

5'-非转录区序列改建提高毕赤酵母表达抗菌肽 LL-37

陆建荣^{1*}, 王惠民², 吴 萍¹, 黄松平¹, 常秋月³, 凌勇武¹, 倪晓蓉¹

(1. 南通市第三人民医院感染病实验室, 南通 226006; 2. 南通大学附属医院检验科, 南通 226001; 3. 南通市中心血站, 南通 226006)

[摘要] **目的:**探讨 5'-非转录区(5'-UTR)序列改建对毕赤酵母表达外源蛋白 LL-37 的影响。**方法:**去除毕赤酵母分泌表达质粒 pPIC9 5'-UTR 内 GGATCCAA 序列, 转化 *E. coli* DH5 α , 构建改良的毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9-EDIT; PCR 鉴定及测序确认后与酵母偏爱密码子编码的 LL-37 基因片段连接, 构建改良的重组表达载体 pPIC9-EDIT-LL-37; 原生质球法转化毕赤酵母 GS115, PCR 扩增鉴定后诱导 LL-37 表达, 筛选最佳表达条件, 对表达产物进行凝胶电泳和 Western 印迹分析; 比较转入 pPIC9-EDIT-LL-37 及 pPIC9-LL-37 后毕赤酵母表达产物的抑菌活性, 间接测定改建前后 LL-37 蛋白表达量的变化。**结果:**PCR 鉴定及测序证实 pPIC9-EDIT 改建成功, 成功构建重组载体 pPIC9-EDIT-LL-37; 转化毕赤酵母后表达产物 PCR 鉴定出 LL-37 基因, 最佳诱导甲醇浓度为 0.5%, 最佳诱导表达时间为 72 h, 电泳及 Western 印迹分析证实表达产物为 LL-37; 改建后 LL-37 蛋白表达量提高了约 35 倍。**结论:**pPIC9 5'-UTR 序列的改建能明显提高毕赤酵母表达 LL-37 蛋白, 值得进一步研究以应用于其他外源蛋白表达。

[关键词] 抗菌肽 LL-37; 毕赤酵母; 5'-非转录区

[中图分类号] Q 784

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)12-1329-06

Modification of 5'-UTR sequences of pPIC9 increases expression of antimicrobial peptide LL-37

LU Jian-rong^{1*}, WANG Hui-min², WU Ping¹, HUANG Song-ping¹, CHANG Qiu-yue³, LING Yong-wu¹, NI Xiao-rong¹
(1. Lab of Infectious Diseases, the Third People's Hospital of Nantong, Nantong 226006, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; 3. Nantong Blood Center, Nantong 226006)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of 5'-untranslated region modification of pPIC9 on expression of LL-37 in *Pichia pastoris*. **Methods:** The sequence GGATCCAA was deleted from 5'-UTR of pPIC9 and the modified product was transformed into *E. coli* DH5 α to construct a modified eukaryotic vector pPIC9-EDIT. After PCR and sequencing, pPIC9-EDIT was ligated with LL-37 sequence coded by the biased codon of yeast, the product was then transformed into *E. coli* DH5 α to construct the recombinant expression vector pPIC9-EDIT-LL-37, the latter was transformed into *P. pastoris* GS115 by spheroplasting and the insert was confirmed by PCR. The bacteriolytic activity to *E. coli* DH5 α was analyzed to screen the highest expressing strain and to determine the best inducing time and concentration of methanol. The fermentation product was analyzed by Tricine-SDS-PAGE and Western blotting. The antibacterial activities of expression products of pPIC9-LL-37 and pPIC9-EDIT-LL-37 were compared, and the changes of LL-37 protein expression were determined before and after modification. **Results:** pPIC9-EDIT and pPIC9-EDIT-LL-37 were successfully constructed. Expression of LL-37 gene was confirmed by PCR in *P. pastoris* after pPIC9-EDIT-LL-37 transformation. The highest expressing strain was identified; the best inducing time was 72 h and the best concentration of methanol was 0.5%. Tricine-SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the expression product was LL-37. The expression level of LL-37 protein increased by 35 times after modification. **Conclusion:** Modification of pPIC9 5'-UTR can obviously improve expression of LL-37 protein in *P. pastoris*; it is worth to be used in the research of other heterogenous protein.

