文章编号:1000-5404(2005)20-2009-03

论著

重组小鼠凝血因子Ⅶ毕赤酵母表达载体的构建及整合体的筛选

项贵明,杨峥嵘,粟永萍,程天民 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建无凝血活性的重组小鼠凝血因子Ⅶ(rmFⅦ)毕赤酵母分泌型表达载体,获得高拷贝稳定整合菌株,为大量获得rmFⅦ蛋白,进行功能研究及其临床应用奠定基础。**方法** PCR扩增得到mFⅦ基因片段,插入酵母表达载体pPIC9K的α分泌信号开放阅读框的下游,再经定点突变(K341A)得到pPIC9K-rmFⅦ,测序正确的质粒用*Sac* Ⅰ线性化后电穿孔转化毕赤酵母GS115,G418梯度筛选转化菌,PCR鉴定目的基因的整合。**结果** 获得了rmFⅦ毕赤酵母表达载体pPIC9K-rmFⅦ,G418抗性筛选得到高拷贝菌株,PCR证实目的基因已整合到毕赤酵母染色体中。**结论** 成功构建了rmFⅦ毕赤酵母表达载体,获得了高拷贝稳定整合菌株,为大规模表达纯化rmFⅦ蛋白及后续研究奠定了基础。

关键词:小鼠凝血因子Ⅶ;毕赤酵母;基因重组
中图法分类号: Q592.1;Q782;Q939.11 **文献标识码:** A

Construction of recombinant mouse coagulation factor Ⅶ expression vector and screening of integrants in *Pichia pastoris*

XIANG Gui-ming, YANG Zheng-rong, SU Yong-ping, CHENG Tian-min (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct secretory recombinant mouse coagulation factor Ⅶ (rmFⅦ) expression vector and to obtain stable multicopy integrants in *Pichia pastoris*. Methods The fragment of mFⅦ cDNA was amplified from a PCDNA3-mFⅦ plasmid and subcloned into α factor secretion signal open reading frame of pPIC9K secretory expression vector, then the target amino acid was mutated by Site-Direct Mutation (K341A) and verified by DNA sequence. The recombinant expression vector bearing rmFⅦ gene was linearized with *Sac* Ⅰ and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115, and stable multicopy integrants were obtained by screening in medium containing different concentrations of G418. Results The secretory rmFⅦ expression vector was successfully constructed and stable multicopy integrated strains were obtained. Conclusion This result offers efficient *Pichia pastoris* strains for mass production of rmFⅦ protein.

Key words: mouse coagulation factor Ⅶ; *Pichia pastoris*; gene recombination

小鼠凝血因子Ⅶ(mouse coagulation factorⅦ, mFⅦ)是一种分子量为53×10^3的单链糖蛋白,是小鼠组织因子(tissue factor, TF)的生理性配体。近年来的研究表明,TF在乳腺癌、黑色素瘤、前列腺癌、直肠癌和急性白血病等多种恶性肿瘤的细胞表面和肿瘤血管内皮细胞表面有高表达,而生理情况下与血液直接接触的正常组织都是不表达TF的[1]。如果以FⅦ作为药物载体,就可能使药物选择性作用于肿瘤组织,从而有效降低常规化疗的毒副作用[2]。但FⅦ是凝血级联反应的重要起始因子,为预防用药后可能出现的凝血和血栓形成,只有人为突变破坏其凝血活性后方能作为靶向药物载体。mFⅦ既可以与小鼠TF结合,也可以与人TF很好地结合,便于在小鼠体内进行实验研究,因此无凝血活性的重组小鼠凝血因子Ⅶ(recombinant mouse coagulation factorⅦ, rmFⅦ)可以作为肿瘤靶向治疗的药物载体。研究表明当mFⅦ第341位的赖氨酸(AAG)突变成丙氨酸(GCG)(简称K341A突变)时,凝血活性大部分丧失,但仍然对TF具有高度亲和力,因此我们选择在此位置进行点突变[3]。我们将mFⅦ经K341A突变破坏其凝血活性,构建了rmFⅦ毕赤酵母分泌型表达载体,为大规模表达纯化rmFⅦ蛋白及后续研究奠定了基础。

基金项目:重庆市院士专项基金资助项目(2003-6317)
Supported by the Funds for Academicians by Chongqing (2003-6317)
作者简介:项贵明(1974-),男,湖北省武穴市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。电话:(023)68771723, E-mail: xiangguiming@yahoo.com.cn
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009, E-mail:suyping@yahoo.com
收稿日期:2005-04-11;**修回日期:**2005-08-16

