

pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 毕赤酵母表达载体的构建和表达

刘学锋, 吕正兵, 汪 波, 徐 涛

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 将掌叶半夏凝集素和死亡素的融合基因 *thanatin-linker-ppa* 定向连接到 pPIC3.5K, 构建酵母表达载体 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 并进行序列分析, 经 *SalI* 单酶切线性化后电转化到 GS115 毕赤酵母感受态细胞中, PCR 鉴定后在含有 G418 抗性的 YPD 平板筛选高拷贝重组子。利用甲醇在 BMMY 培养基中诱导表达融合蛋白, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析显示获得分子量约 31kD 的融合蛋白, 融合蛋白经纯化后 MTT 分析其抗肿瘤活性, 结果显示融合蛋白具有显著的抗肿瘤效果。

关键词: 掌叶半夏凝集素; 死亡素; pPIC3.5K; MTT

中图分类号: Q786

文献标识码: A

0 引 言

1995 年 Peumans 等定义植物凝集素为至少具有一个可与单糖或寡聚糖特异可逆结合的非催化结构域的植物蛋白^[1]。掌叶半夏凝集素(*Pinellia pedatisecta* agglutinin, PPA)是从掌叶半夏块茎中提取的能够特异性凝集甘露糖的糖蛋白, 属于单子叶植物凝集素家族^[2]。研究表明, 掌叶半夏凝集素具有凝血、抗病毒侵染、抗肿瘤等功效。2007 年掌叶半夏凝集素 cDNA 被成功克隆, 长度为 1 146 bp, 其开放阅读框 771 bp, 编码 256 个氨基酸^[3]。原核表达掌叶半夏凝集素具有和天然蛋白相似的凝血活性^[4]。糖链在合成水平上的差异和特殊糖基结构与肿瘤细胞的侵染均有一定的相关性^[5-6], 并且掌叶半夏凝集素能够识别实体肿瘤细胞表面的甘露糖表型糖抗原^[7]。

抗菌肽(Protegrin)是生物体内一种具有抗菌活性的动物蛋白, 通常是昆虫类用于抵抗外来微生物第一层防御系统^[8]。死亡素(Thanatin), 又称死

亡肽, 是在昆虫斑腹刺益蝽(*Podisus maculiventris*)中发现的由 21 个氨基酸残基组成的抗菌肽, 结构简单, 对革兰氏阳性菌和阴性菌及某些真菌都均有抑制作用, 但对酵母无影响, 哺乳动物细胞无溶血性表现^[9-10]。近年来核磁共振技术分析死亡肽的结构显示其二硫桥结构和 C-端的 β 发卡结构与抗菌功效直接相关^[11]。

在治疗类似于宫颈癌等由于细菌感染导致细胞癌变的疾病中, 抗癌药物鲜有抗菌效果^[12]。本研究从掌叶半夏的抗癌活性出发, 为了修饰其抗菌活性, 利用重叠 PCR 技术, 将编码小分子抗菌肽死亡素的基因克隆到编码掌叶半夏蛋白基因的 5'端。为了发挥死亡素和掌叶半夏蛋白各自的活性, 在两段基因中引入柔性肽基因。本文拟构建 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 毕赤酵母胞内表达载体, 通过甲醇诱导表达并分离纯化获得 Thanatin-PPA 融合蛋白, 鉴定融合蛋白的抗肿瘤活性, 为进一步开展掌叶半夏凝集素对癌细胞表面糖抗原表型作用和甘露糖型凝集素的抗肿瘤研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

含有 *thanatin-linker-ppa* 融合基因的重组质粒 pEasy-T1-*thanatin-linker-ppa*, 大肠杆菌菌株 TOP10、DH5 α , HeLa 细胞为本实验室保存。酵母表达质粒 pPIC3. 5K、GS115 菌株、G418 购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶和试剂

