

人血管内皮细胞生长因子受体 Flt-1 胞外区 cDNA 在毕赤酵母中的表达和鉴定

马 骊* 张智清 周小明 曾革非 陈爱君 姚立红 王小宁*

(中国预防医学科学院病毒学研究所 北京 100052)

摘 要 将编码血管内皮细胞生长因子受体 Flt-1 胞外区 1-3 loop 316 个氨基酸残基的 cDNA 插入到含 AOX1 启动子和 α 分泌信号肽序列的 *Pichia pastoris* 酵母载体中, 构建了重组表达质粒 pPIC9K/Flt-1(1-3), 转化酵母宿主菌 GS115, 筛选 His⁺ Mut^s 表型转化子, 经摇瓶培养, 1% 甲醇诱导表达 4 d 后, SDS-PAGE 结果显示, 培养上清中 Flt-1 (1-3) 表达量达总蛋白的 30% 以上。ELISA 及 Western blot 实验表明, 表达产物具有良好的抗原性和特异性。生物学活性检测证实其具有结合 VEGF 的能力和抑制 VEGF 对 HUVEC 细胞的促增殖功能。

关键词 血管内皮生长因子, 受体, 毕赤巴斯德酵母, 表达

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0447-04

血管内皮细胞生长因子(VEGF)受体 Flt-1 属酪氨酸蛋白激酶受体家族第三亚型, 是分子量约为 180kD 的糖蛋白^[1], 分为胞外区、跨膜区和胞内区三个部分, 其中胞外区负责与配体结合, 具有 7 个免疫球蛋白样样袢(Ig-like loop), 配体结合域位于氨基端 3 个 loop 内^[2]。

由于 VEGF 具有促血管内皮细胞增殖及促新生血管形成的功能, 在肿瘤及糖尿病性视网膜病变等血管生成相关疾病的发病过程中起重要作用, 可通过拮抗 VEGF 的作用来治疗这些疾病。可溶性受体 sFlt-1 通过与血管内皮细胞表面的受体竞争结合 VEGF, 阻断其生物学活性, 抑制肿瘤的生长和转移及视网膜新生血管形成, 具有潜在的临床药用开发价值。

甲基营养型酵母表达系统是一种新型外源基因表达系统, 兼有原核细胞良好的可操作性和真核系统的翻译后加工的双重特点^[3]。我们利用 PCR 技术, 从人心肌细胞 cDNA 文库中扩增出 948bp 的 Flt-1 胞外 1~3 loop 基因片段, 并克隆于 *P. pastoris* 酵母表达载体 pPIC9K, 实现了 Flt-1(1-3) 基因的高效分泌性表达。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、细胞株、酶和主要试剂

大肠杆菌 DH5 α HUVEC 细胞株由本室保存。

pGEM-T 载体、限制酶、T4 连接酶及 Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司。人心肌细胞 cDNA 文库由王燕芳博士惠赠。酵母表达载体 pPIC9K 及宿主菌 GS115 购自 Invitrogen 公司。酵母培养基 Pepton、YNB(W/O) 为 Difco 公司产品, 其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 目的基因片段的扩增

引物由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物: 5'-TAGAATTCATGTCTAGTTCAGGTTCAA-3', 引入 *EcoRI* 位点, 下游引物: 5'-TAGCGGC-CGCTATTAATGTTTCACAGTGAT-3', 引入 *NotI* 位点。以人心肌细胞 cDNA 文库为模板, PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 45s, 68 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共 30 个循环, 最后延伸 10min。

1.3 重组质粒的构建

将 PCR 产物插入 pGEM-T 载体, 转化宿主菌 DH5 α , 提取质粒, DNA 测序正确后, 以 *EcoRI* 及 *NotI* 双酶切, 回收 948bp 片段, 插入 pPIC9K 的相同位点, 连接产物转化宿主菌 DH5 α , 提取质粒, 酶切鉴定。

1.4 质粒转化酵母宿主菌

按文献[4]方法将酵母菌 GS115 制备成感受态, 取出 80 μ L 与 5~10 μ g *BglII* 线性化的重组表达质粒混合, 转入 0.2cm 电转杯, 冰浴 5min, 于 Bio-

收稿日期: 1999-08-06 修回日期: 2000-03-27。

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(102-08-01-03)。

* 现地址: 中国人民解放军第一军医大学分子免疫学研究所, 广州 510515 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Rad Gene Pulser 电转仪 1500V, 25 μ F, 200 Ω 条件下转化, 然后将菌液涂布于 MD/-His(1.34% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % Biotin, 2% Dextrose, 1.5% Agar)选择平板上, 30 $^{\circ}$ C 孵育 2~3d, 观察转化子的生长。

