

文章编号:1000-582X(2002)06-0094-04

突变型 hGM-CSF 在毕赤甲醇酵母中的分泌表达^{*}

杨红¹, 欧阳克清¹, 郭芝刚¹, 李新平¹, 陈云高², 蔡绍哲¹

(1. 重庆大学 生物工程学院分子生物学实验室, 重庆 400044; 2. 四川成都荣高实业集团有限公司, 成都 610000)

摘要: 临床研究发现, 与大肠杆菌体系生产的 hGM-CSF 相比, 利用酵母表达系统生产的 hGM-CSF, 具有毒副作用小等优点。鉴于非糖基化的 hGM-CSF 生物活性比人体天然产生的糖基化 GM-CSF 活性更高, 采用 PCR 定点突变的方法修改 hGM-CSF 基因中的糖基化位点, 进而在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中实现该突变型基因的高效表达。实验结果表明, 突变型基因的表达产物具有天然 hGM-CSF 的活性。

关键词: 突变型 hGM-CSF; 毕赤酵母; 分泌表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, hGM-CSF) 是由 127 个氨基酸组成的造血生长因子。hGM-CSF 主要生物学功能是刺激造血前体细胞的增殖、分化和增强成熟效应细胞 (主要是中性粒细胞、嗜酸性细胞和单核/巨嗜细胞)。在临床上主要用于骨髓移植、癌症、AIDS、白细胞减少等病症的辅助治疗^[1-2]。但在治疗中还存在许多未尽人意之处, 如活性低, 治疗时用量大, 循环半衰期短等缺点。临床实验表明, 酵母系统表达的 hGM-CSF 与大肠杆菌体系表达的 hGM-CSF 相比, 具有较小的毒性和副反应发生率^[1,3]。天然 hGM-CSF 由于糖基化程度不同, 分子量从 14.5~32 KD 不等。根据相关文献报道, 临床试验表明未糖基化的 hGM-CSF 的生物活性更高^[1,3]。由此, 实验室首次利用引物导入点突变的方法, 从 cDNA 文库中钓出该基因并突变了其中的 2 个 O-糖基化位点, 即把 9-Ser10-Thr 变为 9-Ala10-Ala^[4-6]。并选择了毕赤酵母宿主系统作为表达系统。毕赤酵母表达系统是近年来应用较多的一种表达系统, 它具有胞外分泌表达, 外源基因多拷贝重复整合到酵母染色体上, 表达稳定, 产量高, 适合高密度发酵, 下游纯化相对容易等优点^[7]。是一种良好的表达系统。本实验以野生型 hGM-CSF 基因在毕赤酵母中表达作对照。结果表明, 突

变型基因在毕赤酵母中表达的产物具有天然 hGM-CSF 的活性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1) 质粒和菌株。质粒 pPIC9k, pPIC9K-GM, 大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10F' 菌株, 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115, KM71 菌株, 人胎肝 cDNA 文库均由胡应和博士惠赠。

2) 培养基和培养条件。大肠杆菌用 LB 培养基, 在 37 °C 培养。酵母在 30 °C 培养, 完全培养基为 YPD, 选择培养基为 RDB, 表达增殖培养基为 BMGY, 诱导表达培养基为 BMMY。按照 Invitrogen 公司操作手册配制。

3) 酶与试剂。TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、购自上海生工生物公司, 一抗购自 Sigma 公司, 其余试剂为国产分析纯。引物合成委托胡应和博士在美国 Hugene 公司合成。

1.2 实验方法

1) 引物的设计与合成。参照发表的人 GM-CSF cDNA 序列, 合成了 2 段引物:

primer1 5' GCA CGT TAC GTA GCA CCC GCC CGC TCG CCC AGC CCC GCC GCG

* 收稿日期: 2002-02-08

作者简介: 杨红 (1974-), 女, 四川开江人, 重庆大学硕士研究生。主要从事分子生物学研究。

primer2 5' GG GAA TTC TCA TCA CTC CTG GAC
TGG CTC

在设计 5' 端寡聚核苷酸引物——引物 1 时, 引入了 SnaI 酶切位点, 并且将第 9 位 AGC(Ser) 和第 10 位 ACC(Thr) 的分别变为 GCC(Ala)GCG(Ala)。在设计 3' 端的寡核苷酸引物——引物 2 时, 引入了 EcoRI 酶切位点和 2 个终止密码子。

