

人可溶性血管内皮细胞生长因子受体 Flt-1 基因在链霉菌中的克隆表达*

姜自彬 李 元**

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 应用 RT-PCR 技术,从人脐静脉内皮细胞中扩增出编码人可溶性血管内皮细胞生长因子(VEGF)受体 Flt-1 胞外区前四个结构域的基因片段,亚克隆至 pUC18 质粒进行测序,将目的基因片段连接至链霉菌表达载体 pSGLgpp,获得重组质粒 pSGLgpp-F,将其转化至 *Streptomyces lividans* TK24,获得基因工程菌株 *Streptomyces lividans* (pSGLgpp-F),对其培养上清液进行 SDS-PAGE 及 Western blot 分析,结果显示,在 63.6kD 处有特异性条带出现,表明 sFLT-1 在链霉菌中获得了成功表达,受体配基结合实验显示表达产物与 VEGF 可特异性结合,表明其具有配基结合生物活性。

关键词 可溶性 VEGF 受体, Flt-1, 链霉菌, 基因表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)04-0411-07

血管内皮细胞生长因子受体(Vascular endothelium growth factor receptor, VEGFR)属于酪氨酸蛋白激酶受体家族第三亚型,主要在内皮细胞上表达,可介导血管内皮细胞生长因子(VEGF)的生物效应,促使血管内皮细胞分裂增殖,形成新的血管。血管生成在胚胎发育及伤口愈合等生理过程中起重要的作用,成人后,血管生成基本停止。但在某些病理条件下,血管生成又变得异常活跃和重要,例如,肿瘤生长达到 2mm³ 时,要继续生长,就必须有血管生成,因此,抑制血管生成对控制肿瘤等与血管生成有关的疾病具有重要意义,通过抑制 VEGFR 和 VEGF 的结合作用可阻断血管生成,达到控制疾病的目的。

VEGFR 主要分为两种类型:受体 1 即 fms 样酪氨酸激酶(fms-like tyrosine kinase, Flt-1),受体 2 即激酶插入结构域受体(kinase insert domain-containing receptor, KDR)。Flt-1 基因全长 7608bp,编码区域为 4014bp,编码 1338 个氨基酸,蛋白分子量约 180kD,分为胞外区、跨膜区和胞内区三部分,其中胞外区由 N 端信号肽和 7 个免疫球蛋白样环状结构(Ig-like loop)组成,跨膜区由 22 个碱性氨基酸组成,胞内区由激酶功能区、酪氨酸激酶插入区及 C 末端组成^[1]。Flt-1 调节内皮细胞之间和内皮细胞与细胞间质之间的作用,可促进细胞的迁移和血管成形^[2]。由于 Flt-1 在血管生成中的重要作用,使其在医药应用方面具有极大的开发价值。

链霉菌为丝状革兰氏阳性菌,属原核表达系统,它具有多种信号肽,可直接介导蛋白质分泌至胞外。本文报道从人脐静脉内皮细胞中克隆得到编码 Flt-1 胞外区的前四个结

* 国家自然科学基金资助项目(30070023)

** 联系人: 李 元,北京天坛西里 1 号,邮编: 100050, Tel (010) 63153320

作者简介: 姜自彬(1969-)男,山东临沭县人,博士,主要从事基因工程药物的研究。

收稿日期: 2001-10-29, 修回日期: 2001-11-28

构域 (sFlt-1) 的基因, 在变铅青链霉菌 *S. lividans* TK24 中获得分泌表达。并分别采用两种链霉菌分泌信号肽 gpp 和 vsi, 以研究不同信号肽对 Flt-1 在 *S. lividans* 中的分泌表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株 *E. coli* TG-1 ; *S. lividans* TK24。

质粒 pUC18, 用于测序 ; pSGLgpp, 链霉菌—大肠杆菌穿梭质粒, 含 pUC18 及 *S. globisporus* 分泌信号肽 gpp 的最小复制区, 为本室自行构建 ; pUWL219 链霉菌—大肠杆菌穿梭质粒 ; pBSC, 含 *S. venezuelae* 分泌信号肽 vsi 全序列及其调控序列。

以上菌株及质粒均为本室保存。

1.1.2 培养基 : LB 培养基用于大肠杆菌的培养和保存 ; D 培养基和 S 培养基用于链霉菌原生质体的制备 ; R₂ 培养基用于链霉菌的培养及转化子的筛选 ; YEME 培养基和 CM 培养基用于重组菌株的培养。LB 培养基按文献 [3] 配制, 其它均按文献 [4] 配制。

