

人白介素-6 表达质粒的 构建及在酿酒酵母中的表达

宋 磊, 李新国

(1. 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘 要: 将带有哺乳动物细胞信号肽的人白细胞介素-6(hIL-6)基因片段构建到大肠杆菌-酵母细胞穿梭型质粒 pYES2 中, 获得表达质粒 pYES2-hIL-6. 另外, 将表达质粒 pYES2-hIL-6 转化到酿酒酵母细胞 DBY747 中, 并将获得的转化子在含 2% 乳糖的 YP 培养基中培养到 $OD_{600} = 1.0$ 左右, 后用 2% 的半乳糖进行了诱导表达. 结果发现, 在培养上清中发现人白介素-6 的分泌.

关键词: 人白介素-6; 酿酒酵母; 质粒构建; 表达

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2003)04-0073-04

0 引 言

利用大肠杆菌表达系统来生产 hIL-6 的技术研究已比较成熟, 并已达到医学临床研究阶段. 而用酵母等真核细胞来做表达宿主的研究和开发则很少, 并尚未发现用 hIL-6 的编码前序列为分泌信号肽在酵母细胞中分泌表达 hIL-6 的报道^[1~4]. 因此本文大胆尝试用 hIL-6 基因本身的前导序列作为分泌信号肽, 构建了酿酒酵母表达质粒 pYES2-hIL-6, 试图在酵母细胞中表达、分泌 hIL-6.

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株与质粒

pYES2 质粒结构:

```
5'-TAA TACGACTCAC TATAGGGAAT
ATTAAAGCTTG GTACCGAGCT CCGATCCACT AGTAACGGCC
GCCAGTGTGC TGGAAATCTG CAGATATCCA TCACACTGGC
GGCCGCTCGA GCATGCATCTAGA-3'
```

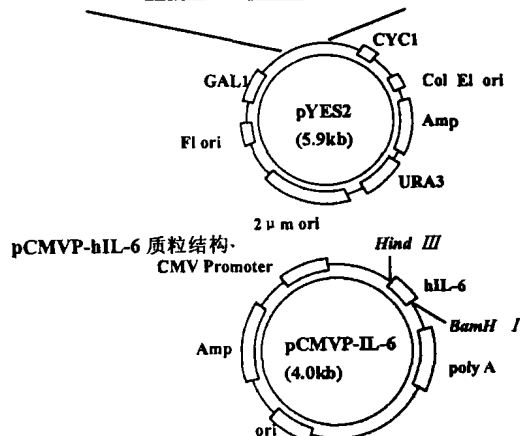


图 1 质粒结构

收稿日期: 2003-04-02

基金项目: 上海教委科技发展基金(2000 D11); 上海师范大学校青年基金(2001 DQ115)

作者简介: 宋磊(1972-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院讲师; 李新国(1959-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

质粒扩增菌:大肠杆菌(E. coli)JM 109
 宿主菌:酵母细胞(S. cerevisiae)DBY747
 质粒:pYES2(5.9Kb)
 pCMVP-hIL-6(4.0Kb) (图 1)

由日本九州大学遗传资源细胞制御研究室 Shirahada 教授惠赠.

1.2 方法

- (1) 质粒的构建(图 2)^[5,6].
- (2) 酵母细胞的转化^[7].

(3) 在酵母细胞中的表达:将保存的转化后的酵母细胞涂布在包含有选择性培养基的平皿上,静置,30℃,过夜.取一个克隆,悬浮于加入 2mL 20%乳糖的 20mL YP 培养基中,震荡,30℃,过夜.取 10~20mL 培养液加到加入有 20mL 20%乳糖的 200mL YP 培养基中(OD₆₀₀ = 0.2 左右)震荡,30℃,大约 5h,当 OD₆₀₀ = 1.0 左右时,加入 20mL 的 20%半乳糖,震荡,30℃,诱导培养 8~30h.

