

通过毕赤酵母表达系统获得高纯度的重组人血管内皮生长因子 (rhVEGF165)

周伟杰^{1,2}, 吴凤梅^{1,2}, 姚冬生^{1,2}, 谢春芳^{2,3}

1 暨南大学 生物医药研究院, 广东 广州 510632

2 暨南大学 基因工程药物国家工程研究中心, 广东 广州 510632

3 暨南大学 生物工程系, 广东 广州 510632

周伟杰, 吴凤梅, 姚冬生, 等. 通过毕赤酵母表达系统获得高纯度的重组人血管内皮生长因子 (rhVEGF165). 生物工程学报, 2021, 37(12): 4083-4094.

Zhou WJ, Wu FM, Yao DS, et al. Production of high-purity recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) by *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4083-4094.

摘要: 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF165) 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 高纯度的 VEGF165 对于抗肿瘤药物和生物标志物研发检测试剂必不可少。目前关于 VEGF165 的异源表达方法, 纯化步骤多且产物纯度不高。以毕赤酵母表达系统为基础, 构建人血管内皮生长因子 (VEGF165) 多拷贝的表达载体。按照酵母密码子偏好性优化人血管内皮生长因子基因 (*veg165*) 的密码子, 在毕赤酵母 BBPB 表达载体基础上, 用 Biobrick 生物积块的方法, 构建以 Pgap 为启动子的五拷贝 rhVEGF165 表达载体, 同时添加组氨酸标签。利用 His 标签和 VEGF165 自身的肝素结合结构域, 仅用两步亲和层析纯化得到纯度高于 98% 的 rhVEGF165 蛋白。rhVEGF165 纯化后浓度为 0.45 mg/mL, 且具有生物学活性。该异源表达策略简化了 rhVEGF165 的纯化步骤, rhVEGF165 具有天然 VEGF165 的生物学活性, 且纯度达到目前文献报道的最高水平。

关键词: 人血管内皮生长因子, *veg165*, 高效表达, 多拷贝, 毕赤酵母

Received: January 8, 2021; **Accepted:** March 26, 2021

Supported by: National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2013AA102801), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2013B090600141), Guangdong Provincial Research and Development Financial Subsidy Project.

Corresponding author: Chunfang Xie. E-mail: xiechunfang28@aliyun.com

国家高技术研究发展计划 (No. 2013AA102801), 广东省科技计划 (No. 2013B090600141), 广东省级财政技术研究开发补助项目资助。

网络出版时间: 2021-04-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210412.0948.005.html>

Production of high-purity recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) by *Pichia pastoris*

Weijie Zhou^{1,2}, Fengmei Wu^{1,2}, Dongsheng Yao^{1,2}, and Chunfang Xie^{2,3}

¹ Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

² National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

³ Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

Abstract: Vascular endothelial growth factor (VEGF165) is a highly specific vascular endothelial growth factor that can be used to treat many cardiovascular diseases. The development of anti-tumor drugs and disease detection reagents requires highly pure VEGF165 (at least 95% purity). To date, the methods for heterologous expression and purification of VEGF165 require multiple purification steps, but the product purity remains to be low. In this study, we optimized the codons of the human VEGF165 gene (*veg165*) according to the yeast codon preference. Based on the *Pichia pastoris* BBPB vector, we used the BioBrick method to construct a five-copy rhVEGF165 recombinant expression vector using Pgap as the promoter. In addition, a histidine tag was added to the vector. Facilitated by the His tag and the heparin-binding domain of VEGF165, we were able to obtain highly pure rhVEGF165 (purity > 98%) protein using two-step affinity chromatography. The purified rhVEGF165 was biologically active, and reached a concentration of 0.45 mg/mL. The new design of the expression vector enables production of active and highly pure rhVEGF165 in a simplified purification process, the purity of the biologically active natural VEGF165 reached the highest reported to date.

Keywords: human vascular endothelial growth factor, *veg165*, efficient expression, multiple copies, *Pichia pastoris*

血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF), 又称血管通透因子 (Vascular permeability factor, VPF), 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、肿瘤生长、类风湿性关节炎和新生血管性眼疾的能力^[1-3]。在促血管生成作用方面, VEGF 的 6 种异构体中, 以 VEGF165 的活性最高和含量最多, 并且 VEGF165 对肿瘤生长的影响最为重要^[4]; VEGF165 作为血管生成的直接效应分子, 在血管系统的发育和分化中起至关重要的作用, VEGF165 已被用于冠心病防治的实验研究, 它可促进小冠状血管侧支循环的建立, 恢复心肌血流供应, 延缓梗塞面积扩大, 促进缺血心肌的功能恢复^[5]。高纯度的 VEGF165 是研发抗肿瘤药物和生物标志物检测试剂等研究的基础^[6-7]。因此, 一个简便、成本低廉、能获得高纯度以及有活性的 VEGF165 的表达系统则尤为重要。

天然 VEGF165 蛋白分子含有 16 对二硫键^[8], 在异源表达系统中容易发生二硫键错配, 并且二

硫键错配的杂质蛋白很难去除, 进而影响蛋白活性和降低正确结构蛋白的纯度, 不利于制备工艺的放大^[9], 所以利用体外异源表达系统获得活性高、纯度高且结构正确的蛋白具有一定的挑战性。因其糖基化不影响其生物学功能, 只影响其表达分泌的功能, 所以其重组基因可以通过真核表达系统以及原核表达系统进行异源表达。根据过往报道, VEGF165 可以在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[10]、毕赤酵母 *Pichia pastoris*^[11]、大肠杆菌 *Escherichia coli*^[12]、昆虫细胞^[13]和哺乳动物细胞^[14]等多种异源蛋白表达系统中进行表达。但是以上表达系统均有各自的缺点: 酿酒酵母表达系统表达水平低、分泌效率低、不易进行高密度发酵; 甲醇诱导毕赤酵母表达系统筛选高拷贝重组菌株的工作量大、诱导培养周期长、单交换整合转化子在高密度发酵时不稳定; 大肠杆菌表达系统易形成包涵体, 在复性过程中极易发生二硫键错配, 大大降低了蛋白活性和正确结构蛋白的纯度、回收率低; 昆虫细胞表达系统获取表达

