

【研究简报】

文章编号: 1000-7423(2013)-01-0073-03

白纹伊蚊唾液三磷酸腺苷二磷酸酶在毕赤酵母中的分泌表达

吴松泉^{1*}, 王光丽¹, 雷永良², 张凯波¹

【提要】 采用 RT-PCR 技术克隆编码白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 唾液三磷酸腺苷二磷酸酶 (apyrase) 的成熟肽 cDNA 序列, 并克隆至毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 组成型分泌表达载体 pGAPZ α -A 的 α -factor 信号肽序列的下游, 构建 pGAPZ α -A-apyrase 重组分泌表达载体。表达载体经 *Bln* I 线性化处理电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 转化子经 Zeocin 抗性筛选和菌落 PCR, 成功构建了 pGAPZ α -A-apyrase/GS115 工程菌。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果显示, pGAPZ α -A-apyrase/GS115 的工程菌分泌表达了相对分子质量 (M_r) 约为 60 000 的重组 apyrase 蛋白。

【关键词】 白纹伊蚊; ATP-二磷酸酶; 毕赤酵母; 表达

中图分类号: R384.113 文献标识码: B

Secretory Expression of Salivary ATP Diphosphohydrolase (Apyrase) from *Aedes albopictus* in *Pichia pastoris*

WU Song-quan^{1*}, WANG Guang-li¹, LEI Yong-liang², ZHANG Kai-bo¹

(1 Medical College, Lishui University, Lishui 323000, China; 2 Lishui Center for Disease Control and Prevention, Lishui 323000, China)

【Abstract】 The gene-coding mature apyrase protein from *Aedes albopictus* was amplified by RT-PCR and cloned in frame with the α -factor secretion signal peptide into *Pichia pastoris* secreting expression vector pGAPZ α -A resulting in the pGAPZ α -A-apyrase. After being linearized by *Bln* I restriction enzyme, the recombinant pGAPZ α -A-apyrase was trans-formed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. Recombinant strains pGAPZ α -A-apyrase/GS115 were screened on YPDS plates containing Zeocin and identified by PCR. The recombinant protein of apyrase (M_r 60 000) has been expressed in the supernatant of *Pichia pastoris*.

【Key words】 *Aedes albopictus*; Apyrase; *Pichia pastoris*; Secreted expression

* Corresponding author, E-mail: lswsq163@163.com

白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 是广泛分布于我国的重要家栖医学昆虫, 不仅可传播多种虫媒病毒病, 而且在吸血时, 其唾液腺分泌的唾液蛋白可导致宿主局部或全身发生强烈的变态反应性炎症^[1,2]。研究证实, 蚊虫唾液组分含有多种功能药理活性因子, 对脊椎动物宿主有抗凝血、抗炎和调节宿主免疫功能的作用, 便于促进蚊媒吸血和传播疾病^[3,4]。蚊唾液中的三磷酸腺苷二磷酸酶 (apyrase) 的功能是在吸血时将二磷酸腺苷 (ADP) 水解成一磷酸腺苷 (AMP) 和磷酸盐, 从而抑制 ADP 诱导的血小板聚集, apyrase 主要富集在雌蚊唾液中^[5-7]。本研究应用生物信息学方法寻找白纹伊蚊编码 apyrase 的序列, 克隆 apyrase 成熟蛋白基因编码序列, 构建毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 组成型分泌表达载体, 进而表达该蛋白, 可为后续纯化该蛋白和研究其在白纹伊蚊唾液中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

作者单位: 1 丽水学院医学院, 丽水 323000;
2 丽水市疾病预防控制中心, 丽水 323000
* 通讯作者, E-mail: lswsq163@163.com

1.1 蚊虫、载体和菌株 3~5 日龄白纹伊蚊为本室常规养殖, 养殖条件: 25℃、相对湿度 85%、光照 14 h/d。pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 大肠埃希菌 *E. coli* Top10F/(*recA1*, *endA1*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 (*his4*) 菌株和 pGAPZ α -A 表达载体购自美国 Invitrogen 公司。
1.2 主要试剂 TRIzol 和抗生素 Zeocin 购自美国 Invitrogen 公司, *Taq* DNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒 [RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0]、*T₄* DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA 标志物、蛋白质标志物和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 白纹伊蚊 apyrase 蛋白的生物信息学分析 根据 GenBank 中白纹伊蚊 apyrase 氨基酸序列 (GenBank 登录号为 AAV90659), 在 NCBI 网站上进行保守功能域搜索 (conserved domain search) 分析, 并利用 SignalP 4.0 Server 软件分析 apyrase 蛋白, 确定其信号肽序列的位置。

