

• 论 著 •

Stathmin 基因毕赤酵母表达体系的构建及鉴定^{*}

杨 铭, 林 芳, 和 婷, 董 轲, 张惠中[△]

(第四军医大学唐都医院中心实验室, 陕西西安 710038)

摘 要:目的 构建 Stathmin 基因毕赤酵母表达体系, 并对表达产物进行纯化和鉴定, 为 Stathmin 相互作用蛋白的进一步研究提供实验基础。方法 通过 PCR 方法从 SKBR3 乳腺癌细胞中扩增出人 Stathmin 基因片段, 克隆入毕赤酵母表达载体 pPIC3.5K, 构建重组载体 pPIC3.5K-Stathmin, 转化 GS115 工程菌, 经含基因素(G418)的酵母胨葡萄糖琼脂(YPD)培养基筛选出阳性克隆。用 0.5% 甲醇诱导表达, 并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western Blotting 鉴定表达产物。结果 DNA 测序结果表明, 所获基因片段与 Stathmin 基因序列一致。在含有 G418 600 $\mu\text{g/mL}$ 的 YPD 培养基上筛选出的 pPIC3.5K-Stathmin 转化子, 经 PCR 鉴定为阳性克隆。SDS-PAGE 可见约 37×10^3 处有目的条带表达, 经 Western Blotting 鉴定, 此条带为 Stathmin 蛋白。结论 成功构建了 Stathmin 酵母表达载体, 并在毕赤酵母中表达成功, 为 Stathmin 相互作用蛋白研究以及生物治疗药物的制备奠定了基础。

关键词:基因; 毕赤酵母表达体系; 鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1161-03

Construction and identification of Stathmin gene Pichia pastoris expression system^{*}

Yang Ming, Lin Fang, He Ting, Dong Ke, Zhang Huizhong[△]

(Central Laboratory, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

Abstract: Objective To provide the experimental basis for the further research of the interacting proteins with Stathmin, the Stathmin gene Pichia pastoris expression system was constructed, the expressed Stathmin product was purified and identified. **Methods** Stathmin gene was amplified from tumor cell line of SKBR3 by PCR method and cloned into the yeast expression vector pPIC3.5K. The recombinant vector pPIC3.5K-Stathmin was constructed and transformed into Pichia pastoris GS115. The positive clones were screened by YPD medium containing Geneticin 600 $\mu\text{g/mL}$. Expression was induced with 0.5% methanol and expression products were identified by SDS-PAGE and Western Blotting. **Results** DNA sequencing result showed that the gene fragment was consistent with Stathmin gene sequence, pPIC3.5K-Stathmin was selected from YPD culture medium containing Geneticin, and the positive clones were identified by PCR. SDS-PAGE showed that a 37×10^3 protein band could be seen on the PAGE gel after Coomassie Blue staining, which was further confirmed and identified as Stathmin protein by Western Blotting. **Conclusion** Stathmin yeast expression vector is successfully constructed and expressed in Pichia pastoris, which laid the foundation for the study of interacting proteins with Stathmin, and for the preparation of the biological treatment drugs of Stathmin target.

Key words: gene; Pichia pastoris expression system; identify

Stathmin 是一种高度保守的细胞质磷蛋白, 通过其磷酸化和去磷酸化高效调节细胞的增殖和分化^[1]。国内外研究均表明 Stathmin 蛋白与多种肿瘤的发生发展密切相关^[2-4], 并与肿瘤组织学分级、病情进展以及预后相关^[5]。Stathmin 被认为是潜在的肿瘤标志物和肿瘤治疗新靶点^[6]。为进一步深入探讨以 Stathmin 为靶点的应用研究, Stathmin 表达体系的建立至关重要, 而原核表达体系虽然周期短、表达产量高, 但目的蛋白常以包涵体形式表达, 导致产物纯化困难, 且原核表达系统翻译后加工修饰体系不完善, 表达产物的生物活性较低, 不能满足进一步研究的需要。所以研究者构建了 Stathmin 毕赤酵母真核表达体系, 纯化 His-Stathmin 蛋白, 为发现新的 Stathmin 拮抗蛋白和新的肿瘤生物治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pPIC3.5K 载体和 pichia host strain 购自 Invitro-

gen 公司。E. coli JM109 为本实验室保存。限制性内切酶 EcoR I、Not I、Sal I、Tap DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶, 均购自 Takara 公司。Anti-His 抗体购自中衫金桥公司, Anti-Stathmin 抗体购自 cell signaling 公司, 其他常规试剂为本实验室保存。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成; 引物序列如下: Stathmin-F: 5'-TTT TCC TTT TGC GGC CGC TTA GTC AGC TTC AGT CTC G -3', 其中下划线部分为 Notc 酶切位点; Stathmin-R: 5'-CG GAA TTC CAC CAC CAC CAC CAC CAC ATG GCT TCT TCT GAT-3', 其中下划线部分为 EcoR I 酶切位点, 波浪线部分为 His 标签。

