

## 猪表皮生长因子在毕赤酵母中的表达及鉴定

汪 洋, 杨桂香, 吴波浪, 张万江, 黄伟华, 彭险峰

(华南农业大学兽医学院/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642)

**摘要:** 【目的】猪表皮生长因子 (pEGF) 具有刺激静止期猪卵母细胞的成熟以及刺激仔猪胃肠上皮细胞成熟的功能, 从而可以提高母猪繁殖率和降低断奶仔猪的应激。因此开发猪表皮生长因子具有重要意义。【方法】用人工合成的 pEGF 基因为模板, 用 PCR 扩增获得 pEGF-6His 片段, 将其克隆到载体 pPIC9 构建重组质粒 pPIC9-pEGF 并电转化毕赤酵母。用斑点杂交法筛选多拷贝整合转化子即基因工程菌, 用 Ni-NTA 亲和层析法纯化目的蛋白, 纯化产物用抗 His-tag 的单克隆抗体进行蛋白质免疫印迹、氨基端测序鉴定、体外生物活性检测。【结果】斑点杂交法筛选中信号越强的转化子, 甲醇诱导表达的目的蛋白含量越高。免疫印迹中可以观察到印迹条带。氨基端氨基酸测序发现纯化的表达产物含有 2 条肽链, 其 N-端 15 个氨基酸的序列分别与天然的 pEGF 以及 Glu-Ala-pEGF 的序列相同。体外生物活性检测结果表明, 纯化的表达产物对 BALB/c 3T3 细胞具有显著的增殖作用。【结论】本研究获得了能高效表达具有生物学活性的重组猪表皮生长因子的基因工程菌。

**关键词:** 猪表皮生长因子; 毕赤酵母; 分泌表达; 生物活性

## Expression and Characterization of Porcine Epidermal Growth Factor in *Pichia pastoris*

WANG Yang, YANG Gui-xiang, WU Bo-lang, ZHANG Wan-jiang, HUANG Wei-hua, PENG Xian-feng

(Guangdong Key Laboratory for Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

**Abstract:** 【Objective】 Porcine epidermal growth factor (pEGF) can stimulate dormant primordial follicle into active follicle and stimulate growth of gastrointestinal (GI) tract and repair the GI tract in pigs and it may enhance productivity of sows and reduce the stress of early-weaned piglets, so it is necessary to develop recombinant pEGF. 【Method】 According to the codon usage preference of *pichia pastoris*, a pEGF gene was synthesized and the PCR was performed to obtain pEGF-6-His fragment using the synthetic pEGF gene as template. Then pEGF-6-His fragment was cloned into plasmid pPIC9. The resulting plasmid pPIC9-pEGF was linearized and transformed into *pichia pastoris* by electroporation, multicopy strains were screened out by dot blotting analysis, and the target protein in the medium supernatants was purified by His-tag affinity column. The purified protein was analyzed by Western blotting using anti-His-tag monoclonal antibody, amino-terminal sequencing, and in vitro bioactivity assay. 【Result】 The stronger hybridization signal of the transformant in dot blotting, the more obvious target protein band from this transformant was observed in Tricine-SDS-PAGE. An immunoblotting band was observed in the western blotting analysis, and N-terminal amino-acid sequencing showed that purified products contained two peptides. The N-terminal sequence of one peptide was the same as the sequence of the natural pEGF, and the other peptide was Glu-Ala-pEGF. Finally, the expressed pEGF fusion protein could significantly increase the proliferation of BALB/c 3T3 cells. 【Conclusion】 These results indicated that a recombinant strain which can effectively and stably produce recombinant porcine epidermal growth factor with high bioactivity was obtained.

