

重组人血管内皮细胞生长因子 121 cDNA 的基因克隆、表达和鉴定*

王跃祥 官孝群 杨 健 莫 炜 宋后燕**

(复旦大学医学院分子遗传教研室, 上海 200032)

摘要 应用 RT-PCR 方法, 扩增人 VEGF₁₂₁ cDNA 基因片段, 与酵母表达载体 pPIC9K 重组, 获得表达质粒 p9KVEGF₁₂₁. 该质粒转化毕赤酵母菌 GS115, 用 G418-YPD 平板筛选高拷贝转化子, PCR 鉴定 VEGF₁₂₁ cDNA 与酵母染色体整合状态, 高拷贝转化子用甲醇诱导表达. 工程菌用 5 L 发酵罐发酵, 表达产物 r-hVEGF₁₂₁ 占培养液中总蛋白量 70% 以上. 纯化产物促进牛毛细血管内皮 (BCE) 细胞增殖, 并强烈促进血管通透.

关键词 VEGF₁₂₁ cDNA 克隆, 毕赤酵母表达, 血管生成, 血管通透

学科分类号 Q786

血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一类特异性促进血管内皮细胞增殖并增加血管通透性的细胞因子^[1,2], 在血管发生 (vasculogenesis) 和血管生成 (angiogenesis) 中起重要作用^[2], 在缺血性疾病的治疗方面有潜在的临床价值. VEGF 也是实体肿瘤生长和转移的关键因子, 其功能一旦被抑制, 肿瘤生长将受抑制^[3,4]. 天然来源 VEGF 非常有限, 利用 DNA 重组技术获取大量有活性的 VEGF, 有利于靶向血管药物的研制和血管生成机制的研究.

人 VEGF 是由两条糖蛋白链形成的同源二聚体, 由于基因转录水平剪切方式不同, VEGF 至少有 5 种亚型^[4], VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉和 VEGF₂₀₆, 其中 VEGF₁₂₁和 VEGF₁₆₅功能最强且以可溶性蛋白形式分泌于细胞外, VEGF₁₂₁没有亲肝素及硫酸乙酰肝素的特性, 外源给予 VEGF₁₂₁更有利于其扩散, 显示更强的活性^[4,5].

VEGF 是富含半胱氨酸生长因子超家族成员, 活性形式以二聚体形式存在, 每个亚基有 8 个半胱氨酸参与形成二硫键, 有一个糖基化位点, 糖基化与 VEGF 活性关系不大. 大肠杆菌表达时复性困难, 昆虫细胞和哺乳类细胞表达量低^[6,7]. 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是一种新型外源基因表达系统, 兼有原核系统良好的可操作性和真核系统翻译后加工的双重特点^[8]. 我们利用 RT-PCR 技术, 从 HeLa 细胞中提取总 RNA, RT-PCR 扩增出 VEGF₁₂₁ cDNA 基因片段, 组装入毕赤酵母表达载体 pPIC9K, 实现了 VEGF₁₂₁ cDNA 克隆的高效

分泌性表达.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和细胞: 大肠杆菌 JM109、pUC18 质粒为本实验室冻存; pPIC9K 质粒和 GS115 酵母菌购自美国 Invitrogen 公司; HeLa 细胞为复旦大学医学院分子遗传教研室朱运松教授馈赠; 牛血管内皮 (bovine capillary endothelial, BCE) 细胞株从 ATCC 购买, 编号为 CRL-8659.

1.1.2 试剂和仪器: 限制性内切酶购自 NEB 公司; RPMI1640、DMEM、RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Gibco BRL 公司; dNTPs、G418、RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司; QIAGEN plasmid Mini/Midi Kit 购自 QIAGEN Inc. (德国); 酵母表达试剂盒 (multi-copy *pichia* expression kit) 购自 Invitrogen 公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺及培养基 YNB (yeast nitrogen base)、蛋白胨 (peptone)、伊文氏蓝染料购自 Sigma 公司; 酵母提取物 (yeast extract) 购自 Difco 公司; 图像分析系统 ImageMaster VDS 图象处理系统购自 Pharmacia Biotech 公司; 蛋白质检测试剂盒 (Protein Assay)、GENE PULSER II 电穿孔仪为 Bio-Rad 公司产品; PE2000 PCR 扩增仪购自 PE 公司; Bio FLU3000 5L 发酵罐购自 NBS 公司.

