

重组人 VEGF165 蛋白在毕赤酵母中 高效表达与多克隆抗体的制备

王晓^{1,2}, 黄晓平^{1,2}, 周宇^{1,2}, 刁勇^{1,2}

(1. 华侨大学 分子药物研究院, 福建 泉州 362021;

2. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 构建 pPIC9K-VEGF165 分泌型载体,线性化后电击转化至 GS115(his4)中,经最小葡萄糖培养基(MD 平板)筛选出阳性表达菌株并进行聚合酶链式反应(PCR)验证.菌株发酵上清液经 Sephadex G-25, Heparin Sepharose FF 和 Sephacryl S-100 层析介质分离纯化,目的蛋白纯度达到 95%,相对分子质量约为 24 ku.结果表明:重组人 VEGF165 蛋白能诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖,提高 HUVEC 细胞的活性;重组人 VEGF165 蛋白免疫小鼠,制备多克隆抗体,间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测抗体效价达 1:51 200.

关键词: 重组人 VEGF165 蛋白;多克隆抗体;毕赤酵母;高效表达

中图分类号: Q 815

文献标志码: A

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 又称血管通透因子,是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可作用于血管内皮细胞,具有促进血管内皮细胞分裂、增殖和调节血管的功能.最近研究表明:在大多数肿瘤中 VEGF 通过与其受体 VEGFR 相互作用上调新生血管的生成,已经成为肿瘤新生血管生成中最重要的细胞因子.VEGF 具有 5 个亚型,分别是 VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 和 VEGF206^[1],其中,VEGF165 对肿瘤生长的影响最为重要.实验研究表明:VEGF 的单抗能有效地抑制肿瘤,特别是实体瘤的生长,已经开发为一种有效的抗肿瘤药物^[2-4].虽然针对 VEGF 的抗体可以抑制肿瘤的发展,但因 VEGF 其他的亚型可能参与正常的生理功能,如减少血管内血栓的形成及血栓性闭塞,抑制内膜增生等^[5].因此,仅针对在肿瘤生长过程中最重要的 VEGF165 而开发单克隆抗体将会减少不良反应的发生^[6].目前,制备多克隆抗体有抗原表位预测、多肽合成、免疫动物等方法,如果根据抗原表位预测的方法制备抗体,必然会带来费用高、工作量大的问题,而且重叠区之间的表位有可能被忽略,不能鉴定出目的蛋白上所有的 T 细胞表位.为了快速制备 VEGF165 多克隆抗体并用于后续实验,课题组选择利用纯化后的 VEGF165 蛋白直接免疫小鼠来获得多克隆抗体.本文采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法,从人肝细胞中克隆出 VEGF165 基因,构建毕赤酵母分泌表达型载体 pPIC9K-VEGF165,通过 G418 筛选得到高表达菌株,经生物反应器高密度发酵,层析介质纯化,得到纯度较高的重组人 VEGF165 蛋白,并对其促进血管内皮细胞活性与增殖进行初步验证.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞株和质粒 *E. coli* DH5 α , GS115(his4), pPCI9K 均为华侨大学生物医学学院保存;人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购于美国典型菌种保藏中心(ATCC).

收稿日期: 2014-03-05

通信作者: 刁勇(1967-),男,教授,主要从事新药研发、基因药物的研究. E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271691);国际科技合作项目(2011DFG33320);福建省科技重大项目(2013N5007);华侨大学科研基金资助项目(11HZR19)

1.1.2 实验动物 昆明(KM)小鼠购于福建医科大学.

1.1.3 主要酶和试剂 限制性内切酶 *Xho* I, *Eco* R I, *Stu* I (辽宁省宝生物大连有限公司); T4DNA 连接酶(美国 Thermo Scientific 公司); D-生物素、D-山梨醇(美国 Sigma 公司); 无氨基酵母氮源(美国 Amresco 公司); DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(上海市碧云天生物技术有限公司); Sephadex G-25, Heparin Sepharose FF, Sephacryl S-100 等层析介质(美国 GE Healthcare Life Sciences 公司); 鼠抗 VEGF 单抗、山羊抗鼠二抗(英国 Abcam 公司).