**Key words:** Porcine epidermal growth factor; *Pichia pastoris*; Secreting expression; Bioactivity

收稿日期: 2006-06-20 ; 接受日期: 2007-01-09

基金项目: 广州市科技计划项目 (2006Z3-E0051)

作者简介: 汪 洋 (1981-), 男, 湖南常德人, 硕士研究生, 研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail: ddysea.student@sina.com。通讯作者杨桂香 (1965-), 女, 湖南衡阳人, 教授, 博士, 研究方向为分子药理学与毒理学。Tel: 020-85281478; Fax: 020-85284896; E-mail: yanggx@scau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】由于猪乳中含有  $124 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的表皮生长因子, 断奶引起乳源性的表皮生长因子的供应突然中断, 使断奶仔猪的胃肠黏膜难以适应饲料, 而引发断奶应激, 采食量、日增重及饲料转化率大幅度降低, 进而引起腹泻, 免疫力下降, 导致断奶仔猪生长停滞或死亡, 给养猪生产带来较大经济损失。表皮生长因子是一种在多种动物中存在的丝裂原性的含有 53 个氨基酸的多肽, 有研究表明皮生长因子具有多种生物学功能, 如可刺激表皮和内皮细胞的增殖<sup>[1-3]</sup>; 可刺激胃肠道的生长以及诱导小肠消化酶的表达<sup>[4-8]</sup>。此外, pEGF 具有促进静止期的初级卵母泡变成活化卵泡, 从而加速卵子的排出, 因此具有提高哺乳动物的窝产仔数的功能<sup>[9-11]</sup>。McGlone 等的研究表明大肠杆菌表达的重组 pEGF 可提高窝产仔数 20.79%<sup>[12]</sup>。因此开发重组用于畜牧生产以及兽医临床用的表皮生长具有重要的实践意义。【前人研究进展】由于表皮生长因子具有多种生物学活性, 有关重组人表皮生长因子 (rhEGF) 和重组小鼠表皮生长因子 (rmEGF) 在大肠杆菌<sup>[13-17]</sup>、短芽孢杆菌<sup>[18]</sup>、酵母<sup>[19-22]</sup>的研究已经有大量的报道。Oka 等早在 1985 用大肠杆菌表达分泌性 rhEGF, 但是培养基上清中 rhEGF 只有  $1.026 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[14]</sup>。Ebrahmi-Rad 等用大肠杆菌表达 rhEGF 时, 用高效表达系统 (M15/pSE), 细胞周质中可溶性蛋白表达量为  $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而且表达的 rhEGF 对 Balb/c 3T3 细胞的增殖活性低; 而用 BL21/pET32 表达系统的可溶性表达量只有  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[17]</sup>。Yamagata 等用 *Bacillus brevis* 分泌表达 rhEGF, 表达量可达  $260 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[18]</sup>。Clare 等用毕赤酵母来分泌表达 rmEGF, 由于筛选了多拷贝整合转化子, 结果高密度发酵的表达量可达  $447 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[19]</sup>。黄秉仁报道用毕赤酵母表达 rhEGF 的产量为  $300 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[20]</sup>。【本研究切入点】目前, 对重组 pEGF 表达的报道则很少。Pascall 等报道在 *Saccharomyces cerevisiae* 表达了少量的 pEGF 的融合蛋白<sup>[21]</sup>; 2001 年美国专利 6300311B1 报道了用大肠杆菌表达融合蛋白 6His-pEGF, 并用 Ni-凝胶柱从细菌中纯化表达产物, 但是表达产物在 C-端含有 19 个来源于表达载体的氨基酸<sup>[11]</sup>; Lee 等用毕赤酵母表达系统成功表达了 pEGF, 而且表达量较高  $870 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但是没有建立纯化表达产物的方法, 也没有对表达产物进行纯化<sup>[8]</sup>, 因此发酵表达的上清需要保存在  $-80^\circ\text{C}$ 。没有纯化的 pEGF 难以进行下游制剂的研制。本研究为

了获得大量的纯化的能用于兽医临床以及重组 pEGF, 因此开展了本研究。【拟解决的关键问题】本研究根据毕赤酵母对密码子偏好性, 人工合成了 pEGF 基因, 并在其 C-端加上了编码 6 个组氨酸的序列, 用毕赤酵母表达系统进行表达, 使研制的基因工程菌不仅能高效稳定地表达重组表达, 而且表达产物的纯化步骤简单、实用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

基因工程菌 *E.coli* DH5 $\alpha$ , 用于质粒的扩增与转化, 广东省兽药研制与安全评价重点实验室保存。pPIC9 载体、毕赤酵母 GS115 菌株、GS115/His+MutS albumin 菌株, 购于 INVITROGEN 公司。

