

重组牙鲆生长激素基因片断在毕赤酵母中的表达

邢福国^{1,2}, 张培军², 谭训刚², 刘 阳¹

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘 要: 为了开发一种有效的重组牙鲆生长激素(r-fGH)的方法, 利用 PCR 的方法从牙鲆 cDNA 文库中克隆得到了牙鲆生长激素(*fgh*)的 cDNA 片断。接着将这个 *fgh* 片断克隆到整合型质粒 pAO815, 它可以在甲醇诱导启动子的调控下表达外源蛋白。利用这种包含一个 *fgh* 插入片段的克隆来构建含有 2 个和 3 个头尾顺序排列的 *fgh* 表达框的表达质粒。利用氯化锂转化的方法将所构建的质粒转化到毕赤酵母 GS115, 然后进行筛选、培养和 0.5% 甲醇诱导表达, 最后得到重组表达的牙鲆生长激素。

关键词: 牙鲆; 重组牙鲆生长激素; 毕赤酵母; 基因表达

Expression of Recombinant Flounder Growth Hormone Gene in *Pichia pastoris*

XING Fu-guo^{1,2}, ZHANG Pei-jun², TAN Xun-gang², LIU Yang¹

(1. Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to develop an efficient method for recombinant flounder growth hormone (r-fGH) production, a cDNA fragment coding for the flounder growth hormone (*fgh*) was amplified by PCR. Then *fgh* gene was cloned into the integrative plasmid pAO815 under the control of a methanol-inducible promoter. Clones containing a single *fgh* insert were used to construct cassettes bearing 2 and 3 copies of *fgh* tandem. The constructed plasmid was then transformed into *Pichia pastoris* cell line GS115 by lithium chloride transformation method. The transformants were screened, cultured and induced by 0.5% methanol. By these steps, the recombinant flounder growth hormone gene is expressed in *Pichia pastoris*.

Key words: flounder; recombinant flounder growth hormone; *Pichia pastoris*; gene expression

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0198-04

1948 年, Pickford 和 Thompson 发现哺乳动物脑下垂体分泌的生长激素可以促进鱼类的生长^[1-6]。从此之后, 人们对于生长激素在鱼类养殖业中的应用给予了越来越多的关注。大量的鱼类生长激素及其相关基因已经被分离和克隆得到^[7]。人们已经建立了一些重组 DNA 技术用来生产鱼类生长激素^[8-10]。但是重组牙鲆生长激素在酵母中的表达还没有研究。

日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 最大可以达到 1m 长、10kg 重, 是亚洲沿海地区最重要的养殖鱼类之一。牙鲆生长激素的 cDNA 序列在 1988 年被公布^[11], 1998 年 Jeh 和他的同事开发了一种利用大肠杆菌有效生

产重组牙鲆生长激素的方法^[12]。然而, 利用重组毕赤酵母系统的最新 DNA 技术似乎是大规模生产鱼类生长激素的最好选择, 因为毕赤酵母具有许多优点, 包括: 高产率、小规模发酵, 外源基因重组到染色体以及可以达到几百毫克每升的产率^[13-14]。本实验将研究重组牙鲆生长激素(r-fGH)在毕赤酵母中的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

毕赤酵母 GS115 购自 Invitrogen 公司, 作为蛋白质表达菌株; 大肠杆菌购自 Invitrogen 公司, 用于构建所

收稿日期: 2007-07-29

基金项目: 国家 973 项目(2004CB117402); 国家 863 项目(2004AA628110)

作者简介: 邢福国(1979-), 男, 博士, 研究方向为食品安全和分子生物学。E-mail: fgxing@163.com

有的 *fGH* 表达质粒的宿主菌。

平面生长培养基为 YPD 琼脂培养基(每 100ml 含: 酵母粉 1g、蛋白胨 2g、葡萄糖 2g、和琼脂 1.3g); 液体生长培养基为 MGY 培养基(每 100ml 含: 含有硫酸铵不含氨基酸的酵母氮源 1.34g、生物素 0.04mg、甘油 1ml); 诱导 *r-fGH* 表达的培养基为 MM 培养基(每 100ml 含: 含有硫酸铵不含氨基酸的酵母氮源 1.34g、生物素 0.04g、甲醇 0.5ml)。

