 NIH3T3 细胞, 消化后, 以 1×10^4 /mL 细胞密度植入 96 孔板, 每孔 100 μ L, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 72 h. 每孔加入含 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养基 150 μ L, 继续培养 48 h. 将 96 孔板分为 5 组, 第 1 组不加任何东西; 第 2 组加入含 0.5% 小牛血清的 DMEM

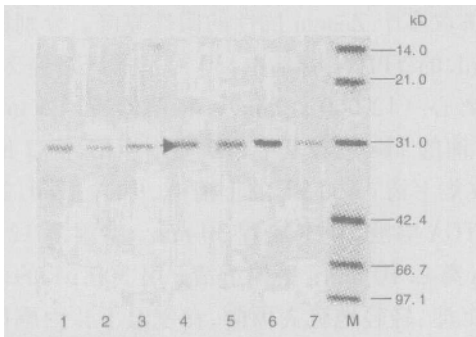


图 1 表达菌株筛选

1、2、3、4、5、6、7 代表不同的菌株, M 为标样.

Fig. 1 Analysis of PDGF recombinant protein by gel electrophoresis

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represent different strains, M for mark.

对转化的毕赤酵母 SMD1168 菌株产生的阳性克隆筛选结果如图 1, 1、4、5、6 号菌株的 SDS-PAGE 电泳条带明显, 表明有目的蛋白表达, 其分子质量为 30 kD 左右, 2、7 条带不明显. 而在 1、4、5、6 号菌株中, 6 号菌株的条带最明显, 目的蛋白表达量最高, 估算其表达量为 80~100 mg/L, 认定为高效表达菌株, 保存于 -70 °C 超低温冰箱供后续实验使用; 4、5 号菌株的条带较明显, 目的蛋白表达量较高; 而 1 号菌株的目的蛋白表达量最低. Western 斑点杂交表明此目的带确为 PDGF 蛋白(图 2).

2.2 外源蛋白在毕赤酵母中高效表达的稳定性及最佳表达条件

通过对毕赤酵母高效表达菌株继代 50 次培养发现, 外源蛋白的表达量并没有随传代次数的增加而减少(图 2). PDGF 蛋白在毕赤酵母中的表达与培养基的关系很大(图 3), 在含 4% 甘油的 FBS 培养基中的表达量最高, SDS-PAGE 电泳图上条带明显; 在含 2% 葡萄糖的 FBS 培养基中的

培养基, 同时加入 100 ng 的 PDGF 蛋白, 第 3 组加入含 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养基, 同时加入 10 ng 的 PDGF 蛋白, 第 4 组加入含 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养基, 同时加入 1 μ g 的 PDGF 蛋白, 第 5 组加入含 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养基. 将 96 孔板于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 72 h, 在结束前 5 h 加入 20 μ L 的含 5 g/LMTT 的 Pbs 溶液. 移去培养基, 用 Pbs 缓冲液洗涤细胞一次, 加入 200 μ L 的 DMSO, 37 °C 保持 5 min, 550 nm 波长处读数.

2 结果与分析

2.1 高效表达菌株的筛选以及目的蛋白的鉴定

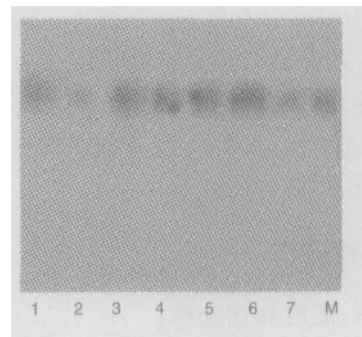


图 2 Western 斑点杂交鉴定目的蛋白

1、2、3、4、5、6、7 为不同的菌株, M 为标样.

Fig. 2 Analysis of PDGF recombinant protein by Western blotting hybridization

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represent different strains, M for mark.

表达量次之, 而在 YPD 培养基中的表达量很低, SDS-PAGE 电泳图上几乎看不到条带.

在毕赤酵母表达系统中, 外源蛋白的获得量与收获的时间关系很大, 找到最佳的收获时间, 才能够获得最大量的目的蛋白. 这也是宿主细胞表达外源蛋白的一种普遍规律. 图 5 显示, 携带有外源蛋白基因的毕赤酵母在含 4% 甘油的 FBS 培养基中培养时, 外源蛋白的表达量是随培养时间的延长而逐渐增大, 到 84 h 时达到最大, 而后又逐渐减少; 而杂蛋白表达量也是随培养时间的延长而逐渐增多. 因此, 毕赤酵母表达外源蛋白的最佳收获时间以 84 h 为宜.

