

研究报告

瞬时基因表达可溶性的 VEGFR2: I-IV

李军, 易小萍, 张元兴, 孙祥明

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 通过 RT-PCR 的方法从三个月的流产绒毛组织中克隆目的基因 VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2, 血管内皮细胞生长因子受体 2) 胞外 I-IV 区, 连接到真核表达载体上构建了重组表达载体。首先在无血清悬浮培养的 HEK293 细胞中, 使用报告基因 GFP (Green fluorescence protein, 绿色荧光蛋白) 优化转染条件, 发现在转染时 DNA: PEI=1:2 (W/W)、1.5 μg DNA/ 10^6 cells 及开始转染 4 h 内使用无血清、摇床(120 r/min)时可以达到最佳的转染效率和细胞数量。在确定转染条件之后, 将构建的表达载体分别在 HEK293 细胞、COS-7 细胞和 CHO-K1 细胞中进行瞬时转染表达, 结果发现仅在 CHO-K1 细胞的培养上清中检测到目的蛋白的表达。瞬时转染 CHO-K1 细胞至总体积约为 1.5 L, 由于目的蛋白的羧基端有 8-His 标签, 通过 Ni^{2+} -IDA 柱纯化得到 5 mg 左右的目的蛋白。

关键词: VEGFR2, 瞬时基因表达, HEK293, PEI

Transient Gene Expression of Soluble VEGFR2: I-IV

Jun Li, Xiaoping Yi, Yuanxing Zhang, and Xiangming Sun

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: The extracellular domain I-IV of target gene VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) was cloned from villus of trimester abortion by RT-PCR, and linked to the expression vectors. Then, the transfection conditions were optimized in serum-free suspension culture HEK293 using GFP (Green fluorescence protein) as the report gene. The results showed that the optimal transfection efficiency and cell number were obtained when the ratio of foreign DNA: PEI= 1:2 (W/W), DNA=1.5 g / 10^6 cells and shaking speed (120 r/min) in serum free medium in the beginning 4 hours of transfection. After optimizing the transfection conditions, the expression vector was successfully constructed for transient gene expression in HEK293, COS-7, and CHO-K1. The result shows that the target protein was only detected in CHO-K1 supernatant. Because of the C-terminal 8-His tag of target protein, target protein was subsequently purified using Ni^{2+} -IDA and 5 mg purified protein was obtained in 1.5 L supernatant of CHOK1.

Keywords: VEGFR2, transient gene expression, HEK293, PEI

恶性肿瘤已经成为当前严重影响人类健康、威胁人类生命的主要疾病之一。2006 年, 中国癌症死亡人数约为 160 万, 全世界有将近 800 万人死于癌症。但是肿瘤的治疗仍然是当今医学界的难题, 研究人员一直在寻找肿瘤治疗的新方向。通过研究肿瘤发现, 血管生成在肿瘤的发生发展过程中起关键

作用。抑制肿瘤血管生成可作为肿瘤治疗靶点, 通过抑制肿瘤血管的生成进而达到抑制肿瘤生长的目的。

肿瘤血管为肿瘤的生长提供了充足的营养供给同时也促进了癌细胞的扩散和转移^[1]。VEGF (Vascular endothelial growth factor, 血管内皮细胞生

Received: September 28, 2007; Accepted: December 18, 2007

Corresponding author: Xiaoping Yi. Tel: +86-21-64253065; E-mail: xpyi@ecust.edu.cn

