

Arresten 在毕赤酵母中的表达和鉴定

曾昭淳^{1*} 何爱彬¹ 马立新² 廖 飞¹

¹(重庆医科大学,重庆 400016)

²(湖北大学生命科学院,武汉 430062)

摘 要 Arresten 来自人 IV 型胶原 α_1 链非胶原末端,可抑制新血管生成。从人肝脏提取总 RNA,RT-PCR 扩增 arresten 的 cDNA, T 载体进一步扩增后与表达载体 pPIC9 连接,测序确认后转入毕赤酵母,获得表达可溶性 arresten 的酵母细胞。表达产物经初步纯化后,用 SDS-PAGE 测定分子量为 26kD,与理论计算值接近,表达产物对 matrigel 辅助的内皮细胞管化有明显抑制作用。上述结果表明用毕赤酵母表达了有活性的 arresten。

关键词 Arresten 毕赤酵母 新生血管生成

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0572-05

新血管生成指从原有血管内皮细胞经过增生、再成型,形成新的毛细血管,此过程受到内源性刺激因子和抑制因子的调节^[1,2]。肿瘤组织生长和转移依赖于新血管生成供给营养。抑制新血管生成是抑制肿瘤生长的有效途径。Colorado 于 2000 年发现来自人 IV 型胶原 α_1 链非胶原末端的 arresten 可以抑制内皮细胞的管化和新血管生成^[3]。因此,arresten 有望开发成高效的抗肿瘤生物制剂。本文用毕赤酵母表达分泌性 arresten,以期获得具有抗肿瘤活性的重组表达人源 arresten。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株与细胞株、细胞培养

pGEM-T 载体购自 Promega 公司,pPIC9 等载体及 GS115 等酵母细胞,分别由湖北大学生命科学院马立新教授和重庆医科大学肝炎研究所惠赠。健康汉族人肝组织由重庆医科大学附属第一医院提供。大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。人脐静脉内皮细胞 ECV-304 和肿瘤细胞株 MDA-MB-435S 由重庆医科大学病理生理教研室提供。

1.2 工具酶与试剂

限制酶等工具酶购自 TaKaRa 公司,酵母提取物和胰化蛋白胨购自 OXOID 公司,Peptone,YNBw/o 购自 Invitrogen 公司,细胞培养基购自 Hyclone 公司。其余试剂为分析纯。

1.3 巢式 PCR 引物设计

根据人 IV 型胶原 α_1 链序列(GenBank Accession Number NM-001845)设计引物(上海博亚合成)。第一对 PCR 外引物为 P₁:5'-AGGCCCGATGGGTTC-3';P₂:5'-CTA TAAGGCACITTTACGGTTTTTC-3'。用于与 pPIC9 连接的 第二对引物为 P₃:5'-CGCTCGAGAAAAGATCTGTTGATC-3',P₄:5'-GCCCGGATCCTTATGTTCTTCTCATACAG-3',引物 P₃ 为保证在酵母中表达、分泌时信号肽正确切割加上了识别序列 CTCGAGAAAAGA。

1.4 目的基因的扩增与克隆

用 Trizol 从健康汉族人肝组织提取总 RNA。逆转录反应体系含总 RNA 4 μ L,oligo(dT)₈ 1 μ L,DEPC 处理纯水 6 μ L,置于 70 $^{\circ}$ C 反应 5 min 后立即冰浴,加入 5 \times buffer 5 μ L,10mmol/L dNTP 2 μ L,RNasin 2 μ L,M-MLV 逆转录酶 1 μ L(2000u),混匀,置室温 5min,然后 42 $^{\circ}$ C 60min,70 $^{\circ}$ C 10min,再立即冰浴。PCR 扩增体系为 纯水 15.5 μ L,Buffer 2.5 μ L,10mmol/L dNTP 0.5 μ L,引物 P1 和 P2(10 μ mol/L)各 2 μ L,EX-Taq 酶 0.5 μ L,逆转录产物 2 μ L。反应体系先在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min。扩增的条件为 95 $^{\circ}$ C 45s,63 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 45s,30 个循环,最后于 72 $^{\circ}$ C,保温 7min。PCR 产物稀释 1000 倍后,取 2 μ L 为模板,用第二对引物按相同条件扩增内部的目标片段。巢式 PCR

