

人血管内皮细胞生长因子在毕赤酵母中的高效表达

阎锡蕴 汤 健 黄宇鸿

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

关键词 人血管内皮细胞生长因子,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),蛋白表达

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0531-03

血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor,简称 VEGF)是一类多功能细胞因子,特异地作用于血管内皮受体 KDR 和 Flt-1,促进新生血管形成并增加微血管的渗透性^[1]。VEGF 在生理和病理,如肿瘤血管发生、伤口愈合和、类风湿性关节炎、胚胎发育及冠心病等过程中起着非常重要的作用。

天然 VEGF 是由两条糖蛋白链形成的二聚体。目前发现 VEGF 至少有 5 种亚型,根据单体残基数不同分别为 VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆,其中 VEGF₁₂₁和 VEGF₁₆₅是以可溶性蛋白形式分泌于细胞外发挥生物活性,其他则与胞外基质结合而被储存。

VEGF 基因在酵母^[2]昆虫^[3]以及大肠杆菌^[4]宿主细胞中均获得表达。作者曾用大肠杆菌高效表达了 VEGF,然而,包含体 VEGF 的复性不仅费时费力,而且损失较大。因此,本实验选用了 *P. pastoris* 酵母表达系统,其主要优点是分泌表达的外源蛋白为可溶性,蛋白糖基化更接近于人体,表达的生物制剂用于人体疾病的治疗免疫原性小。

1 材料和方法

1.1 材料

重组质粒 pET-3d-VEGF₁₆₅由德国福莱堡分子医学研究所馈赠;质粒 pGEM[®]-7Zf、大肠杆菌 JM109、DH5 α 购自 Promega 公司; *Pichia pastoris*(GS115),质粒 pHIL-S1 及其大肠杆菌宿主菌 TOP10F',酵母菌基本培养基(YNB) 购自 Invitrogen 公司;各种内切酶及工具酶均购自美国 Bio-Labs 公司;VEGF 鼠单克隆抗体 2E1 购自日本株式会社免疫生物研究所,HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自北京天象人公司,培养基 YEPI(2% Tryptone + 1% Yeast Extract + 2% Glucose);MD (YNB + 1% Dextrose);MM(YNB + 0.5% Methanol);BMGY (YNB + 2% Tryptone + 1% Yeast Extract + 1% Glycerol);电击转化仪 GenePulser[®] 为 BioRad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组 VEGF 酵母表达载体的构建和鉴定

pET-3d-VEGF₁₆₅用 *Nco*I 单酶切,经 Klenow 酶补平,再用 *Bam*HI 酶切,回收 VEGF₁₆₅ 基因片段,与经 *Sma*I、*Bam*HI 双酶切的 pGEM-7Zf 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒;用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 分别双酶切酵母表达载体 pHIL-S1 和 pGEM-7Zf-VEGF₁₆₅,回收并连接酶切产物,转化 *E. coli* TOP10F'。

1.2.2 基因转化及转化子鉴定:用 *Dra*I 酶切重组表达质粒 pHIL-S1-VEGF₁₆₅,将线性化质粒 1~3 μ g 电击转入酵母感受态细胞 GS115,立即向槽内加入 1 mL 冰冷的 1 mmol/L 山梨醇,混匀后,取 200 μ L 菌液涂布到 MD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d。将 MD 平板上生长的转化菌落按先后顺序分别接种到 MM 和 MD 平板上的相应位置,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d,根据菌落在 MM 平板上的生长情况,鉴定转化子的表型。一般地,在 MM 平板上生长正常的转化子是 Mut⁺型,而在 MM 平板上生长较弱的转化子是 Mus^S型。根据转化子的表型采用不同的诱导方法表达外源蛋白^[5]。

采用斑点杂交法进一步检测 VEGF₁₆₅ 基因是否整合到 *P. pastoris* 酵母染色体上。选取 Mut⁺ 和 Mut^S 转化子分别接种到 YEPI 中,30 $^{\circ}$ C 培养 24 h,取 20 μ L 菌液均匀点到硝酸纤维素膜上,用 α -³²P-dATP 标记 VEGF₁₆₅ 基因片段,制备杂交探针。参照文献 5 进行斑点杂交。