Qiaprep Spinminiprep 试剂盒及 Qiaquick Gel Extraction 试剂盒购自 Qiagen 公司; 同位素 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, 购自北京福润生物医学公司; Takara Random Primer DNA labeling 试剂盒, 购自 TakaRa 公司; 小鼠源性的抗 His-Tag 单克隆抗体及 i-NTA His-Band Resins, 购自 Novagen 公司。

Balb/c 3T3 细胞购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心; DMEM 基础培养基、胎牛血清、青链霉素、链霉素、胺酰胺购自 GBICO 公司。重组人表皮生长因子 (Recombinant Human EGF, hEGF), 英国 PeproTech House 公司。Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Dojindo Molecular Technologies 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 pPIC9-pEGF 表达载体的构建 根据 pEGF 的氨基酸序列以及毕赤酵母对密码子的偏好性, 人工合成 pEGF 基因。以合成的 pEGF 基因为模板, 设计一对引物, 使上游引物的 5'端含有 *Xho* I 至 *Sna*B I 之间的序列, 下游引物的 5'端含有编码 6 个组氨酸以及 *Eco*R I 位点, 进行 PCR 扩增。PCR 产物和 pPIC9 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后用 Qiaquick Gel Extraction 试剂盒回收 210 bp 的 pEGF 片段和 8 000 bp 的载体条带, 然后进行连接反应。连接产物转化 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。用 Qiaprep Spinminiprep 试剂盒提取阳性转化子的质粒, 进行酶切鉴定以及测序鉴定。获得的重组表达载体为 pPIC9-pEGF。

1.2.2 pPIC9-pEGF 转化毕赤酵母 重组质粒 pPIC9-pEGF 用 *Bgl* II 酶切线性化后, 采用电转化法转化酵母 GS115 感受态细胞。参照 Pichia Expression kit

的说明书, 在 MD 及 MM 平板上观察各转化子的生长的快慢以确定转化子的表型。

**1.2.3 斑点杂交筛选多拷贝整合转化子** 在 Clare 等<sup>[7]</sup>方法的基础上进行一些修改。将已经确定表型的转化子置于含 100  $\mu\text{l}$  YPD 培养基的 96 孔板中, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 取 10  $\mu\text{l}$  接种含新鲜 YPD 培养基的 96 孔板中, 继续培养 48 h。然后每孔取 50  $\mu\text{l}$  培养的菌液于 2 ml 离心管中, 离心去上清后, 用 80  $\mu\text{l}$  含有酵母裂解酶 (lyticase) 的酵母裂解缓冲液重悬细胞沉淀, 37  $^{\circ}\text{C}$  裂解 4 h, 100 $^{\circ}\text{C}$  作用 10 min 后, 立即将离心管放入冰中, 并加入等体积的 20 $\times$ SSC, 得到裂解液。利用斑点杂交加样器, 将制备的裂解液转移至硝酸纤维素膜上, 变性后 80 $^{\circ}\text{C}$  烘烤 2 h, 置入杂接管, 加入预杂交液杂交 4 h。用引物 (上游引物 AOX primer 5'-GACTGG TTCCAATTGACAAG-3', 下游引物 pPSEGF primer 5'-CCTAGGGAATTCTCAATGATGA-3') 从 pPIC9-pEGF 上扩增出长度为 535 bp 含有 pEGF 基因的片段。用 Qiaquick Gel Extraction 试剂盒回 PCR 产物, 以之为模板, 用 Takara Random Primer DNA labeling 试剂盒以及 [ $\alpha$ -32P]dCTP 进行同位素探针标记反应。将标记的探针加入预杂交的管中, 杂交过夜。洗膜后, 取出硝酸纤维素膜压磷板 24 h。将该磷板在 Bio-Rad FX 扫描仪上扫描, 筛选多拷贝转化子。

**1.2.4 pEGF 的表达和纯化** 挑取斑点杂交筛选出的多拷贝转化子于 40 ml BMGY 培养基中培养 16~18 h, 离心, 细胞沉淀加入 10 ml 含 1% Casamino Acid 的 BMMY 培养基中, 用 1% 甲醇诱导表达, 分别在 0、24、48、72、96、120 h 取 100  $\mu\text{l}$  上清, 参照 Schagger 等<sup>[8]</sup>的方法进行 Tricine-SDS-PAGE 分析, 筛选表达量高的转化子作为工程菌。