产物经琼脂糖凝胶电泳回收,按 Promega 产品说明书克隆于 pGEM-T 载体,测序确认(上海博亚)。

1.5 酵母转化质粒的构建

酶切 pGEM-arresten,琼脂糖凝胶电泳回收目的片段。用 T4 DNA 连接酶连接目的片段与 *EcoR* I / *Not* I 双酶切的 pPIC9,构建载体 pPIC9-arresten,再转化用 hanahan 法制作的感受态大肠杆菌 DH5 α ,LA 平板过夜培养,挑取单克隆,提取质粒,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,确认外源片段是否插入,酶切确定插入片段大小,测序确认。

1.6 酵母宿主细胞的转化及重组子的筛选

Sac I 酶切 20 μ g pPIC9-arresten 质粒,线性化后转化毕赤酵母 GS115(按 Invitrogen 公司说明书,PEG1000 法制作毕赤酵母 GS115 的感受态),涂布 MD 平板,30 $^{\circ}$ C 温箱培养,72h 检查菌落,挑单克隆,BMGY 培养,提取酵母基因组 DNA,用 arresten 引物 P3、P4 进行 PCR 扩增,对产物进行鉴定,筛选确认整合有 arresten 基因的重组子。

1.7 菌株的表型鉴定和表达筛选

对整合有 arresten 基因的菌株接种于 MM 和 MD 平板。3d 后,根据菌体生长情况鉴定 Mut(+ / -) 表型。按 Invitrogen 公司说明书先用 BMGY 培养 24h,换 BMMY 培养诱导表达,用四层纱布保持良好的通气,每隔 12h 左右取样分析,并每隔 24h 补加甲醇至 1%。取培养液上清 100 μ L,SDS-PAGE 电泳(单体总浓度 12%),考马斯亮蓝 R250 染色检查。

1.8 毕赤酵母中 Arresten 的诱导表达

BMGY 平板活化,取单克隆菌株接种于含有 10mL BMGY 液体培养基的 100mL 锥形瓶中,摇床 250r/min 在 30 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} > 6$,按 1% 转接于 1L 瓶中,在相同条件下培养至 OD_{600} 为 2 ~ 6 后,再换 BMMY 液体培养基 50mL 培养。每隔 12h 左右取样,并每隔 24h 补加 1% 的甲醇,取培养上清 SDS-PAGE 电泳(单体总浓度 12%),考马斯亮蓝 R250 染色确定表达产物量最大的培养时间。

1.9 表达蛋白的脱盐、浓缩和定量

培养液上清用 0.5 μ m 尼龙膜过滤,上 Sephadex G-25 柱脱盐,冷冻干燥浓缩,Bradford 染料结合法定量总蛋白质。

1.10 内皮细胞血管化抑制活性测定

将 matrigel 按 40 μ L/孔均匀地铺在 millicell 膜上,37 $^{\circ}$ C 成胶 30min,紫外照射过夜灭菌,临用前再次成胶 30min。在 5% CO $_2$,37 $^{\circ}$ C 饱和湿度,用含 10% 小牛血清的 M199 培养基培养人脐静脉内皮细胞 ECV-

304,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养肿瘤细胞 MDA-MB-435S。将贴壁细胞消化计数,按每孔 2×10^5 个的量,将肿瘤细胞接种于 6 孔板,ECV-304 接种于成胶的 millicell 内。实验组在肿瘤细胞的培养液加 50 μ g 含 arresten 浓缩总蛋白(相当于培养上清液 100 μ L)对照组加未转化酵母培养上清液 100 μ L。将接种了 ECV-304 的 millicell 置于 24 孔板培养 24min,待细胞贴壁后,换含 1% 小牛血清的 M199 培养液,并置于含有肿瘤细胞的 6 孔板培养,换液培养 4d,取出 millicell 膜,PBS 洗 3 次,95% 乙醇固定 15min,HE 染色,将小室滤膜置载玻片上,光镜下(10 \times)观察照相。

