

人血管抑制素基因克隆、表达和生物活性分析^{*}

张爱联, 罗进贤, 张添元, 罗学斌

(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: 应用 PCR 技术从人胎肝 cDNA 文库中扩增了人血管抑制素基因。将克隆的基因重组进酵母质粒 pPIC9K 获得含该基因的重组质粒 pPIC9KA3。用电激法将质粒 pPIC9K 转化毕节酵母 GS115, 经 PCR 检测获得含人血管抑制素基因的酵母工程菌 GS115 (pPIC9KA3)。再用 G418 筛选法, 在含不同浓度的 G418 平板上筛选高拷贝整合的转化子。对高拷贝整合的转化子进行发酵培养和诱导表达。SDS-PAGE 及 Western 印迹分析显示: 表达产物约占胞外蛋白的 43%, 相当于 94 mg/L, 并具有免疫活性。并能抑制 bFGF 诱导的鸡胚尿囊膜新生血管的生成。还对用 G418 筛选高拷贝整合转化子的方法做了探索。

关键词: 人血管抑制素; 基因表达; 毕节酵母; G418; 血管生成

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 03-0056-04

肿瘤的生长和转移与血管形成有关, 新生血管的生成是实体肿瘤得以迅速生长和转移的基础, 利用高效的血管生成抑制因子抑制血管生成切断肿瘤的营养供应, 达到抑制肿瘤和治疗肿瘤的目的是当前肿瘤研究的热点之一^[1]。血管抑制素 (Angiostatin) 是近年来发现的一种血管生成抑制因子, 相当于纤溶酶原的 K1-4 功能区。动物试验结果表明, 它能抑制移植于小鼠的黑色素瘤、纤维肉瘤、人肝癌、鼻咽癌、前列腺癌、乳腺癌的生长^[3]。毕节酵母 (*Pichia pastoris*) 是一类能以甲醇为唯一碳源和能源的酵母, 由于其能高效表达外源蛋白, 易于实现高密度发酵和产业化等特点, 已发展成为高效的第二代酵母表达系统^[4]。本文报道人血管抑制素基因的克隆扩增及其在毕节酵母中的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, 毕节酵母 GS115 及质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.2 酶和主要试剂

各种限制酶、修饰酶购自 GIBCO-BRL 及 Promega 公司, 人纤溶酶原抗血清和 G418 为 Sigma 公司产品, 辣根过氧化物酶标记得葡萄球菌蛋白 A (HRP-ProteinA) 为上海生物制品研究所研制, PCR

引物由博亚公司合成。

1.3 培养基

大肠杆菌培养用 LB 培养基, 酵母培养和筛选用的 YPD、BMGY、BMMY 培养基配方见 Invitrogen 公司提供的操作手册。

1.4 DNA 的提取, 酶切, 连接和 *E. coli* 转化
参照文献 [5] 的方法。

1.5 酵母质粒的转化和重组子的筛选

酵母质粒的转化和阳性转化子的筛选 (PCR 法) 按 Invitrogen 公司提供的操作手册进行。高拷贝转化子的筛选参考 Scorer 的方法^[6], 将电激法或原生质体法转化的涂布于含 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 YPD 培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d 后, 将长出的 his⁺ 细胞分别点种于含 1 000, 2 000, 4 000 和 6 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 YPD 平板上, 培养 2~3 d 后观察结果。

1.6 人血管抑制素的诱导表达

含人血管抑制素基因的重组转化子 *P. pastoris* GS115 (pPIC9KA3) 接种于 BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $A_{600} \approx 4 \sim 6$ 时开始诱导, 加甲醇至终体积分数为 0.5%, 每 24 h 补加 1 次, 取样走 SDS-PAGE 检测基因表达情况。蛋白质含量测定采用蛋白质标准曲线法^[7]。

1.7 表达产物的免疫印迹分析

将表达产物的 SDS-PAGE 凝胶按 Sambrook 等的方法^[8]转移至硝酸纤维素膜后, 以人纤溶酶原抗血清

* 收稿日期: 2002-06-04

基金项目: 广州市“225”科技工程资助项目 (99-Z-004-01)

