

大鼠 DAF 蛋白真核表达载体的构建及生物活性鉴定*

王巍¹, 张立², 张朋^{3△}

1. 四川大学华西第二医院 病理科 (成都 610041); 2. 四川大学华西医院 移植免疫实验室 (成都 610041);
3. 四川大学华西医院 泌尿外科 (成都 610041)

【摘要】 目的 构建大鼠促衰变因子(DAF)的酵母真核表达载体,诱导其表达并对生物学特性进行鉴定。方法 采用 RT-PCR 技术从大鼠肝脏组织中扩增出 DAF 基因并克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 质粒中。经酶切鉴定后,将 pPIC9K-DAF 转化至毕赤酵母菌 GS115,通过 G418-YPD 平板筛选高拷贝转化子。转化子经甲醇诱导表达后,对表达的 DAF 蛋白进行 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定并检测重组蛋白的生物活性。结果 成功克隆大鼠 DAF 基因,并筛选出 pPIC9K 载体中的 DAF 阳性克隆,证实所获得相对分子质量约为 70×10^3 大小的重组蛋白具有大鼠 DAF 蛋白的抗原性和生物学活性。结论 采用分子克隆的方法成功构建大鼠 DAF 蛋白的毕赤酵母真核表达载体,能为补体及免疫研究提供高效的大鼠 DAF 蛋白来源。

【关键词】 毕赤酵母 真核表达 pPIC9K 促衰变因子

Eukaryotic Expression and Identification of the Recombination Protein of Rat Decay-accelerating Factor with *Pichia pastoris* Expression System WANG Wei¹, ZHANG Li², ZHANG Peng^{3△}. 1. Department of Pathology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Transplant Engineering and Immunology, Ministry of Health, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: zpeng2001@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To construct yeast eukaryotic expression vector carrying the gene of rat decay-accelerating factor (DAF), and to induce the expression of recombinant protein. **Methods** The cDNA of rat DAF was amplified by RT-PCR from the fresh hepatic tissue of rat. The PCR product was inserted into the *Pichia pastoris* vector pPIC9K. Then the recombinant plasmid pPIC9K-DAF was transformed into yeast GS115 through electroporation. The positive high copy number transformants were rapidly selected by using G418-YPD and were induced by methanol. The induced product was analyzed by DNA sequencing, SDS-PAGE and Western blot. Finally, the bio-activity of recombinant rat DAF was examined. **Results** The rat DAF cDNA was successfully cloned in pPIC9K. The positive clone in pPIC9K expression vector (pPIC9K-DAF) was sieved, and the pPIC9K-DAF showed the same sequencing result as reported in GenBank. And the recombination protein of rat DAF (relative molecular mass is 70×10^3) has natural rat immunogenicity and bio-activity. **Conclusion** Successfully cloning and high-level expression of rat DAF recombination protein in *Pichia pastoris* laid a foundation for further research on immunity and complement system.

【Key words】 *Pichia pastoris* Eukaryotic expression pPIC9K Decay-accelerating factor

补体负性调控膜蛋白促衰变因子(DAF)通过促进经典和替代激活途径中 C3 和 C5 转化酶的降解能抑制补体系统激活。现在的研究证实 DAF 不仅具有传统的抑制补体活性的能力,同时还能降低抗原提呈细胞(APC)对抗原的提呈能力、直接抑制 T/B 淋巴细胞的活性甚至还参与病毒免疫^[1-3]。DAF 在胞膜上的异常表达是多种自身免疫性疾病发生的原因如夜间阵发性血红蛋白尿、Goodpaster 综合征、炎性肠病和多发性硬化等^[4,5]。因此,应用

基因工程技术克隆表达 DAF 蛋白,对上述疾病的研究有重要意义。

本研究首次采用毕赤酵母真核表达载体来克隆表达大鼠 DAF 蛋白。该真核表达载体具有原核表达系统能高效表达外源蛋白的特点,又具有高分泌、低成本、低背景及具有真核生物的翻译后修饰加工功能,使表达的外源蛋白具有很好的生物学活性^[6-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