1.2 方法

1.2.1 VEGF165 基因的扩增 根据 GenBank 数据库中人 HSPB7 基因(XM_342966)的序列设计一对引物,上游引物为 vP: 5'-ATA CTCGAGAAGAGAGCACCCATGGCAGAAGGAGG-3', 引入 *Xho* I 酶切位点; 下游引物为 vF: 5'-CTCGAATTCTCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3', 引入 *Eco* R I 酶切位点, 通过 RT-PCR 方法从人肝细胞中提取总 RNA, 然后反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用 Pyrobest DNA 聚合酶进行特异性扩增.

1.2.2 重组表达载体的构建与鉴定 PCR 产物进行凝胶回收, 回收的 VEGF165 基因与 pPIC9K 质粒分别进行 *Xho* I 和 *Eco* R I 酶切, T4 连接酶连接回收后的目的片段, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 通过氨苄(1 mg \cdot mL⁻¹)抗性筛选出阳性克隆, 提取质粒并经 PCR 和酶切鉴定. 委托江苏省南京市金斯瑞生物科技有限公司对重组质粒进行测序分析.

1.2.3 GS115-VEGF165 工程菌株的构建与鉴定 pPIC9K-VEGF165 表达载体经 *Stu* I 线性化、电转化至感受态的毕赤酵母 GS115(his4), 涂布含 G418 的 MD 平板来筛选高拷贝的转化子. 待菌落长出, 挑取单克隆菌株进行 PCR 鉴定. 将 PCR 结果为阳性的克隆按照文献[7]中的方法进行诱导表达. 利用 VEGF ELISA 方法测定发酵上清液中 VEGF165 的表达量, 并将发酵上清液经 SDS-PAGE 分离, 电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 质量分数为 5% 的牛血清白蛋白(BSA)封闭 2 h, 室温孵育鼠抗 VEGF 抗体 2 h, 磷酸盐吐温缓冲液(PBST, 磷酸盐缓冲液与体积分数为 0.5% 的吐温 20)漂洗 3 次, 每次 10 min, 室温孵育山羊抗鼠抗体 2 h, PBST 漂洗 3 次; 最后使用辣根过氧化物酶(HRP)底物电化学发光免疫(ECL)检测, Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像.

1.2.4 重组人 VEGF165 蛋白分离纯化 发酵上清液经 Sephadex G-25 凝胶过滤层析, Heparin Sepharose FF 肝素亲和层析, Sephacryl S-100 凝胶过滤层析, 得到重组人 VEGF165 蛋白, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE).

1.2.5 重组人 VEGF165 蛋白对 HUVEC 活力的影响 选取对数生长期的 HUVEC 细胞, 以 5 000 个 \cdot 孔⁻¹ 的密度接种至 96 孔板, 待细胞贴壁后加入重组人 VEGF165 蛋白, 至终质量浓度分别为 12.5, 25, 50, 100, 200 ng \cdot mL⁻¹, 对照组加入等体积的生理盐水. 于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO₂ 条件下继续培养 48 h, 每孔加 10 μ L 噻唑蓝(MTT, 5 mg \cdot mL⁻¹)培养 2 h. 再加入 200 μ L 二甲基亚砷(DMSO)溶解, 酶标仪检测 490 nm 处吸光值, 计算细胞存活率.

1.2.6 重组人 VEGF165 蛋白对 HUVEC 增殖的影响 5-乙炔基-2-脱氧尿苷(Edu)是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶渗入正在复制的 DNA 分子中, 能快速检测细胞 DNA 复制活性及细胞增殖. 取对数生长期的 HUVEC 细胞, 以 5 000 个 \cdot 孔⁻¹ 的密度接种至 96 孔板, 加入重组人 VEGF165 蛋白, 至终质量浓度分别为 25, 200 ng \cdot mL⁻¹, 对照组加入等体积的生理盐水, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO₂ 条件下继续培养 48 h. 再加入 Edu 孵育 2 h, 弃培养基, 固定细胞, 洗涤, Hoechst 33258 复染、洗涤后拍照. 利用 Image pro-Plus 6.0 软件分别对 Edu 阳性细胞(新增殖的细胞)和 Hoechst 33258 阳性细胞(所有细胞)进行计数, 统计分析新增殖细胞占总细胞数目的百分比.