长因子)是主要作用于血管内皮细胞的生长因子,具有促进内皮细胞增殖、增加微血管通透性(因此也称为血管渗透因子)、诱导血管生成等多种功能^[2]。已有研究证实 VEGF 的高表达与实体肿瘤的形成及其转移、风湿性关节炎、牛皮癣、糖尿病性视网膜病变、动脉硬化等疾病有着密切关系^[3]。VEGF 通过与血管内皮细胞膜上的特异性受体 VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)结合来激活信号传导的。VEGFR 家族的成员包括: VEGFR1(Flt-1)、VEGFR2(KDR/Flk-1)、VEGFR3(Flt-4)。它们均为跨膜蛋白,由胞外的 7 个免疫球蛋白样的功能域(I-VII 区)、胞内的酪氨酸激酶功能域和中间的一段跨膜序列组成。其中 VEGFR2 定位于人 4q11-12,由 1356 个氨基酸构成,可促进血管内皮细胞增殖、迁移及增加毛细血管通透性。研究已经证实,肿瘤血管内皮细胞的有丝分裂与肿瘤微血管的渗透性主要是通过 VEGF 与 VEGFR2 的相互作用而发生的^[4]。VEGFR2 在健康的成人身体内,表达水平很低甚至不表达;而在许多肿瘤中,如乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、宫颈癌、肝细胞癌、成血管细胞瘤、脑胶质瘤等,发现 VEGFR2 在肿瘤血管内皮细胞中是高表达的。VEGFR2 胞外区部分缺失实验证实: VEGF 主要是通过与 VEGFR2 胞外的 I-III 区特异性结合来发生信号传导的^[5,6]。本实验以胞外 I-IV 区为目的基因,保证了 VEGFR2 空间结构的相对完整性、实验的可操作性及有利于后续特异性杂交瘤细胞株的筛选。考虑 VEGFR2 胞外 I-IV 区的糖基化及正确的二硫键匹配的形成,采用哺乳动物细胞瞬时基因表达。瞬时基因表达技术是指外源基因进入受体细胞后,存在于游离的载体上,不整合至染色体,较短时间内就可获得目的基因的表达产物,但随着细胞的分裂增殖,这种外源基因最终会消失,持续时间为几天到两周。此技术大大缩短了微量至中等量(几毫克到几百毫克)重组蛋白的生产过程,为新药的临床前研究和基因-蛋白质的功能、结构研究等提供了一种快速、方便的方法。常用的宿主细胞有 293 细胞、COS-7 细胞、CHO-K1 细胞等。

本文采用瞬时基因表达技术,以 VEGFR2 胞外 I-IV 区为目的基因,合成其重组蛋白,为进一步建立分泌抗 VEGFR2 单克隆抗体的杂交瘤细胞株奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料

流产绒毛由上海仁济医院妇产科提供, RNAlater 购自 QIAGEN, 逆转录酶购自 TOYOBO, 高保真 Pfu、普通 Tag 酶、质粒小抽试剂盒、无内毒素质粒大抽试剂盒购于 TIANGEN, TA 克隆产品购于 TaKaRa, PEI(聚乙烯亚胺)购买于 Polysciences, TRIZOL 购自 Invitrogen, 引物由上海 Invitrogen 公司合成。

P1 巢式上游引物:

5' AGACAGCTTGGCTGGGCTCGTTGG 3'

P2 巢式下游引物:

5' CGGCTCCCAGATTCTGGGCATTTC 3'

P3 VEGFR2 上游引物(包含有 Kozak 序列, *Kpn* I 酶切位点):

5' TTGGTACCCAGGATGCAGAGCAAGGTGCTGCTGG 3'

P4 VEGFR2 下游引物 1:

5' TGATGGTGATGGTGAGAACCAGAGACCA CATGGCTCTGC 3'

P5 VEGFR2 下游引物 2(包含 8-His 标签, 柔性位点, 终止密码子, *Bam*H I 酶切位点):

5' GCGGATCCCTCAGTGATGATGATGATGGTG ATGGTGAGAAC 3'

P6 免疫球蛋白 轻链信号肽引物 1:

5' CGGTACCACCATGGAGACAGACACACTC CTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG 3'

P7 免疫球蛋白κ轻链信号肽引物 2:

5' GGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC ACTGGTGACGCCTCTGTGGGTTTGC 3'

EF6 pEF6 载体下游引物(包含 *Xba* I 酶切位点):

5' GCGCTCTAGACGTCAGTGATGATGATGA TGG 3'

细胞培养、PCR、蛋白质分析等实验用水为 Milli-Q 超纯水。

1.1.2 菌种和细胞

大肠杆菌 Top-10、无血清悬浮培养的 HEK293 细胞、COS-7 细胞、CHO-K1 细胞均为本实验室保存,表达载体 pCEP4、pEF6 购买于美国 Invitrogen

公司。目的基因插入 pCEP4 命名为 pCVR2-8H, 含有免疫球蛋白 κ 轻链信号肽的目的基因插入 pCEP4 命名为 pNCVR2-8H, 目的基因插入 pEF6 命名为 pEVR2-8H。GFP(Green fluorescence protein, 绿色荧光蛋白)插入 pCEP4 的 pCGFP, 为本实验室保存。

1.1.3 培养基

DMEM 干粉购自美国 Gibco 公司, 小牛血清购自杭州四季青公司, HEK293SFM 为本实验室配方(受专利保护)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

