

受体型酪氨酸激酶 PDGFR β 在毕赤酵母中的表达与纯化

茆建胜 周祥山* 张元兴

(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: 构建了受体酪氨酸激酶 PDGFR β 的融合表达载体 pPIC3.5K-PDGFR β , 转化毕赤酵母 GS115, 通过组氨酸营养缺陷型筛选, G418 高拷贝菌株筛选, 以及摇瓶诱导表达筛选, 得到一株高表达 PDGFR β 毕赤酵母菌株 M3。对该菌株进行 5 L 罐培养, 镍柱亲和纯化在 250 mmol/L 咪唑浓度下洗下 PDGFR β 融合蛋白, Western blot 验证约为 90.08 kD, 酶联免疫反应检测表明融合表达的 PDGFR β 具有高的酪氨酸激酶活性。为筛选其小分子抑制剂奠定了基础。

关键词: 受体酪氨酸激酶, PDGFR β , 毕赤酵母, 表达

Expression and Purification of Receptor Tyrosine Kinase PDGFR β

MAO Jian-Sheng ZHOU Xiang-Shan* ZHANG Yuan-Xing

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

Abstract: A fusion expression vector pPIC3.5K-PDGFR β was constructed to express recombinant receptor tyrosine kinase PDGFR β and the right *Pichia pastoris* transformants were screened on *his*-deficient plates and YPD-G418 plates by turns after electroporation of strain GS115, a high yield strain named M3 was screened. The strain M3 was cultured in a 5 L fermentor and His-GFP-PDGFR β fusion protein was purified by Ni²⁺ chelating affinity chromatography. One distinct peak was obtained after elution with 250 mmol/L imidazole. Fusion protein was proved to be 90.08 kD by western blotting, and have tyrosine kinase activity by ELISA. Results showed that the receptor tyrosine kinase PDGFR β was successfully expressed in *P. pastoris* and could be used as a target for small molecule selective inhibitors screening.

Keywords: Receptor tyrosine kinase, *Pichia pastoris*, Cloning, Expression, RTK activity

PDGFR β 全称为 β 型血小板衍生生长因子受体 (Platelet-derived growth factor receptor β)。是一种受体酪氨酸激酶。PDGFR β 信号传导在胚胎发育过程中起着很重要的作用, 它的过表达与纤维化、血管增生和癌症密切相关^[1,2]。PDGFR/PDGF 信号系统

由两种受体 (PDGFR α 和 PDGFR β) 和四种配体 (PDGF-A、B、C 和 D) 组成。PDGFR β 是一种跨膜蛋白质, 具有胞外的 5 个免疫球蛋白样的配体结合区, 一个单跨膜区域、和一个膜锚地区域以及一个胞内的催化区域^[3]。与 PDGF 配体结合后, 受体会

* 通讯作者: Tel: 86-21-54253306; ✉: xszhou@ecust.edu.cn
收稿日期: 2009-03-12; 接受日期: 2009-05-06

发生二聚化并引发构象变化使得受体胞内区域特定的酪氨酸残基发生自磷酸化反应。胞内特定信号分子与这些磷酸化的酪氨酸通过 SH2、PTB 或者其它磷酸酪氨酸作用模式结合, 从而引发一个信号途径, 最终引发配基所诱导的表型^[4-7]。

PDGFR β 的过度表达或过度活化均能刺激肿瘤内血管生成, 促进肿瘤生长。PDGFR β 是肿瘤血管内皮细胞的分子标志之一, 在肿瘤新生血管内皮细胞中高表达, 并与某些肿瘤的生长、转移及预后密切相关^[8,9]。在食管癌、胶质瘤、卵巢癌、皮肤纤维肉瘤、前列腺癌等癌细胞中, PDGFR β 的表达水平均显著高于癌旁组织及正常组织^[10,11]。因而, 阻断或修饰过度表达的酪氨酸激酶活性, 成为目前治疗肿瘤的趋势之一。目前靶向 PDGFR β 酪氨酸激酶的治疗策略有^[12]: 有小分子抑制剂, 配基调节剂, 抗受体的单克隆抗体^[13]和用于基因治疗的寡核苷酸及其它药物等。小分子酪氨酸激酶抑制剂能选择性地干预胞内酪氨酸激酶活性, 因此阻断受体自身磷酸化和下游信号转导通路的激活。目前, 蛋白酪氨酸激酶抑制剂已成为世界抗肿瘤研究的热点领域。PDGFR β 是一个较为理想的肿瘤靶向治疗靶标, 但作为靶标的酪氨酸激酶来源极少, 而目前市售进口的商业用酶的价格非常昂贵。