1.2 方法

1.2.1 Stathmin 基因片段扩增 根据 GeneBank(X53305) 人 Stathmin 基因序列, 设计合成用于扩增 Stathmin 全长基因的 Stathmin-F, Stathmin-R 引物, 提取乳腺癌细胞系 SKBR3 细胞

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81372836)。 作者简介: 杨铭, 女, 检验技师, 主要从事肿瘤生物治疗研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhz328@yahoo.com.cn。

总 RNA,反转录为 cDNA 模板,常规 PCR 方法扩增 Stathmin 全长基因。反应体系按照说明书进行,PCR 反应条件为 94 ℃ 3 min,94 ℃ 40 s,53 ℃ 40 s,72 ℃ 40 s,30 个循环,72 ℃ 10 min。

1.2.2 重组 pPIC3.5K 质粒建立 用 EcoR I 和 Not I 分别双酶切全长 Stathmin 基因片段及 pPIC3.5K 载体 37 ℃,4 h。琼脂糖电泳后分别回收目标片段并纯化。将 Stathmin 基因克隆入 pPIC3.5K 载体相应位点,用氯化钙法转化入 E. coli JM109 感受态,挑取菌落,提取质粒,经双酶切和 PCR 鉴定,筛选阳性克隆命名为 pPIC3.5K-Stathmin 并且进行基因测序,确定没有突变。

1.2.3 酵母感受态的制备 挑取酵母菌 GS115 于 100 mL 酵母膏葡萄糖琼脂 (YPD) 培养基中,28 ℃,250 r/min 培养 16 h,待 OD 值达 1.0~1.5,4 000 r/min,5 min,4 ℃ 离心集菌。沉淀用 50 mL 预冷灭菌水洗涤 1 次,再用 20 mL 预冷 1 mol/L 山梨醇洗涤 1 次后,用 1 mL 山梨醇重悬后冰浴。制备成酵母菌 GS115 感受态。

1.2.4 Stathmin 酵母表达载体的构建 重组质粒 pPIC3.5K-Stathmin 用 Sal I 内切酶线性化处理,电转化法转入 GS115 感受态后,涂布于 MD 平板,28 ℃ 培养 48 h。将培养出的克隆稀释后涂布到含有 G418 分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/mL 的 YPD 平板,28 ℃ 孵育 2~3 d,筛选出高拷贝克隆。挑取单克隆至 MGY 液体培养基中,28 ℃ 培养 48 h 后提取酵母菌基因组 DNA,用 PCR 鉴定 Stathmin 与酵母基因组是否整合成功。

1.2.5 甲醇诱导表达及鉴定 取 PCR 鉴定阳性克隆接种于 5 mL BMGY 培养液中,于 28 ℃ 培养 18 h,至 OD₆₀₀ 为 2.0~6.0 时,2 000 r/min 离心 5 min 集菌,用适量 BMMY 培养液重悬,使 OD₆₀₀ 值在 1.0~1.2。加入甲醇溶液诱导表达,使甲醇总浓度维持在 0.5%,每 24 h 补充 1 次甲醇。培养 96 h 后,用 Western Blotting 对表达产物进行鉴定,并以 pPIC3.5K 空载体为阴性对照。

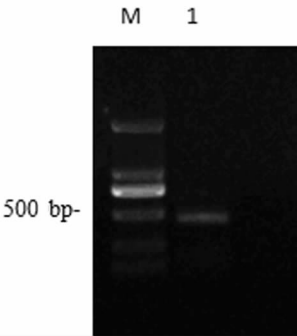
1.2.6 Stathmin 蛋白的纯化和鉴定 采用 Anti-His-tag 亲和层析柱对 Stathmin 蛋白进行纯化。收集诱导表达的毕赤酵母,加液氮研磨破壁 20 min,用 1 mL PBS 进行重悬,4 000 r/min 离心 5 min 后,取上清 14 000 r/min 离心 4 min,再用 0.45 nm 滤膜过滤后,加入 Anti-His-tag 亲和层析柱进行纯化,收集流穿液。用 5 倍床体积 PBS 进行洗柱后,再用 50、100、150、200 mmol/L 咪唑分别进行洗脱。并将洗脱液收集,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western Blotting 对 Stathmin 蛋白进行鉴定。