将工程菌接种 400 ml BMGY 培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$  摇瓶培养 16~18 h, 离心, 去上清, 细胞接种 100 ml BMMY 培养基, 继续摇瓶培养, 用 1% 甲醇诱导 96 h; 诱导表达的上清用磷酸钾调 pH 值至 7.8。离心去细胞及碎片, 离心上清用过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, 洗脱液按 1 ml 体积分装到 2 ml EP 管。取各 EP 管中的洗脱液少量, 进行 Tricine-SDS-PAGE 分析, 将含靶蛋白洗脱液对 1 L 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液透析 24 h, 然后冻干保存。

### 1.2.5 表达产物的鉴定

**1.2.5.1 Western blotting** 将 Ni-NTA 亲和层析柱纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳, 再经转 PVDF 膜、封闭, 然后用小鼠源性的抗 His-Tag 单克隆抗体 (Novagen

公司) 以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 进行免疫印迹反应。

**1.2.5.2 N 端氨基酸测序** 取少量冻干的纯化表达产物, 用蒸馏水溶解, 加  $\beta$ -巯基乙醇 (终浓度为 5%), 100 $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min, 使分子中的二硫键还原。然后将样品进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳以及转 PVDF 膜。将含有目的条带的 PVDF 膜送上海基康生物技术有限公司进行 N 端的氨基酸测序, 测定 N 端 15 个氨基酸残基。

**1.2.5.3 融合蛋白活性检测** Balb/c3T3 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 (完全培养基) 传代培养, 用完全培养基稀释至  $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ , 以每孔 100  $\mu\text{l}$  加入到 96 孔细胞培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 用含 1% 小牛血清的 DMEM 培养基 (基础培养基) 饥饿培养 12 h, 加入系列稀释的含纯化的 pEGF 样品或 hEGF 标准品的培养基 (每个浓度水平做 4 个重复), 37 $^{\circ}\text{C}$  继续培养 48 h, 加 10  $\mu\text{l}$  的 CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$  作用 2 h 后测定 600 nm 波长的吸收度值 (OD)。

**1.2.6 统计分析** 融合蛋白活性检测的原始数据用 Excell 2000 软件进行 student T 检验, 分别比较 pEGF 空白组以及与 rhEGF 组对细胞的增殖作用的差异。

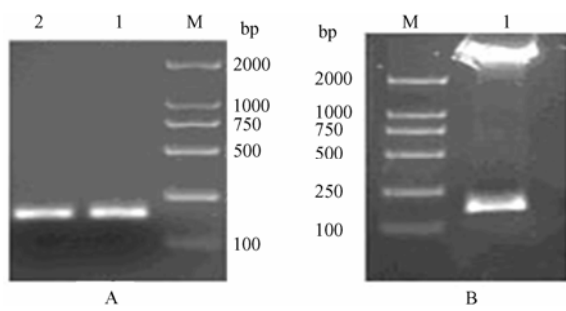
## 2 结果与分析

### 2.1 pPIC9-pEGF 表达载体的构建

以合成的 pEGF 基因为模板用上下游引物扩增出一个约 200 bp 片段, 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 分别对该 PCR 产物和 pPIC9 载体进行酶切消化, 酶切回收的 pEGF 片段与 pPIC9 载体片段进行连接转化, 获得的转化子进行增菌培养, 菌液 PCR 扩增的结果可见一条大小约 200 bp 的条带 (图 1-A)。提取菌液 PCR 结果为阳性的菌落的质粒, 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切, 酶切产物电泳图中可见一条大小约为 200 bp 的条带 (图 1-B)。这表明 pEGF-6His 片段已成功地克隆到 pPIC9。测序结果表明 pPIC9-pEGF 载体中插入的 pEGF 基因序列与合成的序列一致。

### 2.2 多拷贝整合转化子的筛选与 pEGF 的诱导

表达转化子用 MD 板和 MM 板确定其对甲醇利用的快慢, 在挑取的 200 个转化子中, 有一半是 Mut+ (利用甲醇快) 型转化子。将鉴定为 Mut+、Mut s 表型的转化子挑出, 用斑点杂交法筛选多拷贝整合转化子, 结果如图 2。多拷贝整合转化子是信号较强的转化子, 如 A8、B2、B7、B8、C6、C7。将筛选出的多拷贝整合转化子, 分别用 BGMY 和 BMMY 来扩大培