本课题尝试用具有高表达、高稳定、生长繁殖迅速、工艺简单、生产成本低等优点的毕赤酵母表达酪氨酸激酶, 在抗肿瘤药物高通量筛选中, 将对降低酪氨酸激酶的生产成本、解决抗肿瘤药物靶标蛋白酪氨酸激酶的来源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 TOP10 感受态, 毕赤酵母 GS115 感受态, 重组 pPIC3.5K 质粒购自 Invitrogen, 含有目的基因的 pcDNA3.1-PDGFR β 质粒由上海中科院药物所提供。

1.1.2 培养基: LB (1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1%氯化钠, 100 μ g/mL Ampicilin), 固体培养基为上述成分再加入 2%琼脂粉。YPD(1%蛋白胨, 2%酵母提取物, 2%葡萄糖), 配制其培养基时, 葡萄糖要分开配成溶液灭菌, 等冷却到 50 $^{\circ}$ C 左右再混合在一起。固体 MGY (13.4% YNB, 10%甘油, 2%琼脂粉, 4 \times 10⁻⁵%生物素), MM (1.34% YNB, 4 \times 10⁻⁵%生物素,

0.5%甲醇)。

1.1.3 工具酶和试剂: 限制性内切酶 *Spe* I、*Sal* I 和 *Not* I、Pyrobest DNA Polymerase、Premix *Taq* (Ex *Taq*TM Version)、DNA Ligation Kit Ver.2 购自宝生物工程(大连)有限公司; Plasmid Kit、Gel Extraction Kit 购自上海天根生物工程有限公司; 酪氨酸激酶活性检测试剂盒购自 Sigma 公司(No. PTK-101); 氨苄青霉素、G418、生物素、山梨醇购自上海生物工程技术有限公司; YNB 购自 Sigma 公司; Ni-IDA Agarose 购自 Amersham pharmacia 公司。

1.1.4 主要仪器: PCR 仪购自 Bio-Rad 公司; 紫外/可见分光光度计 UV751GD 购自上海分析仪器总厂; 蛋白质纯化系统 (Biologic LP) 购自 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪 FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)由本校生物反应器工程国家重点实验室提供; Mini-BeadBeater-8 酵母细胞破壁仪购自美国 Biospec products; 5 L 发酵罐为生物反应器工程国家重点实验室自行研制。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件: 大肠杆菌在 37 $^{\circ}$ C LB-Ampicilin 平板培养或 LB-Ampicilin 液体培养基中 200 r/min 振荡培养。毕赤酵母在 30 $^{\circ}$ C MGY 平板培养、MM 或 YPD 培养基中 200 r/min 振荡培养。液体培养基装液量为 30 mL/150 mL 或 50 mL/250 mL。

1.2.2 表达载体的构建: 以含有目的片段 PDGFR β 序列(1521 bp)的 pcDNA 3.1-PDGFR β 质粒为模板, 利用引物设计软件 Primer 5.0 设计上下游引物 P1 和 P2, 并分别在 5'端添加 *Spe* I-*Mlu* I 和 *Avr* II-*Not* I 酶切位点序列(下划线)。

P1: 5'- CATTACTAGT ACGCGT CTT GTG CTG GGA CGC ACC CTC-3';

P2: 5'- CATTACTAGT GCGGCCGC CCTAGG CTATTACAG GAAGCTATCCTCTGCTTCC-3'。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 7 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。胶回收 PCR 产物和提取含有 HIS₁₀-GFP 的重组 pPIC3.5K 质粒(11651 bp), 分别用 *Spe* I-*Not* I 进行双酶切。胶回收在 pPIC3.5K 重组质粒上切下的 9876 bp 长的大片段和 PCR 扩增的目的片段酶切片段 1561 bp, 使两者在 Ligation mix 的作用下相连, 构建含有 HIS-GFP-PDGFR β 的重组质粒 pPIC3.5K-PDGFR β (11438 bp)。将该质粒转入大肠杆菌并涂板培养, 挑

