

人组织因子在毕赤酵母中的表达和纯化

王羽雄 于敏[△] 顾银良 宋后燕

(复旦大学上海医学院分子医学教育部重点实验室 上海 200032)

【摘要】 目的 制备具有凝血活性的重组人组织因子(recombinant tissue factor, r-TF)用于构建 PT 试剂盒。方法 将人组织因子胞外区编码基因与酵母表达载体重组,构建酵母表达质粒 pPIC9K-TF,利用电穿孔法转化宿主菌 *Pichia pastoris* GS115,转化子经 G418 抗性筛选后,获得高表达克隆。工程菌在摇瓶中经甲醇诱导,表达 r-TF,表达产物经纯化后,鉴定生物活性。结果 SDS-PAGE 证实表达产物的分子量为 37 000~45 000, Western blot 证明其为人组织因子衍生物,纯化后,r-TF 经脂化后,具有促凝血活性,为研制凝血活酶时间测定试剂盒及研究 TF 的构效关系创造条件。结论 用毕赤酵母高效表达具有活性的 rTF,表达量达到 182 mg/L。纯化工艺简便易行,蛋白回收率高,纯化后的 rTF 可用于组装 PT 测定试剂盒。

【关键词】 组织因子; 外源性凝血; 毕赤酵母; 凝血酶原时间

【中图分类号】 Q 784 **【文献标志码】** A

Expression and purification of the recombinant human tissue factor in *Pichia pastoris*

WANG Yu-xiong, YU Min[△], GU Yin-liang, SONG Hou-yan

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education-Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To obtain recombinant human extracellular tissue factor (r-TF) which can be used to set up PT kit. **Methods** Expression plasmid, pPIC9K-TF, was constructed by inserting the sequence encoding human extracellular tissue factor into yeast expression vector pPIC9K and transformed into *Pichia pastoris* GS115 with electroporation. Having been selected by G418, transformants containing TF cDNA were induced by methanol for the expression of rTF, purified and analyzed activity. **Results** SDS-PAGE showed that the molecular weight of the expression product was about 37 000 - 45 000. Western-blotting indicated that it was human extracellular tissue factor. After phospholipids treatment, purified rTF was able to initiate blood coagulation.

Conclusions rTF gene is expressed in *Pichia pastoris* and the active products are secreted into the medium with concentration up to 182 mg/L. The recombinant protein is purified with a simple process and high rate of protein recovery, the purified protein can be used in PT test.

【Key words】 tissue factor; blood coagulation; *Pichia pastoris*; prothrombin time

组织因子^[1](tissue factor, TF),又称组织凝血致活酶,是一个分子量为 47 000 的单链跨膜糖蛋白。它既是凝血因子 FⅦ在细胞表面的受体,又是 FⅦ或激活的 FⅦ因子(FⅦa)的催化协同因子。TF 与 FⅦ(FⅦa)形成二元复合物,能激活凝血因子 FⅩ和凝血因子 FⅨ,同时启动内、外两条凝血途径。

人组织因子由 263 个氨基酸组成,分子中含 3 个结构域,1~219 残基为胞外区,220~242 残基为

疏水跨膜区,243~263 残基为胞内区^[2]。其中可溶性胞外区能与因子 FⅦa 高亲和结合,并能作为因子 FⅦa 的辅助因子增强 FⅩ因子的活性。

人全长组织因子或组织因子胞外区基因已分别用 CHO 细胞、大肠埃希菌、酿酒酵母等进行表达,并具有一定的生物活性^[3-5]。我们选用 *Pichia pastoris* 毕赤酵母表达系统高效表达组织因子胞外区蛋白(r-TF),并成功实现了 GS115-rTF 的可溶性

[△]Corresponding author E-mail: minyu@shmu.edu.cn

分泌型表达,并用离子交换和分子筛层析提纯了 rTF, rTF 经磷脂酰化后具有生物活性,可望用于理论研究和临床检验。目前临床检验凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 测定用兔脑粉作为组织因子,因兔脑粉成分复杂,质量不易控制。用重组组织因子,则会稳定、可靠和廉价,各批次测定数据可比性亦会更强。

材料和方法

材料

细胞、菌株与质粒 *E. coli* DH5 α 和质粒 pUC19-TF 为本室保存。质粒 pPIC9K, *Pichia pastoris* GS115 购自 Invitrogen 公司。