作者简介: 张爱联 (1954 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

为第一抗体，辣根过氧化物酶标记得葡萄球菌蛋白 A（HRP-ProteinA）为第二抗体进行免疫印迹（Western blotting）分析。

1.8 鸡胚尿囊膜（CAM）血管生成抑制活性分析
参照文献 [9] 的方法进行。每只鸡胚重组人血管抑制素用量为 200 μg。

2 结 果

2.1 人血管抑制素基因的克隆及分泌型表达载体的构建

人血管抑制素 cDNA 用 PCR 法从人胎肝 cDNA 文库中扩增。所用引物为：

5'端引物：

5'-CC GAA TTC ATG TAT CTC TCAGAG TGC AAG-3'
EcoRI

3'端引物：

5'-CCC CGG GCG GCTA GTC TGT GGT AAA AC ACC A-3'
NotI

其中 5'端引物加EcoRI 位点及起始密码 ATG，3'端引物加终止密码及 Not I 位点。扩增产物经酶切和电泳分析获得一条约 1.0 kb 的片断，经 DNA 序列分析（图略）后插入 pPIC9K 的 EcoRI 及 Not I 位点之间，获得含人血管抑制素基因的表达式载体 pPIC9KA3（图 1）。以 pPIC9K 为模板，pPIC9K 上的 AOX1 5'端及 3'端序列为引物进行 PCR 可扩增出一条约 0.5 kb 的带，主要是 MIα1 因子的信号肽序列及部分 AOX1 启动子序列。以 pPIC9KA3 为模板时（引物相同），PCR 扩增产物约为 1.5 kb，表明 1Kb 长的人血管抑制素基因已重组进 pPIC9K（位于 MIα1 因子的信号肽与 AOX1 3'端之间）（图 2）。

2.2 人血管抑制素基因在 P. pastoris 中的表达

将构建的含人血管抑制素基因的重组转化子 P. pastoris GS115（pPIC9KA3）接种在 BMGY 培养基中，30℃振荡培养至 A600 ≈ 6 后用甲醇诱导，3 d 后取样，离心，上清液走 SDS-PAGE 检查基因表达情况，结果如图 3（a）。从图上可见，重组转化子 GS115（pPIC9KA3）在 50 000 附近出现 2 条新的蛋白带，电泳凝胶用薄层蛋白扫描仪进行扫描和蛋白定量估算出表达产物约占分泌蛋白的 43%，相当 94 mg/L 发酵液。

将电泳胶转移至硝酸纤维素膜后，按 1.7 的方法进行免疫印迹分析。图 3（b）的结果显示表达的 2 条带都能与人纤溶酶原抗血清特异结合，即这 2 条蛋白带均具免疫活性。

2.3 重组人血管抑制素对血管生成的抑制作用

如图 4 所示，仅加 bFGF 的对照组鸡胚形成血管丛，而同时加 bFGF 和人血管抑制素的鸡胚则形

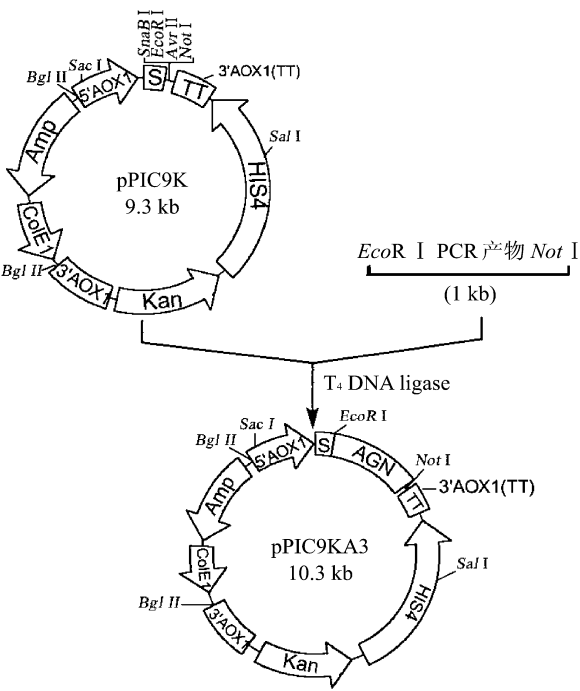


图 1 表达式载体 pPIC9KA3 的构建示意图
Fig 1 Construction of expression vector pPIC9KA3

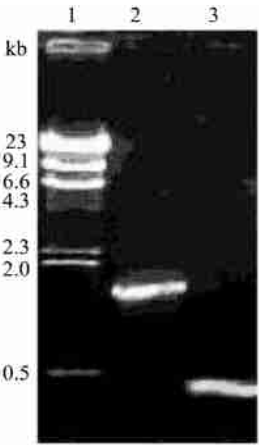


图 2 pPIC9KA3 重组质粒的 PCR 鉴定
Fig 2 PCR identification of recombinant plasmid pPIC9KA3
1: CI857s7/Hind III
2: pPIC9KA3 的扩增产物;
3: pPIC9K 的扩增产物