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

取合适菌落 37°C 液体培养, 取少量菌液作为菌落 PCR 模板, 以 AOX 通用引物、Ex Taq 酶进行 PCR: 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环后以核酸电泳验证阳性克隆。将初步验证为阳性的克隆进行 DNA 测序鉴定, 确认正确的质粒命名为 pPIC3.5K-PDGFR β 。

1.2.3 重组毕赤酵母菌株的筛选与培养: 将测序结果正确的质粒进行 *Sal* I 酶切使之线性化, 电转毕赤酵母 GS115。电转菌液立即涂在含有 1 mol/L 山梨醇的 MGY 平板上, 30°C 培育 72 h~96 h, 利用无菌水洗下菌落, 取少量菌液稀释到 10⁻⁵ 细胞/mL, 涂布在含有不同浓度 G418 的 YPD 平板上, 30°C 培育 2 d~5 d, 以筛选高拷贝菌株。G418 浓度分别取 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、3.0 mg/mL、4.0 mg/mL。在 G418 抗性平板上挑选形状大小合适的菌落, 抽取酵母染色体, 以 AOX 通用引物、Ex Taq 酶进行 PCR 验证。进一步做摇瓶表达筛选, 挑选出表达量最高的菌株。

1.2.4 5 L 生物反应器发酵: 500 mL 三角瓶中装入 50 mL 种子培养基, 1×10⁵ 高压湿热灭菌 30 min, 冷却后接入菌种 M3, 30°C 下 200 r/min 培养 24 h, 按 1:10 的接种比例接入 2 L 三角瓶中(装种子培养基 300 mL), 30°C 下 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 6.0, 接入装有 3 L 发酵培养基的 5 L 生物反应器中, 发酵培养基的组分为: 85% (W/V) H₃PO₄ 13 mL/L, KOH 10.6 g/L, CaSO₄ 0.82 g/L, K₂SO₄ 18.20 g/L, MgSO₄·7H₂O 14.90 g/L, 甘油 40 g/L, 硫酸铵 13.2 g/L, Antifoam 204 (Sigma) 0.33 mL/L。灭菌后加入微量元素溶液(PTM1) 4.4 mL/L。以 25% NH₄OH 调节 pH 5.0, 于 30°C 和溶解氧(DO)>40%下培养, 直至培养基中甘油耗尽。甘油分批发酵阶段结束后, 以甘油流加培养基限制性连续流加, 初始流加速率为 10 mL/(h·L), 经过 2 h 后, 将流速提高到 20 mL/(h·L), 培养酵母直至密度达到需要的密度, 停止甘油流加, 待溶解氧(DO)持续上升数分钟, 确保罐内甘油耗尽。随后开始流加添加 1.2% (V/V) PTM1 的甲醇培养基。为防止甲醇流加太多引起细胞中毒, 采用缓慢提高流速的方式流加甲醇直至甲醇流速为 12 mL/(h·L)。

1.2.5 融合蛋白的纯化与验证: 用于分离纯化的样品来自发酵过程中下罐时收集的离心菌体, 取 10 g 左右离心菌体, 悬浮于裂解缓冲液(50 mmol/L

NaH₂PO₄, pH 8.0, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF, 1% NP-40)中, 加入 0.5 mm 玻璃珠, 采用酵母细胞破壁仪进行阶段性机械破壁。每破壁 1 min 之后放在 -20°C 冰箱中 5 min, 反复 5 次。破壁后于 4°C, 转速 19000 g, 离心 40 min 收集裂解上清, 再加入 10% 体积的 3 mol/L NaCl 至终浓度为 300 mmol/L, 上样到经平衡处理的 IDA-Ni 纯化柱, 以不同浓度的咪唑缓冲液洗脱, 富集含 HIS 标签的融合蛋白。纯化过程尽量在低温下进行, 纯化样品储存在 -80°C 冰箱中。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色和 Western blot 检测纯化样品中融合蛋白的表达及纯化情况^[14]。

1.2.6 融合蛋白的活性检测: 根据 Sigma 公司酪氨酸激酶活性测试试剂盒提供的实验步骤, 采用酶联免疫法(ELISA)检测纯化过程中各组分的激酶活性。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建与筛选