毕赤巴斯德酵母细胞株 GS115 和酵母表达质

* 国家自然科学基金(No. 81101261)资助

△ 通讯作者, E-mail: zpeng2001@gmail.com

粒 pPIC9K (Invitrogen), *Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa)、碱性磷酸酶 (BAP)、限制性内切酶 *Sna*B I / *AVR* II (NEW ENGLAND), 山梨醇 (Amresco), 酵母氮源 Yeast Nitrogen Base (YNB), Geneticin (GIBCO), DNA Marker (Promega), MDPHis (13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 20 g/L 葡萄糖, 15 g/L 琼脂), MM 培养基 (13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 1.5 g/L 甲醇, 15 g/L 琼脂) 等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 DAF 基因扩增 收集大鼠 (四川大学实验动物中心) 新鲜肝脏组织, 采用 RNA 提取试剂盒 (Promega 公司) 抽提肝组织中的总 RNA, 一步法 RT-PCR 扩增 DAF 的 cDNA。为使大鼠 DAF 基因表达具有天然序列结构 (能被分泌且被有效而完整地切割), 我们在 5' 端设有 *AVR* II 酶切位点, 在 3' 端设有 *Sna*B I 酶切位点, 用于完整目的基因的克隆。为保证该酶切位点的有效切割, 在酶切位点外侧设有 4 个 His 保护性碱基。因为 pPIC9K 为分泌型表达载体, 含有信号肽序列, 故不用再添加外源性信号肽。基于以上几点要求设计引物, 并交由公司 (上海生工生物工程公司) 合成: 上游: 5'-TTGG TACGTAGACTGCGGCCACCTCCAGACATTC C-3' (TACGTA 为 *Sna*B I 酶切位点); 下游: 5'-AAGGCCTAGGTAATGATGATGATGATGAT GTCC ATATATAAAATGGTCACCACCTGAAT TAG ACTC-3' (CCTAGG 为 *AVR* II 酶切位点)。扩增条件为: 95 °C 变性 5 min, 然后依次按照 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 55 s 的条件循环 30 次, 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物电泳、成像, 结果用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行采集、鉴定 PCR 产物大小。

1.2.2 pPIC9K-DAF 重组质粒的构建 将上述 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后回收相应 DNA 片段, 并与 pPIC9K 空质粒一起经 *AVR* II 和 *Sna*B I 双酶切。在 T4 DNA 连接酶作用下, pPIC9K 和目的基因片段摩尔比为 1 : 5, 连接质粒和目的片段 (16 °C, 1 h), 形成 pPIC9K-DAF 重组质粒, 按标准程序转化进 XL1-Blue 大肠杆菌^[9,10]。最后再从大肠杆菌中提取质粒经 PCR 和双酶切鉴定, 并送北京奥科生物技术有限责任公司测序。

1.2.3 重组质粒 pPIC9K-DAF 的转化 重组质粒 pPIC9K-DAF 的线性化: 用 *Sna*B I 内切酶充分线性化重组质粒 pPIC9K-DAF 和 pPIC9K 空载体后 (可取 5 μ L 酶切产物经 10 g/L 琼脂糖电泳检测是

否消化完全), 在酶切体系中加入 2 μ L BAP, 50 °C 水浴反应 30 min, 进行去磷酸化, 然后用 3 mol/L NaAc 和冰乙醇沉淀核酸, 存于 -20 °C 备用。毕赤酵母菌 GS115 的电穿孔转化: 按 Invitrogen 公司提供的操作指南制备新鲜的感受态酵母菌 (GS115), 在预冷的电转化杯 (BioRad) 中加入酵母感受态细胞与线性化的重组质粒 DNA, GenePulser 电击穿孔后立刻加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇 30 °C 培养 1 h。

1.2.4 阳性克隆的筛选 转化后的菌液涂布于 MDPHis 选择平板上, 30 °C 培养 2 d, 筛选出 His⁻Mut⁺ 表型转化子, 然后在 MM 和 MD 选择平板上筛选, 再用 PCR 鉴定 (引物及反应条件同 1.2.1), 最后通过 G418-YPD (2 mL/mL) 筛选出生长良好的菌株作为表达株。

1.2.5 重组大鼠 DAF 蛋白在酵母中的诱导表达 将 G418-YPD 平板筛选出的阳性克隆的菌落, 在 100 mL 复合甘油培养基 (BMGY) 中摇床培养 40 h (30 °C, 280 r/min)。离心 (2000 $\times$ g, 4 °C, 10 min) 收集菌体转移至 30 mL 复合甲醇培养液 (Buffermethanol-complex medium, BMMY) 培养基中继续培养。每 24 h 补加 1 次甲醇至终浓度为 3%, 收集第 7 d 菌液 100 μ L 室温离心 (1000 $\times$ g, 1 min), 将上清冻存备用。