1.2.7 VEGF165 多克隆抗体的制备 0.1 mL 纯化的重组人 VEGF165 蛋白(1 mg \cdot mL⁻¹)与 0.1 mL 弗氏完全佐剂混匀后, 肌肉注射小鼠腋下和腹股沟处进行初次免疫. 此后每隔 1 周进行 1 次免疫, 共 3 次, 最后采用 0.1 mL 重组人 VEGF165 蛋白(1 mg \cdot mL⁻¹)与 0.1 mL 弗氏不完全佐剂混合液进行免疫, 1 周后采取眼球取血, 分离血清, 测定多克隆抗体效价.

1.2.8 多克隆抗体效价的测定 用纯化的重组人 VEGF165 蛋白(50 μ g \cdot mL⁻¹) 100 μ L \cdot 孔⁻¹ 室温包被酶标板过夜, PBST(0.01 mol \cdot L⁻¹ 磷酸盐缓冲液, 体积分数为 0.5% 的吐温 20)洗涤 5 次; 加入

150 μL 质量分数为 1% 的 BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 洗涤 5 次后依次加入小鼠免疫血清(以未进行免疫的正常小鼠血清作为阴性对照)孵育 2 h, PBST 洗涤 5 次; 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗孵育 2 h, PBST 洗涤 5 次; 加入底物四甲基联苯胺(TMB)室温显色 15 min, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸终止, 酶标仪测定吸光值. 按照文献[8]中的方法计算抗体效价.

2 实验结果

2.1 重组表达质粒(pPIC9K-VEGF165)的构建与鉴定

重组表达质粒 pPIC9K-VEGF165 的酶切图谱显示: 经 *Eco* R I 与 *Xho* I 双酶切后出现了与 VEGF165 目的基因大小相同的条带, 约 500 bp, 如图 1 所示. 图 1 中: M 泳道为 DNA 标准相对分子质量; 1 泳道为 VEGF165 DNA 分子; 2 泳道为以 *E. coli* DH5 α /pPIC9K-VEGF165 为模板的 PCR 扩增产物; 3 泳道为 *Eco* R I 酶切 pPIC9K-VEGF165 产物; 4 泳道为 *Eco* R I, *Xho* I 双酶切 pPIC9K-VEGF165 产物. 基因测序的结果进一步证实 pPIC9K-VEGF165 重组质粒构建成功.

2.2 重组人 VEGF165 蛋白的表达与鉴定

重组质粒 pPIC9K-VEGF165 电转化至 GS115(his4), 涂布含有 G418 的 MD 平板, 筛选出高拷贝的单菌落, 单菌落 PCR 扩增片段为 500 bp, 如图 2 所示. 图 2 中: M 泳道为 DNA 标准相对分子质量; 1 泳道为 VEGF165 DNA 分子; 2~4 泳道为以 GS115/pPIC9K-VEGF165 单克隆为模板的 PCR 扩增产物;

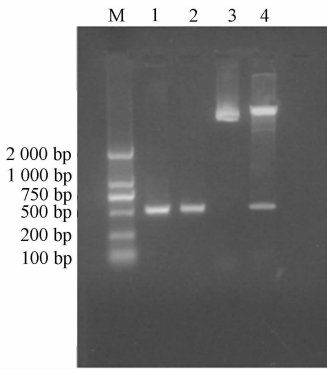


图 1 pPIC9K-VEGF165 重组质粒的鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant vector pPIC9K-VEGF165

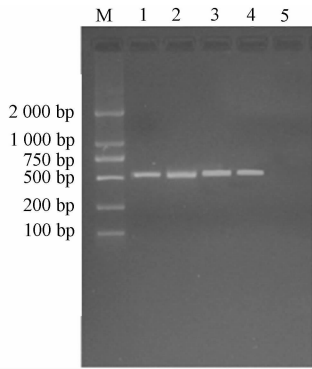


图 2 GS115(his4) 阳性转化子菌落 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of GS115(his4) positive transformants by colony PCR