COS-7 细胞, CHO-K1 细胞培养基为 DMEM+10%小牛血清(NBS), 37°C, 5% CO₂ 恒温培养箱培养。细胞复苏之后, 在 25 cm² 方瓶中传代培养。细胞长满瓶底约 80%时, 0.25%(W/V)胰酶消化, 1:10 进行传代, 保证细胞良好的生长状态。瞬时转染前一天, 换液并进行细胞计数和活性检测(大于 90%), 保证细胞数为 6×10^5 cells/mL, 转入大方瓶(放培养基约 30 mL)中培养, 转染后 3 d 收获。无血清悬浮培养的 HEK293 细胞使用 HEK293SFM, 37°C, 5% CO₂, 120 r/min 摇床上培养。细胞复苏后在 25 cm² 方瓶中传代培养, 2~3 d 左右以 1:10 稀释传代。瞬时转染前细胞计数定为 2×10^6 cells/mL 及活性检测大于 95%, 转入大摇瓶中(100 mL 液体), 转染后 4 d 收获(确定最佳收获时间的数据未列出)。

1.2.2 质粒准备

质粒抽提使用无内毒素质粒大抽试剂盒。提取后, 核酸电泳确定分子量大小, 同时使用微量核酸定量仪 ND-1000(NanoDrop Technologies 公司)测定 A₂₆₀/A₂₈₀, 比例在 1.80~1.95 之间方可使用, 同时进行质粒定量。

1.2.3 转染复合物的准备

转染复合物以 DMEM 为母液, DMEM 体积为细胞培养体积的十分之一。首先向 DMEM 中缓慢加入质粒 DNA, 振荡混匀, 室温放置 2 min, 然后加入 PEI 储液, 振荡混匀, 室温放置 10 min, 加入培养瓶中。PEI 储液配方如下: PEI (Polyethylenimine, 聚乙烯亚胺, 线性, MW 25 k, Polysciences 公司)溶解于超纯水, 终浓度为 1 mg/mL, 逐滴加入浓盐酸调至 pH7.0, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 4°C 保存备用。

1.2.4 检测方法

细胞计数使用血细胞计数板。活性测定使用 Trypan Blue 染色后再进行计数, 细胞活性=活细胞数/总细胞数 \times 100%。转染效率分析使用流式细胞仪 FACSCalibur(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.2.5 免疫印迹分析(Western Blot)

样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 100 V 转膜 4 h, 将蛋白转移至孔径为 0.45 μ m 的 PVDF 膜(Millipore)。在封闭液(PBST+5% BSA)中 37°C 孵育 1 h。加入用封闭液稀释 5000 倍的鼠抗 His 抗体(Protein Tech Group)37°C 孵育 2 h; 使用 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用封闭液稀释 2500 倍的 HRP 标记的羊抗鼠抗体 37°C 孵育 1 h。使用 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 使用沉淀型 TMB 显色。

2 结果和讨论

2.1 VEGFR2 胞外 I-IV 区基因的克隆

2.1.1 RNA 提取和 cDNA 合成

正常情况下大多数组织是不表达 VEGFR2 的, 除了一些血管新生比较旺盛的器官, 如: 大脑、心脏等, 这就为目的基因的克隆造成了一定困难。M. Vuckovic 等人在 1996 年通过实验证明: 在怀孕 3 个月的孕妇的绒毛组织中, 通过特异性染色观察发现 VEGFR2 是高表达的^[7]。在上海仁济医院妇产科, 经患者同意后, 获取 3 个月的流产绒毛组织, 保存于 RNAlater, 低温运输至实验室, -80°C 冰箱冻存。冻存半小时后, 通过 TRIZOL 法提取总的 RNA, 然后立即进行逆转录, 获得 cDNA, -80°C 冰箱保存。

2.1.2 基因克隆

引物设计见材料与方法。直接通过基因上下游引物提取目的基因, 条带复杂且没有明显的目的条带, 原因可能是引物特异性差及目的基因丰度低。为此而采用图 1 的方法, 引物使用顺序如下: P1、P2 \rightarrow P3、P4 \rightarrow P3、P5。使用 Premier5.0 设计的 P1、P2 为目的基因外围引物, PCR 结果显示其最佳的退火温度为 65°C, 并且目的条带单一。然后以此 PCR 反应原液稀释 10 000 倍后为下一步 PCR 的反应模板, 以 P3、P4 为引物。继续以上一步 PCR 反应原液稀释 10 000 倍后为下一步 PCR 反应模板, 以 P3、P5 为引物, 目的基因得到克隆。

