

内皮细胞抑制素在毕节酵母中的表达与活性分析^{*}

吴江雪, 符武钊, 张添元, 罗进贤, 吴群悦

(中山大学基因工程教育部重点实验室 // 生物化学系, 广东 广州 510275)

摘要: 采用 PCR 技术从人胎脑 cDNA 库中扩增了人内皮细胞抑制素基因。经 DNA 序列分析后将扩增的基因克隆至酵母载体 pPIC9K, 获得的重组质粒 pPIC9K-EDN 转化毕节酵母 GS115, 构建表达内皮细胞抑制素的酵母工程菌 *P. pastoris* GS115 (pPIC9K-EDN)。SDS PAGE 分析结果显示: 人内皮细胞抑制素在重组酵母 GS115 (pPIC9K-EDN) 中获得高效表达。用 30 L 发酵罐构建的工程菌进行高密度发酵, 经甲醇诱导 48 h, 生物量达到 250 OD, 分泌量为 150 mg/L, 发酵液经 SP Streamline, SP Sepharose FF 阳离子交换柱和 Sepharose Heparin Hi Trap 柱纯化, 产物纯度达到 98%。纯化产物具有免疫活性并能抑制 bFGF 诱导的鸡胚绒毛尿囊膜血管生成。

关键词: 人内皮细胞抑制素; 基因表达; 毕节酵母; 高密度发酵; 纯化与生物活性分析

中图分类号: Q95-336 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 06-0083-04

肿瘤的生长和转移与其血管的生成密切相关。抑制肿瘤新生血管的生成, 阻断其血液供应会导致肿瘤饥饿、退化, 因此抑制肿瘤的血管生成成为肿瘤研究和治疗的新靶点之一^[1,2]。内皮细胞抑制素 (endostatin, EDN) 是从鼠血管内皮细胞瘤中分离到的一种新的抑制因子, 它相当于胶原蛋白 XVIII C 端约 20 000 的片段, 动物实验证明它能抑制新生血管的生成和肿瘤的生长^[3,4]。毕节酵母是一种新的重组蛋白表达系统, 它除具有高效表达外源蛋白的能力和完善的分泌系统和翻译后加工机制外, 还具有在常规条件下进行高密度发酵的优点, 有利于工业化生产^[5]。本文采用毕节酵母表达系统, 将人内皮细胞抑制素基因克隆至大肠杆菌—毕节酵母表达载体, 构建能表达人内皮细胞抑制素的酵母工程菌并对其生产重组人内皮细胞抑制素的中试工艺包括高密度发酵和纯化方法做了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒 pPIC9K, 毕节酵母 GS115 购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 DH 5 α 为本室保存。

1.1.2 培养基与主要试剂 大肠杆菌培养用 LB 培养基, 酵母培养采用 MD, YPD, BMMY, BMGY 培养基, 发酵基础培养基, PTM1 配方见 Invitrogen 公司实验手册。

各种限制酶和修饰酶购自华美生物工程公司及 GIBCO-BRL 公司, 阳离子交换柱 SP Streamline, SP Sepharose Fast Flow, Heparin Sepharose HiTrap 亲和柱购自 Pharmacia 公司, 蛋白胨购自北京奥博星公司, 酵母膏为 OXOID 公司产品, 山羊抗 m-EDN IgG 购自 R&D 公司, 辣根过氧化物酶标记的驴抗山羊 IgG 购自鼎国公司, 其余为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 克隆方法 DNA 的提取, 纯化, 酶切, 片段回收, *E. coli* 转化, SDS PAGE 参照分子克隆的方法进行。

1.2.2 PCR 扩增 以人胎脑 cDNA 库为模板及合成的二段序列为引物进行扩增, 扩增条件为第 1 循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 以后每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 30 个循环。

1.2.3 PCR 产物的克隆和序列分析 PCR 产物先克隆至质粒 pBluescript M13, 利用 M13 通用引物进行序列分析。

1.2.4 酵母表达载体 pPIC9K-EDN 的转化和重组转化子的筛选 表达载体经 *Sal* I 酶切, 线性化后取 10 μg 用电激法转化毕节酵母 GS115, 条件为 1 500 V, 25 μF , 200 Ω , 电激的菌液涂于 MD 板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~4 d 观察转化子的生长情况。挑取部分能在 MD 板上生长的转化子提取染色体 DNA, 用 5' AOX 与 3' AOX 引物进行 PCR, 确定含 EDN 基因的

* 收稿日期: 2002-12-23

基金项目: 广东省重点科技攻关资助项目 (2KM02502G)

作者简介: 吴江雪 (1974 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: Lsbr02@zsu.edu.cn

阳性转化子，再将阳性转化子点种在含不同浓度 G418 (1 000~3 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 YPD 平板上，挑选高拷贝整合的转化子。

