

## 人骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 在巴斯德毕赤酵母中的表达\*

梁东春 左爱军 王宝利 郭 刚 张镜宇\*\*

(天津市内分泌研究所 天津 300070)

**摘要** 以重组质粒 pUC-BMP2 为模板 PCR 扩增人 BMP-2 成熟肽编码序列,将该序列克隆入 pGEM-T 载体进行 DNA 序列分析后亚克隆入分泌型毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中。重组质粒 pPIC9K-BMP2 经 *Bgl*II 酶切后回收线性化片段,聚乙二醇法转染毕赤酵母菌株 GS115。PCR 筛选整合有人 BMP-2 基因的酵母细胞重组子,以甲醇进行诱导表达,于酵母细胞培养基中可检测到 rhBMP-2。体外培养条件下,所得 rhBMP-2 可增加 2T3 小鼠成骨细胞内碱性磷酸酶活性;体内实验, rhBMP-2 冻干粉可于小鼠骨四头肌肌袋中诱导软骨细胞群产生。

**关键词** 人骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 毕赤酵母 分泌表达

人骨形态发生蛋白-2(hBMP-2)不但具有良好的诱导成骨活性,可作为成骨因子应用于骨组织工程领域,还是 1 种重要的发育调节因子<sup>[1-5]</sup>。基因工程生产重组人 BMP-2(rhBMP-2)无论在临床应用还是基础研究中都具有重要的意义。由于大肠杆菌无法进行某些真核蛋白活性所必需的翻译后加工,重组蛋白又往往以不溶的形式出现在包涵体中。若选用大肠杆菌表达系统,必须对包涵体进行后期处理才能获得有生物活性的 rhBMP-2。本实验室曾在昆虫细胞及中国仓鼠卵巢细胞(CHO cell)这两种真核细胞中成功表达出了直接具成骨活性的 rhBMP-2<sup>[6]</sup>,但上述表达系统大规模培养困难,不适于产业化生产。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统一方面具有原核系统操作简便、细胞生长迅速、能大规模发酵生产的优点。另一方面其对蛋白质的翻译后加工方式也接近于哺乳动物细胞,已用于 rhTNF、rhEGF 等多种重组蛋白的批量生产<sup>[7]</sup>,本文尝试以该系统进行了 rhBMP-2 的表达。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株和质粒 含人 BMP-2 成熟肽编码序列

收稿日期:2004-12-20 修回日期:2005-06-03

\* 天津市自然科学基金重点项目(023105311)

\*\*通讯作者,电子邮箱:liangdongchun122@eyou.com

的重组质粒 pUC-BMP-2,大肠杆菌菌株 JM109、2T3 小鼠成骨细胞系为本实验室保存。酵母表达质粒 pPIC9K,酵母菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司。克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司。

**1.1.2 酶和试剂** DNA 限制性内切酶 *Xho*I, *Eco*RI, *Bgl*II, T4DNA Ligase 购自 TaKaRa 大连有限公司,去糖基化酶 PNGase F 购自 Biolabs 公司。抗坏血酸(Ascorbic acid)购自 Sigma 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司,碱性磷酸酶测定试剂盒为天津市药物研究院产品。小鼠抗人 BMP-2 单克隆抗体购自美国 R&D 公司,HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。所需引物自行设计,由上海生工生物技术公司合成。

#### 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒 pGEM-BMP-2 的构建** 以本室前期构建的重组质粒 pUC-BMP-2 为模板进行 PCR,所用引物为 sense 5'-a **ctcgag** aaaagacatgatgaaaagg-3'; antisense 5'-gc **gaattc** ctacgacacccc-3'。上游引物中引入了限制性内切酶 *Xho*I 识别位点及毕赤酵母分泌型表达所必需的信号肽编码序列;下游引物含限制性内切酶 *Eco*RI 的识别位点。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5min;94℃,30s;62℃,30s;72℃,30s,30 个循环;72℃最终延伸 5min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物与 pGEM-T 载体进行连接,连接产物转化感受态细胞大肠杆菌 JM109。酶切鉴定筛选阳性重