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 质粒 pPIC9K 和毕赤酵母菌菌株 GS115(Mut +/His-)购自 Invitrogen 公司,含 mFⅦ全长 cDNA 序列的 pcDNA3- mFⅦ质粒由本所杨峥嵘博士提供。

1.1.2 试剂耗材 DNA 聚合酶、限制性内切酶、T_4 连接酶均为 TaKaRa 生物公司产品。点突变试剂盒购自 Strategene 公司,电泳仪、电转仪均为 Bio-Rad 公司产品。引物合成和测序由上海博亚生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 mFⅦ基因片段的获得 根据 mFⅦ的氨基酸序列和 pPIC9K 的 α 因子信号肽序列,设计引物用于扩增不含自身信号肽序列的 mFⅦ cDNA 片段。上游引物 P1:5′-GAATTCGCCAACTCACTCCTGGAGGAGCTT-3′,引入 *Eco*R Ⅰ酶切位点;下游引物 P2 :5′-GCGGCCGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAA-3′,引入 *Not* Ⅰ酶切位点。PCR 反应模板为 pcDNA3-mFⅦ质粒,选用 Pyrobest DNA Polymerase 进行扩增。反应条件:95 ℃变性 1 min,56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,共进行 30 个循环。

1.2.2 pPIC9K-mFⅦ的连接转化 将上述 PCR 产物用 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切,回收 1 200 bp 左右的片段,定向插入经相同酶切的毕赤酵母表达载体 pPIC9K,热休克转化宿主菌 DH5α,培养于含氨苄青霉素的 LB 平板上,挑阳性克隆提取质粒,酶切鉴定含有 mFⅦ片段的重组子送公司测序。

1.2.3 pPIC9K-mFⅦ的定点突变(K341A) 常规摇菌,抽提含 mFⅦ片段的 pPIC9K 质粒,作为点突变 PCR 反应的质粒模板。突变引物设计(带下划线为突变位点)上游 P3:5′-ACCAAGGACGCCTGCGCGGGTGACAGCGGTGGC-3′,下游 P4:5′-GCCACCGCTGTCACCCGCGCAGGCGTCCTTGGT-3′。PCR 反应体系组成如下:10 ×反应缓冲液 5 μl,质粒模板 2 μl,突变引物各 1.25 μl ,dNTP 1 μl,QuickSolution 3 μl,dH_2O 36.5 μl,Pfu-Turbo DNA polymerase (2.5 U/μl) 1 μl。反应条件:95 ℃变性 30 s ,55 ℃退火 1 min, 68 ℃延伸 22 min ,18 个循环。扩增的 PCR 产物用 *Dpn* Ⅰ酶消化 1 h,消化好的 DNA 热休克转化 XL10-Golden 感受态细菌,挑氨苄平板上的阳性克隆摇菌扩增,菌液与所抽提质粒一并送公司测序。

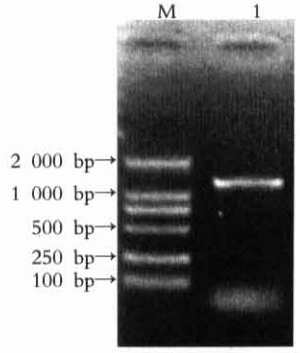
1.2.4 酵母菌的转化及高拷贝整合菌株的筛选 挑取 GS115 单菌落接种于 10 ml YPD 培养液中,30 ℃振荡过夜,1 % 体积转接至 50 ml YPD 中,扩大培养至对数生长期 $D = 1.3 \sim 1.5$。菌液于 4 ℃,1 500 ×g 离心 10 min,菌体依次用 50 ml 预冷的去离子水和 10 ml 预冷的 1 mol/L 山梨醇洗涤得到感受态酵母细胞,将细胞重悬于 1.0 ml 预冷的山梨醇溶液中。*Sac* Ⅰ线性化的 pPIC9K-rmFⅦ及空载体 pPIC9K 各 20 μg 分别与 100 μl 感受态酵母细胞混匀,加入 0.2 cm 电击杯中,冰浴 5 min,Bio-Rad 电转仪转化。电击结束后立即加入 1 ml 预冷的 1 mol/L 的山梨醇溶液,混匀。取 0.5 ml 转化物涂布于 RD 选择性平板上(组成为:13.4 g/L YNB,4×10^{-4} g/L Biotin, 20 g/L Dextrose,20 g/L 琼脂,1 mol/L 山梨醇,0.005% 省却组氨酸的氨基酸),30 ℃培养 2 ~ 4 d ,观察转化子的生长。再将 RD 平板上生长的阳性克隆分别转种至 G418 浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0 g/L 的 YPD 平板上,以在高浓度 YPD-G418 平板上正常生长的菌落为高拷贝整合菌株。