1.2.5 内皮细胞抑制素在 GS115 (pPIC9K-EDN) 中的表达 经 G418 筛选的转化子单菌落接种于 BMGY 培养基中，培养至 $A_{600}=2\sim6$ 后用甲醇诱导，定时取发酵上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 30 L 罐高密度发酵 在德国产 *B. braun* 30 L 生物反应器中进行。发酵条件参考文献 [6]。

1.2.7 蛋白纯化 10 L 发酵上清液以 1:2 体积用水稀释后上 Streamline SP 离子交换柱 (床体积约 1.6 L)，经冲洗后用含 1 mol/L NaCl 的磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 洗脱，洗脱液用超滤浓缩后上 SP Sepharose FF 柱 (床体积 80 mL)，以 0~1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱，洗脱液用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 透析后上 Heparin Sepharose 亲和层析柱 (床体积 5 mL)，洗柱后用含 0~1 mol/L NaCl 的磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 进行梯度洗脱。用 SDS-PAGE ($w=5\%$ 浓缩胶， $w=12\%$ 分离胶) 分析纯化情况。

1.2.8 表达产物的抗血管生成活性分析 取孵化 6 d 的鸡蛋，消毒后在气室下方开 1 cm $\times$ 0.5 cm 的小窗，放入 0.5 cm $\times$ 0.8 cm 的滤纸片，实验组的滤纸上加 30 μg bFGF 和 10 μg 内皮细胞抑制素，对照组的滤纸上加有 30 μg bFGF 和 10 μL 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 2 d 后观察结果。

2 结果与讨论

2.1 人内皮细胞抑制素的克隆

2.1.1 PCR 引物的设计与合成 根据人胶原蛋白 X VIII C 端非胶原区的 cDNA 序列^[8]，设计合成了如下 1 对序列：

5'端引物：
5' ATTAGAATTCCACAGCCACCGCGACTTCCAG 3'
EcoRI
3'端引物：
5' CCGCGGCCGCTACTTGGAGGCAGTCATGAAGCT 3'
NotI

为方便基因操作，在 5' 端引物上加 EcoRI 酶切位点，在 3' 端引物上加 Not I 酶切位点。

2.1.2 PCR 扩增和序列分析 以人胎脑 cDNA 库为模板，以合成的二段序列为引物，用 PCR 方法合成得到一条约 550 bp 的 DNA 片段。该片段 (PCR 产物) 直接克隆至质粒 pBluescript M13，获得的质粒 pBS-EDN 进行 DNA 序列分析，证实扩增产物为

人内皮细胞抑制素基因 (具体序列从略)。

2.2 表达载体 pPIC9K-EDN 的构建

用 EcoRI 和 Not I 从 pBS-EDN 上切下 EDN 基因克隆至 pPIC9K 的 EcoRI 和 Not I 位点之间，构建含 EDN 基因的酵母表达载体 pPIC9K-EDN。用 EcoRI 和 Not I 双酶切 pPIC9K-EDN，得到两条带，一条大小与 pPIC9K 一致，一条大小与 PCR 产物一致。表达载体的物理图谱和酶切鉴定结果见图 1。

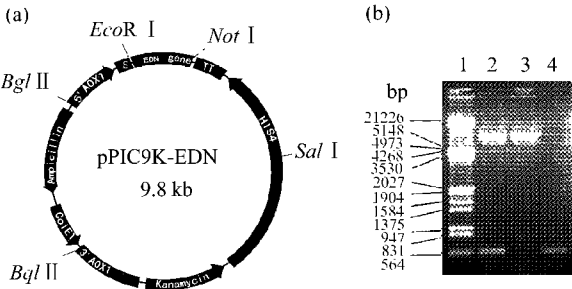


图 1 表达载体 pPIC9K-EDN 的构建图

Fig 1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-EDN

(a) pPIC9K-EDN 的物理图谱；

(b) pPIC9K-EDN 的酶切电泳图

1: λ /EcoRI + HindIII; 2: pPIC9K-EDN/EcoRI + NotI ;
3: pPIC9K/EcoRI ; 4: PCR 产物

2.3 毕节酵母工程菌高拷贝转化子的筛选

按 1.2.4 的方法将表达载体 pPIC9K-EDN 转化毕节酵母 GS115 后在 MD 平板上长出许多转化子，然后用 PCR 方法筛选整合了 EDN 基因的阳性转化子，从测试的 400 个菌落中筛选出 367 个含 EDN 基因阳性的转化子，再将这些阳性转化子点种到含不同 G418 浓度的 YPD 平板上，最后从含 3 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 YPD 平板上选出菌落较大的转化子做下一步 EDN 表达研究。

