

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0099-05

重组小鼠凝血因子VII-pPIC9K 表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达

杨峥嵘¹, 何 飞², 王 蒙¹, 粟永萍¹, 程天民¹(1. 第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038; 2. 第三军医大学新桥医院口腔科, 重庆 400038)

[摘 要] 目的: 构建去除凝血功能, 但保留 TF 亲和力的 rmFVII-pPIC9K 表达载体并用毕赤酵母表达目的蛋白。方法: 通过 RT-PCR 自小鼠肝脏获得 FVIIcDNA, 对其进行定点突变后连入 pPIC9K 质粒, 电击转化 Gs115 酵母细胞, 经 G418 筛选、BMYG/BMMY 小量摇瓶培养表达目的蛋白, 并进行初步的凝血、结合活性鉴定。结果: 成功构建了 3 种 rmFVII-pPIC9K 表达载体 (M1: LCmFVII-pPIC9K; M2: K341AmFVII-pPIC9K; M3: QEAmFVII-pPIC9K), 并通过酵母表达获得相应蛋白, 经初步活性鉴定其中两种符合设计目的。结论: 毕赤酵母表达 rmFVII 蛋白, 为抗肿瘤血管药物的研究、肿瘤的分子靶向性治疗奠定了基础。

[关键词] 凝血因子 VII; 组织因子; 毕赤酵母; 定点突变

[中图分类号] R730.5; R73.3 [文献标识码] A

Construction of Recombinant Mice Factor VII-pPIC9K Vector and Expression in Pichia

YANG Zheng-rong¹, HE Fei², WANG Meng¹, SHU Yong-ping¹, CHENG Tian-ming¹(1. State Key Laboration of Traum, Burning and Combined Injury; Institute of Combined Injury; Collage of Preventive Medicine; Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Stomaology, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the yeast expressive vector of rmFVII, in which mFVII was mutated to inhibit coagulation without affecting the affinity for TF, and express it in Pichia pastoris. **Methods:** The full length cDNA encoding mFVII was amplified from a mouse liver by RT-PCR method, site-direct mutated and restriction enzyme digested as design. Cloning into pPIC9K, electroporation of Gs115, *in vivo* screen of multiple inserts by G418 resistance, BMYG/BMMY are used for induction and expression of rmFVII in pichia pastoris. These proteins were also screened for functional activity. **Results:** Three different rmFVII-pPIC9K yeast expression vectors and it's aim protein were obtained, two kinds of proteins were found to be functional active as design. **Conclusion:** rmFVII protein can be expressed in pichia pastoris and it might facilitate the development of tumor-target molecule, and novel anti-angiogenesis drug study.

[Key words] coagulation factor VII; tissue factor; pichia pastoris; site-directed mutagenesis

外源性凝血级联反应启动因子——组织因子(tissue factor, TF)在多种肿瘤和肿瘤血管内皮细胞表面高表达,而在生理情况下与血液直接接触的组织都不表达,这在生理情况下与血液直接接触的组织都不表达,这使药物选择性攻击肿瘤血管成为可能^[1-3]。经证实 TF 不仅能促进肿瘤血管生长,与肿瘤浸润、转移密切相关,还能导致肿瘤病人血液高凝,引起严重的并发症并影响预后^[4,5]。

作为 TF 的生理性配体,凝血因子 VII(factor VII, F VII)是天然的高亲和力靶向分子,但同时也是凝血反应的重要起始因子,只有破坏其促凝血活性后方能作为

靶向分子用。本实验拟通过 RT-PCR、定点突变、毕赤酵母表达等技术方法,构建载体并表达重组小鼠 F VII 蛋白(recombined mice factor VII, rmF VII),尝试在破坏其凝血功能基础上保留 TF 结合活性,为下一步研究新型抗肿瘤血管药物奠定了基础。

[基金项目] 重庆市院士基金(NO. 6317)

[作者简介] 杨峥嵘(1973-), 男, 湖南武冈人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究