1.2.6 重组大鼠 DAF 蛋白的纯化 将上述获得的上清样品进一步过滤 (0.22 μ m), 过滤后样品以 5 mL/min 的速度过 His 亲和柱, 然后用 50 mL wash buffer (5 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9) 清洗亲和柱, 再用 15 mL 洗脱液 (0.2 mol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9) 收获蛋白, 并经过透析脱盐后获得最终蛋白样品。

1.2.7 重组大鼠 DAF 蛋白的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定 取 -20 °C 保存的表达产物 20 μ L 与 2 $\times$ 上样缓冲液等体积混合后上样, 电泳后考马斯亮蓝 R250 染色。Western blot 按常规方法进行, 一抗为兔抗大鼠 DAF 抗体 (1 : 1000 稀释, 孵育 2 h), 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 1000 稀释, 孵育 1 h); DAB 显色, X 光片曝光。

1.2.8 重组大鼠 DAF 蛋白生物活性检测 根据 DAF 作为补体负性调控蛋白能够促进 C3 转化酶降解, 抑制补体 C3 在绵羊红细胞上沉积的特性, 通过检测在不同浓度的重组 DAF 干预下, 红细胞表面 C3 的沉积率来间接反映重组 DAF 的活性。具体步

骤：先用 10% 大鼠正常血清培养绵羊红细胞(1×10^7 ; 蕊特生物科技有限公司), 然后按 $0 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 梯度浓度将重组的 DAF 蛋白加入到培养液中, 37°C 孵育 30 min 后离心($1000 \times g, 3 \text{ min}$)。将离心后的产物弃掉上清用 PBS 清洗 $5 \text{ min} \times 3 \text{ 次}$, 再加入 anti-rat C3d IgG (R&D 公司; $1:500$ 稀释) 孵育 1 h 后离心($1000 \times g, 3 \text{ min}$) 弃上清; 离心后的产物用 PBS 清洗 $5 \text{ min} \times 3 \text{ 次}$, 离心弃上清, 最后加入带有 FITC 荧光标记的二抗孵育 30 min 后(避光操作), 用流式细胞仪进行检测。

1.2.9 统计学方法 所有实验均重复 3 次以上, 实验结果用单因素方差分析和 q 检验进行分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 pPIC9K-DAF 表达载体的构建

2.1.1 DAF 基因扩增结果 从大鼠肝组织中成功提取了大鼠总 RNA 并逆转录为 cDNA, 经 PCR 扩增后, 电泳检测扩增产物, 在 1000 bp 附近有特异的扩增条带, 初步判断是预期的不含信号肽的 DAF cDNA 序列(图 1)。

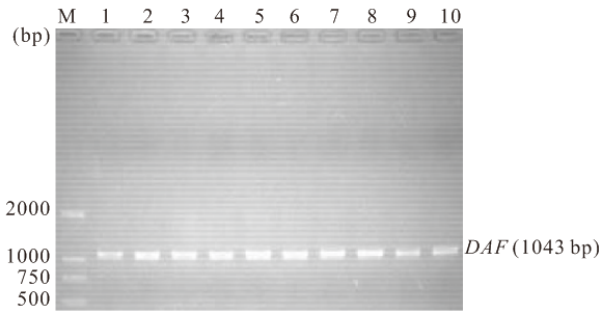


图 1 PCR 扩增产物琼脂糖电泳结果

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

M: Marker; 1-10: PCR products of DAF cDNA

2.1.2 重组质粒 pPIC9K-DAF 的酶切和 PCR 鉴定 重组 pPIC9K-DAF 表达质粒转化大肠杆菌后, 随机挑取 10 个克隆进行 *AVR II*、*SnaB I* 双酶切和 PCR 鉴定, 结果有 10 个克隆在 1000 bp 处都有正确的酶切片段(图 2、图 3)。

2.1.3 重组质粒 pPIC9K-DAF 的测序鉴定 测序结果证明插入片段序列与原序列一致, 与载体读码框匹配, 表明成功获得重组 pPIC9K-DAF 表达质粒。