2.4 内皮细胞抑制素在毕节酵母 GS115 (pPIC9K-EDN) 中的表达

将在 3 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 平板上生长较好的转化子在摇瓶中进行发酵，研究 EDN 基因的表达水平。条件是在 500 mL 三角瓶中装 50 mL BMGY 培养基，转化子在其中培养至 A_{600} 达 2~6 时，转种至含甲醇的 BMMY 培养基中并保持甲醇的体积分数为 1% 以诱导基因的表达，每 24 h 取表达上清进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 2。从图中可见，重组转化子 GS115 (pPIC9K-EDN) 在 20 000 处出现一条新的蛋白带而 GS115 (pPIC9K) 的泳道上没有新的蛋白带。SDS PAGE 结果还显示 48 h 的样品即可见清晰的表达带，72 h 表达量达到高峰 (电泳图略)。经发酵筛选表达水平最高的转化子命名为 GS115 (pPIC9K-EDN)。

2.5 酵母工程菌 GS115(pPIC9K-EDN) 高密度发酵

接种 GS115 (pPIC9K-EDN) 单菌落于 5 mL BMGY 培养基中, 30 ℃培养过夜, 转种至 1 L BMGY 培养基中作为种子液, 继续培养至 $A_{600}=6$ 时, 以 10% 的量转种至发酵培养基。高密度发酵用 30 L 反应器, 发酵液初始体积为 10 L, 温度 30 ℃, 用氨水调 pH 5.0, 甘油培养约 12 h 后以 36 ~ 72 mL/h 的速度补料, 加入含 PTM1 盐的 $\varphi=50\%$ 甘油 (12 mL PTM1/L), 培养 24 h 至 A_{600} 达到 150 时, 开始甲醇诱导并逐渐加大甲醇的流加速度, 同时控制溶氧值在 20% ~ 30%, 甲醇诱导 48 h 后停止发酵, 最后取得发酵液 12 L。光密度分析发酵液最终细胞浓度为 $A_{600}=250$ (常规发酵 $A_{600}=30\sim40$)。取 10 μ L 上清进行 SDS-PAGE。电泳结果显示 (如图 3), EDN 在诱导 48 h 表达量达到最高, 经凝胶光密度扫描和蛋白含量分析, 表达量约为 150 mg/L。

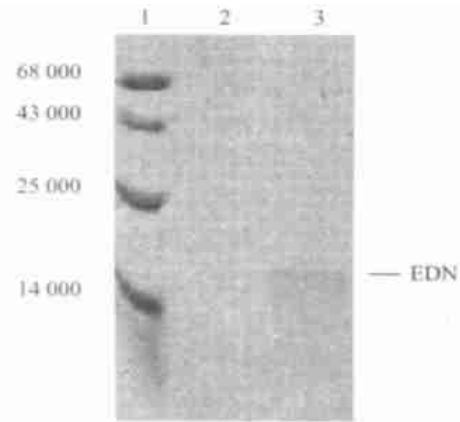


图2 内皮细胞抑制素的表达

Fig. 2 Expression of endostatin

- 1: 蛋白质相对分子质量标准;
- 2: GS115(pPIC9K) 摇瓶发酵 72 h 诱导上清;
- 3: GS115(pPIC9K-EDN) 摇瓶发酵 72 h 诱导上清

2.6 表达产物的纯化

发酵液稀释后先后上 Streamline SP 柱、SP Sepharose FF 离子交换柱和 Heparin Sepharose Hi Trap 亲和柱, 分别取样进行 SDS-PAGE, 结果显示 (如图 3), 经过 3 次层析纯化后, 产物呈现一条带, 纯度 98%, 回收率 60%。

2.7 表达产物的生物活性分析

2.7.1 免疫活性分析 (ELISA) 将纯化样品包被到酶标板上, 利用山羊抗 m-EDN Ig G 进行酶联免疫显色反应。实验结果如图 4, 证明表达产物具有天然 EDN 的免疫反应活性。

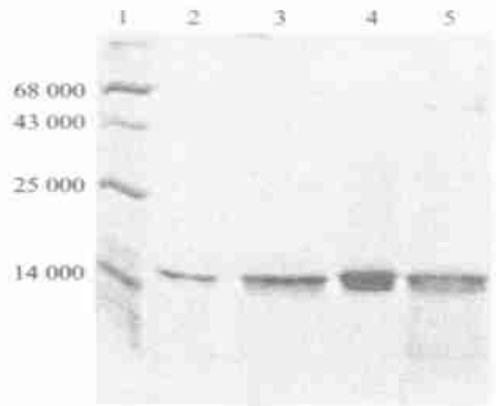


图3 内皮细胞抑制素的纯化

Fig. 3 Purification of endostatin

- 1: 蛋白质相对分子质量标准;
- 2: 过 Sepharose Heparin Hi Trap 柱样品;
- 3: 过 SP Sepharose FF 柱样品;
- 4: 过 SP Streamline 柱样品;
- 5: GS115(pPIC9K-EDN) 高密度发酵 48 h 诱导上清

