

共表达蛋白质折叠辅助因子对毕赤酵母分泌表达 IFN β -HSA 融合蛋白质的影响

陈凤祥¹, 关波¹, 陈蕴², 段作营¹, 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, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 探索共表达蛋白质折叠辅助因子 Ero1、PDI 和 BiP 对毕赤酵母 GS115 分泌表达融合蛋白质 IFN β -HSA 的影响。将构建的蛋白质折叠辅助因子表达载体 pGAP-Ero1、pGAP-PDI、pGAP-BiP 和空载对照线性化后, 电击转化重组毕赤酵母 GS115/IFN β -HSA 细胞, 用含有 400 μ g/mL zeocin 的 YPD 平板筛选阳性转化子, 并采用 PCR 和 Western blot 法进一步鉴定。阳性转化子进行摇瓶发酵后, 采用 SDS-PAGE 及 Western blot 法分析共表达 Ero1、PDI 和 BiP 对 IFN β -HSA 表达水平的影响。结果表明, Ero1、PDI 和 BiP 成功地在胞内过量表达, 且不影响宿主细胞的正常生长; 共表达 Ero1 和 PDI 分别使 IFN β -HSA 的表达量提高了 80% 和 90%, 而共表达 BiP 则对 IFN β -HSA 的表达水平无明显影响。

关键词: 蛋白质折叠辅助因子; 融合蛋白质 IFN β -HSA; 毕赤酵母; 内质网氧化还原酶; 二硫键异构酶; 分子伴侣 BiP

中图分类号: Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)12—1246—05

Effect of Co-Expression of Protein Folding Factor on Expression of Fusion Protein IFN β -HSA in *Pichia pastoris*

CHEN Fengxiang¹, GUAN Bo¹, CHEN Yun², DUAN Zuoying¹, JIN Jian², LI Huazhong^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To explore the expression level of co-expression of folding factors Ero1, PDI and BiP on production of IFN β -HSA by *Pichia pastoris* GS115. The pGAP-Ero1, pGAP-PDI, pGAP-BiP expression plasmids and the empty plasmid pGAPZ B (control) were linearized and integrated into the genome of *P.pastoris* GS115-IFN β -HSA by electroporation. The recombinant yeasts were screened with 400 μ g/mL zeocin. Positive recombinants were identified by genomic PCR and Western blot. The transformants were fermented in flask and the expression products were confirmed by SDS-PAGE and Western blot. The expression levels of IFN β -HSA co-expressed with Ero1, PDI and BiP were analysed. The results indicated that Ero1, PDI and BiP were successfully expressed in

收稿日期: 2014-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970029); 江苏省优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 李华钟(1958—), 男, 山东龙口人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物制药研究。

E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

recombinants with no effect on growth. Compared with Bip, co-expressed with Ero1 and PDI significantly improved the expression level of IFN β -HSA, the expression level was 80% (Ero1) and 90% (PDI) higher than control.

Keywords: protein folding factor, IFN β -HSA, *Pichia pastoris*, Ero1, PDI, BiP

干扰素 β (Interferon β , IFN β) 是由人成纤维细胞分泌的一种糖蛋白质, 它是一种具有广谱抗病毒、抑制细胞增殖、免疫调节等多种生物活性的细胞因子, 由 166 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 22 000~23 000^[1-2]。由于 IFN β 相对分子质量较小, 易被肾小球滤过, 因而在体内的半衰期较短。作者所在实验室前期利用基因融合技术将 IFN β 与人类血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 基因融合, 并成功地在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) KM71 中进行了表达, 融合蛋白质具有 HSA 和 IFN β 的抗原性以及良好的临床应用前景^[3]。

研究表明, 外源蛋白质过量表达时, 初生肽链在内质网中折叠、加工和转运途径超载, 造成蛋白质错误折叠, 成为外源蛋白质分泌表达的限速步骤^[4]。分子伴侣 BiP 是定位于内质网腔内的伴侣蛋白质, 能帮助新合成蛋白质完成进一步的折叠, 或者与未折叠蛋白质、错误折叠蛋白质结合并通过内质网相关的降解 (ER associated degradation, ERAD) 途径实现其降解^[5-6]。有文献报道, 共表达分子伴侣 BiP 能够促进毕赤酵母分泌外源蛋白质^[7]; 但也有研究表明, BiP 的过量共表达会对外源蛋白质表达造成负面影响^[8]。分析其原因可能是过表达 BiP 将导致其辅助分子伴侣 Lhs1p 或内质网腔内 ATP 等含量不足, 过多的 BiP 不再能发挥分子伴侣活性, 从而使蛋白质进入 ERAD 途径而被降解^[9-10]。