培养过程中, 培养基的成分会发生改变, 而这些改变可能对外源蛋白的表达不利, 因此有必要在适当的时间在培养液中添加营养成分. 结果表明(图 6): 每 12 h 补料所获得的目的蛋白量最高, 杂蛋白也较少, 而没有补料所获得的杂蛋白多很多, 基本上得不到目的蛋白带.

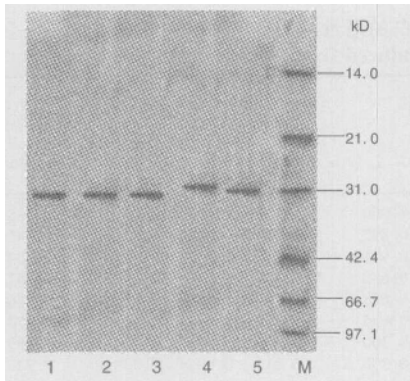


图3 PDGF 毕赤酵母高效表达菌株的稳定性
1:10代 2:20代 3:30代 4:40代 5:50代.

Fig. 3 Stability of high expression of PDGF recombinant protein cultured

1, 2, 3, 4, 5 represent 10, 20, 30, 40, 50 respectively.

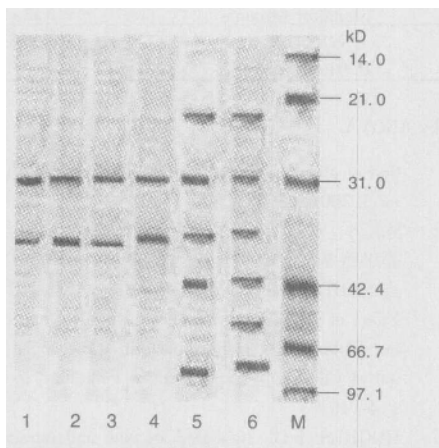


图5 PDGF 重组蛋白在不同培养时间下表达情况
1:48 h; 2:60 h; 3:72 h; 4:84 h; 5:96 h; 6:108 h.

Fig. 5 Expression of PDGF recombinant protein cultured at the different time

1: 48 h; 2: 60 h; 3: 72 h; 4: 84 h; 5: 96 h; 6: 108 h.

2.3 毕赤酵母表达的 PDGF 蛋白活性检测

采用 MTT 法对毕赤酵母表达的 PDGF 蛋白活性进行检测结果见表 1、表 2. 方差统计表明, 在 0.5% 的低浓度小牛血清培养下, 鼠 NIH3T3 细胞的生长受 PDGF-BB 蛋白影响明显, 与对照相比, PDGF 蛋白添加量的多少对鼠 NIH3T3 细胞的生长有很显著的差异 ($P < 0.01$). 表明毕赤酵母表达的 PDGF 蛋白具有促进细胞增殖的效应, 其生物学活性与天然 PDGF 蛋白非常相似.

3 讨论

毕赤酵母细胞内含有糖基化酶类, 能对其细胞内表达的外源蛋白进行部分糖基化^[11], 具有真核细胞翻译后的加工和修饰功能, 能表达有生物活性的外源蛋白^[13], 表达的外源蛋白质的生物

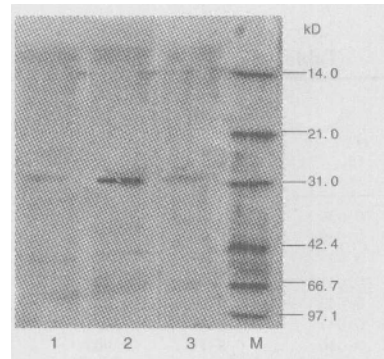


图4 PDGF 重组蛋白在不同培养基中表达中表达情况
1. YPD 培养基; 2. 含 4% 甘油的 FBS 培养基; 3. 含 2% 葡萄糖 FBS 培养基.

Fig. 4 Expression of PDGF recombinant protein cultured at the different medium

1: YPD medium; 2: FBS medium supplemented with 4% glycerol; 3: FBS medium supplemented with 2% glucose.

