

# 青岛海葵强心活性多肽在毕氏酵母中的分泌表达

王维荣 刘爱民 钱志康 黄伟达

(复旦大学生命科学学院生物化学系, 上海 200433)

**摘要** 青岛海葵中存在两种具有增强心肌收缩功能的多肽类毒素(分别命名为 A<sub>P</sub>-QD1 和 A<sub>P</sub>-QD2)。通过分析已经得到 A<sub>P</sub>-QD2 的氨基酸序列, 按照毕氏酵母的偏爱密码子设计并合成了 A<sub>P</sub>-QD2 的 cDNA。将合成 cDNA 序列通过 PCR 扩增及一系列分子克隆操作导入毕氏酵母表达载体 pPICZαA 中, 以电穿孔方法转化毕氏酵母 GS115 和 KM71, 并进行转化子的表型及高拷贝化筛选。其中的 KM71 (Mut<sup>+</sup>) 的转化子经摇瓶发酵, 每升发酵液可表达约 20 mg 的重组 A<sub>P</sub>-QD2 产物, 通过纯化可得到 7 mg 纯的有天然生物学活性的 A<sub>P</sub>-QD2 基因工程产物。

**关键词** 青岛海葵强心活性多肽, 毕氏酵母, 分泌表达

**学科分类号** Q786

海葵毒素 (anthopleurins, A<sub>P</sub> 类物质或称海葵素) 是一类能增强心肌收缩又不影响心率和血压的多肽物质, 可望开发成为治疗心力衰竭的新一代药物<sup>[1]</sup>。这类多肽与神经和肌肉的快速电压依赖性钠离子通道结合, 可引起通道开放而导致心肌收缩的增强<sup>[2]</sup>。我们在已报道的研究中发现青岛侧花海葵 (*Anthopleura qingdaoensis*) 中含有两种强心活性多肽, 分别命名为 A<sub>P</sub>-QD1 和 A<sub>P</sub>-QD2<sup>[3]</sup>。其中 A<sub>P</sub>-QD2 由 49 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 5 200, 在生物体内含量较 A<sub>P</sub>-QD1 为低, 但强心活性更强。A<sub>P</sub>-QD2 的结构分析显示出与文献报道的 A<sub>P</sub>-A 和 A<sub>P</sub>-B 的不同, 但介于两者之间<sup>[1,3]</sup>。

由于海葵毒素在海葵中的含量极低 (每千克体重含大约 3 mg), 而且受季节的影响, 因而通过基因工程生产海葵毒素, 对于海葵毒素的深入研究和开发有着十分重要的意义。本研究工作以毕氏酵母的分泌表达体系作为海葵毒素的基因工程体系, 将按毕氏酵母的偏爱密码子设计和合成的 A<sub>P</sub>-QD2 的合成 cDNA 在毕氏酵母中进行了分泌表达研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 质粒与菌种:** 质粒 pBlueScript (pSK) 和大肠杆菌菌株 XLI-Blue 用于合成 cDNA 的克隆; 表达载体 pPICZαA 以及毕氏酵母宿主菌 GS115 (Mut<sup>+</sup>)、KM71 (Mut<sup>+</sup>) 购自美国 Invitrogen 公司。

**1.1.2 酶与化学试剂:** 各种限制性内切酶及其他工具酶购自美国 Bio-Labs, 大连 TAKARA 生物公司。三羟甲基氨基甘氨酸 (Tricine) 购自美国

Calbiochem 公司, zeocin 和酵母培养用 YNB (酵母氮源) 购自美国 Invitrogen 公司。其他各种药品均为国产分析纯。

**培养基组成:** YPD 培养基含 1% 酵母抽提物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖; BMGY 培养基含 1% 酵母抽提物, 2% 蛋白胨, 1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0), 1.34% YNB, 4 × 10<sup>-5</sup>% 生物素, 1% 甘油; BMMY 培养基中用 0.5% 的甲醇取代 BMGY 培养基中的甘油; MM 培养基含 1.34% YNB, 4 × 10<sup>-5</sup>% 生物素, 0.5% 甲醇; MD 培养基中用 2% 葡萄糖取代 MM 培养基中的甲醇。