1.1.3 工具酶和试剂 : 总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA 回收试剂盒分别购自 BioDev—Tech 公司、Promega 公司、QIAGEN 公司 ; 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶分别购自 Promega 公司和 Sangon 公司 ; 小鼠抗人 Flt-1 单克隆抗体购自 R&D System 公司, 小鼠抗人 VEGF 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 Ig G 抗体购自北京中山生物技术有限公司, rhVEGF₁₆₅ 由中国科学院微生物研究所闫锡蕴教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 : 采用 BioDev-Tech 公司的总 RNA 提取试剂盒, 取新鲜人脐带组织, 用无菌的 PBS 溶液洗净后, 将脐静脉剥离后, 加入适量的 TRIZOL 溶液, 在冰浴下研磨, 然后依说明书提取总 RNA。

1.2.2 目的基因片段的扩增 : 根据已知基因序列^[5]设计引物。上游引物 P1 : 5'-GCG-GAATTCTCCTGAACTGAGTTTAAAAGGC—3', 引入 *Eco*R I 限制酶切位点 ; 下游引物 P2 : 5'-CAAAGCTTTCCTGAACTGAGTTTAAAAGGC—3', 引入终止密码子 TGA 及 *Hind* III 限制酶切位点。以提取的总 RNA 为模板, 45℃ 逆转录 30 min, 然后采用下列反应条件 : 首先 94℃ 预变性 5min, 然后按 94℃ 2min, 66℃ 1min, 72℃ 1min, 进行共 35 个循环, 再 72℃ 延伸 10min。得到扩增编码 Flt-1 胞外区前 4 个结构域的核苷酸片段。回收 Flt-1 基因片段, 并以此为模板按上述 PCR 条件进行扩增, 扩增产物行琼脂糖制备凝胶电泳, 用 DNA 回收试剂盒回收。

1.2.3 pUC-F 质粒的构建及测序 : Flt-1 基因片段及 pUC18 分别经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后, 用 T4DNA 连接酶连接, 得到重组质粒 pUC-F, 对其进行 DNA 测序。

1.2.4 重组质粒构建 : 将 pUC-F 用 *Eco*R I、*Hind* III 进行双酶切, 回收 Flt-1 片段, 质粒 pSGLgpp 经同样双酶切后, 回收 5.6 kb 的片段, 并与回收的 Flt-1 片段连接, 按文献 [4] 方法转化 *S. lividans* TK24, 提取重组子质粒, 进行酶切鉴定 ; 将 Flt-1 片段连接于 pBSC 质粒, 构建重组质粒 pBSC-F, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 获得 vsi-Flt-1 片段, 将其与经同样双酶切的质粒 pUWL219 连接, 按文献 [3] 操作转化大肠杆菌 TG-1, 获得重组质粒 pUWL219-F。

vsi-F 将其转化于 *S. lividans* TK24 中。

1.2.5 SDS-PAGE 将重组转化子接种于 5 mL YEME 培养基中, 28℃ 培养 24 h 后, 转种于 50 mL CM 培养基中, 28℃ 培养 72 h, 取上清按文献 [3] 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 Western blot 取上述培养上清, 按文献 [3] 进行 Western blot 分析。

1.2.7 蛋白印迹受体配基结合实验 样品不经煮沸, 并采用不含二硫苏糖醇的上样缓冲液, 按文献 [3] 进行 SDS-PAGE 和蛋白印迹转移, 转移完毕, 取下硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液 4℃ 封闭过夜。封闭后的纤维素膜经 TBS 漂洗后, 按 0.1 mL/cm² 加入含 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液和 10 μ L VEGF₁₆₅ 溶液 (1 mg/mL), 封袋后室温缓振 3 h, 用 TBS 漂洗纤维素膜三次, 每次 5 min。余下操作按文献 [4] 进行。

2 结果

2.1 重组质粒的构建和鉴定

2.1.1 Flt-1 基因的测序 获得的 Flt-1 基因片段, 插入 pUC18 质粒, 得到重组质粒 pUC-F, 与文献 [5] 比较, 测序结果显示, Flt-1 基因片段在 850bp 和 1168bp 处均发生了 A→G 突变, 但突变位于受体非结合区, 不影响 sFlt-1 的生物活性。

