

人 tumstatin 基因的克隆、表达和抗体制备^{*}

顾取良, 罗进贤, 张添元, 官文俊

(中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 应用 PCR 技术从人胎肺 cDNA 文库中扩增 tumstatin 基因编码序列, 克隆至 pET 3c 载体构建非融合表达的重组质粒 pET 3c-tum, 并在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中获得高效表达。表达蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离、切胶回收后免疫新西兰大白兔, 获得 ELISA 效价高达 1:1 000 的特异性兔抗人 tumstatin 抗血清。

关键词: 人肿瘤抑素; 基因表达; 抗血清

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) S2-0189-04

1971 年 Folkman^[1] 提出了肿瘤生长和转移依赖于血管生成的观点, 而肿瘤的抗血管生成疗法作为肿瘤治疗新策略现已被广泛接受。近年来, 许多具有抑制血管生成活性的内源性蛋白或水解片断被相继发现, 如内皮抑素 (endostatin)、restin、arresten、canstatin 以及 tumstatin 等^[2]。其中, 人 tumstatin^[3-5] 是胶原蛋白 IV α 3 链的 C 端包括非胶原区 (non-collagenous domain, NC1) 在内的一个 245 aa 大小片段, 具有抑制血管内皮细胞和肿瘤细胞增殖的双功能区, 能专一性地促进内皮细胞凋亡, 抑制血管生成和肿瘤生长, 促进肿瘤消退, 其抗肿瘤作用达内皮抑素的 10 倍, 呈现良好的应用前景。目前国外对其结构、功能和作用机制的研究正在深入, 国内尚未有该基因的研究报道。本文克隆人 tumstatin 全长 cDNA, 在大肠杆菌中进行高效表达, 经 SDS-PAGE 分离纯化后免疫动物获得特异性抗血清, 为 tumstatin 在真核表达产物中的检测及其功能作用机制等的进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、质粒及菌种

pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker 等购自 NEB 和晶美生物工程公司; DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司; 显色底物 DAB 和 AEC 购自华美生物工程公司, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 引物合成及序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成; 原核表达质粒 pET 3c 及菌株

E. coli BL21 (DE3) 和 *E. coli* DH5 α 为本室保存。

1.2 引物、PCR 及重组质粒 pET 3c-tum 的构建

根据 GenBank 登录的 tumstatin 序列, 设计一对引物用于从人胎肺文库 cDNA 中扩增 tumstatin 全长 cDNA, 在上下游引物的两端分别添加 *Nde* I 和 *Bam* HI 酶切位点, 并在上游引物中引入一个同义突变 (cca $\rightarrow$ cgg^{*})、在下游引物中引入终止密码子。引物序列如下:

5' primer: g gaa ttc cat atg cgg^{*} ggt ttg aaa gga aaa cgt g

3' primer: cg gga tcc tca gtg tct ttt ctt cat gca

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。PCR 产物纯化后用 *Nde* I 和 *Bam* HI 双酶切, 与同样酶切处理的载体 pET 3c 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经质粒提取、限制性酶切鉴定和 DNA 序列分析筛选重组克隆。

1.3 重组人 tumstatin 的诱导表达

将测序正确的重组质粒 pET 3c-tum 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 获得重组转化子 BL21 (DE3, pET 3c-tum), 挑取单个转化子接种于 LB (含 100 μ g/mL Amp) 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 8~12 h 后按 1:100 转接, 继续培养至 $A_{600}=0.5$ 时加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 诱导 3 h。表达产物分析参照文献[6]进行。

1.4 人 tumstatin 抗原的制备

将 20 mL 诱导表达的培养液收集菌体后加入 1 mL 上样缓冲液, 煮沸后离心取上清进行 SDS-PAGE, 参照 Hager 等^[7]的方法染色: 将凝胶用双蒸

* 收稿日期: 2004-12-24

基金项目: 广东省重点科技基金资助项目 (KM02502G)