1.3.2 白纹伊蚊总 RNA 的提取和 apyrase 成熟蛋白基因的扩增 按照 TRIzol 的说明提取白纹伊蚊总 RNA。根据 GenBank 中

apyrase 基因序列 (GenBank 登录号为 AY826087), 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物用于克隆白纹伊蚊 apyrase 成熟蛋白基因 (79~1 695 bp), 上下游分别引入 *Xba* I 与 *Xho* I 酶切位点, 命名为 Apy-F: 5'-CACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGATAATATGCCCGCTGATAAGG-3'; Apy-R: 5'-GTTC-TAGATTAAAGTACATGGTGAACCTGCTTTACATAC-3', 引物合成和序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。按 RT-PCR 说明合成 cDNA 第 1 链, 再以合成的 cDNA 第 1 链为模板, Apy-F 和 Apy-R 为引物, PCR 扩增 apyrase 成熟蛋白基因片段。反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 40 个循环; 72 °C 10 min。电泳鉴定扩增产物的大小, 正确后切胶回收目的片段。

1.3.3 克隆载体的构建与鉴定 将 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后与 pMD18-T 连接, 构建克隆载体 pMD18-T-apyrase。通过转化 *E. coli* DH5 α , 并涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜, 挑取菌落, 利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 筛选出阳性克隆后送至上海英骏生物技术有限公司测序, 将测序正确的克隆载体命名为 pMD18-T-Apyrase。

1.3.4 pGAPZ α -A-apyrase 重组毕赤酵母表达载体的构建和鉴定 分别用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切重组克隆载体 pMD18-T-apyrase 和表达载体 pGAPZ α -A, 使用 T₄ DNA 连接酶连接 apyrase 基因片段和 pGAPZ α -A 线性化载体, 构建重组表达载体 pGAPZ α -A-apyrase。将重组表达载体通过 CaCl₂ 法转化 *E. coli* Top10F 感受态细胞, 在含有 25 mg/L 博莱霉素的低盐固体 LB 培养基平板上筛选重组菌。提取质粒, 用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定重组载体。将筛选的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

1.3.5 工程菌 pGAPZ α -A-apyrase/GS115 的构建和筛选 参照试剂盒手册制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 将 10 μ g 表达载体 pGAPZ α -A-apyrase 用 *Bln* I 进行线性化, 以用于电转化 GS115 感受态细胞, 转化参数为: 电压 1 500 V, 电容 25 μ f, 电击时间 10 ms。转化子在含有 300 mg/L 博莱霉素的酵母浸出粉葡萄糖琼脂平板上初筛, 28 °C 培养 2~3 d。利用 pGAPZ α -A 载体的通用引物 pGAP F: 5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3' 和 3' AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 进行菌落 PCR, 筛选阳性克隆, 反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 40 个循环; 72 °C 10 min。

1.3.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 挑取阳性酵母单菌落于含有 100 mg/L 博莱霉素的酵母浸出粉葡萄糖液体培养基中, 300 r/min, 30 °C 培养, 每隔 0、24、48、72 和 98 h 取发酵菌液样品 1 ml, 离心取上清, 进行 SDS-PAGE。

2 结果

2.1 白纹伊蚊 apyrase 保守功能域和信号肽分析 在 NCBI 站点上对白纹伊蚊 apyrase 进行保守功能域搜索分析结果表明, 该蛋白具有 1 个 CD73 即胞外-5'-核苷酸酶 (ecto-5'-nucleotidase, eN) N 端保守的金属磷酸酶 (metallophosphatases, MPPs) 结构域和一个 5'核苷酸酶的 C 端保守结构域。利用