工具酶与抗体 DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I 均购自上海生工生物技术有限公司。鼠抗人 TF 单克隆抗体由本室制备。

其他试剂 G418 购自上海申能博彩生物技术有限公司,各种培养基 (LB、YPD、MM、MD、BMGY、BMMY) 均按 Invitrogen 公司推荐的方法配制。凝血酶原测定试剂盒购自上海华山医院。

方法

引物设计与合成 根据 Genebank 设计人组织因子胞外区引物,上游引物,含 *EcoR* I 酶切位点 5' GGA GAA TTC TCA GGC ACT ACA AAT ACT GTG 3'; 下游引物,含 *Not* I 酶切位点 5' GGA GCG GCC GCT TAT CTA AAT TCC CCT TTC TC 3'; 由上海生工生物技术有限公司合成。

表达载体构建及鉴定 以 pUC-TF 为模板,取上、下游引物各 25 pmol 引进作 PCR,反应条件为 95 °C 变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 25 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。pPIC9K 和 PCR 产物均用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切后,回收 pPIC9K 大片段和 PCR 产物,用 T4 连接酶连接,连接产物转化 DH5 α 感受态,提取阳性转化子的重组质粒,大量制备质粒 DNA 后,进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶解后鉴定及重组质粒送上海生工生物公司测序。

转染毕赤酵母菌 约 10 μ g 的 pPIC9K-rTF 质粒 DNA 用 *Sal* I 酶解线性化,然后以用电穿孔法导入毕赤酵母感受态细胞并涂布在缺组氨酸的 MD 板。用 G418 以 0.25、0.5、1、2、4 mg/mL 的浓度筛选高拷贝转化子,命名为 YPD-GS115-rTF。

摇瓶诱导表达及鉴定 从含 4 mg/mL G418 的平板上挑取单菌落,在 50 mL BMGY 培养基中以

30 °C、300 r/min 培养至 $D_{600} = 2 \sim 6$, 5 000 g 离心 5 min 后,弃上清,菌体以 BMY 培养基重悬,在 30 °C、300 r/min 条件下培养,每 24 h 补加甲醇至终浓度 0.5%,并取样离心收集上清。

蛋白电泳和 Western blot 分析 对样品进行还原性 SDS-PAGE,采用 12% 的分离胶,5% 积层胶,电泳结束后进行考马斯亮蓝染色。12% SDS-PAGE 电泳结束后,利用湿转法将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶为封闭试剂,鼠抗人 TF 单抗为一抗,HRP 标记的兔抗鼠多抗为二抗,检测表达产物的抗原性。

rTF 的纯化 诱导表达 3 d 的 YPD-GS115-rTF,于 4 °C、6 000 g 离心 5 min,上清加入 80% 硫酸铵沉淀后,经 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 8.0) 透析过夜,离心留上清。

Q-Sepharose 柱 (50 mm \times 100 mm) 用 0.02 mol/L PB, pH 8.0 平衡后,上清直接上柱,用 0~1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱,收集各组分分析,留 TF 活性最高组分,浓缩后用 Sephadex G-25 脱盐。

活性测定^[6-8]

标准曲线的绘制 将 PT 试剂盒中兔脑凝血致活酶按说明复溶后,再按一定比例稀释并测定凝血时间。以凝血时间对稀释倍数对数作图。把在 50 s 凝血时间的凝血致活酶定义为 1 AU。

TF 的磷脂化 磷脂 (卵磷脂和磷脂酰丝氨酸比例为 7:3) 溶于 0.5% 脱氧胆酸溶液,然后与 100 mmol/L CdCl₂ 一起与 TBSA (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 1 g/L BSA) 混和后配成磷脂化溶液,TF 加入磷脂化液后,37 °C 保温 30 min 备用。

一步法测定 TF 活性 磷脂化的 TF 经适当稀释后取 50 μ L 加入测定管中,加入正常人血浆 50 μ L, 37 °C 孵育 2 min,加入 25 mmol/L CaCl₂ (pH 7.4),计算凝血时间。

结 果

r-TF cDNA 扩增 以 pUC TF 质粒为模板,用上、下引物通过 PCR 扩增 TF 的胞外区 cDNA,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在 670 bp 处有特异条带,与 TF 的胞外区分子量大小相同 (图 1)。

