

鸡神经肽 Y (NPY) 基因在毕赤酵母中的表达

张 鑫, 程军军, 姜勋平, 刘桂琼*

(华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070)

摘 要: 为通过毕赤酵母的表达获得鸡 NPY 蛋白, 根据 GenBank 上的鸡 NPY 基因序列, 结合毕赤酵母密码子的偏好性合成编码鸡 NPY 蛋白的基因, 将其插入真核表达载体 *pPICZαA*, 构建重组表达质粒 *pPICZαA-NPY*, 并将重组质粒电转入毕赤酵母 GS115, 获得重组毕赤酵母菌 *GS115/pPICZαA-NPY*, 用终浓度为 1% 的甲醇诱导表达阳性转化菌, 用 Tricine-SDS-PAGE 和 Western Blot 检测表达蛋白。结果成功构建表达载体 *pPICZαA-NPY*, 转化后的重组酵母菌成功分泌鸡 NPY 蛋白, 获得分子量约为 35 kDa 的鸡 NPY 蛋白。

关键词: 鸡; 毕赤酵母; 神经肽 Y; 基因表达

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)01-0040-04

Expression of chicken NPY gene in *Pichia pastoris*

ZHANG Xin, CHENG Junjun, JIANG Xunping, LIU Guiqiong

(College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The aim of this study was to obtain chicken neuropeptide Y(NPY)protein. The DNA sequence of the chicken NPY gene from GenBank was modified based on the codon preference of *Pichia pastoris*. The modified DNA sequence was synthesized and inserted into *pPICZαA* vector to obtain recombinant *pPICZαA-NPY*, and then the recombinant plasmid was transfected into *Pichia pastoris* GS115 by electrotransformation. The positive recombinant strains were induced to express the recombinant protein with 1% methanol. Tricine-SDS-PAGE and Western blot were used to detect the recombinant protein. The results showed that the recombinant NPY protein could be secreted by the positive recombinant strains and the molecular weight of NPY protein was approximately 35 kDa.

Key words: chicken; *Pichia pastoris*; neuropeptide Y; gene expression

神经肽 Y (NPY) 是一个由 36 个氨基酸构成的多肽, 是中枢和外周神经系统含量最大的神经递质, 与 PYY 和 PP 一并归为 NPY 家族。NPY 在神经细胞中合成, 通过轴索传送到神经纤维末梢, 与去甲肾上腺素共存于交感神经分泌囊泡, NPY 还存在于交感神经系统, 并且与去甲肾上腺素和三磷酸腺苷共同作用于许多器官; 在中枢, NPY 参与很多生物学过程, 包括摄食行为、神经发生、心脏活动、抗焦虑、增强记忆力、影响昼夜节律、调节激素释放及调节情绪^[1]。鸭子子宫阴道交接部的全基因组表达分析表明短受精期组子宫阴道交接部的 NPY 基因表达量显著高于长受精期组^[2]。作者课题组也发现 NPY 在母鸡子宫阴道交接部及漏斗部大量表达 (未

发表资料), 推测 NPY 可能在母鸡生殖道发挥功能。黄华云等发现 NPY 基因多态性与鸡开产体重等繁殖性状显著相关^[3]。目前已经利用原核表达载体成功表达牛 NPY 蛋白^[4], 还没有对鸡 NPY 进行真核表达的报道, 且原核表达产物难以进行后续研究。因此本研究在毕赤酵母 GS115 中表达鸡 NPY 基因, 以期研究 NPY 蛋白在禽类生殖道内的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 真核表达载体 *pPICZαA*、毕赤酵母 GS115 菌株为华中农业大学国家微生物重点实验

收稿日期: 2016-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572404) 资助。

作者简介: 张 鑫, 硕士研究生。E-mail: 415278178@qq.com; 程军军, 硕士研究生。E-mail: cjun6666@126.com

* 通信作者: 刘桂琼, 博士, 副教授。E-mail: liuguqiong@mail.hzau.edu.cn

室郭爱珍教授课题组惠赠; 克隆载体 PMD-18T 购自大连宝生物公司 (TaKaRa) 公司; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株购自北京全式金生物技术有限公司; 引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