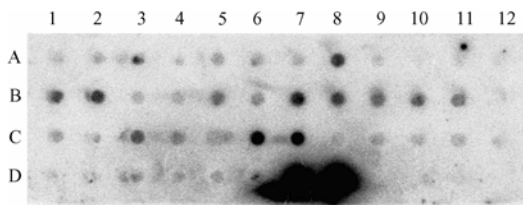


A. 1、2: 菌液 PCR 产物电泳图; M: DNA 分子量标准 DL2000; B. 1: 阳性转化子提取的质粒酶切电泳图; M: DNA 分子量标准 DL2000  
A. 1, 2: Agarose gel electrophoresis of PCR products from pPIC9-pEGF transformants; M: DL 2000 DNA marker; B. 1: Agarose gel electrophoresis of plasmid from positive transformants; M: DL 2000 DNA marker

图 1 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis

养和诱导表达 pEGF。表达上清的 Tricine-SDS-PAGE 电泳结果见图 3。从图 3 可以看出, pPIC9 载体转化子的诱导表达上清中没有观察到明显的目的蛋白条带 (泳道 9); pPIC9-pEGF 多拷贝转化子的表达上清中, 每个转化子在 6 kD~14.4 kD 之间有明显的蛋白条带 (泳道 1~6), 拷贝数越多的转化子, 表达上清中靶蛋白的条带越明显。



D3、D4: pPIC9 转化子; D5、D6: 未转化的 GS115; D7、D8: pPIC9-pEGF 质粒; 其它为 pPIC9-pEGF 转化子  
D3, D4: pPIC9 transformants; D5, D6: Untransformed GS115; D7, D8: pPIC9-pEGF plasmid; The other dots were pPIC9-pEGF transformants

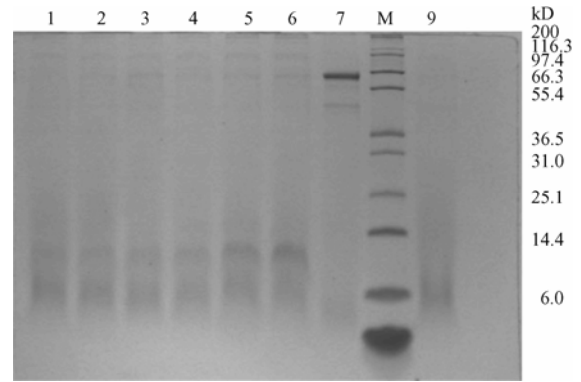
图 2 斑点杂交筛选多拷贝转化子

Fig. 2 Multicopy strains isolated by dot blotting

### 2.3 表达产物的纯化与鉴定

2.3.1 表达产物的纯化 表达上清过 Ni-NTA 亲和柱后, 靶蛋白主要集中在第 2、3、4 管洗脱液中 (图 4)。从图 4 可以看出, 表达上清过 Ni-NTA 亲和柱后, 杂蛋白很少。实验室的摇瓶诱导表达产物纯化后的产量约为  $82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

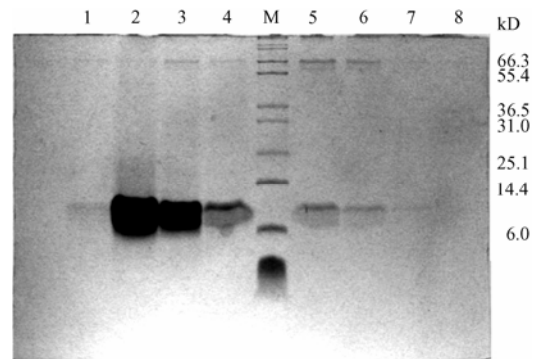
2.3.2 Western blotting 分析 工程菌的诱导表达上清经 Tricine-SDS-PAGE 电泳以及转膜后, 用抗 His tag