1.2.5 高拷贝整合菌株的 PCR 鉴定 挑取高拷贝整合单菌落的 1/4 ~ 1/2 溶于 20 μl 无菌水中,冰上处理 15 min,然后转入 95 ℃热处理 10 min 使细胞壁裂解[4]。离心取上清作为 DNA 模板,分别用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系和条件同 1.2.1。

2 结果

2.1 mFⅦ基因片段的获得

经 PCR 扩增,获得 1 235 bp 大小的 mFⅦ基因片段,见图 1。



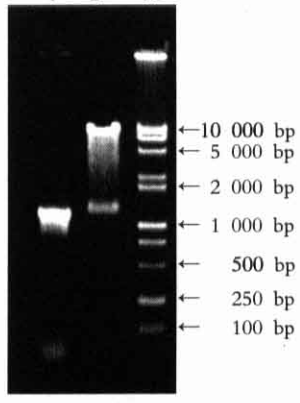
M:DL2000 marker; 1:PCR product

图 1 目的片段 PCR 扩增结果

Fig 1 Results of PCR amplification of mFⅦ

2.2 pPIC9K-mFⅦ的连接转化

DH5α 转化菌培养结果,氨苄青霉素平板上共长出 21 个阳性克隆,随机挑取 1 个克隆摇菌,提取质粒、酶切鉴定证实含有 mFⅦ片段,见图 2。



M:Wide range marker; 1:PCR product; 2:pPIC9K-mFⅦ digested by *Eco*R Ⅰ and *Not* Ⅰ

图 2 pPIC9K-mFⅦ质粒酶切鉴定结果

Fig 2 pPIC9K-mFⅦ by restriction enzyme digestion

2.3 重组质粒 pPIC9K-rmFⅦ的鉴定

提取氨苄青霉素平板上 XL10-Golden 阳性克隆质粒,酶切鉴定正确的克隆送公司测序。测序报告结果显示,与 GenBank 中编号为 AK089402 的 mFⅦ基因报告序列相比,目的片段不含前 41 个氨基酸组成的自身信号肽序列且第 341 位的赖氨酸(AAG) 突变成丙氨酸(GCG),含有与预期目标完全一致的突

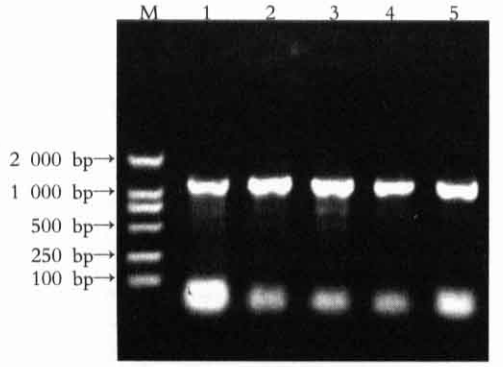
变位点和设计于两端的限制性酶切位点。序列正确的重组质粒命名为 pPIC9K-rmFⅦ。

2.4　GS115 的转化及高拷贝整合菌株的筛选

Sac Ⅰ线性化的 pPIC9K-rmFⅦ质粒转化 GS115 感受态细胞，在 RD 平板上培养 4 d，共得到 31 个 His + 转化菌落，与空载体转化效率没有明显差异。将 pPIC9K-rmFⅦ转化的 His + 菌落和空载体转化菌、GS115 逐个点种至不同浓度的 YPD-G418 平板上，在 0.25 g/L 的平板上所有 His + 菌生长无差异，GS115 生长缓慢；而当 G418 浓度在 0.5、1.0、2.0 g/L 时，GS115 不生长，His + 菌生长速度出现差异；4.0 g/L 的 YPD-G418 平板上无 His + 菌生长。在 2.0 g/L 的 YPD-G418 平板上共得到 5 个生长较迅速的大菌落，估计是高拷贝整合菌株。