作者简介: 顾取良 (1979 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

水漂洗 2 min, 浸泡在冰预冷的 0.25 mol/L KCl 溶液中 5 min, 待显色后切下目的蛋白条带, 于双蒸水中 4 ℃ 摇动洗涤 24 h, 然后加入适量 PBS 缓冲液冰浴研磨, 并按需要加入等体积弗氏完全或不完全佐剂进行完全乳化。

1.5 抗血清的制备^[8]

采用皮下注射结合肌肉注射的方法免疫 2~3 kg 雄性新西兰大白兔。免疫前耳缘静脉采血作为对照; 首次免疫时用弗氏完全佐剂乳化的抗原溶液, 约含 200~300 μg 表达的 tumstatin, 在背部脊柱两侧皮下多点注射; 加强免疫时抗原量减半, 用弗氏不完全佐剂进行乳化, 背部皮下注射结合臀部肌肉注射, 每隔 3~4 周加强一次, 共免疫 4 次。加强两次后第 7~10 天耳缘静脉采血 ELSIA 法测定效价, 达到理想值后颈动脉取血。并参考文献 [6] 的方法从抗血清中去除能与宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 的成分起交叉反应的某些抗体, 然后分装成小份 -20 ℃ 备用。

1.6 ELSIA 法测定效价^[9]

用包被液将表达的蛋白按 10 μg/mL 稀释后加于酶标板, 每孔 100 μL, 4 ℃ 过夜; 弃去抗原, 每孔加入封闭液 100 μL, 37 ℃ 湿盒内静置孵育 2 h; 弃去封闭液, 每孔加满洗涤液, 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入 100 μL 不同稀释度的抗血清, 37 ℃ 湿盒内静置孵育 2 h; 同前洗涤后加入 100 μL 1:1 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 37 ℃ 湿盒内静置孵育 1 h; 洗涤后加入 100 μL 底物显色液 AEC (3-氨基-9-乙基苒唑), 室温暗处反应 10~30 min, 加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 根据各孔颜色深浅进行判断。

1.7 Western Blot 鉴定^[6]

将样品进行 12% SDS PAGE 分离后 100 mA 恒流 2 h 电转移至硝酸纤维素膜上; 将膜在封闭液中室温缓慢振荡过夜; 与用封闭液 1:500 稀释的抗血清室温孵育 2 h; 洗涤 3 次后加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h; 洗涤后加 DAB (二氨基联苯胺) 显色检测目的蛋白。

2 结 果

2.1 人 tumstatin cDNA 的获得与重组质粒 pET-3c-tum 的构建

以人胎肺 cDNA 为模板经 PCR 扩增得到一条约 750 bp 大小的片段, 将 PCR 扩增产物和载体 pET-3c 皆用 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切, 分别用乙醇沉淀和琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 用 T₄ DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 (图 1)。连接产物转化

E. coli DH5α, 提取质粒, *Eco*RI 酶切鉴定。tumstatin 和载体 pET-3c 上各有一个 *Eco*RI 酶切位点, 重组质粒 pET-3c-tum 用 *Eco*RI 酶切产生的两个片段大小应分别为 705 bp 和 4 631 bp。酶切产物的电泳 (图 2) 及 DNA 序列分析 (结果未显示) 表明, 所获得的 tumstatin cDNA 的大小和序列与预期一致, 且已正确插入到 pET-3c 中。