组质粒, 进行 DNA 序列分析(所用引物为 M13F)。

**1.2.2 rhBMP-2 酵母表达重组子的构建** 以限制性内切酶 *Xho*I 和 *Eco*RI 分别处理重组质粒 pGEM-BMP-2 及酵母表达质粒 pPIC9K, 电泳回收所需 DNA 片段进行连接, 连接产物转化感受态细胞大肠杆菌 JM109, PCR 筛选重组质粒 pPIC9K-BMP-2。(PCR 筛选引物为 5' AOX1 及 3' AOX1, 对应序列分别位于质粒 pPIC9K 多克隆位点上、下游, 购自 Invitrogen 公司)。以限制性内切酶 *Bgl*II 处理重组质粒 pPIC9K-BMP-2, 电泳回收线性化片段。取回收产物 20 $\mu$ l, 聚乙二醇法转化毕赤酵母细胞 GS115 (按 Invitrogen 公司提供的 *Pichia pastoris* 操作手册进行)。玻璃珠法提取酵母 DNA<sup>[8]</sup>, PCR 筛选酵母细胞重组子<sup>[9,10]</sup>。

**1.2.3 重组酵母菌株的诱导表达** 挑取重组毕赤酵母细胞单菌落接种于 100ml BMGY (Buffered Complex Glycerol Medium) 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至  $A_{600} = 4.0$ 。离心收集菌体, 弃去 BMGY 培养基, 更换为 25ml BMMY (Buffered Complex Methanol Medium) 培养基继续振荡培养。每 24h 加入甲醇 0.125 ml (终浓度为 0.5% V/V)。6d 后终止培养, 15 000  $\times$  g 离心收集上清, 取适量进行 SDS-PAGE 鉴定。

**1.2.4 表达产物的去糖基化处理及 Western Blot 鉴定** 取适量上清液, 加入 SDS、 $\beta$  巯基乙醇至终浓度分别为 0.5% (W/V) 及 1% (V/V), 沸水浴 10min, 冷却后加入适量 PNGase F, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h。取适量去糖基化产物行 SDS-PAGE, 半干法将凝胶中的蛋白质条带转移至硝酸纤维素膜上。剪取部分硝酸纤维素膜以氨基黑染色确定转膜成功, 剩余 NC 膜经 5% 脱脂奶粉封闭后以小鼠抗人 BMP-2 单克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗, DAB 显色进行印迹。

**1.2.5 rhBMP-2 的活性测定** (1) 对 2T3 成骨细胞中碱性磷酸酶活性的影响。以市售重组人 BMP-2 为标准品, ELISA 测定表达产物中 rhBMP-2 的浓度。培养 2T3 小鼠成骨细胞, 适当传代后, 按  $5 \times 10^4$ /ml 的密度接种于 24 孔细胞培养板中。饥饿处理 24h 后将培养液更换为含不同浓度 rhBMP-2 (50, 100, 250, 500, 1000, 1500 ng/ml) 的 DMEM 条件培养基 (含终浓度为 50 $\mu$ g/ml 的抗坏血酸), 市售 rhBMP-2 作为对照。72h 后弃去培养液, 每孔中加入 0.6ml 含 0.5% Triton X-100 的 PBS, 反复冻融 3

次。收集细胞裂解液, 测定其中碱性磷酸酶 (ALP) 活性, BCA 法测定每个样本的总蛋白浓度对 ALP 结果进行矫正。(2) 体内包埋 表达产物对蒸馏水透析 48h 后进行冷冻抽干。取冻干粉 1.0mg 植入小鼠股四头肌肌袋中, 植入 1.0mg BSA 作为对照。21d 后分离植入区肌肉组织经中性福尔马林固定后, 石蜡包埋切片, H&E 染色, 显微镜下观察并摄片。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pGEM-BMP-2 的构建