1~6: 拷贝数不同的 6 个菌株的诱导表达上清; 7: GS115/His+ MutS albumin 的诱导表达上清; M: 蛋白质分子量标准; 9: pPIC9 载体转化子的诱导表达上清  
1-6: Induced supernatants from 6 different multicopy strains; 7: Induced supernatant from GS115/His+MutS albumin; M: Protein marker; 9: Induced supernatant from pPIC9 transformant

图 3 多拷贝整合转化子的表达上清的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed supernatants from multicopy strains



1~8: 第 1-8 离心管接收的洗脱液; M: 为蛋白质分子量标准  
1-8: Aliquots from 1th-8th eluted solutions; M: Protein marker

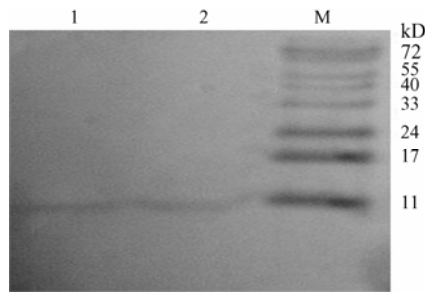
图 4 表达上清经 Ni-NTA 纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the products purified by Ni-NTA affinity chromatography

单克隆抗体进行免疫印迹分析 (图 5)。在图 5 的 1、2 泳道中可见印迹条带。

2.2.3 N 端氨基酸测序 Ni-NTA 亲和柱纯化的表达产物用 Edman 降解法进行 N 端的氨基酸测序, 发现样品中含有 2 条多肽, 其 N 端的 15 氨基酸残基的序列分别为 NSYSECPPSHDGYCL 和 EANSYSECP SHDGY。

2.2.4 表达产物的活性检测 纯化的表达产物对 Balb/c 3T3 细胞的增殖活性 (图 6)。从图 6 可见, 与



1, 2: 纯化的表达产物; M: 预染蛋白质分子量标准  
1 and 2: Purified products; M: Pre-stained protein marker

图 5 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis

空白对照相比,本研究表达纯化的 pEGF 蛋白对 Balb/c 3T3 细胞具有显著的细胞增殖活性 ( $P < 0.01$ ), 与重组人表皮生长因子对照品的细胞增殖活性相比, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

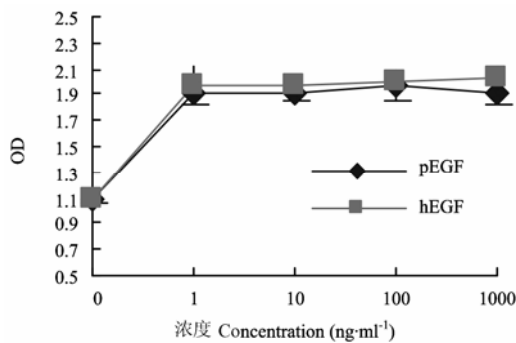


图 6 用 CCK-8 测定的纯化表达产物 pEGF-6His 对 Balb/c 3T3 的生物活性

Fig. 6 Bioactivity of purified pEGF-6His on Balb/c 3T3 cells by using CCK-8 assay

### 3 讨论

#### 3.1 pEGF 基因的高效表达

由于天然的 pEGF 在猪体内为分泌型蛋白, 所以本研究采用分泌型表达载体 pPIC9 来构建重组表达载体。在 pPIC9 载体上含有编码 *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$  factor 信号肽序列, 表达的靶蛋白可以分泌到培养基中。在分泌表达的过程中, 信号肽可由毕赤酵母体内的蛋白酶 *KEX2* 及 *STE13* 切除, 其中 Glu-Ala 重复序列由蛋白酶 *STE13* 切除。本研究的测序结果表明纯产

物中含有两段肽: 一条肽的 N-端 15 个氨基酸为 NSYSECPPSHDGYCL, 与天然 pEGF 的序列一致; 另一条肽的 N-端 15 个氨基酸为 EANSYSECPPSHDGY, 说明工程菌在表达 pEGF-6His 时, 有部分靶蛋白上的 Glu-Ala 切除不完全。

本研究得到的基因工程菌在最佳条件下摇瓶诱导表达上清中的 pEGF 可达  $82 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此, 该基因工程菌是一个能高表达的工程菌, 这可能与该基因工程菌中的 pEGF 基因的密码子是毕赤酵母使用频率最高的密码子以及基因工程菌是多拷贝整合转化子有关。