2.5　PCR 鉴定高拷贝整合菌株

将在 2.0 g/ L G418 平板上生长的 5 个菌落经冷热处理使细胞壁裂解，以裂解后的上清为模板进行 PCR 鉴定。结果 5 个菌落以 P1 和 P2 引物所进行的 PCR 扩增均为阳性，见图 3，由此证实 rmFⅦ基因已成功整合到毕赤酵母的染色体中。



M：DL2000 marker；1 – 5：Stable multicopy integrants amplified by P1 and P2 primers

图 3　PCR 鉴定目的基因的整合

Fig 3　Identification of stable multicopy integrants by PCR

3　讨论

为了能够大量获得基因重组的小鼠凝血因子Ⅶ，我们选择了毕赤酵母表达系统。毕赤酵母表达系统是近年来被公认的最有效的外源性蛋白表达系统之一，已有多种外源性蛋白质在该宿主系统中获得了成功表达[5,6]。毕赤酵母是一种甲基营养型酵母，在缺乏抑制性碳源如葡萄糖、甘油时，能利用甲醇作为唯一碳源，其甲醇利用的关键基因醇氧化酶基因（AOX1）的表达量可占细胞总 mRNA 的 5%，该酶可占细胞总蛋白的 30 % 以上，AOX1 启动子受甲醇的严格诱导表达，被广泛用于驱动外源蛋白的高效表达[7]。本实验中我们选用的 pPIC9K 分泌型表达载体即采用了 AOX1 高效表达启动子。Swiss-Prot 蛋白质数据库资料显示，mFⅦ由 446 个氨基酸残基组成，前 41 个氨基酸残基为自身信号肽。为避免与酵母 α 分泌信号的相互干扰，我们通过 PCR 方法去掉了 mFⅦ编码自身信号肽的序列，然后将目的基因插入 pPIC9Kα 分泌信号的下游，利用 AOX1 高效启动子使目的基因能在酵母中高效分泌表达。由于毕赤酵母没有天然质粒，目前已开发的表达载体均为整合型载体。表达载体与酵母染色体通过同源重组的方式整合至酵母染色体，从而获得目的基因稳定整合的工程菌株。我们采用 *Sac* Ⅰ单酶切使表达载体线性化，表达框与宿主基因组发生单交换而整合于染色体中。由于 pPIC9K 载体带有新霉素抗性基因，使阳性转化菌产生 G418 抗性，且整合的拷贝数与 G418 抗性之间有一定的计量依赖关系。

由于 TF 在多种肿瘤细胞和肿瘤的血管内皮细胞表面有表达，因此，以 TF 为靶点的治疗药物理论上具有广谱的抗肿瘤作用，rmFⅦ是实现这一目的的理想分子。作为靶向药物载体的 rmFⅦ用于肿瘤治疗具有如下特点：①能相对选择性攻击多种肿瘤血管而不影响正常血管；②不会激活凝血系统，无引发 DIC 之虑；③能同时作用于肿瘤血管与肿瘤细胞，增强肿瘤局部浓度；④不仅对原发肿瘤有治疗作用，对转移瘤同样有效。目前这方面研究才刚起步不久，还很难确切评价其临床应用价值，但初步结果是令人鼓舞的，值得进一步研究[8]。我们设计并获得了 rmFⅦ基因，通过将其插入酵母 α 信号肽下游，成功构建了 rmFⅦ毕赤酵母表达载体，经 G418 抗性筛选获得了高拷贝稳定整合菌株，为 rmFⅦ的大规模表达纯化及其临床前实验研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Maiolo A, Tua A, Grignani G. Hemostasis and cancer: tumor cells induce the expression of tissue factor-like procoagulant activity on endothelial cells[J]. Haematologica, 2002, 87(6): 624 – 628.

[2] Levine M N, Lee A Y, Kakkar A K. From Trousseau to targeted therapy: new insights and innovations in thrombosis and cancer[J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(7): 1456 – 1463.

[3] Hu Z, Garen A. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16): 9221 – 9225.

[4] 蔡传奇，方荣祥. 毕赤酵母基因操作技术的改进及其在水蛭素表达中的应用[J]. 生物工程学报，2001，17(2)：155 – 160.

[5] Sinclair G, Choy F Y. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, Pichia pastoris[J]. Protein Expr Purif, 2002, 26 (1): 96 – 105.

[6] Outchkourov N S, Stiekema W J, Jongsma M A. Optimization of the expression of equistatin in Pichia pastoris[J]. Protein Expr Purif, 2002, 24(1): 18 – 24.

[7] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24 (1): 45 – 66.

[8] Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(21): 12180 – 12185.

（编辑　陈聪连）