

人纤溶酶原 K1-3 基因的克隆、表达和产物的纯化及抗癌活性分析

张添元 罗进贤* 陆幸妍

(中山大学基因工程教育部重点实验室, 生物化学系, 广州 510275)

摘要 纤溶酶原 K1-3 功能区是近年发现的血管生成抑制因子, 具有抑制肿瘤生长和转移的活性。以人血管生成抑制素 cDNA 为模板用 PCR 技术扩增了 K1-3 功能区的基因, DNA 序列分析后克隆至质粒 pPIC9K 上获得重组质粒 pPIC9K13, 转化毕赤酵母 GS115, 用 PCR 和 G418 法筛选高拷贝转化子, 进行摇瓶发酵。SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果证实 K1-3 基因已在 GS115 分泌表达, 并具有免疫活性。选用 30L 和 80L 罐进行高密度发酵, 甲醇诱导 48h 细胞密度达到 $OD_{250} \sim 300$, 比摇瓶提高 5~6 倍, 表达量 150-200mg/L。发酵上清液经 Streamline SP 离子交换及 Phenyl-Sepharose 疏水层析纯化, 在 SDS-PAGE 上显示一条带, 纯度 96%。动物实验证明纯化产物具有抗血管生成和抗肿瘤的活性。

关键词 人纤溶酶原 K1-3, 基因克隆和表达, 纯化, 抗癌活性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0593-04

血管生成是肿瘤组织得以快速生长和转移的基础^[1]。利用高效低毒的血管生成抑制因子抑制新生血管的形成, 切断肿瘤的营养供应, 达到治疗肿瘤的目的是当前肿瘤领域研究的热点之一^[2~3]。1994 年发现的纤溶酶原的 K1-4 功能区是一个血管生成抑制因子, 它通过抑制血管生成来抑制肿瘤的生长和转移^[4]。后来又发现其 K1-3 功能区比 K1-4 区有更强的抗血管生成和抗肿瘤活性。K1-4 功能区的研究国外已开始进入一期临床阶段, 国内研究尚在实验室规模, K1-3 功能区的研究国内尚无报道。毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是一种甲基营养酵母, 它能以甲醇为唯一碳源和能源。在以甲醇作碳源时与甲醇代谢有关的酶如醇脱氢酶 (AOX) 等能大量地表达。由于这类酵母具有能高密度发酵, 遗传稳定, 发酵液中分泌的杂蛋白质少, 易纯化和糖基化形式较接近人类的优点, 是新一代的酵母表达系统。本文报道人纤溶酶原 K1-3 功能区基因的克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达, 高密度发酵, 产物的纯化和生物活性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, 毕

赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 及 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶和主要试剂: 限制酶, T4 DNA 连接酶, dNTPs, PCR 试剂盒购自 Roche 公司, 人纤溶酶原抗血清为 Sigma 公司产品, PCR 引物由北京赛百盛公司合成, 纯化用的 Streamline SP, Phenyl-Sepharose 等填料为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。

1.1.3 培养基 大肠杆菌的培养用 LB 培养基, 酵母培养基 YPD, MD, MM, BMGY 及 BMMY 见文献 [6]。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 以人血管生成抑制素 cDNA 为模板, 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 反应 30 个循环。

1.2.2 PCR 产物的克隆和序列分析: PCR 产物先克隆至质粒 pSP72, 用 Perkin Elmer 公司的全自动 DNA 序列分析仪进行序列测定。序列正确的 DNA 再克隆到质粒 pPIC9K 上。

1.2.3 酵母的转化, 阳性转化子和高拷贝转化子的筛选 均按文献 [6] 的方法进行。

1.2.4 K1-3 基因的表达, 电泳, 免疫印迹分析: 高拷贝阳性转化子单菌落接种, 培养至 $OD_{600} = 2 \sim 6$ 后用甲醇诱导, 上清液进行 SDS-PAGE 及 Western blot

分析。

1.2.5 高密度发酵 :在德国的 B. Braun 30L 和 80L 反应器中进行,发酵条件参考文献 [7]。

1.2.6 产物的抗血管生成和抑癌活性分析按文献 [8] 的方法。

2 结果和讨论

2.1 人纤溶酶原 K1-3 基因的克隆

2.1.1 PCR 引物的合成 :根据人血管生成抑制素 DNA 序列^[8],设计合成了如下一对引物:

*Xho*I

5'端引物:TCG CTC GAG AAA AGA GAG GCT
GAA GCT GTG TAT CTC TCA GAG TGC AAG

*Eco*RI

3'端引物:TCG GAA TTC TAT TAG GAG TCA
CAG GAC GGT ATC TTA C

为方便基因操作,在 5'端引物上加了 *Xho*I 酶切位点及 8 个氨基酸组成的信号肽酶识别位点,在 3'端引物上加 *Eco*RI 的酶切位点及 2 个终止密码。