1.1.2 试剂 T4 DNA 连接酶、TEMED、限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I 和 *Sac* I 均购于 TOYOBO 公司; ZeocinTM 购自 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; DNA Marker DL2000/3000 购于大连宝生物 (TaKaRa) 公司; DNA 胶回收纯化试剂盒购于北京庄盟生物科技有限公司; *Taq* 酶购于 Fermentas 公司; 预染的低分子量蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司; BCA 蛋白浓度定量试剂盒购于碧云天生物技术研究; 5 \times 还原性蛋白上样缓冲液、ECL 化学发光试剂盒购于武汉谷歌生物科技有限公司; 鼠抗 His-tag 抗体试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司; 0.22 μ m 的 PVDF 膜购自 Millipore; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NPY 基因合成 根据 GenBank 上公布的鸡 NPY 基因 (NM_205473.1) 的 mRNA 编码序列, 结合毕赤酵母密码子的偏好性对其进行优化, 优化后序列 G+C 含量接近 50%, 且不改变其氨基酸序列, 然后分别在基因的两端添加保护性碱基和限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I。合成序列总长为 314 bp, 依次为保护性碱基、*EcoR* I 酶切位点、氨基酸编码序列 294 bp、*Not* I 酶切位点与保护性碱基, 优化基因序列由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

1.2.2 酵母表达载体的构建 用 *EcoR* I 和 *Not* I 对合成的基因与酵母表达载体 *pPICZaA* 在 37 $^{\circ}$ C 条件下酶切 3 h, 2% 的琼脂糖凝胶回收酶切产物, 将双酶切后的产物用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建重组表达质粒 *pPICZaA-NPY*。将连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 挑单菌落培养提取质粒, 使用通用引物 5' AOX 和 3' AOX 进行 PCR 鉴定, 并用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行质粒双酶切鉴定, 阳性菌液送武汉金开瑞生物工程有限公司测序。

1.2.3 构建重组 NPY 的酵母菌株 用 *Sac* I 线性化重组质粒 *pPICZaA-NPY*, 取 10 μ L 线性化产物与 50 μ L 的 GS115 感受态充分混匀并转移至预冷的 0.2 cm 电击杯中, 在 BIO-RAD 电转仪中电击 (电压为 1500 V, 电容 50 μ F, 脉冲时间 500 μ s), 立即加入 1 mL 冰冻的山梨醇溶液, 冰浴静置 10 min, 转移至 1.5 mL 离心管, 30 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h, 离心后弃上清液, 涂布于含 Zeocin (100 μ g \cdot mL⁻¹) 的 YPD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养至出现白色单菌落, 挑菌接种至 YPD 液体培

养基培养, 采用“煮-冻-煮”的方法提取酵母基因组, 用通用引物 5' AOX 和 3' AOX 进行 PCR 扩增, 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中检测扩增产物。

1.2.4 NPY 在酵母中的表达 将阳性酵母重组质粒菌液接种到 BMGY 培养基, 空载体作对照, 30 $^{\circ}$ C, 220 r \cdot min⁻¹ 培养 24 h 后转移至无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 4 000 g 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 100 mL 的 BMMY 培养基悬浮, 30 $^{\circ}$ C、220 r \cdot min⁻¹ 培养, 甲醇诱导表达, 每隔 24 h 添加 100% 甲醇使终浓度为 1%, 持续诱导 96 h, 每次添加时取 2 mL 菌液, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 5 min, 取上清液至离心管中保存于 -20 $^{\circ}$ C 中。用 BCA 蛋白浓度定量试剂盒测定 24、48、72 和 96 h 上清液的表达蛋白浓度。

1.2.5 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 和 Western Blot 检测 在 1 mL 的上清液中加入 100 μ L 三氯乙酸, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 10 000 g 离心 10 min, 弃上清, 加 1 mL 预冷丙酮剧烈震荡溶解, 10 000 g 离心 5 min 弃上清, 重复 1 次, 将试管置于室温 30 min 以上, 晾干后获得浓缩蛋白。在离心管中加入 100 μ L 的 5 \times SDS-PAGE Loading Buffer, 沸水煮 10 min 后取 10 μ L 做 Tricine-SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 转印至硝酸纤维素膜, 载体 *pPICZaA* 含 6 \times His-Tag, 故用 His-Tag 单克隆抗体进行 Western-blot 检测。