二硫键异构酶 (PDI) 能够加速对蛋白质的进一步折叠, 主要负责二硫键的形成和异构化, 能够防止新生多肽多聚体产生, 而且能使错误折叠的蛋白质重新正确装配^[11]。二硫键的形成需要氧化型 PDI 再生, 而黄素腺嘌呤二核苷酸依赖的内质网氧化还原酶 (Endoplasmic reticulum oxidation 1, Ero1) 能促进氧化型 PDI 再生, 从而激活其活性^[12-13]。

研究中使用相对温和的 GAP 启动子, 构建了共表达 Ero1、PDI 和 BiP 等蛋白质折叠辅助因子的 *Pichia pastoris* GS115/pPIC-IFN β -HSA 菌株, 考察共表达这 3 种蛋白质折叠辅助因子对融合蛋白质

表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

融合蛋白质表达菌株 *Pichia pastoris* GS115/pPIC-IFN β -HSA 和蛋白质折叠辅助因子表达载体 pGAP-Ero1、pGAP-PDI、pGAP-BiP 由作者所在实验室构建并保藏, 酵母表达载体 pGAPZ B 购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *AvrII*, 购自 Thermo 公司; PCR 产物纯化试剂盒, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 酵母基因组提取试剂盒, 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 酸洗玻璃珠 (500 μ m), 购自 Sigma 公司; 博来霉素 (Zeocin), 购自美国 Invitrogen 公司; 酵母浸粉 (Yeast Extract)、胰蛋白胨 (Tryptone Powder), 购自 OXOID 公司; 其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 共表达转化子的构建与验证

将 pGAP-Ero1、pGAP-PDI 和 pGAP-BiP 共表达质粒和 pGAPZ B 空载分别用 *AvrII* 限制性内切酶进行线性化, 电击转化 GS115-IFN β -HSA 感受态细胞 (1.5 kV, 5 ms)^[14]。加入预冷的 1 mol/L 山梨醇 30 $^{\circ}$ C 静置培养 1 h 后, 再加入 YPD 培养基 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 h, 涂布 YPD 平板 (含 400 μ g/mL 的 Zeocin), 置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3 d。

挑取若干 YPD 平板单菌落分别接种于 5 mL YPD 液体培养基中 (含 100 μ g/mL Zeocin), 200 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 采用 pGAP 载体通用引物 (正向: 5'-GTCCCTATTTC AATCAATTGAA-3'; 反向: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 以验证各蛋白质折叠辅助因子基因的过表达载体是否成功整合至重组酵母菌中。

1.4 Ero1、PDI、BiP 的 Western blot 分析

共表达菌株胞内蛋白质提取及诱导表达参照 pGAPZ B 说明书进行。提取经基因组 DNA PCR 验证正确的共表达菌株的胞内蛋白质进行 Western blot 分析。

由于在构建共表达质粒时,将 Ero1、PDI 和 BiP 终止密码子去除,使得 6 $\times$ His 标签分别与 Ero1、PDI 和 BiP 的 C 端融合表达(图 1)。因此,可利用抗 6 $\times$ His 抗体检测各蛋白质折叠辅助因子是否在重组酵母胞内过量表达。

