

文章编号: 1673-1689(2010)04-0595-07

重组融合人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 突变体 在毕赤酵母中的表达

金光泽¹, 段作营¹, 张莲芬², 金坚², 李华钟^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 构建编码人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 的重组表达质粒, 在 *Pichia pastoris* GS115 中表达, 获得具有较高 IL-2 活性的融合蛋白。设计并合成符合 *P. pastoris* 密码子偏好, 且含有 C125A 突变的 IL-2 编码基因 IL-2m, 通过酶切连接方法将其与人血清白蛋白(HSA)的编码基因连接为融合蛋白 HSA-IL2m 的编码基因。克隆到表达质粒 pPIC9K 中, 电击转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞, 获得重组 *P. pastoris* GS115/pPHIm 基因工程菌。摇瓶发酵获得分泌表达产物。结果: Western blot 鉴定结果显示该融合蛋白与 IL-2、HSA 的抗体都能发生免疫反应。经脱盐、冻干制备的粗蛋白的 IL-2 生物学活性为 1.51×10^6 IU/mg。结论: 在 *P. pastoris* GS115 中成功表达了具有人白介素-2 生物学活性的 HSA-IL2m 融合蛋白。

关键词: 突变型人白介素-2; 人血清白蛋白; 毕赤酵母; 融合蛋白

中图分类号: Q 81

文献标识码: A

Expression of the Fusion Protein Human Serum Album/Mutant Human Interleukin 2C125A in *Pichia pastoris*

JIN Guang-ze¹, DUAN Zu-ying¹, ZHANG Lian-fen², JIN Jian², LI Hua-zhong^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aim of this study was to obtain the fusion protein HSA-IL2m with high IL2 bioactivity, for this, the recombinant plasmid encoding HSA-IL2C125A was constructed and expressed in *Pichia pastoris* GS115. The DNA fragment encoding mutant IL-2 of C125A was design and synthesized based on codon usage bias of *P. pastoris*. The fragment was spliced with Human Serum Album encoding gene and then the fusion gene was cloned into pPIC9K to construct the expression plasmid pPHIm by restrictive digestion and ligation. Recombinant yeast of *P. pastoris* GS115/pPHIm was obtained with pPHIm linearization and electroporation. The excreting product was obtained under shake flask culture. Results: Western-blot showed the fusion protein reactive positively with the antibody of IL-2 and HSA, respectively. The crude fusion protein prepared by desalting and freeze-drying showed IL-2 bioactivity of 5.0×10^5 IU/mg. The results demonstrated that the fusion protein of HSA-IL2m with IL-2 bioactivity was

收稿日期: 2009-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970029); 江苏省产学研联合创新资金计划项目(BY2009110)。

*通信作者: 李华钟(1958-), 男, 山东龙口人, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物制药研究。Email: hzhli@jiangnan.edu.cn

successfully expressed in *P. pastoris* GS115.

Key words: mutant Human interleukin-2, Human serum album, *Pichia pastoris*, fusion protein

白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2), 又称 T 细胞生长因子, 1976 年由 Morgan 等首先在外周血淋巴细胞中发现^[1], 是辅助 T 细胞分泌的淋巴因子, 在免疫系统中发挥着重要的作用。它是中国第一个基因工程生产的蛋白质药物^[2], 临床上可用于恶性肿瘤治疗、感染性疾病的治疗、镇痛等^[3]。由于 IL-2 在人体内的半衰期很短, 临床多采用高剂量频繁给药, 这不仅增加患者的经济负担更有可能产生不良副作用^[4]。为了克服上述缺点, 作者利用人血清白蛋白融合技术 (albumin fusion technology) 构建了编码人血清白蛋白 (Human Serum Albumin, HSA) 和 IL-2 的融合基因, 通过分泌型表达载体 pPIC9K, 将该融合基因整合到巴斯德毕赤酵母染色体中, 在分泌信号肽的作用下分泌表达融合蛋白 HSA-IL2, 以增加其半衰期。同时, 为了能够大量生产具有较高的 IL-2 活性的融合蛋白, 对 IL-2 分子的编码序列进行了改造。IL-2 的成熟分子由 133 个氨基酸残基组成, 它剪切掉了 IL-2 N-端 20 个氨基酸残基的信号肽, 翻译后加工的过程还包括在 58 位和 105 位半胱氨酸 (Cys) 之间形成二硫键, 正确的二硫键对于 IL-2 活性的保持是必需的^[5], 而肽链中第三个 Cys 位点的存在极有可能造成二硫键的错配产生无活性异构体和多聚体。根据毕赤酵母密码子使用频率, 替换天然 IL-2 编码序列中的低频密码子, 并设计合成了第 125 位游离 Cys 点突变为 Ala 的突变型人白介素-2 (mutant Interleukin-2, IL2m) 的编码基因。再通过表达条件优化, 得到较高的融合蛋白产量及生物学活性。

