

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710047352.2

[51] Int. Cl.

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 4 月 29 日

[11] 公开号 CN 101418042A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 5/08 (2006.01)

[22] 申请日 2007.10.24

[21] 申请号 200710047352.2

[71] 申请人 苏州思坦维生物技术有限责任公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街

218 号生物纳米园 A3 号楼 A105 室

[72] 发明人 周群敏 罗师平 周 青 陶飞龙

胡红群 谢凤娟

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 3 页

[54] 发明名称

重组人血管内皮细胞生长因子的分离纯化、
体外化学标记及其应用

[57] 摘要

本发明属于生物技术领域。血管内皮细胞生长因子(VEGF)在血管新生或增生中起着重要作用,但体内天然的 VEGF 含量低且半衰期短,故很难提取到足够量的内源 VEGF 蛋白以满足日益增长的实验研究及临床需要。本发明公开了一种以重组基因工程及免疫亲和层析柱法经济方便地制备及提取纯化重组人 VEGF 蛋白的方法。本发明还公开了对纯化的 VEGF 蛋白进行体外非放射性化学偶联标记处理的方法。本发明的 VEGF 蛋白(包括未标记的或化学偶联标记的)在实验研究及临床诊疗上具有广泛的用途。

1. 一种以重组基因工程及免疫亲和层析技术来制备及分离提取重组人血管内皮细胞生长因子(VEGF)蛋白的方法,其特征在于其包括下列步骤:

1) 以多聚酶链式反应(RT-PCR)从健康人细胞组织中克隆获得含编码人 VEGF 蛋白质的 cDNA;

2) 克隆扩增获得的 cDNA 经限制性内切酶处理后,再用 T4 连接酶将其与经相应的限制性内切酶处理的表达载体相连,获得重组表达载体;

3) 将上述重组表达载体转入真核宿主细胞,经筛选、扩增培养后获得高效稳定分泌表达重组人 VEGF 蛋白的宿主细胞;

4) 收集细胞培养上清液,经离心及以滤膜过滤后,将滤液直接上样至含有偶联有 VEGF 受体蛋白或抗-VEGF 抗体蛋白的亲合层析柱中;

5) 亲合层析柱先经 PBS 洗脱后,再以低 pH 液洗脱回收被吸附的蛋白;

6) 洗脱回收的蛋白再经调节 pH 至中性及透析与理化鉴定后,即获得纯化的重组人 VEGF 蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的制备及分离提取重组人 VEGF 蛋白的方法,其特征在于所述的用于表达重组人 VEGF 蛋白的真核宿主细胞包括但不限于动物细胞、昆虫细胞及酵母细胞等。

3. 如权利要求 1 所述的制备及分离提取重组人 VEGF 蛋白的方法,其特征在于所述的偶联于亲合层析柱中的 VEGF 受体蛋白包括但不限于:天然的可溶性 VEGF 受体(VEGF-R1、VEGF-R2 及 VEGF-R3)蛋白、含 VEGF 结合区的 VEGF 受体蛋白片段及重组的含 VEGF 结合区的 VEGF 受体融合蛋白等。

4. 如权利要求 1 所述的制备及分离提取重组人 VEGF 蛋白的方法,其特征在于所述的偶联于亲合层析柱中的抗-VEGF 抗体蛋白包括但不限于:可结合人 VEGF 蛋白的单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体或含可结合人 VEGF 蛋白的抗体蛋白片段等。

5. 一种带有生物素(Biotin)标记物的 VEGF 蛋白,其特征在于该标记的 VEGF 蛋白多肽中偶联有一个或多个生物素,并保持有 VEGF 及生物素(Biotin)的双重活性,可同时与 VEGF 受体结合及与亲和素(Avidin)结合。

6. 一种制备如权利要求 5 所述的带生物素标记的 VEGF 蛋白的方法, 其特征在于该标记方法包括下列步骤:

1) 溶解 VEGF 蛋白质于 pH 为 7-9 的缓冲液中;

2) 按标记试剂与 VEGF 蛋白的反应摩尔比在 10: 1 至 50: 1 间, 加入适量的活化的生物素标记试剂与 VEGF 蛋白样品混合, 并混匀, 室温反应 30-60 分钟;

3) 通过透析或脱盐去除未反应的过量生物素, 得到生物素标记的 VEGF 蛋白。

7. 一种以权利要求 5 所述的生物素标记的 VEGF 蛋白为主要试剂成分进行体外检测细胞或组织中的 VEGF 受体 (VEGF-R) 表达的方法, 其特征在于其包括下列步骤:

1) 待检细胞或组织切片以含牛血清白蛋白的封闭液温育封闭;

2) 在待检细胞或组织切片上滴加经适度稀释的生物素标记的 VEGF 蛋白, 温育 1-2 小时;

3) 用缓冲液洗涤样品, 再滴加经适度稀释的酶标记的亲合素 (Avidin), 温育 30-60 分钟;

4) 用缓冲液洗涤样品, 再滴加底物, 温育 5-10 分钟或至显色; 显色反应结束, 于显微镜下判读检测结果。

8. 一种以权利要求 5 所述的生物素标记的 VEGF 蛋白为主要试剂成分进行体外检测流离的可溶性 VEGF 受体 (VEGF-R) 的方法, 其特征在于其包括下列步骤:

1) 用抗人 VEGF 受体的抗体或其他可结合 VEGF 受体的配体包被 ELISA 板;

2) 经 PBS 液洗脱及以含牛血清白蛋白的封闭液温育后, 加入待检的样品, 温育 1-2 h;

3) 经 PBS-T 液洗脱后, 加入经适度稀释的生物素标记的 VEGF 蛋白, 温育 1-2 h;

4) 经 PBS-T 液洗脱后, 再加入经适度稀释的酶标记的亲合素 (Avidin), 温育 1-2 h;

5) 经 PBS-T 液洗脱后, 加入显色底物液, 室温 5-30 min, 或至显色;

6) 加入终止反应液, 以酶联免疫仪测定各孔的吸光值; 根据 OD 值并与正常参照物 (重组可溶性 VEGFR 受体蛋白) 比较, 计算出待检测的样品中所含流离的或可溶性 VEGF 受体蛋白的水平。

9. 一种以权利要求 5 所述的生物素标记的 VEGF 蛋白为主要试剂成分进行体外定量检测 VEGF 水平的方法, 其特征在于包括下列步骤:

1) 用抗人-VEGF 的抗体或 VEGF 受体蛋白包被 ELISA 板, 4°C 过夜;

2) 包被板以含牛血清白蛋白的封闭液封闭;

3) 经 PBS-T 洗脱后, 加入固定溶度的生物素标记的 VEGF 蛋白及待检的样品(如细胞上清液, 血清等), 温育 1-2 h; 另设 VEGF 蛋白对照参照组, 该组加入固定溶度的生物素标记的 VEGF 蛋白及已知不同溶度的未标记的 VEGF 蛋白参照物, 温育 1-2 h;

4) PBS-T 洗板后, 加入酶标记的亲合素(Avidin), 温育 1-2 h;

5) PBS-T 液洗脱后, 加入显色底物液, 室温 5-30 min 或至显色;

6) 加入终止反应液, 以酶联免疫仪测定各孔的吸光值; 根据 OD 值并与含 VEGF 蛋白参照组相比较, 测算出样品中所含 VEGF 蛋白的水平。

10. 一种用权利要求 5 所述的生物素标记的 VEGF 蛋白为吸附剂, 来分离或清除 VEGF 受体蛋白及 VEGF 受体表达阳性的细胞或组织的用途, 其特征在于包括下列步骤:

1) 将亲和素(Avidin)吸附在适当的固相载体上(如细胞培养板, 硝酸纤维素膜等);

2) 在固相载体上滴加含牛血清白蛋白的封闭液, 封闭温育;

3) PBS 洗涤, 在固相载体上滴加生物素标记的 VEGF 蛋白, 温育 1-2 小时;

4) 加入含 VEGF 受体的生物样品或 VEGF 受体表达阳性的细胞或组织, 温育 1-2 小时;

5) PBS 洗涤后, 分离得到 VEGF 受体蛋白或 VEGF 受体表达阳性的细胞或组织。

11. 一种以权利要求 5 所述的 VEGF 蛋白用于体内非放射性显示与定位跟踪 VEGF 受体表达阳性的细胞与器官组织的用途。

12. 一种用权利要求 1 或权利要求 5 所述的 VEGF 蛋白体外建立血管内皮细胞或肿瘤细胞迁移/生长的模型筛选抗血管内皮细胞迁移/生长药物成分的方法, 其特征在于: 细胞置于含微孔隔离膜(膜孔径大小为 4-8 μm)的配养装置的上层, 而含 VEGF 蛋白的样品置于配养装置的下层, 细胞在 VEGF 蛋白介导趋化之下而发生变形及穿透隔离膜而沉积在配养装置的下层。

重组人血管内皮细胞生长因子的分离纯化、体外化学标记及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域。本发明涉及以重组基因工程及亲和层析柱技术来制备及分离提纯具生物活性的重组 VEGF 蛋白；本发明还涉及对纯化的重组 VEGF 蛋白进行体外非放射性化学偶联标记处理的方法。本发明的 VEGF 蛋白(包括化学偶联标记的或未标记的)在实验研究及临床上具有广泛的用途。

背景技术

血管新生或增生(angiogenesis)在生物学上是指体内的已存在的血管(如毛细血管和小静脉)通过出芽或分裂的方式而产生新的血管的过程。血管新生在维持机体的许多正常的生理过程如组织胚胎发育、外伤伤口的愈合与修复等是有益的和必需的。但过度的血管新生或增生也与许多病理变化(如肿瘤的增生扩散,炎症)息息相关。体内的血管能够不断地增生与增长的关键是其内衬的血管内皮细胞具有不断分裂增生及定向迁移置入已有的血管管壁的能力。

血管内皮细胞的分裂/增生依赖于血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, 即 VEGF)(Napoleone Ferrara: 2004, Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. Endocrine Reviews 25 (4): 581-611)。VEGF 在血管增生中的重要性也已在 VEGF 基因剔除小鼠的研究中被证实: 如只要当 VEGF 基因中的一份被敲除, 其胚胎中的新生血管即无法正常形成进而导致胚胎死亡。

人 VEGF 的基因全长为 14 kb, 由 8 个外显子, 7 个内含子组成。其中由于其 mRNA 不同的剪接, 体内至少存在有 6 种不同形式的 VEGF 蛋白(即 VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 及 VEGF206, 其中研究最多的是 VEGF165)。这 6 种 VEGF 蛋白以同源二聚体可溶性糖蛋白形式存在细胞外间质或体液中, 通过与特异表达在血管内皮细胞上的 VEGF 受体(VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3)的高度结合, 从而介导出刺激血管内皮细胞分裂增生的活性。

但是体内天然的 VEGF 含量低且半衰期短, 故一般很难提取与分离到足够量的天然的

VEGF 蛋白以满足实验研究及临床应用的需要。以重组基因工程及细胞培养或细菌发酵技术来体外大量表达生产重组的 VEGF 蛋白则是解决该问题的理想方案。但鉴于 VEGF 蛋白富含二硫键(S-S)结构,而二硫键对维持其三级结构及生物学活性起重要作用,故重组 VEGF 蛋白的表达生产策略将以在真核细胞中的分泌性表达最为理想。常见的真核表达宿主包括:哺乳动物细胞、昆虫细胞及酵母细胞等。但已有的研究表明以哺乳动物细胞表达重组 VEGF 蛋白,其生产成本高,不宜达到工业化规模生产。而真核单细胞生物中的酵母细胞(菌)表达系统由于兼有原核细胞的生长快速,培养方便经济,生产成本低廉,和真核细胞系统的对表达产物的加工修饰的双重特点,则是工业化生产表达外源基因如 VEGF 蛋白的最理想宿主。其中,近年来应用较为广泛的宿主细胞是以 *Pichia. pastoris* (毕赤巴斯德酵母)代表的甲基营养型酵母(methylotrophic yeast)。

以毕赤酵母表达人血管内皮细胞生长因子的方法目前已有一些报导。如马骊等在 2000 年报导(文献 1:马骊 张智清 陈爱君 姚立红 姜忠良 王小宁: 人血管内皮生长因子在毕赤酵母菌中的表达和鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志 2000 Vol. 14 No. 4 P. 309-312):利用聚合酶链反应(PCR)技术,扩增出 hVEGF165 基因片段,并克隆于含 AOX1 启动子和 α 分泌信号肽序列的 *Pichia. pastoris* 酵母载体中,构建重组表达质粒 pPIC9K/hVEGF165,转化酵母宿主菌 KM71,筛选多拷贝整合转化子,摇瓶培养,1%甲醇诱导表达,获得高效表达且具有生物学活性的重组 VEGF165。

而在一份申请号为 CN03114994.4 的专利文献中(专利文献: 专利发明名称: 一种重组人血管内皮细胞生长因子的制备方法和应用, 专利申请人:复旦大学 发明人: 宋后燕; 王跃祥)则公开了一种以毕赤酵母菌 GS115 高效表达重组人血管内皮细胞生长因子 121(r-hVEGF121)方法。该专利报导了应用 RT-PCR 方法,扩增人 VEGF121cDNA 基因片段,与酵母表达载体 pPIC9K 重组,获得表达质粒 p9KVEGF121,转化毕赤酵母菌 GS115,筛选出高效表达工程菌株。工程菌经发酵、诱导表达,分离纯化后,纯度 95%以上。实验证明该发明产物具有高效的促血管内皮细胞增殖功能和促血管通透作用和防治缺血性疾病的应用价值。

以上文献虽然都报导采用毕赤酵母系统表达人血管内皮细胞生长因子基因,并分别获得了具有生物学活性的表达产物(即文献 1 中的重组 VEGF165 蛋白,文献 2 中的 VEGF121 蛋白),但两者也还存在各自的局限:如文献 1 中只报道了在酵母细胞上清中的检测到分泌表

达的重组 VEGF165 蛋白,而并无分离纯化该重组 VEGF 蛋白的方法或资料数据;而文献 2 中虽公开了一种从酵母细胞上清中分离纯化重组 VEGF121 蛋白的方法,但因该分离纯化的工艺繁琐(需要超滤浓缩,凝胶过滤,离子交换等多步),其在工业化规模生产应用上有所限制。

本发明涉及一种以重组基因工程及免疫亲和层析技术来制备及分离提取具生物活性的人重组 VEGF 蛋白的方法,该方法具表达高效,蛋白的分离提取简便、快速等优点,便于工业化规模生产。本发明还涉及对分离提取的重组 VEGF 蛋白进行体外非放射性化学偶联标记处理的方法。本发明的 VEGF 蛋白(包括化学偶联标记的或未标记的)在实验研究及临床诊治上具有广泛的用途。