[KEY WORDS] antimicrobial peptide LL-37; *Pichia pastoris*; 5'-untranslated regions

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1329-1334]

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)具有类似哺乳动物细胞的分泌系统,能够完成蛋白质正确折叠、蛋白质剪切、糖基化及分泌功能,加上它具有不产生内毒素的特点,特别适合于表达药用蛋白^[1-2]。在过去的 20 年中,毕赤酵母以其能高密度发酵、易于收获及拥有高效可控表达启动子等特点,已发展成为能够生成多种外源蛋白的表达系统^[3-5]。我们前期

采用商品化的毕赤酵母分泌表达质粒 pPIC9 构建

[基金项目] 江苏省南通市科学技术委员会资助项目(S40032). Supported by Science and Technology Committee of Nantong, Jiangsu Province(S40032).

[作者简介] 陆建荣,副主任技师。

* Corresponding author. E-mail: ljrmtsy@yahoo.com.cn

pPIC9-LL-37,在毕赤酵母中成功表达抗菌肽 LL-37,但表达量相对较低,无法达到高效表达 LL-37 的要求^[6]。在菌株筛选、培养条件、发酵技术等逐渐成熟的情况下,构建高表达载体是提高外源基因表达量的一个重要途径。因此,改良表达载体是提高外源蛋白质在毕赤酵母中的表达量,降低工业化生产成本的关键。

5'-非转录区(5'-untranslated regions, 5'-UTR)对蛋白表达的影响主要表现在 mRNA 的翻译水平上。毕赤酵母是一种甲醇营养型酵母,能以甲醇作为唯一碳源和能源生长^[7],与甲醇代谢相关的甲醇氧化酶(AOX1)可占细胞可溶性蛋白的 35%^[8],而其对应的 AOX1 mRNA 仅占总 mRNA 的 5%。Sreekrishna 等^[9]通过调整人血清白蛋白 mRNA 与 AOX1 mRNA 的 5'-UTR 相同后表达水平提高 50 倍以上。这提示 AOX1 mRNA 的 5'-UTR 非常有利于其在毕赤酵母中的翻译、表达,目的蛋白 mRNA 应尽可能具有与 AOX1 mRNA 相近最好是相同的 5'-UTR。

我们在前期工作中发现,目前常用的商品化毕赤酵母分泌表达质粒 pPIC9 信号肽 mRNA 的 5'-UTR 序列比 AOX1 mRNA 序列多 8 个核苷酸 GGATCCAA(nt938~945),其余序列完全一样,这可能是限制目的蛋白表达的重要因素之一。因此,本研究应用 PCR 方法去除载体 pPIC9 信号肽 mRNA 的 5'-UTR 序列中的 GGATCCAA 序列,使其与 AOX1 mRNA 的 5'-UTR 一致,构建新的表达载体 pPIC9-EDIT 及重组质粒 pPIC9-EDIT-LL-37,比较改建前后 LL-37 蛋白表达的变化,探讨质粒 pPIC9 信号肽 mRNA 5'-UTR 序列改建对毕赤酵母表达外源蛋白的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及材料

重组表达载体 pPIC9-LL-37 由本实验室前期构建,转化 pPIC9、pPIC9-LL-37 的毕赤酵母工程菌由本实验室保存^[6,10]。克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本室保存,Original Pichia Expression Kit (含 pPIC9)购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I、*Bgl* II、*Nsi* I、*Bst*B I、*Bam*H I 及 *Pfu* DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、Wizard Genomic DNA Purification Kit 购自 Promega 公司,消解酶 Lyticase 购自 Sigma 公司,山羊抗人 LL-37 购自 Santa Cruz 公司,LL-37 标准品购自 Hycult Biotechnology 公司,酵母培养基 YNB 和 Casamino acid 为 Difco 公司产品,其他试剂均为国