重组表达载体的构建与序列分析 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,与 pPIC9K 分别经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶解,经连接酶催化重组,形成 rTF cDNA 表达载体 pPIC9K-rTF, pPIC9K-rTF 基因受醇氧化酶启动子和终止子调控。

表达载体 pPIC9K-rTF 用 *EcoR* I、*Not* I 双酶解后经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 2, 670 bp 片段与 rTF cDNA 大小相同。pPIC9K-rTF 质粒 DNA, 送英俊生物技术公司经 3700 测序仪双向测序, 结果与文献报道一致。

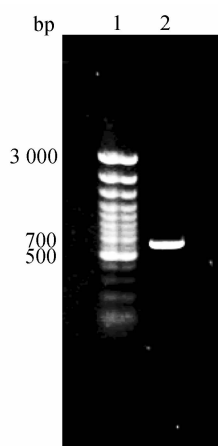


图 1 r-TF cDNA 扩增产物的琼脂糖电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis for analysis PCR product of human r-TF cDNA

1: DNA marker 100 bp DNA Ladder Plus;
2: PCR product of r-TF cDNA

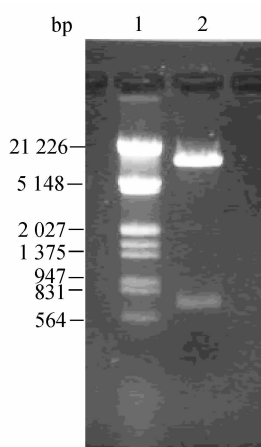


图 2 重组质粒 pPIC9K-rTF 的酶解鉴定

Fig 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pPIC9K-rTF

1: DNA marker Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III;
2: pPIC9K-rTF

r-TF cDNA 在毕赤酵母中的表达 表达载体 pPIC9K-rTF 用电穿孔法转化毕赤酵母 GS115, 经 G418 筛选, 在 8 mg/mL 浓度时获高拷贝转化菌, 命名为 YPD-GS115-rTF。YPD-GS115-rTF 用摇瓶培养, 0.5% 甲醇诱导 rTF cDNA 基因的表达, 每 24 h 补加甲醇 1 次, 诱导培养至 72 h。分别在诱导前、诱导 24 h、48 h、72 h 取样, 还原性 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 结果见图 3。

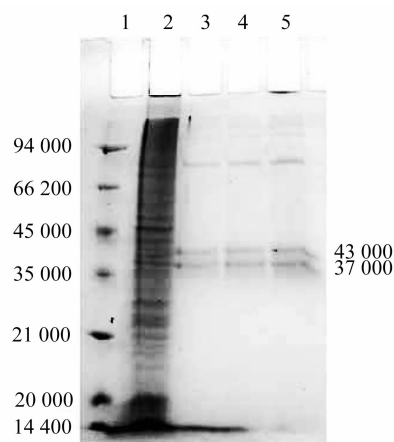


图 3 重组酵母培养上清的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 Reducing SDS-PAGE of fusion protein expressed by GS115/pPIC9K-rTF

1: Molecular weight standard; 2: Before induction;
3-5: Methanol induced for 24 h, 48 h, 72 h respectively

r-TF 的纯化和活性分析 pPIC9K-rTF 克隆经诱导表达, 发酵液离心后取上清, 80% 硫酸铵沉淀 rTF, 沉淀物用 0.05 mol/L PB 溶解, 经 0.02 mol/L PB (pH 8.0) 透析后, 上 Q-Sepharose 柱, 0~1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 分部收集洗脱液, 超滤浓缩上 Sephadex G-25 柱, 分部收集并用 SDS-PAGE 分析, 合并分子量在 37 000~45 000 有特异性条带各管, 纯化样品再行氧化和还原型 SDS-PAGE 以及 Western blot, Imagemaster 分析显示纯度在 95% 以上 (图 4)。