2.1.2 K1-3 基因的扩增与序列分析 :以人血管生成抑制素基因为模板,以 2.1.1 中的两段序列为引物,PCR 方法合成得到 0.8 kb 的 DNA 片段。PCR 产物直接克隆至质粒 pSP72 上,经酶切电泳分析和 DNA 序列分析,结果证明是正确的 K1-3 基因(序列结果略)。

2.2 含 K1-3 基因的表达载体 pPIC9K13 的构建

用 *Xho*I 和 *Eco*RI 从 pSPK1-3 上切下 K1-3 的基因,克隆至质粒 pPIC9K 的 *Xho*I, *Eco*RI 位点之间 (*Xho*I 做部分酶切)构建含 K1-3 基因的表达载体 pPIC9K13,其物理图谱如图 1。pPIC9K13 经 *Xho*I-*Eco*RI 酶切成 3 条带(其中 2 条大小相近约 4.6 kb 的带重叠在一起,另一条为 0.8 kb 即 K1-3 基因),大小均与理论值相符,从而证明 K1-3 基因已克隆至 pPIC9K。

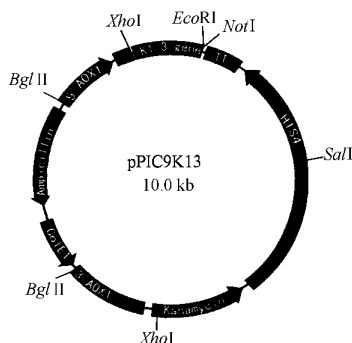


图 1 表达载体 pPIC9K13 的物理图谱

Fig. 1 Physical map of expression vector pPIC9K13

2.3 pPIC9K13 的转化和阳性转化子的筛选

用 *Bgl* II (或 *Sal* I) 酶切 pPIC9K13 使之线性化,然后采用原生质体转化法将 pPIC9K13 转化 *P. pastoris* GS115,先用 PCR 快速检测筛选阳性转化子,然后点种到分别含 1~4mg/mL G418 的 YPD 平板上,最后在 4mg/mL G418 的平板上筛选出高拷贝整合的转化子,命名为 GS115(pPIC9K13)。

2.4 K1-3 基因在 GS115(pPIC9K13) 中的诱导表达

将 GS115(pPIC9K13) 在 BMGY 中 30℃ 培养至 $OD_{600} = 2 \sim 6$,然后用甲醇诱导,并以 GS115 为对照,48h 后取样,上清液进行 SDS-PAGE。结果如图 2a,可见在 35kD 附近有一条新的蛋白带,将电泳凝胶转膜后进行 Western blot 分析,发现表达产物能与入纤溶酶原抗血清特异结合而与对照菌 GS115 呈阴性反应(图 2b),以上结果证明 K1-3 基因已在毕赤酵母中表达。经凝胶光密度扫描和蛋白浓度测定,估算表达量约为 50mg/L 发酵液。

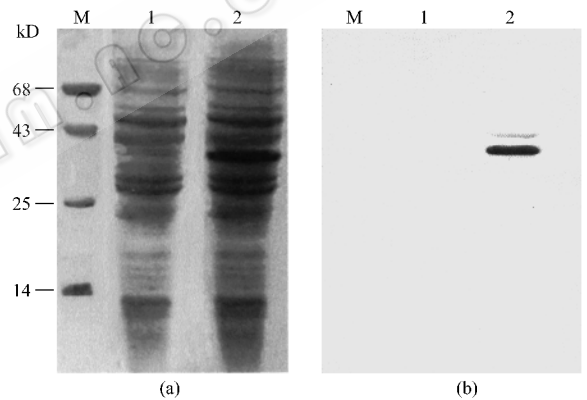


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析
Fig. 2 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of expressed protein