2.1.2 重组质粒 pSGLgpp-F 的构建和鉴定 重组质粒 pSGLgpp-F 的构建如图 1。图 2 显示, 样品 2 pSGLgpp-F 经 *Eco*R I 和 *Hind*III 双酶切后, 得到 1.2 kb 的片段, 与 Flt-1 基因片段大小一致, 表明 Flt-1 基因插入了 pSGLgpp 质粒, 以 pSGLgpp-F 为模板进行 PCR 得到 1.2kb 的片段, 也进一步证明 Flt-1 基因插入了 pSGLgpp 质粒。

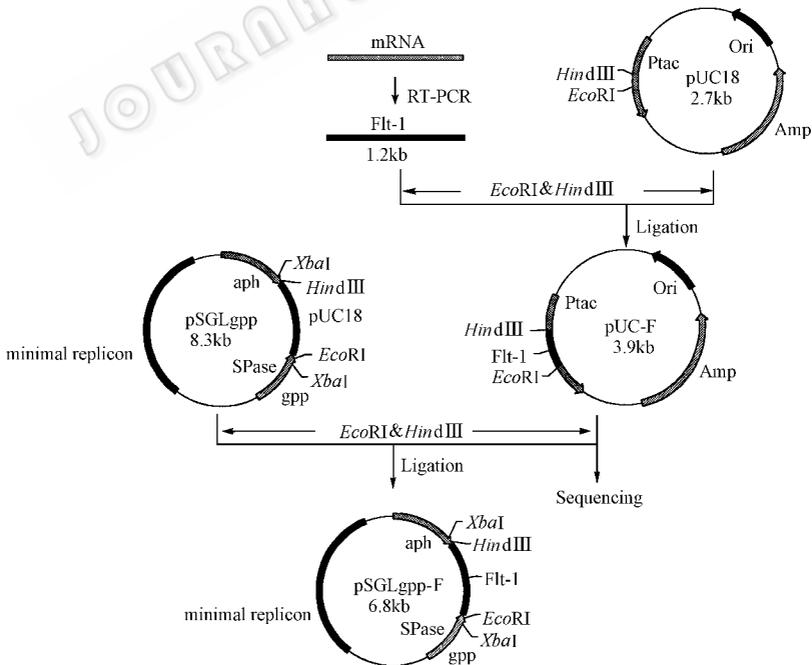


图 1 重组质粒 pSGLgpp-F 构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the recombinant plasmid pSGLgpp-F

2.1.3 重组质粒 pUWL219-vsi-F 的构建和鉴定 重组质粒 pUWL219-vsi-F 的构建如图 3 所示。先将 Flt-1 基因片段连接至 pBSC 质粒, 获得 pBSC-F, 如图 4 所示。

样品 3pBSC-F 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 获得 1.8kb 的片段 vsi-F, 为 vsi 序列 (0.6kb) 和目的基因片段 (1.2 kb) 大小之和, 表明目的基因片段插入了 pBSC-F; 图 5 显示 样品 2 pUWL219-vsi-F 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 得到相应 1.8kb 的片段 vsi-F, 表明 vsi-F 片段插入了 pUWL219 质粒。

2.2 重组蛋白的表达

2.2.1 SDS-PAGE : *S. lividans* 的培养上清经 SDS-PAGE 分析 (如图 6)。其显示与对照 *S. lividans*(pSGLgpp) 相比, *S. lividans*(pSGLgpp-F) 表达产物在 63.6kD 处有明显条带, 与文献报道一致。而 *S. lividans*(pUWL219-vsi-F) 表达产物与其对照 *S. lividans*(pUWL219) 相比, 没有明显差别, 表明 Flt-1 在 *S. lividans*(pSGLgpp-F) 中获得了分泌表达, 而在 *S. lividans*(pUWL219-vsi-F) 中不能检测到表达。

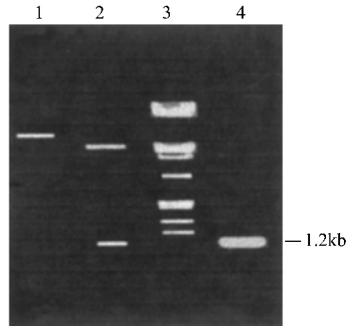


图 2 重组质粒 pSGLgpp-F 酶切鉴定
Fig.2 pSGLgpp-F digested by *Eco*R I/*Hind* III
1. pSGLgpp-F/*Eco*R I ; 2. pSGLgpp-F/*Eco*R I & *Hind* III ; 3. Standard molecular markers(λ DNA/*Eco*R I & *Hind* III); 4. PCR product of pSGLgpp-F.