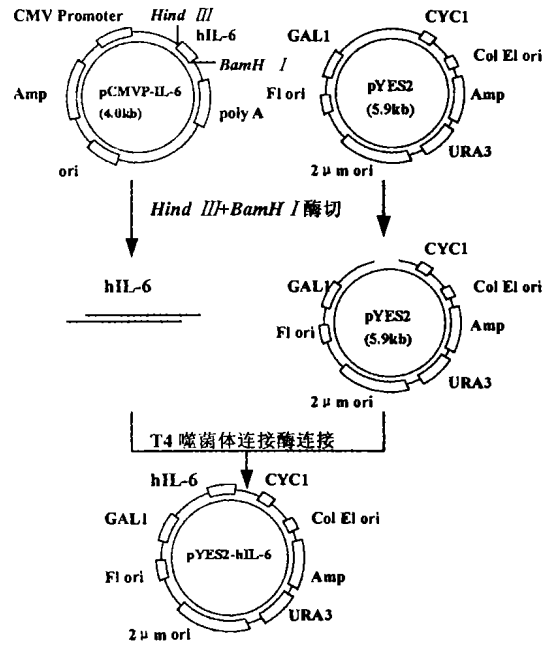
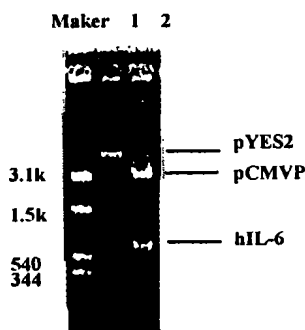


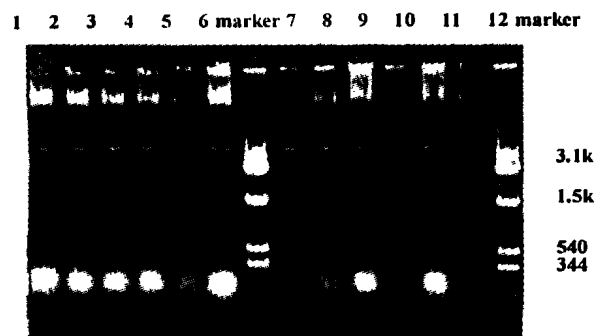
图 2 质粒构建简图

2 实验结果与讨论

将一定量的 pYES2 和 pCMVP-hIL-6 分别进行 HindIII 和 BamHI 酶切,然后进行琼脂糖电泳(图 3).将 pYES2 和 hIL-6 酶切片段分别回收,再连接.上述连接产物 pYES2-hIL-6 转化到事先制备的 E. coli 感 1 受态细胞中,经过培养得到转化子,然后从中随机选取若干个单菌落,处理后进行琼脂糖电泳(图 4),发现每个泳道都或多或少出现了条带.选取 8 号和 9 号转化子经过 DNA 小量制备并酶切之后,观察到 5.9Kb 的 pYES2 片段和 700bp 的 hIL-6 片段清晰可见,证明构建基本成功(图 5).



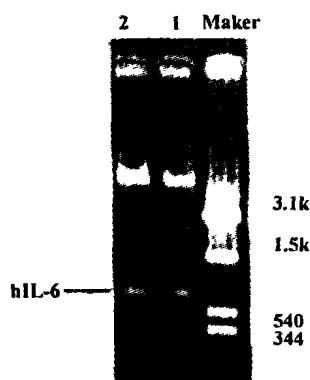
1: pYES2 酶切片段
 2: pCMVP-hIL-6 酶切片段
 图 3 pYES2 构建片段与 hIL-6 基因片段的酶切图谱



1-12: 12 个转化子序号
 图 4 质粒 DNA 的初步鉴定

将转化的酵母细胞进行诱导表达,每隔 6 h 取样,上清用 SDS-PAGE 的方法进行电泳,然后进行银染,结果见图 6.从图谱中可以看到第 4,5 泳道出现了外源蛋白的分泌.从上述结果来看,外源蛋白在酵母细胞中得到了表达,而且得到了一定程度的分泌.