产或进口分析纯。

1.2 引物设计

毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9 5'-UTR 序列较毕赤酵母 AOX1 mRNA 的 5'-UTR 多 8 个核苷酸 GGATCCAA(nt938~945),内含 *Bam*H I 酶切位点,其余序列完全一样。nt673~678 与 nt1192~1197 分别是 pPIC9 的单切位点 *Nsi* I、*Xho* I,而 GGATCCAA 上游为 *Bst*B I 酶切位点 TTCGAA 序列,设计含酶切位点的引物 Pedit1(*Nsi* I) 5'-GAT TAT GCA TTG TCT CCA CAT TGT ATG C -3', Pedit2(*Bst*B I) 5'-CTC ATC GTT TCG AAT AAT TAG TTG TT-3', Pedit3(*Bst*B I):5'-ACT AAT TAT TCG AAA CGA TGA GAT TTC CTT CA-3', Pedit4(*Xho* I):5'-TTC TCG AGA GAT ACC CCT TCT TCT TTA-3',其中 Pedit2、Pedit3 内部人为去除了 GGATCCAA 序列,Pedit1、Pedit4 的 5'端分别含 *Nsi* I、*Xho* I 酶切位点。LL-37 蛋白鉴定 PCR 扩增引物:P1 5'-CTC TCG AGA AGA GAG AGG C-3',P2 5'-GGG AAT TCC TAG GAC TCA GTT C-3'。所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 改建片段的获取

分别以 Pedit1、Pedit2 及 Pedit3、Pedit4 为引物,以 pPIC9 为模板,进行 PCR 扩增。体系为:引物各 50 pmol,*Pfu* 2 U,1 \times PCR Buffer,200 μ mol/L dNTPs,体积 50 μ l;PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min;55 $^{\circ}$ C 1 min;72 $^{\circ}$ C 1 min 35 循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。各合并 3 管 PCR 产物乙醇沉淀,溶于 20 μ l TE,皆以 *Bst*B I 酶切,酶切物 1%琼脂糖电泳后,华舜胶回收试剂盒回收后进行连接反应,连接反应体系:两种 *Bst*B I 酶切回收 PCR 产物各 2 μ l,1 \times Ligase Buffer,1 μ l T₄ DNA 连接酶,体积 20 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜。取连接物千分之一稀释,取 2 μ l 为模板,以 Pedit1、Pedit4 为引物进行 PCR 扩增。

1.4 改建后载体 pPIC9-EDIT 的制备及鉴定

PCR 扩增产物与 pPIC9 以 *Nsi* I、*Xho* I 双酶切,分别电泳胶回收后进行连接反应,连接反应体系:4 ng 双酶切 PCR 产物,200 ng 双酶切 pPIC9,1 \times Ligase Buffer,1 μ l T₄ DNA 连接酶,体积 20 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α 细胞^[11],涂布于 37 $^{\circ}$ C 预热的含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑选转化子接种于含 60 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。少量抽提质粒 DNA 用于 PCR 鉴定:以质粒 DNA 为模板,以 Pedit1、Pedit4 为引物进行 PCR 扩增,扩增产

物 *Bam*H I 酶切、电泳,不被切开(约 533 bp)的克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。PCR 鉴定及测序正确的克隆命名为 pPIC9-EDIT。

1.5 改建后重组表达载体 pPIC9-EDIT-LL-37 的制备及鉴定

1.5.1 LL-37 片段扩增 参考文献^[6],获得酵母偏爱密码子编码的 LL-37 双链基因。

1.5.2 pPIC9-EDIT-LL-37 的制备 LL-37 双链基因与载体 pPIC9-EDIT 以 *Xho* I、*Eco*R I 酶切,分别电泳回收后进行连接反应,连接反应体系:4 ng 双酶切 PCR 产物,200 ng 双酶切 pPIC9-EDIT 载体,1×*Ligase* Buffer,1 μl T₄ DNA 连接酶,体积 20 μl,4℃过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5α 细胞,涂布于 37℃预热的含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板,37℃培养过夜。随机挑选转化子接种于含 60 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基,37℃培养过夜。少量抽提质粒 DNA 用于 PCR 鉴定。经 PCR 鉴定的克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5.3 阳性克隆的筛选与鉴定 用无菌牙签各随机挑选 100 个转化子对应接种于 MM、MD 平板,筛选 His⁺ Mut^s 及 His⁺ Mut⁺ 克隆,随机挑取 His⁺ Mut^s、His⁺ Mut⁺ 克隆各 12 个分别接种于 1.5 ml MD 培养基,培养 20 h,取 1 ml 离心悬浮于 293 μl 50 mmol/L EDTA,加 7.5 μl 20 mg/ml Lyti-case,37℃ 60 min,用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取酵母 DNA,以 P1、P2 为引物行 PCR 扩增,扩增产物在 Caliper1000 芯片仪上电泳。