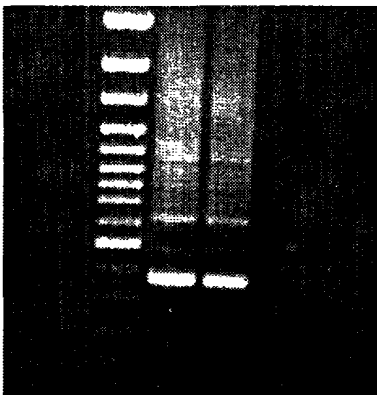
2) PCR 扩增。94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, 30 cycles。低熔点胶回收 PCR 产物。

3) 基因操作的常用技术和方法。照《分子克隆》^[8]第 2 版的方法进行。

4) 核苷酸序列测定。委托上海基康公司测定。

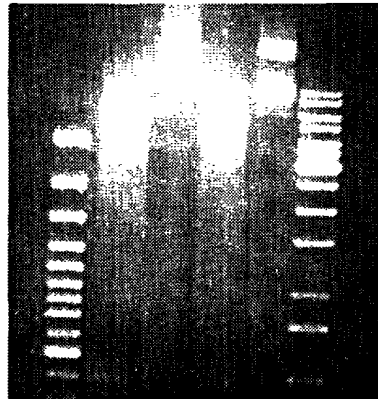
5) Western 印迹杂交。参照《分子克隆》^[8]第 2 版的方法进行。

2 结果



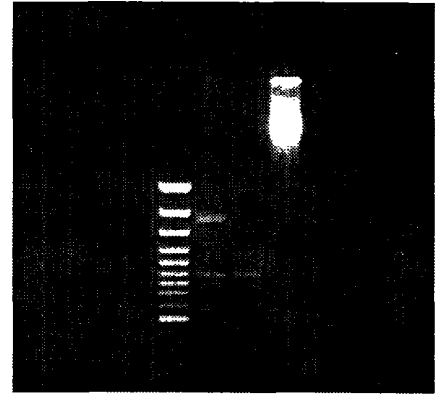
1. 100 bp Ladder marker; 3 000 bp, 1 500 bp, 1 200 bp, 1 000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp;
2. PCR 扩增的 GM - CSF 基因序列 (381 bp);
3. PCR 扩增的突变型 GM - CSF 基因序列 (381 bp)。

图 1 目的基因的扩增



1. 100 bp Ladder marker; 3 000 bp, 1 500 bp, 1 200 bp, 1 000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp;
2. GM - CSF 基因的双酶切产物/(SnaI + EcoRI);
3. GM - CSF 基因;
4. 突变型 GM - CSF 基因的双酶切产物/(SnaI + EcoRI);
5. 突变型 GM - CSF 基因;
6. 1Kb marker。

图 2 质粒酶切鉴定图谱



1. 100 bp Ladder marker; 3 000 bp, 1 500 bp, 1 200 bp, 1 000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp;
2. 用 AOX1 引物扩增 GM - CSF 转化子克隆的结果 (约 873 bp);
3. 用 AOX1 引物扩增突变型 GM - CSF 转化子克隆的结果 (约 873 bp);
4. 毕赤甲醇酵母基因组 DNA。

图 3 PCR 方法鉴定阳性重组子

2.2 hGM - CSF 在毕赤酵母中的分泌表达

将筛选得到的重组子, 在 BMGY 培养液中摇床培养至 OD₆₀₀ 为 2 ~ 9, 离心收集菌体转至 BMMY 培养液中诱导表达 3 天, 其间补甲醇数次。取发酵液上清 SDS - PAGE 电泳检测。电泳结果显示野生型基因菌株和变异型基因菌株在约 14 KD 左右均可观察到表达