1 材料

1.1 质粒、菌株和细胞株

大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-Blue 和含有 HSA 编码基因的质粒 pBlue/HSA 为作者所在实验室保存, 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和酵母分泌型表达质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司, IL2m 的编码基因委托上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 酶和其他试剂

Plasmid Mini Kit, Gel Extraction Kit (OMEGA BIO-TEK), 限制性内切酶, T4 DNA Ligase,

Taq DNA Polymerase、PCR 试剂: Takara 宝生物公司产品; Interleukin-2 Antibody (sc-34799): Santa 公司产品; Donkey anti-Goat/HRP (KC-GT-035): 上海康成生物有限公司产品; HSA 兔抗人多克隆抗体: 作者所在实验室制备; Goat anti-Rabbit IgG/HRP (bse-0295G): 北京博奥森公司产品; 豚微量白蛋白测定试剂盒: 上海名典生物公司产品; 其余试剂均为分析纯试剂。

1.3 培养基

大肠杆菌 LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH 7.2; 固体 LB 培养基添加质量分数 1.5% 的琼脂;

酵母培养基 YPD、MD、BMGY、BMMY、YPD 按照文献^[6]方法配制。

2 方法

2.1 融合蛋白基因的克隆

2.1.1 IL2m 基因的设计与合成 参照 GenBank 中天然 IL-2 编码基因序列, 根据 <http://www.kazusa.or.jp/codon/> 数据库提供的 *Pichia pastoris* 密码子信息, 保留天然 IL-2 编码基因中的高频及次高频密码子, 用高频密码子替换剩余的所有低频密码子, 并突变天然 IL-2 第 125 位 Cys 为 Ala。设计如下序列:

```

S1  GCCTTAGGCTTAGCACCTACTTCAGTTCTACAAGAAGAACACAGTTGCACTGGAGCAT
      ↑
S2  GCACCTACTTCAAGTTCTACAAGAAGAACACAGTTGCACTGGAGCAT
      [Xcc8II]
61  TTGCTGCTGGATTGCGAGATGATTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAATCCAAAATTG
      ::::::::::::::::::::
49  TTACTGCTGATTACAGATGATTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAATCCAAAATCTC

121 ACCAGAATGCTTACATTTAAGTTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAAACATCTT
      ::::::::::::::::::::
109 ACCAGGATGCTCAGATTTAAGTTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAAACATCTT

181 CAGTGTGTTGGAAGAAGAAATTAAGAACTCTGGAGGAAGTGTGAATTTGCTCAATCTTAAA
      ::::::::::::::::::::
169 CAGTGTCTGAAGAAGAACTCAAACTCTGGAGGAAGTGTGAATTTGCTCAAAAGCAAA

241 AACCTTCACCTCAGAACCAAGAGACTGTACTCTAATATCAACCTTATAGTTCTGGAACAT
      ::::::::::::::::::::
229 AACCTTCACCTAAGAACCAAGGACTTAACTCAGCAATATCAACCTTAAATAGTTCTGGAAC
      ::::::::::::::::::::

301 AAGGGATCTGAAACACAACTCAGTGTGAATATGCTGATGAGCAGCAACCATTTGTTGAA
      ::::::::::::::::::::
289 AAGGGATCTGAAACACAACTCAGTGTGAATATGCTGATGAGCAGCAACCACTTGTAGAA

      Ala
361 TTTCTGAACAGATGGATTACCTTTGCTCAAATCTATCATCTCAACCACTGCACTTAAGGGCCGGCT
      ::::::::::::::::::::
349 TTTCTGAACAGATGGATTACCTTTGCTCAAAGCATCATCTCAACCACTGCACT      ↑
      Cys      [NoI]
  