产物的操作步骤繁杂、成本较高;哺乳动物细胞表达系统表达量很低、培养成本高、操作技术要求高。

与传统的筛选高拷贝重组菌株的方法不同,本研究利用实验室已经构建的毕赤酵母 BBPB Biobrick 生物积块组装以 Pgap 为启动子的多拷贝 rhVEGF165 重组毕赤酵母;且在每一个表达盒构建策略上将 VEGF165 自身的信号肽替换成酵母 α -因子信号肽,让 rhVEGF165 成熟肽分泌到培养上清中,同时在远离 VEGF165 功能区的 C 末端添加了 6 个组氨酸标签,利用 His 标签和 VEGF165 的肝素结合域 (VEGF165 第 111–165 位氨基酸)^[15–16],只需通过两步特异性的亲和层析纯化即可获得高纯度的 rhVEGF165 蛋白。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

毕赤酵母 GS115 由本实验室保存;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,购自广州鼎国生物技术公司;Paox-Pgap-BBPB 质粒、Taox-PgHT-BBPB 质粒和 Taox-Pgap-BBPB 质粒由本实验室构建;ss1-VEGF165-pGH 质粒由上海捷瑞生物工程有限公司合成;HUVEC 细胞株由暨南大学细胞系邝志和研究员提供。

1.2 主要试剂和培养基

限制性核酸内切酶 (*EcoR* I -HF、*Xba* I、*Spe* I -HF、*Pst* I -HF)、核酸连接酶 (T4 DNA ligase)、糖苷内切酶 (Endo H)、琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自 NEB 公司;质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司;Western blotting 检测试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;CCK-8 检测试剂盒购自 Beyotime/碧云天;ELISA Kit for Vascular Endothelial Growth Factor 165 (VEGF165)购自 Uscn 公司;Quick Start Bradford 蛋白测定试剂盒购自 Bio-Rad 公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

LB 液体培养基(g/L):酵母提取物 5.0,蛋白

胨 10.0,氯化钠 10.0。LB 固体培养基中加琼脂粉 15.0 g。

MD 固体培养基(g/L):丙三醇 10.0,无氨基酵母氮源 13.4,生物素 0.4 mg/L,琼脂粉 15.0。YPG 液体培养基(g/L):酵母提取物 10.0,大豆蛋白胨 20.0,丙三醇 10.0。

1.3 仪器与器材

ECM399 电转仪, BTX 公司;Sigma 4K-15 高速冷冻离心机, BECKMAN 公司;Mini 蛋白质电泳仪、Western blotting 电泳仪, Bio-Rad 公司;AKTA pure 纯化仪, GE Healthcare 公司。

1.4 目的基因的获取

从 NCBI 核酸数据库中查找 VEGF165 的核酸序列 (GenBank 登录号: AF486837.1) 和氨基酸序列 (GenBank 登录号: AAM03108.1), 去除其本身信号肽基因序列 (前 78 bp), 在目的基因前加上信号肽序列 ss1 基因序列;在目的基因末尾添加组氨酸标签。使用本实验室的克隆载体来构建多拷贝目的基因表达盒, 故在信号肽基因前和目的基因后的 5'端和 3'端分别添加 *EcoR* I、*Xba* I 和 *Spe* I、*Pst* I 限制性核酸内切酶酶切位点。序列由上海捷瑞生物工程有限公司进行全基因合成。

1.5 单拷贝目的基因表达盒的构建

克隆载体 Taox-PgHT-BBPB (简称为 TH-BBPB)、Paox-Pgap-BBPB (简称为 PP-BBPB) 和 Taox-Pgap-BBPB (简称为 TP-BBPB) (TH-BBPB、PP-BBPB、TP-BBPB 为本实验室前期构建) 上均含有 *EcoR* I、*Xba* I、*Spe* I、*Pst* I 这 4 个限制性核酸内切酶位点。*Xba* I 和 *Spe* I 是一对同尾酶, 同尾酶产生相同的粘性末端, 两个粘性末端连接后, 原来的酶切位点将消失^[17]。

用 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切全基因合成的质粒 ss1-veg165-Pgh (简称为 sV-pGH), 同时用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切 TH-BBPB 载体, T4 DNA 连接酶连接回收后的目的片段, 连接产物 sV-TH-BBPB

转化 DH5 α 感受态细胞, 通过氨苄 (1 mg/mL) 抗性筛选阳性克隆; 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切鉴定阳性克隆并切胶回收目的载体。*EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切 PP-BBPB 质粒, 切胶回收 PP 片段, 与胶回收后的目的载体进行连接, 转化 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性克隆, 双酶切鉴定, 获得重组单拷贝目的基因酵母表达盒质粒 PP-sV-TH-BBPB。

1.5.1 二至五拷贝目的基因酵母表达盒的构建

用 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切 sV-Pgh, 切胶回收 sV 片段, 与经 *Pst* I 和 *Spe* I 双酶切胶回收后的 PP-BBPB 载体片段通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得 PP-sV-BBPB。

用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切 sV-TH-BBPB 质粒, 与经 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切胶回收后的 TP-BBPB 片段通过 T4 DNA 连接酶连接获得 TP-sV-TH-BBPB。

用 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切 sV-pGH 质粒, 与经 *Pst* I 和 *Spe* I 双酶切胶回收后的 TP-BBPB 片段通过 T4 DNA 连接酶连接获得 TP-sV-TH-BBPB。

用 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切 PP-sV-BBPB, 与经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切胶回收后的 TP-sV-TH-BBPB 载体片段通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得 PP-sV-TP-sV-TH-BBPB 两拷贝目的基因质粒。

通过不同的双酶切组合对 TH-BBPB、PP-BBPB、TP-BBPB、sV-pGH 进行酶切、连接成 PP-sV、TP-sV、TP-sV-TH 的载体片段, 从而构建出 PP-sV-TP-sV-TP-sV-TH-BBPB、PP-sV-TP-sV-TP-sV-TP-sV-TH-BBPB、PP-sV-TP-sV-TP-sV-TP-sV-TP-sV-TH-BBPB (三、四、五拷贝目的基因酵母表达盒)。