2.1 hGM - CSF 表达质粒的构建和鉴定

将从低熔点胶中回收的野生型和变异型 hGM - CSF 基因用 SnaI 和 EcoRI 双酶切, 同时质粒载体 pPIC9K 也用 SnaI 和 EcoRI 双酶切, 分别回收后, 连接, 转化大肠杆菌 Top10F'。经酶切图谱分析, 构建成功, 得到目的基因的转化子。质粒经测序鉴定, 与设计的序列一致。目的基因的扩增见图 1。质粒酶切鉴定图谱见图 2。表达质粒 pPIC9K - GMM 和 pPIC9K - GM 用 SacI 酶线性化, 分别用化学法 (Pichia pastoris protocols, Invitrogen) 转化酵母 GS115 菌株。将得到的转化子编号, 逐一筛选, 筛选方法为 G418 抗性筛选。经过上百株的筛选, 最后在抗 G418 浓度 2.0 mg/ml 的平板上得到 4 株高表达的阳性克隆子。用 PCR 方法鉴定阳性重组子, 结果见图 3。

的蛋白条带, 而作为空白对照的未诱导的酵母上清则没有此条带, 结果见图 4。高表达菌株的筛选见图 5。筛选出的工程菌在摇瓶中表达量约为 100 mg/L。

2.3 hGM - CSF 的 Western Blot 测定

Western 印迹杂交的结果见图 6。结果显示野生型基因和突变型基因表达产物均有条带出现。



1. 突变型 GM - CSF/GS115 克隆在诱导前的产物;
2. 突变型 GM - CSF/GS115 克隆在诱导后的表
达产物(14.7 KD);
3. 低分子量蛋白质标准: 97.4 kb, 66.2 kb, 45
kb, 31 kb, 21.5 kb, 14.4 kb

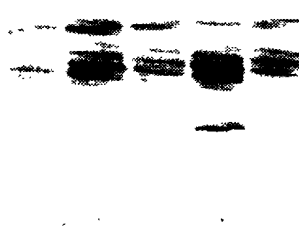


图 5 高表达菌株的筛选



图 6 Western - Blot 印迹杂交图谱

3 讨论

粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte - macrophage colony stimulating factor, GM - CSF) 于 1977 年 Burgess 等从小鼠肺条件培养液中发现, 该因子能刺激粒细胞和巨噬细胞形成集落, 故命名为粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子。GM - CSF 是一种重要的造血调节因子, 在临床上已用于多种造血功能障碍的治疗, 已经收到良好效果。它能防治强烈化疗/放疗后的粒细胞减少, 缩短粒细胞缺乏的时间, 减少感染发生率。也有人报道, rhGM - CSF 加抗肿瘤特异性单克隆抗体治疗肿瘤, 以及 rhGM - CSF 加 IFN α 治疗肝炎也获得较好的疗效^[12]。另一方面, 重度再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合症, 伴严重粒细胞缺乏病人, 若与 EPO 或 IL - 3 联合应用, 可以显著其提高疗效。将 2 种功能相关或重叠的细胞因子以融合蛋白的方式表达, 其作用可能显著高于单个因子或两者合用的效果。国内和国外均有报道新型的造血刺激因子融合蛋白在大肠杆菌和酵母中成功表达。目前, 国内在这方面的研究也有了很大进展, 已成功构建了 rhGM - CSF/IL - 3, rhGM - CSF/IL - 2, rhGM - CSF/LIF 等融合蛋白, 并在大肠杆菌中获得表达^[2, 13]。深入了解造血因子间的最佳协作和相加作用将能更好地指导临床上的应用。在实验和临床血液学中有关造血生长因子生物调控的模式中, rhGM - CSF/IL - 3 也是最典型和成功的融合蛋白之一。应用融合蛋白作为联合使用造血生长因子的新策略可最大限度地改善重组细胞因子的生物学效应, 并减少其相应大剂量时的毒副作用。这也是未来细胞因子研究发展的新方向^[13]。

巴斯德毕赤酵母作为一种新型外源基因表达系统, 因其易于操作和本身具有的真核生物的特性, 越来越受到人们的重视。它的许多优点: 含有诱导型启动子, 用甲醇可以严格地调控表达; 外源蛋白可以直接分

泌到培养基中, 有利于维持其天然构型、生物活性及下游的蛋白质分离纯化; 生存能力强, 培养基成本较低廉, 发酵工艺成熟, 生物量大, 易于实现高密度、高表达及大规模培养, 甚至放大至工业化规模进行生产^[7]。为进一步提高的生物学活性和疗效, 减少其剂量和副作用, 成功地将 hGM - CSF 基因导入毕赤酵母中高效表达, 并尝试对其潜在的 O - 糖基化位点 9 - Ser、10 - Thr 作了突变, 该突变型基因表达的产物分子量不变, 仍具有天然分子的免疫原性和生物活性。这个结果将有助于对毕赤酵母在表达后修饰及其糖基化问题的进一步研究。