1.6 pPIC9-EDIT-LL-37 转入毕赤酵母菌中诱导目的蛋白表达及鉴定

1.6.1 LL-37 蛋白的诱导表达及条件优化 挑取筛选到的 10 个 pPIC9-EDIT-LL-37 His⁺ Mut^s 阳性克隆接种于 10 ml MD 培养基(于 100 ml 三角瓶),28~30℃、280 r/min 振荡培养 24 h,3 000 r/min 离心收获菌体,悬于 10 ml BMGY 培养基振荡培养 12 h,离心收获菌体,悬于 10 ml BMGY 培养基(含 1% Casamino acid),振荡培养 8 h,离心收获菌体,悬浮于 MM 培养基(含 0.5% 甲醇,1% Casamino acid)调节 *D*₆₀₀ 为 20,取 10 ml 振荡培养,进行甲醇诱导表达,每隔 24 h 取样 500 μl,同时补加甲醇至终浓度为 0.5%,培养 144 h 结束。取 5 μl 上述转入 pPIC9-EDIT-LL-37 毕赤酵母菌离心上清液加入 1 000 μl 菌液,参照 Hultmark 等^[12]的方法进行抗菌肽 LL-37 对 *E. coli* DH5α 的杀菌效价检测。转化 pPIC9-LL-37 的工程菌同样处理,不同的是取样

100 μl,加入 900 μl 菌液中。根据杀菌效价得到最高表达克隆及各自诱导最佳时间点,选用不同的甲醇浓度诱导培养获得最佳诱导浓度。选各自最高表达克隆扩大培养,培养方法与条件最优化,体积为 100 ml(于 1 000 ml 三角瓶),培养至最佳时间,离心收获上清,沸水浴 30 min,-20℃冻存。

1.6.2 表达产物 Tricine-SDS-PAGE 及 Western 印迹分析 抗菌肽 LL-37 相对分子质量为 4 500,用常规 SDS-PAGE 难以得到理想的分辨率,本研究使用 Tricine-SDS-PAGE (16% Separating gel, 10% Spacer, 4% Stacking gel),使得 LL-37 能得到较好的分离。具体参照 Schagger 等^[13]的方法:取 5 μl 上清液进行 Tricine-SDS-PAGE,以冷冻干燥浓缩 20 倍的转化 pPIC9 和转化 pPIC9-LL-37 的毕赤酵母工程菌的发酵上清液及商品合成肽 LL-37 为对照,凝胶采用硝酸银染色。电泳条件稳定后,参照 Kjeldsen 等^[14]方法,进行 Western 印迹分析。

1.7 pPIC9-EDIT-LL-37 及 pPIC9-LL-37 表达蛋白抑菌浓度的测定 目前表达蛋白的纯化度不是很高,无法精确测定蛋白含量,因此本研究采用测定表达蛋白抑菌直径的方法间接测定蛋白的表达量。参照 Hultmark 等^[15]的方法对上清液进行针对 *E. coli* DH5α 抑菌活性检测。10 mmol/L pH 7.4 磷酸钠缓冲液 10 ml 加 0.1 g 琼脂糖及 0.3 mg Tryptic soy broth 干粉灭菌,冷却到 43℃,将对数生长期的细菌 *E. coli* DH5α (*D*₅₇₀ = 0.5,浓度约为 10⁹ CFU/ml)以液体培养基稀释 100 倍,取 200 μl 加入到上述琼脂糖培养基浇注平板,冷却后打孔(3.2 mm),加 10 μl 上清液,放置 3 h,上铺双倍营养琼脂糖培养基(10 mmol/L pH 7.4 磷酸钠缓冲液 10 ml 加 0.1 g 琼脂糖及 0.6 mg Tryptic soy broth 干粉灭菌,冷却到 43℃),37℃培养过夜,精确测量抑菌圈直径。以 1 000、100、10 μg/ml 的 LL-37 作为标准品,测定抑菌圈直径,测 3 次,计算平均值,绘制标准曲线,测定待测样品抑菌浓度。同时对浓缩 20 倍的转化 pPIC9 及 pPIC9-LL-37 的工程菌诱导产物进行抑菌活性测定,比较改建前后目的蛋白表达量的变化。

2 结果

2.1 改建片段的获得 分别以 Pedit1、Pedit2 及 Pedit3、Pedit4 为引物,以 pPIC9 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 *Bst*B I 酶切连接后,再以 Pedit1、Pedit4 为引物扩增获得了大小约 533 bp 的片段,与预期结果一致(图 1)。