### 1.2 方法

**1.2.1 A<sub>P</sub>-QD2 cDNA 的设计与合成:** 根据测定得到的 A<sub>P</sub>-QD2 的氨基酸序列 (待发表), 按毕氏酵母偏爱密码子设计寡核苷酸片段, 由上海生工生物工程公司合成。其中 F1~F4 为 A<sub>P</sub>-QD2 合成基因的模板序列, F5~F7 为 F1~F4 的连接部分的互补片段 (表 1)。寡核苷酸片段 F2、F3 及 F4 的 5' 端磷酸化后与互补片段 F5、F6 及 F7 混合, 加热至 90 °C, 自然冷却到室温, 加 T4 DNA 连接酶连接过夜。以连接物为模板 DNA, 以导入了酶切位点的一对引物进行 PCR 扩增。5' 引物序列为: XXXCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCAGGTGTTGCTTGTGTGT (导入 Xho I 位点), 3' 引物序列为: XXXGGATCCTCATTGTTTACAACACAACC (导入 Bam H I 位点), 其中 X 为 G 和 C 的混合碱基。PCR 反应的条件为: 94 °C × 60 s, 45 °C × 60 s, 72 °C × 60 s, 35 个循环。

表 1 Ap-QD2 合成 cDNA 的设计及寡核苷酸片段的序列

F1	F2	F3	F4
F5	F6	F7	
<p>F1: 5'-GGTGTTCCTTGTGGTGTGATTCTGATGGTCCATCT</p> <p>F2: 5'-GTTAGAGGTAATACTTTGTCTGGTACTATTTGGTTGTACC</p> <p>F3: 5'-CATCTGGTTGTCCTTCTGGTTGGCACAATTGTAAAGCTCAC</p> <p>F4: 5'-GGTCCAAATATTGGTTGGTGTGTTGTAACAA</p> <p>F5: 5'-CCTCTAACAGATGGACCA</p> <p>F6: 5'-ACCAGATGGGTACAAC</p> <p>F7: 5'-TTTGGACCGTGAGCTT</p>			

注: F1~F4 为 Ap-QD2 的合成 cDNA 模板片段序列; F5~F7 为 F1~F4 连接部分的互补片段序列。

1.2.2 PCR 产物的克隆及表达载体的构建: PCR 产物经琼脂糖电泳回收后, 以 *Xho* I / *Bam* H I 的位点组合克隆到 pSK 质粒上, 转化大肠杆菌后抽提得到重组质粒, 再以 *Xho* I / *Not* I 的组合克隆到毕氏酵母表达载体 pPICZaA 上, 构建成重组表达质粒 pAp-QD2 (图 1)。

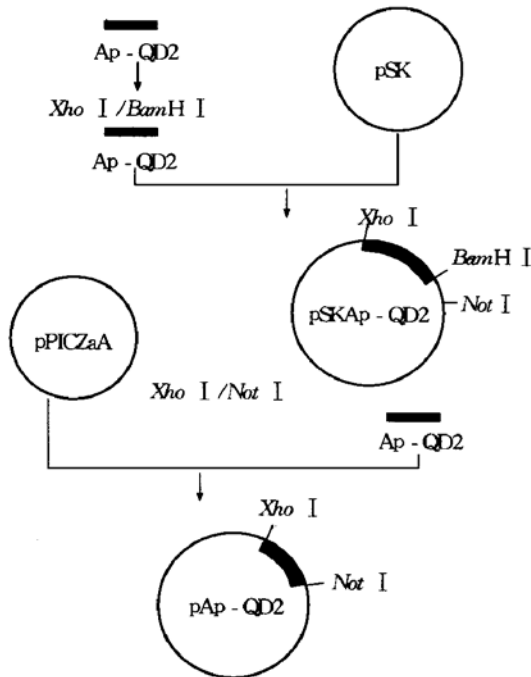


图 1 pAp-QD2 重组表达载体的克隆流程图

1.2.3 毕氏酵母中表达载体的转化: 取 5~10 μg 去除了 RNA 的重组表达质粒, 经 *Sac* I 单酶切线性化, 乙醇沉淀回收后以电穿孔法转化毕氏酵母, 在含 100 mg/L 的 zeocin 和 1 mol/L 山梨醇的平板上筛选转化子。所用电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Genepulser, 转化条件为电压 1500 V, 电容 25 μF, 电阻 300 Ω。