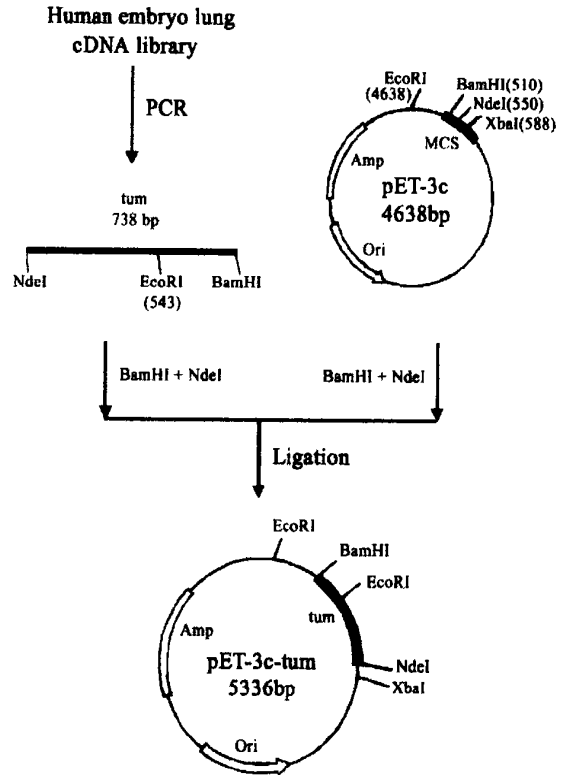


图 1 重组质粒 pET-3c-tum 的构建示意图
Fig 1 Construction of recombinant plasmid pET-3c-tum

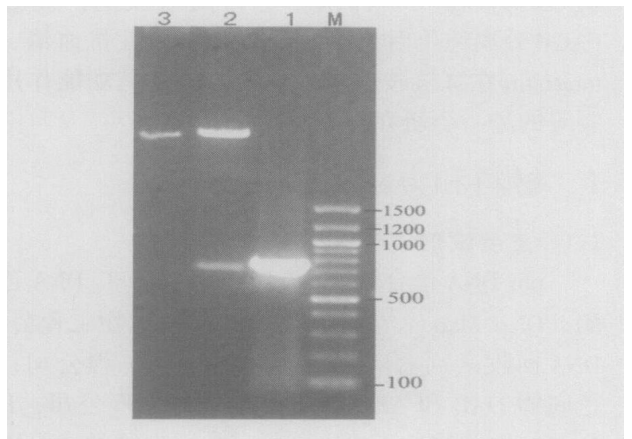


图 2 PCR 产物和重组质粒 pET-3c-tum 的酶切鉴定
Fig 2 PCR product and restriction analysis of recombinant plasmid pET-3c-tum

M: 100 bp ladder (NEB); 1: PCR product;
2: pET-3c-tum/*Eco*RI; 3: pET-3c/*Eco*RI

2.2 重组人 tumstatin 在大肠杆菌中的表达

图3的 SDS PAGE 分析表明, 含重组质粒 pET-3c tum 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 转化子经 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 诱导培养 3 h, 菌体裂解物在 27 000 处出现明显的蛋白表达条带, 与 tumstatin 的理论相对分子质量相符, 而含空载体的转化子 BL21 (DE3, pET 3c) 诱导后在相应的位置不出现新的条带, 表明 tumstatin 已在重组转化子 BL21(DE3, pET 3c-tum) 中获得表达。经凝胶扫描分析, 表达量约占菌体总蛋白的 30%。菌体超声破碎并离心后分别取上清和沉淀进行 SDS PAGE, 发现该蛋白只存在于沉淀中, 说明表达的蛋白主要以包涵体形式存在。

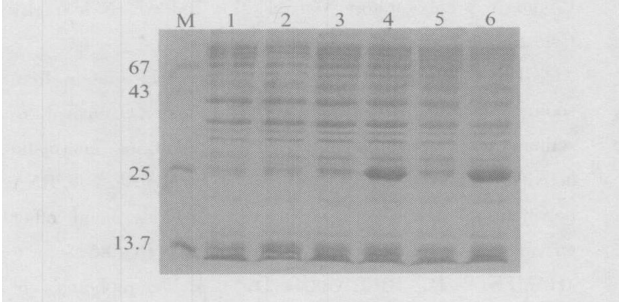


图3 表达产物的SDS PAGE 分析

Fig 3 12%SDS-PAGE analysis of expression products

- M: Protein molecular weight marker;
1, 2: Total lysates of BL21 (DE3, pET 3c) , uninduced (lane1) , induced (lane 2);
3, 4: Total lysates of BL21 (DE3, pET-3c-tum) , uninduced (lane3) , induced (lane 4);
5: Supernatant of sonicated BL21 (DE3, pET-3c-tum) (induced);
6: Pellet of of sonicated BL21 (DE3, pET-3c-tum) (induced)