DNA 限制性内切酶 *Bam*HI、*Not*I、*Sal*I、T4 DNA Ligase 及 1kb DNA Marker 购于 Fermentas; Taq 聚合酶、PCR 相关试剂及克隆载体 pEasy-T 购于 Trans Gene 公司; 凝胶回收试剂盒购于 Axygen; 蛋白胨(peptone)、酵母提取物(yeast extract)等培养基系英国 Oxoid 公司产品; 二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)系 Sigma 产品; 引物由上海生工合成; 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组载体 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 的构建

以本实验室构建的 pEasy-T-*thanatin-linker-ppa* 为模板, 3. 5K-A(5'-TTTTCCTTTTGCGGCC GCCTACGCAGCAATGGAGCGCTTC-3', 下划线部分为 *Not*I) 3. 5K-F(5'-CGGTACGTAATG CATCATCATCATCATGGT TCTAAGAAGCCT-3', 下划线部分为 *Bam*HI 酶切位点, 波浪线部分为 His 标签)为引物扩增含 His 标签的融合基因, PCR 条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 继续延伸 10 min。PCR 产物鉴定后经凝胶回收试剂盒纯化, 并连接到克隆载体 pEasy-T(Amp), 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 双酶切鉴定阳性克隆并序列分析。

用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Not*I 分别对上述克隆到 pEasy-T 载体上的 *thanatin-linker-ppa* 基因和 pPIC3. 5K 进行完全双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分析并回收目的片断, 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接插入片段与 pPIC3. 5K, 构建重组酵母表达载 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA。重组载体转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞中, 双酶切鉴定重组质粒并序列分析。

1.2.2 酵母高拷贝转化子鉴定

限制性内切酶 *Sal*I 单酶切序列分析正确的高

浓度质粒 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA, 电泳回收线性化片段。取 10 μ L 回收产物电转化到 GS115 感受态细胞中并涂布 MD 平板中, 30℃ 培养 2 d, 至单克隆转化子出现。挑取单菌落至 YPD 液体培养基, 30℃ 培养 12 h 后提取酵母基因组, 分别对同一单菌落基因组用 3' AOX/5' AOX 和 9K-A/9K-F 引物做 PCR 鉴定, 验证 *thanatin-linker-ppa* 和酵母基因组整合情况, 同时用 pPIC3. 5K 空质粒转化的毕赤酵母菌落分别做阴性对照。

PCR 鉴定后将 MD 平板上单克隆转化子划线培养在含有不同浓度 G418 抗性的 YPD 平板上, 30℃ 培养 2~3 d, 筛选高拷贝转化子。

1.2.3 融合蛋白的表达和 Western blotting 鉴定

取高拷贝转化子单菌落接种至 25 mL BMGY 中, 28℃, 250 r/min 培养至 OD 值约 4, 室温 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, BMGY 重悬菌体至细胞 OD 值约 1.0, 28℃ 培养, 每 24 h 后加甲醇至终浓度为 1.5% 继续诱导表达, 分别取 1 mL 不同诱导时间点培养物, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 沉淀重悬于 100 μ L PBS 缓冲液后 SDS-PAGE 电泳分析, 未诱导组和 pPIC3. 5K 空质粒诱导组做对照。

取 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 诱导组和未诱导组培养物沉淀, SDS-PAGE 电泳后, 电转至 PVDF 膜上; His 标记一抗室温反应 2 h, TBS 洗涤; HRP 标记二抗反应 2 h, 洗涤; 用 ECL 试剂孵育后曝光、显影、定影, 进行结果分析。

1.2.4 融合蛋白的制备和纯化

融合蛋白的大量制备: 取诱导培养液 200 mL, 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。取约 10 g 菌体重悬于 Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 1 mM DTT, 5% 甘油, pH 8.0), 加入 20 g 直径为 0.25~0.5 mm 玻璃珠。每隔破壁 1 min, 处理至悬浊液澄清。12 000 r/min 离心 15 min, 上清即为融合蛋白制备液。

利用透析调节融合蛋白制备液 pH 与 Ni 柱平衡缓冲液 pH 相同, 0.22 μ m 滤膜过滤融合蛋白制备液, 上样至 Ni 柱, 去除杂蛋白后, pH 7.4 的 50 mM 磷酸盐缓冲液 (含 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑) 洗脱目的蛋白。洗脱样品经透析浓缩后 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 融合蛋白对 HeLa 细胞生长的影响

