

人胎盘生长因子2在毕赤酵母中的表达和纯化

梁小庆¹, 闫鹏飞², 刘 煜^{2*}

(¹东南大学附属中大医院,南京 210009; ²中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009)

摘要 为获得真核表达的重组人胎盘生长因子2(PIGF-2)纯化蛋白样品,采用基因工程方法构建重组人PIGF-2酵母表达载体pPIC9K-PIGF-2,电转后筛选阳性克隆,经甲醇诱导表达、肝素亲和柱色谱分离纯化得到蛋白纯化样品,经SDS-PAGE和Western blot鉴定,该蛋白为重组人PIGF-2纯化蛋白,表明该法可用于制备分泌表达的hPIGR-2。

关键词 胎盘生长因子2; 毕赤酵母; 纯化

中图分类号 Q789 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)03-0376-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180318

引用本文 梁小庆, 闫鹏飞, 刘煜. 人胎盘生长因子2在毕赤酵母中的表达和纯化[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3):376–380.
Cite this article as: LIANG Xiaoqing, YAN Pengfei, LIU Yu. Expression and purification of human placental growth factor 2 using the *Pichia pastoris* expression system[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(3):376–380.

Expression and purification of human placental growth factor 2 using the *Pichia pastoris* expression system

LIANG Xiaoqing¹, YAN Pengfei², LIU Yu^{2*}

¹Zhongda Hospital Southeast University, Nanjing 210009;

²School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To prepare the human placental growth factor 2 (PIGF-2), human PIGF-2 gene was cloned into pPIC9K vector to construct the recombinant pPIC9K-PIGF-2 vector. Linearized recombinant pPIC9K-PIGF-2 was transformed into *Pichia pastoris* by electroporation. YPD-Geneticin plate was used to screen geneticin hyper-resistant colonies. The positive colonies were verified by PCR. Results of SDS-PAGE and Western blot showed that recombinant human PIGF-2 was expressed after being induced by methanol. Using its characteristic heparin binding, recombinant human PIGF-2 was successfully purified by heparin affinity column chromatography.

Key words placental growth factor 2 (PIGF-2); *Pichia pastoris*; purify

This study was supported by the Special Technical Development Project for Scientific Research Institution of Hainan Province Innovation Capacity Construction Plan (No. SQ2017JSKF0027)

胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)属于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族,是一种有效的促进血管形成和增加血管通透性的诱导因子。PIGF最早从胎盘cDNA文库中分离得到,通常在滋养层、正常甲状腺以及在伤口愈合期间进行表达。它能够促进内皮细胞的增殖、迁移、分化及存活,抑制内皮细胞的

老化和凋亡。PIGF在胃癌、直肠癌、非小细胞肺癌、乳腺癌和中耳胆脂瘤中明显上升,可以作为这几种肿瘤的指标性物质,说明PIGF和部分肿瘤血管生成有着密切的关系。近年来,国内外对于PIGF在促进血管生成、调节滋养细胞功能、加快缺血性疾病进程及促进肿瘤生长等方面进行了大量研究。PIGF是一种分泌性同二聚体糖蛋白,其基因定位于14q24-

q31。根据编码基因 RNA 不同的剪接方式,目前有4种异构体:PIGF-1、PIGF-2、PIGF-3、PIGF-4,其中以PIGF-2在人体中表达最为丰富,活性最强,因此本研究采用毕赤酵母表达重组人PIGF-2蛋白,用于后续的抗体制备及活性研究。在制备中,由于PIGF蛋白具有肝素亲和活性,因此采用Heparin-Sepharose CL6B肝素亲和色谱进行高效的分离纯化。

1 材 料

1.1 质粒、菌株和试剂

Taq 酶、dNTP(中国上海翊圣生物科技有限公司);T4 DNA 连接酶、*EcoR* I、*Not* I、PMD-19T、*Sal* I(日本 Takara 公司);小量质粒 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、Lyticase(中国天根生化科技有限公司);heparin-Sepharose CL4B(美国 GE 公司);G418[生工生物工程上海(股份)有限公司];无氨基酵母氮源(YNB,美国 Difco 公司);生物素(美国 Amresco 公司);PIGF 抗体(美国 Santa Cruzs 公司);胰蛋白胨、酵母粉(英国 Oxoid 公司);人 PIGF-2 cDNA(中国北京义翘神州生物技术公司);pPIC9K、GS115、*E. coli* DH5 α (本实验室保存)。