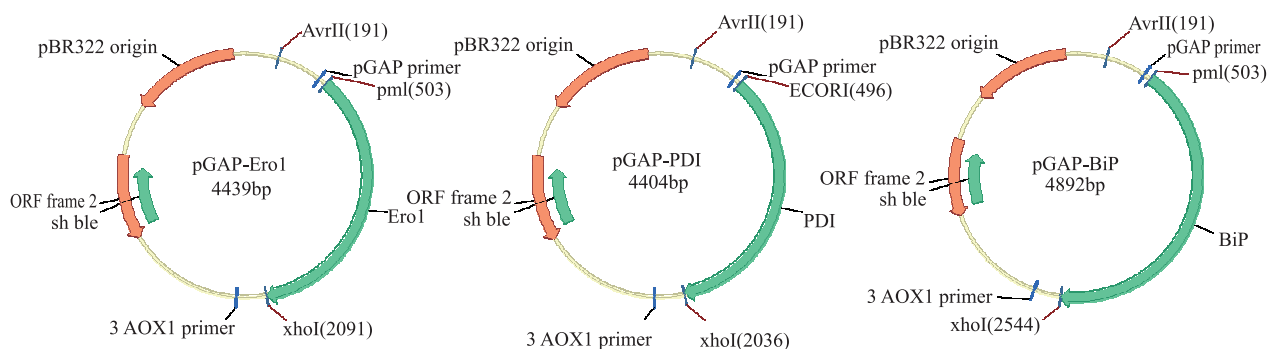


图 1 pGAP-Ero1、pGAP-PDI 和 pGAP-BiP 质粒图谱

Fig. 1 Schematic map of pGAP-Ero1, pGAP-PDI and pGAP-BiP plasmids

1.5 共表达 Ero1、PDI 和 BiP 菌株分泌表达 IFN β -HSA 的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

接种共表达 Ero1、PDI 和 BiP 的重组菌株至 BMGY 培养基培养,收获菌体后在 BMMY 培养基中用体积分数 2%甲醇诱导表达,将不同诱导时间的发酵液离心后取上清液,进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,并用图像处理软件 ImageJ 对 SDS-PAGE 结果进行灰度定量,用统计分析软件 SPSS 对定量结果进行统计分析。

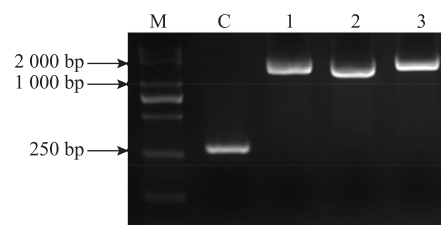
1.6 共表达重组菌株生长测定

将各共表达菌株和转化 pGAPZ B 空载的对照菌株分别接种至 YPD 液体培养基,200 r/min、30 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h,以体积分数 1%接种量接种至 BMGY 培养基,200 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养,采用比浊法 (OD_{600})测定菌体生长。

2 结果与分析

2.1 共表达 Ero1、PDI 和 BiP 酵母菌株的构建及其阳性转化子的筛选

将线性化的 pGAP-Ero1、pGAP-PDI、pGAP-BiP 和空载 pGAPZ B 电击转化 GS115-IFN β -HSA 感受态细胞。分别从 YPD(含 400 μ g/mL Zeocin)平板上挑取转化子若干,以其基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示。



M:DM2000 plus DNA marker;C:对照组通用引物 PCR 产物;1—3 为共表达菌株基因组 DNA 的 PCR 产物;1. Ero1, 2. PDI, 3. BiP。

图 2 酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of genome of *Pichia pastoris*

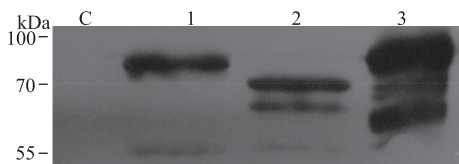
结果显示,转化空载的菌株基因组 DNA 经扩增后获得约 250 bp 的片段(C 泳道);而以转化 pGAP-Ero1、pGAP-PDI 和 pGAP-BiP 菌株的基因组 DNA 为模板时,PCR 扩增产物在约 2000 bp 处各有明显条带,表明 pGAP-Ero1、pGAP-PDI 和 pGAP-BiP 表达框已成功整合至相应转化子基因组。

2.2 Ero1、PDI 和 BiP 表达的 Western blot 分析

为了验证蛋白质折叠辅助因子 Ero1、PDI 和 BiP 在胞内过量表达,用抗 6 $\times$ His 抗体对 Ero1、PDI 和 BiP 共表达菌株和对照菌株胞内蛋白质进行了 Western blot 分析,结果如图 3 所示。

对照菌株胞内蛋白质的 Western blot 杂交没有出现特异性条带,而 Ero1、PDI 和 BiP 共表达菌株胞内蛋白质 Western blot 均出现特异性杂交条带,表

明蛋白质折叠因子 Ero1、PDI 和 BiP 分别在共表达菌株中被过量表达。Ero1、PDI 和 BiP 蛋白质杂交条带均比理论分子量略大,Ero1 尤其显著,这可能是由于毕赤酵母的 Ero1 自身存在糖基化修饰造成的^[15]。