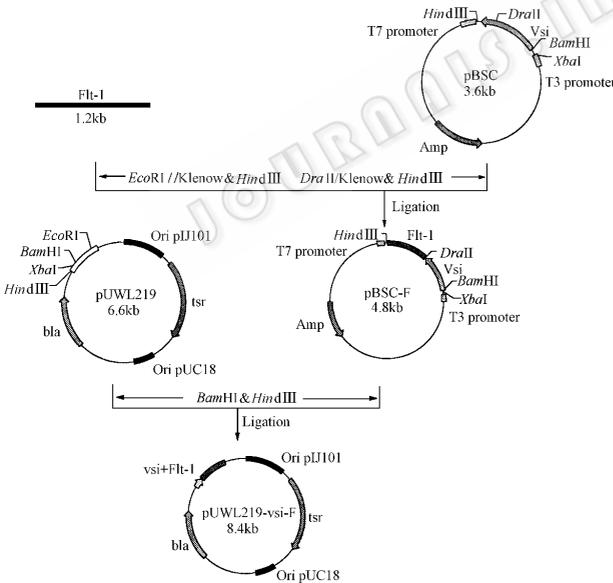


图 3 重组质粒 pUWL219-vsi-F 构建示意图

Fig.3 Schematic diagram of the recombinant plasmid pUWL219-vsi-F

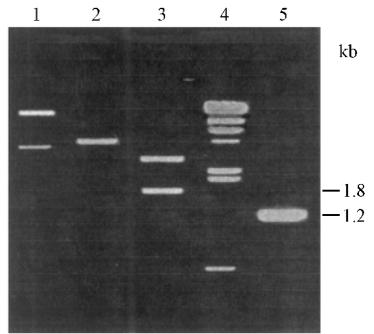


图 4 重组质粒 pBSC-F 酶切鉴定
Fig.4 pBSC-F digested by *Bam*H I & *Hind* III
1. pBSC-F ; 2. pBSC-F/*Bam*H I ; 3. pBSC-F/*Bam*H I & *Hind* III ; 4. Standard molecular markers (λ DNA/*hind* III); 5. PCR product of pBSC-F.

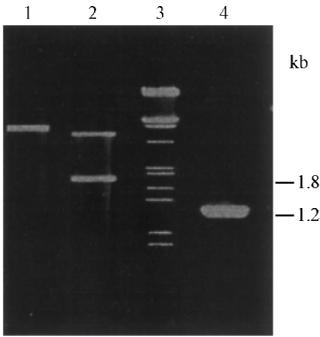


图 5 重组质粒 pUWL219-vsi-F 酶切鉴定

Fig.5 pUWL219-vsi-F digested by *Bam*HI/*Hind*III digestion
1. pUWL219-vsi-F/*Hind* III ;2. pUWL219-vsi-F/*Bam*HI & *Hind* III ;3. Standard molecular markers (λ DNA/*Eco*RI & *Hind*III)4. PCR product of pUWL219-vsi-F.

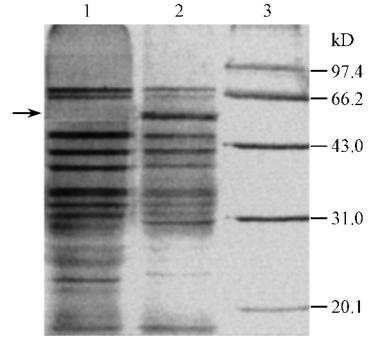


图 6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE assay of the expression production
1. Supernatant of *S. lividans*(pSGLgpp) 2. Supernatant of *S. lividans*(pSGLgpp-F) ;3. Molecular weight standard of protein.

2.2.2 Western blot 对 *S. lividans* (pSGLgpp-F) 的培养上清进行 Western blot 分析 结果显示在 63.6kD 处出现特异性杂交条带 ,因此确认表达产物为 Flt-1 ,表明 Flt-1 基因在 *S. lividans*(pSGLgpp-F) 中获得了分泌表达(图 7)。