M. Protein marker; 1. GS115 induced; 2. GS115(pPIC9K13) induced

2.5 生物反应器高密度发酵

按 1.2.5 的方法在 30L 和 80L 的反应器中进行高密度发酵。种子液 28℃ 培养过夜至 $OD_{600} = 8$ 接入发酵培养基中,温度保持 28~30℃,用氨水自动调节 pH 保持在 5.0 左右,培养 24h 至 $OD_{600} = 160$ 时开始加甲醇诱导,控制溶氧 20% 以上,逐渐加大甲醇的流加速度,诱导 48h 后放罐,此时细胞的浓度达到 $OD_{600} = 300$,发酵上清走 SDS-PAGE,经凝胶光密度扫描和蛋白含量分析,表达量约 200mg/L。

2.6 表达产物的纯化

发酵上清液先上 Streamline SP 阳离子交换柱,然后再上 Phenyl-Sepharose High Performance 疏水层析,在 SDS-PAGE 上展现一条带(图 3),纯度 96%。

回收率 70%。

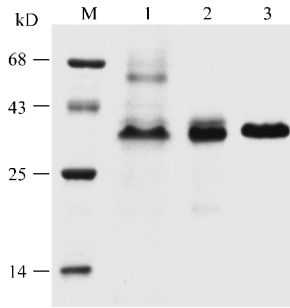


图3 生物反应器发酵表达及蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed and purified products from bioreactor

M. Protein marker ;

1. Fermentation supernatant ;

2. Purified protein after Streamline SP ;

3. Purified protein after Phenyl Sepharose

2.7 表达产物的生物活性分析

按 1.2.6 的方法,分析表达产物的抗血管生成和抑癌活性。从图 4 可见加了 bFGF 和 K1-3 的实验组鸡胚形成无血管区而仅加 bFGF 的对照组鸡胚形成毛细血管丛。图 5 显示注射 PBS 的对照组荷黑色素瘤小鼠背部肿瘤迅速生长,瘤体积达到 $(2700 \pm 600) \text{ mm}^3$,而注射了 K1-3 的实验组小鼠肿瘤体积仅有 $(720 \pm 150) \text{ mm}^3$ (开始注射时瘤体积为 $(607 \pm 120) \text{ mm}^3$,注射 10d 后实验组比对照组平均抑癌率为 94.1%(以上数据为每组 5 只小鼠测得数据的平均值)。

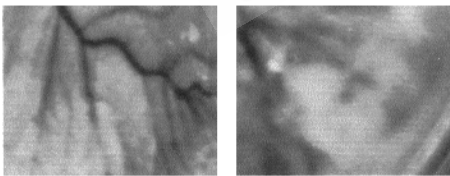


图4 重组 K1-3 对鸡胚绒毛尿囊膜血管形成的抑制作用

Fig.4 Inhibition by recombinant K1-3 on the angiogenesis of chicken embryonic chorioallantoic membrane

Left. Without treatment ; Right. Treated with recombinant K1-3

毕赤酵母是新一代的酵母表达系统,它具有表达水平高、表达蛋白可分泌胞外等优点,尤其是它分泌的杂蛋白少,纯化过程中容易除去,且易于进行高密度发酵的优点特别适合大规模的工业化生产。以上特点使毕赤酵母成为表达和分泌动物蛋白的理想系统,受到广泛的重视。近年来有关外源基因在毕赤酵母中表达的文章很多,但关于发酵特别是高密

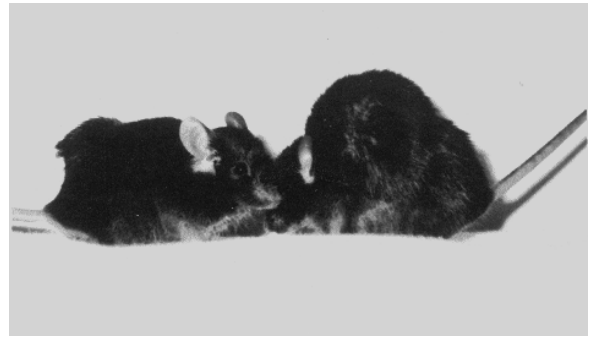


图5 K1-3 对小鼠黑色素瘤的抑制作用

Fig.5 Inhibition of recombinant K1-3 on mouse melanoma
eft. Mouse treated with recombinant K1-3 ; Right. Mouse without treatment