E-mail: fy306@mail. tmmu. com. cn

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株及试剂

DH5 α 菌株, 本室存; QuickchangeTM XL Site-Directed Mutagenesis 试剂盒购自 Strate-gene, 毕赤酵母表达试剂盒购自 Invitrogen, F VII 检测试剂盒购自 Stago, 山羊抗鼠 F VII 多抗购自 Santa Cruz。RT-PCR 试剂盒, 各种 Taq 酶、限制性内切酶等购自 Takara。

1.2 RT-PCR(两步法) 获得 mF VII cDNA 目的片段

Tripure 提取鼠肝总 RNA。自 GenBank 查找 mF VII 序列, Primer-Premier 5.0 设计 RT-PCR 引物序列如下: 上游: 5'-CGGGAATTCGTTCCACAGGCGCATGGGC-3'; 下游: ① 5'-TGGCGGCCGCTCTACAGTAGTGGGAGTCG-GAAAACC-3'; ② 5'-TGGCGGCCGCGCCTTGGCGCGT-GCTGGATTTC-3', 由 Takara 公司合成。设计扩增产物依次为 mF VII cDNA 开放阅读框架全长(1 338 bp) 及 mF VII 轻链 cDNA(576 bp)。逆转录反应条件见试剂盒说明; PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 1 Cycle; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 Cycles; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 1 Cycle。切胶回收目的片段, Not I + EcoR I 双酶切后连入 pPIC9K 质粒, 常规转化、抽提质粒, 测序鉴定。

1.3 定点突变

重组片段设计如图(1) 示, 在含目的片段 pPIC9K 质粒的双链 DNA 上直接进行 PCR 定点突变。引物设计如表 1(带下划线为突变位点): ① 第 10 位赖氨酸(CCC) 突变成谷氨酰胺(CAG)(简称 P10Q); ② 第 32 位赖氨酸(AAG) 突变成谷氨酸(GAG)(简称 K32E); ③ 第 341 位赖氨酸(AAG) 突变成丙氨酸(GCG)(简称 K341A)。操作及 PCR 条件按试剂盒说明进行。其中 M2 采用引物 #3 一次突变, M3 进行全部 3 种突变。

图 1 重组 DNA 片段结构设计示意图

Fig. 1 Scheme of recombined DNA fragment

S: Excrete signal; P: Peptide; AR: Activation region of mF VII; GLA, EGF1, EGF2: Region s of light chain of mF VII; PD: Heavy chain of mF VII

表 1 突变引物设计

Tab. 1 Mutation prime sequence

	Mutation site	Prime sequence
Primer #1	P10Q	Sence: 5'-CTG GAG GAG CTT TGG <u>CAG</u> GGC TCT CTG GAG AGA G- 3' Antisence: 5'-C TCT CTC CAG AGA GCC <u>GTC</u> CCA AAG CTC CTC CAG- 3'
Primer #2	K32E	Sence: 5'-GCC CGG GAG ATC TTC <u>GAG</u> AGC CCT GAG AGG ACC- 3' Antisence: 5'-GGT CCT CTC AGG GCT <u>CTC</u> GAA GAT CTC CCG GGC- 3'
Primer #3	K341A	Sence: 5'-ACC AAG GAC GCC TGC <u>GCG</u> GGT GAC AGC GGT GGC - 3' Antisence: 5'-GCC ACC GCT GTC ACC <u>CGC</u> GCA GGC GTC CTT GGT - 3'

1.4 电穿孔转化

感受态 Gs115 细胞每管 40 μ l, 共 4 管。分别加入 Sac I 线性化的前述 3 种不同表达载体(100 ng) 及正常 mF VII-pPIC9K、pPIC 9K 空载体, 再加入预冷 0.2 cm 间隙电击池, 电击(1.5 KV, 25 μ F, 200 Ω) 后向池中加入 0.5 ml 预冷 1 mol/L 山梨醇。分别吸取适量菌液涂布于山梨醇选择平板(HIS^r) 上, 30 $^{\circ}$ C 孵育 5 ~ 7 d, 至菌落出现。