```

其中 S1 为设计合成序列, S2 是天然 IL-2 的编码序列。S1 的 5' 端序列 GCCTTAGGCTTA 为人血清白蛋白的编码基因 3' 末端的序列, 下划线部分为限制性内切酶位点, TAA 是终止密码, 两者之间的 396 个碱基为 IL2m 的编码序列。全部序列长 423 bp, 交由上海生工生物工程公司合成并克隆到载体 pUC57 中。

2.1.2 HSA-IL2m 融合蛋白的表达基因的构建 质粒 pBlue/HSA 经 *Eco*81I、*Not*I 双酶切, 回收含有 HSA 序列的载体片段。质粒 pUC57-IL2m 经 *Eco*81I、*Not*I 双酶切, 回收 IL2m 片断, 连接两片段后, 转化 *E. coli* XL1-Blue, 根据 Amp 抗性挑选转化子。提取质粒, 酶切验证, 得到含有人血清白蛋白-人白介素 2C125A (HSA-IL2m) 的序列的重组质粒 pBHIm。

2.1.3 表达载体的构建 质粒 pPIC9k 和 pBHIm 经 *Eco*RI、*Not*I 双酶切, 回收两片段, 连接后, 转化 *E. coli* XL1-Blue, 根据 Amp 抗性挑选转化子 pPHIm。提取质粒, 酶切验证, 并送上海生工生物技术有限公司测序。

2.2 融合蛋白表达与鉴定

2.2.1 酵母细胞转化 质粒 pPHIm 经 *Sa*II 酶切, 回收线性化片断, 电击转化 *P. pastoris* GS115。感受态细胞的制备方法及其酵母转化方法同参考文献[7]。

2.2.2 重组克隆筛选及产物表达 将电击转化的酵母细胞以合适的稀释度涂布含有 1 mol/L 山梨醇的 MD 平板, 30 °C 培养至菌落出现。初筛: 挑取长出的转化子 200 个, 接种到含 5 mL BMGY 培养基的试管中, 30 °C, 200 r/min 培养 36 h。置于 4 °C 冰箱中待菌体自然沉降, 无菌条件下弃上清, 加入 1 mL BMMY 培养基, 30 °C, 200 r/min 诱导培养 72 h, 其间每隔 24 h 补加体积分数 1% 甲醇。5 000 r/min, 5 min 离心收集上清, 用脲微量白蛋白测定试剂盒测定上清液中目标蛋白的量, 选取高表达量菌株, 于 YPD 斜面 4 °C 保藏。复筛: 挑取上述初筛的菌至 5 mL BMGY 培养基的 50 mL 三角瓶中, 30 °C, 200 r/min 培养 24 h, 以体积分数 1% 接种量转接到装有 100 mL BMGY 培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C, 200 r/min 培养 30 h 左右, 离心收集菌体于装有 25 mL BMMY 培养基的 250 mL 三角瓶中培养, 30 °C, 200 r/min 诱导 72 h, 其间每隔 24 h 补加体积分数 1% 甲醇。5 000 r/min, 5 min 离心收集发酵上清液。结合脲微量白蛋白测定试剂盒和 SDS-PAGE 电泳, 挑选表达量最高菌株, 于 YPD 斜

面 4 °C 保藏。

2.2.3 重组子诱导表达产物的分析与 Western blot 验证 取保存的发酵上清液, 经 SDS-PAGE 后, 电转移蛋白至硝酸纤维素膜上, 用含 50 g/L 脱脂奶粉的 1×TBS 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L NaCl, pH 7.5) 4 °C 封闭过夜, 用 TBS 清洗后分别用兔抗人 HSA 或山羊抗人 IL-2 的抗体 (1:100) 室温孵育 2 h, 用 TBS 清洗后分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:500) 或驴抗山羊二抗 (1:500) 室温孵育 1 h, 用 TBS 清洗后用 DAB 试剂显色。

2.2.4 活性测定 根据中国药 2005 年第三部中关于 IL-2 的生物活性的检测方法, 即 CTTLL-2/MTT 法^[8], 对融合蛋白的生物学活性进行检测。文中没有说明的其他分子生物学的实验方法, 均参照文献[9]进行。

2.2.5 融合蛋白的摇瓶发酵诱导条件初步优化 菌体培养及诱导的方法同 2.2.2 中复筛时所用的两步法。采用单因素实验, 根据优化需要进行相关调整, 研究初始 pH、甲醇加量、转速、诱导相与生长相培养基体积比等 4 个主要条件对 HSA-IL2m 表达量的影响。