如图 1 所示, 以质粒 pUC-BMP-2 为模板, PCR 扩增出了与人 BMP-2 成熟肽编码序列大小相符的 390bp 的 DNA 条带, 重组质粒 pGEM-BMP-2 序列测定结果与预期完全一致。

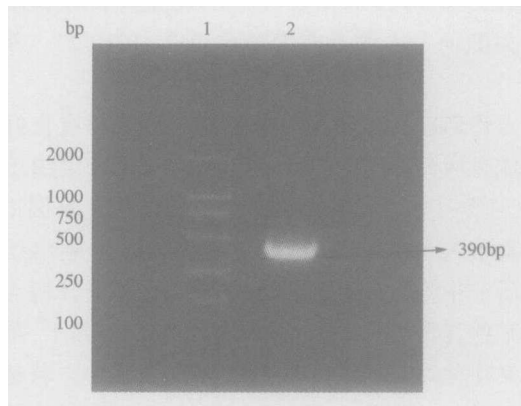


图 1 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 1.5% agarose gel electrophoresis of PCR product

1: DNA molecular weight marker DL-2000; 2: PCR product

### 2.2 酵母细胞重组子的 PCR 筛选

以 5' AOX1 及 3' AOX1 为引物, 空质粒 pPIC9K 为模板的 PCR 产物大小应为 492 bp, 当有外源 DNA 插入后此扩增片段则会相应增大。如图 2 所示, 以重组质粒 pPIC9K-BMP-2 作为模板时 PCR 产物的大小将近 900bp, 证明此质粒中有 BMP-2 基因的插入。经转化后, 线性化的质粒可与酵母细胞染色体发生同源重组, 提取酵母细胞染色体作为模板, 以上述引物进行 PCR 可筛选出整合有不同质粒的酵母细胞重组子。如图 3 所示, lane3 的模板应是整合有重组质粒 pPIC9K-BMP-2 的酵母细胞染色体。

### 2.3 rhBMP-2 的诱导表达

图 4 所示, 重组有人 BMP-2 基因的酵母菌株 GS115 经诱导表达后于培养基中可检出一大小约



图2 重组质粒 pPIC9K-BMP-2 的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPIC9K-BMP-2 by PCR

1: plasmid pPIC9K as template; 2,3,5,6,7: recombinant plasmid pPIC9K-BMP-2 as template; 4: DNA molecular weight marker DL-2000

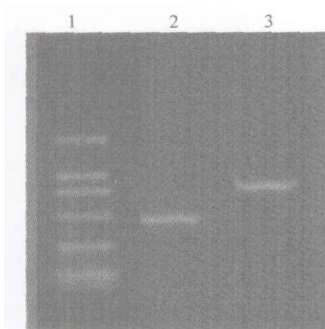


图3 酵母细胞重组子的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of *Pichia pastoris* GS115 transformant by PCR

1: DNA molecular weight marker DL-2000; 2: plasmid pPIC9K transformed *Pichia pastoris* GS115; 3: recombinant plasmid pPIC9K-BMP-2 transformed *Pichia pastoris* GS115

为 24kDa 的蛋白质,该蛋白在培养基中的含量随诱导时间的延长而增多,在诱导表达 120h 后接近峰值;作为对照,整合有空质粒的酵母细胞诱导表达 6 d 后,培养基中检测不到任何蛋白条带。由图 5 可见,去糖基化处理后,此蛋白的分子量由 24kDa 减小至 16kDa 左右,Western blot 显示该蛋白为 rhBMP-2。