1.2.4 转化子的 PCR 鉴定: 挑转化子的单克隆菌

落悬于 10 μl 的无菌水, 加入 5 μl 5 U/μl 蜗牛酶, 30℃作用 10 min, -80℃放置 10 min 后取 5 μl 上清作为模板, 用 Invitrogen 公司提供的 AOX1 5' 引物 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') 和 3' 引物 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCG-3') 进行 PCR 扩增, 反应条件 95℃×60 s、54℃×60 s、72℃×60 s, 30 个循环。

1.2.5 DNA 测序: 送样由北京赛百盛生物工程公司测定。

1.2.6 基因表达: 毕氏酵母基因表达受体菌选用 GS115 和 KM71, 挑取单克隆菌落, 按照 Invitrogen 公司提供的操作手册的 GS115 (Mut<sup>+</sup>) 及 KM71 (Mut<sup>s</sup>) 所介绍的发酵方法进行摇瓶发酵, 定期取样, 以 Tricine SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[4]</sup>及醇溶蛋白染色<sup>[5]</sup>检测目的基因的表达水平。

1.2.7 表达产物的纯化: 发酵液离心去菌体, 上清中加乙醇至终浓度为 50%, 65℃处理 10 min, 离心去沉淀, 上清液 40℃减压浓缩, 相对分子质量为 3000 的透析袋对水透析, 透析液在 Bio-Rad 公司的 Biological 中压系统上进行阳离子交换柱层析, 收集分离峰进行电泳检测和生物活性检测。

1.2.8 蛋白质含量的测定: 按照 Bradford 方法测定蛋白质含量<sup>[6]</sup>。

1.2.9 生物活性检测: 表达产物的生物活性按照 Shibata 的方法采用豚鼠离体心脏进行检测<sup>[7]</sup>, 由山东省海洋药物研究所帮助完成。

## 2 结 果

### 2.1 合成 cDNA 的 PCR 扩增

Ap-QD2 酵母表达体系的合成 cDNA 模板片段连接后经 PCR 扩增, 得到特异扩增的单一一条带的扩增产物, 产物大小在 150 bp 左右, 扩增产物经 *Xho* I / *Bam* H I 双酶切后释放出 150 bp 的片段,

片段的大小为所要合成的目的基因片段的大小 (图 2).

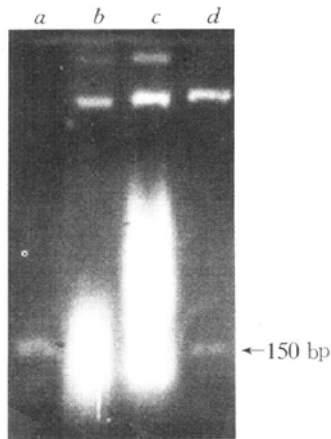


图 2 Ap-QD2 合成基因的 PCR 扩增及酶切图

a: Ap-QD2 合成基因的 PCR 产物; b: pPICZaA;  
c: pAp-QD2; d: pAp-QD2/ (*EcoRI* + *NotI*).

## 2.2 表达载体的构建

Ap-QD2 合成基因的 PCR 扩增产物先以 *XhoI* / *BamHI* 的组合克隆到 pSK 质粒上构建成 pSKAp-QD2, 然后以 *XhoI* / *NotI* 的组合转克隆到毕氏酵母表达质粒 pPICZaA 中. 克隆载体和表达载体分别用 *EcoRI* / *BamHI* 及 *EcoRI* / *NotI* 进行双酶切鉴定. 对 pSKAp-QD2 及 pAp-QD2 的测序结果表明, 重组质粒中的外源基因序列与设计的 Ap-QD2 的合成 cDNA 的序列完全一致 (数据略).

## 2.3 表达载体的转化、鉴定

通过电穿孔的方法分别得到 21 个 (GS115) 和 17 个 (KM71) 转化子, 转化后的毕氏酵母在含 zeocin 的 YPD 培养基上生长, 表明带有 zeocin 抗性的 pAp-QD2 的表达重组质粒已经转移到了毕氏酵母的细胞内. 转化子经 PCR 鉴定亦表明 Ap-QD2 合成基因已整合到毕氏酵母染色体上.

## 2.4 发酵表达

两种转化子 GS115 (*Mut*<sup>+</sup>) 和 KM71 (*Mut*<sup>s</sup>) 摇瓶发酵培养后的上清经 Tricine SDS-聚丙酰胺凝胶电泳检测, 只在 KM71 (*Mut*<sup>s</sup>) 的发酵上清中检测到 Ap-QD2 合成基因的表达产物 (图 3), 电泳图谱的蛋白质定量显示目的基因的表达水平为每升摇瓶发酵液约 20 mg.