3 结果与讨论

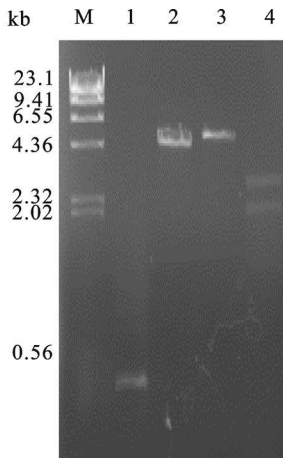
3.1 融合蛋白基因的构建

质粒 pBlue/HSA 经 *Eco*81I、*Not*I 双酶切, 回收约 4.7 kb 的片断; 质粒 pUC57-IL2m 经 *Eco*81I、*Not*I 双酶切, 回收 0.4 kb 的片断。利用这两个片断双酶切所形成的粘性末端, 连接后转化 *E. coli* XL1-Blue 感受态细胞, 通过 Amp 抗性挑选阳性转化子, 提取质粒后进行酶切验证, 结果如图 1 所示, 重组质粒 pBHIm 经 *Eco*RI 单酶切得到 5.1 kb 的片断, 比质粒 pBlue/HSA 双酶切的回收产物多出了约 0.4 kb; 经 *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切得到长度约 2.2 kb 的片断和 2.9 kb 的载体片断, 而 HSA 的编码序列为 1.8 kb, 证明成功构建了 HSA-IL2m 的编码基因。

3.2 表达载体 pPHIm 的构建

重组质粒 pPHIm 物理图谱如图 2(a) 所示。融合基因插入表达载体 pPIC9K 的 *Eco*RI 和 *Not*I 位点之间, 在序列上位于 AOX1 启动子和 α 交配因子的下游且与 α 交配因子的开放阅读框相同。构建的重组质粒 pPHIm 的酶切鉴定见图 2(b), 重组质粒 pPHIm 经 *Eco*RI 单酶切得到一条长约 11.4 kb

的产物,经 EcoRI 和 NotI 双酶切得到长约 2.2 kb 的插入片断和长约 9.3 kb 的载体片断,表明融合基因已经成功插入到载体 pPIC9k 中。质粒测序结果显示,全部序列没有发生突变,与预期一致。



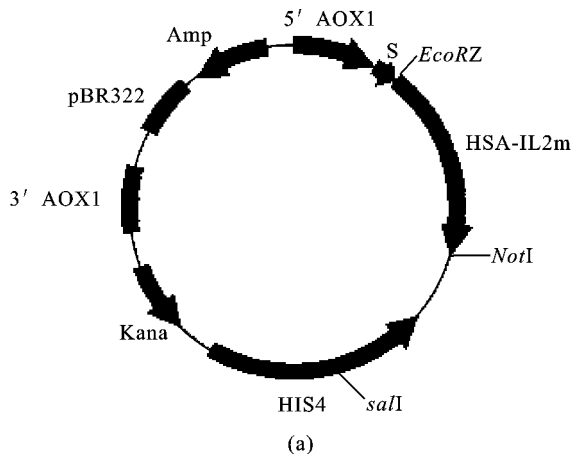
1. Gel extraction of IL2m; 2. Gel extraction of pBlue/HSA; 3. Digestion of pBHIm with EcoRI; 4. Double digestion of pBHIm with EcoRI/NotI; M. λ DNA/HindIII Marker

图1 重组质粒 pBHIm 的酶切分析

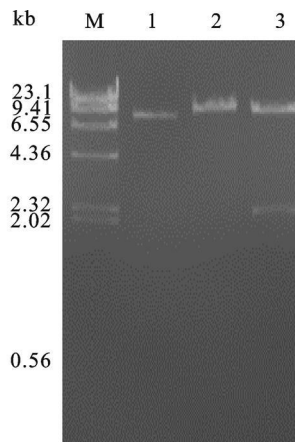
Fig. 1 Restriction analysis of the recombinant plasmid pBHIm