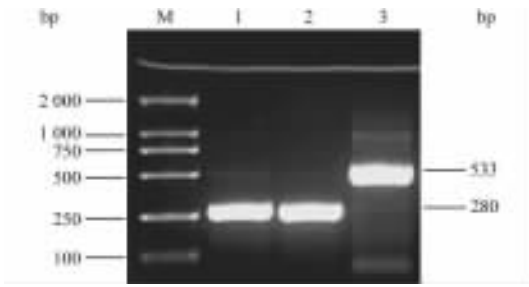


图 1 改建片段的 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR identification of modified fragment

M:DL2000 marker;1:PCR product using Pedit1,Pedit2(285 bp);2:PCR product using Pedit3,Pedit4(278 bp);3:PCR product for reconstruct(533 bp)

2.2 pPIC9-EDIT 载体的构建与鉴定结果 由于双酶切线性化胶回收的 pPIC9 不可能自身环化,因此理论上讲 Amp 抗性菌落应含有所需要的质粒。随机挑选 5 个单菌落,培养后抽提质粒,以 pPIC9 为阴性对照,用 Pedit1、Pedit4 进行 PCR 扩增,扩增产物以 BamH I 酶切,电泳,结果 3 个失去 BamH I 酶切位点,选一失去 BamH I 酶切位点克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果与预期一致(图 2),证实改造成功,成功改造的载体命名为 pPIC9-EDIT。

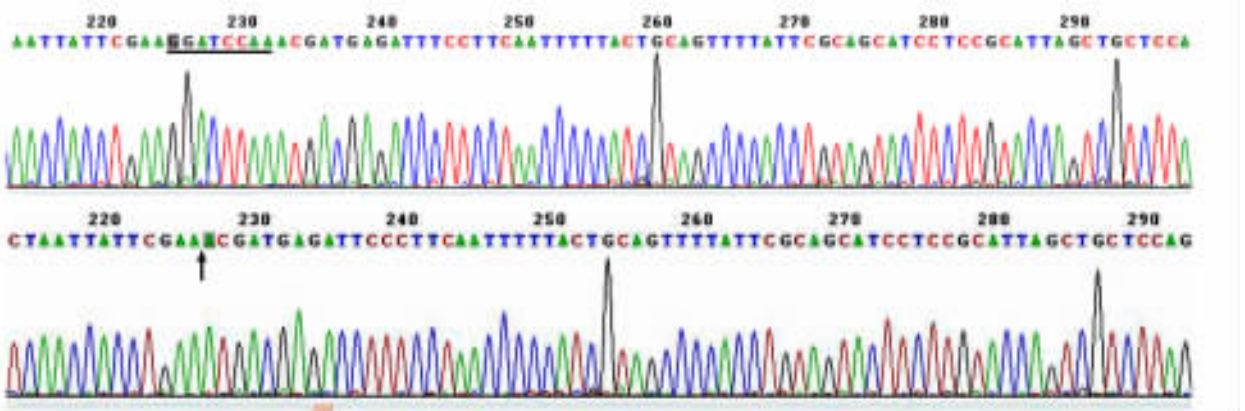


图 2 pPIC9-EDIT 质粒测序结果

Fig 2 Sequencing result of pPIC9-EDIT plasmid

The upper graph showed part of the sequence of pPIC9 and the lower showed the corresponding sequence of pPIC9-EDIT. The sequence GGATC-CAA(under line) has been deleted in the lower graph(arrow)

2.3 pPIC9-EDIT-LL-37 的制备及鉴定 成功构建重组质粒 pPIC9-EDIT-LL-37,经 Bgl II 线性化后用原生质球方法转化 Pichia pastoris GS115,取 His⁺ Mut⁺、His⁺ Mut^s 克隆各 12 个行 PCR 扩增,结果分别有 8 和 10 个克隆检测到目的基因的插入,His⁺ Mut^s 克隆鉴定结果见图 3。

2.4 重组质粒 pPIC9-EDIT-LL-37 的诱导表达 His⁺ Mut⁺、His⁺ Mut^s 两种表型分别进行甲醇诱导表达,His⁺ Mut^s 表达量较高,通过小体积培养及对 E. coli DH5 α 杀菌效价检测,获得一最高表达菌株,最佳诱导甲醇浓度为 0.5% 与转化 pPIC9-LL-37 的工程菌相仿(图 4A),最佳诱导表达时间 72 h,较转化 pPIC9-LL-37 的工程菌诱导时间(96 h)短(图 4B)。

