

# 人纤溶蛋白酶原 K5 在毕赤酵母中的表达 及其生物活性鉴定

沈 利 宋大新 高卜渝 吕 红 李育阳\*

(复旦大学生命科学学院遗传学研究所,遗传工程国家重点实验室,上海 200433)

**摘 要** 化学合成人纤溶蛋白酶原 K5 (pK5) 的编码基因并克隆到毕赤氏酵母表达系统的分泌型载体 pPIC9K 上,将重组质粒经 *Bgl* II 单酶切后电转化 *Pichia pastoris* GS115 菌株,筛选出对 G418 有高抗性和在 MM 培养基上生长缓慢的转化子。经摇瓶发酵和甲醇诱导后,用 15% SDS-PAGE 检测发酵上清液,表明有重组蛋白 pK5 的高表达。经 CM-Sephrose 离子交换柱和 Superdex 75 分子筛层析两步分离纯化,获得了纯度达到 98% 的 rpK5。用 MTT 方法检测的结果表明,纯化的 rpK5 可显著地抑制人血管内皮细胞的生长。

**关键词** 人纤溶蛋白酶原 K5, 酵母, 分泌表达, 内皮细胞增殖分析

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0879-05

Angiostatin 是一种内源性的血管生长抑制因子,它是人纤溶蛋白酶原(Human Plasminogen, HPg)的酶解片段,具有 4 个 kringle,它能够通过影响血管内皮细胞的生长来抑制新生血管的生长,是新一代抗癌药物<sup>[1]</sup>。它可以有效阻止肿瘤新生血管的形成,使肿瘤细胞得不到营养而停止生长,进一步萎缩,甚至完全消失<sup>[2,3]</sup>。1996 年 Yihai Cao 等人又发现 HPg 的第 5 个 Kringle (pK5) 也具有相同的功能甚至更强<sup>[4]</sup>。从血液中纯化得到的人 pK5 能抑制牛的毛细血管内皮细胞生长,半抑制浓度为 50 nmol/L。已经有人利用大肠杆菌系统表达鼠的重组 pK5 蛋白,半抑制浓度为 500 nmol/L<sup>[5,6]</sup>。另有研究发现 pK5 还与内皮细胞的细胞周期和细胞凋亡有关<sup>[7]</sup>。由于 pK5 的抑制作用是选择性地针对血管内皮细胞,而且这类血管抑制因子在肿瘤的治疗中不会产生获得性抗药性,故这类药物有较好的应用前景。国内已有科研人员开始利用大肠杆菌系统表达人的 pK5。由于毕赤氏酵母对外源蛋白的加工修饰与哺乳动物细胞比较接近,而且可以进行大规模的发酵生产,因此我们决定利用毕赤氏酵母系统来表达人的重组 pK5 蛋白(rpK5),并对表达产物的纯化和生物活性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和细胞:大肠杆菌 *E. coli* Top10,毕赤氏

酵母 *Pichia Pastoris* GS115 均为本室保存;人的血管内皮细胞由苏州医学院保存,用于检测重组蛋白的活性。

**1.1.2 质粒和载体:**质粒 pSK-pK5 含有化学法合成的 pK5 编码基因(上海皓嘉科技发展有限公司合成);载体 pPIC9 和 pPIC9K 由本室保存,用于构建重组蛋白表达载体。

**1.1.3 主要试剂及培养基:**各种限制酶、连接酶、DNA 分子质量 Marker、ExTaqDNA 聚合酶反应体系购自 TaKaRa 公司;毕赤氏酵母发酵所需试剂购自美国 DIFCO 公司;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳所用试剂和蛋白质分子质量 marker 购自 Bio-Rad 公司;胎牛血清和 RPMI 1640 细胞培养液购自 Gibco-BRL 公司;其他试剂均为分析纯。LB、YPD、MD、MM、BMGY 和 BMMY 培养基均按 Invitrogen 公司操作手册推荐的方法配制。