3.3 阳性转化子的筛选及诱导产物的 Western blot 鉴定

质粒 pPHIm 经 *SaI* 酶切,回收线性化片断,电击转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞。涂布 MD 平板,30℃培养 4 d 后共长出了约 400 个转化子,挑选其中 200 个菌落进行初筛,选其中表达量较高的 10 株重组菌进行复筛验证,得到一株产量最高的重组菌 *P. pastoris* GS115/pPHIm,诱导 3 d 后上清液的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 结果如图 3 所示。



(a)



(b)

1. Digestion of pPIC9K with EcoRI; 2. Digestion of pPHIm with EcoRI; 3. Double digestion of pPHIm with EcoRI/NotI; M. λ DNA/HindIII Marker

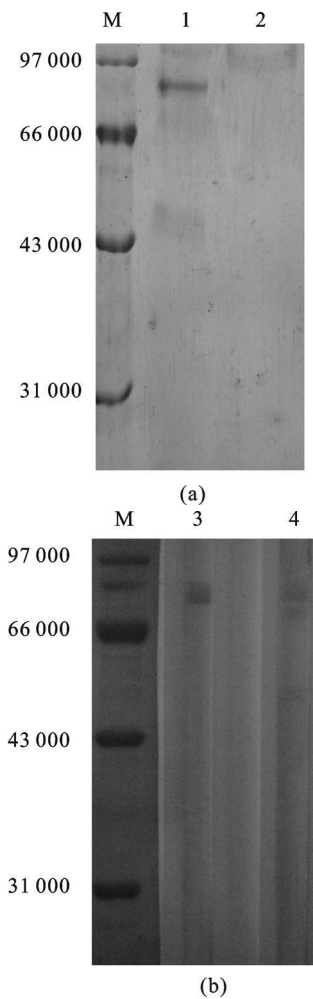
图2 重组质粒 pPHIm 的物理图谱(A)和酶切分析(B)

Fig. 2 Physical map(A) and restriction analysis(B) of the recombinant plasmid pPHIm

研究发现,表达的蛋白质的相对分子质量约为 82 000,与理论计算 HSA-IL2m 的相对分子质量相符,且这一位置的蛋白与 IL-2、HSA 的抗体都能发生免疫反应,进一步证实酵母经诱导表达 HSA-IL2m。但 70 000 和 45 000 这两处的降解条带又都可以与 HSA 的抗体发生免疫反应,认为是融合蛋白降解所产生的条带。经白蛋白测定试剂盒测得其中白蛋白融合蛋白的量约为 60.2 mg/L (以 HSA-IL2m 计)。

3.4 诱导产物的活性测定

发酵液经脱盐处理后,冻干保存。取 0.1 mg 冻干粉用 2 mL PBS 复溶后,离心取上清,测得其中融合蛋白的量约为 300 μ g/mL。采用 IL-2 依赖细胞株 CTLL-2 以标准品 IL-2 为对照,对上清液中的融合蛋白的生物学活性进行了测定。标准品的活性为 2×10^5 IU/mL,用 RPMI1640 稀释到浓度为 200 IU/mL。测定结果表明,上清液中的融合蛋白可以有效的刺激 CTLL-2 细胞增殖。以标准品的最高浓度 OD₅₇₀ 值为 100%,计算标准品、样品梯度百分率。将百分率换算为概率单位,以概率单位为纵坐标,以稀释度 X 的对数为横坐标,绘制直线回归图(图 4),通过计算得出融合蛋白粗蛋白的比活性为 1.51×10^6 IU/mg。



M. Protein marker; 1. Fusion protein HSA-IL2m; 2. Protein expressed by *P. pastoris* GS115/pPIC9k; 3. HSA-IL2m / IL2 antibody, 4. HSA-IL2m / HSA antibody

图3 融合蛋白 HSA-IL2m 的 SDS-PAGE 分析(A) 和 Western Blot 分析(B)