2.2 SDS-PAGE 及 Western blot 证实目标蛋白

SDS-PAGE 分析发现, 阳性表达菌在相对分子质量为 70×10^3 处有一条带, 空载体阴性对照菌未

见该条带。Western blot 检测发现, 甲醇诱导 7 d 后诱导克隆上清中有 DAF 蛋白的表达(图 4)。

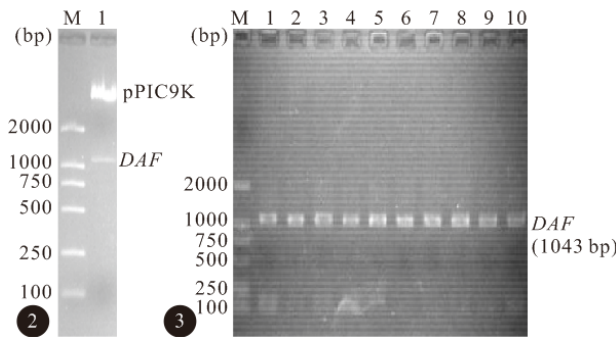


图 2 pPIC9K-DAF 质粒双酶切(*AVR II* / *SnaB I*)电泳结果

图 3 阳性克隆 PCR 扩增琼脂糖电泳图

Fig 2 Analysis of recombinant plasmid digestion (*AVR II* / *SnaB I*)

(M: Marker; 1: pPIC9K-DAF digested by *AVR II* / *SnaB I*)

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid PCR products (M: Marker; 1-10: PCR products of positive clone)

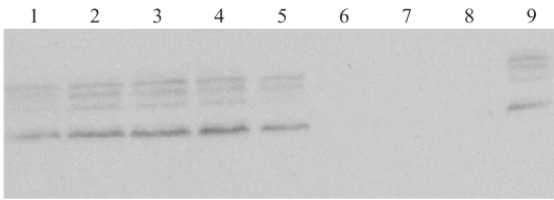


图 4 Western blot 检测菌液中 DAF 蛋白的表达

Fig 4 The examine the expression of DAF protein detected by Western blot

1-5: Transfection positive yeast; 6-8: Transfection negative yeast; 9: Protein from normal rat liver

2.3 蛋白质功能检测

结果显示: 重组大鼠 DAF 蛋白能有效抑制 C3 转化酶的活性, 且呈剂量依赖性($P < 0.05$), 证实重组 DAF 与天然 DAF 有着相似的生物学活性(图 5)。

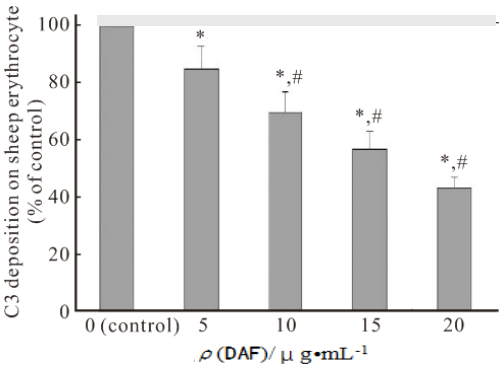


图 5 重组 DAF 蛋白活性检测

Fig 5 Examination of bio-activity of recombinant rat DAF

* $P < 0.05$, vs. control; # $P < 0.05$, vs. former concentration

3 讨论

目前常用的重组蛋白表达体系包括原核和真核表达两大类。原核表达系统虽然产量高,但存在变/复性处理困难、纯化难度大、融合蛋白还需切割处理、对真核蛋白不能翻译后加工修饰(包括蛋白的糖基化和磷酸化等)以及影响蛋白的抗原性及生物活性等缺点。而哺乳动物细胞表达系统蛋白表达产量低,且表达体系自身分泌蛋白多,从而导致难以纯化外源性目的蛋白。与前两者相比,巴斯德毕赤酵母表达系统(pPIC9k)这一近年来发展起来的酵母表达体系,因具有遗传背景清晰(自身分泌蛋白少)、高表达(强启动子)、高稳定(非质粒的整合型)、高分泌(突破克级水平),以及具有易于纯化、蛋白产量高、不含内毒素和糖基化少等显著特点已成为较为理想的表达系统,越来越适用于疫苗等基因工程产品的开发和研制^[11-13]。

pPIC9K 是巴斯德毕赤酵母表达系统的整合型载体(分泌表达型载体),可以稳定地以整合型方式嵌入毕赤酵母染色体,产生多个表达单元^[14]。此外,因为该载体还含有 G418 抗性基因,可用 G418 筛选含有高拷贝整合片段的重组酵母菌株,便于获取含有高拷贝目的基因片段的酵母菌^[15,16]。