发明内容

本发明内容之一是公开了一种以重组基因工程及亲和层析技术来制备及分离提取具生物活性的人重组血管内皮细胞生长因子(VEGF)蛋白的方法。该方法是基于在真核细胞高效分泌表达外源重组基因的基础上,采用免疫亲和层析柱从细胞上清液中回收分离纯化重组 VEGF 蛋白。以该方法分离纯化重组 VEGF 蛋白,简便快速;且分离纯化获得的重组 VEGF 蛋白保持有如内源性 VEGF 的生物活性,能与 VEGF 受体高度特异结合并可刺激血管内皮细胞分裂增生,可作为潜在药物成分用于治疗各种缺血性疾病。

本发明另一大内容是公开了一种非放射性化学物标记处理的 VEGF 蛋白及其制备方法。其中用于体外化学偶联标记 VEGF 蛋白的化学物是生物素(Biotin)。生物素标记的 VEGF 蛋白中可与亲和素(avidin)合并使用,构成生物素-亲和素检测系统(biotin-avidin system),具有检测迅速、灵敏、专一、稳定、多级放大效应及无放射污染等特点。因次,本发明的生物素标记的 VEGF 蛋白在实验研究及临床体内外诊断上具有广泛的用途。其明显的用途包括但不限于:作为检测试剂用于体内及体外定性及定量检测 VEGF 受体的表达;作为吸附剂用于体内外分离 VEGF 受体表达阳性的细胞(如血管内皮细胞)与组织等;作为非放射性显示剂,用于体内定位跟踪显示 VEGF 受体表达阳性的细胞与器官组织等。

本发明的 VEGF 蛋白(标记的或未标记的)还可用于建立以 VEGF 介导的体外血管内皮细胞迁移模型,该模型可用于体外快速筛选抗 VEGF 及其受体介导的抗血管内皮细胞迁移/增生的药物成分。

本发明的具体内容描述如下：

一、以重组基因工程及免疫亲和层析技术高效表达及快速分离重组人 VEGF 蛋白

该发明部分包含俩大内容：重组人 VEGF 蛋白的高效表达及其快速分离。

1. 重组人 VEGF 蛋白的高效表达

重组人 VEGF 蛋白的表达以真核细胞分泌性表达为主。真核细胞分泌性表达的一大优点是合成的 VEGF 蛋白集聚于细胞培养液中，便于回收及分离纯化。本发明在具体实施中首选酵母细胞表达系统。保证 VEGF 蛋白在真核细胞（包括酵母细胞）分泌表达的一大关键因素是需要一段信号肽（signal peptide）以引导新合成的蛋白质穿透内质网，并最终分泌到细胞外间质。信号肽的编码来源可来自 VEGF 基因本身，或其他外源基因如 IL-2 等基因。本发明在具体实施实例中因采用酵母细胞表系统，故其信号肽选择酵母细胞中 α 分泌信号肽序列，以引导融合蛋白的分泌性表达。含 α 分泌信号肽序列，可用于酵母细胞表达的载体可选择如 pPic9k（Invitrogen）等常规载体。

构建含 VEGF 重组基因表达载体的具体技术与操作方法可参见《分子克隆》等书。其中有关技术方案包括如下步骤：

- 1) 先采用 RT-PCR 方法从人细胞组织如外周血单核细胞(PBMCs)中克隆扩增获得含人 VEGF 蛋白的编码区(coding region)的 cDNA（包括 VEGF121、165、183、189 等形式）。用于 PCR 的扩增上、下游引物参照已报道的 cDNA 核苷序列体外合成。
- 2) RT-PCR 克隆获得的 VEGF cDNA 经限制性内切酶酶切处理，再用 T4 连接酶将其与经相应的酶切处理的表达载体相连，经转化入感受细菌；
- 3) 再经筛选，扩增，提取质粒 DNA 及酶切鉴定，即获得含重组人 VEGF 基因的真核细胞表达载体。

获得 VEGF 蛋白在真核细胞（包括酵母细胞）高效稳定表达关键因素是 1) 高效地将表达载体转入细胞内 2) 筛选与扩增出带多拷贝 VEGF 基因的细胞株(克隆)。其中在本发明中，采用电转化(即电穿孔法)将 VEGF 表达载体转入真核酵母细胞中。电转化的仪器可采用 Bio-Rad 公司的 Gene pusler 进行。VEGF 基因在电转化后酵母细胞的表达量与 VEGF 基因在宿主染色体中整合的拷贝数正相关。而在表达质粒载体 pPic9k-VEGF 转化后的酵母细胞获

得了对 G418 的抗性,其抗药能力与表达质粒在酵母菌染色体中的拷贝数正相关。因此可通过筛选对 G418 具有高抗药性的克隆得到高表达目的基因的菌株。

在获到含多拷贝 VEGF 基因的酵母细胞株后,挑取数个克隆用于诱导表达 VEGF。诱导表达在摇床培养中进行,以 1%甲醇诱导。诱导表达 2-3 天后,收集酵母细胞培养上清液,离心后,再以 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定分析上清中所含的重组 VEGF 蛋白。

2. 以免疫亲和层析柱法从收集的细胞培养液中快速分离纯化 VEGF 蛋白

本发明的一大内容是采用亲和层析方法从收集的细胞培养上清液中分离提取 VEGF 蛋白。用于免疫亲和的层析柱填冲物包括偶联抗人 VEGF 抗体(如 avastin)或 VEGF 受体蛋白(如重组 VEGFR1, VEGFR2 受体蛋白等)的粒珠(如 Sepharose4B)。在本发明实施中,采用偶联了重组 VEGF-R1 受体蛋白的 Sepharose4B 填冲柱来分离提取 VEGF 蛋白为实例,其操作步骤包括:

- 1) 取收集的细胞培养上清液,经离心及以滤膜过滤后,将滤液上样至亲和层析柱,VEGF 蛋白由于经与 VEGF-R1 受体的非共价的耦联,被特异吸附于亲和层析柱中;
- 2) 上样完毕后,先以 PBS 洗脱去除杂蛋白,再以如低 pH 甘氨酸液洗脱层析柱,并同时收集被洗脱下的蛋白;
- 3) 收集的样品经调节 pH 至 7.0,再对 PBS 透析后即获得纯化的重组人 VEGF 蛋白;
- 4) 纯化的 VEGF 蛋白再经理化及生物活性鉴定,鉴定实验包括 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)/考马斯亮蓝染色;免疫印迹/ELISA 试验;与 VEGF 受体结合试验及体外促血管内皮细胞增殖实验等。

二. VEGF 蛋白的体外化学标记处理

本发明的另一大内容是 VEGF 的体外化学标记。本发明采用非放射性化学偶联标记方法对纯化的 VEGF 蛋白进行体外标记处理。可用于化学标记蛋白的常用标记物包括各种酶(辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,葡萄糖氧化酶,微过氧化物酶);荧光素(异硫氰酸荧光素(FITC);生物素-抗生物素及胶体金等;在本发明中,用于体外化学偶联标记 VEGF 蛋白的首选标记物是生物素(Biotin)。

