

重组 TFPI 缺失突变体 TFPI₁₋₁₆₁ 在毕赤酵母中的 高效表达及功能鉴定

白 浩 马 端* 宋后燕 莫 炜 顾银良 孔德升 郭泓坤

(复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

摘 要 人组织因子途径抑制物(TFPI)是一种体内天然存在的外源性凝血途径特异性抑制物。缺失突变体 TFPI₁₋₁₆₁ 仅包括 TFPI 的 N 末端、K1 和 K2 结构域, 是一种研究 TFPI 结构与功能及其相互关系的理想对照分子。以克隆质粒 pGEM-3Zf(-)-TFPI 为模板, 用 PCR 方法获得 TFPI₁₋₁₆₁ 基因, 构建表达质粒 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁ 并转化毕赤酵母 GS115。通过筛选多拷贝转化子及优化发酵培养条件, 首次在毕赤酵母中高效表达了 TFPI₁₋₁₆₁, 经纯化后最终产量高于酿酒酵母 20 倍以上。由于糖基化程度不同, TFPI₁₋₁₆₁ 表达为 TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) 两种分子形式, 其等电点分别为 4.8 和 4.9。根据等电点差异, 二者可通过阴离子交换层析得到分离, 其活性无显著性差异。经分子筛和阴离子交换层析分离纯化后, 从 4L 发酵培养液中可分别获得 1.4g TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 1.8g TFPI₁₋₁₆₁ (27kD), 其比活性分别达 12 880u/mg 和 12 400u/mg, 回收率达 55%。经稀释的凝血酶原时间及发色底物法检测, 重组 TFPI₁₋₁₆₁ 具有良好的抗凝及抑制 FXa 活性的作用。为获得大量 TFPI₁₋₁₆₁ 提供了一种廉价高效的蛋白表达纯化方式, 为进一步的基础及临床前研究奠定了基础。

关键词 组织因子途径抑制物, TFPI₁₋₁₆₁, 表达, 纯化, *Pichia pastoris*

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0937-06

组织因子途径抑制物 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 是一种体内天然存在的外源性凝血途径特异性抑制物, 属于 Kunitz 型蛋白酶抑制剂家族, 成熟蛋白全长 276 氨基酸, 具有 3 个 Kunitz 型结构域, 从 N 端到 C 端分别称为 K1、K2、K3, 其 N 端多为酸性氨基酸, C 端多为碱性氨基酸。K1 和 K2 可以分别与 TF/FVIIa 和 FXa 结合并抑制其活性, K3 和 C 末端除参与 TFPI 发挥最佳抗凝活性^[1,2] 外, 还能与肝素、低密度脂蛋白、低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 和 CD14 等分子结合^[3-6], 产生多种生物学效应。缺失突变体 TFPI₁₋₁₆₁ 仅包括 TFPI 的 N 末端、K1 和 K2 结构域, 是一种研究 TFPI 的结构与功能的理想对照分子, 并具有半衰期长、作用缓和、生物功能专一等特点, 有望在血栓病及相关疾病的预防方面发挥重要作用。本文在克隆 TFPI₁₋₁₆₁ 基因, 筛选多拷贝转化子的基础上, 首次在巴斯德毕赤酵母中进行了该基因的高效表达, 经纯化后最终产量高于酿

酒酵母 20 倍以上^[7], 并获得了纯度高、活性好的目的蛋白, 为 TFPI₁₋₁₆₁ 的进一步基础及临床前研究提供了一种廉价高效的蛋白质表达纯化方式。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒: 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室冻存; 重组克隆质粒 pGEM-3Zf(-)-TFPI 为本实验室构建; 毕赤酵母 GS115 和质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂: 抗生素 G418 购自 Promega 公司; DNA 聚合酶 pfu、dNTP 购自申能博彩公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自华舜公司; Tryptone、Yeast Extract、Peptone 购自 Oxoid 公司。蛋白质定量检测试剂盒购自 Bio-Rad 公司; 兔抗人 TFPI 多抗购自 ADI 公司; 野生型 TFPI 为本实验室表达纯化; 其