毕赤酵母表达人组织因子胞外区蛋白的纯化结果见表 1。

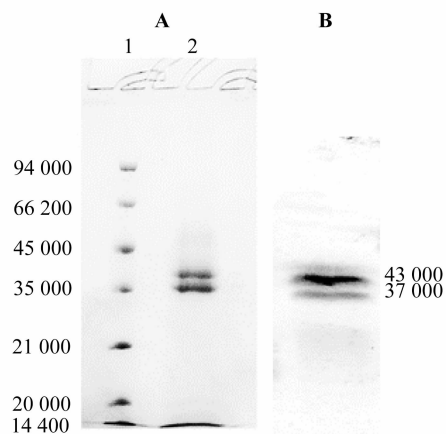


图 4 还原型 SDS-PAGE 和 Western blot 分析 rTF 纯化产品

Fig 4 Reduced SDS-PAGE and Western blot for analysis of purified rTF

A. 1: Molecular weight standard; 2: Purified of r-TF;
B. Western blot for rTF

表1 毕赤酵母表达人组织因子胞外区蛋白的纯化

Tab 1 Purification of human extracellular TF from 40 mL *Pichia pastoris* pPIC9KrTF cell culture supernatant fraction

Item	Protein(mg)	Total activity(u) ^a	Specific activity(u/mg)	Purification factor
Cell supernatant fraction	124	380	4.52	—
Concentrated sample	56	26.8	0.48	
Dialyzed concentrated supernatant fraction	38	5.472	144	1
Anion-exchange setp	7.28	4.200	576	4

^aThe activities were the activities of relipited rTF.

讨 论

TF及可溶性TF(rTF)已分别在哺乳动物细胞(CHO)和大肠杆菌中表达,但前者表达水平低。而在大肠杆菌中形成没有活性的包涵体,需要复性,蛋白回收率比较低。毕赤酵母表达系统,表达水平较高,而且产物是以活性状态分泌到培养液中,易于纯化。目前未见用毕赤酵母表达TF的报导。

毕赤酵母表达系统既具有原核细胞的可操作特点,也具有真核细胞的翻译后加工能力。我们成功地用毕赤酵母高效表达rTF,并获得了有活性的表达产物,表达产物的分子量在37 000~45 000中,其原因可能是TF胞外区的3个N-糖基化位点(Asn11,Asn124,Asn137)在毕赤酵母表达时,各分子糖基化修饰不均所致^[9],因此在SDS-PAGE后在37 000和43 000出现两条带,但是Western blot结果均可与抗TF抗体出现强阳性反应,这表明两条带是糖基化不同而形成的不同分子量rTF。

用毕赤酵母高效表达具有活性的rTF,表达量达到182 mg/L。纯化工艺简便易行,蛋白回收率高,我们拟将rTF用于PT试剂盒中组装,以便用于临床检验,结果证实毕赤酵母表达的rTF具有较强的凝血活性,但尚未达到完全活性。我们认为原因与后期的磷脂化有关。我们将继续研究rTF的表达和脂酰化,以制备凝血酶原时间(PT)测定试剂盒。

参 考 文 献

[1] David MA, Merete TW, Hans Prydz. State of the art article;

tissue factor and biotechnology[J]. *Thromb Res*, 1998, 90: 1-25.

[2] 王振义. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996:61-90.

[3] Stone MJ, Ruf W, Miles DJ, et al. Recombinant soluble human tissue factor secreted by *Saccharomyces Cerevisiae* and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies; Glycosylation of mutants, activity and physical characterization[J]. *Biochem J*, 1995, 1(310):605-614.

[4] Rehemtulla A, Pepe M, Edgington TS. High level expression of recombinant human tissue factor in Chinese hamster ovary cells as a human thromboplastin[J]. *Thromb Haemost*, 1991, 6(5): 521-527.

[5] 于敏,王羽雄,顾银良,等. 可溶性组织因子的基因克隆、表达与性质研究[J]. *药物生物技术*, 2002, 9(3): 128-132.

[6] O'Brien PD, Giles RA, Tate MK, et al. Factor VIII-bypassing activity of bovine tissue factor using the canine hemophilic model[J]. *J Clin Invest*, 1988, 82:206.

[7] 关明,吕元,倪赞明,等. 组织因子胞外区融合蛋白基因的表达及产物的分离纯化与活性分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17(1):35-39.

[8] Shigematsu Y, Miyata T, Higashi S, et al. Expression of human soluble tissue factor in yeast and enzymatic properties of its complex with factor VIIa[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(30): 21 329-21 337.

[9] Angela JA, Justin CJ, Gino VH. Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system[J]. *Protein expression and purification*, 1998, 13:136-142.

(收稿日期:2008-03-12;编辑:王蔚)