1.2 仪 器

电转仪、PCR 仪、酶联免疫分析仪、蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像仪(上海天能公司);琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂);蛋白核酸检测仪(南京大学仪器厂);数显横流泵(上海沪西仪器公司)。

2 方 法

2.1 PIGF-2 基因的 TA 克隆

采用 Primer 5 设计一对 PIGF-2 基因的特异性引物:PI5:5'-CGGAATTCATGCCGGTCATGAGGCT-GTTC-3' 和 PI3:5'-AAATATGCGGCCGCTTACCTC-CGGGGAACAG-3',以购得的人 PIGF-2 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 程序为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收与预期大小一致的条带,通过 T-A 克隆将其连接到 pMD19-T 载体上,转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,均匀涂布在 LB 平板(含氨苄青霉素)上,37 ℃ 倒置培养 12 h,经菌落 PCR 检测后挑选阳性克隆进行测序。

2.2 构建 pPIC9K-PIGF-2 质粒

将目的片段和 pPIC9K 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切,37 ℃ 过夜酶切,经割胶回收,T4 DNA 连接酶连接 8 h,转入 DH5a 中,挑取阳性克隆酶切验证,将验证结果正确的菌株送去测序。

2.3 电转化 pPIC9K-PIGF-2

将测序正确的菌株接种培养,提取质粒,以 *Sal* I 酶切线性化,1.2% 琼脂糖电泳割胶回收,-20 ℃ 保存。设定电转仪参数(电压 1 500 V,时间 4 ms),将 *Sal* I 线性化的重组质粒 10 μ L 加入制备好的酵母细胞 GS115 100 μ L 中,混匀,转入 0.2 cm 电转杯内,置电转仪,电击后取出,迅速放回冰上加入预冷山梨醇 1 mL,混匀,吸取 200 μ L 涂布于 MD 平板上。30 ℃ 培养 2 d,挑取阳性克隆。

2.4 阳性克隆的筛选

将 MD 平板上长出的单菌落依次接种于浓度递增的 G418-YPD 平板上(G418 质量浓度为 0.25,0.5,2.0,4.0 mg/mL),30 ℃ 培养 2 d,挑取多拷贝阳性克隆,采用 Lyticase 酶解及 PCR 法鉴定阳性克隆。

2.5 阳性克隆的诱导表达

随机挑选阳性克隆,依次接种于 YPD 培养液 5 mL 和 BMGY 培养基 10 mL 中,30 ℃ 分别培养过夜。第 3 天室温下 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,细胞沉淀重悬于 BMGY 培养液 25 mL 中,加入甲醇浓度为 0.5%,30 ℃ 振荡培养,诱导表达,连续 7 d 固定时间补加甲醇,第 7 天,8 000 r/min 离心 10 min,收获上清液。取上清液经 SDS-PAGE 电泳和 ELISA 鉴定。

2.6 表达条件的优化

2.6.1 甲醇诱导浓度的选择 取 50 mL 灭菌锥形瓶 6 只,按上述方法接种等量的菌液,每天按以下浓度补加甲醇:0.25%,0.5%,0.75%,1.0%,1.5%,2.0%,培养 7 d 收集培养基,采用 ELISA 法测定不同诱导浓度下目的蛋白的表达量。

2.6.2 诱导时间的选择 取 500 mL 锥形瓶 1 只,接种菌液,每日按 1% 补加甲醇溶液,分别于诱导前及诱导后 1,2,3,4,5,6,7 d 取培养液 1 mL 留样,采用 ELISA 法分别测定不同时间目的蛋白的表达量。

2.7 重组蛋白的分离纯化及鉴定

酵母培养液 8 000 r/min 离心 15 min,分离菌

体,培养上清液在平衡液 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)中透析平衡过夜后,过 0.45 μm 滤膜后上样于 Heparin-Sepharose CL6B 亲和柱,用平衡液和含 1 mol/L NaCl 的平衡液进行 0~1 mol/L 线性梯度洗脱,收集洗脱峰进行 SDS-PAGE 和 ELISA 检测。