收稿日期: 2004-04-08, 修回日期: 2004-06-16。

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30271229) 和上海市重点科技攻关课题基金 (No. 034319205) 资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-21-54237198; Fax: 86-21-64033738; E-mail: duanma@shmu.edu.cn

它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器: Model 111 Mini IEF Cell 等电聚焦电泳仪购自 Bio-Rad 公司; GenePulser II 电穿孔仪购自 Bio-Rad 公司; ImageMaster VDS 图像分析系统购自 Pharmacia Biotech 公司; BIOFLO 3000 5L 发酵罐购自 NBS 公司; PrepLC 4000 System 蛋白质纯化系统购自 Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建毕赤酵母表达质粒 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁: 以克隆质粒 pGEM-3Zf(-)-TFPI 为模板,用上、下游引物通过 PCR 扩增 TFPI₁₋₁₆₁ 基因。反应条件:94℃ 变性 3min;然后 94℃ 变性 40s,40℃ 退火 40s,72℃ 延伸 60s,进行 8 个循环;然后 94℃ 变性 40s,55℃ 退火 40s,72℃ 延伸 60s,进行 25 个循环;最后 72℃ 延伸 5min,4℃ 保温。PCR 产物通过 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点与质粒 pPIC9K 连接重组,转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。挑阳性克隆抽提质粒后进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定,并测定 DNA 序列。重组质粒命名为 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁。

上游引物:5'-CGG GAA TTC (*EcoR* I) GAC TCT GAG GAA GAT GAG-3'

下游引物:5'-GTT GCG GCC GC (*Not* I) TTA GGT TCC ATA GTT ATC-3'

1.2.2 电转化毕赤酵母 GS115 及筛选多拷贝阳性克隆: 参照 Invitrogen 公司 Multi-Copy Pichia Expression Kit 说明书操作。用 *Sal* I 酶切重组质粒 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁,使其完全线性化,经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀纯化后电转化感受态毕赤酵母 GS115,电击参数:电压 1500V,电容 25 μ F,电阻 200 Ω ,涂布 MD 平板,30℃ 静置培养 48h。挑单克隆菌落接种至 96 孔细胞培养板,经同步化后分别接种至含 0、1.0、2.0、4.0 g/L G418 的 YPD 平板上,30℃ 静置培养至长出单克隆菌落。

1.2.3 PCR 法鉴定转化子表型: 在高浓度 G418-YPD 平板上挑单克隆(约 10⁷ 个细胞)至 20 μ L 0.25% SDS 溶液中,混匀后 90℃ 加热 3min,离心后取 1 μ L 上清作模板,用上、下游引物进行 PCR 反应。反应体系 50 μ L,含 1% Triton X-100。反应条件:95℃ 变性 2min;95℃ 变性 60s,55℃ 退火 60s,72℃ 延伸 120s,进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5min,4℃ 保温。根据 PCR 结果鉴定转化子表型,仅出现一条带(492bp 加外源基因片段)者为甲醇利用慢型(Mut^s),出现两条带(上述条带及 2.2kb 条带)者为甲醇利用快型

(Mut⁺)。

上游引物:5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3' (5' AoxI Primer)

下游引物:5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3' (3' AoxI Primer)

1.2.4 在毕赤酵母中诱导表达重组蛋白 TFPI₁₋₁₆₁: 挑 Mut⁺ 型多拷贝阳性单克隆接种至 5mL YPD 培养液中,30℃,250r/min 振荡培养 12h,此为一级种子液。将一级种子液接种至 200mL BMGY 培养液中,振荡培养 16h,至 OD₆₀₀ = 5 ~ 6,此为二级种子液。将二级种子液接种至 4L 低盐发酵培养液中,用 28% 氨水调节 pH 至 5.0。设置发酵培养条件:温度 30℃,搅拌速度 600r/min,溶氧度 35%,自动补加氨水维持 pH5.0。继续培养 18h 至 OD₆₀₀ = 70 ~ 80,待溶氧度快速上升,培养液中甘油耗尽时开始补加 50% 甘油溶液,速度 80mL/h,时间 2 ~ 3h,至 OD₆₀₀ = 150 ~ 160 时停止补加甘油,待其完全耗尽时立即开始补加甲醇,速度 30mL/h,时间 30h。诱导表达结束后,离心收集上清,置 4℃ 备用。