#### 3.2 对表达产物的纯化

为了便于靶蛋白的纯化, 构建表达载体时在 pEGF 基因的下流加上了编码 6 个组氨酸标签的 DNA 片段。因此基因工程菌的诱导表达上清过 Ni-NTA 亲和柱后, 靶蛋白纯度较高 (图 4)。而且从表达产物对 BALB/c 3T3 成纤维细胞的增殖作用来看, pEGF 的羧基端的 6 个组氨酸并没有明显地影响其生物活性。这与用大肠杆菌表达的 6-His-pEGF 不影响其对卵泡的激活作用<sup>[11]</sup>相似。

#### 3.3 SDS-PAGE 靶蛋白分子量偏大的原因

当用普通的 SDS-PAGE 电泳检测多拷贝转化子的诱导表达上清中的靶蛋白时, 没有观察到分子量小于 10 kD 的条带, 而采用三羟甲基甘氨酸 (Tricine) -SDS-PAGE 电泳<sup>[23]</sup>可以观察到在 6~14.4 kD 之间出现一条明显的蛋白条带 (图 3)。但是图 3 中观察到的靶蛋白分子量明显大于 pEGF-6His 及 Glu-Ala-pEGF-6His 的理论值 (分别为 6.97 kD, 7.17 kD), 而且在 western blotting 中也观察到表达产物分子量非常接近 11 kD (图 5)。这种现象在其它文献中也有报道<sup>[24,25]</sup>。其中唐威华用质谱验证了含有 His-tag 的融合蛋白质在 SDS-PAGE 中分子量比实际分子量大, 而且根据 SDS-PAGE 的原理, 对此现象进行了解释: SDS-PAGE 利用被分析的蛋白质在加热变性后, 与 SDS 成带负电荷的粒子, 在电场作用下向阳极运动, 并根据电泳后蛋白质泳动的距离来推算其分子量; 而含有 His-tag 的融合蛋白质由于含有 6 个带正电荷的组氨酸, 造成其在 SDS-PAGE 中迁移变慢, 从而导致 SDS-PAGE 观察的分子量比理论值大<sup>[24]</sup>。此外, Lee 等用毕赤酵母表达系统表达的没有 6 个组氨酸标记的 pEGF, 在 SDS-PAGE 以及 western blot 分析图片中, pEGF 的分子量大小与氨基酸序列推断的分子量相一致<sup>[8]</sup>。因此本研究 SDS-PAGE 以及 western blot 分析图片中观察到的靶蛋白分子量偏大的现象很有可能是由

6 个组氨酸标记所致。

## 4 结 论

4.1 本研究利用在毕赤酵母中使用频率高的密码子合成了 pEGF 基因。用该基因构建的分泌型表达载体 pPIC9-pEGF 电转化导入毕赤酵母后,通过放射性同位素随机引物标记法筛选了多拷贝 pPIC9-pEGF 整合的基因工程菌。