1.5.2 重组质粒电击转化毕赤酵母 GS115 以及重组子的筛选

重组质粒经 *Xba* I 和 *Spe* I 线性化后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的片段, 并将目的片段电击转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 涂布于 MD 固体培养基平板, 置于 28 °C 恒温培

养箱中培养, 待长出单菌落, 挑取单克隆于 5 mL YPG 液体培养基中, 于 28 °C、200 r/min 振荡培养 72 h, 12 000 r/min 离心 1min 收集上清, SDS-PAGE 法检测培养上清, 再进行银染分析筛选阳性单克隆。

1.5.3 蛋白质印迹法进一步鉴定重组子

取 20 μ L 银染结果符合预期的重组子单克隆菌液进行离心, 取上清液进行 SDS-PAGE。并基于蛋白质 C 端的组氨酸标签, 利用一抗(小鼠抗 His 标签抗体)和二抗(HRP 标记的羊抗小鼠抗体)进行 Western blotting 实验加以验证。

1.6 重组菌的扩大培养

重组菌接入 2 L 的 YPD 培养基 (使用磷酸钾溶液调节改良 pH 至 6.0), 在 30 °C 条件下置于 220 r/min 摇床中培养 3 d。

1.7 亲和层析

重组菌的发酵上清液经硫酸铵沉淀处理后依次进行 Ni Sepharose 6 Fast Flow 镍柱亲和层析、HiTrap Heparin 肝素亲和层析, 得到重组人 VEGF165 蛋白 (rhVEGF165) 进行 SDS-PAGE 检验, 用 Image-Pro Plus 软件对 SDS-PAGE 图进行灰度扫描分析, 计算目的蛋白的纯度。

1.7.1 目的蛋白液浓缩和缓冲液置换

用截留分子量为 3 kDa 或 10 kDa 的 Amicon Ultra-15 超滤管浓缩肝素亲和层析洗脱收集的目的蛋白液, 将蛋白液置于超滤管上层内槽, 离心去除多余的纯化缓冲液。然后用后续实验所需的缓冲液置换原洗脱缓冲液, 反复置换 3 次并浓缩至 2.5 mL。用 0.22 μ m 滤头过滤后, 将浓缩蛋白液置于 4 °C 保存。

1.7.2 考马斯亮蓝染色法测蛋白浓度

采用 Quick Start Bradford 蛋白测定试剂盒制备蛋白标准曲线和测定样品蛋白浓度。以不同浓度的标准蛋白 (BSA) 和染液, 在 595 nm 处的吸光值制作蛋白浓度标准曲线, 用于计算目的蛋白的浓度。

1.8 VEGF165 蛋白的生物学活性检测

1.8.1 糖蛋白分子鉴定

糖苷内切酶 H (Endo H) 是一种重组糖苷酶, 能够对 N-糖蛋白中的高甘露糖和某些杂合型寡聚糖的壳二糖核心结构进行切割^[18], 可用其验证重组表达的 VEGF165 蛋白是否发生糖基化。rhVEGF165 经过 Endo H 酶切后进行 SDS-PAGE 分析, 再用 Western blotting 实验进一步验证 Endo H 酶切前后的蛋白条带是否为目的蛋白。

1.8.2 VEGF165 对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的促增殖活性检测

CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 试剂盒是应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的试剂盒。VEGF165 在体外可促进血管内皮细胞的生长和增殖, 故可通过 CCK-8 试剂盒测定 rhVEGF165 对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的促增殖作用^[19]。

选择处于对数生长期的 HUVEC 细胞, 以 10 000 个细胞/mL 接种至 96 孔板, 每个孔加入 100 μ L 的细胞悬液; 细胞悬液继续培养 2 h; 向加有细胞的孔内分别加入梯度浓度的纯化浓缩后的 rhVEGF165, 每个浓度各重复 9 组, 对照组为纯细胞培养液; 每个孔加入新鲜完全培养基补足总体积至 190 μ L, 再每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 轻轻晃动 96 孔板, 酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度值, 作为原始的 A_{450} 吸光度值; 将 96 孔板置于细胞培养箱内继续培养 8 h 后再用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 目的基因的获取

将携带目的基因的甘油菌用平板划线法分离单克隆: 将甘油菌液用接种环划线于 LB 平板上分离获取单克隆, 单克隆于 5 mL LB 试管培养基培养过夜, 提取质粒。双酶切 sV-pGH 质粒, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图 1 所示, sV-pGH 质粒经 *EcoR* I 和 *Spe* I 酶切后得到两条带, 分别是载体 pGH 和目的片段 sV, sV 大小为 800 bp, pGH

大小为 2 907 bp, 核酸电泳结果显示酶切产物片段大小符合预期。

2.2 多拷贝目的基因酵母表达盒的构建

2.2.1 PP-sV-TH-BBPB 重组表达盒的构建

连接产物 sV-TH-BBPB 克隆载体经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切后验证得到条带是 BBPB 载体和 sV-TH 片段; 如图 2 所示, 连接产物 PP-sV-TH-BBPB 双酶切鉴定成功, 获得重组单拷贝目的基因酵母表达盒质粒 PP-sV-TH-BBPB。

2.2.2 二至五拷贝目的基因酵母表达盒的构建

Biobrick 构建表达盒, 转化后挑取单克隆, 其质粒经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切后电泳显示有两条带, 核酸电泳结果 (图 3) 显示酶切产物片段大小符合预期, 说明二至五拷贝克隆载体构建成功。

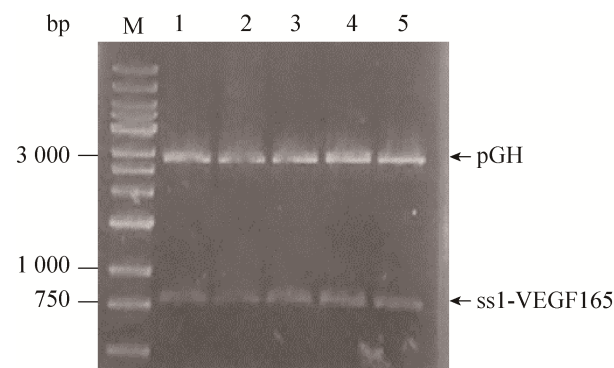


图 1 sV-pGH 质粒双酶切鉴定

Fig. 1 Double enzyme digest products of the sV-pGH plasmid (Lanes 1-5). Lane M: 12K standard nucleic acid.