在表达载体的设计上, 为了方便重组菌株的筛选和目的激酶的检测, 本研究中将目的基因 PDGFR β 与绿色荧光蛋白 GFP 融合表达。同时为了便于目的蛋白激酶的纯化, 本研究还将 HIS 标签与目的基因融合表达。即最终表达的融合蛋白为: His-GFP-PDGFR β 。将该融合蛋白的基因克隆到毕赤酵母胞内表达载体 pPIC3.5K 上, 得到重组表达质粒 pPIC3.5K-PDGFR β 。该质粒转化大肠杆菌 TOP10 并涂板, 挑选 K1~K10 的 10 菌落, 以 AOX 通用引物进行菌落 PCR 筛选阳性克隆(图 1)。扩增的条带大小为 2636 bp 左右, 与预期结果一致, 电泳初步验证 10 个克隆全部为阳性, 取 K6 单菌落进行测序, 测序结果与理论序列完全符合。测序工作由 Invitrogen 公司完成。

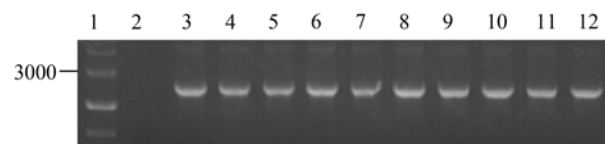


图 1 以 AOX 通用引物进行菌落 PCR 筛选阳性克隆

Fig. 1 Colony PCR with AOX universe primer

Note: 1: DNA Marker III; 2: ddH₂O as control; 3~12: K1~K12 PCR of strain K1~K12.

2.2 酵母转化子 HIS⁺Mut⁺型鉴定及 G418 筛选

采用 *Sal* I 单酶切线性化测序结果正确的 K6 质粒,

并转化入毕赤酵母 GS115。先经过组氨酸营养缺陷型筛选阳性重组毕赤酵母, 再进一步通过 G418 抗性平板筛选目的融合基因高拷贝整合的酵母转化子。在不同浓度 G418 平板上长出的菌落数见表 1。发现 4.0 mg/mL 浓度 G418 的 YPD 平板上未有克隆长出, 而 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL 和 3.0 mg/mL 平板上分别长出 80、4 和 1 个克隆。

表 1 含不同浓度 G418 的 YPD 平板上菌落数 Table 1 Clone numbers on YPD plates with different concentration of G418						
G418 (mg/mL)	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1.0	—	—	—	6	29	80
2.0	—	—	—	—	2	2
3.0	—	—	—	—	—	1
4.0	—	—	—	—	—	0

一般情况下高 G418 抗性对应的拷贝数也就越高, 但考虑到高拷贝不一定表达水平高, 所以有必要进一步做摇瓶表达筛选, 以获得真正高水平表达 PDGFR β 的单克隆菌株。由于 PDGFR β 是和绿色荧光蛋白 GFP 融合表达的, 因此荧光强度和 PDGFR β 蛋白表达量在一定程度下存在正相关性, 可以通过流式细胞仪 FACS 测定相对荧光强度来表征融合蛋白的表达水平。

从图 2 可看出, 在刚开始诱导时, 细胞所发荧光处于本底水平, 当诱导时间达到 24 h, 各株菌的荧光水平都显著升高并达到峰值, 说明在甲醇的作用下, 酵母细胞开始大量生产 GFP 融合蛋白; 而当诱导时间再延长时, 各菌株荧光水平逐步降低, 说明融合蛋白在细胞内表达量在下降。可能是由于在

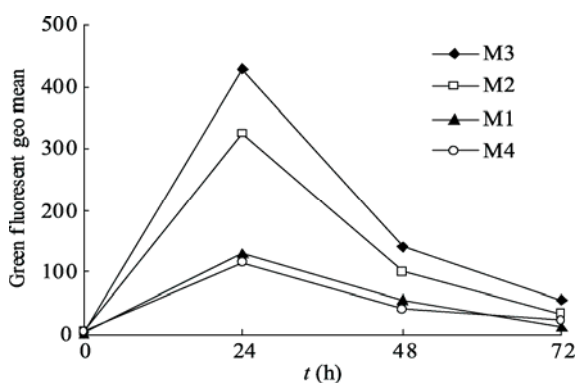


图 2 重组毕赤酵母菌株摇瓶培养诱导表达
Fig. 2 Protein expression levels of 4 single colonies under induction by methanol in shaking flasks