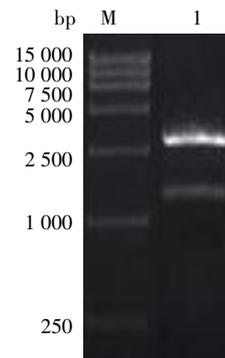
SignalP 4.0 Server 软件对推导得到的蛋白序列在线搜索, 发现在第 1~70 aa 内有 1 个信号肽, 在 26~27 aa 处为 apyrase 信号肽的断点。

2.2 白纹伊蚊 apyrase 成熟蛋白基因的克隆 RT-PCR 扩增结果显示, apyrase 成熟蛋白基因片段大小为 1 617 bp, 与预期大小一致 (图 1)。重组载体 pMD18-T-apyrase 经 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切鉴定得到的片段与预期插入片段大小一致, 初步证明克隆载体构建成功 (图 2)。测序结果表明, 所克隆获得的 apyrase 与 GenBank 所公布基因序列完全一致。



M: DNA 标志物; 1: RT-PCR 扩增产物。

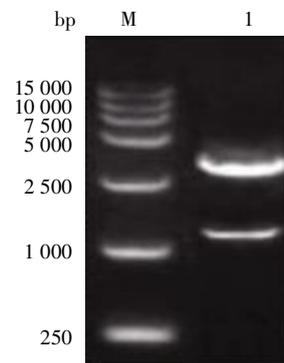
图 1 RT-PCR 扩增 apyrase 蛋白基因



M: DNA 标志物; 1: pMD18-T-apyrase 双酶切 (*Xba* I/*Xho* I)。

图 2 pMD18-T-apyrase 克隆载体酶切鉴定

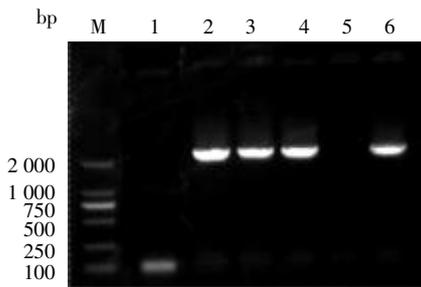
2.3 pGAPZ α -A-apyrase 毕赤酵母分泌型表达载体和鉴定 双酶切鉴定表明毕赤酵母分泌型表达载体构建成功 (图 3)。测序结果也证明 apyrase 插入位置的开放阅读框架正确。



M: DNA 标志物; 1: pGAPZ α -A-apyrase 双酶切 (*Xba* I/*Xho* I)。

图 3 pGAPZ α -A-apyrase 表达载体酶切鉴定

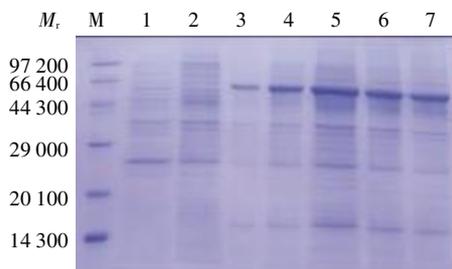
2.4 pGAPZ α -A-apyrase/GS115 重组工程菌的筛选 PCR 结果显示, 所挑取的 5 个克隆中有 4 个能扩增出预期大小的目的条带, apyrase 基因片段加载载体长约 2 010 bp (图 4), 为阳性克隆。



M: DNA 标志物; 1: 毕赤酵母 GS115 感受态细胞; 2~6: pGAPZ α -A-apyrase/GS115。

图 4 pGAPZ α -A-apyrase/ GS115 重组工程菌的筛选

2.5 重组 apyrase 在毕赤酵母中的分泌表达 分析工程菌摇瓶培养 1~5 d 的培养基上清, SDS-PAGE 结果显示, 约相对分子质量 (M_r) 60 000 处有一条与预期大小一致的重组蛋白目的条带, 而 GS115 空白对照菌无条带 (图 5)。



M: 蛋白标志物; 1: 毕赤酵母 GS115 上清 (120 h); 2: pGAPZ α -A/GS115 上清 (120 h); 3~7: pGAPZ α -A-apyrase/GS115 上清 (24、48、72、96 和 120 h)。