1.2.5 重组 TFPI₁₋₁₆₁ 的纯化和鉴定: 离心收集培养液上清,超滤浓缩 10 倍,进行 Sephadex G50 凝胶过滤层析,平衡液及洗脱液用 20mmol/L Na-PO₄ pH7.0,流速 5mL/min,收集目的蛋白洗脱峰组份,然后进行阴离子交换层析,层析柱 Q Sepharose FF 预先用 20 倍柱体积平衡液(20mmol/L Na-PO₄ pH7.0)预平衡,流速 5mL/min,上样结束后用平衡液冲洗至基线,洗脱液(20mmol/L Na-PO₄ pH7.0,1mol/L NaCl)线性梯度洗脱,对应 NaCl 梯度 0.1 ~ 0.2mol/L。收集洗脱峰组份,用 Bradford 法进行蛋白定量,做 15% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,扫描分析纯度。做 Western Blot 进一步验证纯化的目的蛋白。

1.2.6 等电聚焦电泳: 参照 Bio-Rad 公司说明书,制备含两性电解质 Ampholine(pH3.5 ~ 10.0)的薄层聚丙烯酰胺凝胶,点样 1 μ L(1 ~ 2 μ g),室温放置 5min,使样品充分渗入胶中。依次电泳 100V,15min;200V,15min;450V,60min。固定 30min 后考马斯亮蓝染色。

1.2.7 稀释凝血酶原时间法(diluted prothrombin time, dPT)检测抗凝活性: 用生理盐水将凝血酶致活酶标准溶液分别稀释 10、100、200 和 500 倍,置 37℃ 备用。取 100 μ L 正常人混合血浆,分别加 100 μ L 不同浓度的凝血酶致活酶溶液,加 10 μ L TFPI 或 TFPI₁₋₁₆₁ 溶液至终浓度 200nmol/L,37℃ 孵育 1min,加

10μL 250mmol/L CaCl₂ 溶液,开始计时血浆凝固时间,取3次实验平均值记为实验结果。

1.2.8 抑制 FXa 活性检测:参照 Johnson 等的方法制备标准参考血浆,其 TFPI 活性定义为 1u/mL。TFPI 或 TFPI₁₋₁₆₁ 溶液用 TBS (20mmol/L Tris/HCl pH 7.8, 150mmol/L NaCl) 稀释至不同浓度,分别加 100μL 至 96 孔细胞培养板,加 100μL 反应液 (100ng/mL FXa, 2g/L BSA, TBS), 37℃ 孵育 30min。加 10μL 发色底物 Spectrozyme Xa 至终浓度 0.25mmol/L, 37℃ 孵育 60min。加 50μL 50% 乙酸溶液终止反应,检测 405nm 吸光度,取 3 孔平均值记为实验结果。

2 结果

2.1 构建表达质粒 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁

以克隆质粒 pGEM-3Z(-)-TFPI 为模板,经 PCR 扩增得到 TFPI₁₋₁₆₁ 基因 DNA 片段长 506bp,电泳分析结果显示在 400bp ~ 600bp 处有特异性条带,与预测片段长度一致(图 1A)。PCR 产物及质粒 pPIC9K 经 EcoR I 和 Not I 双酶切后连接重组,重组质粒酶切鉴定片段长度与理论预测一致(图 1B)。核苷酸序列分析结果完全正确(数据未显示)。此重组质粒命名为 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁(图 2)。