培养的 HeLa 细胞接种至 96 孔培养板中, 浓度为 2×10^5 /mL, 每孔接种 180 μ L, 继续培养 24 h 后加 20 μ L 纯化后浓度分别为 1、0.8、0.6 mg/mL 和

0.4 mg/mL 的融合蛋白,对照组每孔加 20 μ L PBS,每个浓度设 6 个重复。继续培养 24 h 后每孔加入 20 μ L MTT 溶液,37℃ 孵育 4 h。小心吸去培养液后,每孔加入 200 μ L DMSO。在恒温振荡器上振荡 5 min 后测定各孔细胞的 OD₄₉₀ 值。

2 结果与分析

2.1 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 的构建

pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 的载体构建见图 1, 融合基因 *thanatin-link-ppa* 通过 3.5K-A, 3.5K-F 引入 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切位点, 重组载体经双酶切后电泳分析, 见图 2。图 2 可见, 目的基因的 PCR 产物只有一条大小约 0.9kb 特异性条带, 大小与理论值相符合。

抽提重组质粒 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA, 用 3. 5K-A/3. 5K-F 引物 PCR 扩增, 得到约 0. 9kb 大小的条带与目的基因大小相符, *Bam*HI 和 *Not*I 双酶切重组质粒, 出现约 0. 9kb 和 9kb 片段, 与载体(9. 3kb)和目的基因条带大小相符, 重组质粒序列测定结果与预期完全一致。

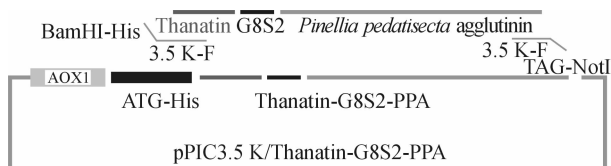
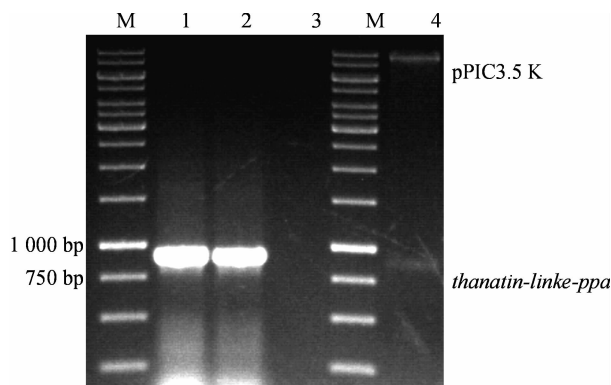


图 1 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 载体示意



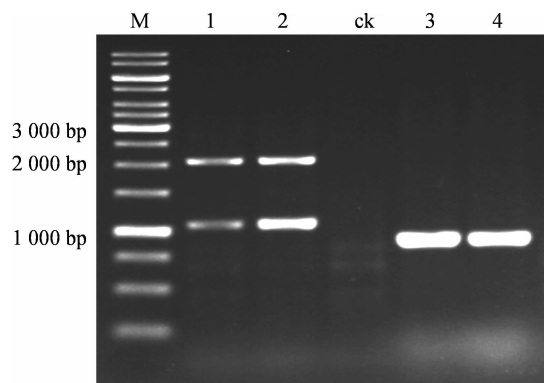
2:重组载体的 PCR 鉴定;3:重组 PCR 阴性对照;
4:重组载体的酶切鉴定

图2 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 载体鉴定

2.2 PCR 鉴定插入基因整合酵母基因组

重组载体 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 和 pPIC3. 5K 经过 *SalI* 单酶切线性化后,电转化到 GS115 酵母感受态细胞中,挑取两个提取其基因组 DNA,利用 5' AOX₂、3' AOX₂ 和 3. 5K-A、3. 5K-F