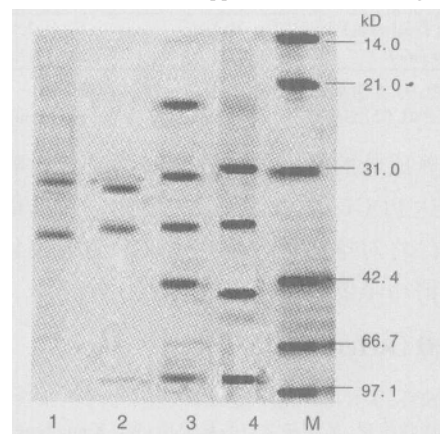


图6 PDGF 重组蛋白在不同时间补料培养的表达情况
1:每 12 h 补一次料; 2:每 24 h 补一次料; 3:每 48 h 补一次料; 4:没有补料.

Fig. 6 Expression of PDGF recombinant protein cultured by supplemented with nourishments at the different time

1: every 12 hours, 2: every 24 hours, 3: every 48 hours, 4: none.

活性远远高于大肠杆菌所表达的^[10]. 甚至有些天然分泌时不被糖基化的蛋白由毕赤酵母表达时却能发生糖基化. 如人体内合成的胰岛素样生长因子 I 为非糖基化蛋白, 而由巴斯德毕赤酵母表达时, 却有 15% 发生了糖基化作用^[14]. 研究发现毕赤酵母系统能够稳定地分泌表达具有生物功能的 PDGF-BB 二聚体.

毕赤酵母作为一种良好的表达宿主, 并不能对所有外源基因高效表达. 一个基因能否在该宿主中表达, 主要取决于外源基因的特性、表达框的染色体整合位点和方式、外源基因在细胞内的拷贝数、外源蛋白的分泌信号、表达产物的稳定性, 基因表达后的加工及宿主蛋白酶的含量等^[10, 11]. 研究中我们注意到了在摇瓶培养毕赤酵母时影响毕赤酵母表达 PDGF 的因素, 除了培养基以及培

表 1 毕赤酵母表达的 PDGF 蛋白的活性检测
Table 1 Activity measurement of PDGF protein produced from *Pichia Pastoris* Yeast

实验编号 No.	对照 CK	5% 小牛血清 + 100 ng PDGF + DMEM 培养基 (5% bull serum + 100 ng PDGF + DMEM culture medium)		5% 小牛血清 + 10 ng PDGF + DMEM 培养基 (5% bull serum + 10 ng PDGF + DMEM culture medium)				5% 小牛血清 + 1 ng PDGF + DMEM 培养基 (5% bull serum + 1 ng PDGF + DMEM culture medium)			5% 小牛血清 + DMEM 培养基 (5% bull serum + DMEM culture medium)	
A	0.039	1.130	1.193	0.779	0.816	0.804	1.060	0.996	0.842	0.764	0.438	0.275
B	0.038	0.971	1.079	1.156	0.904	0.519	0.897	0.699	0.784	0.721	0.345	0.368
C	0.043	0.988	1.030	1.185	0.738	0.850	0.911	0.750	0.603	0.732	0.304	0.295
D	0.041	0.988	1.177	0.738	0.758	0.536	0.680	0.744	0.598	0.713	0.351	0.371
E	0.043	1.092	0.957	0.653	0.736	0.377	0.628	0.647	0.670	0.672	0.340	0.412
F	0.041	1.027	1.164	0.720	0.862	0.801	0.635	0.713	0.628	0.690	0.373	0.385
G	0.040	0.881	0.907	0.752	0.853	0.618	0.700	0.739	0.646	0.536	0.289	0.268
H	0.040	1.130	0.984	0.876	1.395	1.186	0.796	0.815	0.692	0.939	0.322	0.456
Average	0.04063 ± 0.00177	1.04363 ± 0.09702 ***		0.80997 ± 0.21071 ***				0.72221 ± 0.10314 ***			0.3495 ± 0.05625	

Notes: *** $P < 0.05$, Significant difference.

表 2 方差分析表
Table 2 One-way ANOVA

变异来源 Variation	自由度 Freedom	平方和 Sum square	均 方 Standard variance	F 值 F value
处理间 (Treatment)	4	7.71336519	1.92834130	96.96376
误差 (Error)	91	1.80973855	0.0198872368	

注: $P < 0.05$, 5 组间单因子方差分析显著性差异.