## 2.5 表达产物的纯化

发酵液经乙醇和热处理、浓缩、透析及阳离子交换, 收集有生物活性的阳离子交换  $A_{280}$  吸收峰,

层析图谱上显示活性成分只有单一吸收峰 (图 4), 盐梯度洗脱前不吸附的穿透峰是一些不被吸附的杂蛋白和色素, 经检验不含有目的多肽. 1 L 发酵液经纯化可得到 7 mg 的纯品表达产物.

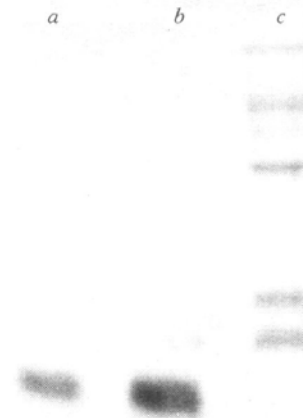


图 3 Ap-QD2 在 KM71 (*Mut*<sup>s</sup>) 中表达的 Tricine SDS 聚丙酰胺凝胶电泳图谱

a: 人胰岛素 (相对分子质量 6 000); b: KM71 (*Mut*<sup>s</sup>) 发酵上清; c: 分子质量标记 (由上至下标记条带的相对分子质量分别为:  $6.8 \times 10^4$ 、 $4.5 \times 10^4$ 、 $2.8 \times 10^4$ 、 $1.7 \times 10^4$  和  $1.4 \times 10^4$ ).

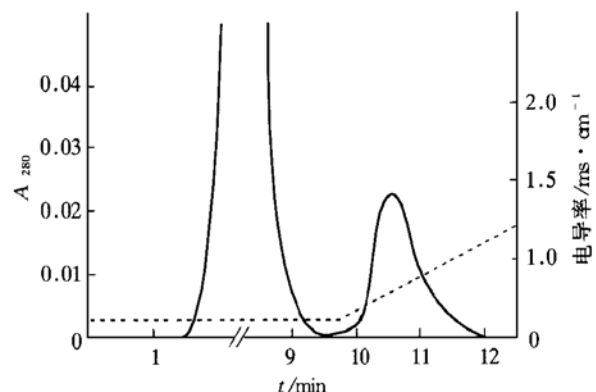


图 4 Ap-QD2 表达产物纯化的阳离子交换层析图

## 2.6 表达产物的生物活性

对 KM71 (*Mut*<sup>s</sup>) 的发酵表达产物进行豚鼠离体心脏的活性试验, 结果发现, Ap-QD2 合成基因在毕氏酵母中分泌表达的产物具有与天然 Ap-QD2 相同的增强小鼠离体心脏心肌收缩的能力. 表 2 以离体豚鼠心房的收缩力增加百分率表示心肌收缩能力增加的程度, 结果由公式求得, 心房收缩力增加百分率 = (用药后的心房收缩幅度 - 用药前的心房收缩幅度) / 用药前的心房收缩幅度  $\times 100\%$ . 表达产物能明显增加豚鼠离体心房的收缩能力, 10~15 min 内的作用强度最大.

表2 表达产物对豚鼠离体心房收缩能力的影响

剂量分组	用药后收缩幅度增加百分率/%				
	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min
高剂量 (112 mg/L)	65.0 ± 30.6	119.5 ± 30.5	132.6 ± 40.6	128.5 ± 44.3	110.4 ± 43.9
中剂量 (56 mg/L)	34.3 ± 14.0	62.3 ± 27.3	72.1 ± 28.6	61.0 ± 29.0	48.9 ± 29.8
低剂量 (28 mg/L)	13.4 ± 9.8	24.3 ± 17.2	28.7 ± 20.3	29.3 ± 32.1	26.3 ± 30.5

注: 每组实验用豚鼠 10 只,  $\bar{x} \pm s$ .