参考文献:

- [1] DORR R T. Clinic properties of Yeast - derived versus Escherichia coli - derived granulocyte - macrophage colony - stimulating factor [J]. Clin Ther, 1993, 15(1): 19 - 29.
- [2] LIESCHKE G J, BURGESS A W. Granulocyte colony - stimulating factor and granulocyte - macrophage colony - stimulating factor [J]. N Eng J Med, 1992, 2(327): 28 - 35.
- [3] 王锡锋, 曹宜生. 粒 - 巨噬细胞集落刺激因子重组表达现状及发展趋势 [J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(4): 209 - 211.
- [4] ERNST J F, MERMOD J J, RICHMAN L H. Site - specific O - glycosylation of human macrophage colony - stimulating factor secreted by yeast and animal cells [J]. Eur J Biochem, 1992, 203(3): 663 - 667.
- [5] WALTER M R, COOK W J, EALICK S E, et al. Three - dimensional structure of recombinant human granulocyte - macrophage colony - stimulating factor [J]. J Mol Biol, 1992, 224(4): 1 075 - 1 085.
- [6] KANAKURA Y, CANNISTRA S A, BROWN C B, et al. Identification of functionally distinct domains of human granulocyte - macrophage colony - stimulating factor using monoclonal antibodies [J]. Blood, 1991, 77(5): 1 033 - 1 043.
- [7] DIVID R. HIGGINS, JAMES M CREGG. Pichia protocols [M].

- New Jersey: Humana Press Inc, 1998.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed[M]. New York: Cold Spring harbor Lab, 1989.
- [9] 荫俊, 孙叶方. 人粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子的基因修饰及其在大肠杆菌中的高效表达[J]. 中国医学科学院学报, 1999, 21(1): 31 - 36.
- [10] 李旌军, 黄秉仁. 重组人粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子在啤酒酵母中的表达和分泌[J]. 基础医学与临床, 1999, 19(1): 43 - 48.
- [11] MARTIN J. BOSCH O, MORALEDA G, et al. Pilot study of recombinant human granulocyte - macrophage colony - stimulating factor in the treatment of chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 1993, (1): 8 775 - 8 780.
- [12] 奚永志, 孔繁华. 重组融合蛋白 - 细胞生长因子发展的新趋势[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(5): 544 - 548.

Expression and Secretion of Mutant Recombinant Human GM - CSF in *Pichia Pastoris*

YANG Hong¹, OUYANG Ke - qing¹, GUO Zhi - gang¹, CHEN Yun - gao², CAI Shao - xi¹

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;
2. Sichuan Chengdu RongGao Industrial Groud Ltd CO, Chengdu, 61000, China)

Abstract: Clinic test reveal that by contrasting with expression in *E. coli* the human granulocyte - macrophage colony - stimulating factor (hGM - CSF) which expression in *Pichia Pastoris* has lower toxicity and side - effect rate. Due to nonglycosylated hGM - CSF has higher biological activity in vivo, we mutant glycosylated positions by using PCR technique. The mutant GM - CSF gene was inserted into PPIC9K and then transformed into *Pichia Pastoris* strain GS115 for high expression. The results demonstrat that, in spite of the mutation, the expression product also has natural biological activity.

Key words: hGM - CSF mutant; *Pichia Pastoris*; expression and secretion

(责任编辑 陈移峰)

(上接第 93 页)

The Influences on Photocatalyzing Properties of TiO₂

LIU Ren - long¹, ZHANG Yun - hua², ZHANG Bing - hui³

(1. College of Power Engineering, ChongQing University, Chongqing 400044, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;
3. College of Material Science and Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: An immobilized TiO₂ photocatalyst is choosed to treat phenol discharge. The authors study the remove efficiencies under different conditions through experiments, such as lamping lights, time that the photocatalyst is lamped, pH of phenol discharge and so on. It is showed that a satisfactory can be presented in the condition that the photocatalyst is lamped by mercury light and the time that light lamping lasts 5 hours long and pH of phenol discharge is in 2.0.

Key words: TiO₂; photocataly; phenols discharge treatment

(责任编辑 陈移峰)