Notes: $P < 0.05$, Significant difference among the five groups when analyzed by ANOVA.

养液营养成分的补充外, 收获时间也是影响毕赤酵母表达 PDGF 的一个因素. 因此, 筛选最佳的培养条件将对毕赤酵母表达 PDGF 的规模化生产产生事半功倍的效果.

参考文献 (References):

- 武湘兵, 王雪梅, 李进. 血小板源生长因子与疾病 [J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册 (WU Xiang-bing, WANG Xue-mei, LI Jing. PDGF and illness [J]. Foreign Medical Sciences Section of Pathophysiology and Clinical Medicine), 1999, 19(1): 54-57.
- 黄群华, 孙仁宇. 血小板源生长因子在低氧性肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. 基础医学与临床 (HUANG Qun-hua, SUN Ren-yu. Effect of platelet-derived growth factor on proliferation of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cell [J]. Basic Medical Sciences and Clinics), 1998, 18(2): 33~37.
- 李丰, 车东媛, 邓仲端. PDGF-BB 多肽刺激肺动脉平滑肌细胞 PDGF mRNA 表达 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志 (LI Feng, CHE Dong-yuan, DENG Zhong-duan. Platelet-derived growth factor (PDGF)-A and B chain mRNA expression induced by PDGF-BB polypeptide in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry), 1998, 7(3): 290-293.
- 董茂龙, 陈璧, 徐明达, 等. PDGF-AB 对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响 [J]. 第四军医大学学报 (DONG Mao-long, CHEN Bi, XUN Ming-da, et al. PDGF-AB effects on proliferation of hypertrophic scar fibroblasts [J]. Journal of Forth Military Medical University), 1999, 20(5): 437-438.
- 夏豪, 李建军, 李庚山, 等. PDGF 对培养内皮细胞增殖的影响 [J]. 心肺血管病杂志 (XIA Hao, LI Jian-jun, LI Geng-shan, et al. The effect of platelet derived growth factor on the proliferation of culture endothelial cell [J]. Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases), 2000, 19(3): 212-215.
- ROBISON S., FRANIC L A. The spatial and temporal regulation of oligodendrocyte precursor proliferation [J]. Dev Neurosci, 2001, 23: 338-345.
- 陈广平, 郭慕依, 张月娥, 等. 肝素和 PDGF 对人肾小球系膜细胞基质合成和分泌的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志 (CHEN Guang-ping, GUO Mu-yi, ZHANG Yue-e, et al. Effect of heparin and PDGF on syntheses and secretion of extracellular matrix in human cultured mesangial cell [J]. Journal of Clinic and Experiment of Pathology), 1998, 14(2): 114-116.
- HUGHES A D. Increased in tone and intracellular Ca^{2+} in rabbit isolated ear artery by platelet-derived growth factor [J]. Br J Pharmacol, 1995, 114: 128.
- 费玲玲, 张萍, 黄文晋, 等. 人 PDGF-A 基因的克隆、表达及表达产物的纯化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 (FEI Lin-lin, ZHANG Ping, HUANG Wen-jin, et al. Clone, expression and purification of human PDGF-A gene [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology), 2002, 18(4): 339-341.
- 马孟根, 王红宁. 毕赤巴斯德酵母表达外源蛋白研究进展 [J]. 四川农业大学学报 (MA Meng-geng, WANG Hong-yu. Advance in the expression of foreign protein in *Pichia Pastoris* [J]. Journal of Sichuan Agricultural University), 2001, 19(3): 277-280.
- 路蓉, 安云庆. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其分泌型蛋白表达的研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志 (LU Rong, AN Yun-qing. Advance of expression system and expression of excretive type protein in *Pichia Pastoris* [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine), 2004, 3(1): 43-47.
- 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯敦 R E, 颜子颖, 王海林 (译). 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社 (AUSUBEL Frederick M, KINGSTON Robert E, MOORE David D, et al. YAN Zi-ying, WANG Hai-lin (Translate). Short Protocols in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press), 1998: 1-861.
- FABER K H, HARDER W G, VEENHUIS M. Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign proteins [J]. Yeast, 1995, 11(14): 1331-1344.
- BRIERLEY R A. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I) [J]. Methods Mol Biol, 1998, 103: 149~177.