1.2.3 VEGF₁₆₅ 基因表达及鉴定:按试剂盒介绍的方法,选取转化菌分别接种 BMGY 培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ = 2~6,离心收集菌体,重悬于 BMGY 中,30 $^{\circ}$ C 培养 48 h,每隔 24 h 加入 0.5% 甲醇(Mut⁺)诱导表达。用 SDS-PAGE 鉴定 VEGF₁₆₅ 的表达。

2 结果与讨论

2.1 重组酵母表达载体 pHIL-S1-VEGF₁₆₅ 的构建及 *P. pastoris* 酵母转化子的鉴定

首先将 VEGF₁₆₅ 亚克隆至 pGEM-7Zf 载体上,再利用

pGEM-7Zf 和酵母表达载体 pHIL-S1 上共同的 *Eco*RI 和 *Bam*HI 位点,将 VEGF₁₆₅ 基因亚克隆至 pHIL-S1 上,构建重组酵母表达载体 pHIL-S1-VEGF₁₆₅,各步酶切产物都经琼脂糖凝胶电泳分析和鉴定(图 1)。

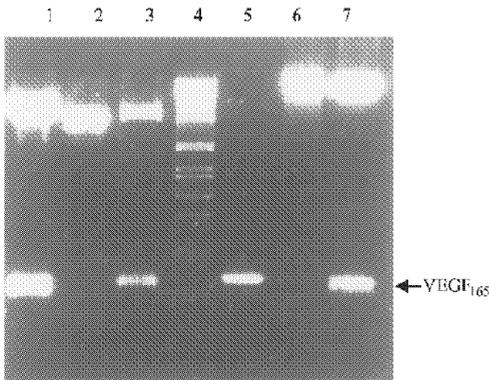


图 1 酶切分析 VEGF₁₆₅ *P. pastoris* 酵母表达质粒

1. Digested pET3d-VEGF₁₆₅ by *Nco*I and *Bam*HI
2. Digested pGEM-7Zf by *Sma*I and *Bam*HI
3. Digested pGEM-7Zf-VEGF₁₆₅ by *Bam*HI and *Eco*RI
4. DNA Marker(λDNA/SppI/*Eco*RI);
5. Purified VEGF₁₆₅ gene from the digested pGEM-7Zf-VEGF₁₆₅ by *Bam*HI and *Eco*RI
6. Digested pHIL-S1 by *Bam*HI and *Eco*RI
7. Digested pHIL-S1-VEGF₁₆₅ by *Bam*HI and *Eco*RI

为了使 VEGF₁₆₅ 基因整合到酵母染色体上,首先用 *Dra*I 酶切重组质粒 pHIL-S1-VEGF₁₆₅ 使其线性化,然后电击转入 *P. pastoris* 酵母 GS115。由于 GS115 为组氨酸缺陷型(*His*⁻)菌株,在基本培养基 MD 上不生长,因此在 MD 上出现的克隆被初步认为是含有重组质粒的转化子。

随机挑取十几个转化子用 DNA 斑点杂交实验进一步鉴定重组质粒,获得 21 个杂交阳性转化子,确定 VEGF₁₆₅ 基因已整合到 *P. pastoris* 酵母染色体上。

根据线性化质粒在 *P. pastoris* 酵母染色体上整合位点是否使乙醇氧化酶(AOX1)基因突变,所得酵母转化子有 *His*⁺/*Mut*⁺ 和 *His*⁺/*Mut*^s 两种表型,*His*⁺/*Mut*⁺ 型菌利用甲醇作碳源效率高,在基本培养基 MM 上生长正常,而 *His*⁺/*Mut*^s 型菌利用甲醇作碳源效率低,在 MM 上生长较慢。表型鉴定结果,21 个阳性转化子中,有 13 个为 *His*⁺/*Mut*⁺, 8 个为 *His*⁺/*Mut*^s, 这对于选择不同诱导条件具有指导意义。