所有的大肠杆菌细胞都生长在添加了 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中。

1.2 PCR 法分离扩增 DNA

牙鲆被饲养在中国科学院海洋研究所, 并控制饲养环境(光照 14h, 黑暗 10h; 温度为 $15 \pm 1^\circ\text{C}$; 海水; 通气)^[15]。从牙鲆脑下垂体分离总 RNA, 以此总 RNA 作为模板并利用 Marthon-cDNA kit(Clontech, USA)来合成 cDNA。根据 *fGH* 的 cDNA 序列合成两条引物 *fGH*PF(5' - GGAATTCATGCAGCCAATCACAGAGAACCAG-3') 和 *fGH*PR(5' - GGAATTCCTACAGGGTGCAGTTAGCTTC-3')。为了便于后面的质粒构建, 在这两条引物的 5' 末端添加了 *EcoRI* 酶切位点。利用所合成的引物进行 PCR 反应从所合成的 cDNA 中扩增目的 DNA 片段。所得到的 PCR 产物通过电泳、胶回收, 然后以平末端的形式连接到载体 pBluecript SK 中 (BSSK-*fgh*) 并测序。

1.3 pAO815 1x-*fgh* 质粒的构建

大肠杆菌/酵母双效载体 pAO815 被用来构建含有单个和多个拷贝的牙鲆生长激素(*fgh*)的表达载体, 其外源基因的表达式受到甲醇诱导启动子 AOX1(图 1)的调控。因为在每条引物的末端都引入了一个 *EcoRI* 识别位点, 所以通过 *EcoRI* 酶切消化 BSSK-*fgh* 就可以得到 522bp 的 *fgh* 片段。接着把这个片段克隆到 pAO815 的单克隆位点位于 PAOX 和 3' AOX(TT) 之间的 *EcoRI* 位点^[16]。转化大肠杆菌, 并用氨苄青霉素来筛选阳性克隆, 然后测序选择插入 pAO815 的 *fgh* 为正向的克隆。这样这个质粒 (*E. coli*/pAO815 1x-*fgh*) 就可以作为 *fgh* 表达框(5'AOX-*fgh*-3'AOX-TT3')的来源用于构建后面的表达质粒。

1.4 pAO815 2x-*fgh* 和 pAO815 3x-*fgh* 质粒的构建

利用 *Bgl*II 和 *Bam*HI 酶切质粒 pAO815 1x-*fgh* 并进行电泳分离和胶回收就可以得到完整的 *fgh* 表达框(图 2)。将完整的表达框回收后进行连接反应并进行 *Bgl*II 和 *Bam*HI 双酶切, 将此多聚体与 *Bam*HI 酶切和 CIP 去磷酸化的单拷贝 pAO815 表达载体连接, 转化 DH5 α 菌, 经酶切鉴定筛选出 2 拷贝和 3 拷贝的质粒 pAO815 2x-*fgh* 和 pAO815 3x-*fgh*^[17]。

1.5 表达质粒转化酵母宿主菌

制备酵母菌 GS115 感受态细胞并将质粒 pAO815 3x-*fgh* 用 *Stu*I 切成线性, 取 10 μ g 线性化表达载体加入到

0.1ml 酵母感受态细胞中, 30 $^\circ\text{C}$ 温浴 30min 后加入 0.7ml 40% 的 PEG-3350。然后用 0.1ml 无菌水重悬菌体, 并将重悬液涂布于 MD 板上, 置 30 $^\circ\text{C}$ 培养 2~3d, 观察转化子的生长。将转化子及 *Mut*⁺ 与 *Mut*^s 阳性对照分别点到相应位置的 MD 板和 MM 板, 30 $^\circ\text{C}$ 培养 2~3d, 观察转化子在 MD 板和 MM 板上的生长情况, 选择在 MD 板上正常生长而在 MM 板上生长较慢的菌落进行进一步的诱导表达。

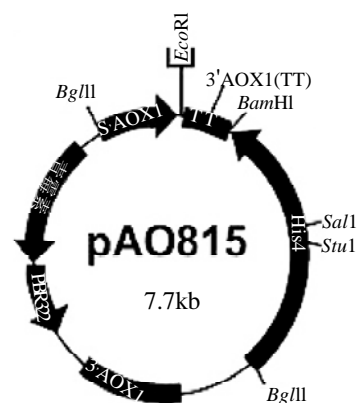
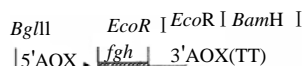
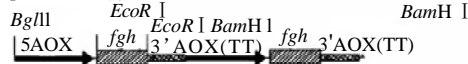