本研究采用 pPIC9K 为毕赤酵母真核表达载体,成功构建了大鼠 DAF 蛋白的真核表达系统。从大鼠新鲜肝细胞中提取总 RNA,设计针对大鼠 DAF 蛋白的引物,采用 RT-PCR 方法扩增出大鼠 DAF 基因,并克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 质粒中。经酶切鉴定后,将 pPIC9K-DAF 转化至毕赤酵母菌 GS115,然后将转化的重组菌接种于 G418 YPD 平板上筛选出多个高拷贝菌株,再将筛选出的阳性高拷贝菌株(转化子)经甲醇诱导表达。由于我们在引物设计中增加了 4 个 His(组氨酸)保护碱基,因此可以通过 His 亲和柱来获得目的蛋白。对所获得的大鼠 DAF 重组质粒进行 DNA 测序并与 GenBank 中大鼠 DAF 基因进行比对,证实其基因序列一致;再通过 Western blot 技术在蛋白水平进行鉴定,亦证实所获重组蛋白为大鼠 DAF 蛋白。最后根据 DAF 能够特异性抑制补体 C3 转化酶的特性,通过观察绵羊红细胞表面 C3 沉积率,结果证实 DAF 作为补体负性调控蛋白能够促进 C3 转化酶降解,从而抑制补体 C3 在绵羊红细胞上沉积。这一结果进一步证实了我们所获得的重组 DAF 蛋白具有很好的生物学活性。

参 考 文 献

- 1 Johnson JB, Lyles DS, Alexander-Miller MA, *et al.* Virion-associated complement regulator CD55 is more potent than CD46 in mediating resistance of mumps virus and vesicular stomatitis virus to neutralization. *J Virol*, 2012; 86(18): 9929-9940.
- 2 Lalli PN, Strainic MG, Yang M, *et al.* Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood*, 2008; 112(5): 1759-1766.
- 3 Lalli PN, Strainic MG, Lin F, *et al.* Decay accelerating factor can control T cell differentiation into IFN-gamma-producing effector cells via regulating local C5a-induced IL-12 production. *J Immunol*, 2007; 179(9): 5793-5802.
- 4 Li Q, Huang D, Nacion K, *et al.* Augmenting DAF levels *in vivo* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol*, 2009; 46(15): 2885-2891.
- 5 Kim Y, Lim J, Kim M, *et al.* Quantitation of CD55 and CD59 expression on reticulocytes and mature erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and healthy control subjects. *Ann Clin Lab Sci*, 2010; 40(3): 226-232.
- 6 Maeng BH, Choi J, Sa YS, *et al.* Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012; 28(3): 1027-1034.
- 7 汤 伟, 李雅华, 刘 露等. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的酶学性质研究及表达条件优化. *微生物学报*, 2012; 52(3): 345-352.
- 8 Li Y, Wu S, Ouyang J, *et al.* Expression of insulin-like growth factor-1 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2012; 84(1): 80-85.
- 9 杨湘越, 吴文冰, 兰小鹏. 人 SmD1 抗原的酵母真核表达及其初步应用. *微生物学报*, 2009; 36(1): 149-153.
- 10 周东风, 张忠广. 人血管内皮抑素毕赤酵母真核表达载体的构建. *青岛大学医学院学报*, 2007; 43(1): 22-24.
- 11 Oberg F, Hedfalk K. Recombinant production of the human aquaporins in the yeast *Pichia pastoris* (Invited Review). *Mol Membr Biol*, 2013; 30(1): 15-31.
- 12 Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; 93(1): 31-39.
- 13 Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*, 2012; 30(5): 1108-1118.
- 14 Shumiao Z, Huang J, Zhang C, *et al.* High-level expression of an *Aspergillus niger* endo-beta-1,4-glucanase in *Pichia pastoris* through gene codon optimization and synthesis. *J Microbiol Biotechnol*, 2010; 20(3): 467-473.
- 15 Li J, Tang C, Shi H, *et al.* Cloning and optimized expression of a neutral endoglucanase gene (ncel5A) from *Volvariella volvacea* WX32 in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 2011; 111(5): 537-540.
- 16 Shen L, Liu Z, Xie F, *et al.* A novel approach for secretion of heterologous proteins with correct n-terminal processing by using α -factor pre sequence in *Pichia pastoris*. *Protein Pept Lett*, 2012; 19(9): 1005-1009.

(2012-10-23 收稿, 2013-02-21 修回)

编辑 余 琳