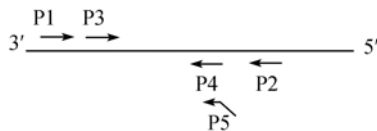


图 1 引物设计

Fig. 1 Design of the primers

2.2 载体构建

目的基因通过 TA 克隆后, 挑取阳性克隆进行测序。测序结果与 NCBI(GenBank Accession No.: NM_002253)已经公布的序列进行比对, 比较 9 次测序结果(按测序顺序编号为 1~9, 结果未列出): 1~8 号有 2~4 次以上的碱基错配, 对应也有 2 个以上的氨基酸错配, 这样的序列不能用于重组蛋白的生产。1~9 号在 895 位碱基有两种测序结果 G 和 A(4 次为 G, 5 次为 A), 相对应 297 位的氨基酸为缬氨酸和异亮氨酸。NM_002253 上 895 位碱基为 G, 而 2007 年 1 月份 Strausberg. R.L 等向 NCBI(登录号: AAI31823)提交的 VEGFR2 氨基酸序列却为异亮氨酸(对应 895 位为 A)。结合测序结果可以得出 VEGFR2 的 cDNA 在 895 位可能有两种形式 G 和 A。9 号可用于重组蛋白的生产。然后连接目的基因到

真核表达载体上构建重组表达载体, 构建过程见图 2。经转化、涂板, 通过菌落 PCR 挑选阳性克隆, 经酶切、测序验证完全正确后备用(载体命名见: 材料与方法)。pCEP4 载体含有 EBNA-1(Epstein-Barr 病毒核心抗原-1)序列及其 OriP 序列, EBNA-1 的表达可通过与载体上的 OriP 原件结合, 启动 pCEP4 载体在宿主细胞内的自我复制。而 COS-7 细胞由于自身可表达 SV40 大 T 抗原, SV40 大 T 抗原与 pEF6 载体上的 SV40 ori 原件结合, 启动了 pEF6 载体在 COS-7 细胞中的自我复制。重组表达载体在宿主细胞内的复制, 其拷贝数因质粒的不同可达到为几十到一百个左右, 为短时间内重组蛋白的生产奠定了基础。

2.3 瞬时基因转染及表达

2.3.1 在 HEK293 细胞中, 以 pCGFP 为报告基因, 考察 DNA:PEI 比例、DNA 用量与开始转染的 4 h 内血清的加入及振荡与否对转染效率和细胞数目的影响

以 pCGFP 为报告基因, 考察 DNA: PEI 比例对转染效率和细胞数目的影响, 见图 3。DNA 用量固定在 $1.5 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$, DNA: PEI 从 1:0 到 1:4(W/W)进行变化。当 DNA: PEI 从 1:0 到 1:2 变化时, 细胞数目