#### 2.4 rhBMP-2 对成骨细胞中碱性磷酸酶活性的影响

由图 6 可见,所得 rhBMP-2 及市售 BMP-2 标准品均可明显提高成骨细胞中碱性磷酸酶的活性,并呈剂量依赖关系,在以上生物效应上此二者并无明显区别。

#### 2.5 rhBMP-2 的体内成骨活性

H&E 染色显示, rhBMP-2 植入区(图 7A)可见大量兰染的软骨细胞群,周围包绕有肌肉组织。包埋 BSA 的对照组(图 7B)则未见软骨细胞。

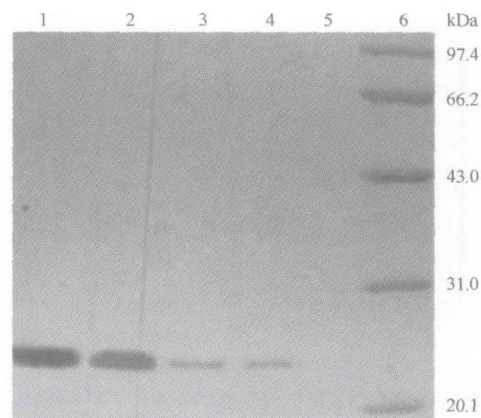


图4 酵母表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.4 The SDS-PAGE analysis of the medium of GS115 transformation

1: 144h after induction; 2: 120h after induction; 3: 96h after induction; 4: 72h after induction 5: control 6: Protein molecular weight marker

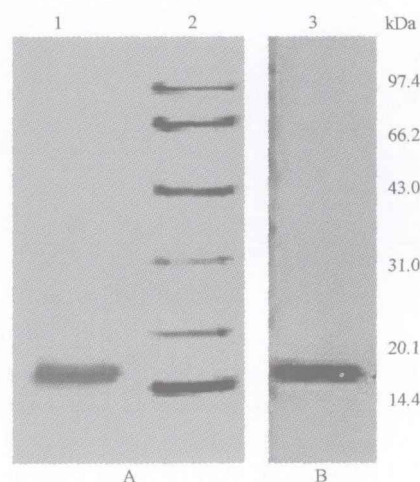


图5 rhBMP-2 的 Western blot 鉴定

Fig.5 Western blot analysis of the rhBMP-2

A: Amino black dyeing of the protein-transferred membrane;

B: Western blotting

1: deglycosylated rhBMP-2; 2: protein molecular weight marker;

3: deglycosylated rhBMP-2

### 3 讨论

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是 1 种甲醇酵母,其细胞的过氧化物酶体中含有甲醇代谢所必需酶,如醇氧化酶(alcohol oxidase, AOX)、二羟丙酮合成酶等。毕赤酵母可在以甲醇为唯一碳源的培养基中生长<sup>[11]</sup>,当细胞以葡萄糖、甘油、乙醇为碳源时,不能检测到 AOX 的活性,而在以甲醇为唯一碳源培养的细胞中,该酶则可占细胞总蛋白的

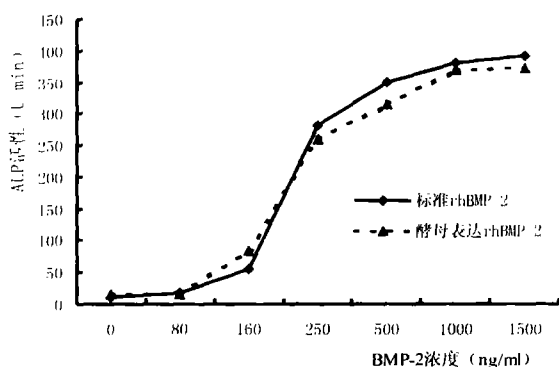
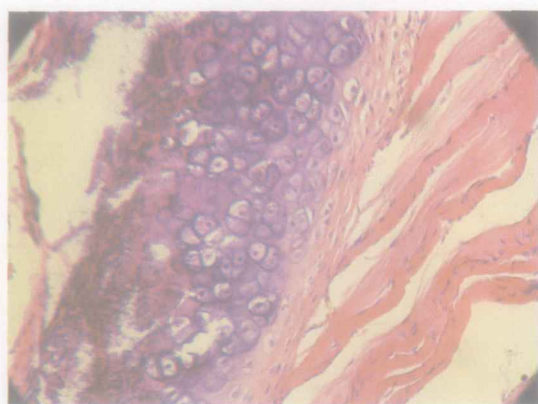
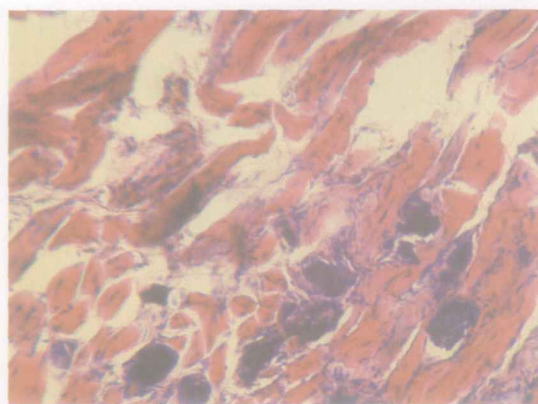