### 1.2 方法

**1.2.1 rpK5 重组蛋白表达载体的克隆:***Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切 pSK-rpK5,胶回收含 rpK5 的小片段,用 T4 连接酶与 pPIC9 线性片段(*Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切)连接,转化 Top10 大肠杆菌,筛选鉴定获得 pPIC9-rpK5;再用 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切 pPIC9-rpK5,胶回收含 rpK5 的片段,用 T4 连接酶与 pPIC9K 线性片段(*Sac* I 和 *Sal* I 双酶切)连接,转化 Top10 大肠杆菌,筛选鉴定获得 pPIC9K-rpK5。经过大肠杆菌扩增和碱性 SDS 法抽提获得 pPIC9K-rpK5 质粒 DNA。

收稿日期:2004-05-08,修回日期:2004-08-02。

\* 通讯作者。 Tel & Fax: 86-21-65643436; Email: liyuy@online.sh.cn

**1.2.2 电转化酵母细胞:**用 *Bgl* II 单酶切重组质粒 pPIC9K-rpK5,使之线性化,与新制备毕赤氏酵母 GS115 感受态细胞混合,用 Bio-Rad Gene Pulser 电转化仪,在 1300V,25 $\mu$ F,200 $\Omega$  条件下进行电转化,而后立即加入 1mL 预冷山梨醇,将电转化液涂布于 RDB 选择平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d,观察转化子的生长。

**1.2.3 高拷贝转化子的筛选和鉴定:**将 RDB 平皿上生长的酵母转化子点种在不同 G418 质量浓度(0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 mg/mL)的 YEPD 平皿上,30 $^{\circ}$ C 培养,得到在高浓度的 G418 存在下仍能生长良好的抗性株。将 G418 抗性菌分别点种在 MD 和 MM 培养基上,选择在 MD 生长快速而在 MM 上生长缓慢的克隆。分别接种 YEPD 液体培养基,30 $^{\circ}$ C,220r/min 培养 1d,根据文献[8]抽提酵母总 DNA,以此为模板, AOX1 5' primer: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', AOX1 3' primer: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 为引物,PCR 鉴定 rpK5 基因在染色体上的整合状态。

**1.2.4 甲醇诱导表达:**将筛选得到的转化子分别接种于 200mL BMGY 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养至  $OD_{600}$  为 20 以上。无菌状态下收集菌液,离心,6000r/min,6min,去上清,用 60 mL BMMY 酵母培养基重悬细胞,30 $^{\circ}$ C,振荡培养 4d,每天在培养液中加入终浓度为 1% 的甲醇,诱导表达。最后培养液用 8000r/min 离心 10min,取上清,SDS-PAGE 电泳分析检测外源蛋白 rPK5 的表达。

**1.2.5 重组蛋白 rpK5 的分离纯化:**发酵上清液用 20mmol/L HAc/NaAc 的缓冲液透析后,上样离子交换柱 CM-Sephrose F.F(Pharmacia Co.Ltd),该柱先用 20mmol/L HAc/NaAc 缓冲液平衡;用 300mmol/L NaCl 的 HAc/NaAc 缓冲液洗脱,收集含有 rpK5 蛋白峰的洗脱液,再用 Superdex 75 2.6/60cm 柱分离后,得到纯化产物。

**1.2.6 rpK5 蛋白等电点的测定:**根据 Bio-Rad 公司的 Model 111 Mini IEF Cell Instruction Manual 操作。

**1.2.7 重组蛋白 rpK5 的生物活性鉴定:**人血管内皮细胞在 RPMI 1640(添加含体积百分数为 10% 的胎牛血清)中进行培养。将纯化的 rpK5 蛋白过滤除菌后,进行系列稀释,分别加入细胞培养液中,同时以强效的血管抑制因子 Endostatin 作为阳性对照,宿主菌 GS115 诱导表达的发酵上清液为阴性对照,同样经过系列稀释后,加入细胞培养液中,37 $^{\circ}$ C,  $\varphi$ (CO<sub>2</sub>) = 5% 培养 72h,用 MTT 比色法<sup>[9]</sup>检测细胞生长状态。