C:pGAPZ B 空载菌株的胞内蛋白质的杂交结果;1—3 为蛋白质辅助折叠因子重组菌株胞内蛋白质的杂交结果:1. Ero1, 2. PDI, 3. BiP。

图 3 蛋白质折叠辅助因子 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of folding helper factors

2.3 Ero1、PDI、BiP 共表达对重组菌株生长的影响

为了分析共表达各种蛋白质折叠辅助因子是否对重组毕赤酵母菌株的生长有不利影响,对共表达 Ero1、PDI、BiP 的菌株和对照菌株在 BMGY 培养基中的生长进行了测定,结果如图 4 所示。

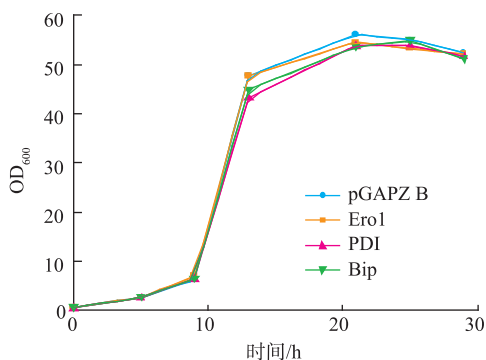


图 4 pGAPZ B、Ero1、PDI 及 BiP 菌株的生长曲线

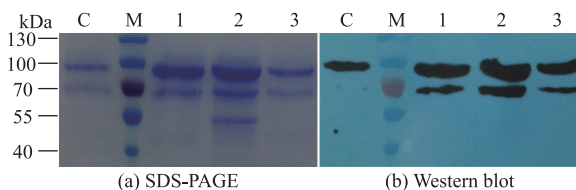
Fig. 4 Growth curves of strains co-overexpressing pGAPZ B Ero1, PDI and BiP

结果表明,各种共表达菌株的生长曲线与对照菌株均无明显差异。各菌株培养约 24 h 后到达平衡期,此时酵母细胞密度 $OD_{600} \approx 50$ 。这说明,共表达 Ero1、PDI、BiP 对 IFN β -HSA 融合蛋白质表达菌株的正常生长没有影响。

2.4 Ero1、PDI 和 BiP 共表达对融合蛋白质 IFN β -HSA 分泌表达的影响

为了分析共表达 Ero1、PDI、BiP 是否对融合蛋白质 IFN β -HSA 的分泌表达有促进作用,将共表达 Ero1、PDI、BiP 的菌株和对照菌株分别诱导表达 72 h 后,离心取上清液,对各个菌株的 IFN β -HSA 表达

作 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,并用 ImageJ 软件对其表达量作相对定量,结果见图 5。



M: 蛋白质预染 marker;C:pGAPZ B 空载对照菌株;1—3 为 Ero1、PDI 和 BiP 共表达菌株;1. Ero1, 2. PDI, 3. BiP。

图 5 表达产物 IFN β -HSA 的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 5 Analysis of the expression of product IFN β -HSA

由图 5 可知,对照菌株和共表达菌株均表达融合蛋白质 IFN β -HSA(分子量约 90 kD)。利用 SPSS 对 ImageJ 定量结果进行统计分析,结果如表 1 所示,诱导 72 h 后,Ero1、PDI 和 BiP 共表达菌株融合蛋白质表达量分别是对照菌株的 1.8 倍、1.9 倍和 1.1 倍,且具有统计学意义($P \leq 0.05$),表明共表达 Ero1 和 PDI 对提高重组毕赤酵母外源蛋白质的表达量具有显著作用,而共表达 BiP 对重组毕赤酵母外源蛋白质的表达水平没有影响。

表 1 蛋白质辅助折叠因子表达量的统计

Table 1 Mean improvements of IFN β -HSA by co-expression of folding helper factors

辅助因子	相对表达量	P 值
Ero1	1.8	0.001
PDI	1.9	0.016
BiP	1.1	0.048

P 值由单样本 t 检验获得, $P \leq 0.05$ 被认为数据可信。

见上图 5,共表达 PDI 时,SDS-PAGE 结果显示,表达产物中还存在一分子量约为 50 kDa 的条带,用抗 HSA 抗体作 Western blot 分析(图 5(b))可见,杂交结果显示此条带并非表达产物 IFN β -HSA 的相关条带,其具体来源有待进一步研究。