2.3 兔抗人 tumstatin 抗血清的制备及其效价测定

SDS PAGE 分离纯化的重组人 tumstatin 免疫新西兰大白兔 4 次后耳缘静脉采血, 将收集的抗血清进行一系列倍比稀释, 以免疫前血清为对照, 用 ELISA 法测定效价。从图 4 可见, 抗血清在 10⁴ 稀释下 (第 6 孔) 与 10 μg/mL 抗原仍有明显的颜色反应, 而免疫前血清 (第 1 孔) 及未加抗原的空白对照 (第 8 孔) 均呈阴性反应, 说明所获得的抗血清效价已达到 1:1 000。

2.4 兔抗人 tumstatin 抗血清特异性检测

以含空载体的 BL21 (DE3) 菌体裂解物为对照, 对含重组质粒 pET 3c tum 的 BL21 (DE3) 的表达产物进行 Western Blot 分析, 以检查制备的抗血清的免疫特异性。结果 (图 5) 显示, 1:500 稀释的兔抗人 tumstatin 抗血清能特异性地与 tumstatin 发生反应。

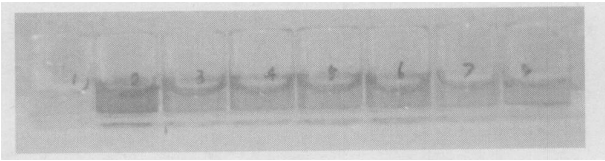


图4 ELISA 法检测血清抗体效价

Fig 4 Titer detection of antiserum by ELISA

- 1: Preimmune serum;
2~7: 10⁰ ~ 10⁵ gradient diluted antiserum, with 10 μg/mL tumstatin as coated antigen
8: Blank, without antigen

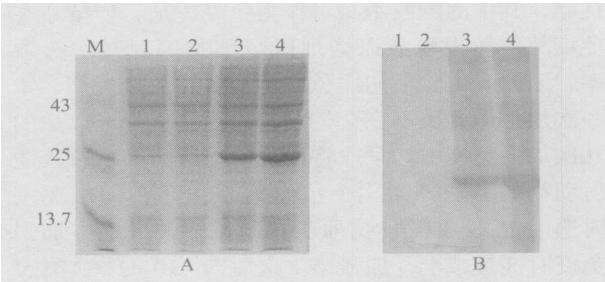


图5 Western Blot 对人 tumstatin 的检测

Fig 5 Western Blot analysis of tumstatin

- A: SDS PAGE; B: Western Blot
M: Protein molecular weight marker;
1: BL21 (DE3, pET 3c) (induced);
2: BL21 (DE3, pET 3c-tum) (uninduced);
3, 4: BL21 (DE3, pET-3c-tum) (induced)

3 讨 论

人 tumstatin 来源于 IV 型胶原蛋白 α3 链的 NC1 区, α3 (IV) 链的分布具有组织和器官特异性, 在胚胎期仅表达于肾脏和肺, 在成人则主要分布在肾、肺、耳、眼、睾丸和卵巢等组织的基底膜^[9], 因此本文以人胎肺 cDNA 库为模板 PCR 扩增人 tumstatin 全长 cDNA 序列。同时考虑到人 tumstatin 的第一个氨基酸脯氨酸使用的密码子是 CCA, 而该密码子是大肠杆菌的稀有密码子, 因而在设计引物时将其突变为大肠杆菌中较常使用的 CCG, 以避免出现人 tumstatin 在大肠杆菌表达系统中的表达效率低下的可能^[11]。

本文所构建的重组质粒 pET 3c tum 在 E. coli BL21 (DE3) 中实现了高效表达, 产生的人 tumstatin 不带有其它多余氨基酸残基, 相对分子质量约为 27 000, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上, 主要以包涵体形式存在, 改变诱导条件, 如降低诱导温度、减少诱导剂 IPTG 用量等亦未能获得有效的可溶性表达 (结果未显示), 进一步的包涵体溶解、复性及纯化产物的活性测定正在进行中。