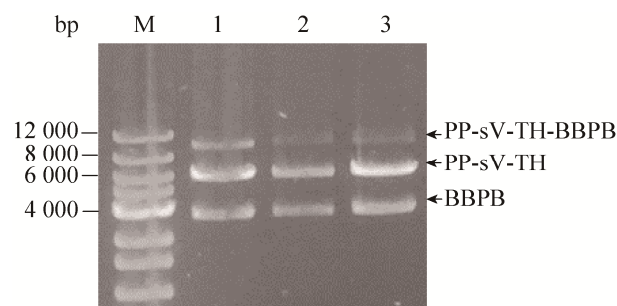


图 2 PP-sV-TH-BBPB 双酶切鉴定

Fig. 2 Double enzyme digest products of the PP-sV-TH-BBPB (Lanes 1-3). Lane M: 12K standard nucleic acid.

2.3 多拷贝目的基因片段电转毕赤酵母 GS115 菌株以及重组菌的筛选

线性化的多拷贝目的基因片段电转染毕赤酵母 GS115(his4)感受态细胞,涂布于 MD 平板,挑取单克隆进行试管培养。重组菌培养上清经 SDS-PAGE 检测,对凝胶进行银染处理后的部分银染结果如图 4 所示。

图 4 中带有红色数字的泳道均为阳性单克隆,其中箭头所指的条带为 rhVEGF165。单拷贝目的基因酵母表达盒 1 和 3 的培养上清液在 20 kDa 和 25 kDa 之间较空白对照多表达出目的蛋白条带,但是表达量很低,为纳克级。其中五拷贝目的基因酵母表达盒的单克隆 2 和 3 的培养上清液在 20 kDa

和 25 kDa 之间较空白对照多表达出目的蛋白条带。经筛选获得多拷贝目的重组菌株,且目的蛋白表达量随基因拷贝数的增加而升高。

2.4 目的蛋白的纯化

2.4.1 镍柱亲和层析

镍柱亲和层析收集的各洗脱液经 SDS-PAGE 鉴定结果如图 5 所示,洗脱峰 2 和 3 均含有目的蛋白条带,洗脱峰 2 收集液含有少量杂带,洗脱峰 3 收集液除了目的条带基本无杂带。说明镍柱亲和层析能高效分离纯化目的蛋白和去除杂蛋白。经 Image-Pro Plus 软件对 SDS-PAGE 图进行灰度扫描分析,计算出目的蛋白纯度为 96.02%。

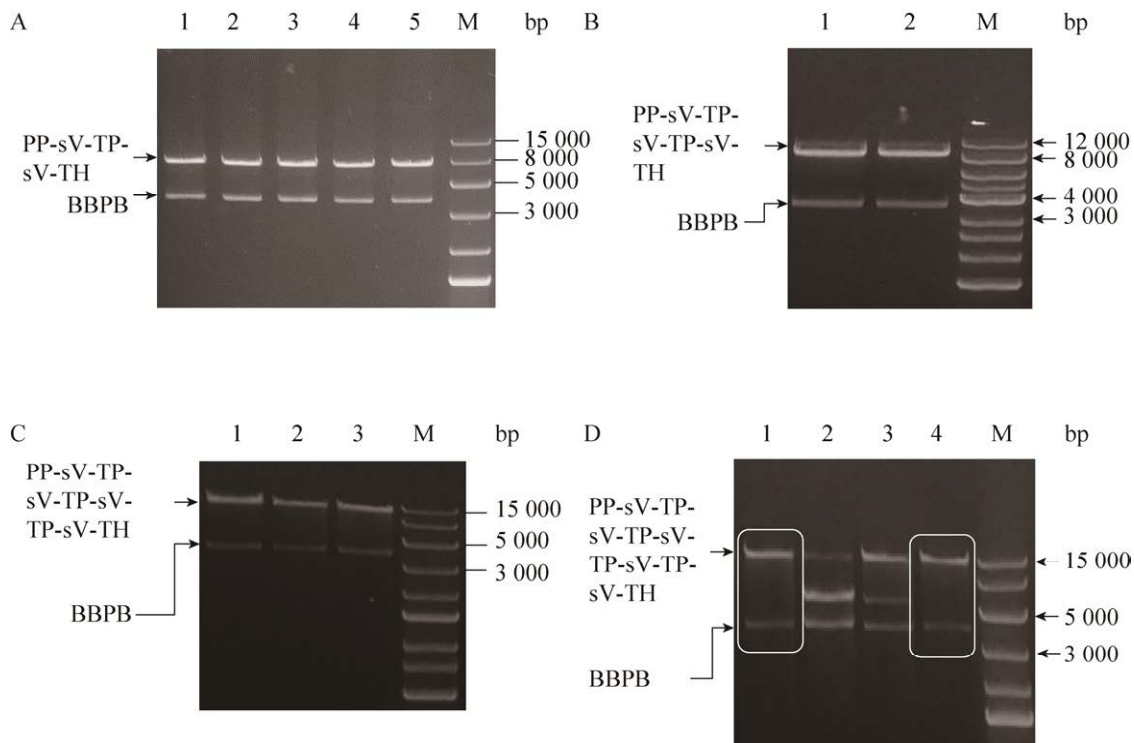


图 3 重组质粒双酶切产物核酸电泳鉴定图

Fig. 3 Double enzyme digest products of the recombinant products (in lanes labeled with different numbers). Lane M: 12K standard nucleic acid. Yeast expression cassette with different copies of the target gene: (A) two copies, (B) three copies, (C) four copies, and (D) five copies.