3 结 语

本实验中,通过在 GS115-IFN β -HSA 中分别共表达 Ero1、PDI 和 BiP,探索了过量表达内质网中这 3 种蛋白质折叠辅助因子对外源蛋白质 IFN β -HSA 分泌表达的影响。实验结果表明,Ero1、PDI 和 BiP

成功地在胞内过量表达,且不影响宿主细胞的正常生长。共表达 Ero1 和 PDI 的重组菌株,其 IFN β -HSA 融合蛋白质表达量有不同程度的提高,分别是对照菌株的 1.8 倍和 1.9 倍。这表明二硫键的形成过程可能是外源蛋白质 IFN β -HSA 分泌表达过程中的限速步骤之一,通过在 *Pichia pastoris* GS115 细胞中分别共表达 Ero1 和 PDI,可能促进了融合蛋白质 IFN β -HSA 折叠过程中二硫键的形成,有助于融合蛋白质在内质网中的折叠加工,从而提高了外源

蛋白质 IFN β -HSA 的表达量。共表达 BiP 的重组菌株中,IFN β -HSA 融合蛋白质的表达量与对照组相当,可能过表达 BiP 加重重组菌株表达外源蛋白质的负担,使得过多的 BiP 已不能发挥蛋白质辅助因子的活性。已有的文献报道显示,共表达 BiP 对外源蛋白质表达的影响存在较大差异^[16],在某些情况下,共表达 BiP 对一些外源蛋白质表达没有显著影响^[17]。因此,组合表达不同的蛋白质折叠辅助因子能否进一步提高目的蛋白质的产量,值得深入研究。

参考文献:

- [1] Jonasch E, Haluska F G. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications and toxicities[J]. **The Oncologist**, 2001, 6(1): 34-55.
- [2] Kontsek P. Human type I interferons: Structure and function[J]. **Acta Virologica**, 1994, 38(6): 345-360.
- [3] 雷榭勇, 张莲芬, 杨健良, 等. 人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国生物工程, 2006(7): 6.
LEI Jianyong, ZHANG Lianfeng, YANG Jianliang, et al. Secretory expression of the fusion protein IFN β -HSA in *Pichia pastoris* [J]. **China Biotechnology**, 2006(7): 6. (in Chinese)
- [4] Nishikawa S I, Fewell S W, Kato Y, et al. Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation[J]. **J Cell Biol**, 2001, 153(5): 1061-1070.
- [5] Otero J H, Lizak B, Hendershot L M. Life and death of a BiP substrate [J]. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2010, 21(5): 472-478.
- [6] Li J, Lee A S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer[J]. **Current Molecular Medicine**, 2006, 6(1): 45-54.
- [7] Damasceno L M, Anderson K A, Ritter G, et al. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 74(2): 381-389.
- [8] VAN DER Heide M, Hollenberg C P, VAN DER Klei I J, et al. Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 58(4): 487-494.
- [9] Steel G J, Fullerton D M, Tyson J R, et al. Coordinated activation of Hsp70 chaperones[J]. **Science**, 2004, 303(5654): 98-101.
- [10] 关波, 金坚, 李华钟. 改良毕赤酵母分泌表达外源蛋白能力的研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 851-857.
GUAN Bo, JIN Jian, LI Huazhong. Genetic engineering of *Pichia pastoris* expression system for improved secretion of heterologous proteins—a review[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2011, 51(7): 851-857. (in Chinese)
- [11] Wilkinson B, Gilbert H F. Protein disulfide isomerase[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2004, 1699(1-2): 35-44.
- [12] Tu B P, Weissman J S. The FAD- and O₂-Dependent reaction cycle of Ero1-Mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum[J]. **Mol Cell**, 2002, 10(5): 983-994.
- [13] Sevier C S, Cuzzo J W, Vala A, et al. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation[J]. **Nature Cell Biology**, 2001, 3(10): 874-882.
- [14] Wu S, Letchworth G J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol[J]. **Bio Techniques**, 2004, 36(1): 152-154.
- [15] Frand A R, Kaiser C A. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum[J]. **Mol Cell**, 1998, 1(2): 161-170.
- [16] Smith J D, Tang B C, Robinson A S. Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2004, 85(3): 340-350.
- [17] Robinson A S, Bockhaus J A, Voegler A C, et al. Reduction of BiP levels decreases heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **J Biol Chem**, 1996, 271(17): 10017-10022.