## 2 结果

### 2.1 rpK5 重组表达菌株的构建

按照材料方法所述的过程,构建获得重组质粒 pPIC9K-rpK5。pPIC9K-rpK5 经过 *Bgl* II 单酶切后获得 rpK5 的表达单元,表达单元内不仅含有 rpK5 和 G418 的抗性基因,其两端还分别含有 AOX1 基因的启动子区(5' AOX1)和终止子区(3' AOX1)序列,电转化后能够与宿主菌 GS115 染色体上的 5' AOX1 和 3' AOX1 序列发生同源双交换,将 rpK5 表达单元整合到染色体上,替换了染色体上的 AOX1 ORF,使表达菌株只能微弱地利用甲醇,在 MM 培养基上生长缓慢。通过对不同质量浓度 G418 的抗性筛选,获得 24 个在 4.0mg/mL G418 质量浓度下仍能生长且在 MM 培养基上生长缓慢的克隆。抽提酵母总 DNA,用 AOX1 的 5' 和 3' 端引物,进行 PCR 分析,得到约 880 bp 的 PCR 产物(图 1),说明 rpK5 表达单元已经同源重组到染色体 DNA 上,替换了染色体上的 AOX1 ORF,因此我们获得 rpK5 重组表达菌株。

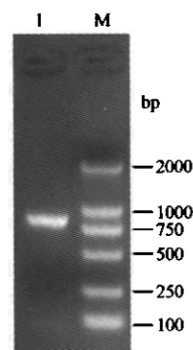


图 1 转化子的 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of transformants

I: GS115/pPIC9k-rpK5; M: DNA marker DL2000

### 2.2 rpK5 表达菌株的诱导表达

rpK5 重组表达菌株经过甲醇诱导发酵后,发酵液的上清部分直接进行 SDS-PAGE 检测,空载体 pPIC9K 转化 GS115 获得的菌株作同期发酵、诱导表达操作,其发酵上清液作为阴性对照同时进行 SDS-PAGE 检测。结果表明,在 15 kD 附近有一明显的蛋白表达条带,阴性对照没有此条带(图 2)。

### 2.3 rpK5 表达菌株表达条件的优化

为了提高重组蛋白 rpK5 在发酵上清液中的含量,从而有利于提高纯化时的效率和得率,我们对表达工程菌进行发酵条件的摸索。

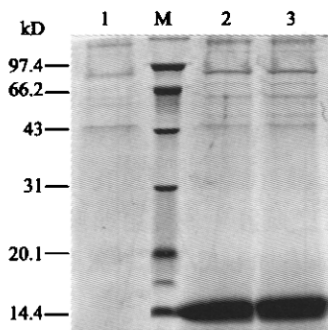


图2 表达产物 rpK5 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed rpK5

M: molecular weight standard; 1: supernatant liquid of

GS115/pPIC9K; 2~3: supernatant liquid of GS115/pPIC9K-rpK5

2.3.1 最佳起始诱导时间的选择:对 GS115 菌株的生长曲线的测定结果表明菌种的对数生长期为 12

~22h,此后逐渐进入稳定期;要提高表达量,既要有一定的菌体量,又要保证菌体生长旺盛,因此选择对数生长末期和稳定初期这一时间段,摸索最佳起始诱导时间。结果表明当菌体生长到 20~24h 时进行诱导, rpK5 的表达量没有显著差异;当培养时间延长至 26h 再诱导, rpK5 的表达量明显降低(图 3A)。

2.3.2 培养基最佳 pH 值的选择:酵母可生长的 pH 范围广泛,但不同的 pH 会影响外源蛋白的表达量。为了获得较高水平 rpK5 的表达,比较了 pH 5, pH 6 和 pH 7 不同条件下 rpK5 的表达。实验结果表明,当发酵培养基 BMMY 的 pH 值为 6 时, rpK5 的表达量最高(图 3B)。得到了优化条件后,我们发现目的蛋白在总分泌蛋白中的表达量有明显的提高,这为进一步的蛋白纯化奠定了基础。