2 结果

2.1 基因的扩增

从正常人肝脏提取总 RNA,甲醛变性电泳可见清晰的三条 5.8S、18S、28S rRNA 带。mRNA 经逆转录后,巢式 PCR 扩增出的目标片段大小与据预期 arresten 序列一致(图 1)。

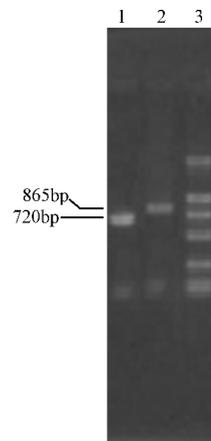


图 1 Arresten PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoresis analysis of arresten cDNA

amplified by PCR in 0.8% agarose gel

1. The products amplified by PCR using primers P3 and P4;

2. The products amplified by PCR using primers P1 and P2;

3. DNA marker DL2000(2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 200bp, 100bp)

2.2 PCR 产物的克隆及序列分析

按 Promega 说明书将 PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体上,测序表明其所编码氨基酸与 GenBank 中编码人 IV 型胶原 α_1 链非胶原末端序列存在一个氨基酸的差异,样本第 130 位氨基酸为 Tyr,文献报道为 Cys(GenBank accession number: NM_1845)。另外,样本 arresten 第 44 位的甘氨酸对应密码 GGC,与 GenBank 记录密码不同(NM_1845 中登记编码甘氨酸对

应密码是 GGA ,本文序列已经提交 GenBank ,accession number :AF536207)。

2.3 酵母转化载体的构建与鉴定

从 pGEM-arresten 上用 *EcoR* I / *Not* I 双酶切下

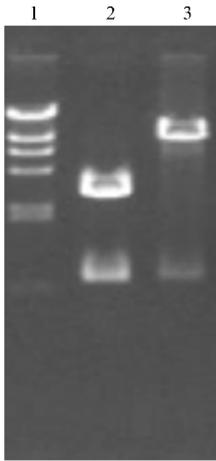


图 2 重组质粒酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Agarose electrophoresis analysis of the recombinant plasmid

1. λ DNA *Hind*III digest marker ;
2. pGEM-arresten digested by *EcoR* I and *Not* I ;
3. pPIC9-arresten digested by *EcoR* I and *Not* I

2.4 酵母转化及表达菌株的筛选和表型鉴定

转化后选单克隆 ,用 BMGY 培养液培养 ,提总 DNA ,PCR 筛选出整合有 arresten 基因的菌株 ,10 株 GS115 在 MD ,MM 平板生长一致 均为 AOX1 基因完整型(甲醇利用表型 Mut⁺ ,Methanol utilization)。重组菌用 BMGY 培养 ,BMMY 诱导表达 ,用 12% SDS-PAGE 分析诱导表达后的培养液上清(图 3) ,发现培

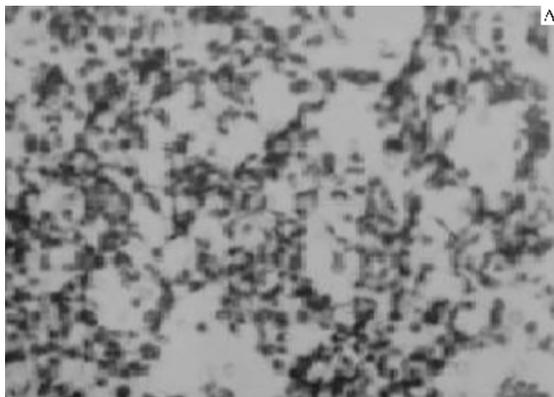


图 4A 对照内皮细胞 ECV-304 管化状态

Fig.4A Tubulation of endothelial cell
ECV-304 without arresten

arresten 基因 ,与 *EcoR* I / *Not* I 双酶切的 pPIC9 载体连接后转化毕赤酵母 GS115 ,从平板上挑 10 个单克隆 ,经 PCR 鉴定及酶切片段大小确认 ,测序表明读码框正确 ,表达质粒构建成功(图 2)。