图6 rhBMP-2对2T3细胞中ALP活性的影响

Fig.6 Influence of rhBMP-2 on ALP activity in cultured 2T3 osteoblast cell line



A(×100)



B(×100)

图7 rhBMP-1植入区组织切片的H&E染色

Fig.7 H&E dying of the section of rhBMP-2 implanted tissue

A: test group of rhBMP-2 implanted; B: control group of BSA implanted

点一般位于 HIS4 区或 AOX 区, AOX 区的整合包括基因置换和位点特异性的基因插入, 前者的 AOX 结构基因被外源基因所替换使宿主细胞失去甲醇利用能力, 称 Mut<sup>-</sup> (methanol utilization slow) 型; 后者则未破坏 AOX 结构基因, 宿主细胞仍可利用甲醇, 称 Mut<sup>+</sup> 型。Mut<sup>+</sup> 在甲醇培养基中生长缓慢但外源基因表达量却更高<sup>[12]</sup>。本文以限制型内切酶 *Bgl* II 处理重组质粒 pPIC9K-BMP-2 导入酵母细胞 GS115 中与酵母染色体 DNA 进行同源重组, 所得到的重组子即为 Mut<sup>+</sup> 表型, 有利于 BMP-2 基因的高效表达。如图 4 所见, 经诱导表达后, 于重组酵母菌株的培养基中可检测到一分子量为 24kDa 左右的外源蛋白, 估计为糖基化修饰后的 rhBMP-2。对表达产物进行了去糖基化处理及 Western blot 鉴定, 经

30% 以上。AOX 启动子的强诱导性使其下游的外源基因具有很高的表达率并易于调控。巴斯德毕赤酵母还能使外源真核基因正确翻译和翻译后加工, 并可对许多蛋白质产物进行分泌, 使产物易于提纯。与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 相比, 巴斯德毕赤酵母对蛋白质产物的糖基化方式更接近高等生物, 临床应用中更安全。本文所表达的 rhBMP-2 原始大小约为 15kDa, 经毕赤酵母细胞的糖基化修饰后大小增加至 25 kDa 左右, 并可被分泌至培养基中。

巴斯德毕赤酵母没有稳定的附加体质粒, 必须以整合型质粒作为外源基因表达的载体。整合位

去糖基化处理后, 该外源蛋白的分子量减少至 16kDa 左右, 与 BMP-2 的分子量大小相符, Western blot 证实该重组蛋白即为所需之目的蛋白——rhBMP-2。

