

Experimental Technology of Genetic Engineering, 2nd. Changsha: Hunan Scientific Publishing House), 1997. 170~ 173

- 5 Cusi D, Binchi G. Renal mechanisms of genetic hypertension: from the molecular level to the intact organism. *Kidney Int*, 1996, 49 (6): 1754~ 1759

Differential Display Analysis of Gene Expression in Kidneys of SHR and WKY Rats. LI Xin-Bo, ZHU Yi-Chun, YAO Tai (*Department of Physiology, State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*).

Abstract In order to observe the difference in gene expression in the kidney of SHR and WKY rats, mRNA differential display was undertaken to screen differently expressed genes in the kidney of SHR and

WKY rats aged 12 weeks by using T11G and AP6 primer. One cDNA fragment was identified in the kidney of SHR and was selected as interesting band. The techniques of T-A cloning, Northern hybridization, *in situ* hybridization and sequencing of the recombinant plasmid were used to determine the characteristics of differentially displayed cDNA fragment. The results indicate that it contains 170 base pairs and the incidence of homology with known genes is less than 80%, it was located in the renal tubule of SHR and no positive signal was found in the kidney of WKY.

Key words spontaneously hypertensive rat (SHR), mRNA differential display analysis, kidney

甲醇酵母 *Pichia pastoris* 高水平表达 有活性的辣根过氧化物酶

蒋太交 吉鑫松 章如安 黄艳红 吴祥甫 袁中一¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 表达有活性的辣根过氧化物酶 (HRP) 不仅可以深入揭示 HRP 结构与功能及其生理作用规律, 而且为 HRP 的广泛需要提供新的来源. 为了在甲醇酵母 *P. pastoris* 中成功表达, 将编码 HRP-C 成熟肽的 cDNA 构建到 pPIC9 上, 再转化到 *P. pastoris* 中, 筛选到了分泌表达非糖基化 HRP 和高糖基化 HRP (分子质量超过 100 ku) 两种主要产物的重组细胞株. 优化表达条件, 目标产物在摇瓶发酵液中高效表达, 可达 4~ 6 g/L. 并且直接从发酵液中可获得具有活性的高糖基化 HRP, 每毫升发酵液中酶活力约有 2 U, 经初步的纯化 HRP 具有最大吸收峰 403 nm.

关键词 辣根过氧化物酶, *Pichia pastoris*, 高糖基化
学科分类号 Q78

无论从应用还是从理论研究角度看, 辣根过氧化物酶 (HRP) 是一种非常重要的酶. 在理论上 HRP 的结构和功能已得到较为广泛和深入的研究, 而且仍是传统研究的素材; 另一方面, HRP 在临床、酶联免疫分析和组织化学中作为蛋白质的示踪剂而得到了普遍应用^[1]. 通常分离得到的并加以应用的天然 HRP 由多种同工酶组成. 要充分了解 HRP 的结构与功能, 就必须得到大量单一组分的酶. HRP 基因克隆与表达为 HRP 结构与功能的研究提供了新的来源, 特别是在微生物中表达天然 HRP 同工酶基因有助于揭示 HRP 各种同工酶的生理作用及它们之间的关系. 但 HRP 的表达是一个具有挑战性的工作. 它含有四对二硫键、一个血红

素辅基和两个钙离子, 且为糖蛋白^[1].

甲醇酵母 *Pichia pastoris* 是近年兴起的真核表达系统^[2], 和细菌相比, 它可以实施真核生物的加工过程, 例如蛋白质的糖基化、二硫键正确形成和蛋白质折叠等. 与 *Saccharomyces cerevisiae* 比较, *Pichia pastoris* 更适于表达真核蛋白, 它比前者更好地分泌外源蛋白. 迄今为止, 许多活性蛋白质用 *P. pastoris* 大量表达, 而且有效地分泌到胞外.