生物素是一种小分子量的维生素,它与亲和素(avidin,又名卵白素)及亲和素样蛋白

质具有很高的结合能力。通过适宜的方法，生物素可以偶联到许多蛋白质，并不改变蛋白原有的生物学活性。生物素标记蛋白的原理是生物素通过-C=O 基与蛋白/多肽 N 末端的 α 氨基或赖氨酸残基的 ϵ 氨基连接反应而形成稳定的胺酞键。生物素标记的蛋白可与亲和素形成高度亲合、专一稳定结合，可用于 ELISA、dot-blot 或 Western-blot 等许多试验。

在本发明实施中，用于标记 VEGF 蛋白的生物素试剂是 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）酯酞活化的生物素。在 pH 7-9 的缓冲液中，NHS 活化的生物素能够非常有效的与蛋白质的伯氨基（-NH₂）反应，形成稳定的酞胺键。一个蛋白质通常包括多个可标记位点，包括氨基端的伯氨基以及赖氨酸侧链上的伯氨基。而生物素标记蛋白质的效果或效率高低则取决于蛋白质的大小、蛋白质表面伯氨基的分布以及生物素标记试剂的使用量。通常情况下，等量的蛋白质在低浓度条件下标记比在高浓度条件下标记所费的试剂多很多倍。在本发明中，可根据目的蛋白的浓度和分子量，对反应的摩尔比进行优化，计算所需标记试剂的量，获得理想的标记效果。

在本发明中，理想的或优化的标记条件如下：

- 1) 用于标记的试剂（NHS 活化的生物素）的终浓度为 9mM；
- 2) 标记生物素：待标记 VEGF 蛋白质的摩尔比为反应摩尔比控制在 10: 1 至 50: 1 间；
- 3) 标记的缓冲液 pH 为 7-9；
- 4) 标记的温度与时间：为室温下反应 30-60 分钟。

在该优化的标记条件下，平均每个 VEGF 蛋白抗体分子一般可偶联上 1-4 个生物素，获得较理想的标记效果。

在本发明实例中，采用的标记试剂与 VEGF 蛋白的反应摩尔比为 50: 1；其标记步骤如下：

- 1)、溶解 VEGF 蛋白质于 PBS 中；
- 3)、按上述计算结果，加入适量的标记试剂（NHS-生物素）与 VEGF 蛋白样品混合，并混匀；室温反应 30-60 分钟；
- 3)、通过透析或脱盐去除未反应的过量生物素，即得到生物素标记的 VEGF 蛋白。

三. 标记的或未标记的 VEGF 蛋白的用途

本发明的另一大内容还涉及 VEGF 蛋白(包括标记的或未标记的)的应用。

本发明的重组 VEGF 蛋白因保持有如内源性 VEGF 的生物活性（表现在能与 VEGF 受体高度特

异结合并可刺激血管内皮细胞分裂增生),可作为潜在药物成分用于治疗缺血性疾病。此外,本发明中的生物素标记的 VEGF 蛋白,可与亲和素(avidin)合并使用,构成生物素-亲和素检测系统(biotin-avidin system)。该检测系统具有检测迅速、灵敏、专一、稳定及多级放大效应等特点,在实验研究及临床体内外诊断上具有广泛的用途。其明显的用途至少包括:

- 1) 作为检测试剂用于体内外定性及定量检测 VEGF 及 VEGF 受体的表达;
- 2) 作为吸附剂用于体内外分离 VEGF 受体表达阳性的细胞(如血管内皮细胞)与组织等;
- 3) 作为非放射性显示剂,用于体内定位跟踪显示 VEGF 受体细胞表达阳性的细胞(如新生血管内皮细胞)与组织等。

其中有关本发明中的 VEGF 蛋白的几项应用描述如下:

1. VEGF 蛋白作为试剂应用于体外检测 VEGF 受体的表达

本发明的 VEGF 可作为试剂用于体外检测 VEGF 受体的表达。被检测的 VEGF 受体可以是以膜蛋白形式表达于细胞/组织中,培养细胞,也可以是以流离的或降解的可溶性分子存在于各种体液(如血清)及细胞培养上清液中。

生物素标记的 VEGF 如用于体外检测流离的 VEGF 受体,则可采用 ELISA 方法。如以抗人 VEGF 受体的抗体为包被抗体,以生物素标记的 VEGF 为检测试剂,以 ELISA 方法来检测样品中流离的 VEGF 受体为列,其步骤包括:

- 1) 用抗人 VEGFR 抗体包被 ELISA 板,4℃ 过夜;
- 2) 包被板以含牛血清白蛋白(BSA)封闭液,于室温封闭温育 1-2 小时;
- 3) 加入含流离 VEGF 受体的待检样品(如血清,细胞上清液等),37° C 孵育 1-2 h;
- 4) PBS-T 洗板×3,再加入辣根过氧化物酶标记的亲和素,37° C 孵育 1-2 h;
- 5) PBS-T 洗板×3,然后加入显色液(邻苯二胺)-3% H₂O₂,室温静置显色 10-20 min,再加入 1 mol/L HCL 终止反应,以酶标仪测定 490 nm 波长处各孔的吸光。根据显色 OD 结果并与参照物相比较,可估测待检样品中的流离 VEGF 受体溶度。

生物素标记的 VEGF 还可作为检测试剂用于免疫组化检测以表达或吸附于细胞及其周围组织中的 VEGF 受体。如以生物素标记的 VEGF 蛋白用免疫组化方法检测组织芯片或常规肿瘤病理切片组织中的 VEGF 受体为列,其步骤包括:

- 1) 在切片上滴加上以牛血清白蛋白(BSA)为主的封闭液,于室温封闭温育 1-2 小时;
- 2) 用双蒸水充分洗涤,在切片上滴加生物素标记的 VEGF 蛋白,于室温温育 1-2 小时;

- 3) 用洗脱液洗去多余样品, 滴加酶标记的亲合素, 于室温避光温育 30-60 分钟;
- 4) 用洗脱液洗净, 滴加底物, 避光温育 5-10 分钟, 以终止液终止反应;
- 5) 反应结束后, 于显微镜下判读检测结果。根据组织芯片、切片的检测结果及与临床资料比较, 可得到如检测符合率, 敏感度、稳定性及特异性等有关诊断参数。

2. VEGF 蛋白用于体内外分离吸附 VEGF 受体表达阳性细胞与组织

未标记的或生物素标记处理的 VEGF 蛋白还可用于体内外吸附或分离含 VEGF 受体的细胞与组织。如用生物素标记的 VEGF 蛋白体外吸附分离 VEGF 受体表达阳性的细胞或组织为列, 其步骤包括:

- 1) 先将亲和素(avidin)吸附在适当的固相载体上(如细胞培养板, 细胞培养皿, 硝酸纤维素膜或尼龙膜等);
- 2) 在固相载体上滴加含牛血清白蛋白(BSA)的封闭液, 温育 1-2 小时;
- 3) 用 PBS 洗涤, 在固相载体上滴加生物素偶联标记的 VEGF 蛋白, 温育 1-2 小时;
- 4) 再加入细胞或其他样品, 于室温温育 1-2 小时;
- 5) 用 PBS 洗涤后, 获得被吸附的细胞, 达到分离吸附 VEGF 受体表达阳性细胞的效果。

此外, 生物素标记处理的 VEGF 蛋白也可以与偶联有亲和素(avidin)的磁珠合并使用, 通过磁吸而达到简便而又快速分离 VEGF 受体蛋白质或 VEGF 受体表达阳性细胞的效果。