1.5 转化子表型的筛选

筛选 His⁺ Mut^s 表型转化子。将转化菌落分别对应地点在 MM[1.34% YNB (4 $\times 10^{-5}$) % Biotin, 0.5% Methanol, 1.5% Agar]和 MD 选择平板上, 筛选在 MM 平板上生长缓慢而在 MD 平板上生长良好的菌株作为表达株。

1.6 转化子的 PCR 检测

接种单菌落于 10 μ L 无菌水中, 加入 5 μ L Lyticase(5u/ μ L), 30 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 再置液氮中 1min, 室温下解冻后用作模板, 以 α -Factor 和 3' AOX1 引物作 PCR 检测。

1.7 表达菌株的诱导表达

接种单菌落于 100mL BMGY 培养基[1% Yeast extract, 2% Pepton, 100mmol/L Potassium phosphate, pH6.0, 1.34% YNB (4 $\times 10^{-5}$) % Biotin, 1% Glycerol]于 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ \approx 4.0, 离心收集菌体, 用 20mL BMMY 培养基(BMGY 中的 1% Glycerol 换为 1% Methanol)重悬培养, 每日取样 1mL, 并补加甲醇于培养基至终浓度为 1%, 诱导表达 6 d, 离心收集上清, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 表达产物的免疫学鉴定

ELISA 及 Western blot 方法参见文献[5], 兔抗人 Flt-1(1-3)多抗是本室以原核表达纯化的 Flt-1(1-3)免疫家兔制备的。

1.9 生物学活性检测

1.9.1 Flt-1 对 VEGF 的固相结合实验: 将 Flt-1 表达上清用包被液在酶标板上倍比稀释, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 每孔加 rhVEGF 100 μ L(浓度约为 150 μ g/mL), 然后依次加 1:500 鼠抗人 hVEGF 单抗 1:200 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 最后加 100 μ L 底物液, 避光显色 20min 后, 用 ELISA 检测仪读取 OD₄₉₀ 值, P/N \geq 2.1 为阳性。

1.9.2 Flt-1 对 VEGF 生物学活性的影响: 将 Flt-1 表达上清在 96 孔板上倍比稀释, 每孔加入 hVEGF(40ng/mL) 50 μ L, 然后加入 HUVEGC 100 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 36h, 然后用 MTT 法测定结果。

2 实验结果

2.1 重组质粒的构建和鉴定

重组质粒的构建如图 1。PCR 扩增的 Flt-1(1-3)基因片段长度为 948bp, 与预计的大小相符, 插入 pGEM-T 载体, 转化宿主菌 DH5 α , 提取质粒, DNA 序列分析证实与国外文献报道一致。重组质粒 pPIC9K/Flt-1(1-3)经 *Eco*RI + *Not*I 双酶切鉴定, 得到相应片段(图 2)。

2.2 重组蛋白的表达

转化子经 MM 和 MD 选择平板两次筛选, 获得

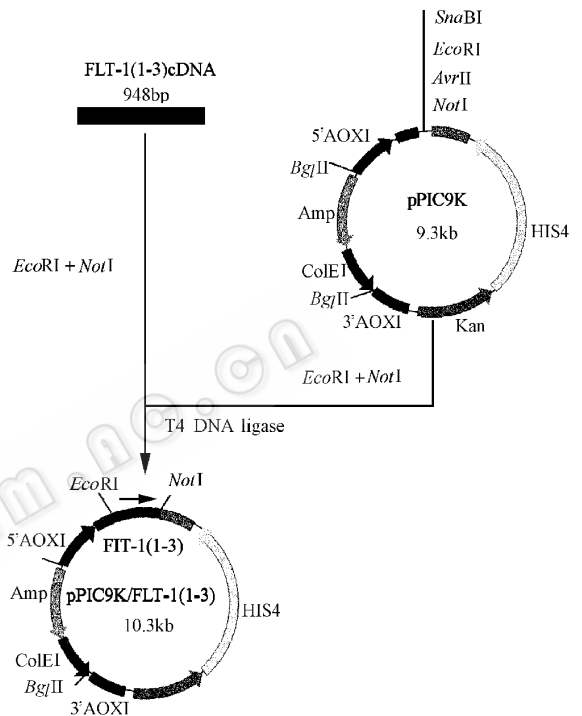


图 1 重组质粒 pPIC9K/Flt-1(1-3)的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K/Flt-1(1-3)