做 PCR 鉴定,电泳分析见图 3。阳性重组子经 AOX 引物 PCR 鉴定,显示为 1.1kb 目的条带和 2.2kb AOX1 基因片段;且利用特异性的引物 3.5K-A、3.5K-F 仅出现一条 0.9kb 的目的片段。结果显示重组子的表型为 His⁺ Mut⁺,且重组载体 pPIC 3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 已经成功插入到酵母基因组 DNA 上。通过 G418 抗性筛选,得到能耐受 1 mg/mL G418 重组转化子 7 个。

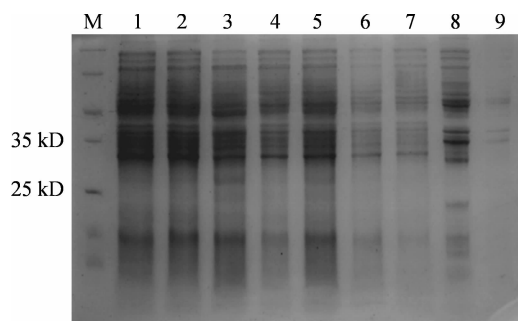


M:1kb DNA Marker; 1, 2: 5' AOX, 3' AOX 鉴定 pPIC3. 5K/
Thanatin-(G8S2)-PPA 转化子 1#, 2#; 3, 4: 3. 5K-A, 3. 5K-F
鉴定 pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 转化子 1#, 2#;
ck: PCR 阴性对照

图 3 PCR 鉴定重组载体插入酵母基因组

2.3 Thanatin-PPA 融合蛋白表达鉴定

将鉴定成功的 7 个高拷贝单克隆经过甲醇诱导表达 24 h 收集培养物沉淀,取 1 mL 培养物重悬沉淀后进行 SDS-PAGE 电泳分析(见图 4)。在约 31 kD 处均出现了特异性的蛋白条带,未诱导组和 pPIC 3.5K 空载体对照没有出现对应的条带。Western Blot 也发现目的条带出现在约 31 kD 左右,表明融合蛋白正确表达。



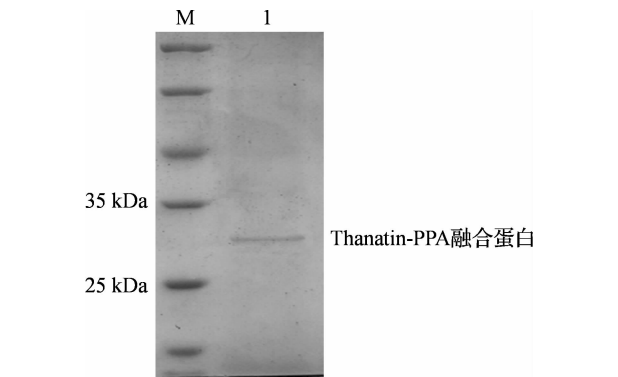
M:低分子量蛋白 Marker,1~7:1#~7#高拷贝转化子诱导蛋白;
8:未诱导组;9:pPIC3.5K 诱导组

图 4 Thanatin-PPA 诱导表达鉴定

2.4 Thanatin-PPA 的纯化

参照前述 1.2.4 中方法进行胞内表达蛋白的制备和纯化,用含 100 mM 咪唑浓度的洗脱液解离目

的蛋白。SDS-PAGE 电泳分析见图 5, Thanatin-PPA 融合蛋白为单一的 31kD 条带, 蛋白纯化成功。根据 Brandford 法测得目的蛋白的浓度为 1.32 g/L。



M: 低分子量蛋白 Marker; 1: 纯化后的融合蛋白
图 5 Thanatin-PPA 蛋白纯化 SDS-PAGE 鉴定

2.5 融合蛋白对 HeLa 细胞生长的影响

不同浓度稀释后的融合蛋白与 HeLa 细胞共同培养, MTT 分析见图 6, 对照组为 12kD 单体半夏蛋白, 本研究显示半夏的提取物(主要成分为半夏凝集素)对 HeLa 细胞均具有显著抑制效果, 同时融合蛋白显著提高了 PPA 的抗肿瘤效果: 1.0、0.8、0.6 mg/mL 和 0.4 mg/mL 的融合蛋白在 24 h 后对 HeLa 细胞的抑制率分别为 77.48%、74.63%、55.90%、33.70%。