我们将天然辣根中克隆到的编码 HRP-C 成熟肽的 cDNA 构建到 pPIC9 上, 再转化到 *Pichia* 中, 获得的表达产物为非糖基化的 HRP 和高糖基化的

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-10-13, 修回日期: 1999-01-29

HRP (分子质量超过 100 ku), 并没有获得适度糖基化的 HRP. 直接从发酵液中可获得高糖基化并具有活性的 HRP, 每毫升发酵液酶活为 2U.

1 方法和材料

1.1 试剂和培养基

抗天然 HRP 抗体自制, 其他试剂及培养基见 Invitrogen *Pichia* 操作手册.

1.2 菌株和培养条件

pPIC9 及宿主菌 GS115 来自 Invitrogen. pPIC9 及重组质粒 pPIChrp 扩增均在 *E. coli* JM109 中进行. 培养条件为 LB 培养基, 含 AP⁺ 100 mg/L, 37℃. 酵母的培养基为 YPD 或 BMGY, 30℃.

1.3 质粒的构建、菌株的筛选和表达产物的检测

见 Invitrogen *Pichia* 操作指南.

1.4 蛋白质含量和糖含量测定

分别按文献 [3] 所述的 Lowry 法和文献 [4] 所述的酚-硫酸法进行测定.

1.5 重组 HRP 活性测定

2, 2'-连氮-双-(3-乙基带并噻唑啉磺酸) (ABTS) 为底物. 在 250 μ l 0.2 mol/L pH 5.0 乙酸钠缓冲液中加入 13 μ l 15 mmol/L ABTS, 样品和双蒸水至 463 μ l, 25℃保温数分钟, 再加入 37 μ l

0.1 mol/L H₂O₂ 起始反应. 25℃下, 在 Beckman DU 7000 测量 405 nm 光吸收增加, 酶活性以单位时间内 (每分钟) 每毫升发酵液或每毫克蛋白质使 ABTS 氧化产物形成的微摩尔数表示, 即表示为 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ (或 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). ABTS 氧化产物摩尔吸光数为 36 800 L $\cdot$ mol⁻¹ $\cdot$ cm⁻¹.

2 结 果

2.1 表达载体的构建与重组菌株的筛选

hrp/pPIC9 构建见图 1. pPIC9 利用 α 因子分泌信号的 8 023 bp 的融合载体. 它在 *Pichia* 中利用 HIS4 作选择标记. pAOX1 的读码从 *EcoR* I 指向 *Not* I. 序列测定表明克隆的 hrp_c 基因阅读框与信号序列的起始密码子的读码框一致, 从而保证了正确表达 (图 1). 分别用 *Bgl* II、*Sal* I 线性化 hrp/pPIC9, 电转化入 GS115. 电转化的细胞在 30℃生长 4~6 d 至大小适中的单菌落. 按照前述方法进行表型筛选.

高效表达菌株的筛选很重要. 我们分别挑选了五六十个表型为 Mut^s 和 Mut⁺ 的单菌落, 按照前述条件进行诱导表达. 表达结果直接通过 SDS-PAGE, 银染检测. 最终我们获得了高效表达的菌株, 其表型为 Mut⁺. 以后的实验均使用该菌株.