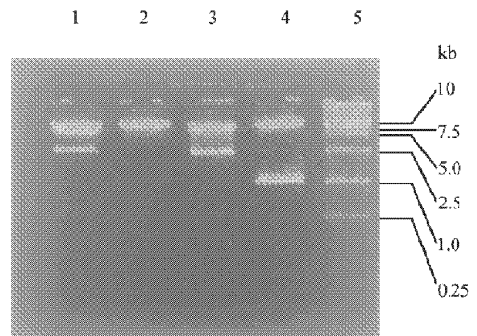


图 2 重组质粒 pPIC9K/Flt-1(1-3)的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction map of plasmids pPIC9K/Flt-1(1-3)

1. pPIC9K digested by *Bgl*II (2.4kb + 6.9kb)

2. pPIC9K digested by *Eco*RI + *Not*I (9.3kb)

3. pPIC9K/Flt-1(1-3) digested by *Bgl*II (2.4kb + 7.85kb)

4. pPIC9K/Flt-1(1-3) digested by *Eco*RI + *Not*I (948bp + 9.3kb)

5. DL13000 standard molecular markers

正确整合的 His⁺ Mut^s 表型转化子,约占总菌落的 30%,提取菌体 DNA,用 α -Factor 和 3' AOX1 引物作 PCR 检测,得到 1265bp 大小的特异片段,表明转化子基因组中确实整合有 Flt-1(1-3)基因。SDS-PAGE 分析甲醇诱导时间对表达量的影响发现,甲醇诱导第 1 天,即有表达产物出现,但表达量较低,随着表达时间的延长,表达量也逐步增高,到第 4 天达到高峰,经双波长薄层扫描,表达量最高可达上清总蛋白的 30% 以上(图 3)。

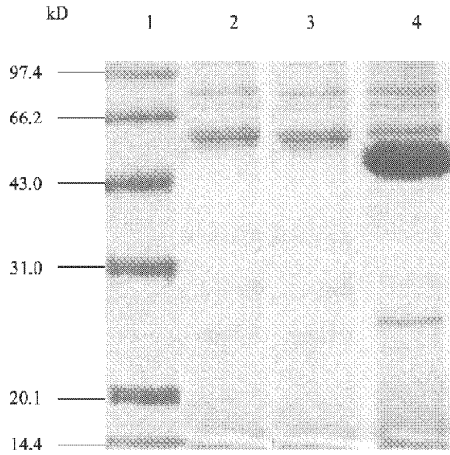


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression product

1. Expression supernatant of strain GS115/pPIC9K/Flt-1(1-3)
2. Molecular weight Standard
3. Non-induced supernatant of strain GS115/pPIC9K/Flt-1(1-3)
4. Induced supernatant of strain GS115/pPIC9K

2.3 表达产物的免疫学鉴定

ELISA 结果表明,抗 Flt-1 多抗与表达产物呈强阳性反应,而与空载体对照上清无反应。Western blot 结果显示,在分子量 48kD 处出现一条特异性条带(图 4)。

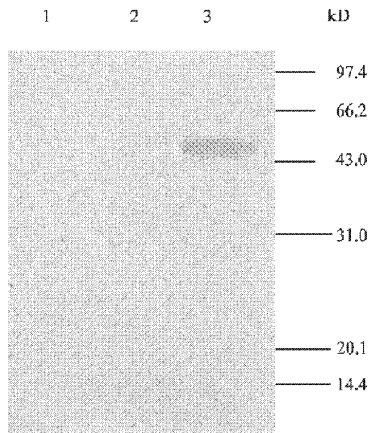


图 4 表达产物的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of the expression product

2.4 生物学活性测定

2.4.1 固相结合实验结果表明,不同稀释度的 Flt-1(1-3)表达上清与 hVEGF 之间均可发生结合反应,OD_{490nm} 值的大小与 Flt-1(1-3)浓度呈正相关,而空载体对照上清与 VEGF 之间无结合,呈阴性反应。说明 Flt-1 胞外 1-3 loop 具有与 hVEGF 结合的能力(图 5)。