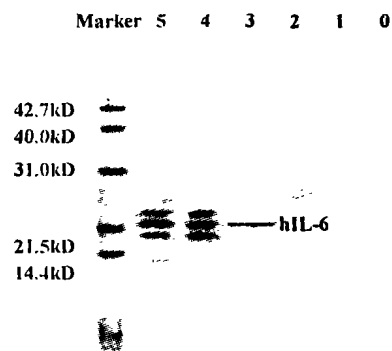
综合分析此次外源蛋白在酵母细胞中表达、分泌的情况与其他文献报道发现,宿主-载体的匹配是很重要的问题,据文献[8]报道相同的质粒在不同的酿酒酵母宿主内分泌的情况有明显的差别,外源蛋白有的完全不分泌而停留在周质空间,有的部分分泌到胞外,有的绝大部分分泌到胞外.



1: 8号转化子质粒 DNA 酶切图谱

2: 9号转化子质粒 DNA 酶切图谱

图 5 质粒 DNA 电泳鉴定



0: 诱导前培养基上清样品

1,2,3,4,5: 诱导时间为 6、12、18、24、30 小时培养基上清

图 6 培养基上清的 SDS-PAGE 电泳图谱

现在研究得最清楚的酵母细胞自身信号肽为 MF- α 因子^[3,4].在酵母基因组中, α 因子多肽编码区重复四次,每一重复之间有编码间隔肽(Spacer peptide)的序列,其中有 lys arg(AAA AGA),接下来是编码 2-3 个二肽 glu ala 或 asp ala 的序列.形成 α 因子多肽的加工过程包括 3 个步骤:

- (1)用 Cathelin B 或胰蛋白酶样的酶在 lys arg 后切割.
- (2)N-末端的二肽用二肽氨肽酶(Dipeptidylaminopeptidase)切除.
- (3)C-末端的碱基用羧肽酶 B(Carboxypeptidase B)去除.

利用 α 因子的启动子和分泌信号肽已经表达和分泌了多种外源基因蛋白,尽管表达水平相差很大,但是一般都能得到比较好的分泌.此过程中二肽氨肽酶作用步骤是一个限制加工的因素,如果把编码成熟蛋白质的序列连接于 lys arg(AAA AGA)之后,这样加工过程就不需要二肽氨肽酶的作用了,得到的就是结构正确的成熟蛋白质产物.哺乳动物的分泌信号肽并不是以 lys arg(AAA AGA)结尾的,所以可能得不到正确的加工,也没能得到很好的分泌.

参考文献:

- [1] 得永正雄. 酵母おにはる蛋白质输送・分泌生产[J]. 化学と生物,1995,33(7):427-436.
- [2] 刘峰,霍克克,李育阳. 非常规酵母基因工程表达系统[J]. 生物工程学报,1996,12(1):1-5.

- [3] 杨立宏,韩丽英,陈长庆,等. 人白介素-3 基因在酿酒酵母中的分泌表达[J]. 生物工程学报,1996,12(2):183-188.
- [4] 李育阳. 外源基因在酵母中表达产物的分泌[J]. 生物工程学报,1987,3(2):81-85.
- [5] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第2版)[M]. 北京:科学出版社,1992. 19-55.
- [6] 余沛涛,等. 农杆菌对丝石竹的基因转化[J]. 上海师范大学学报,1996(4): 90.
- [7] 毛小洪,蔡金科. 酵母完整细胞快速高效转化法[J]. 生物工程学报,1990,6(2):905-910.
- [8] LI Xin-liang, LARS G Ljungdahl. Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and Secretion of the Xylanase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(1):209-213.

Construction of Human Interukin-6 Plasmid and Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*

SONG Lei, LI Xin-guo

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The fragment of human interleukin-6 (hIL-6) with a mammalian signal peptide was constructed into the shuttle plasmid pYES2 between *E. coli* and Yeast, resulting in an expression plasmid pYES2-hIL-6. Thus the plasmid pYES2-hIL-6 was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* cells DBY747. The transformant was cultured in YP culture media with 2% lactose, to which 2% galactose was introduced for expression when the OD value at 600 nm reached 1.0. Only a slight hIL-6 was secreted into the culture broth, while most of the protein was found in the Yeast cells.

Key words: human interleukin-6; *Saccharomyces cerevisiae*; plasmid construction; expression