* 复旦大学融合基金 Med X 项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-64033738, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2001-10-23, 接受日期: 2001-12-25

1.2 方法

1.2.1 HeLa 细胞培养、总 RNA 提取及逆转录反应: HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养. 总 RNA 提取参照 Gibco BRL 公司“TRIzol Reagent”Kit 进行. 逆转录反应参照 Promega 公司提供的试剂盒及说明书进行, 反应体系为: 总 RNA 2 μg、25 mmol/L MgSO₄ 2 μl、10 × RT 缓冲液 5 μl、10 mmol/L dNTP 4 μl、20 U RNasin、10 U AMV 逆转录酶、Oligo (dT)₁₅ 1 μg, 重蒸水补至 50 μl, 48℃反应 45 min, 94℃灭活逆转录酶 5 min 后, 置冰浴.

1.2.2 VEGF₁₂₁ cDNA 片段的扩增、克隆与鉴定: 根据酵母表达载体多克隆位点区特点和 VEGF₁₂₁ N 端和 C 端氨基酸序列设计引物, 上游引物分别引入 *Eco*RI 位点, 下游引物引入终止密码 (TAA) 和 *Bam*HI 位点, 以逆转录产物为模板, PCR 扩增 VEGF₁₂₁ cDNA, 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 产物. 产物经 Klenow 酶补平、*Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶消化后, 与 pUC18 重组. 重组质粒经限制性内切酶鉴定、DNA 序列分析筛选阳性克隆^[9], 阳性克隆命名为 pVEGF₁₂₁.

1.2.3 酵母表达质粒 p9KVEGF₁₂₁ 的构建 (图 1): pVEGF₁₂₁ 经 *Xba*I 酶解、Klenow 酶补平、*Eco*RI 酶解,

回收目的片段 (0.39 kb); pPIC9K 经 *Not*I 酶解、Klenow 酶补平、*Eco*RI 酶解, 回收载体片段 (9.27 kb); 两片段连接后转化大肠杆菌 JM109, 扩增转化菌并制备表达质粒, 表达质粒经限制性内切酶鉴定、DNA 序列分析筛选阳性克隆^[9], 阳性克隆命名为 p9KVEGF₁₂₁.

1.2.4 p9KVEGF₁₂₁ 转化毕赤酵母、高拷贝转化子的筛选及 p9KVEGF₁₂₁ 与毕赤酵母染色体整合状态的鉴定: 表达质粒 p9KVEGF₁₂₁ 用 *Sal*I 线性化后, 电穿孔法转化毕赤酵母 GS115, 所有转化子在 MD (葡萄糖最低限培养基) 平板培养 48 h 后, 用 YPD-G418 平板 (G418 终浓度为 0、0.50、1.0 和 2.0 g/L) 筛选生长表型. 选择抗 G418 2 g/L 的转化子用 YPD 培养液培养过夜后, 抽取酵母染色体作为模板, 以编码酵母醇氧化酶 1 (alcohol oxidase 1, AOX1) 基因 5' 端和 3' 端的引物为正逆向引物扩增 DNA 片段, 鉴定 VEGF₁₂₁ cDNA 与酵母染色体整合的状态.

1.2.5 工程酵母菌 GS115-VEGF₁₂₁ 的发酵:

a. 摇瓶发酵: 挑取阳性克隆, 接种于甘油复合培养基 (BMGY) 培养液中, 30℃培养至菌体 A₆₀₀ 达到 2~6 时, 离心去除培养液, 沉淀以甲醇复合培养基 (BMMY) 稀释至 A₆₀₀ 为 1, 诱导培养 7 d, 每 12 小时取样并补加甲醇维持甲醇浓度 0.5%, 于 30℃诱导表达, 每次取样并保留培养液上清, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 鉴定培养液上清中表达产物, 用图像分析系统计算目的产物的百分比, 按照 Bradford 方法并参照试剂盒操作说明书测定培养液上清中总蛋白质浓度, 由此推算目的蛋白在培养液上清的浓度.

b. 5 L 罐发酵: 挑取阳性克隆, 接种于甘油复合培养基 (BMGY) 培养液中, 30℃培养至菌体 A₆₀₀ 达到 2~6 时, 接种入发酵罐 (Bio FLU3000 5 L), 溶氧设为 35%、pH 设为 5.0 继续培养, A₆₀₀ 达到 120 时补加甲醇诱导, 每 2 小时取样并保留培养液上清, 15% SDS-PAGE 鉴定培养液上清中表达产物, 用图像分析系统计算目的产物的百分比, 按照 Bradford 方法并参照试剂盒操作说明书测定培养液上清中总蛋白质浓度, 由此推算目的蛋白在培养液上清的浓度.