摇瓶中每天添加 0.5% 的甲醇浓度已经不足以很好的诱导所有的细胞表达含 GFP 的融合蛋白, 还有可能是融合蛋白逐渐被水解。选产量最高的 M3 菌株进行 5 L 罐发酵培养。

由于不同表型的毕赤酵母菌株对甲醇的利用速度不一样, 为了方便发酵时对甲醇的流加控制, 需要对产量最高的 M3 菌株的表型进行 PCR 鉴定。理论上, 若质粒整合到毕赤酵母染色体上时没有破坏野生的 *AOX1* 基因, 则以 *AOX* 通用引物扩增时可得到两条带 (2200 bp 和 2636 bp), 其中 2200 bp 的条带为 *AOX1*, 2636 bp 的为目的基因。图 3 中 Control 1 为用无菌水代替模板染色体做空白对照, Control 2 为用宿主菌 GS115 染色体做空白对照。两个空白对照均在 2636 bp 处没有目的大小的条带。第 4 和 5 泳道在 2200 bp 和 2636 bp 处均有清晰的条带。该结果表明 M3 中 *AOX1* 基因仍保持完整, M3 菌株的表型为 Mut⁺, 即为甲醇利用快速型。

2.3 5 L 发酵罐高密度发酵与结果分析

在 5 L 罐中发酵约 31 h, 在线显示溶氧值(DO)显著增高, 表明发酵培养基中的甘油已耗尽, 此时开始流加甘油。如图 4 所示, 发酵约 39 h 细胞湿重。达到约 200 g/L 时, 停止甘油流加, 待罐内剩余的甘

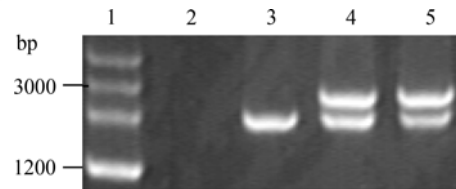


图 3 M3 菌株的 PCR 表型鉴定
Fig. 3 PCR characterization of recombinant M3
Note: 1: DNA marker III; 2: ddH₂O as control; 3: Chromosome DNA of GS115 as control; 4-5: PCR of total chromosome DNA of recombinant M3.

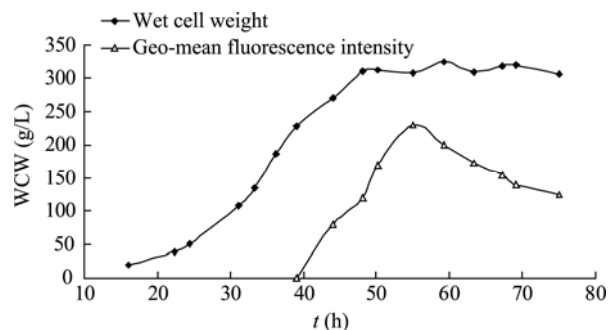


图 4 几何荧光强度与时间关系图
Fig. 4 Geo-mean fluorescence intensity at different induction time

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

油耗尽, 向发酵罐中一次性加入适量甲醇, 让菌体慢慢适应以甲醇为唯一碳源的生长环境, 待 DO 值再次升高之后, 在 39.5 h 开始限制性流加甲醇。

诱导开始后, 每隔 2 h~5 h 取样用流式细胞仪 (FACS) 分析几何平均荧光强度。FACS 检测结果显示(图 4), 从刚开始诱导到 16 h 左右几何平均荧光强度迅速攀升到达到 230 左右, 之后便明显呈下降趋势。到下罐为止, 细胞湿重为 307 g/L 左右。