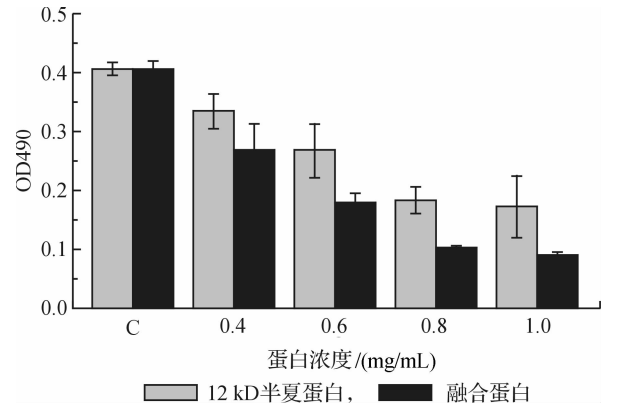


图 6 不同浓度蛋白样品对 HeLa 细胞生长活性分析

3 讨 论

传统掌叶半夏凝集素的抗肿瘤活性研究通常是从掌叶半夏块茎中提取粗蛋白, 利用层析技术获得凝集素纯品, 在体外进行抗肿瘤活性分析。但连年栽培天然掌叶半夏和病毒侵染, 半夏品质不一, 纯品活性难以得到保障。近年来, 对掌叶半夏凝集素的克隆表达研究表明掌叶半夏凝集素为四聚体蛋白^[13], 它由两个不同类型的亚基构成, 两个亚基来源于一个共同的前体蛋白。这些均为掌叶半夏的蛋白表达奠定了一定基础。酵母表达系统是近年来发

展起来的一种外源基因表达体系, 既具有原核表达系统操作方便、经济、适合大规模发酵生产等优点, 又具有真核表达系统翻译后修饰的特点, 因此被广泛用于外源基因的表达。

本研究设计利用毕赤酵母表达 PPA 和死亡素的融合蛋白, 首先考虑 Thanatin 在融合蛋白的 N-端表达不影响其抗菌活性^[14-15]; 并且在两个蛋白之间加入 10 个氨基酸的柔性肽, 这样融合蛋白中保留了与甘露糖凝集相关的两个单体蛋白的活性; 同时据研究表明, 6 个组氨酸在生理 pH 下不带电荷, 基本上不影响融合蛋白的结构和功能, 并且其与 Ni 柱的螯合性较好^[16], 为了方便融合蛋白的纯化, 在构建载体中融入了 6 个组氨酸标签, 在纯化过程中, 融合蛋白基本上能够较好地螯合 Ni⁺; 同时运用酵母表达避免了大肠杆菌包涵体复性问题。

本研究通过 PCR 获得融合基因, 构建 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 重组质粒, 电转化后经 PCR 鉴定和 G418 抗性筛选获得 7 株高拷贝转化子, 经甲醇诱导表达获得融合蛋白, 经 Western blotting 鉴定显示融合蛋白表达成功。纯化的融合蛋白通过滤纸片扩散法分析显示融合蛋白的抗菌活性丧失。可能由于融合蛋白中掌叶半夏凝集素蛋白的分子结构较大, 对死亡素的三级结构造成一定的影响, 导致其抗菌活性丧失。研究显示半夏提取物可显著抑制 HeLa 细胞生长, 其作用机制可能是通过下调增殖细胞核抗原(PCNA)表达相关^[17]。MTT 法分析融合蛋白的抗肿瘤活性显示, 同 12kD 半夏单体蛋白相比其显著抑制 HeLa 细胞的生长, 抗肿瘤活性得到了明显的增强。

本文构建了 pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 毕赤酵母胞内表达载体, 通过甲醇诱导表达并分离纯化获得具有抗肿瘤活性的 Thanatin-PPA 融合蛋白, 同时鉴定了融合蛋白的抗肿瘤活性, 为下一步开展掌叶半夏凝集素对癌细胞表面糖抗原表型作用、以及对癌细胞侵染转移的影响和甘露糖型凝集素的抗肿瘤研究奠定基础。