5 泳道为 GS115/pPIC9K 单克隆为模板的 PCR 扩增产物. 按照文献[7]中报道的方法, 阳性克隆进行生物反应器发酵, ELISA 测得发酵上清液中重组人 VEGF165 蛋白表达量达 $230\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 蛋白印迹法结果显示: 转染了重组质粒的工程菌能检测到 VEGF165 阳性条带的存在, 而未转染重组质粒的菌落未能检测到 VEGF165 阳性条带, 如图 3 所示. 图 3 中: 1 泳道为 GS115/pPIC9K 酵母发酵上清液的蛋白质免疫印记结果; 2 泳道为 GS115/pPIC9K-VEGF165 酵母发酵上清液的蛋白质免疫印记结果.

2.3 重组人 VEGF165 蛋白的纯化

重组人 VEGF165 蛋白的分离纯化包括硫酸铵预处理及三步凝胶层析. 预处理后的上清液经 Sephadex G-25 凝胶层析, 洗脱经 Heparin Sepharose FF 肝素亲和层析, 分别用 $0.1, 0.3, 0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液洗脱, 洗脱峰过 Sephacryl S-100 凝胶层析, 洗脱峰为重组人 VEGF165 蛋白, 如图 4 所示. 图 4 中: 1 泳道为标准蛋白相对分子质量; 2 泳道为 GS115/pPIC9K 发酵上清; 3 泳道为 GS115/pPIC9K-VEGF165 发酵上清; 4 泳道为肝素柱 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 洗脱峰; 5 泳道为肝素柱 $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 洗脱峰; 6 泳道为肝素柱 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 洗脱峰; 7 泳道为 S-100 分子筛柱洗脱峰. 最终的重组人 VEGF165 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 图片经过 Quantity one 软件分析, 得出重组人 VEGF165 蛋白纯度约为 95%, 超滤浓缩至质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用.

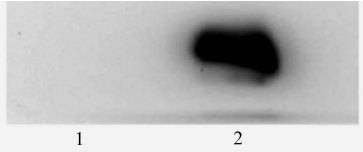
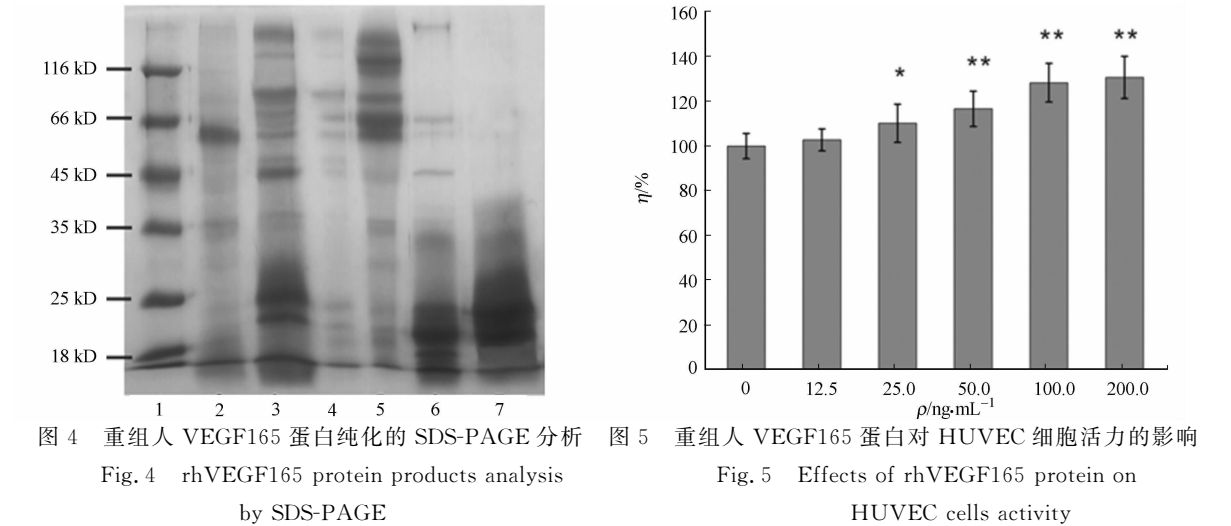