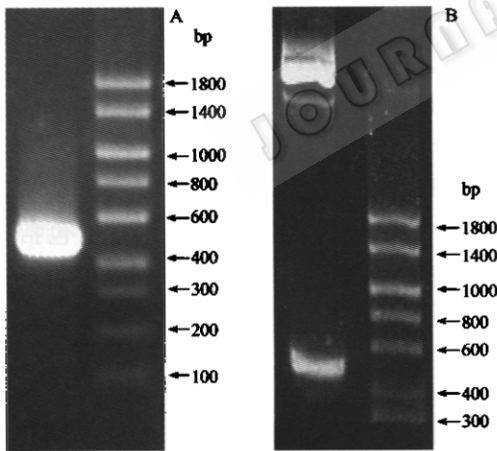


图 1 PCR 扩增 TFPI₁₋₁₆₁ 基因及酶切鉴定重组质粒 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁

Fig.1 Amplification of TFPI₁₋₁₆₁ gene by PCR and restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁

(A) 506 bp DNA fragment of TFPI₁₋₁₆₁ gene obtained by PCR; (B) Digestion of recombinant plasmid pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁ by EcoRI and NotI

2.2 多拷贝阳性转化子的筛选和鉴定

阳性转化子对 G418 抗性的强弱与其所含抗性基因的数量正相关,能够在高浓度 G418 YPD 平板上生长的单克隆含有更多的外源重组基因拷贝数,

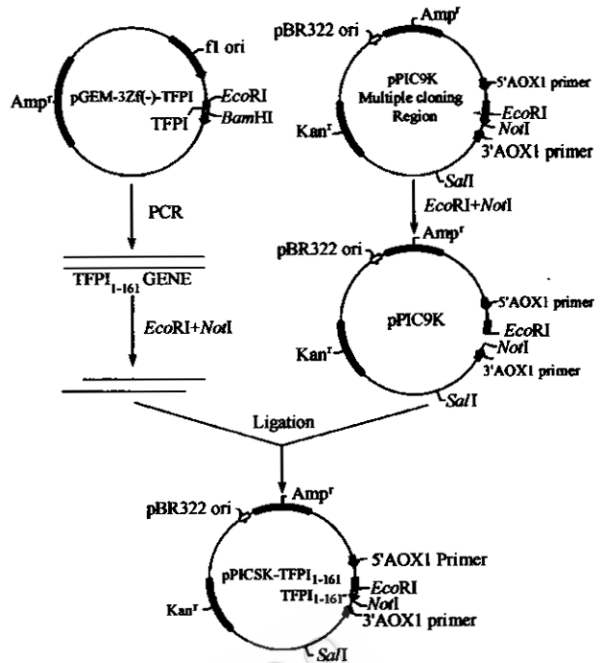


图 2 构建毕赤酵母表达质粒 pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁

Fig.2 Construction of *Pichia pastoris* expression plasmid pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁

因而能够得到更高的表达量。同源重组可产生 Mut^s 和 Mut^r 两种表型,二者对甲醇的利用能力不同,因此发酵培养条件亦有所差别。利用 5' AoxI 和 3' AoxI 引物进行 PCR 鉴定, Mut^r 型出现两条带, 2.2 kb 对应野生型 AoxI 基因, 978 bp 对应质粒 pPIC9K 序列 492 bp 加插入外源基因 486 bp, Mut^s 型只有 978bp 一条带(图 3)。

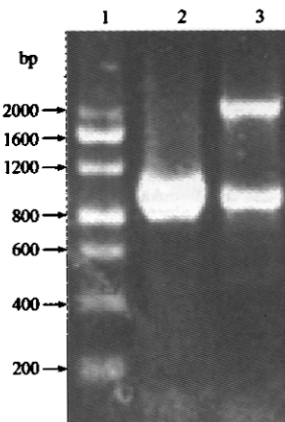


图 3 PCR 法鉴定阳性转化子表型

Fig.3 Phenotype identification of positive transformants of *Pichia pastoris* GS115 by PCR