2.8 ELISA 检测

包被酶标板,其中加入 100 μL rhPIGF-2 酵母发酵液或者纯化后重组人 PIGF-2 样品(1 μg/mL)和 100 μL 包被缓冲液,4 °C 过夜。PBST 洗涤后,加入封闭液(3% BSA-PBST),37 °C 2 h。加入一抗(将抗体以 1% BSA 溶液稀释),37 °C 反应 1 h 后,加入 HRP 标记的抗鼠 IgG,37 °C 反应 1 h 后显色。采用酶标仪在 490 nm 处测定样品吸收度。

3 结果

3.1 PIGF-2 基因的 PCR 结果

经 PCR 扩增后,得到 PIGF-2 基因,经琼脂糖电泳显示,条带位置在 500 bp 左右,与理论预期大小相符(图 1)。

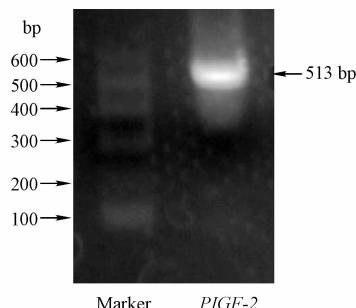


Figure 1 Detection of the amplification product of human placental growth factor 2 (PIGF-2) gene by PCR

3.2 载体构建图

PIGF 基因经 EcoR I 和 Not I 双酶切后条带位置正确,测序检查证明 PIGF 基因已成功重组于载体的多克隆位点,载体构建成功(图 2)。

3.3 转化克隆的 PCR 检测

经 PCR 检测发现,转化克隆均有 500 bp 的阳性条带。PCR 方法检测 Mut⁺/Mut^s 结果见图 3。由图 3 可知,用 AOX1 引物(5'AOX1: 5'-GACTGGT-TCCAATTGACAAGC-3'; 3AOX1: 5'-GCAAATG-GCATTCTGACATCC-3')进行 PCR,1、2、3、5、6、7、8 号菌株均产生了 1 000 bp 左右和 2 000 bp 左右两条带,此为 Mut⁺型菌株,而 4 号菌株在 2 000 bp 没有条带,即为 Mut^s型菌株。

由于 Mut⁺基因型菌株中含有 AOX1 基因,因此可以以甲醇为碳源,在 MM 平板上正常生长,而因外源基因的插入发生交换导致 AOX1 基因缺失的 Mut^s却不能在 MM 平板上正常生长,虽然存在与 AOX1 具有 97% 同源性的 AOX2 基因,但其利用甲醇作为碳源的能力远远低于 AOX1。

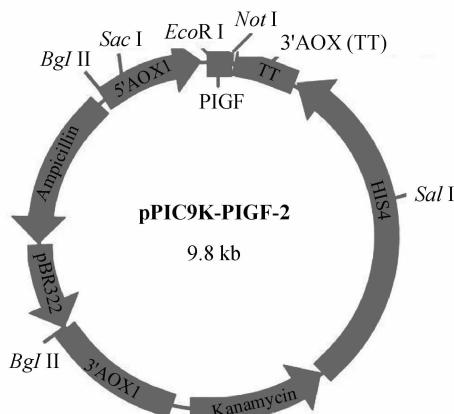


Figure 2 Map of recombinant pPIC9K-PIGF-2

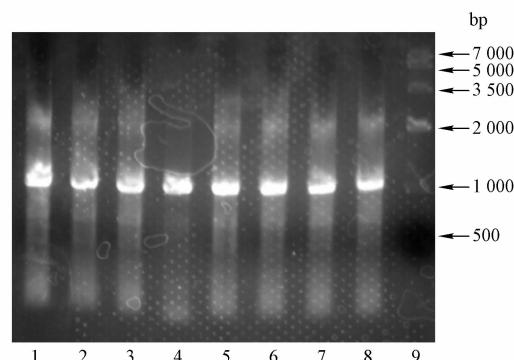


Figure 3 Detection of recombinant plasmid pPIC9K-PIGF-2
Line 1~8: Sample 1~8; Line 9: Marker

3.4 表达条件的优化

3.4.1 甲醇浓度的影响 由图 4 可见,甲醇体积分数为 0.5% 时,目的蛋白的表达量最高。

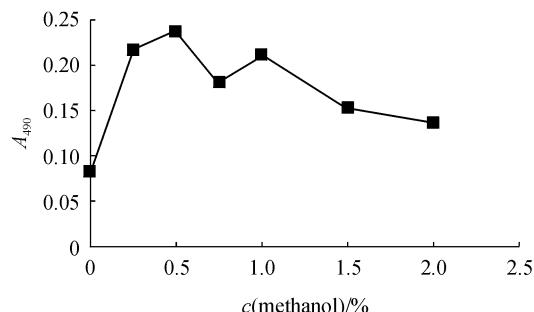


Figure 4 Influence of concentration of methanol on the expression of PIGF-2 in *Pichia pastoris*