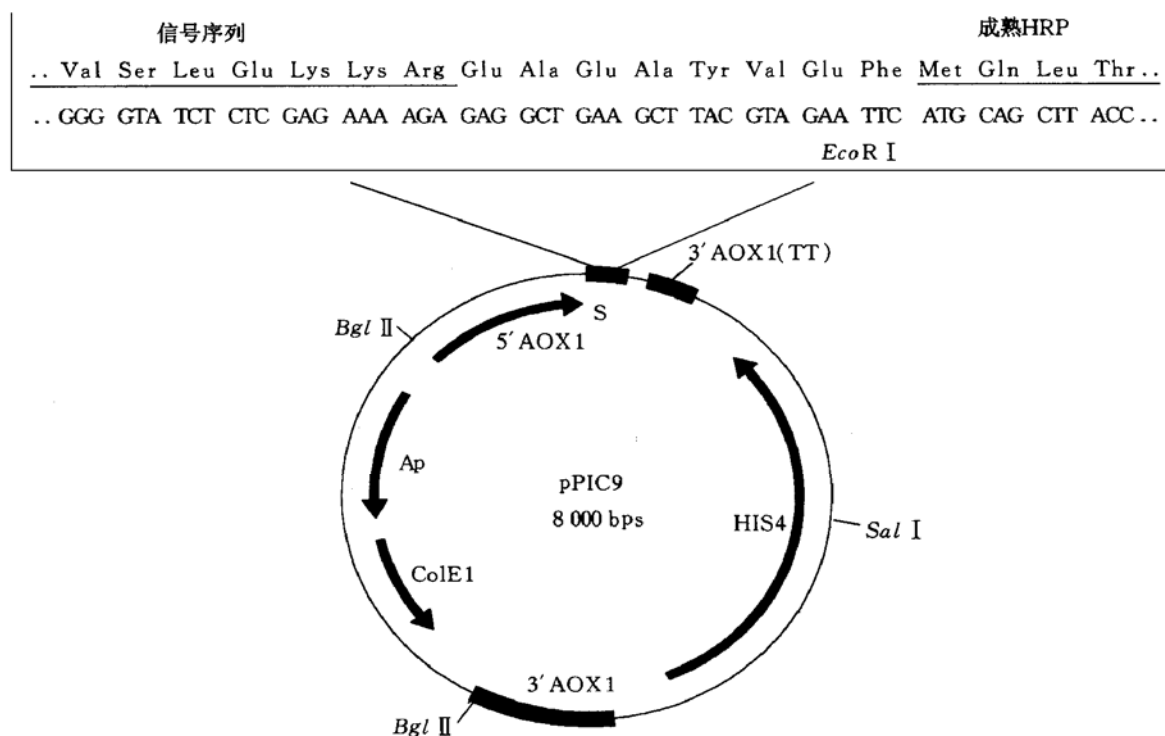


图 1 HRP 表达载体的构建

图示了 *P. pastoris* 表达载体 pPIC9 及其 5' 克隆位点, 酵母 α 因子的部分信号序列和重组质粒的成熟 HRP 起始氨基酸.

2.2 HRP 的高效分泌表达

在适宜表达条件下, 已经成功地诱导重组甲醇酵母表达两种分子质量差别很大的产物. 一种产物的分子质量为高于 30 ku, 另一种分子质量高于 100 ku (图 2). 免疫印迹发现只有 30 ku 的表达产物与抗 HRP 抗体有明显的免疫交叉反应, 而分子质量高于 100 ku 的表达产物没有免疫交叉反应 (数据未发表). 经过糖含量测定, 发现前者是 HRP 非糖基化产物, 后者糖含量约是多肽含量的 1.5 倍, 为高糖基化产物. 图 2 是不同时间取样获得的表达产物, 发现在我们优化条件下, 6 h 即有非糖基化产物的大量表达, 12 h 后基本完全消失, 但高糖基化产物稳定存在.

在摇瓶发酵中, 优化表达条件 (结果未发表), 目标产物高效表达, 约为 4~6 g/L.

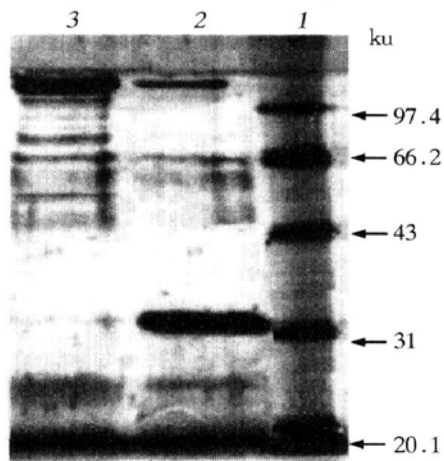


图 2 重组 *P. pastoris* 分泌表达产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1: 蛋白质分子质量标准; 2, 3: 分别诱导 6 h, 12 h 后的分泌产物.