图 3 重组人 VEGF165 蛋白 Western blotting 鉴定
Fig. 3 Western blotting analysis of rhVEGF165 protein

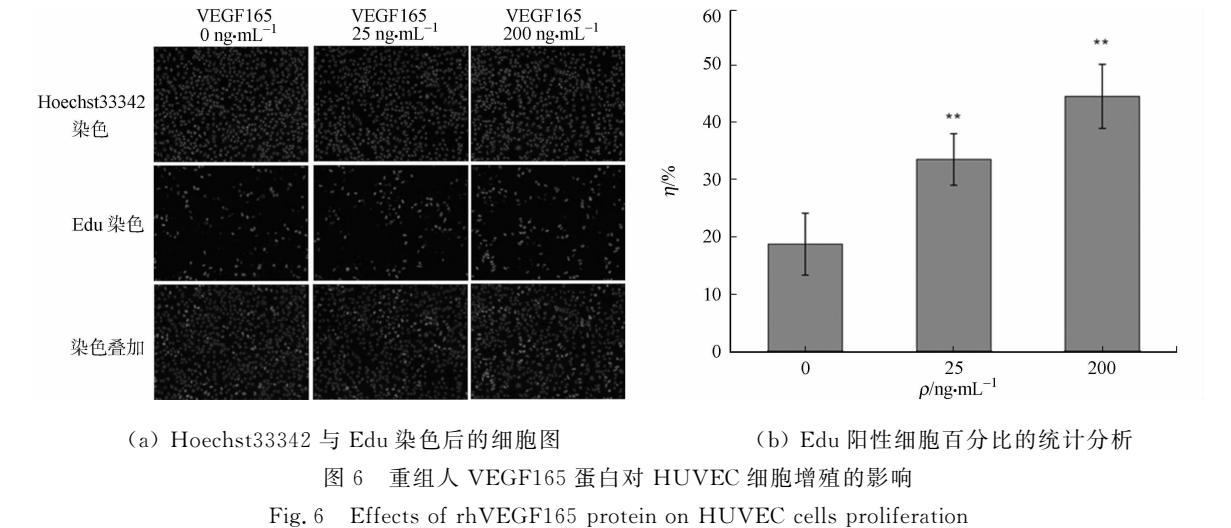
2.4 重组人 VEGF165 蛋白对 HUVEC 活力的影响

MTT 法检测结果显示:重组人 VEGF165 蛋白对 HUVEC 细胞活力的提高表现出量效关系,如图 5 所示.图 5 中:所有数据都以平均值±标准差来表示($n=6$),与对照组相比 $*p<0.05$,即差异具有统计学意义;而 $**p<0.01$ 即差异具有高度统计学意义;200 ng·mL⁻¹组的 HUVEC 存活率为(130.7±9.4)%;100 ng·mL⁻¹组的 HUVEC 存活率为(128.5±8.6)%;50 ng·mL⁻¹组的 HUVEC 存活率为(116.6±7.9)%.



2.5 重组人 VEGF165 蛋白对 HUVEC 细胞增殖的影响

HUVEC 细胞膜表面含有 VEGF 的受体 VEGFR,VEGF 与其受体结合,能够诱导 VEGFR 的磷酸化,从而启动下游细胞增殖的信号通路.利用 Edu 染色方法检测重组人 VEGF165 蛋白对 HUVEC 细胞增殖的影响,结果如图 6 (a)所示.



利用 Image pro-Plus 6.0 软件分别进行计算.对照组的细胞增殖率为(18.7±3.5)%;25 ng·mL⁻¹重组人 VEGF165 蛋白组为(33.49±4.5)%;200 ng·mL⁻¹重组人 VEGF165 蛋白组为(44.5±5.4)% (图 6 (b)).以上结果说明:得到的重组人 VEGF165 蛋白具有诱导 HUVEC 细胞增殖的活性.图 6(a)为 Hoechst33342 与 Edu 染色后的细胞图,Edu 染色新增殖细胞的细胞核为红色;Hoechst33342 染色所有细胞的细胞核为蓝色;图 6(b)为 Edu 阳性细胞百分比的统计分析.所有数据均以平均值±标准差表示($n=6$), $**p<0.01$ 表示与对照组相比,差异具有高度统计学意义.