Fig. 3 SDS PAGE(A) and Western Blot(B) of the fusion protein HSA-IL2m

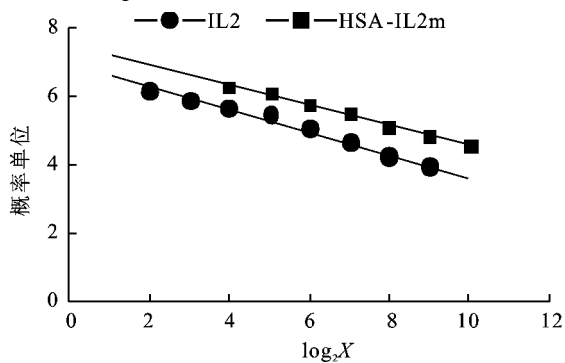


图4 数据转换与线性回归的概率单位分析

Fig. 4 Probit unit analysis of transformation and linear regression of data

3.5 融合蛋白的摇瓶诱导条件初步优化

3.5.1 初始 pH 对表达量的影响 配制 BMMY 培养基时, 将初始 pH 值分别调至 5.0、5.5、6.0、

6.5, 种子液培养 36 h 后, 经离心, 用相同体积的 BMMY 液体培养基重悬菌体, 200 r/min, 30 °C 培养, 每隔 24 h 补加体积分数 1% 甲醇, 72 h 后将发酵液离心并取上清, 测定其中融合蛋白的含量。结果如图 5(a) 所示, 该菌表达 HSA-IL2m 的最适初始 pH 都在 6 左右, 由于诱导培养基中含有 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液, 测得的发酵液 pH 也基本在初始 pH 附近, 因此可基本确定该菌的最适 pH 在 6.0 附近, 这与 Invitrogen 公司的介绍相符。

3.5.2 甲醇体积分数对表达量的影响 配制 BMMY 培养基时, 将初始 pH 调至 6, 二级种子培养 36 h 后, 用相同体积的 BMMY 液体培养基重悬菌体, 200 r/min, 30 °C 培养, 每隔 24 h 按体积分数补加 1%、2%、3%、4% 甲醇, 72 h 后将发酵液离心并取上清, 测定其中融合蛋白的含量。结果如图 5(b) 所示, 甲醇添加量为 3% 时 HSA-IL2m 的表达量最高。

3.5.3 转速对表达量的影响 配制 BMMY 培养基时, 将初始 pH 调至 6, 二级种子培养 36 h 后, 用相同体积的 BMMY 液体培养基重悬菌体, 分别采用旋转式摇床 150、200、250 r/min, 往复式摇床 100、200 r/min, 30 °C 培养, 每隔 24 h 按体积补加甲醇 3%, 72 h 后将发酵液离心并取上清, 测定其中 HSA-IL2m 的含量。结果如图 5(c) 所示, 100(W)、200(W) 为往复式摇床转速, 在装液量体积 10% 条件下, 随转速上升, 表达量呈上升趋势。相同转速下往复式摇床的溶氧要高于旋转式摇床, 说明毕赤酵母在诱导期间对溶氧的需求量非常大, 由于摇床转速的限制, 确定最适的摇床转速为往复式 200 r/min。

3.5.4 诱导相与生长期培养基体积比对表达量的影响 配制 BMMY 培养基时, 将初始 pH 调至 6, 二级种子培养 36 h 后, 用 1:1、1:0.5、1:0.3 倍体积的 BMMY 液体培养基重悬菌体, 分别采用往复式摇床 200 r/min, 30 °C 培养, 每隔 24 h 按体积补加甲醇 3%, 72 h 后将发酵液离心并取上清, 测定其中 HSA-IL2m 的含量。结果如图 5(d) 所示, 该菌在 1:0.5 这个浓缩倍数下, 表达量较高, 在有充分的溶氧和合理的培养基的组分的情况下, 随着细胞密度的增加, 目的蛋白的表达量会逐渐增加。由于本文研究的是在摇床条件下表达目的蛋白, 当细胞密度达到一定值的时候, 溶氧就成了限制菌体代谢和目的蛋白表达的重要因素, 所以研究细胞密度对融合蛋白表达量的影响是有必要的。