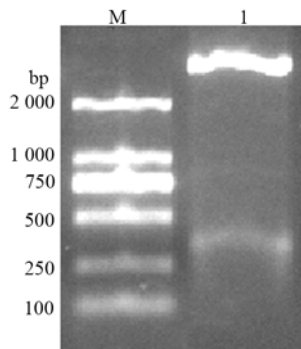
2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切重组质粒 *pPICZaA-NPY*, 酶切后应在 3 500 bp 处和 294 bp 处有条带, 酶切产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳发现在 3 500 bp 处和 250~500 bp 处存在一特异性条带 (图 1), 与预测的条带大小一致 (294 bp)。以 5' AOX 和 3' AOX 为引物, 扩增重组表达质粒 *pPICZaA-NPY*, 检测出目的片段大小在 750~1 100 bp 之间 (图 2), 与目的条带大小一致 (基因序列为 294 bp, 载体自身序列为 588 bp, 故扩增片段为 882 bp)。将质粒 *pPICZaA/NPY* 送武汉金开瑞生物工程有限公司测序, 测序结果表明 NPY 基因已正确插入 *pPICZaA* 载体。

2.2 重组酵母菌的鉴定

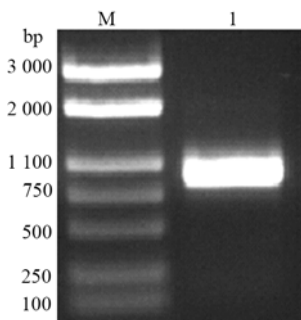
重组质粒 *pPICZaA/NPY* 转入至毕赤酵母 GS115 后, 以 5' AOX 和 3' AOX 为引物进行 PCR 扩增, 发现在 750~1 000 之间存在一特异性条带 (图 3), 与预测片段大小 (882 bp) 一致, 说明目的基因已成功嵌入毕赤酵母基因组中。



M: DL 2000 DNA Marker; 1: *EcoRI* 和 *NotI* 酶切重组质粒 *pPICZαA-NPY* Product of plasmid *pPICZαA-NPY* with *EcoRI* 和 *NotI*

图 1 重组表达质粒 *pPICZαA-NPY* 的酶切

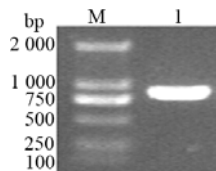
Figure 1 The restriction endonuclease analysis of plasmid *pPICZαA-NPY*



M: DL 3000 DNA Marker; 1: *pPICZαA-NPY* 的 PCR 结果 PCR product of *pPICZαA-NPY*

图 2 重组表达质粒 *pPICZαA-NPY* 的 PCR 鉴定

Figure 2 PCR product of plasmid *pPICZαA-NPY*



M: DL 2000 DNA Marker; 1: *pPICZαA-NPY* PCR 结果 PCR product of *pPICZαA-NPY* clone

图 3 *pPICZαA-NPY* 在 GS115 中的 PCR 鉴定

Figure 3 Detection of *pPICZαA/NPY* by PCR in GS115

2.3 Tricine-SDS-PAGE 和 Western Blot 检测结果

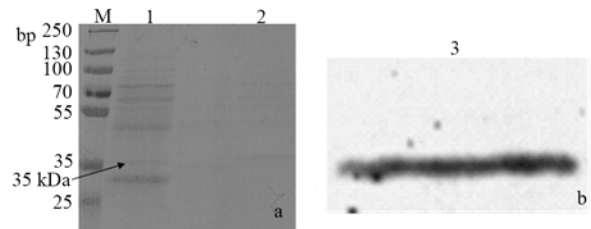
使用 BCA 法进行蛋白浓度检测, 用蛋白标准品绘制蛋白标准曲线, 发现蛋白标准曲线符合要求 ($R^2=0.998$), 可用于测定蛋白浓度。测定诱导 24 h、48、72 和 96 h 后的重组蛋白浓度 (表 1)。从表 1 中可以看出诱导 24 h 时蛋白表达量最高。

甲醇诱导表达 24 h, 蛋白浓缩后通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测, 发现在 35 kDa 左右存在一条带, 而对照的空载体组在 35 kDa 处无条带。SDS-PAGE 和 Western Blot 检测结果一致, 目