2.6 VEGF165 多克隆抗体效价测定

以纯化后的重组人 VEGF165 蛋白作为抗原包被酶标板,ELISA 法测得多克隆抗体的效价为 1 : 51 200,免疫滴定曲线如图 7 所示.

3 讨论

肿瘤血管生成成为肿瘤组织提供氧气和营养物质,同时血管又是肿瘤发生转移的途径,新生血管通过旁分泌和“灌注”效应方式促进肿瘤生长. 因此,抑制肿瘤血管的新生,可以抑制肿瘤的生长和转移. VEGF 可以与血管内皮细胞上的特异性受体相作用,有效地刺激内皮细胞增殖、调控血管生成^[9-10],是肿瘤血管新生最重要的细胞因子. 鉴于 VEGF 重要的生理和病理作用,需要大量具有高度生物学活性的 VEGF 供实验室和临床研究. 然而,天然 VEGF 由于来源有限、产量甚微、价格昂贵等缺点,远远不能满足需求. 因此,利用基因重组技术生产大量的 VEGF 势在必行. 而酵母作为一种新型外源基因的表达系统,既具有原核细胞良好的可操作性,又可以进行真核系统翻译后加工,是外源基因表达的理想宿主^[11].

通过毕赤酵母表达系统,成功表达了重组人 VEGF165 蛋白,蛋白表达量较高,达到 $230\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 由于利用 G418 加压筛选得到了高表达菌株,且采用生物反应器高密度发酵,所以本课题筛选得到的菌株表达量要比文献^[12]中报道的高 10 倍. 重组人 VEGF165 蛋白经过 G-25 脱盐、肝素亲和层析和 S-100 凝胶层析后得到相对分子质量为 24 ku,纯度达 95%的目的蛋白.

实验对表达纯化的重组人 VEGF165 蛋白生物进行活性分析,结果为 $200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白组的 HU-VEC 细胞存活率为 $(130.7 \pm 9.4)\%$,Edu 法结果显示重组人 VEGF165 蛋白能促进 HUVEC 的增殖,与马骊等^[11]报道一致.

商品名为 Avastin 的贝伐单抗(Bevacizumab)于 2004 年 2 月 26 日获得美国食品和药物管理局(FDA)的批准,是美国第 1 个获得批准上市的抑制肿瘤血管生成的药物. 贝伐单抗是 VEGF 的人源化单克隆抗体^[13],可阻止 VEGF 与 VEGFR1,VEGFR2 结合,与标准化疗方案联用,可抑制肿瘤新生血管的形成和生长,显著提高生存率,延长患者的生存期,且不易产生抗药性^[14-15]. 研究发现:Avastin 主要和 VEGF 家族中的 VEGF-A 结合,而不能中和 VEGF-B 和 VEGF-C,使得其疗效非常有限^[16]. 因此,开发新的 VEGF 抗体非常有必要. 文中分离纯化的重组人 VEGF165 蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体,通过间接 ELISA 测得所制备的多克隆抗体效价约为 $1:51\,200$,多克隆抗体的成功制备为 VEGF165 抗体运用于肿瘤的治疗奠定了基础.

参考文献:

[1] BROWN L F, DETMAR M, CLAFFEY K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine[J]. Regulation of Angiogenesis, 1997, 79(2): 233-269.

[2] ASANO M, YUKITA A, MATSUMOTO T, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor 121[J]. Cancer Research, 1995(55): 5296-5302.

[3] SHINKARUK S, BAYLE M, LAIN G, et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF): An emerging target for cancer chemotherapy[J]. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents, 2003, 3(2): 95-117.

[4] ARKONAC B M, FOSTER L C, SIBINGA N E, et al. Vascular endothelial growth factor induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular endothelial cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(8): 4400-4405.