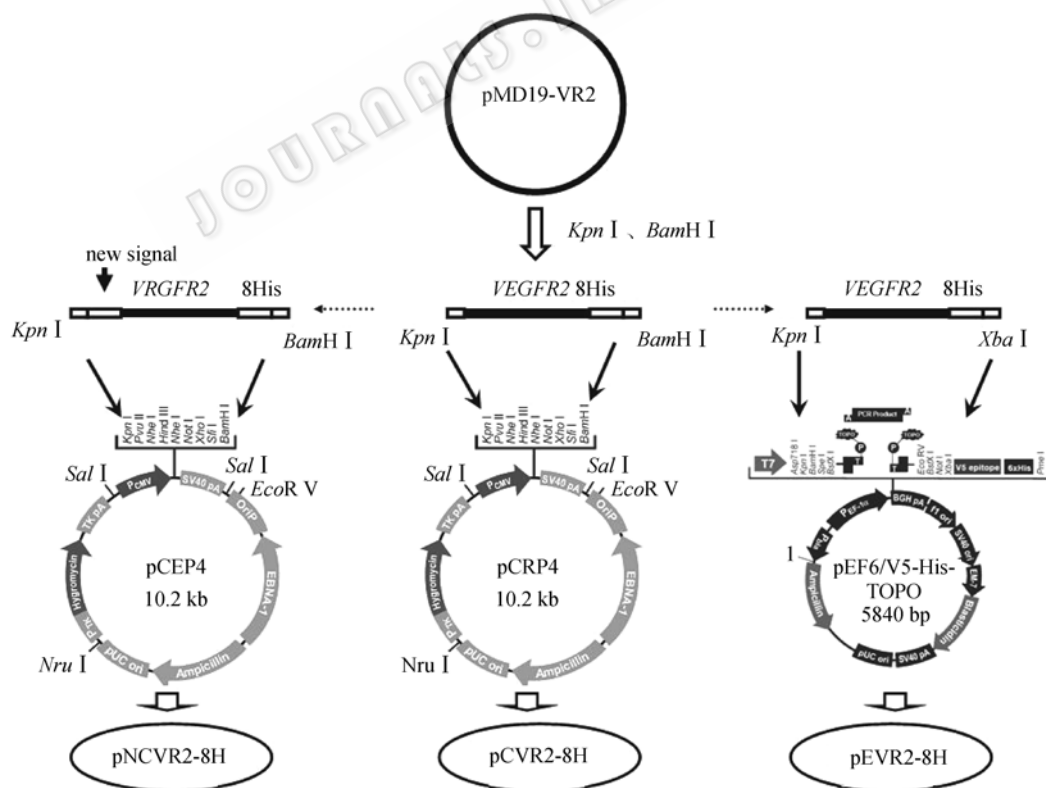


图 2 载体构建示意图

Fig. 2 The construction of expression vectors

减少, 转染效率提高; 但当 DNA:PEI 从 1:2 到 1:4 变化时, 细胞数减少的同时转染效率有轻微的降低。随着 DNA:PEI 比例的提高, PEI 对细胞的毒性越来越明显, 部分细胞死亡。当 DNA:PEI = 1:2(W/W) 时, 转染效率及细胞数达到最优。这一结果与文献报道基本一致^[10,11]。

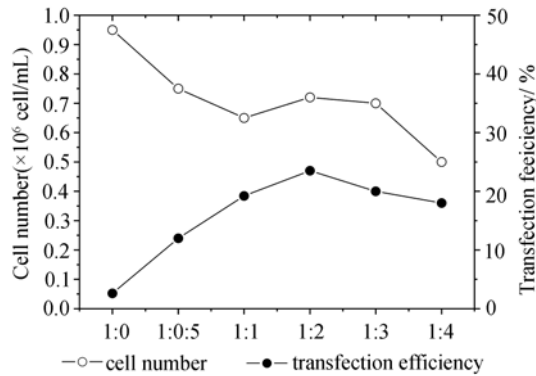


图3 DNA:PEI 对转染效率和细胞数目的影响

Fig. 3 Effects of DNA:PEI on cell number and transfection efficiency

DNA 1.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells, DNA:PEI (W/W) 1:0 1:0.5 1:1 1:2 1:3 1:4 respectively

以 pCGFP 为报告基因, 考察 DNA 用量对转染效率和细胞数目的影响, DNA:PEI=1:2 固定, DNA 用量从 0.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells 到 3.0 $\mu\text{g}/10^6$ cells 变化, 见图 4。当 DNA 从 0.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells 到 1.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells 变化时, 转染效率显著提高, 细胞数目略下降; 当 DNA 用量大于 1.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells 时, 转染效率没有大幅度变化, 细胞数减少。其原因可能是随着 DNA 用量的加大, PEI 的量也相应发生变化, PEI 对细胞的毒性越来越明显因而造成了细胞死亡。可见, 当 DNA:PEI=1:2(W/W) 时, DNA=1.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells, 转染效果最佳。

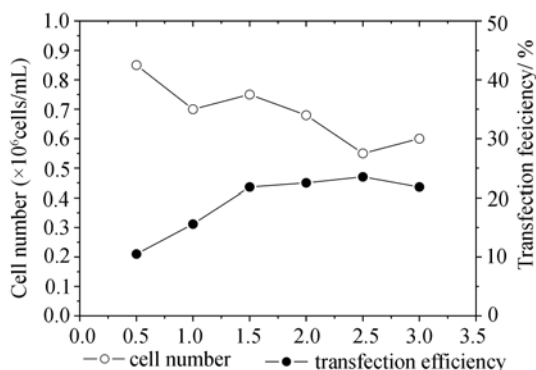


图4 DNA 用量对转染效率和细胞数目的影响

Fig. 4 Effects of cell number and transfection efficiency with DNA dose

DNA:PEI=1:2(W/W), DNA from 0 to 3.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells