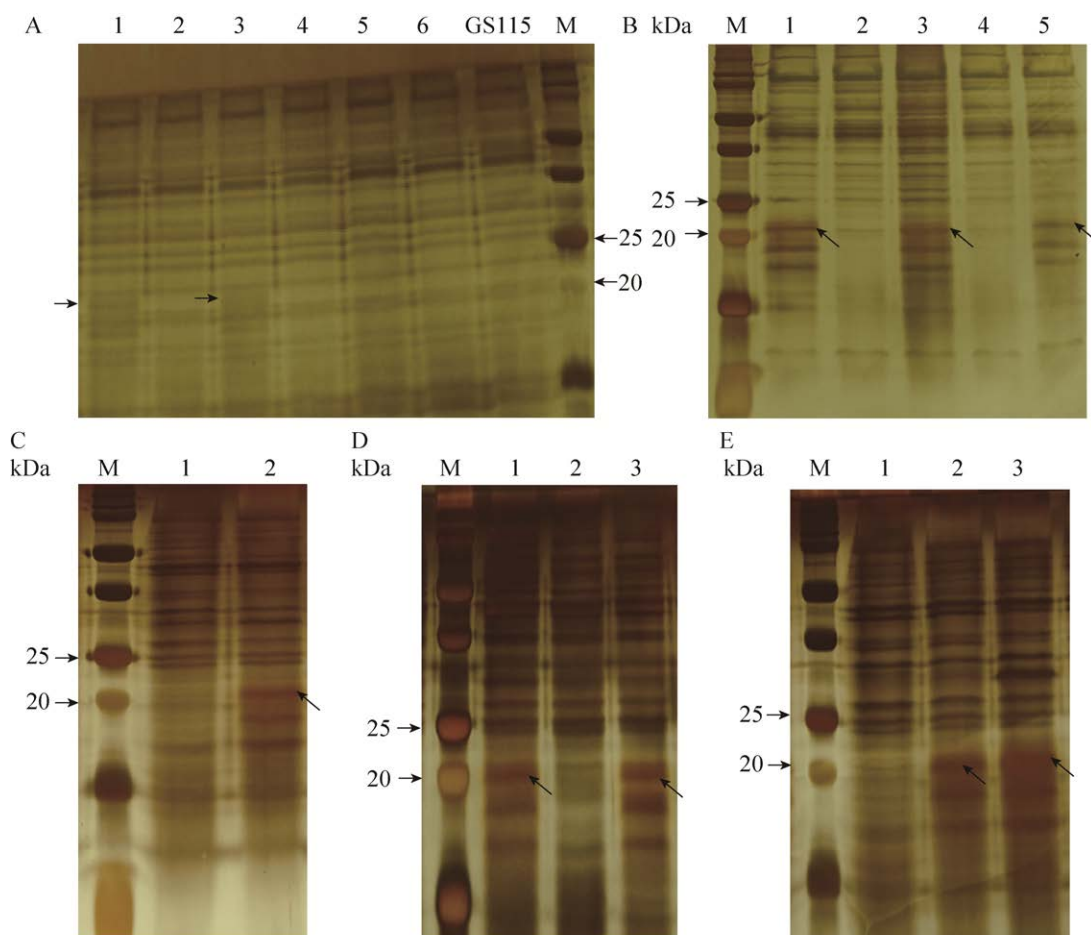


图 4 SDS-PAGE 凝胶银染结果图

Fig. 4 The silver staining results of SDS-PAGE. Lane: the culture supernatant of the selected monoclonal recombinant; lane GS115: the blank control; lane M: the standard protein; the arrow indicates the target protein band. Yeast expression cassette with different copies of the target gene: (A) single copy, (B) two copies, (C) three copies, (D) four copies, and (E) five copies.

2.4.2 肝素亲和层析

肝素亲和层析收集的洗脱液使用浓缩离心管浓缩脱盐后,经 SDS-PAGE 鉴定结果如图 6 所示,洗脱峰 1 收集液(泳道 3)(线性梯度洗脱时 NaCl 浓度约为 0.5 mol/L)和洗脱峰 2 收集液(泳道 4)(线性梯度洗脱时 NaCl 浓度为 0.6–0.8 mol/L)均含大量目的蛋白,说明肝素亲和层析能高效纯化和高选择性富集目的蛋白,经 Image-Pro Plus 软件对 SDS-PAGE 图进行灰度扫描分析,计算出目的蛋白纯度为 98.63%。

2.4.3 浓缩目的蛋白液浓度测定

采用 Quick Start Bradford 蛋白测定试剂盒制

得的蛋白质浓度标准曲线为 $y=0.847\ 8x+0.026\ 9$ ($R^2=0.999\ 3$)。将测得的 A_{595} 值代入标准曲线方程中计算出浓缩蛋白液 rhVEGF165 的浓度为 0.45 mg/mL。表 1 总结了 rhVEGF165 的纯化。

2.5 VEGF165 蛋白的生物学活性检测

2.5.1 糖蛋白分子鉴定结果

将目的蛋白氨基酸序列于在线 N-糖基化位点预测网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 上预测,发现目的蛋白氨基酸序列在第 101–103 位处有一个 N-糖基化位点 (Asn-Ile-Thr)。

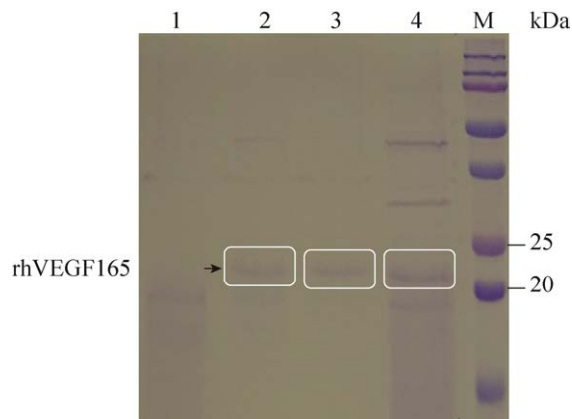


图5 镍柱纯化洗脱峰收集液 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 5 The SDS-PAGE of the eluent of nickel column purification. Lane M: the standard protein; the collection solution of eluate peak 1 (lane 1), eluate peak 3 (lane 2); eluate peak 2 (lane 3); lane 4: sample solution before purification; the protein band in the blue frame is the target protein band.