成少血管区。这一实验结果表明，重组人血管抑制素能抑制 bFGF 诱导的 CAM 血管生成。

2.4 用 G418 筛选高拷贝转化子

用电激法（1 500 V，200 Ω，4 ms）将重组质粒 pPIC9KA3 转化 GS115，转化细胞直接涂布在含 700 μg/mL 的 YPD 平板上，共长出 69 个菌落，PCR 检测证实这些菌落均含有血管抑制素基因后，分别点种至含 1 000，2 000，3 000 和 4 000 μg/mL G418 的 YPD 平板上，各长出 51，35，11，2 个菌落。

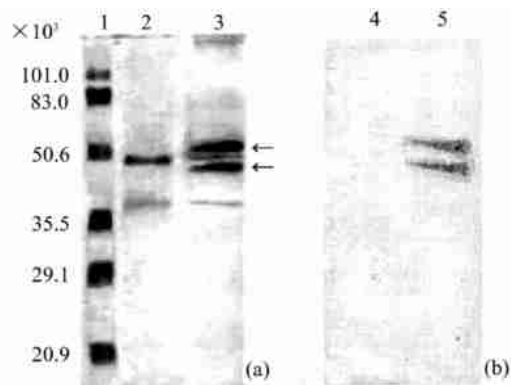


图3 表达产物的 SDS-PAGE 分析 (a) 和免疫印迹分析 (b)

Fig 3 SDS-PAGE and Western bolt analysis of expressed product

- 1: 蛋白质相对分子质量标准;
2: GS115(pPIC9K) 上清; 3: GS115(pPIC9KA3) 上清;
4: GS115(pPIC9K); 5: GS115(pPIC9KA3)

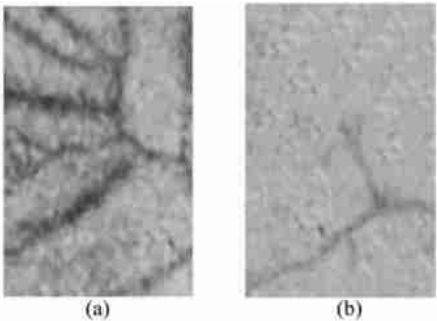


图4 表达产物抑制 CAM 血管生成

Fig 4 Expressed product inhibits CAM angiogenesis
(a) 对照组; (b) 实验组

从这几组菌落中分别挑出一个菌落进行发酵表达。表达产物(上清)走 SDS-PAGE 电泳结果如图 5 (a), 然后用 Shimadzu CS-930 薄层蛋白扫描仪对图 5A 的凝胶进行扫描分析, 结果如图 5 (b), 从图 5 (b) 可见, 人血管抑制素的表达量随 G418 浓度的增加而升高。宿主菌的抗 G418 水平与 Kan 抗性基因的拷贝数(即整合拷贝数)有关。而整合的拷贝数愈高表示宿主染色体上整合的人血管抑制素基因的数量愈多, 因而能提高其表达水平。

3 讨论

本研究自人胚肝 cDNA 文库中钓取了人血管生成抑制素基因, 构建了整合型表达载体, 转化毕节酵母后整合至宿主染色体, 用 G418 筛选出高拷贝整合的转化子, 实现人血管抑制基因的高表达。血管抑制素的相对分子质量较大, 含 12 对二硫键。人血管抑制素在原核细胞中的表达产物是不溶的包

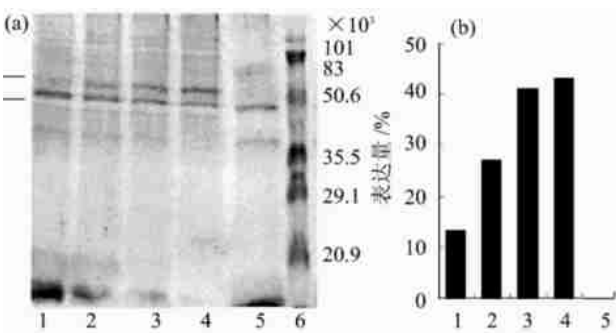


图5 在不同浓度 G418 上生长的转化子的基因表达

Fig 5 Gene expression of GS115 strains grown on different G418 concentration

- (a) SDS-PAGE; (b) 光密度积分扫描分析
1: 1 000 $\mu\text{g/mL}$ G418; 2: 2 000 $\mu\text{g/mL}$ G418;
3: 3 000 $\mu\text{g/mL}$ G418; 4: 4 000 $\mu\text{g/mL}$ G418;
5: pPIC9K 空载体