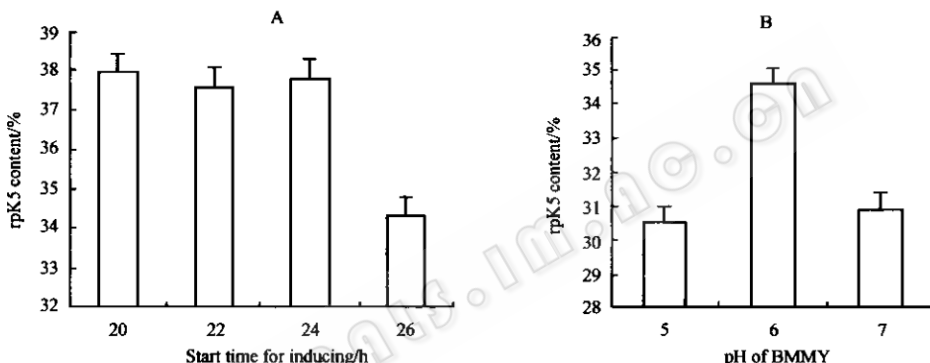


图3 rpK5 表达菌株表达条件的优化

Fig.3 Optimal culture conditions for expression of rpK5

A: start time for inducing; B: pH of growth medium BMMY

2.4 重组蛋白 rpK5 的分离纯化和纯度鉴定

由于发酵上清液(图 4, lane 1)的色素含量高且离子强度高,因此,首先将样品用 20 mmol/L HAC/NaAc 的缓冲液透析,除去大量色素和小分子物质(图 4, lane 2),再用 20mmol/L HAC/NaAc 缓冲液预平衡的 CM-Sepherose F.F 离子交换柱纯化,样品用不同浓度 NaCl 的 HAC/NaAc 缓冲液洗脱, Pharmacia LKB-control Unit UV-1 检测共有 2 个蛋白峰。经 SDS-PAGE 电泳检测,用 300mmol/L NaCl 的 HAC/NaAc 缓冲液洗脱的组份中含有 rpK5(图 4, lane 3)。初步纯化的样品进一步用 Superdex 75 2.6/60cm 柱分离纯化。通过 9 次重复实验证明该分离方法稳定有效,纯化的蛋白用 SDS-PAGE 检测, rpK5 蛋白条带经 Gel works 1D Advanced 软件扫描分析结果表明,其纯度在 98% 以上(图 4, lane 4)。纯化蛋白通过分子筛时只有一个蛋白峰,峰形对称,无杂峰(图 5A)。等电聚焦分析表明 rpK5 的等电点为 6.6(图 5B)。纯

化的 rpK5 具有典型的蛋白质紫外吸收光谱,其最大紫外吸收波长为 279.4nm(图 5C)。

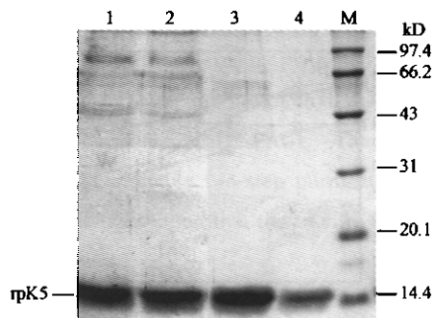


图4 rpK5 蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of samples collected at

different stages of rpK5 purification

1: supernatant of GS115/pPIC9K-rpK5;

2: dialyzed supernatant of GS115/pPIC9K-rpK5;

3: fraction eluted from CM-Sepherose;

4: fraction eluted from Superdex 75;