3.4.2 诱导时间的影响 由图5可见,诱导后7 d内表达量不断增加,所以将诱导时间定为7 d。

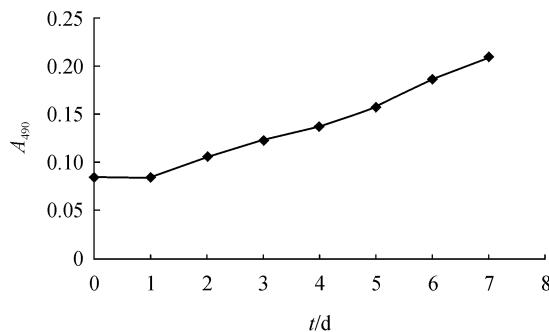


Figure 5 Influence of the induction period on the expression of human PIGF-2 in *Pichia pastoris*

3.5 重组蛋白的纯化鉴定结果

由图6和图7可见,亲和色谱只有一个洗脱峰,由相对分子质量大小及Western blot结果可知,该洗脱峰为目的蛋白峰,其稳定态为二聚体,并且有少量单体存在。

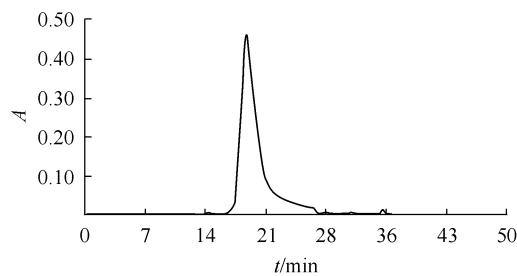


Figure 6 Elution curve of recombinant human PIGF-2

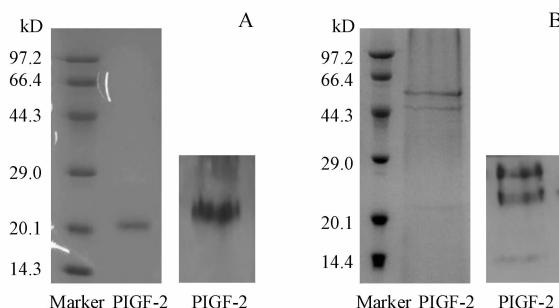


Figure 7 SDS-PAGE and Western blot of recombinant human PIGF-2 expressed in *Pichia pastoris*

A: Reduced; B: Non-reduced

4 讨论

毕赤酵母表达系统既具有原核细胞的易操作性,也有真核细胞翻译后的加工能力,是重组糖蛋白比较理想的表达体系。pPIC9K载体全长9 276 bp,

含有一个Cope1复制起点和两个抗性基因(Amp、Kan),它是一个穿梭载体,既可以在原核细胞中复制,又能在真核细胞中表达,且有一个强启动子AOX1,能在甲醇的诱导下高效表达外源蛋白。所用表达菌株为GS115毕赤酵母,具有组氨酸脱氢酶缺陷型基因His4,可接受含His4的载体pPIC9K而使其具有His⁺表型以筛选阳性转化子,因此可在组氨酸缺陷的MD平板上筛选。

由于Mut⁺基因型菌株中含有AOX1基因,因此可以以甲醇为碳源,在MM平板上正常生长,而因外源基因的插入发生交换导致AOX1基因缺失的Mut^s却不能在MM平板上正常生长,虽然存在与AOX1具有97%同源性的AOX2基因,但其利用甲醇作为碳源的能力远远低于AOX1。在筛选Mut⁺基因型菌株时,曾按照文献方法,从高浓度G418平板上挑取高拷贝菌株于MM和MD平板上,再观测其在平板上的生长情况,挑选在两种板子上生长一样快的为Mut⁺基因型。但实际情况是在挑取菌落过程中,用牙签很难把握挑取的菌量,这就很难判断菌在MM和MD平板上生长情况。因此本研究通过AOX1引物鉴定酵母染色体的基因组,由于Mut⁺基因型中外源重组子是通过单交换以插入的方式整合到酵母染色体中的,PCR结果应该出现酵母自身的AOX1基因条带,以及插入片段中AOX1一部分序列所产生的条带。而Mut^s型基因型外源基因是通过双交换的方式替换掉酵母基因组自身的AOX1基因,结果应该只出现插入片段PCR所产生的一条条带,鉴于此特征可以筛选Mut⁺基因型菌株。