有文献报道: 在 293EBNA1 细胞中, 转染时血清的加入提高了细胞的转染效率(GFP)和重组蛋白的产量(SEAP)^[9]。葡聚糖、肝素等阴离子聚合物的加入会极大地抑制细胞的转染, 在开始转染的 4 h 内, 培养基中不能添加硫酸葡聚糖^[8,10]。为考察在本实验室保存的 HEK293 细胞是否有同样的现象, 同时考察在开始转染的 4 h 内静置培养是否能提高宿主细胞摄取外源 DNA 的能力, 我们进行了如下实验。以 pCGFP 为报告基因, 考察在开始转染的 4 h 内血清的加入与否及振荡与否对转染效率和细胞数目的影响。转染前将细胞用 HEK293SFM 培养基(无硫酸葡聚糖)重悬, 保证细胞数为 2×10^6 cells/mL。DNA 用量为 1.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells, DNA:PEI=1:2(W/W)。见图 5: A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4 为不同的组合。A3, B4 转染 4 h 后, 细胞结团非常严重, 48 h 后细胞几乎全部死亡。其原因可能为转染后静置培养 4 h 后(细胞已为结团状态), 血清的加入会增加培养基的粘度, 结团细胞不能分散开来, 造成结团内细胞营养限制而发生细胞凋亡。A2、A4 的转染效率显著低于 B1、B2, 可见血清的加入明显地抑制了转染效率, 原因可能是血清中一些带负电荷的蛋白质与 PEI 的结合竞争性地抑制了 PEI 与载体 DNA 的结合。从 A1, A3, B3, B4 可以看出, 转染 4 h 后血清的加入导致了细胞的大量死亡, 转染后细胞比较脆弱, 血清的加入导致细胞大量结团而发生凋亡。B1 转染效率最高为 24%, 细胞数为 1.1×10^6 cells/mL。

2.3.2 瞬时基因表达可溶性的 VEGFR2 胞外 I-IV 区

以 pCVR2-8H 瞬时转染无血清悬浮培养的 HKE293 细胞, 4 d 后收获培养上清(转染方法见细胞培养方法)。上清通过 Ni^{2+} -IDA 柱、蛋白电泳、Western blotting 检测均为阴性。为了确定是否为胞内积累, 进行了胞内检测。将转染后细胞和正常细胞分别破壁, Ni 柱亲和后电泳及 Western blotting 检测, 转染细胞和正常细胞比较后发现条带基本一致, 没有特异性大小为 55~60 kD 的目的条带, 可以确定重组蛋白未表达或表达量很低。但在 mRNA 水平上, 见图 6, 瞬时转染的 HEK293 细胞中 mRNA 是有表达的, 相比较于内参照其有高的表达量。mRNA 有表达但检测不到目的蛋白的表达, 说明 mRNA 可能遇到翻译功能障碍或者蛋白质在胞内被降解。重组蛋白经过预测软件分析属于稳定蛋白, 半衰期在哺乳动物细

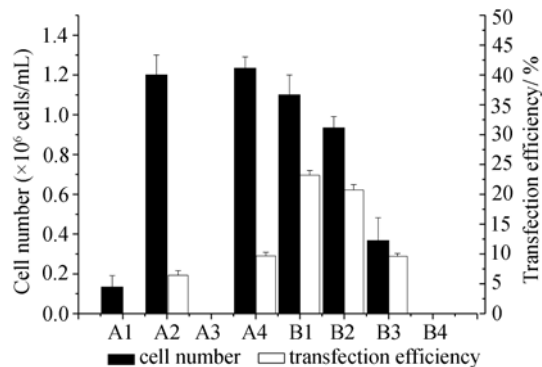


图 5 血清以及开始转染 4 h 内振荡对细胞数目和转染效率的影响

Fig. 5 Effects of cell number and transfection efficiency with and without serum or shaking in the first 4 hours after transfection

48 hours later, in 25cm² flask, counting cell number and detecting transfection infection with Flow Cytometry.