含体, 回收率低, 活性不稳定等。本文采用毕节酵母作宿主, 表达产物分泌至宿主细胞外, 不仅简化了纯化工艺, 回收率高而且获得的重组蛋白质接近人体内的天然蛋白的构像。表达产物在 SDS-PAGE 上呈现为两条大小相近的糖基化与非糖基化的蛋白, 两者均具免疫活性, 其生物活性也相同(另文发表)。以上情况与国外相关报道一致^[3]。

本文使用的是整合型表达载体进入宿主后会整合进宿主染色体, 这种方式能保证质粒和外源基因的稳定性。但整合的位点很少, 整合载体在染色体上多拷贝重组的机率为 1%~10%, 且大多为 2 个拷贝。而基因的拷贝数与外源蛋白的表达量密切相关。多拷贝整合/基因的多拷贝决定外源基因 mRNA 水平, 是决定外源蛋白产量的主要^[8]。如何在众多的重组子中尽快、尽可能的将高拷贝整合的重组子挑选出来是个极为关键的问题。Scorer 等发现重组子的拷贝数与 G418 抗性相关^[6]。本文用不同 G418 浓度的培养基来筛选高拷贝整合的转化子, 发现转化子对 G418 抗性水平与其表达人血管抑素的量成正相关。抗性越高, 蛋白的表达量越多, 这是因为转化子对 G418 的抗性愈强, 整合的拷贝数愈多, 蛋白质的表达量也愈多。用 G418 筛选高拷贝转化子是一种简便、快速的方法。

参考文献:

[1] O'REILLY M S, ROSENTHAL R, SAGE E H, et al. The suppression of tumor metastases by a primary tumor[J]. Surg Forum, 1993, 44: 474.
[2] O'REILLY M S, HOLNGREN L, SHING Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma[J].

Cell, 1994, 79: 315.

[3] O'REILLY M S, HOLNGREN L, CHEN C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice[J] . Nature Medicine, 1996, 2: 689.

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

[5] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[6] SCORER C A, CLARE J F, McCOMBE W R, et al. Rapid Selection using G418 of high copy number transformants of *P. pastoris* for high level foreign gene expression[J] . Bio/Technologh, 1994, 12: 181—184.

[7] SREEKRESHNA K, BRANKAMP R G, KROPP K E, et al. High lever expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J] . Biochemistry, 1989, 28(9): 4117—4125.

[8] REELRESHNA K. BRANKAMP R G, KROOP K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J] . Gene, 1997, 190: 55—62.

[9] 罗进贤, 卢文菊, 李文清, 等. 人血管生成抑制素基因的克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达[J] . 自然科学进展, 2000, 10(1): 49—53.

Cloning of Human Angiostatin Gene and
Its Secretive Expression in *Pichia pastoris*

ZHANG Ai-lian, LUO Jin-xian, ZHANG Tian-yuan, LUO Xue-bin

(Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //

Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University, Guanzhou 510275, China)

Abstract: Human angiostatin gene was amplified from fetal liver cDNA library by PCR technique and cloned into Yeast-*E. coli* shuttle vector pPIC9K resulting in recombinant plasmid pPIC9KA3 which was then transformed into *Pichia pastoris* GS115. The positive transformants were first determined by PCR technique and G418 method was used to screen the high copy integrative transformants. The human angiostatin protein was expressed and secreted into the medium after methanol induction and reacted with antibody against human plasminogen as shown by SDS—PAGE and Western blot. The expressed product constitutes 43% of the total extracellular protein corresponds to 94 mg/L as estimated by Shimadzu CS-930 scanner and protein quantitation. The recombinant angiostatin inhibits the bFGF induced CAM angiogenesis. Screening of high copy integrative transformants by G418 method was discussed.

Key words: angiostatin; gene expression; *P. pastoris*; G418; angiogenesis