图 5 SDS-PAGE 分析重组蛋白 apyrase 的表达

3 讨论

蚊虫唾液组分含有约 70~100 种蛋白, 它们可能参与抗凝血、抗炎和调节宿主免疫功能, 促进病原传播^[8,9]。因此, 蚊虫唾液腺蛋白组学是近几年研究的热点, 但是大多数蛋白分子参与抗凝血与传播疾病的具体情况尚不清楚。要阐明这些蛋白组分的表达特征和功能, 获得外源表达这些蛋白对于发现新的药理活性分子或开发疫苗以阻断虫媒病的传播具有重要意义。抗血小板凝集因子 apyrase 是蚊虫唾液的重要功能因子, 能水解被吸血宿主血液中血小板释放的 ATP 和 ADP 而抑制血小板凝集, 以利吸血过程的顺利进行^[10]。本研究从白纹伊蚊中克隆了 apyrase 成熟蛋白基因编码序列, apyrase 保守功能域搜索分析结果表明, 该蛋白具有 1 个 CD73 即胞外-5'-核苷酸酶 N 端保守的金属磷酸酶结构域和 1 个 5'核苷酸酶的 C 端保守结构域, 这些结构域主要功能是水解 AMP 生成重要的生理活性物质——腺苷。

Dong 等^[2]利用大肠埃希菌表达了具有生物活性的白纹伊蚊

apyrase 成熟蛋白, 但几乎均以包涵体的形式表达, 需经过后续复杂的变性复性过程才能纯化获得具有生物活性的重组蛋白。Sun 等^[10]在杆状病毒-昆虫细胞系统亦获得具有生物活性的白纹伊蚊 apyrase 蛋白, 且表达量高达每升培养基 18 mg, 但该系统需进行昆虫细胞培养, 周期长, 实验条件要求高。毕赤酵母表达系统作为一种高效的表达系统, 在表达产物的加工、外分泌、翻译后修饰和糖基化修饰等方面有明显的优势, 不仅克服了细菌表达系统的不足, 而且能够实现高密度发酵, 在很大程度上提高重组蛋白的表达量^[11,12]。本研究选用的含有 α -factor 信号肽序列的组成型分泌表达载体 pGAPZ α -A 表达 apyrase 成熟蛋白基因 (79~1 695 bp), α -factor 在蛋白分泌到胞外的过程中会被位于毕赤酵母高尔基体上的 *Kex2* 酶清除, 当目的蛋白基因克隆于表达质粒的序列中的 *Kex2* 酶切位点之后, 可表达具有游离 N 端的蛋白。该系统无需诱导, 外源目的蛋白即可分泌表达达到发酵液中, 有利于分离纯化, 可大大降低生产成本, 因此, 本研究作为后续纯化 apyrase 和进一步研究其在白纹伊蚊唾液中的生物学功能和临床应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rezza G. *Aedes albopictus* and the reemergence of dengue [J]. BMC Public Health, 2012, 12(1): 72.
- [2] Dong F, Fu Y, Li X, et al. Cloning, expression, and characterization of salivary apyrase from *Aedes albopictus* [J]. Parasitol Res, 2012, 110(2): 931-937.
- [3] Leal DBR, Streher CA, Neu TN, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1721(1-3): 9-15.
- [4] 武卫华. 蚊唾液蛋白的研究进展 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16(3): 183-185.
- [5] Komozynski M, Wojtczak A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1310(2): 233-241.
- [6] Marinotti O, Brito M, Moreira CK. Apyrase and alphasglucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113(4): 675-679.
- [7] Hamasaki R, Kato H, Terayama Y, et al. Functional characterization of a salivary apyrase from the sandfly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major* [J]. Insect Physiol, 2009, 55(11): 1044-1049.
- [8] 姜进勇, 马雅军, 周红宁. 蚊虫的摄糖习性及其在蚊虫控制中应用的研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(1): 17-19.
- [9] 吴家红, 程金芝, 陈璐, 等. 腺苷脱氨酶、C 型凝集素及丝氨酸蛋白酶抑制剂基因在白纹伊蚊唾液腺中的表达 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(3): 190-193.
- [10] Sun DF, McNicol A, James AA, et al. Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor [J]. Platelets, 2006, 17(3): 178-184.
- [11] Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, et al. Methods Enzymol Volume 463, [M]. 2nd ed. Netherlands: Elsevier Inc, 2009: 169-189.
- [12] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270.

(收稿日期: 2012-08-24 编辑: 杨频)