1.5 酵母表达

挑取电穿孔阳性克隆, 进行 PCR 鉴定、偏嗜性碱基优化及 G418 筛选高拷贝菌株, 小量摇瓶培养(BM-

GY/BMMY + 1% 甲醇, 方法按试剂盒说明)。0 ~ 120 h 于不同时间点取培养上清, 透析、超滤粗提后冻干备用。常规 SDS-PAGE, Western blot 鉴定。

1.6 活性鉴定及数据统计处理

分 rmF VII, mF VII, 空载体培养上清及稀释液等组。促凝活性鉴定: 按 Stago 试剂盒说明, 样品稀释后相继加入乏 F VII 血浆、可溶性 TF(sTF), 在全自动凝血仪上读取 50% 凝集时间; 结合活性鉴定: 样品活化后与等量 sTF 孵育 15 s, S2288 显色, Bradford 法测 F VII-TF 复合物光吸收度($n = 405$ nm)。方法详见文献^[6]。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验统计分析。

2 结果

2.1 mFVIIcDNA 目的片段的获得

GenBank 资料显示, mFVIIcDNA 开放阅读框架全长 1 338 bp(不带起始密码子), 其轻链为 576 bp。RT-PCR 结果如图(2), 凝胶上分别出现了相应特异条带。片段回收后经多次测序与 GenBank 资料(AK089402) 完全一致, 但与编号 NM 010172 资料比较存在第 58 个氨基酸残基 GTA→GGA 的变异(图 4 A)。认为可能与小鼠种属有关。

图 2 RT-PCR 电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

M:DL2000 marker; Lane 1, 2: Open reading frame of mFVIIcDNA, 1 338 bp; Lane 3: Light chain of mFVIIcDNA, 576 bp

图 3 rmFVII-pPIC9K 载体酶切鉴定结果

Fig 3 Identification of rmFVII-pPIC9K by restriction enzyme analysis

M:DL2000 marker; 1: Empty vector; 2: M2; 3: M3; 4: M1

2.2 重组表达载体的构建

质粒 Not I + EcoR I 双酶切鉴定结果如图 3 示, 琼脂糖凝胶上出现了 9.3 kb 片段和预期 1 338 bp, 576 pb 特异性条带。将其连入 pPIC9K 质粒后经定点突变、Amp 抗性筛选获得 3 种重组蛋白质载体: ① LCmFVII-pPIC9K(M1); ② K341AmFVII-pPIC9K(M2); ③ QEAmFVII-pPIC9K(M3)。测序结果显示, 目的片段内含有与设计完全一致的突变位点及酶切位点。突变位点如图 4(B, C, D) 示。

图 4 DNA 测序波形图(局部)

Fig. 4 DNA sequence of rmFVII(part)

A: Variation of 58 amino acid (GTA→GGA); B: P10Q mutation (CCC→CAG);
C: K32E mutation (AAG→GAG); D: K341A mutation (AAG→GCG)

2.3 rmFVII的酵母表达

酵母表达最佳收集时间为 72 h, 培养上清 SDS-PAGE 如图 5 示, 凝胶上分别出现了约 50, 22 KD 特异条带。Western 结果进一步表明(如图 6): M2, M3 表达产物与抗 mFVII 抗体能很好地结合, 为所需目的蛋白。M1 未见目的条带显示。

2.4 初步活性鉴定

活性鉴定结果如表(2), 各样品组与正常 mFVII 比较, 凝集时间明显延长($P < 0.01$), 而与溶剂、空载体组差异不显著, 即使浓缩 30 倍后(约 30 $\mu\text{mol/L}$, 已达 FVII 生理血液浓度的上千倍)凝集时间仍只有少量缩短, 说明 3 种样品的促凝血活性基本已去除; M2, M3 组 A_{405} 与正常 mFVII 比下降不明显, 提示其 TF 结合功能良好; 而 M1 与之差异非常显著($P < 0.01$), 接近阴