的条带单一性好, 说明 NPY 蛋白表达成功, 可用于进一步的后续研究。

表 1 表达蛋白浓度测定结果

Table 1 The concentration of the expressed NPY protein		
诱导时间/h	OD_{595} 值	浓度/mg·mL ⁻¹
Induction time	Value of OD_{595}	Concentration
24	0.694	1.417
48	0.602	1.155
72	0.565	1.049
96	0.538	0.972



M: 蛋白 Marker; 1: 重组蛋白 *pPICZαA-NPY* 表达上清; 2: 空载体; 3: 重组蛋白 *pPICZαA-NPY* 的 Western Blot 结果

M: Protein Marker; 1: Supernatant of *pPICZαA-NPY* expression product; 2: Empty vector; 3: Western Blot of the recombinant protein

图 4 重组蛋白的 SDS-PAGE (a) 和 Western Blot 检测 (b)

Figure 4 The SDS-PAGE (a) and Western Blot (b) of Recombinant protein

3 讨论

自律器官的重要特征之一是其内部有神经分布, 神经系统使其能发挥正常的生理功能。禽类精子进入母鸡生殖道后贮存于子宫阴道交接部的贮精腺, 然后释放上行至伞部受精, 贮精腺内精子的贮存和释放是一自律过程, 因此神经系统有可能参与精子在贮精腺内的贮存和释放, 研究发现神经轴突分布在贮精腺周围或终止于单个的贮精腺^[5]。NPY 是一种神经递质, 广泛分布于全身各处, 通过与其受体结合发挥多种生物学功能^[6], 全基因组表达分析表明 NPY 存在于鸭子宫阴道交接部, 因此 NPY 可能参与精子在禽类子宫阴道交接部的贮存或释放。研究 NPY 在禽类子宫阴道交接部的功能, 需获得其蛋白, 因此本研究构建载体表达鸡的 NPY 蛋白, 可为后续研究奠定基础。

目前已发展出多种蛋白表达系统, 比如: 大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、昆虫细胞表达系统和哺乳动物表达系统^[7]。无论选择哪一种表达系统, 都应充分考虑各种因素, 如蛋白能否有效折叠、表达产物生物活性、表达量及产物纯化问题。大多数蛋白需要转录后修饰才会表现出完整的生物学功

能^[8], 外源蛋白的高效表达与表达系统及表达条件密切相关^[9]。巴斯德毕赤酵母表达系统是一种新型的外源蛋白表达系统, 现已被用于表达各种胞内及胞外蛋白^[10]。与其他蛋白表达系统相比, 该表达系统的特点是营养要求低、自身分泌背景蛋白少、可采用廉价的培养基、易高密度发酵等^[11], 可利用甲醇为唯一碳源, 有强效启动子 AOX1 驱动外源基因的表达^[12]。该启动子是调控机理最为严格且最强的启动子之一^[13], 只需将外源基因序列正确插入, 就能够利用甲醇高效诱导外源基因的表达。毕赤酵母表达系统最重要的特性是遗传性状稳定, 易整合外源基因至酵母基因组, 作为一种真核表达系统, 可对表达出的重组蛋白进行翻译后的修饰加工, 有利于蛋白的分离纯化。巴斯德毕赤酵母有特殊的密码子偏好性, 许多高 A+T 含量的基因常由于提前终止而不能有效转录和翻译。Hoekema 等发现了 25 个酵母菌偏好的密码子, 在保持所翻译的氨基酸不变的情况下将密码子替换为酵母菌偏好的密码子, 结果蛋白表达量显著提高^[14]。Sinclair 等据此改变葡萄糖脑苷脂酶的 G+C 含量, 表达量提升至原来的 7~10 倍, 密码子优化后蛋白的翻译效率有了显著提高^[15]。Teng 等优化 β -1,3-1,4 葡聚糖酶基因的 96 个氨基酸密码子, 所分泌的蛋白含量和活性明显提高^[16], 李大伟等将 *KrPhyS* 基因密码子优化后导入 GS115, 表达的蛋白具较高活力^[17]。本课题组已用巴斯德毕赤酵母表达系统成功表达鸡 NXPH1 蛋白和碳酸酐酶 4 蛋白^[18-19], 因此本研究选用巴斯德毕赤酵母表达系统, 根据毕赤酵母以密码子的偏好性和 G+C 含量优化基因的密码子, 插入毕赤酵母菌 GS115, 利用表达载体 *pPICZaA* 的强启动子 AOX1、 α 交配因子引导外源蛋白的表达^[20], 并利用 Zeocin 抗性基因筛选出阳性重组子, 成功构建 *GS115-pPICZaA-NPY* 重组表达质粒, 高效表达目的蛋白, 通过 SDS-PAGE 检测发现在 35 kDa 处存在一条带, 且 Western Blot 检测在相同蛋白大小处存在条带, 说明成功表达重组蛋白。