纯化浓缩蛋白液经 Endo H 酶切后的 SDS-PAGE 检测结果如图 7A 所示, 目的蛋白经 Endo H 酶切后目的蛋白分子量较大的条带的分子量减小了 2–3 kDa, 说明目的蛋白在毕赤酵母 GS115 中分泌表达时大部分发生了 N-糖基化修饰, 且糖基化位点只有一个, 与文献报道

和在线 N-糖基化位点预测结果一致。而分子量较小的条带分子量保持不变, 说明未发生糖基化。

Western blotting 验证 Endo H 酶切前后的产物的结果如图 7B 所示, 发现目的蛋白液经 Endo H 酶切后两条带的分子量均减小了 2–3 kDa, 说明目的蛋白的两条带在毕赤酵母 GS115 分泌表达过程中均发生了糖基化。

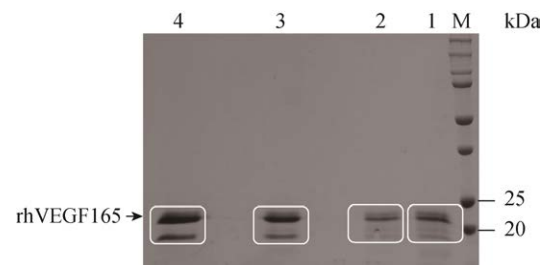


图6 肝素亲和层析洗脱峰收集液 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 6 The SDS-PAGE of the eluent of heparin affinity chromatography. Lane M: the standard protein; lane 1 and 2: the collection solution of nickel column purification elution peak 2 and 3; lane 3 and 4: the collection solution of heparin affinity chromatography elution peak 1 and 2, the protein band in the blue frame is the target protein band.

表1 rhVEGF165 的纯化

Table 1 Purification of rhVEGF165

Purification steps	Protein volume (mL)	Protein purity (%)	Total protein (mg)	Recovery rate (%)	Purified fold
Medium supernatant	2 000	–	119.42	100	1
Ammonium sulfate precipitation	130	–	94.06	78.76	15.38
Nickel column purification	55	96.02	2.13	1.78	36.36
Heparin affinity chromatography	45	98.63	2.05	1.71	44.44
Ultrafiltration	4	98.63	1.81	1.52	500

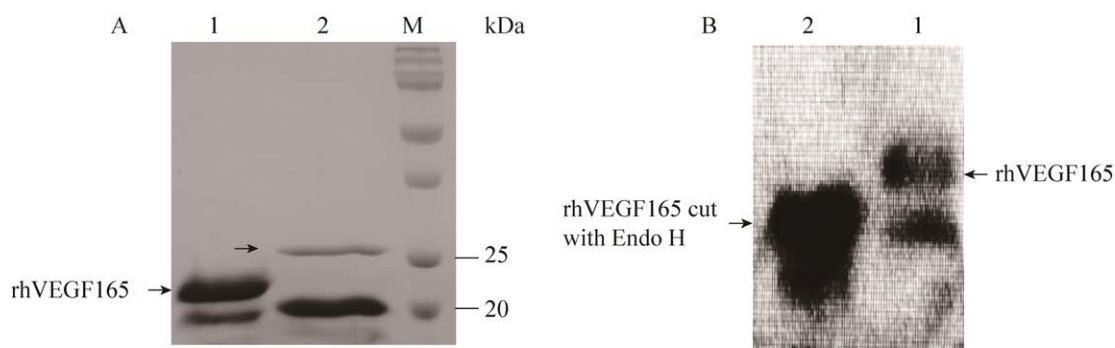


图7 Endo H酶切前后目的蛋白的 SDS-PAGE 鉴定图与 Western blotting 鉴定图

Fig. 7 The SDS-PAGE and Western blotting of target protein before and after cut with Endo H. (A) The SDS-PAGE identification. Lane 1: the purified and concentrated rhVEGF165 protein solution; lane 2: rhVEGF165 protein solution cut with Endo H; lane M: the standard protein; the protein band indicated by the arrow is Endo H. (B) The Western blotting identification Lane 1: the purified and concentrated rhVEGF165 protein solution; lane 2: rhVEGF165 protein solution cut with Endo H.

2.5.2 重组 VEGF165 蛋白对 HUVEC 细胞的促增殖活性

将梯度浓度的 rhVEGF165 蛋白 (0、1、5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于 HUVEC 细胞 8 h, 随后通过 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况。HUVEC 细胞的 A_{450} 吸光值在相同的培养条件下会随着 VEGF165 蛋白浓度的增加而增加 (图 8), 即 rhVEGF165 促进细胞增殖作用以剂量依赖性方式显著增加, 这与其他文献所测得 rhVEGF165 的活性结果一致 (表 2)。说明由毕赤酵母 GS115 重组表达的 VEGF165 蛋白具有天然生物学活性,

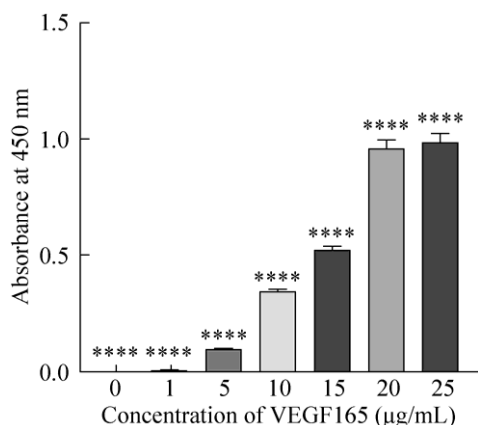


图8 不同浓度 VEGF165 对 HUVEC 细胞的促增殖作用

Fig. 8 The effect of different concentration of VEGF165 on HUVEC cells proliferation. * indicates the significant difference between the experimental groups (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). The error bars indicated standard deviation.