### 3 讨 论

海葵素是一类由海葵毒液中分离到的能增强哺乳动物心肌收缩能力的多肽类毒素, 相对分子质量在 6 000 左右, 其作用位点是钠离子通道, 引起钠离子通道的打开而增强心肌收缩<sup>[3, 7]</sup>, 可望开发成为新一代安全有效的强心药物, 因而一直受到人们的关注. 但由于生物体内的天然含量极低, 分离纯化既繁琐、得率又低<sup>[3, 7, 8]</sup>, 影响了海葵素的深入研究, 尤其是作为强心药物开发中所应进行的大量结构与功能关系的研究. 研究人员一直在寻求利用现代生物工程手段大量生产低成本并有天然生物活性的海葵素以促进海葵素的深入研究和开发, 1992 年 Gallagher 等<sup>[9]</sup>首次在大肠杆菌中以融合蛋白的形式表达了有天然活性的 A<sub>P</sub>B, 但表达量非常低, 仅为每升发酵液 1 mg, 且分离纯化麻烦, 其后有关海葵素基因工程的研究也未见报道. 作者课题研究小组近几年对青岛海葵强心活性多肽的生物化学、药理毒理及分子生物学等方面进行了一系列的研究<sup>[1, 3]</sup>, 同时还进行了海葵素基因表达的研究. 研究中根据 A<sub>P</sub>QD2 的氨基酸序列, 按照大肠杆菌、枯草杆菌和毕氏酵母各系统不同的基因表达特点, 分别设计并合成了 A<sub>P</sub>QD2 的 cDNA, 构建克隆表达载体并转化和表达了有天然生物活性的 A<sub>P</sub>QD2. 大肠杆菌中利用  $\lambda$  噬菌体的 P<sub>R</sub> 启动子与 protein A 以融合蛋白的形式表达了 A<sub>P</sub>QD2, 表达量占总蛋白质量的 7% (未发表), 结果优于文献报道, 但分离纯化麻烦. 枯草杆菌表达体系虽有活性目的多肽的分泌表达, 但目前表达水平还很低 (待发表).

本文报道了青岛海葵强心活性多肽人工基因在毕氏酵母中的分泌表达. 毕氏酵母作为真核表达体系因其对表达蛋白的正确加工、折叠、翻译后修饰及可分泌等优点, 并具有菌体繁殖容易、非致病性和遗传操作方便等特点, 已经成为一个较好的基因工程分泌表达体系, 许多外源基因在该系统中得到

了成功的分泌表达<sup>[10, 11]</sup>. 分泌表达的特点可以确保基因工程表达蛋白纯化的简易和方便, 能大大地降低生产成本. 毕氏酵母表达体系对于表达那些翻译后需要正确架接和折叠成有天然结构的蛋白质、或在胞内不稳定的蛋白质以及有毒蛋白的基因工程有着明显的优势<sup>[10]</sup>. 外源表达构件在线性化后可以串联形式多拷贝整合在毕氏酵母的染色体上, 并可以通过增加选择抗性 zeocin 的工作浓度, 筛选到更高拷贝化的克隆 (EasySelect™ Pichia Expression Kit, protein expression).

海葵强心活性多肽在毕氏酵母中的表达至今尚未见报道. 本工作中摇瓶发酵已可获得较高的表达量, 如配以计算机控制的发酵罐发酵, 表达水平将会达到更高的水平. 当然, 最大限度提高外源基因在毕氏酵母中的表达量, 还存在一些理论及实际操作上的问题如减少蛋白水解酶的作用、表达的诱导和发酵的最适条件等, 这方面还有很多更深入的工作要做.

### 参 考 文 献

- 1 黄伟达, 王维荣, 王京端, 等. 海葵素结构功能与基因工程的研究现状与进展. 中国海洋药物, 1997, 16 (4): 39~ 41  
Huang W D, Wang W R, Wang J D, et al. Chinese Journal of Marine Drugs, 1997, 16 (4): 39~ 41
- 2 Schweitz H, Vincent J P, Barhanin J, et al. Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus* and *Actinodendron plumosum*. Biochemistry, 1981, 20 (18): 5245~ 5252
- 3 王维荣, 黄伟达, 王京端, 等. 青岛海葵强心活性多肽的分离纯化与氨基酸组成分析. 复旦学报 (自然科学版), 1996, 35 (6): 656~ 660  
Wang W R, Huang W D, Wang J D, et al. Journal of Fudan University (Natural Science), 1996, 35 (6): 656~ 660
- 4 Schagger H, Jagow G V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem, 1987, 166 (2): 368~ 379
- 5 忻 骅, 顾其敏, 赵志安, 等. 一种改良的小麦醇溶蛋白电泳法. 植物生理学通讯, 1988, 127 (3): 66~ 68  
Xin H, Gu Q M, Zhao Z A, et al. Plant Physiology Communica-