A1: 2.5% NBS+HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, 120 r/min; 4 hours later diluted with same volume 2.5% NBS+HEK293SFM. A2: 2.5% NBS+HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, 120 r/min; 4 hours later, centrifugated, diluted with two volumes HEK293SFM. A3: 2.5% NBS+HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, quiescence culture; 4 hours later diluted with same volume 2.5% NBS+HEK293SFM. A4: 2.5% NBS+HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, quiescence culture; 4 hours later, centrifugated, diluted with two volumes HEK293SFM. B1: HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, 120 r/min; 4 hours later diluted with same volume HEK293SFM. B2: HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, quiescence culture; 4 hours later diluted with same volume HEK293SFM. B3: HEK293SFM(without dextran sulfate) transfective medium, 120 r/min; 4 hours later, centrifugated, diluted with two volumes 2.5% NBS+HEK293SFM. B4: HEK293SFM (without dextran sulfate) transfective medium, quiescence culture; 4 hours later, centrifugated, diluted with two volumes 2.5% NBS+HEK293SFM

胞大于 30 h, Instability index 为 34.31, 属于稳定蛋白, 后续实验也证实了这种说法。同时, 也考虑更换了信号肽, 使用 P4、P6 和 P4、P7 引物克隆到含有免疫球蛋白 κ 轻链信号肽(商业载体上常用的信号肽)的目的基因, 构建表达载体 pNCVR2-8H(见图 2), 瞬时转染后, 上清中仍未检测到目的蛋白的表达。

以 pEVR2-8H 载体瞬时转染 COS-7 细胞, 瞬时转染前使用 10%NBS + DMEM 培养, 并在转染前使用无菌的 PBS, 清洗瓶壁 3 次以除掉残余的血清。4 h 后换液, 加入等体积 HEK293SFM(无硫酸葡聚糖)。在上清中仍然检测不到目的蛋白分泌表达, 得到与 HEK293 细胞相类似的结果。pEF6 载体替代 pCEP4 载体的使用有以下两方面原因, ①载体比较小, pCVR2-8H 和 pNCVR2-8H 的大小为 11.5 kb \pm ,

而 pEVR2-8H 仅为 7.0 kb \pm ; ②启动子能力更强, pCVR2-8H 和 pNCVR2-8H 启动子为 P_{CMV}, 而 pEVR2-8H 为 P_{EF-1 α} 。

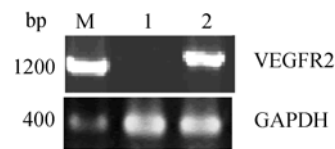


图 6 正常 HEK293 及经 pCVR2-8H 瞬转的 HEK293 RT-PCR 电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of RT-PCR, normal HEK293 and HEK293 by pCVR2-8H

M: marker(marker III); 1: normal HKE293 cell; 2: HEK293 by pCVR2-8H, annealing temperature 65°C, primer; P3, P4

以 pCVR2-8H 载体瞬时转染 CHO-K1 细胞, 方法同上。瞬时转染体积为 40 mL, 培养上清过 Ni²⁺-IDA 柱, 有峰; 而正常 CHO-K1 细胞培养上清是无峰的, 可以初步确定为目的蛋白的分泌表达, 进一步经蛋白电泳和 Western blotting 鉴定正确(图 7)。使用中方瓶分两批扩大培养至总体积约 1.5 L, 并经 Ni²⁺-IDA 柱经咪唑梯度及高盐浓度优化洗脱后, 总共制备了约 5mg \pm 目的蛋白。重组蛋白在 CHO-K1 细胞中的表达, 由于采用无血清培养, 一步亲和层析就可获得比较纯的目的蛋白。

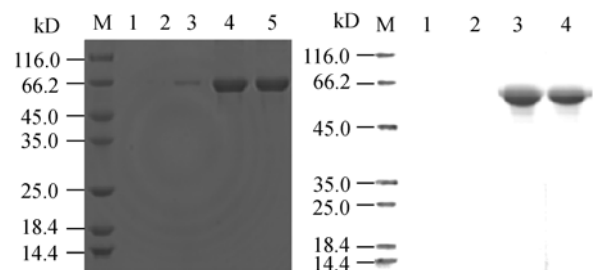


图 7 目的蛋白的电泳及 Western blotting
Fig. 7 Electrophoresis and Western blotting of target protein
12% SDS-PAGE. M: marker; 1: blank;
2: through target protein 60 kD \pm

在 CHO-K1 细胞中重组蛋白成功地实现了分泌表达, 而在 HEK293 细胞和 COS-7 细胞中胞内胞外均未检测到其表达。在瞬时转染的 HEK293 细胞中, 通过 mRNA 水平正常表达说明目的基因的转录是正常的, 目的基因在 HEK293 细胞和 COS-7 细胞中可能遇到翻译功能障碍。为什么会遇到翻译障碍呢? ①表达载体: pCGFP 瞬时转染 HEK293, 24 h 后就可检测到 GFP 的高表达, 说明 pCEP4 载体的功能原件