2.3 直接表达有活性的辣根过氧化物酶

在 BMMY 培养基中加入 5 mmol/L CaCl_2 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 氯高铁血红素 (hemin), 诱导 24~36 h 后收集发酵液. 上清液按前述方法测活, 以没有加 CaCl_2 和 hemin 的表达样品作对照, 明显发现发酵液中有高的酶活力, 为 2.24 U/ml. 样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色检测, 结果只发现高糖基化蛋白高效表达, 而且其他杂蛋白很难检测到.

2.4 重组高糖基化 HRP 的特征吸收光谱

诱导表达出有活性 HRP 发酵上清液直接流过 Sephadex G50, 以双蒸水洗脱, 收集样品. 以双蒸水为对照, 样品在 Beckman DU 7000 上进行波长扫

描, 发现此蛋白在 403 nm 处有特征吸收峰, 见图 3, 显然与天然 HRP 的吸收峰位置相同.

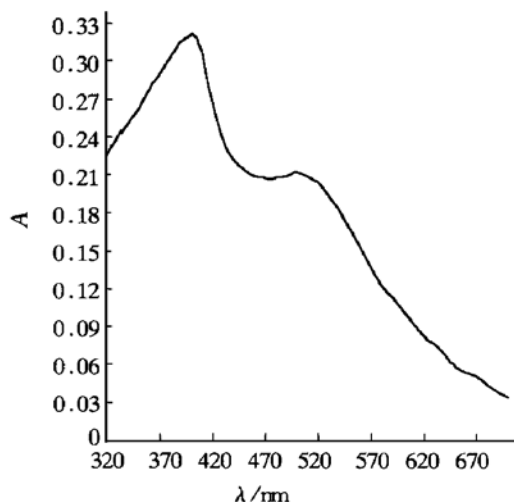


图 3 重组 HRP-C 的吸收光谱

$\lambda_{\text{max}} = 403 \text{ nm}$.

3 讨 论

我们首次成功地在微生物中表达了天然 HRP 同工酶基因, 并且直接获得了有活性的酶. 在微生物中的成功表达有活性辣根过氧化物酶不仅对深入揭示含金属蛋白的结构与功能及其应用具有非常重要的意义, 而且为我们进一步了解 HRP 各种同工酶的生理功能及它们之间的关系开辟了一个新的道路. 然而, 表达有活性的 HRP 本身就是很有意义并具有挑战性的工作. 它含有四对二硫键、一个血红素辅基和两个钙离子, 且为糖蛋白. 迄今 HRP 基因的表达绝大多数均为根据细菌偏爱的密码子人工合成的 HRP-C 基因, 在大肠杆菌中高效表达后, 通过重折叠、复性得到有活性的 HRP^[5~8]. 我们利用 RT-PCR 技术从天然植物辣根中克隆到了这个基因. 同时探索了天然 HRP-C 基因在细菌中的表达. 结果未能在大肠杆菌中有效表达天然 HRP-C 基因, 也没有获得有活性的辣根过氧化物酶 (待发表). 因此我们又选择甲醇酵母 *P. pastoris* 表达体系以解决这个难题. 将该基因构建到分泌型表达载体 pPIC9 上, 转化入 GS115, 筛选到了 Mut^+ 表型的高效表达菌株. 在发酵液中直接添加 CaCl_2 与 hemin, 得到了有活性的辣根过氧化物酶, 每毫升发酵液酶活力 2.24U. 分离到的样品在 403 nm 有明显的吸收峰, 与天然 HRP 的吸收峰位置相同.