诱导培养液上清经过超滤浓缩、Sephadex G50 分子筛和 S-Sepharose Fast Flow 后, 收集、合并目的蛋白, 冷冻抽干.

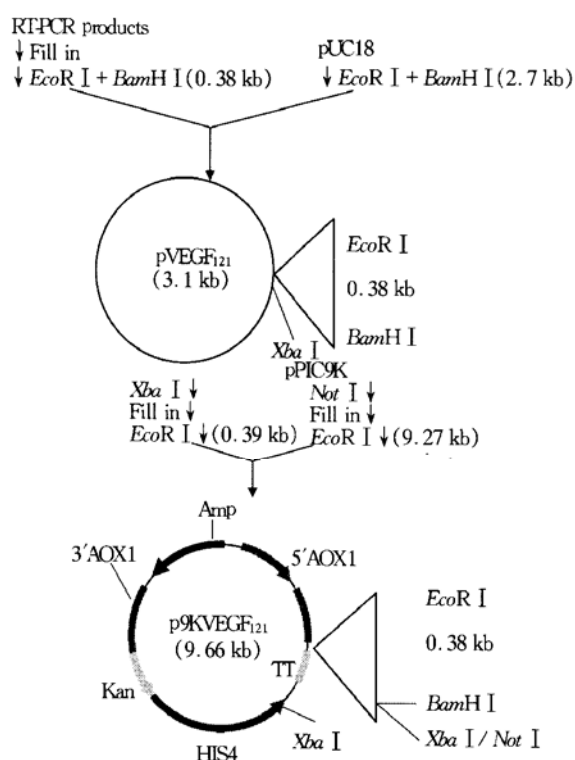


Fig. 1 Construction of Plasmid p9KVEGF₁₂₁

1.2.6 r-hVEGF₁₂₁生物活性测定:

a. r-hVEGF₁₂₁促BCE细胞增殖作用: 用含10%小牛血清的DMEM培养液, 在37℃、5% CO₂条件下传代培养牛血管内皮 (bovine capillary endothelial, BCE) 细胞株, 该细胞经PBS漂洗、胰酶消化, 用上述培养液制成细胞悬液 (1.25×10^4 /ml), 接种到48孔板继续培养 (0.8 ml/孔, 即 1.0×10^4 /孔). 24 h后, 吸弃培养液, 测定组加入0.4 ml培养液和10 μl不同浓度r-hVEGF₁₂₁样品, 对照组加入0.4 ml培养液和10 μl PBS, 室温孵育20 min, 再加入培养液使每孔培养液体积为0.8 ml, 48 h后, 重复上述步骤, 72 h后按白细胞计数法, 低倍镜下计数BCE细胞, 方差统计分析测定组与对照组差异.

b. r-hVEGF₁₂₁血管通透作用: 取约250 g雄性健康豚鼠, 剃毛后足趾静脉注射伊文氏蓝染液20 mg/kg, 5 min后于豚鼠背部皮内注射0.25、0.5、1.0 μg/L r-hVEGF₁₂₁及PBS各200 μl, 10 min后观察蓝斑范围, 测量其直径, 计算蓝斑面积, 分别于3只豚鼠重复上述实验.

2 结 果

2.1 VEGF₁₂₁ cDNA片段的扩增、克隆与鉴定

琼脂糖凝胶电泳显示RT-PCR产物约380 bp, 回收后与pUC18重组, 重组质粒经三套限制性内切酶鉴定、DNA序列分析证实扩增片段与预期结果一致.

2.2 酵母表达质粒p9KVEGF₁₂₁的鉴定

重组质粒p9KVEGF₁₂₁经三套限制性内切酶鉴定、DNA序列分析与预期结果相符合, 阅读框架(ORF)正确.