- tions, 1988, **127** (3): 66~ 68
- 6 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1~ 2): 248~ 254
  - 7 Shibata S, Norton T R. Isolation and characterization of the cardiotoxic polypeptide anthopleurir A from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *J Pharm Sci*, 1976, **65** (9): 1368~ 1373
  - 8 Reimer N S, Yasunobu C L, Yasumobu K T, *et al.* Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurir B. *J Biol Chem*, 1985, **260** (15): 8690~ 8693
  - 9 Gallagher M J, Blumenthal K M. Cloning and expression of wild type and mutant forms of the cardiotoxic polypeptide anthopleurir B. *J Biol Chem*, 1992, **267** (20): 13958~ 13963
  - 10 Romanose M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8** (6): 423~ 488
  - 11 Screelrishna K, Nelles S, Potenz R, *et al.* High level expression, purification, and characterization of recombinant human tumour necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 1989, **28** (9): 4117~ 4125

**Cloning of a Synthetic Gene Coding for Cardiotoxic Polypeptide Anthopleurir-QD2 and Its Expression in *Pichia pastoris*.** WANG Wei Rong, LIU Ai Min, QIAN Zhi Kang, HUANG Wei Da (*School of Life*

*Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

**Abstract** Venom of sea anemone *Anthopleura qingdaoensis* contains at least two cardiotoxic polypeptides capable of enhancing cardiac contraction (a positive inotropic effect). An artificial gene encoding anthopleurir-QD2 (Ap-QD2), which consists of 49 amino acid residues, was cloned and transferred into pPICZαA, a secretory expression vector for *Pichia pastoris*. The construct was linearized and was integrated into the yeast chromosome by electroporation under the selection of zeocin. Approximately 20 mg/L of biologically active Ap-QD2 was produced from one of the KM71 (Mut<sup>s</sup>) transformants, and about 7 mg of pure Ap-QD2 was obtained after chromatography purification.

**Key words** cardiotoxic polypeptide anthopleurir-QD2, sea anemone, *Pichia pastoris*, secretory expression

## 羧甲基化虎奶多糖的制备及抗氧化性研究

王 雁 杨祥良 邓成华 顾小曼 周井炎 徐辉碧<sup>1)</sup>

(华中理工大学药物研究所, 武汉 430074)

**摘要** 通过对从虎奶菌菌核中提取的虎奶多糖 (HNP) 进行羧甲基化修饰, 制备了一种水溶性羧甲基化虎奶多糖 (CM-HNP), 并对其抗氧化性进行了初步研究. 结果表明 CM-HNP 能有效抑制 Fe<sup>2+</sup>-Vit C 引起的大鼠肝线粒体脂质过氧化、膜流动性的降低和线粒体的肿胀, 清除邻苯三酚自氧化产生的超氧自由基 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 并呈一定的剂量-效应关系.

**关键词** 虎奶多糖, 抗氧化性, 羧甲基化

**学科分类号** R284.1, Q539

虎奶, 学名菌核侧耳或地核侧耳, 为担子菌纲 (Basidiomycetes) 侧耳科 (Pleurotaceae) 植物虎奶菌 (*Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing.) 之菌核, 主要分布于我国云南、缅甸及其他一些东南亚国家. 据《中药药名辞典》<sup>[1]</sup> 载: 虎奶菌, 甘, 温, 补气益血, 治气血虚弱症. 但是虎奶作为一种中药材在我国药典和各地地方标准中未被收载, 对其化学成分和生物活性的研究迄今在国内外未见报道.

初步研究表明虎奶的主要成分为一种均一的多

糖 (HNP), 约占菌核干重的 60%. 根据凝胶渗透色谱、高碘酸氧化及 Smith 降解等研究结果, 推测 HNP 为单一的 (1→3)-β-D-葡聚糖, 平均每三个葡萄糖残基上有一个 O-6 位分支的葡萄糖残基.

由于 HNP 几乎不溶于水, 因此本文对其进行羧甲基化修饰, 得到一种水溶性的羧甲基化虎奶多糖 (CM-HNP), 并对其抗氧化性进行了初步研究.

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

Tel: (027) 87543532, E-mail: hbxu@email.hust.edu.cn

收稿日期: 1999-07-20, 修回日期: 1999-11-18