[5] 赵泽国, 杨治华, 冉宇靓, 等. 抗人 VEGF165 单链抗体的构建与表达[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 92-95.

[6] 刁勇, 王立强, 邱飞. 抗肿瘤适体药物的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(6): 415-418.

[7] 张倩, 邢永梅, 刁勇, 等. 重组人组织激肽释放酶结合蛋白的高密度毕赤酵母表达、纯化和生物学活性[J]. 药学报, 2013, 48(7): 1107-1112.

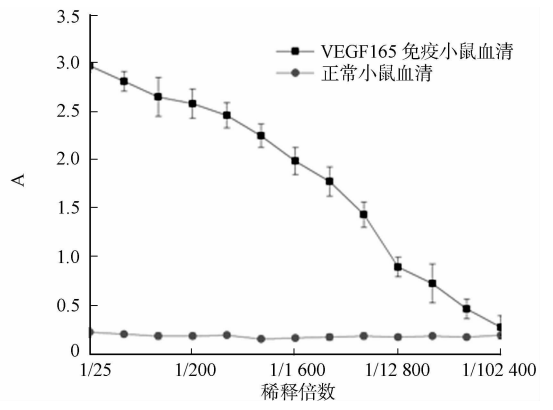


图 7 ELISA 法测定多克隆抗体 VEGF165 效价
Fig. 7 Determination of polyclonal antibodies VEGF165 titer by ELISA

[8] 张经余,王爱娥,李美香,等. 人 NANOGP8 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(3):30-35.

[9] 陈小波,黄锡全,张隆,等. VEGF165 的载体构建、表达及其生物学活性[J]. 江苏大学学报:医学版,2007,17(2):121-123.

[10] BERNADETTE F,YOLMARI L C,DOMENICO C,et al. Intradermal delivery of plasmid VEGF165 by electroporation promotes wound healing[J]. Molecular Therapy,2009,17(4):651-657.

[11] 马骊,王小宁,张智清,等. VEGF165 cDNA 在酵母中的表达、纯化及其生物学活性研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2001,17(1):24-28.

[12] 刘煜,吴国祥,赵建阳,等. 重组人 VEGF165 工程菌的发酵及表达产物的纯化与活性测定[J]. 中国药科大学学报,2004,35(1):82-85.

[13] 赵小峰,董浩,黄晓平,等. 以 VEGF/VEGFR 为靶点的肝癌药物研究进展[J]. 海峡药学,2009,21(7):22-25.

[14] HSU J Y,WAKELEE H A. Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: Current status and future challenges in cancer therapy[J]. BioDrugs,2009,23(5):289-304.

[15] 崔斐,李军,罗荣城. 贝伐单抗在肿瘤临床治疗中的研究进展[J]. 河北医学,2008,11(6):741-746.

[16] PARIKH S S,MEHTAL H H,DESAI B I. Advances in development of bevacizumab a humanized antiangiogenic therapeutic monoclonal antibody targeting VEGF in cancer cells[J]. International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences,2012,3(4):155-163.

High Level Expression of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor 165 Protein in *Pichia pastoris* and Preparation of VEGF165 Polyclonal Antibody

WANG Xiao^{1,2}, HUANG Xiao-ping^{1,2}, ZHOU Yu^{1,2}, DIAO Yong^{1,2}

(1. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;
2. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The recombinant secretory vector of pPIC9K-VEGF165 was constructed, linearized and then transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 (his4) by electroporation. The positive transformants were seperated by minimal dextrose medium (MD plate) plate screening and confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Subsequently, the rhVEGF165 protein was obtained by purification from the supernatant with Sephadex G-25, Heparin Sepharose FF and Sephacryl S-100 gel filtration chromatograph with relative molecular mass of 24 ku and purity of 95%. Furthermore, the recombinant protein was found to have high potency of inducing HUVEC cell proliferation and improving human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) cell activity. The polyclonal antibody generated from rhVEGF165 immunized mouse exerted the titer of 1 : 51 200 by indirect ELISA analysis.

Keywords: rhVEGF165 protein; polyclonal antibody; *Pichia pastoris*; high level expression

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)