1: DNA marker; 2: Mut^s transformant; 3: Mut^r transformant

2.3 转化子的发酵培养和蛋白纯化

挑 Mut^r 型多拷贝阳性转化子接种至 YPD 培养

液中,经二级放大接种至 4L 低盐发酵培养液中,诱导表达 30h 后离心收集培养液上清。TFPI₁₋₁₆₁ 表达为 TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) 两种分子形式,经等电聚焦电泳检测其等电点分别为 4.8 和 4.9 (图 4)。根据等电点差异,二者可通过 Q Sepharose FF 阴离子交换层析得到分离,NaCl 梯度洗脱浓度分别为 0.18 mol/L 和 0.13 mol/L。依次经超滤浓缩、分子筛、离子交换分离纯化后,从 4 L 发酵培养液中可分别获得 1.4g TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 1.8g TFPI₁₋₁₆₁ (27kD),回收率达 55%,经扫描纯度大于 95% (图 5A)。Western blot 进一步验证了最终纯化的目的蛋白(图 5B)。

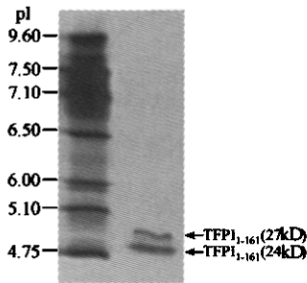


图 4 等电聚焦电泳检测 TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) 等电点

Fig.4 Detection of isoelectric points of TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) and TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) by isoelectrofocusing electrophoresis

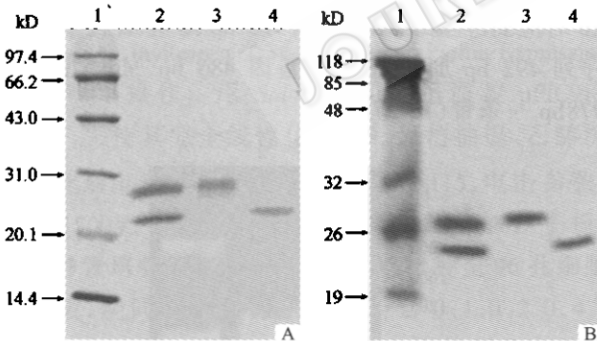


图 5 蛋白 TFPI₁₋₁₆₁ 的纯化及鉴定

Fig.5 Purification and identification of recombinant TFPI₁₋₁₆₁ (A) 15% SDS-PAGE; (B) Western blot.

1: protein marker; 2: after purification using Sephadex G50 column, two protein stripes, 27kD and 24kD, were shown because of different glycosylation; 3: 27kD protein obtained by Q Sepharose Fast Flow chromatography; 4: 24kD protein obtained by Q Sepharose Fast Flow chromatography

2.4 dPT 法检测 TFPI₁₋₁₆₁ 抗凝活性

凝血酶原时间 (PT) 是反映外源性凝血途径活性的生物学指标, dPT 法比 PT 法具有更高的灵敏度^[8,9], 能够更好地反映 TFPI₁₋₁₆₁ 的抗凝活性。野生

型 TFPI 作为对照分子。表 1 数据表明 TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) 均具有显著抗凝活性, 并且随凝血酶致活酶稀释度增加, 抗凝活性表现更加明显, 二者之间无显著性差异, 但均低于野生型 TFPI 抗凝活性, 与文献报道相符^[7,9]。

表 1 dPT 法检测 TFPI₁₋₁₆₁ 抗凝活性

Table 1 Anticoagulant activity detection of TFPI₁₋₁₆₁ and TFPI by dPT assay

Dilution times of thromboplastin	Clotting time/s			
	Physiological saline	TFPI	TFPI ₁₋₁₆₁ (24kD)	TFPI ₁₋₁₆₁ (27kD)
0	13.4	17.9	14.9	15.3
10	29.1	45.5	32.8	35.2
100	50.3	100.5	75.4	74.6
200	67.7	142.8	106.1	103.7
500	84.5	189.6	137.2	142.4

The final concentration of TFPI or TFPI₁₋₁₆₁ was 200nmol/L. Data were given as the mean of three measurements.