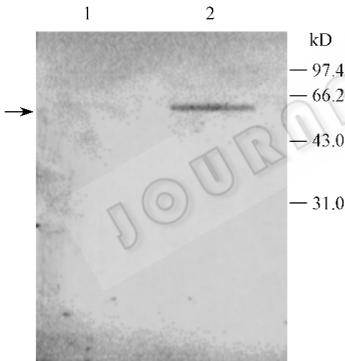


图 7 Flt-1 蛋白的 Western blot 分析

Fig.7 Western blot assay of the Protein Flt-1

1. Supernatant of *S. lividans*(pSGLgpp) 2. Supernatant of *S. lividans*(pSGLgpp-F).

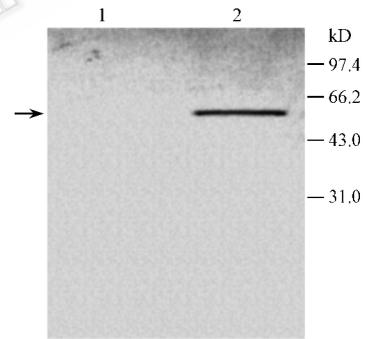


图 8 sFlt-1 的受体配基结合分析

Fig.8 Binding assay of receptor-ligand for sFlt-1

1. Supernatant of *S. lividans*(pSGLgpp) 2. Supernatant of *S. lividans*(pSGLgpp-F).

2.2.3 蛋白印迹受体配基结合实验 :*S. lividans*(pSGLgpp-F) 的表达上清经非还原 SDS-PAGE 后 ,进行蛋白印迹配基结合实验 结果显示在 63.6kD 处出现特异性杂交条带 ,表明表达产物 sFlt-1 具有与配基 VEGF₁₆₅ 结合的生物学活性(图 8)。

3 讨论

本文采用两种不同的分泌信号肽 gpp 和 vsi 研究 Flt-1 基因在链霉菌 *S. lividans* 中的分泌表达 经 SDS-PAGE 和 western blot 分析 结果显示在信号肽 gpp 的引导下 ,Flt-1 在 *S.*

lividans 中获得成功分泌表达,受体-配基结合实验显示,表达的 Flt-1 具有和配基 VEGF 结合的生物学活性;而在信号肽 *vsi* 的控制下,未获成功表达。关于 VEGF 受体 Flt-1 在 *S. lividans* 的成功分泌表达,为国内外首次报道。

链霉菌是近十几年发展起来的原核表达系统,具有多种信号肽,能介导外源蛋白分泌表达,与其它原核表达系统相比,它不会象大肠杆菌那样形成包涵体,使蛋白处理工艺复杂化,也不会象枯草杆菌和霉菌那样分泌大量的胞外蛋白酶,使外源蛋白发生降解,因此已利用链霉菌为表达宿主实现了多种不同来源的异源基因的表达^[6-8],外源蛋白的分泌表达能力与蛋白的类型、启动子的强弱、信号肽的选择有关。*gpp* 为 *S. globisporus* 产生的新型抗生素 C1027 辅基蛋白分泌信号肽,本室张华博士首次将其编码序列引入链霉菌质粒 *pSGLN*,构建了链霉菌-大肠杆菌穿梭质粒 *pSGLgpp*,并以其为载体在链霉菌中成功表达了 IL-1R,王朝健博士也利用该载体成功表达了毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4。*vsi* 为 *S. venezuelae* 中获得的分泌信号肽,Anne'等利用 *vsi* 表达 *mTNF*,表达量可达 300mg/L,而在表达 IL-10 时,表达量却很低^[9]。本文利用 *gpp* 和 *vsi* 两种信号肽,研究 Flt-1 基因在 *S. lividans* 的分泌表达,结果表明信号肽 *gpp* 可以引导 Flt-1 在 *S. lividans* 中进行分泌表达,而信号肽 *vsi* 不能引导 Flt-1 的分泌表达,说明不同的信号肽对同一基因的表达作用不同。

序列测定发现,扩增的 Flt-1 基因在 850bp 和 1168bp 处均发生了 A→G 突变,相应地发生的氨基酸突变为 Ser→Gly、Thr→Ala,它们分别位于第三、第四 loop 中。而 Flt-1 的抗体结合域在第一个 loop 中^[10],配基结合决定簇在第二个 loop 内,第一和第三 loop 可影响与 VEGF 结合的空间构型,促进 Flt-1 与 VEGF 的结合,用不与 VEGF 结合的 Flt-4 的第一和第三个 loop 分别替代 Flt-1 的 loop1、3,发现对 Flt-1 的配基亲和力没有显著影响,而 Flt-1 和 Flt-1loop1、3 之间的同源性只有 25%、32%^[11],另外通过丙氨酸突变分析发现,谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺对 VEGF 与 Flt-1 的结合是至关重要的^[12],所以发生的两个氨基酸突变对表达的 sFlt-1 的生物学活性没有影响。Western blot 分析和蛋白印迹配基结合实验也证实了这一点。