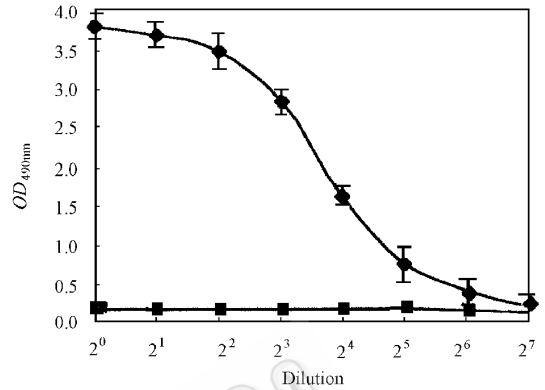


图 5 Flt-1(1-3)与 hVEGF 的固相结合实验结果

Fig.5 Solid phase binding assay of Flt-1(1-3) with hVEGF

—◆— Flt-1; —■— Control supernatant

2.4.2 MTT 法活性检测结果显示,Flt-1(1-3)表达上清呈剂量依赖性地抑制 hVEGF 对 HUVEC 的促增殖作用,而空载体对照上清对 hVEGF 刺激的 HUVEC 增殖无影响(图 6)。

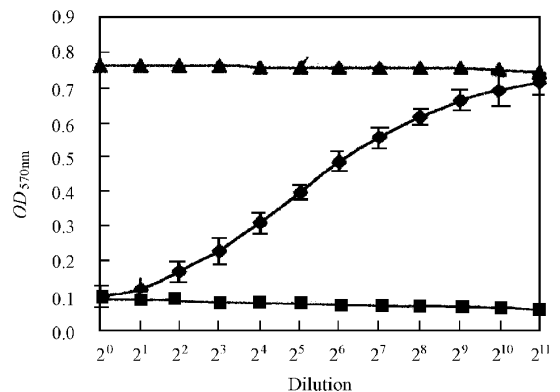


图 6 Flt-1(1-3)与 hVEGF₁₆₅刺激 HUVEC 增殖的抑制作用

Fig.6 Inhibition of Flt-1(1-3) on HUVEC proliferation stimulated by hVEGF

—◆— VEGF + FLT-1; —□— Control supernatant;
—▲— VEGF + Control supernatant

3 讨论

表达载体与酵母染色体的整合方式有两种。一种是载体线性化后形成游离的 AOX, 5'端和 3'端

与宿主染色体的同源区发生双交换,取代宿主染色体 AOX₁ 编码区^[5]。另一种是载体线性化后不产生游离的 AOX₁ 5'端和 3'端,与宿主染色体发生单交换整合^[6],或整合入 AOX₁ 位点,或整合入 His4 位点。一般来讲,整合的拷贝数越多,表达量越高^[7,8],但不是绝对的,有时单拷贝和多拷贝对表达量没有影响,甚至多拷贝引起表达量下降^[9]。本研究采用 BglII 单酶切使表达载体线性化,表达框架与宿主基因组发生双交换而整合于染色体中。文献报道单交换转化效率比双交换高,且易得到多拷贝整合,多拷贝整合发生的机率约为 1%~10%^[10],

由此推测本研究获得的表达株可能仅含单拷贝外源基因。至于各个阳性克隆之间表达水平存在差异的确切原因还不清楚,可能是基因整合时,宿主非同源区基因结构发生改变所致。

本文成功地利用酵母表达载体在 *Pichia pastoris* 高效表达了可溶性人血管内皮生长因子受体 Flt-1 胞外 1-3 loop 片段,并证实它具有 VEGF 结合活性和抑制 VEGF 对 HUVEC 的促增殖功能,这对进一步研究其在肿瘤、糖尿病性视网膜病变等血管生成相关疾病的治疗应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Klagsbrun M, Patricia A D. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1996, 7(3): 259~270
- [2] Barleon B, Totzke K, Herzog C *et al.* *J Bio Chem*, 1997, 272(16): 10382~10388
- [3] Bathust I C. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 50(4): 20~26
- [4] Scorer C A, Clare J J, McCombie W R *et al.* *Bio/Technology*, 1994, 12: 181~184
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989, 1: 21~6, 32
- [6] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. *Yeast*, 1992, 8: 423~428
- [7] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R *et al.* *Biochemistry*, 1989, 28: 4117~4125
- [8] Siegel R S, Buckholz R G, Thill G P *et al.* *Publication*, 1990, No. WO91/10697
- [9] Thill G P, Davis G R, Stillman C *et al.* *Societe Francaise de Microbiologie Paris*, 1990, 2: 477~490
- [10] Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P *et al.* *Bio/Technology*, 1991, 9: 455~460

Expression and Characterization of Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Flt-1 Extracellular Domain in *Pichia pastoris*

MA Li ZHANG Zhi-Qing ZHOU Xiao-Ming ZENG Ge-Fei CHEN Ai-Jun YAO Li-Hong WANG Xiao-Ning
(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)

Abstract By inserting VEGF receptor Flt-1(1-3 loop) cDNA into *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K containing AOX₁ promoter and the sequences of α secreting signal peptides, the expression plasmid pPIC9K/Flt-1(1-3) was constructed and transformed into GS115. The multi-copy insert transformants were selected and cultivated in flasks. After 4 days of 1% methanol induction, the expressed Flt-1(1-3) accumulated up to 30% of total proteins in supernatant. The expressed Flt-1(1-3) was further proved with good antigenicity and high specificity by ELISA and Western blot. They can bind to VEGF and inhibit HUVEC proliferation stimulated by VEGF.

Key words Flt-1, VEGF, *Pichia pastoris*, expression