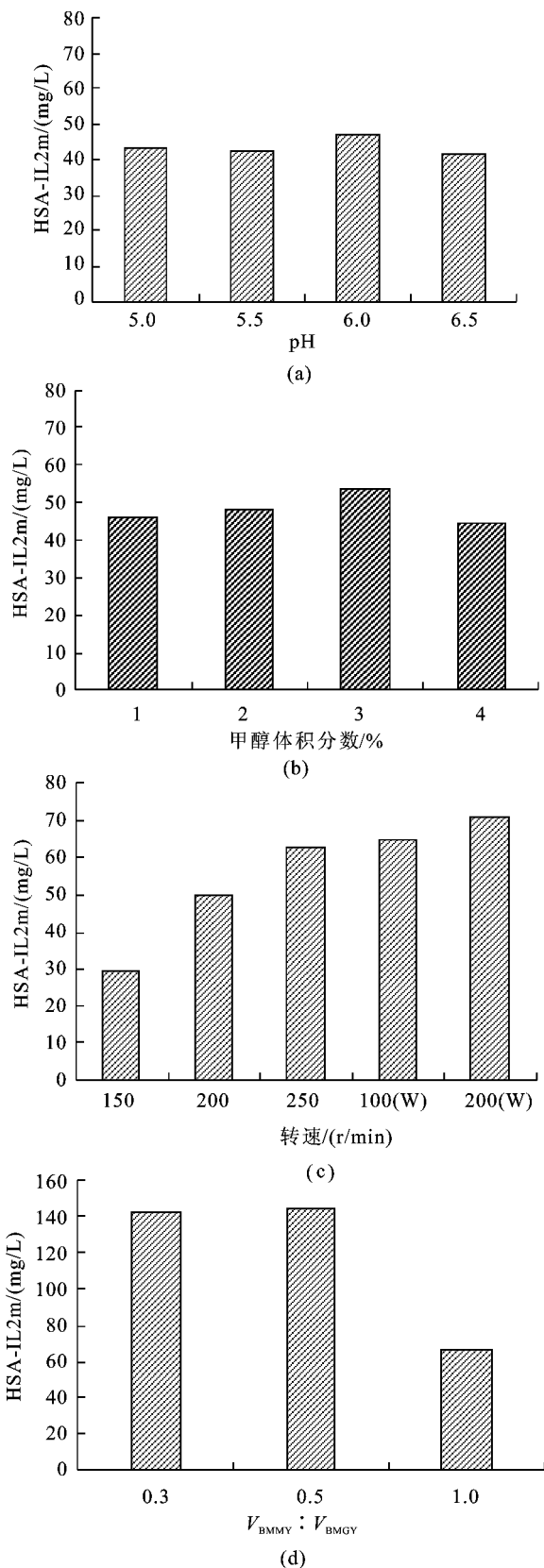
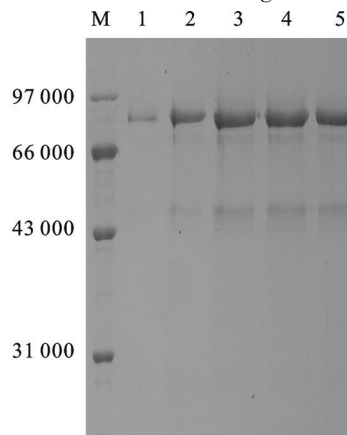


图5 诱导条件对 HSA IL2m 产量的影响

Fig. 5 Effect of inducing conditions on HSA-IL2m yield

3.5.5 初步优化的诱导条件下目的蛋白的表达
 配制 BMMY 培养基时, 将初始 pH 调至 6, 二级种子培养 36 h 后, 用 1:0.5 倍体积的 BMMY 液体培养基重悬菌体, 采用往复式摇床 200 r/min, 30℃ 培

养, 每隔 24 h 补加 3% 甲醇, 诱导 5 d, 其间每隔 24 h 取样保存。结果如图 8 所示, 从发酵液 SDS-PAGE 电泳来看, 82 000 处的条带随时间逐渐变深, 诱导 3 d 以后该条带基本不再变化, 因此确定摇瓶诱导持续时间为 3 d。取 3 d 的样品, 测其中 HSA-IL2m 的质量浓度为 144 mg/L。



M. Protein marker; 1~5. Product of 1~5d

图6 优化诱导条件下 *P. pastoris* GSI15/pPHIm 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS PAGE of expressed product of *P. pastoris* GSI15/pPHIm under the optimized inducing condition

实验得到的表达产物相对分子质量与 HSA-IL2m 的理论预测值相符, Western blot 发现表达产物拥有 HSA 和 IL2m, CTTLL-2/MTT 法提示表达产物具有 IL-2 生物学活性, 说明本研究的表达产物是 HSA-IL2m。

根据密码子的偏爱性, 宿主细胞能够以不同的速度合成所需要的蛋白质, 需要量少的蛋白质基因由于其中有些密码子对应的 tRNA 含量少, 因而合成较少, 反之亦然, 宿主以此来控制该蛋白质的合成速度, 这符合基因表达调控的规律。因此按照密码子偏好, 对外源基因编码基因进行定向改造可以有效提高外源蛋白的表达量^[10]。