图1 具有甲醇启动子 AOX1 的整合型克隆载体 pAO815
Fig.1 Integrative pAO815 cloning vector with methanol promoter (AOX1)

pAO815 1x-*fgh*



pAO815 2x-*fgh*



pAO815 3x-*fgh*

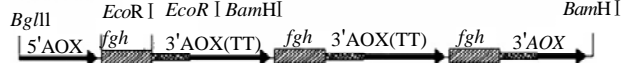


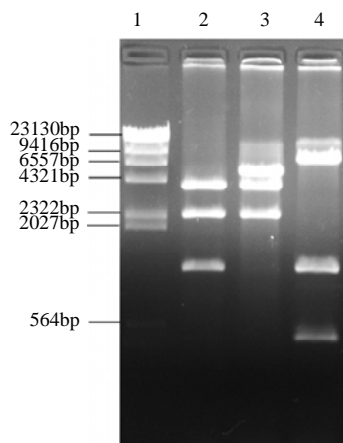
图2 含有 1x、2x、3x-*fgh* 的载体的表达框示意图
Fig.2 Diagram of *fgh* expression cassettes contained in 1x, 2x, and 3x-*fgh* expression vectors

2 结果与分析

2.1 多拷贝 *fgh* 的克隆

凝胶电泳分离 PCR 产物, 接着连接到平末端载体 BSSK 上(BSSK-*fgh*)用于测序, 测序结果显示 PCR 产物就是牙鲆生长激素基因(*fgh*)。 *Bgl*II 和 *Bam*HI 双酶切鉴定重组 pAO815 3x-*fgh*, 结果显示切出三条带: 5.4kb (含有三串联拷贝的 *fgh* 表达框)、2.4 和 4.0kb(图 3)。然而, *Bgl*II 和 *Bam*HI 双酶切 pAO815, 结果显示切出三条带: 1.28 (不含 *fgh* 的单个表达框)、2.4 和 4.0kb (图 3)。 *Eco*RI

酶切 pAO815 3x-*fgh*, 结果显示切三条带: 7.7kb (pAO815)、1.28kb (不含 *fgh*) 的表达框和 522bp (*fgh*) (图 3)。这些结果表明表达质粒 pAO815 3x-*fgh* 在一个载体上含有三个串联拷贝 *fgh* 表达框(图 2)。

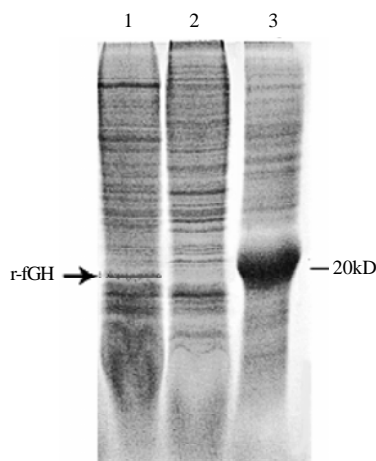


1. λ DNA/*Hind*III 分子量标准; 2.用 *Bgl*II 和 *Bam*HI 酶切质粒 pAO815
3.用 *Bgl*II 和 *Bam*HI 酶切质粒 pAO815 3x-*fgh*; 4.用 *Eco*RI 酶切质粒 pAO815 3x-*fgh*。

图 3 多拷贝质粒 pAO815 3x-*fgh* 的限制性内切酶酶切分析
Fig. 3 Restriction endonuclease analysis of multicopy of pAO815 3x-*fgh* with *Bgl*II and *Bam*HI

2.2 重组蛋白的表达

毕赤酵母系统的一个优点就是, 外源基因整合到酵母的基因组从而使之在复制的过程中不易丢失, 能够稳定遗传。含有三拷贝 *fgh* 表达框的毕赤酵母在 25ml MGY 培养基中 30℃ 培养到 $OD_{600}=2\sim6$ (接近 16~18h)。离心收集菌体, 然后用 MM 培养基重悬菌体到 $OD_{600}=1.0$ (大



1. 甲醇诱导 GS115/pAO815 3x-*fgh* 的表达; 2. 不用甲醇诱导 GS115 pAO815 3x-*fgh* 的表达; 3. 重组干扰素(分子量为 20kD)。

图 4 重组牙鲆生长激素的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of r-fGH expression using plasmid pAO815 3x-*fgh*

约 100~200ml), 添加终浓度为 0.5% 的甲醇诱导 *fGH* 的表达, 每 24h 添加一次保持诱导。在 96 h 收集培养物并用 SDS-PAGE 分析重组牙鲆生长激素(r-fGH)的表达(图 4)。牙鲆生长激素基因最初被克隆到大肠杆菌中进行表达, 为了提高得率并减小发酵规模, 转向毕赤酵母系统, 并且毕赤酵母系统具有一些优点: 整合到基因组, 从而不易丢失; 重组真核蛋白能够正确折叠和进行翻译后的正确修饰; 较高的得率。