由于没有 VEGFR 标准品,所以暂不能确定 sFlt-1 在链霉菌中的表达量,在下一步的研究中,我们将进一步改进培养条件,提高 sFlt-1 的表达量。

sFlt-1 可作为一种受体拮抗剂,与天然 VEGFR 竞争性结合 VEGF,从而降低 VEGF 的生物活性,导致血管生成受抑^[13]。进一步研究表明,sFlt-1 与 VEGF 的结合不依赖于其它因素,而 sKDR 与 VEGF 的结合需要肝素的存在,且 sKDR 不能成为 VEGF 的受体拮抗剂^[14],因此,表达的 sFlt-1 经进一步分离纯化后,可直接用于抑制与血管生成有关的疾病的研究,同时,还可利用重组 sFlt-1 建立 VEGF 拮抗剂筛选模型,从组合化学库等天然来源的化合物中进行高通量、大规模药物筛选。

致谢 北大妇产儿童医院姜玉武博士、彭超博士在实验中给予极大帮助,在此致以诚挚谢意!

参 考 文 献

- [2] Seetharam L ,Gotoh N ,Maru Y ,et al . *Oncogene* ,1995 ,**10** :135 ~ 147 .
- [3] J 萨姆布鲁克 ,E F 弗里奇 ,T 曼尼阿蒂斯(金冬雁等译) . 分子克隆实验指南 . 第二版 . 北京 :科学出版社 ,1999 .
- [4] Kieser T ,Bibb M J ,Buttner M T ,et al . *Practical Streptomyces Genetics* . Norwich ,UK :The John Innes Foundation ,2000 .
- [5] Yu Y ,Whitney R G ,Sato J D . Genebank ,NCBI ,1998 ,Accession :AF063657 .
- [6] Murooka Y ,Imanaka T ,*Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications* . New York :Maecel Dekker Inc ,1994 . 81 ~ 104 .
- [7] Gilbert M ,Morosoli K ,Shareck F ,et al . *Crie Rev Biotech* ,1995 ,**15** :13 ~ 39 .
- [8] Binnie C ,Cossar J D ,Stewart D I . *Trends Biotech* ,1997 ,**15** :315 ~ 320 .
- [9] Lammertyn E ,Anne' J . *FEMS Microbiol Lett* ,1998 ,**160** :1 ~ 10 .
- [10] Barleon B ,Totzke F ,Herzog C ,et al . *J Bio Chem* ,1997 ,**272**(16) :10382 ~ 10388 .
- [11] Terri D S ,Helen C ,Jeanie P ,et al . *EMBO J* ,**15**(18) :4919 ~ 4927 .
- [12] Neufeld G ,Cohen T ,Gengrinovitch S ,et al . *FASEB* ,1999 ,**13**(1) :9 ~ 22 .
- [13] Richard L ,Kendall R L ,Kenneth A T ,et al . *Natl Acad Sci USA* ,1993 ,**90** :10705 ~ 10709 .
- [14] Roeckl W ,Hecht D ,Sztajer H ,et al . *Exp Cell Res* ,1998 ,**241** :161 ~ 170 .

Cloning and Expression of VEGF Receptor Flt-1 Gene in *S. lividans* TK24*

Jiang Zibin Li Yuan**

(Institute of Medicinal Biotechnology ,Peking Union Medical College ,Chinese Academy of Medical Science ,Beijing 100050 ,China)

Abstract : Using RNA extracted from human umbilical vein endothelium cell as a template ,the gene VEGF receptor Flt-1 was amplified by RT-PCR . Recombinant plasmid pSGLgpp-F was constructed and was transformed into *S. lividans* TK24 . With the detection of SDS-PAGE and Western blot ,a specific band being same to the reports near 63.6kd was found . The results showed sFlt-1 was successfully expressed in *S. lividans* . The result of the binding assay of receptor-ligand for sFlt-1 showed sFlt-1 has the biological activity of binding with its ligand VEGF .

Key words : Soluble VEGF receptor , Flt-1 , *S. lividans* , Gene expression

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (30070023) ** Author for corresponse

《微生物学报》第八届编辑委员会

(排名顺序不分先后)

主 编 李季伦

副主编 谭华荣 陆德如 王敖全 徐建国 曲音波

编 委 田 波 翟中和 范云六 陈永青 朱宝泉 诸葛健

杨苏声 钱世钧 陆承平 黄 力 唐 宏 东秀珠

谢 红 蔡永峰 郑天凌 郭 俊 胡福全 胡远扬

邵一鸣 王 平 闵 航 程 池 盛 军