以上分离获得的 VEGF 受体蛋白或 VEGF 受体表达阳性的细胞(如新生血管内皮细胞)可用于进一步的实验研究(如用于建立体外血管增生模型及抗血管增生药物成分的筛选等)。

3. VEGF 蛋白用于建立血管内皮细胞的体外迁移/生长模型并以该模型开展抗血管内皮细胞迁移/生长药物的筛选

本发明中的 VEGF 还可用于建立由 VEGF 及其受体介导的血管内皮细胞的体外生长/迁移趋化模型。该模型可用于体外快速筛选抗血管内皮细胞生长/迁移的药物成分。体外迁移模型的建立可采用微孔隔离膜(膜的孔径大小为 4-8 μm , 血管内皮细胞在无 VEGF 或其他趋化因子引导下不会自由穿透之)。用 VEGF 蛋白及微孔隔离膜建立体外血管内皮细胞迁移模型, 包括以下步骤:

- 1) 微孔隔离膜的下层依次加入不同溶度 VEGF 蛋白(如 2、10、50、250、1250

- ng/ml；其中一管加入无血清的培养基为阴性对照），
- 2) 将血管内皮细胞置于隔离膜上层孔（细胞数在 10^4 – 10^5 间/孔）37℃ 孵育 4–24 h；
 - 3) 于显微镜下观察及测定完成迁移的细胞数。

该模型一旦建立，则可于抗血管内皮细胞/肿瘤细胞迁移药物的体外快速筛选，被筛选的药物包括中草药成分及其提取物等、抗体及融合蛋白、多肽及小分子化合物等。

附图说明

- 图 1 SDS-PAGE 分析转染酵母细胞培养上清中所含的重组 VEGF165 蛋白。
- 图 2 SDS-PAGE 及免疫印迹分析鉴定分离纯化的 VEGF165 蛋白。
- 图 3 生物素标记的 VEGF 蛋白为试剂成分用于检测转染细胞中 VEGF 受体的表达。
- 图 4 生物素标记的 VEGF 蛋白为试剂成分用于竞争性 ELISA 法来定量检测 VEGF 的水平。

本发明具体实施方式

实施例一：VEGF165 表达载体的构建。

1.1 VEGF165 基因 PCR 扩增

正向上游引物引物(VEGF-F-EcoR I)：ggg tag aat tcg cac cca tgg cag aag gag ga
反向下游引物引物 (v165-R-Not I)：gga ttc gcg gcc gcc cgc ctc ggc ttg tca ca
PCR 扩增体系：

5×Primestar buffer	10ul
dNTPs(2.5mM each)	4ul
Primer VEGF-F-EcoR I (10uM)	5ul
Primer V165-R-Not I (10 uM)	5ul
质粒 pQY-VEGF165	2ul
Primerstar 聚合酶	0.5ul
DD water	2ul
50ul	

PCR 扩增条件：94℃ 5 分/ 94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 40 秒, 共 20 个循环。

VEGF165 基因 PCR 扩增完毕，取少量琼脂糖凝胶电泳分析，于约 500bp 处有一扩增条带，片段大小与预期相符。

1.2 VEGF165-pPic9K 质粒的构建和鉴定

VEGF165 基因 PCR 扩增片段及 pPic9K 质粒分别用 *EcoR I* 和 *Not I* 双酶切，随后用琼脂糖凝胶电泳分离并回收目的片段。将上述两种回收的酶切片段各取约 10ng 混合后 16℃ 连接过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞。随机挑选阳性克隆若干，小量提取质粒 DNA，构建的表达载体 VEGF165-pPic9K 用 *EcoR I* 和 *Not I* 双酶切后，经琼脂糖凝胶电泳分析，于约 500bp 处有一酶切条带，片段大小与预期相符。随后挑选两个经酶切鉴定正确的克隆送往上海鼎安公司进行 DNA 序列测定，测序引物选择通用引物 α -factor primer，测序结果证明 VEGF165 基因片段已经插入到质粒 pPic9K 的预期位置，其读码框与 α -factor 分泌信号相符，基因全长未见突变。

实施例二：表达载体转化 GS115 宿主菌

2.1 采用碱裂解-PEG 纯化法从 100ml 菌液中制备 VEGF165-pPic9K 质粒。具体步骤参考《分子克隆三》相关章节进行。

2.2 取两管各约 15ug VEGF165-pPic9K 质粒分别用 30U *Sal I* 和 30U *Bgl II* 彻底酶切线性化。酶切结束后，质粒用乙醇沉淀并分别用 5ul 超纯无菌去离子水重溶。

2.3 GS115 感受态细胞的制备

- (1) 接种单克隆于 3ml YPD 培养基，30℃ 培养过夜
- (2) 按 300ul 上述新鲜菌液于 300 ml YPD 培养基中，30℃ 培养 18 小时。此时 OD 值为 1.3 左右。
- (3) 1500g 离心 5 分钟收集细菌，随后用 300ml 冰冷的无菌去离子水重悬。
- (4) 1500g 离心 5 分钟收集细菌，随后用 150ml 冰冷的无菌去离子水重悬。
- (5) 1500g 离心 5 分钟收集细菌，随后用 20ml 冰冷的 1M 山梨醇重悬。
- (6) 1500g 离心 5 分钟收集细菌，随后用 500ul 冰冷的 1M 山梨醇重悬，放置于冰上。

2.4 电转化

采用 Bio-Rad 公司的 Gene pusler 进行电转化。电转杯间隙 1mm,

电转条件 1000KV 25uF 200 Ω 。电击结束后立刻加入 1ml 1M 山梨醇, 将细菌转移至 50ml 无菌离心管中, 30℃静置 1 小时。然后加入 1ml YPD, 30℃摇床培养 4 小时。将细菌涂布于 RD-His 平板, 培养 3 天。

2.5 筛选整合有多拷贝 VEGF165 基因的克隆

通常目的基因的表达量与目的基因在宿主菌染色体中整合的拷贝数正相关。同时转化后的酵母获得了对 G418 的抗性, 且其抗药能力也与表达质粒在酵母菌染色体中的拷贝数正相关。因此通过筛选对 G418 具有高抗药性的克隆便可能得到高表达目的基因的菌株。

筛选方法如下:

(1) 配制含 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0mg/ml G418 的 YPD 平板各两块备用。

(2) 吸取 5 ml YPD 培养基滴于转化平板表面, 用无菌 Tips 将所用阳性克隆全部刮下, 并转移至 15 ml 无菌离心管中充分混匀。

(3) 加入无菌甘油至终浓度为 20%, 充分混匀后 1ml 分装, 留一管备用, 其余立即冻存于 -20℃。

(4) 取 10ul 上述菌液, 用无菌水梯度稀释后分别涂布于 YPD 平板, 30℃培养过夜, 第二天通过菌落计数计算菌液的滴度 (cfu/ml)。

(5) 取一管冻存菌融化 (第 3 步所得), 根据第 4 步测定的滴度。取适量菌液用无菌水稀释至 106cfu/ml, 然后取 100ul 分别涂布于第 1 步配制的梯度浓度的 G418 平板上。30℃培养 2-5 天。

3、诱导表达

从低浓度 G418 平板和高浓度 G418 平板分别随机挑取数个克隆用于诱导表达试验。诱导步骤如下。

(1) 挑取单克隆接种于 20ml BMGY 培养基中, 培养至 OD600=2-6;