2.4 融合蛋白的纯化与验证

5 L 罐发酵离心菌体经破壁处理后, 离心取上清, 通过 Ni^{2+} 亲和纯化融合蛋白, 在 250 mmol/L 咪唑洗脱时得到一个较高且窄的洗脱峰(图略)。对镍柱纯化过程中得到的各个组分进行 SDS-PAGE 分析, 并用 GFP 的抗体进行蛋白免疫印迹鉴定(图 5)。图 5A 中泳道 1 为在毕赤酵母 GS115 菌株细胞质中表达的鱼生长激素作为对照, 泳道 2 为阴性对照, 为没有表达外缘蛋白的毕赤酵母 GS115 菌株, 均在 90 kD 左右处没有观察到目的条带。Western blot 显示(图 5B), 裂解上清、流穿、250 mmol/L 咪唑洗脱组分均在 90.08 kD 处有条带, 其中裂解上清、流穿组分的目的条带较淡, 而 250 mmol/L 咪唑洗脱组分条带较浓。软件密度分析表明, 250 mmol/L 咪唑洗脱组分相对于裂解上清, 目的蛋白有效浓缩了 3 倍左右。说明镍柱亲和纯化能有效地富集纯化目的蛋白。而第 4 泳道无目的基因的毕赤酵母 GS115 宿主菌株和第 5 泳道表达鱼生长激素的毕赤酵母菌株均没有特异性的条带。在第 1 泳道中, 目标条带的下方也有能够特异性抗 GFP 抗体的蛋白, 可能是由于目标蛋白降解所致。Western blot 也可以看到流穿组分中还是有一部分目的蛋白流失, 这可能是上样量超过了柱子的吸附容量, 多余的目的蛋白由于无法吸附至介质, 所以随着流穿组分流下。

酪氨酸激酶主要是作为靶标用于抗肿瘤药物的筛选, 筛选时对激酶活性要求很高而对纯度要求不大高。现在市售进口商用酪氨酸激酶纯度大约在 50% 左右。本研究中虽然纯化的目标蛋白 PDGFR β 纯度较低, 但它能否用作抗肿瘤药物筛选用酶关键看其酪氨酸激酶活性的高低。

2.5 融合蛋白的活性检测

为了进一步验证镍柱纯化中得到的目的蛋白, 通过酶联免疫法(ELISA), 利用从 Sigma 公司购买的 Tyrosine kinase assay kit 检测纯化过程中得到

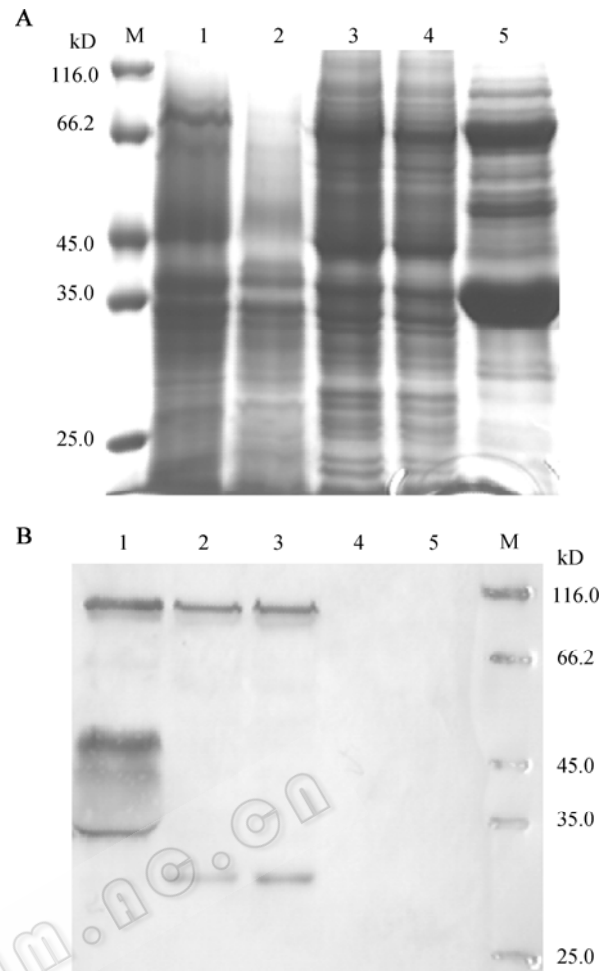


图 5 SDS-PAGE 和 Western blot 分析镍柱纯化各组分
Fig. 5 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of elutes collected in Ni^{2+} affinity chromatography

Note: A: 1: Fish growth hormone expressed in the cytoplasm of *Pichia pastoris* as control; 2: GS115 strain as negative control; 3: Lysate supernatant; 4: Flow-through fraction; 5: Eluted protein 250 mmol/L imidazole; M: Marker; B: 1: Eluted protein 250 mmol/L imidazole; 2: Flow-through fraction; 3: Lysate supernatant; 4: GS115 strain as negative control; 5: Fish growth hormone expressed in the cytoplasm of *Pichia pastoris* as control; M: Marker.