取 1.2ml 在 MM 培养基中 30℃ 培养了 96h 的菌液离心, 然后加入 50 μ l 破碎溶液(pH7.4; 50mmol/L 磷酸钠, 1mmol/L PMSF; 1mmol/L EDTA; 5% 甘油)进行溶解, 煮沸 10min 后取 10 μ l 溶液用 15% 的 SDS-PAGE 进行分析, 结果见图 4。

3 结 论

综上所述, 通过扩增得到了牙鲆生长激素基因(*fgh*)并将其克隆到整合型质粒 pAO815。接着, 构建了含有三拷贝串联表达框的质粒 pAO815 3x-*fgh* 并利用氯化锂转化法将其转化到毕赤酵母 GS115。然后利用甲醇诱导表达得到了重组牙鲆生长激素 r-fGH。这些结果表明本实验所描述的方法能够在真核生物毕赤酵母 GS115 中高效表达牙鲆生长激素, 这为以后重组牙鲆生长激素在鱼类水产养殖中应用打下了坚实的基础。因为生长激素能够促进鱼类的生长, 所以重组牙鲆生长激素的应用可以促进我国牙鲆水产养殖业的发展, 为人们提供更多的鱼肉供应, 丰富人们的食品来源并改善人们的饮食结构。

参考文献:

- [1] PICKFORD G E, THOMPSON E F. The effect of purified mammalian growth hormone on the killifish (*Fundulus heteroclitus*(Linn)) [J]. J Exp Zool, 1948, 109: 367-383.
- [2] HIGGS D A, DONALDSON E M, DYE H M, et al. A preliminary investigation of the effect of bovine growth hormone on growth and muscle composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1975, 27: 240-253.
- [3] HIGGS D A, DONALDSON E M, DYE H M, et al. Influence of bovine growth hormone and L-thyroxine on growth, muscle composition, and histological structure of the gonads, thyroid, pancreas, and pituitary of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. J Fish Res Board Can, 1976, 33: 1585-1603.
- [4] HIGGS D A, FAGERLUND U H M, MCBRIDE J R, et al. Influence of combinations of bovine growth hormone, 17 α -methyltestosterone, and L-thyroxine on growth of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Can J Zool, 1977, 55: 1048-1056.
- [5] HIGGS D A, DONALDSON E M, MCBRIDE J R, et al. Evaluation of the potential for using a chinook salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Can J Zool, 1978, 56: 1226-1231.
- [6] KOMOURDJIAN M P, SAUNDERS R L, FENWICK J C. The effect of porcine somatotropin on growth and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr [J]. Can J Zool, 1976, 54: 531-535.

- [7] CHEN T T, SHAMBLOTT M, LIN C M, et al. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes[C]//DAVEY K G, PETER R E, TOBE S S. Perspectives in comparative endocrinology. Ottawa National Research Council of Canada, 1994: 352-364.
- [8] FINE M, SAKAL E, VASHDI D, et al. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification, and determination of biological activity *in vitro* and *in vivo*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1993, 89: 51-61.
- [9] CHENG C M, LIN C M, SHAMBLOTT M, et al. Production of a biologically active recombinant teleostean growth hormone in *E. coli* cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 1995, 108: 75-85.
- [10] 张竞男, 宋平, 胡珈瑞, 等. 6 种重要经济鱼类生长激素完整 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(1): 19-29.
- [11] MOMOTA H, KOSUGI R, OHGAI H, et al. Amino acid sequence of flounder growth hormone deduced from a cDNA sequence[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(21): 10362.
- [12] JEH H S, KIM C H, LEE H K, et al. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 60: 183-193.
- [13] VEDVICK T, BUCKHOLZ R G, ENGEL M, et al. High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*[J]. J Ind Microbiol, 1991, 7: 197-201.
- [14] KIM T R, GOTO Y, HIROTA N, et al. High-level expression of bovine beta lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties[J]. Protein Eng, 1997(10):1339-1345.
- [15] ZHANG Y, TAN X, ZHANG P J, et al. Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Analysis of Its expression patterns during embryogenesis[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(2): 139-148.
- [16] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T, et al. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 315-325.
- [17] PAUS E J, WILLEY J, RIDGE R J, et al. Production of recombinant endotoxin neutralizing protein in *Pichia pastoris* and methods for its purification[J]. Protein Expr Purif, 2002, 26: 202-210.