(2) 1500g 离心 5 分钟收集菌体, 并用 2ml BMMY 培养基重悬;

(3) 1500g 离心 5 分钟收集菌体, 并用 2ml BMMY 培养基重悬;

(4) 取 1ml 重悬的菌液转移至 15ml 圆底离心管中, 放入摇床进行诱导表达。

(5) 另 1ml 重悬的菌液转移至 250ml 无菌三角瓶中, 加入 19ml 新鲜 BMMY 培养基, 放入摇床进行诱导表达。

(6) 每 12 小时补加 100% 的甲醇至终浓度为 0.5%, 每 24 小时取样适量; 样品 12000rpm 离心 2 分钟后将上清和菌体分别冻存于 -20℃。

实施例三: VEGF 目的蛋白的检测

采用 SDS-PAGE 及 Western-blot 等方法检测目的蛋白。经 DNA 测序鉴定正确的表达质粒采用电激转化法转化 GS115 酵母宿主菌, 获得上千个重组克隆。随后用梯度浓度的 G418 进行筛选, 获得数十个在含 4 mg/ml G418 的 YPD 平板上生长良好的菌落。挑取 3 个克隆进行诱导表达。诱导 96 小时后, 离心取表达上清进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析, 以质粒 pPic9K 转化克隆表达上清作为阴性对照。结果如图 1: 与阴性组对比 (lane 3), VEGF165-pPic9K-GS115 表达上清经 DTT 还原后, 在约 22-25KD 左右可见特异性条带 (lane 2, 4 和 5); 以抗人 VEGF 抗体 Avastin 作为一抗及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记-山羊抗人 IgG-Fc 多克隆抗体 (1:1000 稀释) 为二抗进行 Western-blot 分析, 也证明此特异性条带正是人 VEGF 蛋白。

实施例四: 以免疫亲和层析柱法分离纯化 VEGF 蛋白

1. VEGF 蛋白的分离纯化

取培养液上清液, 经离心 (2000 rpm x10min) 及以 0.45 μ m 滤膜过滤后, 滤液上样于含 VEGFR1 蛋白的亲合层析柱中 (1L/10ml 层析柱); 亲合层析柱先以 PBS 洗脱去除杂蛋白, 再以低 pH (2.7) 甘氨酸 (0.1M) 洗脱液被吸附的融合蛋白。洗脱液再以 1mol/L Tris (pH9.0) 调节 pH 至 7.0, 再对 10 倍的体积的 1x PBS 透析 12~16 后即获得纯化的 VEGF 蛋白。纯化的蛋白以 PIERCE-BCA (bicinchoninic acid) 方法测定蛋白浓度, 及以 12% SDS-PAGE 及考马斯亮蓝 (R-250) 染色观察测定。如图 2 左示, 变性还原样品泳带在 25 kd 左右, 与其基因序列推测的人 VEGF165 蛋白分子量相符; 而在未变性样品中, 染色泳带在 50 kd 左右, 为 VEGF165 的双倍体分子量相符。说明分离纯化获得的 VEGF165 蛋白主要以双倍体形式存在。

上述平行样品蛋白在 SDS-PAGE 电泳结束后, 将蛋白质转印至 PVDF 膜 (30 V, 4° C, 16 h), 再以 1%BSA 封闭, 室温 1~2h 后, 以抗人 VEGF 抗体作为一抗, 37° C 孵育 1 h, 再加入辣根

过氧化物酶（HRP）标记-山羊抗人 IgG-Fc 多克隆抗体（1：1000 稀释），37° C 孵育 1 h。膜经充分漂洗后，加入显色液（邻苯二胺）-3% H₂O₂，以 DAB 显色渍特异性条带出现后，蒸馏水漂洗终止反应。免疫印迹试验结果如图 2 右示：在未变性样品中，在相对分子质量为 50 kd 左右的位置有阳性反应泳带（与双倍体的 VEGF165 蛋白的预期分子量大小相符）。免疫印迹结果表明纯化获得的 VEGF 蛋白保持其免疫原活性，可被抗人 VEGF 抗体特异识别与结合。

实施例五 VEGF 蛋白的体外生物素化学标记

在本发明实例中，生物素标记试剂的制备浓度为 9mM，采用的标记试剂与 VEGF 蛋白的反应摩尔比为 50：1。其标记包括以下步骤：

- 1) 溶解 50-200 ug VEGF 蛋白质于 200-700 ul PBS 中；
- 2) 剪下一管生物素标记试剂，剩余的试剂放为-20 度冻存。加入 200ul 试剂（水、DMF 或 DMSO）溶解，并用移液器混匀；
- 3) 按上述计算结果，加入适量的标记试剂与蛋白样品混合，并混匀；
- 4) 室温反应 30-60 分钟；
- 5) 通过透析或脱盐去除未反应的过量生物素，即得到生物素标记的 VEGF 蛋白。

实施例六 标记处理的 VEGF 蛋白用于检测细胞/组织中的 VEGF 受体的表达

在本实例中，生物素标记的 VEGF 蛋白作为检测试剂用于免疫组化来体外检测重组人 VEGFR1 基因转染的细胞中的 VEGF 受体的表达，以次来进一步说明本发明的生物素标记的 VEGF 蛋白的实际用途。为此，取对数生长期的 CHO 细胞，胰酶/5mM EDTA 常规消化后，以 1×10^5 细胞/孔接种 6-孔塑料培养板，37° C，5% CO₂ 培养过夜；第 2 天，在 100 μ L 无血清、无抗生素的 DMEM 加入 6 μ L fugen6 与不同量的含重组人 VEGFR1 基因的质粒及对照载体 DNA（1-2 μ g）混匀，制备成 fugen6-DNA 混合液，室温放置 15 min 后，滴加至 CHO 细胞中；在转染 48h 后，CHO 细胞经 1x PBS 液漂洗及 90% methanol 4°C 20 min 固定后，加入含生物素标记的 VEGF165 蛋白（1：1000 稀释，200 ul/孔），37° C 1 h，以 PBS 液洗脱，再加入辣根过氧化物酶标记的 Avidin（Sigma，1：2000 稀释，300 ul/孔），37° C 1 h，再以 PBS 液洗脱，然后加入显色液（邻苯二胺：DAB-3% H₂O₂，）室温 5-10 min。PBS 液漂洗终止反应，置于观察显色反应。

结果如图 3 所示：VEGFR1 基因转染组中有近 5-10%的细胞明显呈显色阳性，而对照载体转染组无显色阳性细胞。此实验结果证明生物素标记的 VEGF 蛋白可特异识别与结合转染细

胞中表达的 VEGF 受体 (VEGFR1) 蛋白。

实施例七： VEGF 蛋白用于检测流离的 (或可溶性) VEGF 受体及定量检测 VEGF 的水平

本发明中的 VEGF 蛋白 (包括生物素标记处理的 VEGF 蛋白) 还可与其他试剂成分合并使用, 组成试剂盒, 用于体外检测各种生物样品 (如血清、细胞裂解液、细胞培养上清液等) 中可与 VEGF 蛋白结合的物质 (如流离的或可溶性 VEGF 受体) 或定量检测 VEGF 的水平。其中, 同 VEGF 蛋白合并使用的试剂盒成分包括抗人 VEGF 抗体, 可溶性 VEGF 受体等。该类试剂盒可既可用于以两步法/夹心 ELISA 法或免疫印迹等方法来检测可溶性 VEGF 受体, 也可用于以竞争性 ELISA 法来检测 VEGF 的水平。