2.3 PCR鉴定p9KVEGF₁₂₁与毕赤酵母染色体整合状态

如图2所示, 以空白酵母菌GS115的染色体为模板扩增出2.2 kb的片段(图2中3), 以重组质粒p9KVEGF₁₂₁转化的酵母染色体为模板, 其扩增产物为2.2 kb及0.86 kb(图2中2), 以重组质粒p9KVEGF₁₂₁为模板, 其扩增产物为0.86 kb(图2中4), 上述结果表明: VEGF₁₂₁ cDNA基因以单交换整合方式整合于毕赤酵母染色体中, 酵母表型为甲醇利用快型 (Methanol utilization plus, Mut⁺).

2.4 表达产物的含量、浓度

15% SDS-PAGE电泳显示, 表达菌在32 ku处

有一浓集条带, 而仅转入空载体的对照菌未见该条带, 提示r-hVEGF₁₂₁已获表达. 摇瓶诱导表达诱导72 h后, 培养液中总蛋白量达最高, 约100 mg/L, 其中目的蛋白约70 mg/L. 5 L发酵罐发酵, 甲醇诱导28 h后, 培养液中总蛋白量达最高, 约900 mg/L, 其中目的蛋白约600 mg/L(图3).

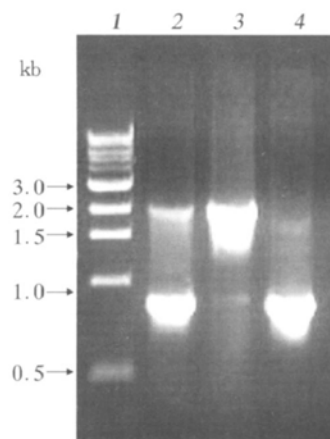


Fig. 2 PCR analysis of *Pichia pastoris* integrants

1: DNA marker (1 kb DNA ladder); 2: GS115-p9KVEGF₁₂₁ (2.2 kb, 0.86 kb); 3: GS115 (2.2 kb); 4: p9KVEGF₁₂₁ (0.86 kb).

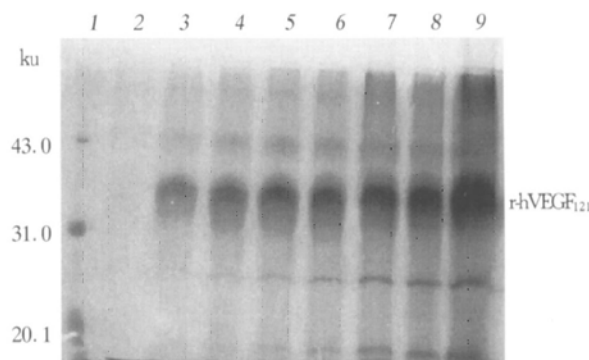


Fig. 3 Expression of VEGF₁₂₁ cDNA gene with *Pichia pastoris* system by a 5-liter fermentor

2~9: samples of culture medium collected on different period after methanol induction. 1: protein marker; 2: 0 hour; 3: 16th hour; 4: 18th hour; 5: 20th hour; 6: 22nd hour; 7: 24th hour; 8: 26th hour; 9: 28th hour.

2.5 表达产物的活性分析

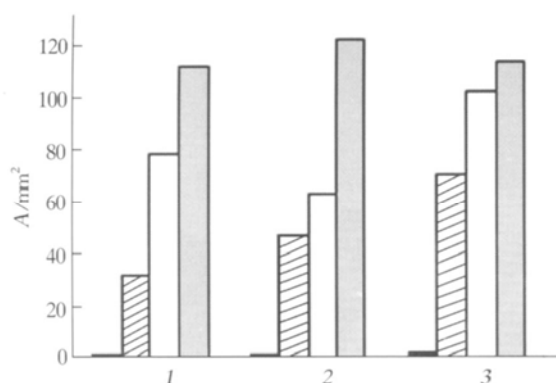
2.5.1 r-hVEGF₁₂₁能促进BCE细胞增殖, 72 h后, r-hVEGF₁₂₁测定组细胞数明显高于PBS对照组(表1).

2.5.2 r-hVEGF₁₂₁也能明显增加血管通透性, 伊文氏蓝染液从注射点附近外渗, 形成蓝色斑块, 斑块面积与r-hVEGF₁₂₁剂量正相关(图4).