HSA 是含有 585 个氨基酸残基的单链无糖基化的球形蛋白质, 相对分子质量 65 000, 它是人血浆中含量最高的蛋白质。HSA 本身就是许多内源因子和外源药物的载体, 药物蛋白和 HSA 结合后, 可以减少其药物利用度同时增加在体内的半衰期^[11]。大多数治疗用的蛋白和多肽半衰期一般较短, 而 HSA 有将近长达 19 d 的血清半衰期, 并且 HSA 的基因在毕赤酵母中可以高效分泌表达^[12], 摇瓶发酵表达量可达 390 mg/L, 上罐发酵表达量可以达到 4 g/L, 摇瓶发酵上清液杂质含量较少, 纯化方便, 将药物基因与 HSA 的基因融合, 在毕赤酵母中表达,

获得融合蛋白,延长蛋白质药物的半衰期。

4 结 语

将 IL2m 的编码基因直接融合于 HSA 的编码

序列的 C 端,中间没有加入任何连接肽。突变型融合蛋白在毕赤酵母中得到了分泌表达,有轻微降解。所表达的 HSA-IL2m 可以有效刺激 CTLL-2 细胞的增殖,表现较高的生物学活性。

参考文献(References):

- [1] Kim HP, Imbert J, Leonard W. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system [J]. **Cytokine Growth Factor Rev**, 2006, 17(5): 349—366.
- [2] 常志远, 徐荻. 白细胞介素 2 的研究进展[J]. 中国处方药, 2004, 29: 36—38.
CHANG Zhi-yuan, XU Di. Advances in Interleukin-2[J]. **China Prescription Drug**, 2004, 29: 36—38. (in Chinese)
- [3] 蒋春雷, 徐荻, 郑仲承, 等. 白细胞介素-2 的中枢镇痛作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1994, 10(4): 322—324.
JIANG Chun-lei, XU Di, ZHENG Zhong-cheng, et al. The central analgesic effect of IL-2[J]. **Chinese Journal of Applied Physiology**, 1994, 10(4): 322—324. (in Chinese)
- [4] Alice KP, Jorge AT. Therapeutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients[J]. **Current Opinion In Pharmacology**, 2002, 2: 433—439.
- [5] Grace Ju, Lisa C, Kimberlee L, et al. Structure-Function analysis of human interleukin-2[J]. **The journal of Biological Chemistry**, 1994, 262(12): 5723—5731.
- [6] 李洁, 张莲芬, 孙均铭, 等. 人 C-型利钠肽-血清白蛋白融合蛋白的构建及在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(5): 289—293.
LI Jie, ZHANG Lian-fen, SUN Jun-ming, et al. Secretive expression of the fusion protein HSA-CNP in *Pichia pastoris* [J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 2007, 28(5): 289—293. (in Chinese)
- [7] Version E, Carlsbad CA. Multi-copy Pichia Expression Kit. Invitrogen, 1999.
- [8] 周道洪, 沈元珊, 赵曼瑞. 测定淋巴细胞转化和鼠白细胞介素 2 活性的新方法——MTT 比色分析法[J]. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 39—44.
ZHOU Dao-hong, SHEN Yuan-shan, ZHAO Man-rui. The application of MTT colorimetric assay to measured the proliferation of lymphocytes and the activity of rat/mouse IL2[J]. **Chinese Journal of Immunology**, 1986, 2(1): 39—44. (in Chinese)
- [9] Samrook J, Pritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[J]. **Analytical Biochemistry**, 1990, 186: 182—183.
- [10] Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ, et al. The intracellular production and secretion of HIV-envelope protein in the methylo-tropic yeast *Pichia pastoris*[J]. **Gene**, 1993, 136: 111—119.
- [11] Roberts M J, Bentley MD, Harris JM, et al. Chemistry for peptide and protein PEGylation[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2002, 54(4): 459—476.
- [12] 郭美锦, 庄英萍, 储炬, 等. 重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达 rHSA [J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 65—68.
GUO Mei-jin, ZHUANG Ying-ping, CHU Ju, et al. Expression of recombinant human serum albumin in genetically engineered pichia pastoris in high-density fermentation[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2002, 42(1): 65—68. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)