如用标记处理的 VEGF 蛋白及抗人 VEGFR1 抗体, 采用夹心 ELISA 法来检测样品中可溶性 VEGFR1 受体为例, 其检测步骤包括:

- 1) 用抗人 VEGFR1 抗体包被 96-well-ELISA 板 ($2 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{l/孔}$), 4°C 过夜;
- 2) 经 1x PBS 液漂洗及 2% BSA (in PBS-0.1% tween20 液) 室温封闭 1~2h 后, 分别加入待检的样品, 37°C 孵育 2 h;
- 3) 经 PBS-T 洗脱 3 次后, 加入生物素标记标记的 VEGF 蛋白 (1: 4, 37°C 孵育 2 h; 4) 经 PBS-T 洗脱 3 次后, 再加入辣根过氧化物酶标记的 Avdin (1: 100000), 37°C 孵育 1 h;
- 5) 经 PBS-T 洗脱 5 次后, 加入显色液 (邻苯二胺)-3% 双氧水, 室温 10-20 min, 至显
- 6) 加入 1 mol/L HCL 终止反应, 以酶联免疫仪测定测定 490 nm 波长处各孔的吸光值; 根据 OD 值并与正常参照物 (如重组可溶性 VEGFR1 受体蛋白) 相比较, 计算出检测的样品中所含流离的或可溶性 VEGFR1 受体蛋白的水平。

同理, 生物素标记的 VEGF 蛋白如与其他试剂成分 (如抗人 VEGF 抗体) 及已知溶度的 VEGF 蛋白参照物 (如重组 VEGFR 蛋白) 合并使用, 构成竞争性 ELISA 试剂盒, 可用于体外检测各种生物样品 (如血清、细胞裂解液、细胞培养上清液等) 中 VEGF 的水平。

如以竞争性 ELISA 法来检测样品血清中 VEGF 的水平为例, 其检测步骤包括:

- 1) 用抗人 VEGF 抗体包被 96-well-ELISA 板 ($2 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{l/孔}$), 4°C 过夜;
- 2) 经 PBS 液漂洗及 2% BSA (in PBS-0.1% tween20 液) 室温封闭后, 分别加入待检的样品, 37°C 孵育 2 h;
- 3) 经 PBS-T 洗脱后, 加入已知固定溶度的生物素标记的 VEGF 蛋白 (1: 4000) 及待检的样品 (血清), 37°C 孵育 2 h; 另设 VEGF 蛋白对照参照组, 该组加入已知固定溶度的生

物素标记的 VEGF 蛋白 (1: 4000) 及不同溶度的未标记的 VEGF 蛋白参照物, 37° C 孵育 2 h;

4) 经 PBS-T 洗脱后, 加入辣根过氧化物酶标记的 (1: 100000), 37° C 孵育 1 h;

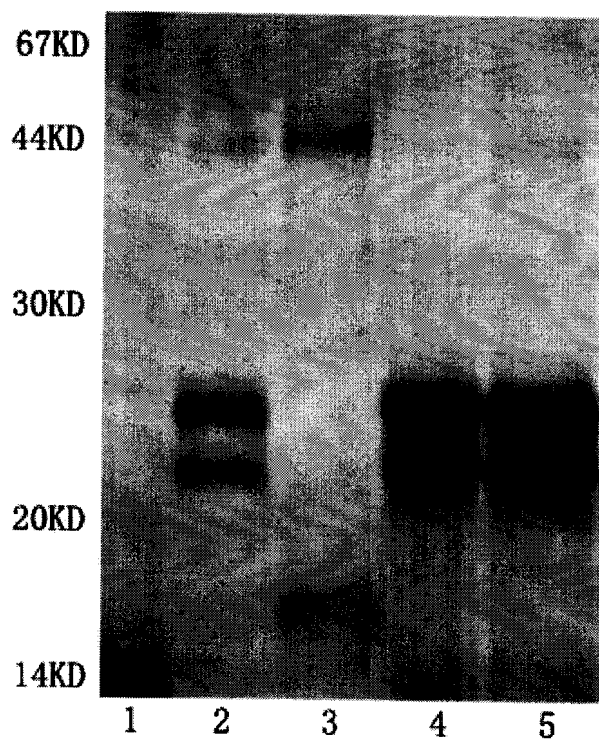
5) 经 PBS-T 洗脱后, 加入显色液(邻苯二胺)-3% 双氧水, 室温 10-20 min, 至显色;

6) 加入 HCL 终止反应, 以酶联免疫仪测定测定 490 nm 波长处各孔的吸光值;

7) 根据 OD 值并与含正常 VEGF 蛋白相比较, 计算出检测的样品中所含 VEGF 蛋白的水平。

因与生物素标记的 VEGF 蛋白竞争结合抗人 VEGF 抗体之故, 样品中所含 VEGF 蛋白的量与 OD 值呈反比关系, 即 VEGF 蛋白的量越高, OD 值越低。

竞争性 ELISA 结果如图 4: 在仅加入生物素标记的 VEGF 蛋白(biot-VEGF)的样品组中, 其 OD 值与加入的 biotVEGF 蛋白的量基本成线性正比关系; 而在加入固定溶度的生物素标记的 VEGF 蛋白 (1:4000) 及不同溶度的未标记的 VEGF 蛋白参照物组中 (VEGF+biotVEGF), 其 OD 值与加入的未标记-VEGF 蛋白的量成反比关系: 即加入的未标记 VEGF 蛋白的量越高, 其 OD 值越低。



- Lane 1 Protein Marker
Lane 2 VEGF-pPic9k-GS115 1号克隆表达上清
Lane 3 pPic9k-GS115 表达上清 (阴性对照)
Lane 4 VEGF-pPic9k-GS115 2号克隆表达上清
Lane 5 VEGF-pPic9k-GS115 3号克隆表达上清