4 结论

根据 GenBank 上公布的鸡 NPY 序列, 结合毕赤酵母密码子的偏好性优化鸡 NPY 基因序列, 成功构建重组表达质粒 *pPICZaA-NPY*, 导入 GS115 中通过甲醇诱导表达获得鸡 NPY 融合蛋白, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示蛋白分子量为 35 kDa, 通过 Western Blot 证实成功表达鸡 NPY 蛋白。

参考文献:

- [1] HERZOG H. 30 Years of NPY research [J]. *Neuropeptides*, 2012, 46(6):251.
- [2] HUANG H L, CHENG Y S, YANG K T, et al. Genome-wide transcript expression analysis in the uterovaginal junction in association with fertile period in Tsaiya ducks[J]. *J Reprod Develop*, 2011, 57(6): 731-736.
- [3] 黄华云, 黎寿丰, 赵振华, 等. 神经肽(NPY)基因多态性与邵伯鸡母系繁殖性状的关联性分析[J]. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(1): 47-50.
- [4] 张丽. 黄牛 NPY 和 HCRTR1 基因的克隆表达及其遗传多样性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007: 70-81.
- [5] FREEDMAN S L, AKUFFO V G, BAKST M R. Evidence for the innervation of sperm storage tubules in the oviduct of the turkey (*Meleagris gallopavo*)[J]. *Reproduction*, 2001, 121(5): 809-814.
- [6] 余慧, 钟文婷, 孙宏志. 神经肽 Y 在能量代谢中的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(5): 833-837.
- [7] 陈晓娟, 闫少春, 邵国. 蛋白表达系统的研究进展[J]. *包头医学院学报*, 2014, 30(3): 142-143.
- [8] CHOI B K, BOBROWICZ P, DAVIDSON R C, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5022-5027.
- [9] 杨梅, 温真, 林丽玉, 等. 毕赤酵母蛋白表达系统研究进展[J]. *生物技术通报*, 2011(4): 46-51.
- [10] CREGG J M, VEDVICK T S, RASCHKE W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*[J]. *NAT BIOTECHNOL*, 1993, 11(8): 905-910.
- [11] HIGGINS D R, CREGG J M. Introduction to *Pichia pastoris* [J]. *Pichia Protoc*, 1998, 103: 1-15.
- [12] DALY R, HEARN M T W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119-138.
- [13] HOHENBLUM H, GASSER B, MAURER M, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85(4): 367-375.
- [14] HOEKEMA A, KASTELEIN R A, VASSER M, et al. Codon replacement in the *PGK1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression[J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(8): 2914-2924.
- [15] SINCLAIR G, CHOY F Y M. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *Protein Express Purif*, 2002, 26(1): 96-105.
- [16] TENG D, FAN Y, YANG Y, et al. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1, 3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2007, 74(5): 1074-1083.
- [17] 李大伟, 付晓燕, 赵伟, 等. 来源于 *Kosakonia radicitans* 的新型植酸酶基因通过密码子优化在毕赤酵母中高效表达[J]. *上海农业学报*, 2016, 32(2): 33-38.
- [18] 聂彬, 黄华榕, 韩燕国, 等. 鸡碳酸酐酶 4 基因在毕赤酵母中的表达[J]. *生物技术*, 2015, 25(3): 233-237.
- [19] 陈美玲, 聂彬, 姜勋平, 等. 鸡 *neurexophilin 1* 基因在毕赤酵母中的表达[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(3): 213-217.
- [20] GHAFAR A, KHAN S A, MUKHTAR Z, et al. Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(5): 3227-3233.