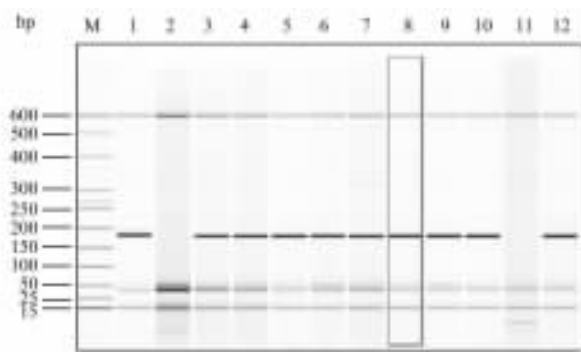


图 3 His⁺ Mut⁺ 克隆 PCR 鉴定结果

Fig 3 PCR analysis of His⁺ Mut^s clones of Pichia after transfection

M: Marker;1-12:PCR product of P. pastoris harboring pPIC9-EDIT-LL-37, 2&11 are negative, the others are positive

2.5 表达蛋白 Tricine-SDS-PAGE 及 Western 印迹分析结果 以 LL-37 标准品及浓缩 20 倍的转化 pPIC9、pPIC9-LL-37 的 P. pastoris 培养上清液作对照,电泳银染色结果显示:甲醇诱导表达上清在 4 500 处出现一条带(图 5A),Western 印迹结果表明产物为 LL-37(图 5B)。

2.6 转入 pPIC9-EDIT-LL-37 及 pPIC9-LL-37 的毕赤酵母菌表达产物抑菌浓度的比较 用系列稀释的 LL-37 标准品进行检测成功绘制出标准曲线(图 6),拟合方程为 $y = x/200 + 0.66$ 。将转入 pPIC9-EDIT-LL-37 的工程菌发酵上清液抑菌直径 $[(0.76 \pm 0.05) \text{ cm}]$ 代入拟合方程,计算出其表达量

约 21 $\mu\text{g/ml}$, 而转入 pPIC9-LL-37 工程菌发酵上清液抑菌直径 $[(0.72 \pm 0.05)\text{cm}]$ 代入拟合方程, 计算出其表达量约为 12 $\mu\text{g/ml}$, 考虑到浓缩倍数, 实际为 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 因此, 改建 pPIC9 5'-UTR 后 LL-37 表达量约提高了 35 倍。

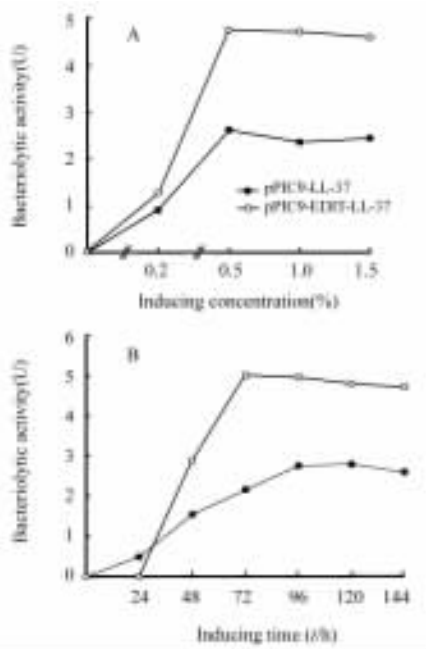


图 4 杀菌效价与诱导浓度(A)及诱导时间(B)的关系
Fig 4 Relationship between bacteriolytic activity of recombinant LL-37 with inducing concentration(A) and inducing time(B)

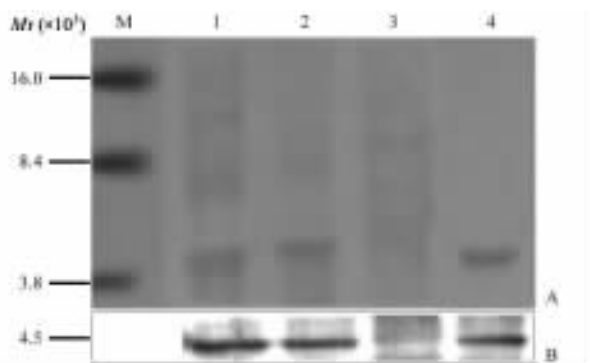


图 5 表达产物 Tricine-SDS-PAGE 银染色分析(A)及 Western 印迹分析(B)结果
Fig 5 Tricine-SDS-PAGE silver staining analysis(A) and Western blotting analysis(B) of LL-37 expression product