在 HEK293 细胞中可正常发挥作用, pEVR2-8H 转染 COS-7 细胞的失败也间接表明表达载体不是造成翻译功能障碍的原因; ②细胞株: HEK293 细胞和 COS-7 细胞分别来源于人胚肾细胞与非洲绿猴肾细胞, 都属于肾组织来源的; 而 CHO-K1 细胞来源于中国仓鼠卵巢细胞, 可能肾来源的细胞株对于 VEGFR2 胞外 I-IV 区的蛋白表达有障碍; ③mRNA 编辑: mRNA 可能在不同的细胞株内发生了编辑差异, HEK293 和 COS-7 细胞内被编辑的 mRNA 不能被识别翻译, 可能也是由于细胞株的差异而造成的。VEGFR2 在健康的成人体内, 表达水平很低甚至不表达, 而在生理应激, 如妊娠、创伤修复等及病理条件下大量表达, 说明 VEGFR2 的表达受到严格的时空特异性的调控, 因而很有可能 VEGFR2 胞外 I-IV 区在 HEK293 细胞和 COS-7 细胞中的表达受到基因表达时空特异性的限制。细胞株可能对于一些重组蛋白的生产具有“选择性”。

3 结论

本文通过 RT-PCR 的方法从 3 个月的流产绒毛组织中克隆目的基因 VEGFR2 胞外 I-IV 区后, 结合 NCBI(GenBank Accession No. NM_002253, AAI31823) 已经提交的数据和我们的测序结果可以得出 VEGFR2 的 cDNA 在 895 位碱基存在两种形式 G 和 A。确定目的基因后, 连接到真核表达载体上构建了重组表达载体。为了达到更好的转染效果, 实现重组表达载体在无血清悬浮培养的 HEK293 细胞中高转染高表达, 使用报告基因 GFP 优化转染条件, 发现转染复合物中血清的加入抑制转染效率, 且高浓度的 PEI 对细胞有毒性, 确定最优转染条件为: DNA:PEI=1:2(W/W)、1.5 μ g DNA/ 10^6 cells 及开始转染 4 h 内使用无血清、摇床(120 r/min)。使用构建的表达载体 pCVR2-8H 和 pNCVR2-8H 分别瞬时转染无血清悬浮培养的 HEK293 细胞, 及 pEVR2-8H 载体瞬时转染 COS-7 细胞, 培养上清中均未检测到目的蛋白的分泌表达。但是当使用 pCVR2-8H 载体瞬时转染 CHO-K1 细胞时, 目的蛋白成功地实现了分泌表达, 获得的重组蛋白经蛋白电泳、Western blotting

进行了成功验证。瞬时转染 CHO-K1 细胞至总体积约为 1.5 L, 由于目的蛋白的羧基端有 8-His 标签, 通过 Ni^{2+} -IDA 柱纯化得到 5 mg 左右的目的蛋白。为进一步建立分泌抗 VEGFR2 单克隆抗体的杂交瘤细胞株奠定了基础。

致谢 感谢上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科提供帮助。

REFERENCES

- [1] Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res*, 2000, **79**: 1-38.
- [2] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, **13**: 9-22.
- [3] Ferrara N. Molecular and biological of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*, 1999, **77**: 527-543.
- [4] Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of BEVACIZUMAB, an antibody for treating cancer. *Nature Rev*, 2004, **3**: 391-400.
- [5] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein T, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in *flk1* deficient mice. *Nature*, 1995, **376**: 62-66.
- [6] Lee S, Rosen. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist*, 2005, **10**: 382-391.
- [7] Vuckovic M, Ponting J, Terman BI, Niketic V, Seif MW, Kumar S. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. *J Anat*, 1996, **188**: 361-366.
- [8] Pham PL, Perret S, Doan HC, Cass B, Laurent GS, Kamen A, Durocher Y. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **84**(3): 332-342.
- [9] Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucl Acids Res*, 2002, **30**(2): 9.
- [10] Sun X, Goh PE, Kathy TK, Mori T, Yap MGS. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 843-848.
- [11] Carpentier E, Paris S, Kamen A, Durocher Y. Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. *J Biotechnol*, 2007, **128**: 268-280.