参考文献:

[1] Peumans W J, Van Damme E J. The role of lectins in plant defence[J]. Histochem J, 1995, 27(4): 253-271.
[2] Barre A, Van Damme E J, Peumans W J, et al. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins[J]. Plant Physiol, 1996, 112(4): 1531-1540.
[3] Yao J H, Zhao X Y, Liao Z H, et al. Cloning and mo-

- lecular characterization of a novel lectin gene from *Pinellia ternata*[J]. Cell Res, 2003, 13(4): 301-308.
- [4] Lin L, Lu J, Zeng H, et al. Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from *Pinellia cordata*[J]. Mol Biol Rep, 2008, 35(4): 641-647.
- [5] Ugorski M, Laskowska A. Sialyl lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells[J]. Acta Biochim Pol, 2002, 49(2): 303-311.
- [6] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(16): 10231-10233.
- [7] 李 新, 牛 娜, 李 娜, 等. 融合蛋白 EGRF-PPA 原核表达及标记肿瘤细胞研究[J]. 浙江理工大学学报, 2010, 27(4): 615-619.
- [8] Andreu D, Ubach J, Boman A, et al. Shortened cecropin a-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity[J]. FEBS Lett, 1992, 296(2): 190-194.
- [9] Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, et al. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(3): 1221-1225.
- [10] Lee D G, Kim P I, Park Y, et al. Design of novel peptide analogs with potent fungicidal activity, based on PMAP-23 antimicrobial peptide isolated from porcine myeloid[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(1): 231-238.
- [11] Imamura T, Yamamoto N, Tamura A, et al. NMR based structure-activity relationship analysis of an anti-microbial peptide, thanatin, engineered by site-specific chemical modification: activity improvement and spectrum alteration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(2): 609-615.
- [12] 谢灵遐, 胡丽娜. 宫颈癌发生的炎症机理[J]. 华西医学, 2008, 23(1): 194-195.
- [13] Lin J, Zhou X, Fei J, et al. Genomic cloning and characterization of a PPA gene encoding a mannose-binding lectin from *Pinellia pedatisecta*[J]. Biocell, 2006, 30(1): 15-25.
- [14] Wang L N, Yu B, Han G Q, et al. Design, expression and characterization of recombinant hybrid peptide Attacin-Thanatin in *Escherichia coli* [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(7): 3495-3501.
- [15] 王沛珍, 顾金保, 罗 军, 等. 大肠杆菌 ER2566 表达的重组 Thanatin 的敏感抗菌活性[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 1050-1054.
- [16] Maly J, Di Meo C, De Francesco M, et al. Reversible immobilization of engineered molecules by Ni-NTA chelators[J]. Bioelectrochemistry, 2004, 63(1-2): 271-275.
- [17] Li G L, Gui S Q, Wang L. Effect of *Pinellia* extract on Hela cell line in vitro and associated mechanism[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(3): 303-307.

Construction and Expression of Recombinant *Pichia pastoris* for pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA

LIU Xue-feng, LÜ Zheng-bing, WANG Bo, XU Tao

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The fusion gene of *thanatin-linker-ppa* is cloned into the *Pichia pastoris* expression vector. The pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA yeast expression vector is constructed and then sequenced. The pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA is linearized by *Sal* I enzyme, and transformed into GS115 *Pichia pastoris* using electricity. Then the transformants are identified by PCR and selected with high G418 resistance on a YPD plate. The positive *Pichia pastoris* transformants of pPIC3. 5K/Thanatin-(G8S2)-PPA are induced by methynol. SDS-PAGE analysis and western blotting show that fusion protein is attained, and its molecular weight is about 31 kD. The anti-tumor activity of fusion protein, which is purified by Ni-NTA affinity chromatography, is analyzed by MTT, and the results indicate that fusion protein exhibits significant antitumor activity.

Key words: PPA; Thanatin; pPIC3. 5K; MTT

(责任编辑: 许惠儿)