适宜表达条件下, 获得了非糖基化与高糖基化产物. 通常认为, 在甲醇酵母 *P. pastoris* 表达体系可能进行适度糖基化^[2], 然而在我们实验中并

没有得到适度糖基化的表达产物。由于糖基化与非糖基化产物均为分泌表达, 说明了糖基化并非分泌所必需。但在实验中, 很难得到稳定的非糖基化产物, 而糖基化产物相当稳定, 即使将含有该蛋白的发酵液置于室温 2~3 d, 蛋白质未见明显降解。显然糖基化虽并非分泌必需, 但它对蛋白质的稳定有重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Dunford H B. Horseradish peroxidase: structure and kinetics. In: Everse J, Everse K E, Grisham M B, eds. Peroxidases in Chemistry and Biology, 2. Boca Raton: CRC Press, 1991. 1~24
- 2 Hollenberg C P, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. Curr Opin Biotech, 1997, 8 (5): 554~560
- 3 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社 (Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. Methods and Techniques in Biochemistry, Beijing: Advanced Education Press), 1982. 165~166
- 4 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956, 28 (3): 350~356
- 5 Smith A T, Santama N, Daycey S, et al. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. J Biol Chem, 1990, 265 (22): 13335~13343
- 6 Ortlepp S A, Pollard-Knight D, Chiswell D J. Expression and characterisation of a protein specified by a synthetic horseradish peroxidase gene in *Escherichia coli*. J Biotech, 1989, 11 (4): 353~364
- 7 Egorov A M, Gazaryan I G, Savelyev S V, et al. Horseradish peroxidase gene expression in *Escherichia coli*. Annals New York Academy of Sciences, 1991, 646: 35~40
- 8 Egorov A M, Gazaryan I G, Kim B B, et al. Horseradish peroxidase isozyme C: a comparative study of native and recombinant enzyme produced by *E. coli* transformants. Annals New

York Academy of Sciences, 1994, 721: 73~81

High-level Expression of Active Horseradish Peroxidase in Methylotrophic Yeast. JIANG Tai-Jiao, JI Xin-Song, ZHANG Ru-An, HUANG Yan-Hong, WU Xiang-Fu, YUAN Zhong-Yi (Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Expression of active horseradish (*Armoracia rusticana*) peroxidase (HRP) in microbes is necessary not only to gain an insight into its mechanisms, structure and function, and physiological role in plants, but also to supply large quantities of this useful enzyme. Exploiting new approach to express HRP in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, the cDNA coding for mature HRP isozyme C was subcloned into the vector pPIC9. After transformation, the recombinant *P. pastoris* strain which secreted nonglycosylated HRP (about 30 ku) and hyperglycosylated HRP (about 100 ku) was obtained. Through optimization of the growth conditions, the hyperglycosylated HRP as the sole product was secreted into fermentation broth and reached a level of approximately 4~6 mg per ml of culture medium. Remarkably, a certain activity of 2.24 U/ml was determined in the fermentation broth and showed the maximum absorbance at 403 nm.

Key words horseradish peroxidase (HRP), *Pichia pastoris*, hyperglycosylation

金黄地鼠视皮层 17、18 区乙酰胆碱阳性神经元*

李俊凤 吴奇久

(中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放研究实验室, 北京 100101)

摘要 利用乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 自身抗体对金黄地鼠视皮层 17、18 区乙酰胆碱阳性神经元及其分布进行免疫学显示并进行量化分析。实验发现, Ach 阳性细胞大部分为非锥体神经元, 也有少量锥体神经元。Ach 阳性神经元在视皮层的 II~VI 层, 主要分布在 II~IV 层。在不同层次中其阳性神经元类型存在某些差异, II~IV 中双极细胞居多, 其他层次中多极细胞占优势。17 区的这类神经元数量较多且集中成垂直于皮层表面的细胞带, 18 区的神经元数量相对较少且多呈分散状态。

关键词 视皮层, 乙酰胆碱, 免疫组织化学, 神经元

学科分类号 Q421

* 中国科学院重大项目“神经科学前沿课题的开拓”资助项目 (9002KP85-2-4)。 收稿日期: 1998-10-16, 修回日期: 1999-01-04