Table 1 r-hVEGF₁₂₁ stimulates the proliferation of BCE cells

r-hVEGF ₁₂₁ /μg·L ⁻¹	BCE cells/ (10 ⁴ /well) ¹⁾
0.0	2.6±0.17
1.0	3.0±0.00 ²⁾
2.5	3.3±0.00 ²⁾
5.0	3.7±0.17 ²⁾
10.0	3.9±0.00 ²⁾
25.0	4.3±0.17 ²⁾
50.0	4.5±0.30 ²⁾
100.0	3.8±0.17 ²⁾

¹⁾ mean ± SEM. ²⁾ vs PBS group, *P* < 0.01.

**Fig. 4** r-hVEGF₁₂₁ vascular permeability assay

■: PBS; ▨: 50 ng; □: 100 ng; ▤: 200 ng.

1~3: different guinea pig.

3 讨 论

VEGF 是启动血管形成的高度特异的有丝分裂原,也是高效的血管通透因子,与缺血性疾病、创伤愈合、肿瘤发生和转移乃至基因治疗等领域有密切的关系, r-hVEGF₁₂₁ 有理论研究价值和潜在的应用价值^[1~4,10].

新型毕赤酵母表达系统近年来发展很快. 尤其适合真核基因的表达,因为具有很强的蛋白质修饰功能,如二硫键的形成、糖链的加工等,以及分泌外源基因表达的蛋白质,使表达产物分离纯化十分简便. 本文对 VEGF₁₂₁ 基因表达条件进行初步探索,摇瓶发酵时由于甲醇浓度和溶氧这两个关键参

数未得到很好控制,表达量相对较低,用 5 L 发酵罐发酵时,参数得到优化,表达量大幅度提高,可大量获取 r-hVEGF₁₂₁.

我们在电穿孔转化 GS115 时,有意识将表达载体线性化后以单交换整合方式与 GS115 染色体 his 部分重组,这样整合的拷贝数较多,且多数为 Mut⁺.

我们成功地克隆与高效表达了 VEGF₁₂₁ cDNA 基因,纯化后的 r-hVEGF₁₂₁ 能够促进 BCE 细胞增殖,并显示强烈的促进血管通透作用,为靶向血管药物的研制及血管生成机制的研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Yancopoulos G D, Davis S, Gale N W, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, **407** (14): 242~248
- 2 Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med*, 2000, **6** (3): 389~395
- 3 Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, **407** (14): 249~257
- 4 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, **13** (1): 9~22
- 5 Mack C A, Patel S R, Schwarz E A, *et al.* Cardiopulmonary support and physiology. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, **115** (1): 168~177
- 6 Cohen T, Gitai-Goren H, Neufeld G, *et al.* High levels of biologically active vascular endothelial growth factor (VEGF) are produced by the baculovirus expression system. *Growth Factors*, 1992, **7** (2): 131~138
- 7 Peretz D, Gitai-Goren H, Safran M, *et al.* Glycosylation of vascular endothelial growth factor is not required for its mitogenic activity. *Biochem Biophys Res Comm*, 1992, **182** (3): 1340~1347
- 8 Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**: 527~533
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- 10 Rosengart T K, Lee L Y, Patel S R, *et al.* Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenoviral vector expressing VEGF₁₂₁ cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*, 1999, **100** (5): 468~474

Molecular Cloning, Expression and Characterization of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor 121^{*}

WANG Yue-Xiang, GUAN Xiao-Qun, YANG Jian, MO Wei, SONG Hou-Yan^{**}

(Department of Molecular Genetics, School of Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The human VEGF₁₂₁ cDNA was amplified by RT-PCR, and was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K to form the expression plasmid p9KVEGF₁₂₁. This recombinant plasmid was transformed into GS115. Transformants were screened by G418-YPD plates and were induced by methanol. The expression product of r-hVEGF₁₂₁ amounted to 900 mg/L by a 5-liter fermentor, over 70% of the total secreted protein. The purified r-hVEGF₁₂₁ can stimulate the proliferation of bovine capillary endothelial cells and shows high vascular permeability.

Key words VEGF₁₂₁ cDNA clone, *Pichia pastoris* expression, angiogenesis, vascular permeability

^{*} This work was supported by a grant from the Combined fund (Med-X) of Fudan University.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-21-64033738, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

Received: October 23, 2001 Accepted: December 25, 2001