2 结 果

2.1 Stathmin 基因片段扩增结果 以乳腺癌 SKBR3 细胞 cDNA 为模板,PCR 扩增 Stathmin 基因片段,经琼脂糖凝胶电泳,可见一条约 450 bp 的片段,与预期 Stathmin 基因片段大小符合,见图 1。

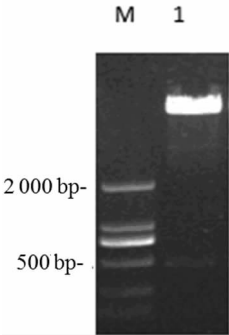
2.2 重组 pPIC3.5K-Stathmin 质粒的鉴定 重组质粒经 EcoR I 和 Not I 双酶切,进行琼脂糖凝胶电泳,可见一条 9 000 bp 和一条 450 bp 的条带,符合预期,见图 2。阳性克隆送北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序鉴定结果显示序列正确,与 Genebank X53305 一致,见图 3(见《国际检验医学杂志》网

站主页“论文附件”)。



M:DNA 标志物 DL2000;1:Stathmin PCR 产物。

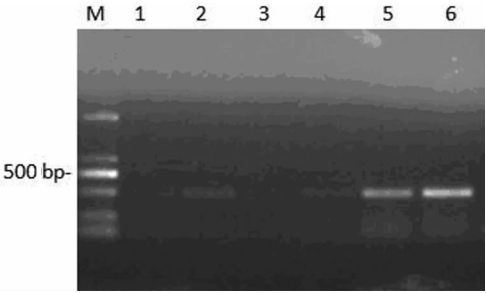
图 1 琼脂糖凝胶电泳 Stathmin 基因片段 PCR 扩增结果



M:DNA 标志物 DL2000;1:pPIC3.5K-Stathmin。

图 2 pPIC3.5K-Stathmin 重组表达载体的双酶切鉴定结果

2.3 重组毕赤酵母菌的构建、筛选和鉴定 在含有 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 不同梯度 G418 的 YPD 固体培养基上抗性筛选毕赤酵母转化子,提取基因组 DNA 为模板,进行 PCR 鉴定,出现预期 450 bp 的条带,见图 4。



M:DNA 标志物 DL2000;1:pPIC3.5K 空载体;2~6:分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL G418 YPD 筛选的 pPIC3.5K-Stathmin 转化子。

图 4 pPIC3.5K-Stathmin 重组转化的毕赤酵母的 PCR 鉴定

2.4 目的蛋白的纯化和鉴定 采用 Anti-His-tag 亲和层析柱对表达的 Stathmin 蛋白进行纯化。经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,凝胶上出现相对分子质量约为 35×10^3 的条带,见图 5。分别用 His 抗体和 Stathmin 抗体进行 Western Blotting 鉴定,分别在胶片上同样相对分子质量大小出现条带,蛋白鉴定为 Stathmin 蛋白。相对分子质量较预期 19×10^3 偏大,与添加 His 标签和蛋白糖基化有关,空载体转化的毕赤酵母菌作为阴性对照,没有出现相应条带,见图 6。