的各个组分的活性(图 6)。其中的阴性对照为加入反应缓冲液作为空白, 阳性对照为试剂盒提供的酪氨酸激酶 EGFR 标准样品, 结果显示 250 mmol/L 咪唑洗脱产物的活性最高, 且酶活都明显高于阳性对照, 而裂解上清、上样流穿的活性都相对较低。说明纯化得到的蛋白具有高的酪氨酸激酶生物活性, 可以作为靶标激酶, 用于酪氨酸激酶抑制剂的筛选。

3 讨论

本研究构建了重组表达载体 pPIC3.5K-His-GFP-PDGFR β , 并成功地转化毕赤酵

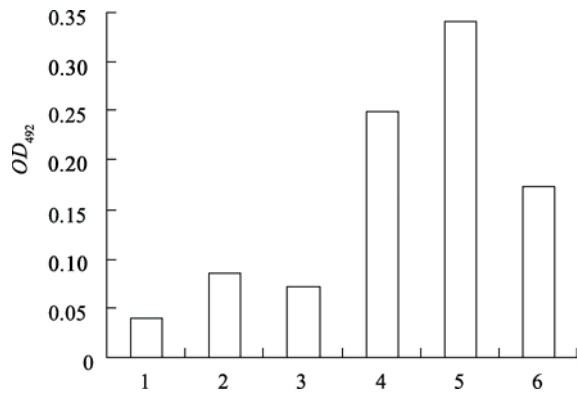


图 6 镍柱纯化各组分活性

Fig. 6 Activities of fractions collected by Ni²⁺ affinity chromatography

Note: 1: Blank; 2: lysate supernatant; 3: Flow-through fraction; 4: Eluted with 250 mmol/L imidazole; 5: Concentrated protein in 250 mmol/L imidazole elution; 6: EGFR standard sample.

母 GS115, 通过组氨酸缺陷筛选和抗生素 G418 抗性筛选, 摇瓶表达及流式细胞仪检测相对绿色荧光强度得到一株高表达毕赤酵母菌株 M3。经 5 L 罐发酵, 表达的蛋白进行镍柱亲和纯化并经蛋白电泳及蛋白免疫印迹检测, 表明 250 mmol/L 的咪唑能洗下绝大部分的目的蛋白。同时激酶活性分析也表明表达的 PDGFR β 融合蛋白具有高的酪氨酸激酶活性。可作为靶标蛋白用于抗肿瘤药物的筛选。

致谢: 中科院上海药物研究所丁健研究员、林莉萍研究员、童林江博士、谢华博士在本课题检测等方面提供了支持。

参 考 文 献

- [1] Betshohz C, Karlsson L, Lindhal P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*, 2001, **23**(6): 494–507.
- [2] Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, **15**(4): 275–286.
- [3] Jones AV, Cross NCP. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**: 2912–2923.
- [4] Clasesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 32023–32036.
- [5] Bergsten E, Uutela M, Pietras K, *et al.* PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 512–516.
- [6] Beckmann MP, Betsholtz C, Heldin CH, *et al.* Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science*, 1988, **241**: 1346–1349.
- [7] 朱孝峰, 刘宗潮, 曾益新. 酪氨酸激酶受体的信号转导途径与肿瘤治疗. *药学报*, 2002, **37**(3): 229–234.
- [8] Machida S, Saga Y, Takei Y, *et al.* Inhibition of peritoneal dissemination of ovarian cancer by tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668(TSU-68). *Int J Cancer*, 2005, **114**(2): 224–229.
- [9] Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, *et al.* SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor β in pre-clinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 2003, **2**(5): 471–478.
- [10] Hermanson M, Funä K, Hartman M, *et al.* Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res*, 1992, **52**(11): 3213–3219.
- [11] Kim SJ, Uehara H, Yazici S, *et al.* Targeting platelet-derived growth factor receptor on endothelial cells of multidrug-resistant prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2006, **98**(11): 783–793.
- [12] Madhusudan S, Ganesan TS. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clin Biochem*, 2004, **37**: 618–635.
- [13] 王振达, 方 丽, 魏大鹏, 等. PDGFR 单克隆抗体的制备和鉴定. *四川大学学报*, 2007, **38**(3): 503–508.
- [14] FM 奥斯伯, RE 金斯顿, R 布伦特. 精编分子生物学实验指南. 第四版. 北京: 北京科学出版社, 2005, pp.333–373.

栏目介绍

生 物 实 验 室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>