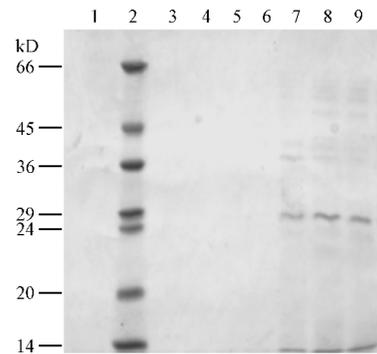


图 3 SDS-PAGE 分析表达 arresten 蛋白

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed arresten

1. 72h supernatant of GS115 conditioned medium 20 μ L
2. Protein marker (14 20 24 29 36 45 66kD)
3. The 3 4 5 6 7 8 9 lanes were the supernatants of GS115 conditioned medium 20 μ L at 24 36 48 , 60 72 90 ,102h , respectively

养 72h 后分泌型 arresten 的表达最高。

2.5 浓缩蛋白的生物活性测定

在 ECV-304 细胞培养液 ,加 50 μ g 转化酵母表达培养液总蛋白 ,ECV-304 细胞的管化得到有效抑制(图 4A) ,而对照组则出现了明显的内皮细胞管化(图 4B)。

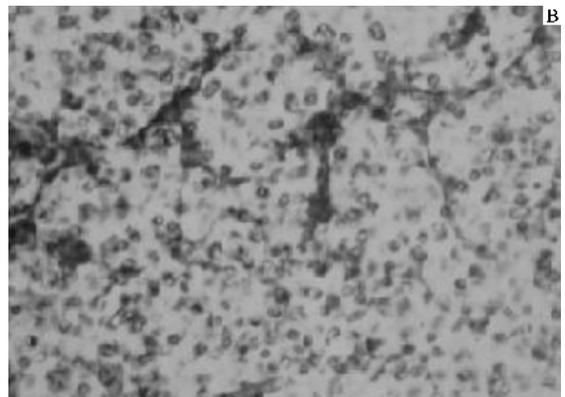


图 4B 加表达 arresten 后内皮细胞 ECV-304 管化状态

Fig.4B Tubulation of endothelial cell
in the presence of 50 μ g arresten

3 讨 论

按 PCR 产物测序结果,所用样本第 130 个氨基酸为 Tyr,而 GenBank 报道的编码人 IV 型胶原 α_1 链非胶原区的 130 个氨基酸为 Cys(GenBank accession number:NM_1845);样本 arresten 第 44 位甘氨酸对应密码是 GGC,而 NM_1845 中登记编码甘氨酸对应密码是 GGA。这种差异可能来源于种属差异(本文中样品测序结果已经提交 GenBank,accession number:AF536207)。

Matrigel 是大鼠 ESH 肉瘤细胞外基质提取物,其成分与基底膜相似,在 37℃ 呈胶状,可以代替血管基底膜进行实验^[4]。在趋化因子(如肿瘤细胞分泌物)诱导下内皮细胞能侵袭 Matrigel,发生管化,形成树枝状或网状结构。本文以 Matrigel 形成的凝胶代替基底膜测定内皮细胞的管化作用,发现重组表达的 arresten 对 Matrigel 辅助的内皮细胞管化有明显抑制作用,说明本文实验获得了重组表达的活性汉族人源 arresten。

为降低分泌蛋白的降解,将 P₃ 引物改为 5'-CGCTCGAGAAAAGAACCCCA TCTGTTGATC-3',其中增加了 ACCCCA 6 个碱基,编码氨基端 Thr-Pro,与 P₄ 一起扩增,构建重组质粒 pPIC9-K。肽链的氨基端的 Thr 与 Pro 的亚氨基形成的肽键,可降低氨肽酶对表达产物的水解^[10]。初步实验表明,添加此两个氨基酸后的 arresten 仍然具有抑制内皮细胞管化作用(资料未公布)。我们将作进一步的研究。

本文结果表明用毕赤酵母为宿主,pPIC9 为载体,构建得到表达人 arresten 的酵母细胞,为进一步深入研究其作用机理和结构优化等奠定了基础。但是目前获得的天然血管生成抑制肽比活性都很低,