为了给人 tumstatin 在真核表达系统中的表达提供检测手段, 在实现了高效的非融合表达的基础上, 利用 SDS PAGE 分离纯化原核表达的 tumstatin, 割胶后研碎直接免疫动物, 制备抗血清。影响免疫应答强度和特异性的因素较多, 主要有动物种类、遗传因素、抗原的物理状态、抗原用量、注射途径和免疫程序等。一般来说, 聚集蛋白的免疫原性高于可溶性的分散状蛋白, 部分变性的抗原有助于提高免疫原性, 但所获抗血清可能不与天然蛋白反应。从聚丙烯酰胺凝胶上切割下目的蛋白条带作为抗原, 其中的凝胶本身可作为免疫佐剂, 使抗原在免疫部位缓慢释放以增加巨噬细胞等对其的摄取率, 因此我们除在初次免疫时加弗氏完全佐剂、第一次加强加弗氏不完全佐剂与抗原乳化外, 以后的几次加强免疫中均采取将回收的凝胶研碎后直接注射动物的方法, 简化了抗原的制备^[12]。初次免疫时选用 200~300 μ g 抗原的用量, 隔 4 周左右加强免疫时剂量减半, 加强第 2 次后 7~10 d 采血测定效价已高于 1:64, 再次加强后收获的抗血清 ELISA 效价已达 1:1 000, 足够用于检测使用。为提高抗血清的特异性, 采用 *E. coli* BL21 (DE3) 宿主细胞的丙酮抽提物去除某些交叉反应抗体。以经初步纯化的抗血清为一抗进行 Western Blot 分析时, 抗原抗体反应呈现明显的特异性。兔抗人 tumstatin 抗血清的制备也为人 tumstatin 功能及作用机制等的进一步研究打下了基础。

参考文献:

[1] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182—1186.
[2] ORTEGA N, WERB Z. New functional roles for non—collagenous domains of basement membrane collagens[J]. *J*

Cell Sci, 2002, 115(Pt 22): 4201—4214.
[3] MAESHIMA Y, COLORADO P C, KALLURI R. Two RGD— independent $\alpha\beta 3$ integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti— tumor properties[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(31): 23745—23750.
[4] MAESHIMA Y, MANFREDI M, REIMER C, et al. Identification of anti—angiogenic site within vascular basement membrane— derived tumstatin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 15240—15248.
[5] MAESHIMA Y, SUDHAKAR A, LIVELY J C, et al. Tumstatin, an endothelial cell—specific inhibitor of protein synthesis[J]. *Science*, 2002, 295(5552): 140—143.
[6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
[7] HAGER D A, BURGESS R R. Elution of protein from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes[J]. *Anal Biochem*, 1980, 109(1): 76—86.
[8] HAMES B D, RICKWOOD D. Gel Electrophoresis of Protein: A Practical Approach[M]. 2nd ed. London, UK: Oxford University Press, 1990.
[9] 林清华. 免疫学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1999.
[10] CHUDSON B G, REEDERS S T, TRYGGVASON K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(35): 26033—26036.
[11] 孙乃恩, 孙东旭, 朱德煦. 分子遗传学[M]. 南京: 南京大学出版社, 1990.
[12] WALKER J M. The Protein Protocols Handbook[M]. New Jersey: Humana Press Inc Totowa, 1998.

Cloning and Expression of Human Tumstatin in *Escherichia coli* and Preparation of Its Polyclonal Antiserum

GU Qu liang, LUO Jin xian, ZHANG Tian yuan, GUAN Wen jun

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education,
Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Human tumstatin cDNA was amplified from embryo lung cDNA library by PCR technique and cloned into expression vector pET 3c resulting in recombinant plasmid pET 3c tum which was subsequently transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Tumstatin was expressed by 0.5 mmol/L IPTG induction at 37 $^{\circ}$ C for 3 hours as a 27 000 protein as detected by SDS PAGE and accounted for more than 30% of total bacterial protein as estimated by densitometry. Tumstatin was recovered and purified from the separated target band on SDS PAGE gels and used to immunize New Zealand rabbits and a polyclonal antiserum against human tumstatin with the titer of 1:1 000 as detected by ELISA was obtained.

Key words: tumstatin; gene expression; antiserum