4.2 对工程菌的表达产物,用 His-tag 亲和层析纯化方法可使重组 pEGF 的纯度达到 95%以上。

4.3 本研究获得的基因工程菌所表达的重组 pEGF 具有很高的生物学活性。

## References

- [1] Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237: 1555-1562.
- [2] Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, 1975, 257: 325-327.
- [3] Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 1979, 48: 193-216.
- [4] Jaeger L A, Lamar C H, Cline T R, Cardona C J. Effect of orally administered epidermal growth factor on the jejunal mucosa of weaned pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 1990, 51: 471-474.
- [5] Black D D, Ellinas H. Apolipoprotein synthesis in of diarrhoea in newborn piglet intestinal explants. *Pediatric Research*, 1992, 32: 553-558.
- [6] James P S, Smith M W, Tivey D R, Wilson T J G. Epidermal growth factor selectively increases maltase and sucrase activities in neonatal piglet intestine. *Journal of Physiology*, 1987, 393: 583-594.
- [7] Xua R J, Wang F, Zhang S H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. *Livestock Production Science*, 2000, 66: 95-107.
- [8] Lee D N, Kuo T Y, Chen M C, Tang T Y, Liu F H, Weng C F. Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets. *Life Sciences*, 2006, 78: 649-654.
- [9] Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, Rieke A, Prather R S, Day B N. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 51: 395-401.
- [10] Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, Rieke A, Murphy C N, Prather R S, Day B N. Development and viability of pig oocytes maturation in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 2000, 54: 787-797.
- [11] Lee V H, McGlore J J. Regulation of vertebrate ovarian maturation and function using growth factors. United States Patent, 2001, Patent No. US 6, 300, 311 B1.
- [12] McGlone J J, Anderson D L, Vaughan H L. Prepubertal administration of porcine Epidermal Growth Factor increases litter size. Southern Section ASAS Meeting. 2003. [http://www.depts.ttu.edu/porkindustryinstitute/research/pEGF\\_in\\_vivo\\_abstract\\_v2.htm](http://www.depts.ttu.edu/porkindustryinstitute/research/pEGF_in_vivo_abstract_v2.htm). 2003.
- [13] Smith J, Cook E, Fotheringham I, Pheby S, Derbyshire R, Eaton M A, Doel M, Lilley D M, Pardon J F, Patel T, Lewis H, Bell L D. Chemical synthesis and cloning of a gene for human beta-urogastrone. *Nucleic Acids Research*, 1982, 10: 4467-4482.
- [14] Oka T, Sakamoto S, Miyoshi K, Fuwa T, Yoda K, Yamasaki M, Tamura G, Miyake T. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82: 7212-7216.
- [15] Tong W Y, Yao S J, Zhu Z Q, Yu J. An improved procedure for production of human epidermal growth factor from recombinant *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57: 674-679.
- [16] Soler L F, Cedano J, Querol E, de Llorens R. Cloning, expression and purification of human epidermal growth factor using different expression systems. *Journal of Chromatography B*, 2003, 788: 113-123.
- [17] Ebrahimi-Rad M, Azarmoosh M, Bashir A, Bakayev V V. A novel vector for expression/ secretion of properly folded eukaryotic proteins: a comparative study on cytoplasmic and periplastic expression of human epidermal growth factor in *E.coli*. *Iranian Biomedical Journal*, 2004, 8(2): 51-61.
- [18] Yamagata H, Nakahama K, Suzuki Y, Kakinuma A, Tsukagoshi N, Udaka S. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86: 3589-3593.
- [19] Clare J J, Romanos M A, Rayment F B, Rowedder J E, Smith M A, Payne M M, Sreekrishna K, Henwood C A. Production of epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991, 105: 205-212.
- [20] 黄秉仁, 蔡良婉, 王 欣, 马雪梅, 马晓骊, 李旌军, 李红卓, 韦忠明, 梁 青, 郑华军, 唐琪浩, 唐申秀, 廖洪涛, 向绪传. 甲基营养型酵母系统表达的重组人表皮生长因子的纯化及其性质. 中国医

- 学科学院学报, 2001, 23(2): 106-110.
- Huang B R, Cai L W, Wang X, Ma X M, Ma X L, Li J J, Li H Z, Wei Z M, Liang Q, Zheng H J, Tang Q H, Tang S X, Liao H T, Xiang X Z. Purification of recombinant hEGF expression in yeast *Pichia pastoris*. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2001, 23(2): 106-110. (in Chinese)
- [21] Heo J H, Won H S, Kang H A, Rhee S K, Chung B H. Purification of recombinant human epidermal growth factor secreted from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Protein Expression and Purification*, 2002, 24: 117-122.
- [22] Pascall J C, Jones D S, Doel S M, Clements J M, Hunter M, Fallon T, Edwards M, Brown K D. Cloning and characterization of a gene encoding pig epidermal growth factor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1991, 6: 63-70.
- [23] Chagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166: 368-379.
- [24] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 洪孟民. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因. *植物生理学报*, 2000, 26(1): 64-68.
- Tang W H, Zhang J L, Wang Z Y, Hong M M. The cause of deviation made in determining the molecular weight of his-tag fusion proteins by SDS-PAGE. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2000, 26(1): 64-68. (in Chinese)
- [25] Niu X, Guiltinan M J. DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22 (23): 4969-4978.

(责任编辑 高 雨)