且经纯化浓缩等一系列处理后对 HUVEC 细胞仍然具有很强的促增殖作用。

3 讨论

VEGF 是一种血管内皮细胞特异性有丝分裂原, 能够促进内皮细胞分裂增殖, 加强血管的通透性、促进新血管以及骨组织的生成^[21-23]; 以 VEGF165 为治疗靶标研制开发抗肿瘤药物和生物标志物研发检测试剂成为研究热点, 高纯度的 VEGF165 则成为各种研究的基础。为提供一个能够快速简便得到高纯度有活性 VEGF165 的方法, 本文通过上游设计构建目的基因表达盒, 利用毕赤酵母表达系统进行异源表达。

本研究在选择表达系统时克服了大肠杆菌原核表达系统以及昆虫细胞、酿酒酵母和哺乳动物细胞等真核表达系统的缺点与不足 (表 3); 同时利用 BBPB 载体通过“Biobirck”法构建多拷贝 VEGF165 基因, 实现了提高 rhVEGF165 表达量的目的, 表达盒构建策略能明确知道基因的拷贝数和目的蛋白表达量与其基因拷贝数的相关性, 避免了 G418 压力筛选的不确定性, 减少了 G418 压力筛选高拷贝菌株的工作量, 克服了毕赤酵母筛选高拷贝菌株的难点。筛选获得的重组菌株 GV5-18 表达的目的蛋白量相对较高。

表 2 检测 rhVEGF165 活性的方法以及结果汇总

Table 2 Summary of methods for detecting the effect rhVEGF165 on promoting cell proliferation

Expression system	Cell proliferation assay	Whether the proliferation effect of rhVEGF165 is significantly increased in a dose-dependent manner	References
<i>E. coli</i>	MTT assay	Yes	[12]
<i>E. coli</i>	10% alamarBlue	Yes	[20]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WST-1 cell proliferation assay system (TaKaRa)	Yes	[10]
Insect cell	CellTiter 96 Non-radioactive cell proliferation assay (Promega) procedure	Yes	[13]
<i>Pichia pastoris</i>	MTT assay	Yes	[11]
<i>Pichia pastoris</i>	Cell Counting Kit-8	Yes	This paper

表 3 VEGF165 在不同的异源表达系统下表达纯化的优缺点

Table 3 Summary of the advantages and disadvantages of VEGF165 expression and purification using different heterologous expression systems

Expression system	Advantages and disadvantages	References
<i>E. coli</i>	Advantages: large-scale expression of rhVEGF165, low cost and short cycle Disadvantages: cumbersome purification, easy to produce inclusion bodies, the refolding process of inclusion bodies is extremely prone to mismatches of disulfide bonds, too much protein affects the activity and purity	[12]
Mammalian cell	Advantages: rhVEGF165 expressed in mammalian cells has a natural conformation, and the glycosylation sequence is the same as the natural one Disadvantages: low expression level, high training cost, and high technical requirements for operation	[24] [25] [14]
Insect cell	Advantages: high expression level, correct protein folding and glycosylation modification Disadvantages: sometimes the glycosylation sequence is different from the natural one, and the purification steps are complicated and costly	[13]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Disadvantages: low expression level, low purity, difficulty in high-density fermentation, easy loss of plasmids, unstable subculture cells, low secretion efficiency, and prone to hyperglycosylation	[10]
<i>Pichia pastoris</i>	Advantages: high expression level of multi-copy recombinant strains, low culture cost, correct protein folding and glycosylation modification Disadvantages: the workload of screening multi-copy recombinant strains is large, and the single exchange integrated transformants are unstable during high-density fermentation	[11]

本研究通过上游设计目的基因表达元件以改良目的蛋白下游纯化工艺: 1) 将 VEGF165 自身的信号肽替换成毕赤酵母 α -因子信号肽实现了目的蛋白的高效分泌表达, 并在 VEGF165 序列的 C 端添加 His 标签, 通过 His 标签和 VEGF165 肝素结合结构域, 采用镍柱与肝素亲和层析进行蛋白纯化, 线性梯度洗脱的分离纯化策略实现了目的蛋白高效分离和浓缩的效应, 表达产物仅经两步亲和

层析后获得了纯度达到 98.63% 的 rhVEGF165 蛋白 (表 4)。2) 选择 P_{gap} 启动子进行表达, 免去了菌液培养时需添加甲醇的步骤, 与文献报道的甲醇毕赤酵母诱导表达相比, 简化了培养过程, 缩短了培养时间, 表达的蛋白符合医用要求, 稳定性更佳, 分泌表达过程中目的蛋白降解率低。但是缺点为重组菌株目的蛋白表达量会较低, 后期可以通过改造 P_{gap} 调控因子、构建和筛选更高

表 4 VEGF165 在不同的纯化策略的纯化结果

Table 4 Summary of the purification of VEGF165 from fermentation supernatant using different purification strategies

Expression system	Purification steps	Purity of rhVEGF165 after purification	Purified fold	Summary of purification strategies	References
<i>E. coli</i>	1.Nickel-nitrilotriacetic acid resin column	97%	–	Using his tag, one-step purification obtains rhVEGF165 with 97% purity.	[12]
Mammalian cell (Sf21)	1.Heparin affinity 2.30 kDa cut-off membrane for ultrafiltration 3.Ion exchange chromatography 4.FPLC	95.85%	119.75	The purity of rhVEGF165 obtained by the three-step purification procedure is only 95.85%. Too many purification steps will reduce the yield of the target protein.	[23]
<i>Pichia pastoris</i> (GS115)	1.Sephadex G-25 2.Heparin Sepharose FF 3.Sephacryl S-100	95%	–	Using methanol-induced protein expression, 95% purity rhVEGF165 was obtained through three chromatographic separation and purification. Too many purification steps would reduce the protein yield.	[11]
<i>Pichia pastoris</i> (GS115)	1.Nickel column purification 2.Heparin affinity chromatography 3.Ultrafiltration	98.63%	500	Using non-methanol to induce this paper <i>Pichia pastoris</i> expression, through upstream design optimization purification strategy, two-step purification to obtain 98.63% purity rhVEGF165.	