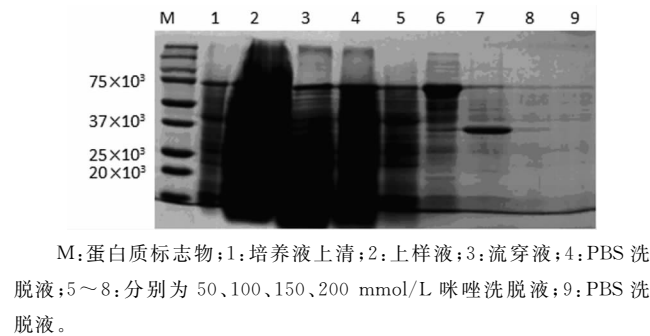


图 5 SDS-PAGE 鉴定表达和纯化的 Stathmin 蛋白

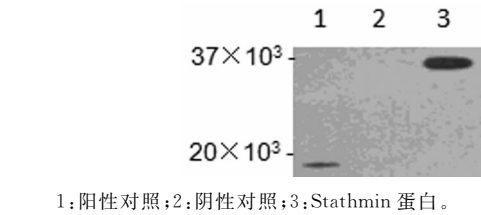


图 6 Western Blotting 鉴定 Stathmin 蛋白

3 讨 论

Stathmin 是一种由 149 个氨基酸残基组成的可溶性、高度保守的细胞质磷蛋白。它的相对分子质量约为 19×10^3 ，分为 2 个区域。一个是 N 端的“磷酸化”区域，其含有 Ser16、Ser25、Ser38 和 Ser63 共 4 个丝氨酸磷酸化位点^[7]。另一个是 C 端的“功能”区域，该区域可以和微管的 α/β 异源二聚体整合形成紧密的 T2S 三聚体复合物，从而调节微管蛋白的功能^[8]。该蛋白广泛存在于各种脊椎动物细胞中，主要通过与微管系统作用发挥功能，Stathmin 蛋白作为一种基本的微管解离蛋白，通过结合微管蛋白参与微管和纺锤体的组装和活化调节。此外，Stathmin 不仅能和多种其他蛋白结合，也是许多细胞内蛋白激酶的底物，Stathmin 还在不同的细胞周期通过修饰 Stathmin 蛋白的不同磷酸化位点而改变微管蛋白的聚合从而调控细胞的增殖、分化和运动^[9-11]；同时，许多癌基因及抑癌基因的表达产物，还有大量的细胞因子均可通过不同的方式与 Stathmin 作用而引起肿瘤细胞生物学行为的改变。另外，Stathmin 可以作为信号转导子，参与信号通路活性调节，在细胞的生长发育过程中发挥了非常重要的作用。Stathmin 与肿瘤的发生发展关系密切，作为潜在的肿瘤标志物和新的肿瘤生物治疗靶点，Stathmin 蛋白表达系统的建立对进一步研究肿瘤靶向治疗药至关重要。

毕赤酵母表达系统与传统的大肠杆菌表达系统相比，毕赤酵母作为单细胞真核生物，不但具有原核生物生长快速、培养基廉价和实验手段简单等特点，还具备真核生物可对表达蛋白进行加工折叠和翻译后修饰等生物学特性，并且克服了原核表达系统表达产物多以包涵体形式存在，复性困难且效率低下，背景蛋白多、不易纯化的缺点。而相较酿酒酵母表达体系，毕赤酵母具有更强有力的启动子、分泌效率有所提高，表达质粒更稳定等特性。并且还具有可以通过高密度发酵获得大量产物，且分泌产物无过度糖基化，临床应用安全等特点^[12]。本研究使用 pPIC3.5K 载体构建 Stathmin 毕赤酵母表达体系，使用的醇氧化酶基因 (AOX) 启动子为强诱导型启动子，可有效地

调控外源基因的高效表达。在 Stathmin 蛋白上加入了 $6 \times$ His-tag 表达标签，用优质带镍离子的亲和纯化柱进行纯化，目标蛋白纯度高，方法简单。

构建 Stathmin 毕赤酵母表达体系，纯化 Stathmin 蛋白，将有利于发现 Stathmin 蛋白的拮抗蛋白或多肽，为新的肿瘤生物治疗靶向药物的产生奠定基础。同时，也可以更好地研究 Stathmin 蛋白与其他蛋白相互作用关系以及 Stathmin 在信号通路中的作用，进一步深入地了解 Stathmin 在肿瘤发生发展中的作用。Stathmin 作为新的肿瘤标志物和肿瘤生物治疗新靶点，将发挥更加重要的作用，成功构建 Stathmin 毕赤酵母表达体系为 Stathmin 的进一步研究奠定重要基础。

参考文献

[1] Wik E, Birkeland E, Trovik J, et al. High phospho-Stathmin (Serine38) expression identifies aggressive endometrial cancer and suggests an association with PI3K inhibition[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(9): 2331-2341.

[2] 徐建萍, 胡建达, 李静, 等. Stathmin1 在急性白血病中的表达及意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 25(5): 1105-1110.

[3] Nie W, Xu MD, Gan L, et al. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. Lab Invest, 2015, 95(1): 56-64.

[4] Liu X, Liu H, Liang J, et al. Stathmin is a potential molecular marker and target for the treatment of gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 6502-6509.

[5] 伍勇, 曹亚. Stathmin 作为抗肿瘤治疗新靶标的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 25(1): 29-35.

[6] 甘淋, 刘银坤. Stathmin 蛋白: 一个潜在的肿瘤标志物[J]. 肿瘤, 2010, 30(1): 73-76.

[7] Hu JY, Chu ZG, Han J, et al. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(2): 321-333.

[8] Lachkar S, Lebois M, Steinmetz MO, et al. Drosophila stathmins bind tubulin heterodimers with high and variable stoichiometries [J]. J Biol Chem, 2010, 285(15): 11667-11680.

[9] 孙忠杰, 刘志宇, 王乃玉. Shh 和 Stathmin 在前列腺疾病中的表达及意义[J]. 大连医科大学学报, 2013, 20(1): 34-37.

[10] 续文婷, 杨桢, 吕农华. 微管不稳定蛋白在消化系肿瘤中的表达及意义[J]. 基础医学与临床, 2013, 5(5): 635-638.

[11] 刘海荣, 李岩, 梁婧, 等. 反义 Stathmin 基因对胃癌细胞生长影响的观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 24(1): 1958-1961.

[12] Byrne B, Kim H, Yoo SJ, et al. Pichia pastoris as an expression host for membrane protein structural biology Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins[J]. Curr Opin Struct Biol, 2015, 32(1): 9-17.

(收稿日期: 2015-12-28)