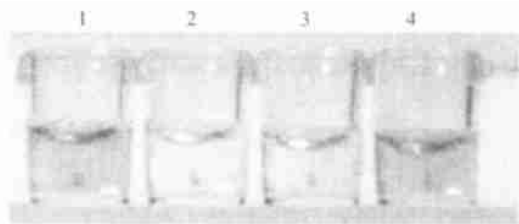


图4 表达产物的 ELISA 分析结果

Fig. 4 ELISA test of expressed product

- 1: 正对照; 2: 负对照;
- 3: GS115 总蛋白; 4: 纯化产物

2.7.2 鸡胚尿囊膜血管生成抑制活性分析 按 1.2.8 的方法分析表达产物的抗血管生成活性。图 5 显示, 加了 bFGF 和 EDN 样品的实验组鸡胚基本无新生血管的生成, 而仅加 bFGF 的鸡胚形成毛细血管丛, 证明表达产物能抑制新生血管的生成。

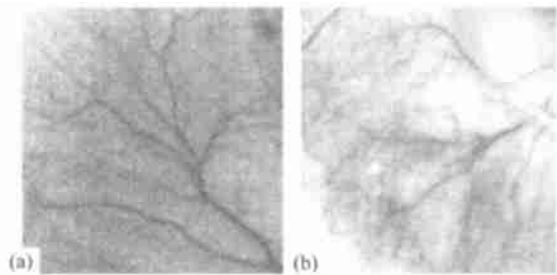


图5 表达产物对鸡胚尿囊膜血管生成的抑制作用

Fig. 5 Anti-angiogenesis activity of expressed product on CAM
(a) 对照组 (bFGF 处理);
(b) 实验组 (bFGF+EDN 处理)

本文采用表达载体 pPIC9K, 在毕节酵母 GS115 中表达人内皮细胞抑制素, 并在 30 L 生物反应器中对酵母工程菌的高密度发酵条件进行了初步研究和蛋白样品的大批量纯化方法摸索, 建立了工程菌的发酵和纯化工艺, 为内皮细胞抑制素的工业化生产打下了基础。

参考文献:

[1] ZETTER B R. Angiogenesis and tumor metastasis[J] . Annu Rev Med, 1998 49: 407—424.

[2] CAO Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications[J] . Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(4) : 357—369.

[3] O' REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J] . Cell, 1997, 24: 88(2) : 277—285.

[4] KIM Y M, JANG J W, LEE O H, et al. Endostatin inhibits

endothelial and tumor cellular invasion by blocking theactivation and catalytic activity of matrix metalloproteinase [J] . Cancer Res, 2000, 60(19) : 5410—5413.

[5] ROMANS M A. Advances in the use of Pichia pastoris for high level gene expression[J] . Current Opinion Biotechnol, 1995, 6: 527.

[6] Nilsen S L, DEFORD M E. High level secretion in pichia pastoris and biochemical characterization of the recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator[J] . Biotechnol Appl Biochem, 1997, 20, 63—74.

[7] LUO J X, LU W J, LI W Q, et al, Cloning, sequencing of human angiostatin gene and its expression in *E. coli* [J] . Progress in Natural Science, 1999, 9(9) : 672—677.

[8] SASAKI T, FKA I N. Structure, function and tissue forms of the C terminal globular domain of collagen X VIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin[J] . EMBO J, 1998, 17 (15) : 4249—4256.

Expression of Human Endostatin in *P. pastoris* and the Bioactivity of Its Product

WU Jiang xue, FU Wu zhao, ZHANG Tian yuan, LUO Jin xian, WU Qun yue
(Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //Department of Biochemistry, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Human endostatin gene was amplified from human fetal brain cDNA library by PCR technique and cloned into *E. coli* yeast vector pPIC9K. The resultant plasmid pPIC9K-EDN was transformed into *P. pastoris* GS115. SDS-PAGE analysis indicated that endostatin was expressed in yeast engineered strain GS115 (pPIC9K-EDN). The high cell density culture of GS115 (pPIC9K-EDN) was performed in a 30 liter bioreactor. After 48 h methanol induction, the cell density reaches $A_{600} = 250$ and secretion yield is 150 mg/L. The purity of the expressed product after purification with SP Streamline, SP Sepharose FF cation exchanger chromatographies and Heparin Sepharose affinity chromatography reached 98%. The purified product possessed immunoactivity and could inhibit CAM angiogenesis induced by bFGF.

Key words: human endostatin; gene expression; *P. pastoris*; high cell density culture; purification and bioactivity