2.5 抑制 FXa 活性检测

用发色底物法检测 TFPI₁₋₁₆₁ 抑制 FXa 活性。定义标准参考血浆 TFPI 活性为 1u/mL。野生型 TFPI 作为对照分子, 未加 TFPI₁₋₁₆₁ 时 FXa 活性计为 100%, 加不同浓度 TFPI₁₋₁₆₁ 后检测 405nm 吸光度代表剩余 FXa 活性。图 6 表明 TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) 均能显著抑制 FXa 活性, 并呈量效依赖关系, 二者活性之间无显著性差异, 但均低于野生型 TFPI。TFPI 及 TFPI₁₋₁₆₁ 的特征性常数, 包括比活性、抑制常数 (K_i)、半数抑制浓度 (IC₅₀) 等总结于表 2。

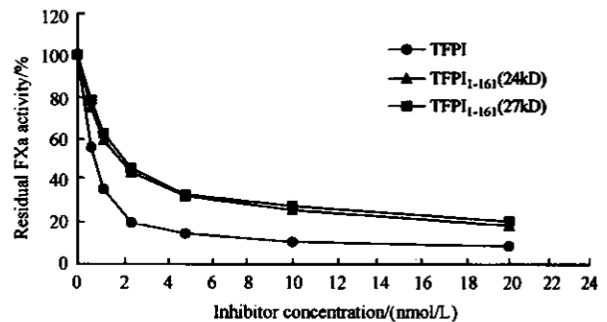


图 6 TFPI₁₋₁₆₁ 和 TFPI 抑制 FXa 活性检测

Fig.6 Inhibition of FXa by TFPI₁₋₁₆₁ and TFPI in a direct amidolytic assay

The final concentration of FXa and chromogenic substrate were 50ng/mL and 0.25mmol/L respectively. The FXa activity with no inhibitor was defined as 100% and the residual activity was determined by absorbance at 405nm

表 2 TFPI₁₋₁₆₁ 和 TFPI 抑制 FXa 活性的特征性常数Table 2 The Characteristics of TFPI₁₋₁₆₁ and TFPI for FXa inhibition

	TFPI	TFPI ₁₋₁₆₁ (24kD)	TFPI ₁₋₁₆₁ (27kD)
Specific activity/(u/mg)	18440	12880	12400
K _i /(nmol/L)	0.24	0.61	0.68
IC ₅₀ /(nmol/L)	0.82	2.04	2.15

3 讨论

凝血途径分为内源性凝血途径和外源性凝血途径,现代血液学理论认为外源性凝血途径在生理性止血和病理性凝血中占主要地位。TFPI 是外源性凝血途径的特异性抑制物,有证据表明,相对于蛋白 C 抗凝系统和 Scrpins 超家族,TFPI 是更重要的抗凝物质^[10]。除抗凝作用外,TFPI 还具有抗炎^[5]、抑制血管生成和肿瘤生长^[11,12],抑制内皮细胞增殖和诱导细胞凋亡^[13,14],以及抑制血管新生内膜过度增生^[15]等多种生物功能。这些功能的发挥均涉及 K3 和 C 末端。TFPI 主要通过 K3 和 C 末端与肝细胞表面受体 LRP 结合入胞代谢,半衰期很短,需大剂量连续使用,因此易导致出血等副反应的发生,不利于临床应用。TFPI₁₋₁₆₁ 缺失了 K3 和 C 末端,是研究 TFPI 的结构与功能及其相互关系的理想对照分子,同时半衰期延长,作用缓和,出血等副反应的危险度降低,并且生物功能单一,抗凝作用针对性强,有望在血栓病及相关疾病的预防方面发挥重要作用。研究 TFPI₁₋₁₆₁ 的表达纯化,获得大量 TFPI₁₋₁₆₁ 具有重要意义,即可满足其基础及临床前研究需要,也可用于 TFPI 结构与功能研究。