–: not reported in the article.

拷贝数的重组菌株、使用发酵罐大规模培养等方法继续提高其表达量。考马斯亮蓝法测得 rhVEGF165 蛋白浓度达到 0.45 mg/mL, 带 His 标签的 rhVEGF165 能够促进 HUVEC 细胞的增殖, 证明具有天然 VEGF165 的生物学活性。

本研究的纯化策略结合了非甲醇诱导的毕赤酵母表达系统, 不仅能够减少粗酶液杂蛋白的含量, 还简化了 rhVEGF165 的纯化步骤来减少纯化过程所带来的蛋白损失, 是目前文献报道的最高纯度 (表 4), 高纯度且有活性的 VEGF165 能进一步为探索研发关于 VEGF165 的药物研究奠定基础。

REFERENCES

- [1] 张淑芝. 血管内皮生长因子研究进展. 潍坊学院学报, 2012, 12(2): 54-58.
Zhang SZ. Advances in the research of vascular endothelial growth factor. J Weifang Univ, 2014, 12(2): 54-58 (in Chinese).
- [2] Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Rev, 1996, 7(3): 259-270.
- [3] Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia, J Biol Chem, 1996, 271(5): 2746-2753.
- [4] Birk DM, Barbato J, Mureebe L, et al. Basic science review: current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. Vascul Endovasc Surg, 2008, 42(6): 517-530.
- [5] Ng EWM, Shima DT, Calias P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(2): 123-132.
- [6] Radema SA, Witteveen PO, Gebbink MB, et al. The clinical perspective of angiogenesis inhibitors. Ned Tijdschr Geneesk, 2003, 147(35): 1675-1680.
- [7] Kimoto M, Nakamura M, Hirao I. Post-ExSELEX stabilization of an unnatural-base DNA aptamer

- targeting VEGF₁₆₅ toward pharmaceutical applications. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(15): 7487-7494.
- [8] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vegf-a and the induction of pathological angiogenesis. *Ann Rev Pathol Mechan Dis*, 2007, 2: 251-275.
- [9] Lee IL, Li PS, Yu WL, et al. Prokaryotic expression, refolding, and purification of functional human vascular endothelial growth factor isoform 165: purification procedures and refolding conditions revisited. *Protein Expr Purif*, 2011, 76(1): 54-58.
- [10] Kang WK, Lee MH, Kim YH, et al. Enhanced secretion of biologically active, non-glycosylated VEGF from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2013, 164(4): 441-448.
- [11] 王晓, 黄晓平, 周宇, 等. 重组人 VEGF165 蛋白在毕赤酵母中高效表达与多克隆抗体的制备. 华侨大学学报(自然科学版), 2014, 35(6): 695-700.
Wang X, Huang XP, Zhou Y, et al. High level expression of recombinant human vascular endothelial growth factor 165 protein in *Pichia pastoris* and preparation of VEGF165 polyclonal antibody. *J Huaqiao Univ (Nat Sci)*, 2014, 35(6): 695-700 (in Chinese).
- [12] Kang W, Kim S, Lee S, et al. Characterization and optimization of vascular endothelial growth factor₁₆₅ (rhVEGF₁₆₅) expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2013, 87(2): 55-60.
- [13] Zhang TY, Liu RP, Luo Q, et al. Expression and characterization of recombinant human VEGF165 in the middle silk gland of transgenic silkworms. *Transgenic Res*, 2019, 28(5/6): 601-609.
- [14] 唐浩, 陈勇, 夏昆, 等. VEGF165 在哺乳动物细胞中的稳定表达. 中国医师杂志, 2004, 6(7): 868-871.
Tang H, Chen Y, Xia K, et al. The stable expression of VEGF165 in mammalian cells. *J Chin Physician*, 2004, 6(7): 868-871 (in Chinese).
- [15] Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G. The α -helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1998, 273(18): 11115-11120.
- [16] Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, et al. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, 1997, 91(5): 695-704.
- [17] 王令, 郭苗苗, 杜伟立, 等. 多靶点 CRISPR 表达载体系统的设计和构建. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4): 1518-1525.
Wang L, Guo MM, Du WL, et al. Design and construction of CRISPR expression vector system harboring multi-target sites. *Genomics and applied biology*, 2017, 36(4): 1518-1525 (in Chinese).
- [18] 徐云巧, 李婷婷, 吴彩娥, 等. 糖蛋白的去糖基化方法研究进展. 中国生物工程杂志, 2017, 37(5): 97-106.
Xu YQ, Li TT, Wu CE, et al. Research progress on the methods of deglycosylation of glycoproteins. *China Biotechnol*, 2017, 37(5): 97-106 (in Chinese).
- [19] Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, et al. Heparin regulates vascular endothelial growth factor₁₆₅-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem*, 2005, 280(36): 31508-31515.
- [20] 周晓雷, 朱重悦, 张世光, 等. 重组人血管内皮生长因子 165 在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化与体外活性评价. 科学技术与工程, 2016, 16(1): 42-46.
Zhou XL, Zhu CY, Zhang SG, et al. Prokaryotic soluble expression and purification of functional human vascular endothelial growth factor 165. *Sci Technol Eng*, 2016, 16(1): 42-46 (in Chinese).
- [21] Dai J, Rabie ABM. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res*, 2007, 86(10): 937-950.
- [22] Geiger F, Bertram H, Berger I, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF₁₆₅-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(11): 2028-2035.
- [23] Bluteau G, Julien M, Magne D, et al. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone*, 2007, 40(3): 568-576.
- [24] Lee GY, Jung WW, Kang CS, et al. Expression and characterization of human vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅) in insect cells. *Protein Expr Purif*, 2006, 46(2): 503-509.
- [25] 韦方, 邓云坤, 乔慧. 人 VEGF165 基因的克隆、表达和活性鉴定. 贵州医药, 2005, 29(1): 3-6.
Wei F, Deng YK, Qiao H. The clone, expression and activity identify of human vascular endothelial growth factor. *Guizhou Med J*, 2005, 29(1): 3-6 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)