还需要进一步进行结构优化和尽量降低治疗剂量,才可能用于实践。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G. H. A. clowes memorial award lecture. *Cancer Res*, 1986, **46**(2):467-473
- [2] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1995, **1**(1):27-31
- [3] Colorado P C, Torre A, Kamphaus G *et al.* Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res*, 2000, **60**(9):2520-2526
- [4] Bao L, Matsumura Y, Baban D *et al.* Effects of inoculation site and Matrigel on growth and metastasis of human breast cancer cell. *Br J cancer*, 1994, **70**(2):228-232
- [5] George D Kamphaus, Pablo C Colorado, David J Panka *et al.* Canstatin, a Novel Matrix-derived Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *J Biol Chem*, 2000, **275**(2):1209-1215
- [6] Yohei M, Mark M, Corinne R *et al.* Identification of the Anti-angiogenic Site within Vascular Basement Membrane-derived Tumstatin. *J Biol Chem*, 2001, **276**(18):15240-15248.
- [7] Maeshima Y, Colorado P C, Torre A *et al.* Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*, 2000, **275**(28):21340-21348
- [8] Kalluri R, Torre A, Shield CF 3rd *et al.* Identification of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen as alloantigens for Alport posttransplant anti-glomerular basement membrane antibodies. *Transplantation*, 2000, **69**(4):679-683
- [9] Minto A W, Kalluri R, Togawa M *et al.* Augmented expression of glomerular basement membrane specific type IV collagen isoforms (alpha3-alpha5) in experimental membranous nephropathy. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, **110**(3):207-217
- [10] Burton J, Wood S G, Lynch M *et al.* Substrate analogue inhibitors of the IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Chem*, 1988, **31**(8):1647-1651

Expression and Identification of Recombinant Arresten in *Pichia pastoris*

ZENG Zhao-Chun^{*1} HE Ai-Bin¹ MA Li-Xin² LIAO Fei¹

¹(Biochemistry Department, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

²(Microbiology Department, Hubei University, School of Life Science, Wuhan 430062, China)

Abstract Arresten as a endogenous inhibitor of angiogenesis originated from the carboxyl-terminal 223 amino acids fragment of the non-collagen domain in α_1 chain of human collagen IV. In order to get the soluble arresten with biological activity, the cDNA of arresten was cloned and expressed in *Pichia pastoris*. The produced arresten cDNA was amplified by PCR using primer P₁ 5'-

AGGCCCCGATGGGTTGC-3' , primer P₂ 5'-CTATAAG GCACTTTACGGTTTTTC-3' . The PCR products was cloned into pGEM-T vector , and sequenced. The arresten cDNA from pGEM-T vector was recombined with vector pPIC9 as pPIC9-arresten , used to transform *E. coli* DH5 α , and the inserted arresten cDNA confirmed by agarose electrophoresis and sequencing. pPIC9-arresten was linearized by *Sac* I . *Pichia pastoris* GS115 was treated with PEG1000(followed Invitrogen 's specification) , transformed with linear recombined pPIC9-arresten. *Pichia pastoris* GS115 was cultured on MD medium , single clone was selected and the DNA from the single clone was extracted , used as template , characterized by PCR using the second pair primers P₃ :5' -CGCTCGAGAAAAGATCTGTTGATC-3' , P₄ :5'-GCCCCGG ATCCTTATGTTCTTCTCATAACAG-3' . The polynucleotides CTC-GAGAAAAGA used as marker sequence was inserted into primer P3 for signal peptidase to cleave off the signal sequence correctly. The recombined *Pichia pastoris* GS115 was selected according to the results of PCR , cultured on MM and MD media and then in the BMGY media using methanol as inducer. Expressed arresten was analysed by SDS-PAGE. The soluble arresten expressed by *Pichia pastoris* gave apparent molecular weight in SDS-PAGE consistent with that calculated , and in matrigel gel it showed inhibitory activity on the tubulation of endothelial cell ECV-304 induced by tumor cell MDA-MB-435S. These results showed arresten with biological activity is expressed successfully in *Pichia pastoris* GS115.

Key words arresten , angiogenesis , *Pichia pastoris*