In Fig A, M: Marker; 1: Concentrated supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9-LL-37; 2: Supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9-EDIT-LL-37; 3: Concentrated supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9; 4: LL-37 control. In Fig B, 1: Concentrated supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9-LL-37; 2: Supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9-EDIT-LL-37; 3: Concentrated supernatant from *P. pastoris* harboring pPIC9; 4: LL-37 control

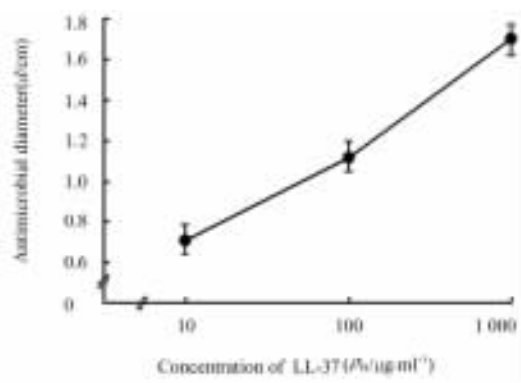


图 6 LL-37 抑菌浓度-抑菌直径标准曲线
Fig 6 Standard curve of LL-37 antimicrobial concentration-antimicrobial diameter
 $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

我们前期实验^[6]中选用毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9, 成功构建了 pPIC9-LL-37 并诱导表达, 取得一定量的 LL-37 蛋白, 但仍存在表达量偏低的问题。因此, 提高目的蛋白表达产量成为目前亟待解决的难题。外源基因 5'-UTR 决定基因转录后的翻译效率, 其核苷酸序列和长度能明显影响外源蛋白的表达^[9]。毕赤酵母的 AOX1 mRNA 5'-UTR 非常有利于其在毕赤酵母中的表达^[8], 其 5'-UTR 的核苷酸序列和长度引起了科学工作者极大的关注。Sreekrishna 等^[9]通过调整人血清白蛋白 mRNA 5'-UTR 序列, 使之与 AOX1 mRNA 5'-UTR 相同, 其表达水平明显提高。因此, 改建表达载体 pPIC9 中外源基因 5'-UTR 序列, 使之与 AOX1 mRNA 5'-UTR 相同或相近, 是提高目的蛋白表达产量的可能途径之一。

进一步分析发现毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9 外源蛋白 mRNA 5'-UTR 较 AOX1 mRNA 的 5'-UTR 多 8 个核苷酸 GGA TCC AA (nt938~945), 内含 *Bam*H I 酶切位点, 其余序列完全一样。通过检索发现 nt673~678 与 nt1192~1197 分别是 pPIC9 的单切位点 *Nsi* I、*Xho* I, 而 GGA TCC AA 上游为 *Bst*B I 酶切位点 TTC GAA 序列。因此, 本研究设计含酶切位点的引物 Pedit1、Pedit2、Pedit3、Pedit4, 其中 Pedit2、Pedit3 内部人为去除 GGA TCC AA 序列, 分别以 Pedit1、Pedit2 及 Pedit3、Pedit4 为引物, pPIC9 为模板, 进行 PCR 扩增, 两 PCR 产物电泳回收后以 *Bst*B I 酶切、连接后, 以 Pedit1、Pedit4 为引物行 PCR 扩增。产物电泳回收物与 pPIC9 以 *Nsi*I、*Xho* I 双酶切、连接, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 通过以 Pedit1、Pedit4 为引

物的PCR扩增、*Bam*H I 酶切鉴定,选失去 *Bam*H I 酶切位点的克隆测序。测序结果证明所选克隆改造后,外源基因的 5'-UTR 与 *AOX1* mRNA 的 5'-UTR 序列完全一致。改造成功的 pPIC9-EDIT 进一步克隆入 LL-37 基因,转化毕赤酵母 GS115,诱导表达表明表达产物较改造前提高了约 35 倍。