度发酵的研究有限。基因工程的目的是通过发酵摸索工程菌快速生长和外源基因高效表达的工艺以获得大量的外源基因表达产物,而高密度发酵是实现上述目的的重要条件。本研究根据毕赤酵母表达产物分泌至胞外和适于进行高密度发酵的优点,将 K1-3 基因转入毕赤酵母 GS115,在摇瓶培养的基础上,在 80L 罐进行中试规模的高密度发酵和纯化工工艺研究获得理想的效果,经甲醇诱导 48h 细胞密度达到 300 OD,是常规发酵的 6~8 倍。表达量达到 200mg/L,是常规发酵的 4 倍。为今后的规模生产和临床试验打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Vile R. Less blood means more sanguinity. *Current Biology*, 1995 **5** :10~13
- [2] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Natl Cancer Inst*, 1989 **82** :4~6
- [3] Isaiah J F, Lee M E. The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, 1994 **79** :185~188
- [4] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994 **79** :315~328
- [5] Sreekrishna K, Kropp K E. *Pichia pastoris*. In: Wolf K. (Ed), *Non-conventional Yeasts in Biotechnology*, Heidelberg Springer, 1996 :203~252
- [6] Invitrogen Inc. Manual for "Easysselect™ Pichia Expression Kit"
- [7] Nilsen S L, Deford M E, Prorok M *et al.* High level secretion in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the recombinant Kringle2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997 **25** :63~74
- [8] LUO J X, LU W J, LI W Q *et al.* Cloning, sequencing of human angiostatin gene and its expression in *E. coli*. *Progress in Natural Science*, 1999 **(9)** :672~677

Cloning and Expression of Kringle 1-3 Gene of Human Plasminogen and the Purification and Bioactivity of Its Expressed Product

ZHANG Tian-Yuan LUO Jin-Xian* LU Xing-Yan

(The key laboratory of gene engineering of Ministry of Education and Department of Biochemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Kringle 1-3 domain is a recently found angiogenesis inhibitor with anti-angiogenesis and anti-tumor activity. The kringle 1-3 gene was amplified by PCR technique using angiostatin gene as template. After DNA sequencing, the PCR product was cloned into pPIC9K resulting in recombinant plasmid pPIC9K13 which was then transformed into *Pichia pastoris* GS115. The high copy integration transformants screened by PCR and G418 methods were cultivated in flasks. The K1-3 was expressed and secreted to the medium and has immunogenic activity as shown by SDS-PAGE and Western blotting. High cell density culture was carried out in 30-liter and 80-liter bioreactor, the biomass reaches 300 OD after methanol induction, and the expressed product is 200mg/L. The fermentation supernatant was purified by Streamline SP and Phenyl Sepharose Chromatography, the product appears as a single band on SDS-PAGE, with a purity of 95% ~ 96%. The purified product has anti-angiogenesis and anti-tumor activity.

Key words K1-3 domain of human plasminogen, gene cloning and expression, purification, anti-tumor activity

Received: 04-27-2002

This work was supported by Grant from Guangzhou "225 Science and Technology Program" (No. 99-Z-004-01).

* Corresponding author. Tel: 86-20-84112397; Fax: 86-20-84036215; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

向您介绍世界著名的学术出版机构 John Wiley et Sons Inc.

Wiley 创立于 1807 年, 做为全球知名的学术出版机构, 出版大量的学术著作、教材和高品质的学术期刊。2002 年, Wiley 已出版超过 400 种期刊, 其中拥有众多的国际权威学会会刊和推荐出版物, 被 SCI 收录的核心刊达 200 种以上, 主要分布在: 化学化工、生命科学与医学、计算机科学、工程技术、地球科学(包括环境科学)、数学与统计学、物理科学、心理学、经济与管理类等。Wiley 是最早进入电子出版物领域的出版商, 在 1997 年将期刊电子化, 目前全文在线期刊已超过 300 种, 您可以通过访问、浏览、查询我们的在线出版平台: www.interscience.wiley.com 了解所关心的期刊和在线出版物的情况, 并免费获得样刊或试用。

Wiley 还出版世界一流水准的大型实验手册、工具书和电子图书。这些产品中有被全球上万生命科学、医学、化学实验室使用的大型实验室指南 Current Protocols 共 13 个专题, 每季度更新, 被称为“圣经”的 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 电子工程百科全书 Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering 等。

要查询公司有关介绍和图书出版情况, 欢迎您访问 Wiley 国际网站:

www.wiley.com

北京代表处于 2002 年成立, 致力于为用户提供专业品质的服务。

(郑京春 供稿)