性对照,提示其 TF 结合功能已绝大部分丧失。

图5 rmFVII表达上清 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of rmFVII supernatant

M:Marker; Lane 1,2: M2 supernatant; Lane 3,4: M3 supernatant; Lane 5,6: M1 supernatant; Lane 7: pPIC9K vector control; 8: Mut^s control. Samples in Lane 1, 3,5 were 30 fold concentrated. 20 μl per sample

图6 rmFVII表达上清 Western blot 鉴定

Fig. 6 Western blot analysis of rmFVII supernatant

Lane 1: hFVII; Lane 2,3: M2; Lane 4,5: M3; Lane 6: M1; Lane 7: pPIC9K Vector control

表2 rmFVII功能活性鉴定

Tab. 2 Functional analysis of rmFVII

Groups	50% cogulation time(sec)	Absorbance of FVII-TF (n =405 nm)
Control: Solution	85.6 ± 11.2	—
Vector	83.8 ± 7.8	0.008 ± 0.065
mFVII(1 ×)	8.92 ± 3.4	0.793 ± 0.147
Sample: M1 (1 ×)	82.8 ± 10.4**	0.027 ± 0.053**
M1(30 ×)	80.6 ± 9.5**	0.051 ± 0.062**
M2(1 ×)	76.5 ± 6.7**	0.642 ± 0.075
M2(30 ×)	70.7 ± 3.8**	0.746 ± 0.143
M3(1 ×)	71.3 ± 5.2**	0.685 ± 0.081
M3(30 ×)	66.5 ± 9.3**	0.778 ± 0.172*

* Sample groups vs normal mFVII group, P < 0.05;

** : P < 0.01

3 讨论

众所周知,目前抗肿瘤血管药物通常对正常血管与肿瘤血管并无选择性,还往往只对新生血管有效,对已生成肿瘤血管无作用,实际临床效果并不理想^[7]。近年来关于 TF 的研究进展为上述问题提供了新的解决思路。如前所述,TF 在肿瘤血管内皮细胞表面特异性高表达,同时还在肿瘤发生、发展中占据重要地位,与病人预后密切相关。寻找 TF 高亲和力分子,形成一种新型选择性抗肿瘤血管药物,与传统疗法结合进行综合治疗,将有助于大幅提升疗效,减少费用,并降低肿瘤转移、复发率^[8-10]。其中,FVII作为 TF 的生理性配体,与 TF 的结合活性接近理想,如能去除促凝血功能,同时保留 TF 结合功能,减小分子量,将是极佳的候选靶向分子。

本实验以小鼠 FVII为研究对象,拟通过定点突变、酵母表达等方法获得候选 TF 靶向蛋白。在突变位置的选择上,已知 mFVII重链与凝血功能密切相关,轻链为主要 TF 结合部位。目前国内外对 mFVII突变研究极少,而报道的人 FVII临床基因突变型高达 200 余种,其中 Dickinson 等^[11]发现重链 K341A 突变可使 FVII凝血活性大部分丧失,同时对 TF 亲和力影响较小;Shah 等^[6,12]报道轻链 P10Q、K32E 突变可通过增加 FVII对细胞膜的亲和力,达到结合速度加快 100 倍左右的效果。考虑到鼠与人 FVII高度同源,上述位点又均位于进化保守区,这些效果有望在 mFVII上重现。

基于以上报道与思索,我们初步选定并构建了 3 种 rmFVII-pPIC9K 载体,分别含有 K341A mFVII, QEA-mFVII及编码 mFVII轻链的序列,前二者转染表达产物经 SDS-PAGE,Western blot 证实为目的蛋白。实验中 M1 产物大小与预期(20 kD)亦较为一致,Western 未见条带显示,分析与 mFVII和一抗结合部位可能与位于重链有关。