2.2 VEGF₁₆₅ 基因在 *P. pastoris* 酵母中的表达和鉴定

将斑点杂交阳性的转化子培养在 BMMY 中,经甲醇诱

导 *Mut*⁺ 表达 48 h,收集菌液离心后,上清用 TCA 沉淀,SDS-PAGE 鉴定蛋白表达。其中有一株 *Mut*⁺ 型菌表达了可溶性 VEGF₁₆₅ 二聚体,表达量约占培养上清总蛋白的 47%,分子量约 46 kD(图 2),略大于大肠杆菌表达的 VEGF₁₆₅ 复性后产物(43 kD),这大概是由于 VEGF₁₆₅ 在酵母中糖基化所致。点免疫印迹结果表明 *P. pastoris* 酵母分泌表达的人重组 VEGF₁₆₅ 具有结合其受体 *flt*-1 和 KDR 生物活性(图 3)。

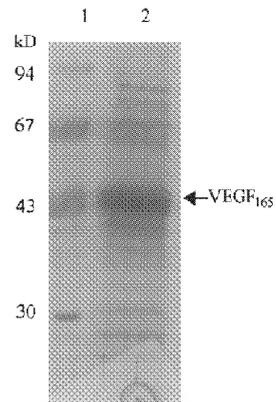


图 2 SDS-PAGE 分析 VEGF₁₆₅ 基因在 *P. pastoris* 酵母中的表达

1. Protein standard marker; 2. Culture supernatant of pHIL-S1-VEGF₁₆₅ transformed yeast *P. pastoris*

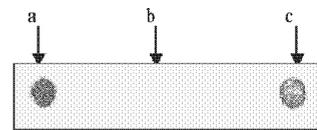


图 3 点免疫印迹鉴定 VEGF₁₆₅ 的生物活性

The expressed VEGF₁₆₅ bound the purified receptors KDR(a) and Flt-1(c) dotted on nitrocellulose, but not bound human immunoglobulin(b)

以上结果说明 *P. pastoris* 酵母系统能够分泌表达具有生物功能的 VEGF₁₆₅ 二聚体。在研究中我们注意到了影响 *P. pastoris* 酵母表达的因素,除外源基因本身影响表达量外,基因拷贝数与外源蛋白的表达量有正相关。因此,用斑点杂交法筛选高拷贝转化子是十分必要的,但并非所有的高拷贝转化子都能有效分泌外源蛋白,这可能是由于高水平表达阻断分泌途径所致。另外充足的氧气是 *P. pastoris* 酵母高效表达所必需的。有报道在发酵条件下外源蛋白表达量比摇瓶培养条件下高 10~100 倍。

参 考 文 献

- [1] Leung D W, Cachinanes G, Kuang W J *et al.* *Science*, 1989, 246: 1306~1309
- [2] Mohanraj D, Olson T A, Ramankrishnan S. *Growth Factor*, 1995, 12. ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [3] Fiebich B L, Janger B, Schollmann C *et al.* *Eur J Biochem* ,1993 **211** :19~26
- [4] Siemeister G, Schnurr B, Katja M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* ,1996 **222** :249~255
- [5] *Pichia pastoris* Expression kit a Laboratory Manual. Invitrogen B V

High-level Expression of Human Vascular Endothelial Growth Factor in *Pichia pastoris*

YAN Xi-Yun TANG Jian HUANG Yu-Hong

(State Key Laboratory of Microbial Resources, The Chinese Academy of Sciences Beijing 100080)

Abstract The gene of VEGF₁₆₅ was subcloned into the *P. pastoris* secretive expression vector pHIL-S1 and the recombinant expression plasmid pHIL-S1-VEGF₁₆₅ was constructed. After transformation into yeast GS115, the positive transformants were obtained through phenotype selection and DNA Dot blotting. After induction by methanol, soluble dimer VEGF₁₆₅ were expressed and secreted into the culture supernatant with its expression occupying 47% of the total protein in the supernatant. Dot blot analysis showed that the expressed human VEGF₁₆₅ could bind to its receptors flt-1 and KDR.

Key words Human vascular endothelial growth factor, *Pichia pastoris*, protein expression