为了验证毕赤酵母细胞所表达的 rhBMP-2 是否直接具有生物活性, 文中不但体外检测了其成骨细胞内碱性磷酸酶活性的影响, 还检验了其体内成骨活性。经测定发现, 所得 rhBMP-2 不需后期处理即具有增加细胞内 ALP 活性作用, 与市售 rhBMP-2 标准品无明显差别; 并可在所植入的肌肉组织中刺激软骨细胞群的产生。至此, 已成功完成了以毕赤酵母细胞直接制备有活性 rhBMP-2 的研究, 为 rhBMP-2 的临床应用奠定了基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Wozney J M, Rosen V, Anthony J, et al. Novel Regulations of bone formation: molecular clones and activities. Science, 1998, 242:1528 ~ 1534
- [ 2 ] Urist M R, Iwata H, Ceccotti P L, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70:3511 ~ 3515
- [ 3 ] 朱帮福,张斌,李毅,等. 重组人骨形成蛋白-2 对细胞成骨分化的作用. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(2):134 ~ 137  
Zhu B F, Zhang B, Li Y, et al. Chin J Cell Mol Immunol, 2002, 18(2):134 ~ 137
- [ 4 ] 杨宁,陈增海,宋怡,等. 骨形态发生蛋白的研究进展. 山东大学学报(医学版), 2004, 42(2):244 ~ 248  
Yang N, Chen Z H, Luan Y, et al. Journal of Shandong University (Health Science), 2004, 42(2):244 ~ 248
- [ 5 ] 张子军,卢世璧,王继芳,等. 诱导性骨再生中内源性 BMP 的作用. 中华骨科杂志, 1996, 16(11):719 ~ 723  
Zhang Z J, Lu S H B, Wang J F, et al. Chinese Journal of Orthopaedics, 1996, 16(11): 719 ~ 723
- [ 6 ] 沈伟,郭善一,鲍秋野,等. 人骨形态发生蛋白-2 基因的真核表达载体构建. 天津医药, 2001, 29(2):88 ~ 90  
Shen W, Guo S H Y, Bao Q Y, et al. Tianjin Med J, 2001, 29(2):88 ~ 90
- [ 7 ] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W G. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. BioTechnology, 1993, 11:905 ~ 910
- [ 8 ] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 127 ~ 133  
Lu S H D. Current protocols for molecular biology. 2nd. Beijing: China Xiehe Medical University Press, 1999. 127 ~ 133
- [ 9 ] Tschopp J F, Brust P F, Cregg J M, et al. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acid Res, 1987, 15(9): 3859 ~ 3876
- [ 10 ] 尉海,梁东春,郭刚,等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较. 天津医药, 2003, 31(5):270 ~ 272  
Ju H, Liang D C H, Guo G, et al. Tianjin Med J, 2003, 31(5): 270 ~ 272
- [ 11 ] Van der Klei I J, Harder W, Veenhuis M. Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeast: a review. Yeast, 1991, 7(3): 195 ~ 209
- [ 12 ] Linder S, Schliwa M, Kube-Granderath E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. Biotechniques, 1996, 20(6): 980 ~ 982

Expression of Recombinant-Bone Morphogenetic Protein 2 in *Pichia pastoris*

LIANG Dong-chun ZUO Ai-jun WANG Bao-li GUO Gang ZHANG Jing-yu

(Institute of Endocrinology Tianjin 300070, China)

**Abstract** A DNA coding sequence for the mature peptide of human BMP-2 was amplified by PCR and cloned into plasmid pGEM-T. After being verified by DNA sequence analysis, the target gene was subcloned into the shuttle plasmid pPIC9K of *Pichia pastoris* expression system, under the control of promoter AOX1 (alcohol oxidase 1). Recombinant plasmid pPIC9K-BMP-2 was linearized by *Bgl*II digestion and then transformed into *Pichia pastoris* strain GS115. The transformant was selected by PCR and introduced to methanol induced expression. Firstly, *Pichia pastoris* GS115 was cultured in BMGY medium, 24h afterwards, the medium was changed into BMMY containing methanol of a final concentration of 0.5% V/V. 6days after culture, supernatant of the medium was collected and analyzed by SDS-PAGE. In supernatant a 24kDa protein was detected, which decreased to 16kDa after deglycosylation and was approved as rhBMP-2 by Western blot. 2T3 mouse osteoblast cell line was cultured and rhBMP-2 from *Pichia pastoris* of different concentration was added into the medium, with rhBMP-2 purchased from R&D company used as control. As a result, these two kinds of rhBMP-2 had almost equal bio-ability of increasing the activity of ALP in this cultured 2T3 cell. Further *in vivo* study showed, embedded rhBMP-2 could induced myoblast differentiate into chondrocyte.

**Key words** Human bone morphogenetic protein 2(BMP-2) *Pichia pastoris* Secreted expression