活性鉴定结果表明:3 种蛋白凝血功能均基本丧失,且 M2,M3 重组蛋白的 TF 结合功能保留较好,证实了前述实验设计中关于人 FVII突变效果重现于 mFVII的推断,是一类较好的 TF 靶向分子。单纯 mFVII轻链(M1)结合效果不佳,提示重链虽非 TF 结合主要部位,但也是不可或缺的重要组成部分。要寻找更小分子量的 TF 高亲和力分子,还需进一步探索。

本研究结果为促进新型肿瘤靶向分子的研制打下了基础,并有望为研究新的抗凝及抗肿瘤血管治疗手段提供实验依据。

[参考文献]

[1] Contrino JS, Hair G, Kreutzer DL, et al. In situ detection of tissue

- factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease[J]. *Nat Med*, 1996, 2(2): 209-215.
- [2] Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, *et al.* Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma[J]. *Cancer*, 1996, 77(9): 1877-1883.
- [3] Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: Correlation between tissue factor and angiogenesis[J]. *Int J Cancer*, 1998, 79(1): 19-22.
- [4] Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Tissue factor is a bi-functional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer[J]. *Int J Hematol*, 2001, 73(2): 145-150.
- [5] Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Tissue factor signal transduction in angiogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(6): 1009-1013.
- [6] Nelsestuen GL, Stone M, Martinez MB, *et al.* Elevated function of blood clotting factor VIIa mutants that have enhanced affinity for membranes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 39825-39831.
- [7] Jain RK, Carmeliet PF. Vessels of death or life[J]. *Sci Am*, 2001, 285(6): 38-45.
- [8] 齐协飞. 抗肿瘤血管生成的新策略—组织因子靶向免疫治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(2): 150-152.
- [9] Ran S, Cao B, Dutty S, *et al.* Infarction of solid Hodekin's tumor in mice by antibody directed targeting of tissue factor to tumor vasculature[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(20): 4646-4653.
- [10] 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.
- [11] Dickinson CD, Kelly C, Ruf W, *et al.* Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(25): 14379-14394.
- [12] Shah AM, Kisiel W, Donald C, *et al.* Manipulation of the membrane binding site of vitamin K-dependent proteins: Enhanced biological function of human factor VII[J]. *Biochemistry*, 1998, 95(8): 4229-4234.
- [收稿日期] 2005-03-03 [修回日期] 2005-04-19
[本文编辑] 韩丹

第九届全国肿瘤生物治疗学术会议征稿启事

肿瘤的生物治疗是肿瘤治疗研究的热点,为了更广泛深入地交流该领域的研究进展和临床应用经验,讨论存在的问题和展望未来的发展趋势,由中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会和中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会联合主办的第九届全国肿瘤生物治疗学术会议于2006年6月在山东省青岛市举行。诚邀国内外专家与同行踊跃投稿、参加会议交流。会议期间将邀请著名专家报告肿瘤防治新进展。

一、征文主题:

1. 肿瘤生物治疗的新理论与新策略; 2. 肿瘤免疫与生物治疗和诊断的新技术; 3. 肿瘤免疫机制研究; 4. 细胞治疗; 5. 细胞因子治疗; 6. 抗体治疗; 7. 肿瘤疫苗; 8. 基因治疗; 9. 中药及免疫调节剂的应用等; 10. 与常规治疗相结合而组成的新疗法

二、征文要求

凡未在国内外公开刊物发表过的研究成果,请撰写为800~1000字的中文摘要,并加盖公章(请附软盘或发E-mail)。所接受的论文摘要将录入会议论文集。

三、截稿日期

2006年3月15日

四、征文请寄:上海市杨浦区翔殷路800号第二军医大学《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部,来稿请在信封左下角注明“会议投稿”。

邮政编码: 200433

联系人: 韩丹

电话: 021-55620605 × 22

传真: 021-65382502

E-mail: hd@biother.org