巴斯德毕赤酵母作为一种新型外源基因表达系统,具有发酵上清液中杂蛋白少、可以高密度发酵、遗传学稳定等优点^[16],能对外源蛋白进行加工、折叠、翻译后修饰,并将其分泌到培养基中^[17,18],所产生的重组蛋白质具有的糖基化形式较酿酒酵母更类似于人类蛋白质^[19],是一种较为理想的真核蛋白表达系统。已知 TFPI 有 3 个糖基化位点,分别是 117N,167N,228N。应用生物学软件 Antheptrot v5.0 计算 TFPI₁₋₁₆₁ 的理论分子量仅为 18.8kD,Johnson 等^[7]在酿酒酵母中表达 TFPI₁₋₁₆₁,由于糖基化程度不同,重组蛋白表现为约 23kD 和 27kD 两种分子形式,因此推测由于糖基化差异,TFPI₁₋₁₆₁ 在毕赤酵母

GS115 中表达为 TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) 两种分子形式。经检测其等电点分别为 4.8 和 4.9,在 pH7.0 条件下,用 Q Sepharose FF 阴离子交换层析能很好地将二者分离开,纯度大于 95%,比活性分别达 12 880u/mg 和 12 400u/mg,具有显著的抗凝及抑制 FXa 活性的作用。二者活性均低于野生型 TFPI,但彼此之间无差异,说明除 K1 和 K2 外,K3 和 C 末端也部分参与了抗凝及抑制 FXa 活性的作用,有助于 TFPI 发挥最佳生物活性。同时,糖基化程度的差异对其活性无显著影响。本研究通过筛选多拷贝转化子及优化发酵培养条件,首次在毕赤酵母中高效表达了 TFPI₁₋₁₆₁,从 4 升发酵培养液中最终可获得 1.4g TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) 和 1.8g TFPI₁₋₁₆₁ (27kD),回收率达 55%,最终产量高于酿酒酵母 20 倍以上,提供了一种廉价高效的 TFPI₁₋₁₆₁ 表达纯化方式,为其进一步的基础及临床前研究奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wesselschmidt R, Likert K, Girard T *et al.* Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa. *Blood*, 1992, 79(8): 2004 - 2010
- [2] Nordfang O, Bjorn SE, Valentin S *et al.* The C-terminus of tissue factor pathway inhibitor is essential to its anticoagulant activity. *Biochemistry*, 1991, 30(43): 10371 - 10376
- [3] Mine S, Yamazaki T, Miyata T *et al.* Structural mechanism for heparin-binding of the third Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*, 2002, 41(1): 78 - 85
- [4] Neels JG, van Den Berg BM, Lookaen A *et al.* The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem*, 1999, 274(44): 31305 - 31311
- [5] Park CT, Creasey AA, Wright SD. Tissue factor pathway inhibitor blocks cellular effects of endotoxin by binding to endotoxin and interfering with transfer to CD14. *Blood*, 1997, 89(12): 4268 - 4274
- [6] Horie S, Hiraishi S, Hamuro T *et al.* Oxidized low-density lipoprotein associates strongly with carboxy-terminal domain of tissue factor pathway inhibitor and reduces the catalytic activity of the protein. *Thromb Haemost*, 2002, 87(1): 80 - 85
- [7] Johnson K, Zaror I, Bauer D *et al.* Activity of secreted Kunitz domain 1 variants of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 1998, 80(4): 585 - 587
- [8] Yang Yinke, He Xiaofan, Li Juncheng *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibody against recombinant human tissue factor pathway inhibitor. *Chin Med J (Engl)*, 1998, 111(8): 718 - 721
- [9] Holst J, Lindblad B, Westerlund G *et al.* Pharmacokinetics and delayed experimental anti-thrombotic effect of two domain non-glycosylated tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res*, 1996, 81(4): 461 - 470