图 1

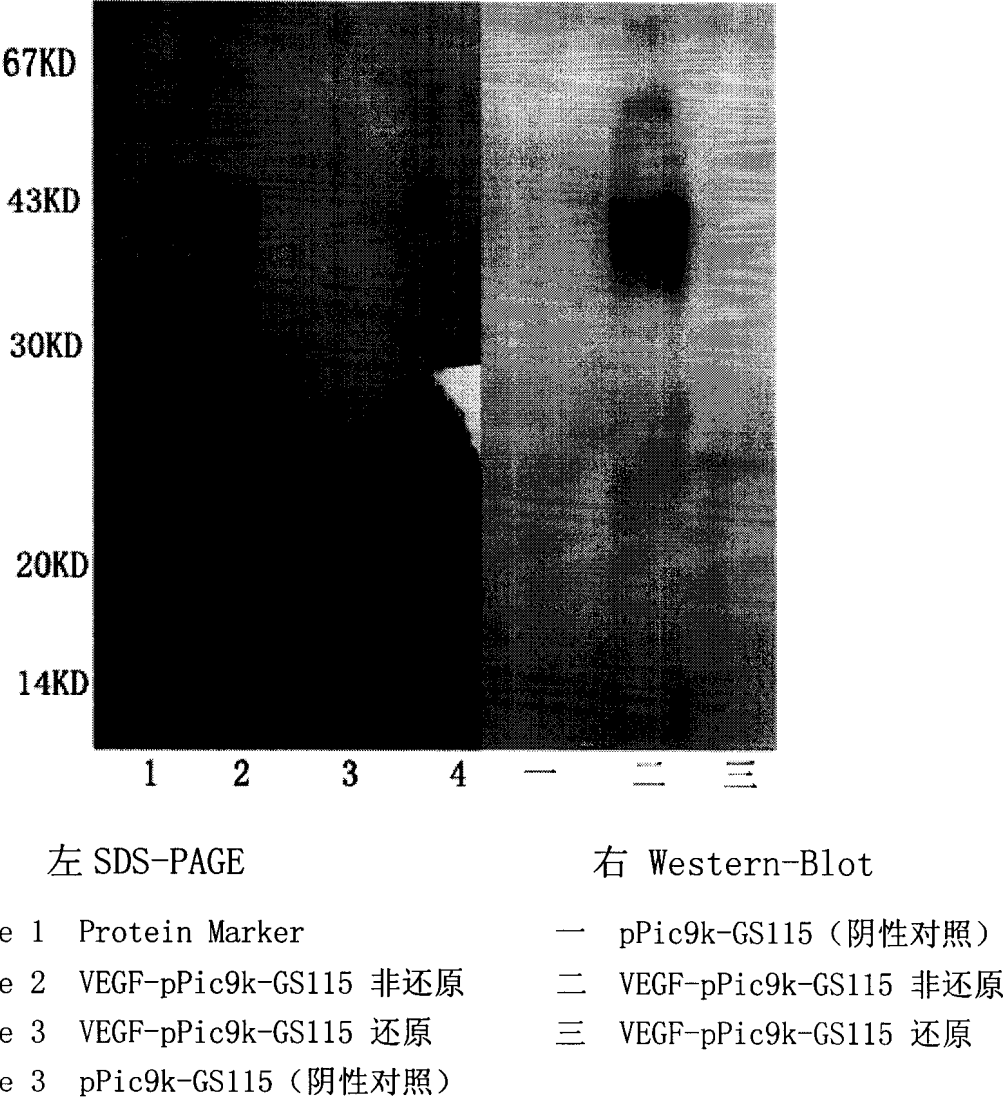


图 2

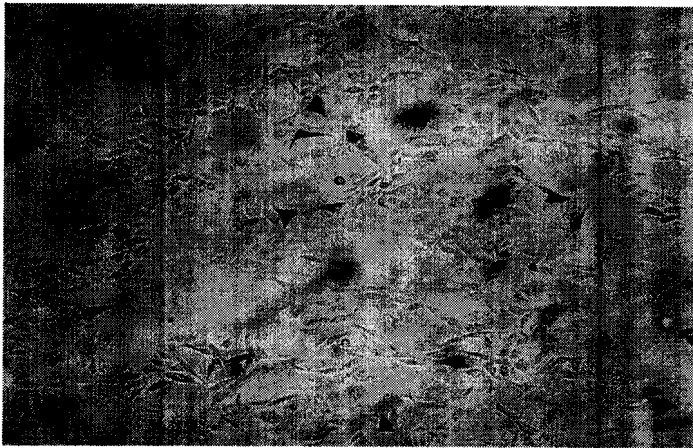


图 3

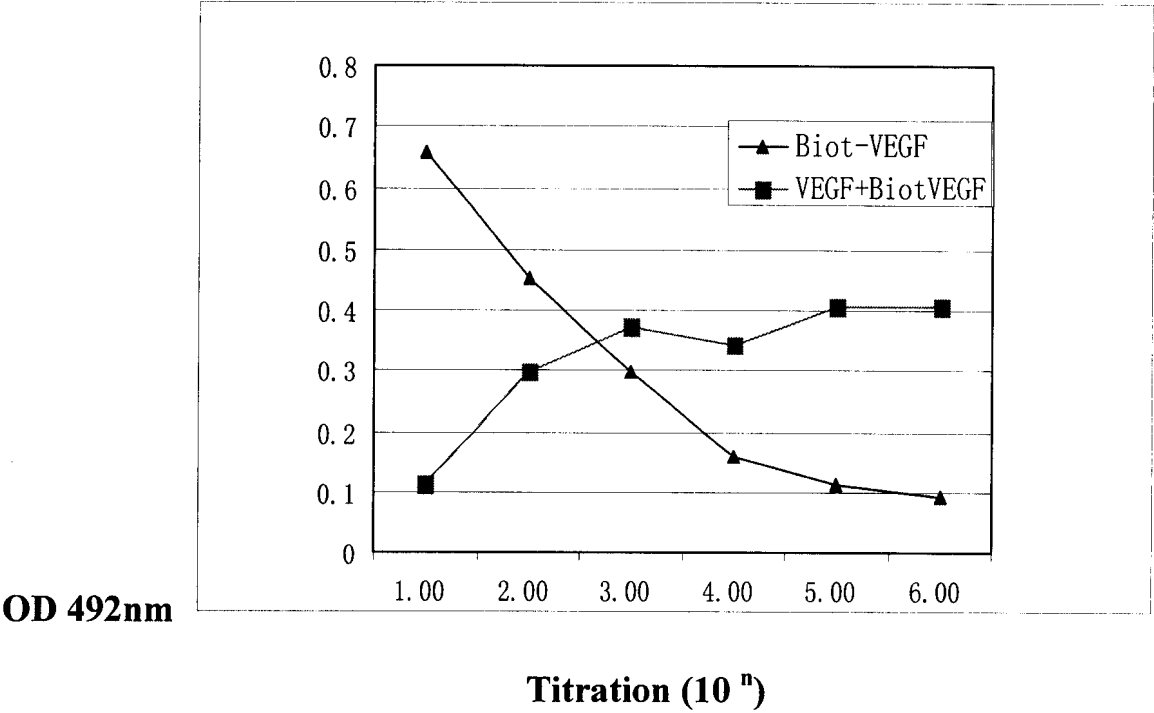


图 4

专利名称(译)	重组人血管内皮细胞生长因子的分离纯化、体外化学标记及其应用		
公开(公告)号	CN101418042A	公开(公告)日	2009-04-29
申请号	CN200710047352.2	申请日	2007-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	苏州思坦维生物技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	苏州思坦维生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州思坦维生物技术有限责任公司		
[标]发明人	周群敏 罗师平 周青 陶飞龙 胡红群 谢凤娟		
发明人	周群敏 罗师平 周青 陶飞龙 胡红群 谢凤娟		
IPC分类号	C07K14/475 C07K1/14 C12N15/09 C12N15/12 G01N33/68 G01N33/53 C12N5/08 C12N5/071		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域。血管内皮细胞生长因子(VEGF)在血管新生或增生中起着重要作用，但体内天然的VEGF含量低且半衰期短，故很难提取到足够量的内源VEGF蛋白以满足日益增长的实验研究及临床需要。本发明公开了一种以重组基因工程及免疫亲和层析柱法经济方便地制备及提取纯化重组人VEGF蛋白的方法。本发明还公开了对纯化的VEGF蛋白进行体外非放射性化学偶联标记处理的方法。本发明的VEGF蛋白(包括未标记的或化学偶联标记的)在实验研究及临床诊疗上具有广泛的用途。

5×Primestar buffer	10ul
dNTPs (2.5mM each)	4ul
Primer VEGF-F-EcoR I (10uM)	5ul
Primer V165-R-Not I (10 uM)	5ul
质粒 pQY-VEGF165	2ul
Primerstar 聚合酶	0.5ul
DD water	2ul

50ul