当然,影响外源蛋白分泌表达的因素很多,包括蛋白本身性质、启动子的选择、分泌信号、偏爱密码子的选择、产物稳定性、细胞本身的活力状态等因素。我们前期系列研究^[6,10]构建 pPIC9-LL-37 时选择强诱导型 *AOX1* 启动子、应用 α -factor 信号肽^[16-17]、选择酵母偏爱密码子^[18],诱导前提高细胞密度及细胞活力状态。这些措施对诱导蛋白的分泌表达极有帮助。此外,我们还在诱导培养基中加入 0.5% Casamino acid,不仅起到增加营养的作用,同时作为蛋白酶的竞争底物,增加了产物的稳定性^[19]。在以上工作的基础上,本研究进一步改进 pPIC9 5'-UTR 序列,大大提高了外源蛋白 LL-37 的表达水平,缩短了诱导时间,对工业生产非常有利。国外 Hong 等^[20]也采用毕赤酵母表达 LL-37 蛋白,但其直接采用人源性 LL-37 基因序列,不含酵母偏爱密码子不适合在酵母中表达;其表达产物并非纯天然蛋白,N 端含有甲硫氨酸,会对蛋白活性产生不可预知的影响;其并非分泌表达,产物不易纯化,不利于工业化生产;且本研究对 pPIC9 5'-UTR 进行了改建,会明显提高 LL-37 蛋白产量。

本研究成功改建了商品化的毕赤酵母分泌载体 pPIC9 的 5'-UTR 序列,改建后 LL-37 蛋白的表达量明显上升,证实 pPIC9 5'-UTR 序列的改建能明显提高毕赤酵母表达 LL-37 蛋白。但随诱导时间延长,LL-37 蛋白表达量反而降低,同时培养基变色、发臭,可能由于高浓度的抗菌肽对毕赤酵母有一定的杀伤性。如何改变发酵条件,在提高表达量的前提下,避免这些问题仍有待进一步的研究探讨。本研究结果表明通过改建 pPIC9 5'-UTR 序列来提高毕赤酵母表达外源蛋白具有广阔的应用前景。

(志谢 本实验得到南通大学微生物与免疫学实验室沈爱国教授等的热情指导和帮助,中国科学院上海生物化学研究所张倩也给予了技术支持,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Niu M, Li X, Wei J, et al. The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its *in vitro* activity[J]. Protein Expr Purif, 2007, doi:10.1016/j.pep.2007.08.006.
- [2] 刘忠渊,张富春,毛新芳,等. 利用毕赤酵母表达外源蛋白的研究[J]. 生物技术, 2004, 14: 56-58.
- [3] Gasser B, Maurer M, Gach J, et al. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments[J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 94: 353-361.
- [4] Hu S, Li L, Qiao J, et al. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single chain antibody in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expr Purif, 2006, 47: 249-257.
- [5] Richter S, Nieveler J, Schulze H, et al. High yield production of a mutant *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its purification[J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 93: 1017-1022.
- [6] 陆建荣,王惠民,吴萍,等. 人源抗菌肽 LL-37 表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 833-837.
- [7] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22: 249-270.
- [8] Koutz P, Davis G R, Stillman C, et al. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes[J]. Yeast, 1989, 5: 167-177.
- [9] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gene, 1997, 190: 55-62.
- [10] 陆建荣,王惠民,凌勇武,等. 人源多肽抗生素 LL-37 真核表达载体的构建[J]. 临床检验杂志, 2007, 25: 185-188.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1220-1224.
- [12] Hultmark D, Steiner H. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal protein from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [13] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166: 368-379.
- [14] Kjeldsen T, Pettersson A F, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1999, 29(Pt 1): 79-86.
- [15] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*[J]. Eur J Biochem, 1982, 127: 207-217.
- [16] Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, et al. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase[J]. Protein Sci, 1998, 7: 1415-1422.
- [17] Eckart M R, Bussineau C M. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast[J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7: 525-530.
- [18] 赵翔,李至,陆身枫,等. 酵母 *Yarrowia lipolytica* 的密码子用法分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, 38: 510-516.
- [19] Werten M W, van den Bosch T J, Wind R D, et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*[J]. Yeast, 1999, 15: 1087-1096.
- [20] Hong I P, Lee S J, Kim Y S, et al. Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29: 73-78.

[收稿日期] 2007-09-10

[修回日期] 2007-11-01

[本文编辑] 贾泽军