SDS-PAGE和Western blot结果显示,表达的PIGF蛋白大部分以二聚体形式存在,少量以单体形式存在。所有阳性酵母菌株的蛋白产量都很低,探究其原因,可能是由于稀有密码子过多。如果要大量表达蛋白则需要改造基因,使其更适合酵母体系表达。

参考文献

- [1] Maglione D, Guerrero V, Viglietto G, et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 1991, 88(20): 9267-9271.
- [2] Yang W, Ahn H, Hinrichs M, et al. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PGF-4) expressed in human rhabdomyosarcoma

- and endothelial cells[J]. *J Reprod Immunol*, 2003, **60**(1):53–60.
- [3] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer[J]. *Cell*, 2010, **140**(6):883–899.
- [4] Chen J, Yang ZF, He AL, et al. The express of placental growth factor in human stomach cancer[J]. *J Clin Med Practice(实用临床医药杂志)*, 2008, **12**(6):24–27.
- [5] Cui HX, Song DB, Wang WP, et al. The significance and expressions of PLGF, bFGF and MVD in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Basic Clin Oncol(肿瘤基础与临床)*, 2009, **4**(22):93–95.
- [6] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *Yeast*, 2005, **22**:249–270.
- [7] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 2000, **24**:45–66.
- [8] Gao BM, Zhangsun DT, Zhu XP, et al. Preparation methods comparison of recombinant *Pichia pastoris* genomic DNA for PCR [J]. *Chin J Marine Drugs(中国海洋药物杂志)*, 2009, **28**(1):7–11.
- [9] Han J, Wu DW, Feng JB, et al. Expression and purification of carbapenemase OXA-72 in *Pichia pastoris* [J]. *J Shandong Univ (Health Sci)[山东大学学报(医学版)]*, 2009, **47**:22–25.

• 新药信息 •

2018年4月全球药物快讯(2)

镇痛与麻醉药物

2018年4月30日,治疗急性偏头痛的候选药物 ubrogepant 在 ACHIEVE II 期临床研究中达到首要终点
2018年4月17日,Asana BioSciences 发表新的 P2X3 和/或 P2X2/3 受体拮抗剂

抗感染药物

2018年4月26日,Entasis Therapeutics 公司宣布与再鼎医药进行 ETX-2514 的战略开发合作
2018年4月19日,病毒衣壳调节剂 GLP-26 有望用于治疗耐药性乙肝
2018年4月18日,Enanta Pharmaceuticals 发现抗 HBV 的新颖化合物
2018年4月12日,Assembly Biosciences 发现新的 HBV 核心蛋白调节剂

代谢类疾病

2018年4月18日,以 NLRP3 为靶标有望治疗非酒精性脂肪肝和肝纤维化
2018年4月16日,Chugai Pharmaceutical 发现新的 GLP-1 受体激动剂
2018年4月13日,STK25 有望成为非酒精性脂肪性肝病的治疗靶标
2018年4月13日,PCSK7 有望成为代谢类疾病的治疗靶标
2018年4月12日,Texas A&M 大学发现新型的 LDLR-PCSK9 蛋白-蛋白相互作用抑制剂
2018年4月11日,默克公司发表新结构的 PCSK9 抑制剂

自身免疫类疾病

2018年4月4日,诺华发表新结构的 TLR7/8/9 拮抗剂

心血管疾病

2018年4月24日,葛兰素史克发表新结构的 TrpV4 拮抗剂
2018年4月18日,Astellas 将用于治疗心力衰竭的 PDE9 抑制剂的开发权授予 Cardurion 公司
2018年4月13日,BIAL-Portela & Ca 发现新结构的多巴胺 β 羟化酶抑制剂

中枢神经系统

2018年4月30日,KAERI 发表用于阿尔兹海默病的光声成像剂
2018年4月30日,有望用于治疗帕金森病的化合物 ITI-214
2018年4月23日,默克公司发表新结构的 mGlu2 受体负向变构调节剂
2018年4月16日,基于干细胞的治疗阿尔兹海默病再生疗法在日本开展首例病人的治疗

(来源:科睿唯安)