M: molecular weight standard

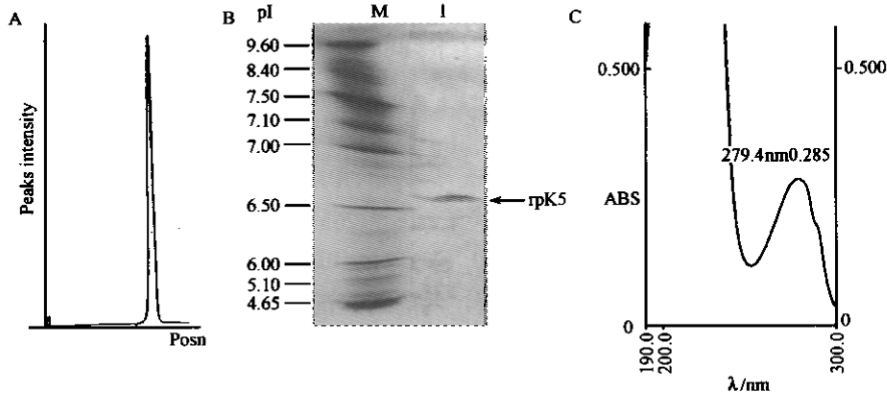


图 5 纯化的 rPK5 理化性质

Fig.5 Characterization of purified rPK5

A: Gel filtration analysis;

B: isoelectric point analysis. M: pI standard; I: purified rPK5; C: UV absorption spectrum analysis

### 2.5 rpK5 的生物活性测定

将纯化的 rpK5 系列稀释后, 加到内血管内皮细胞株的培养液中, 在 37℃,  $\varphi(\text{CO}_2) = 5\%$  条件下培养 72h 后, 用 MTT 方法检测不同浓度 rpK5 对内血管内皮细胞生长的影响, 同时以 Endostatin 作为阳性对照, GS115/pPIC9K 菌株发酵上清液作为阴性对照。各组样品重复 3 次, 在 595nm 处测定细胞的 OD 值, 取平均值后对蛋白质浓度作图(图 6)。结果表明,

与阴性对照 GS115/ pPIC9K 菌株发酵上清液比较, 纯化的 rpK5(图 6A)与阳性对照 Endostatin(图 6B)都可显著抑制内皮细胞的体外增殖, 呈剂量依赖性关系。当细胞培养液中加入 3000ng/mL 的纯化 rpK5 时, 细胞的生长抑制率达到 53% (图 6A), 阳性对照 endostatin 在同样浓度下, 对细胞的生长抑制率是 38% (图 6B)。在培养液中加入 60ng/mL 的 VEGF 进行重复实验, 结果表明纯化的 rpK5 和 endostatin 对 VEGF 引起的内皮增殖均具有显著的抑制作用, 当蛋白质浓度是 3000ng/mL 时, rpK5 和 endostatin 对细胞的生长抑制率分别是 61% 和 46%。这些结果表明纯化的 rpK5 蛋白具有抑制内血管内皮细胞生长的生物活性。

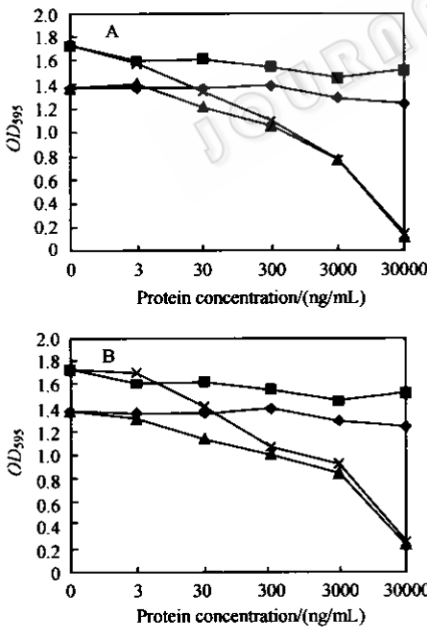


图 6 纯化的 rpK5 蛋白对内血管内皮细胞生长的影响

Fig.6 The effect of rpK5 and Endostatin on the growth of endothelial cell

A: rPK5; B: Endostatin; VEGF Concentration: 60ng/mL  
 A: —◆—GS115/pPIC9K —■—GS115/pPIC9K + VEGF  
 —▲—rpK5 —x—rpK5 + VEGF  
 B: —◆—GS115/pPIC9K —■—GS115/pPIC9K + VEGF  
 —▲—Endo —x—Endo + VEGF