- [10] Rao LV, Nordfang O, Hoang AD *et al.* Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood*, 1995, 85 (1): 121 - 129
- [11] Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A *et al.* Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2997 - 3000
- [12] Hembrough TA, Ruiz JF, Swerdlow BM *et al.* Identification and characterization of a very low density lipoprotein receptor binding peptide from tissue factor pathway inhibitor that has antitumor and antiangiogenic activity. *Blood*, prepublished online January 22, 2004
- [13] Hembrough TA, Ruiz JF, Papathanassiou AE *et al.* Tissue factor pathway inhibitor inhibits endothelial cell proliferation via association with the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276(15): 12241 - 12248
- [14] Hamuro T, Kamikubo Y, Nakahara Y *et al.* Human recombinant tissue factor pathway inhibitor induces apoptosis in cultured human endothelial cells. *FEBS Lett*, 1998, 421(3): 197 - 202
- [15] Sun LB, Utob J, Moriyama S *et al.* Pretreatment of a Dacron graft with tissue factor pathway inhibitor decreases thrombogenicity and neointimal thickness: a preliminary animal study. *ASAIO J*, 2001, 47(4): 325 - 328
- [16] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6(5): 527 - 533
- [17] Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79(4): 438 - 49
- [18] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190(1): 55 - 62
- [19] Duman JG, Miele RG, Liang H *et al.* O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol Appl Biochem*, 1998, 28(1): 39 - 45

High Expression and Characterization of Recombinant Deletion Variant TFPI₁₋₁₆₁ of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor in *Pichia pastoris*

BAI Hao MA Duan* SONG Hou-Yan MO Wei GU Yin-Liang KONG De-Sheng GUO Hong-Shen

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is a native specific inhibitor of extrinsic pathway of coagulation in vivo. As a kind of deletion variant which only contains N-terminus, K1 and K2 of TFPI, TFPI₁₋₁₆₁ is an ideal control molecule in the research of structure and function of TFPI. In this article, we not only investigated the methods of expression and purification, but also detected characteristics of TFPI₁₋₁₆₁. Using plasmid pGEM-3Zf(-)-TFPI as a template, DNA of TFPI₁₋₁₆₁ was obtained by PCR and cloned into plasmid pPIC9K to construct expression plasmid pPIC9K-TFPI₁₋₁₆₁. By force of screening multi-copy transformant and optimizing ferment condition, TFPI₁₋₁₆₁ was highly expressed in *Pichia pastoris* GS115 for the first time and the final yield after purification was increased more than 20-fold comparing with *Saccharomyces cerevisiae*. TFPI₁₋₁₆₁ was expressed as two different molecular weight proteins namely TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) and TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) because of difference of glycosylation. Their isoelectric points were 4.8 and 4.9 respectively. They were separated according to different isoelectric points using anion-exchange chromatography and had similar activity. Approximately 1.4g TFPI₁₋₁₆₁ (24kD) and 1.8g TFPI₁₋₁₆₁ (27kD) was obtained from 4-liter fermentation culture after purification by ultrafiltration, gel filtration, anion-exchange chromatography. Their specific activity were up to 12 880u/mg and 12 400u/mg respectively. The rate of recovery of TFPI₁₋₁₆₁ was about 55%. The recombinant TFPI₁₋₁₆₁ had good anticoagulant activity in diluted prothrombin time assay (dPT) and anti-FXa activity in a direct amidolytic assay. The expression and purification system described here provides a cost-effective method for generating large amounts of material for further fundamental and preclinical research of TFPI₁₋₁₆₁.

Key words tissue factor pathway inhibitor, TFPI₁₋₁₆₁, expression, purification, *Pichia pastoris*

Received: 04-08-2004

This work was supported by Grants from The National Natural Sciences Foundation of China (No.30271229) and The Key Science and Technology R&D Programme Foundation of Shanghai City (No.034319205).

* Corresponding author. Tel: 86-21-54237198; Fax: 86-21-64033738; E-mail: duanma@shmu.edu.cn