### 3 讨论

血管新生与心血管疾病、恶性肿瘤密切相关, 例如, 冠状动脉粥样硬化、心肌梗塞等都会引起心肌缺血, 利用侧枝血管的形成, 开辟新的血流通道, 建立新的循环, 可以达到治疗的目的; 而对于肿瘤细胞, 新生血管是其营养成分的运输通道, 抑制新生血管的生成可以抑制肿瘤细胞的生长、繁殖、转移。利用毕赤氏酵母表达系统, 克隆表达了重组的人血管生长抑制因子 rpK5, 经过 G418 筛选, 获得了高表达的工程菌株。不同的发酵条件能有效地改变重组蛋白的分泌表达量, 培养时间、诱导时间、培养基组成、培养基 pH、温度、通风量等均会影响蛋白的表达量<sup>[10]</sup>。在对 rpK5 最佳发酵条件的摸索中发现, 在工程菌的对数生长中后期进行诱导能提高重组蛋白的表达量; 同时 pH6.0 的发酵条件也是获得高表达的必要条件。透析、阳离子交换层析、分子筛的纯化

过程,能有效地使 rPK5 的纯度达到 98%。该纯化方法不仅能有效地去除杂蛋白,而且获得的纯化 rPK5 具有较强的生物活性。在研究 rPK5 抑制血管内皮细胞生长的活性中发现,毕赤氏酵母表达的 rPK5 比阳性对照 endostatin 有更强的生物活性,能更有效地抑制血管内皮细胞的生长。上述研究结果为 rPK5 的进一步研究和开发打下了很好的基础。

**致谢** rPK5 的活性鉴定是在苏州医学院完成的,感谢苏州医学院张学光教授在活性检测方面的支持。

#### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] O' Reilly MS, 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
- [ 2 ] Cao Y, Chen C, Weatherbee JA *et al.* Gro-beta, a-c-x-c chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J Exp Med*, 1995, **182**: 2069 - 2077
- [ 3 ] Cao Y, Ji RW, Davidson D *et al.* Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 29461 - 29467
- [ 4 ] Cao Y, Chen A, Seong SAA *et al.* Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 22924 - 22928
- [ 5 ] Cao Y, O' Reilly MS, Marshall B *et al.* Kringle 5 of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 1055 - 1063
- [ 6 ] Ji WR, Barrientos LG, Llinas M *et al.* Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**: 414 - 419
- [ 7 ] Lu H, Dhanabal M, Volk R *et al.* Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **258**: 668 - 676
- [ 8 ] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in yeast genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000
- [ 9 ] David LS, Robert DG, Leslie AL. *Cell: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
- [ 10 ] Beierley RA, Bussineau C, Siegel RS *et al.* Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, **589**: 350 - 362

### Expression of rpK5 in *Pichia pastoris* and its Biological Activity Identification

SHEN Li SONG Da-Xin GAO Bo-Yu LÜ Hong LI Yu-Yang\*

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** The expression vector was constructed by inserting chemically synthesized DNA fragment coding for pK5 (plasminogen kringle 5) in expression vector pPIC9k and transformed into *Pichia pastoris* GS115. The transformants with high level of G418 resistance and slow growth on the MM plates were selected. After the selected transformant was grown in BMGY medium and induced by methanol, the culture supernatant was collected by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the recombinant pK5 was secreted into supernatant at quite high level. Through a simple two-step purification procedure, rpK5 with 98 % of purity was obtained. The results of endothelial cell proliferation assay showed that the in vitro anti-endothelial cell proliferation activity of purified rpK5 was significant.

**Key words** plasminogen kringle 5, yeast, secretory expression, endothelial cell proliferation assay