

人纤溶酶原 K1—3 区基因在大肠杆菌中的表达^{*}

陆幸妍, 盛 节, 张添元, 罗进贤
(中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 将人纤溶酶原 kringle 1—3 (K1—3) 基因插入融合表达载体 pET—17b, 获得重组质粒 pET—K13, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 在 IPTG 诱导下, 人纤溶酶原 K1—3 基因在 *E. coli* BL21 (DE3, pET—K13) 中获得高效融合表达, 表达量占菌体总蛋白的 24%, 表达产物以包涵体存在, Western blot 证明重组蛋白对人纤溶酶原抗血清有特异免疫原性。

关键词: 人纤溶酶原 K1—3, 基因表达, 大肠杆菌, Western blot

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 03-0063-03

肿瘤迅速增殖和转移有赖于生成新生血管为其继续增殖提供充足氧气和营养物质^[1]。血管生成抑制素 (angiostatin) 是近年发现的通过抑制血管内皮细胞生长和血管形成从而抑制肿瘤生长及转移的蛋白因子, 其氨基酸序列相当于血纤溶酶原的 K1—4 区^[2,3]。最近发现其 K1—3 功能区的抑制血管生成的能力大于 K1—4 区并能抑制神经胶质瘤的生长^[4]。本研究应用 PCR 技术, 以人纤溶酶原 cDNA 为模板, 扩增其 K1—3 区编码序列, 克隆至表达载体 pET—17b, 获得重组质粒 pET—K13, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 后获得高效融合表达并证明重组蛋白对人纤溶酶原抗血清有特异免疫原性。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 为本室保存。质粒 pSPK13 含人纤溶酶原 K1—3 基因, 由本室构建。质粒 pBluscript 和 pET—17b 为本室保存。

1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶及 T4—DNA 连接酶等购自 GIBCO BRL、Promega 和华美生物工程公司; 羊抗人纤溶酶原血清、IPTG 和二氨基联苯胺购自 Sigma 公司; HRP—Protein A 购自上海生物制品研究所; 其余为国产 AR 试剂。

1.3 质粒 DNA 的提取和酶切片段回收

按试剂盒说明书操作; 限制性内切酶酶切反

应、DNA 连接反应、质粒转化及快速鉴定等参照文献 [5]。

1.4 人纤溶酶原 K1—3 基因的诱导表达

将重组质粒 pET—K13 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 获得重组转化子 *E. coli* BL21 (DE3, pET—K13)。接种转化子单菌落于含氨苄青霉素 (100 mg/mL) 的 2 $\times$ YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇养过夜, 次日以 1/100 量转种于含氨苄青霉素 (100 mg/mL) 的 2 $\times$ YT 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 A=0.5, 加 IPTG 至终质量浓度为 0.4 mg/L, 继续培养 3 h, 离心收集菌体。

1.5 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

详见文献 [5]。

1.6 Western blot 印迹分析

将 SDS—PAGE 凝胶上的蛋白带通过 100 mA 恒电流电泳 90 min 转移至硝酸纤维素膜上, 以 5% 脱脂奶粉室温封闭过夜, 与人纤溶酶原抗血清 (1:250 稀释) 室温温育 2 h, 再与 HRP—Protein A (1:50 稀释) 室温温育 1 h 后, 与二氨基联苯胺显色反应 3 min。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 pET—K13 的构建及酶切鉴定

如图 1, 用 *Cla*I 和 *Hind*III 分别双酶切质粒 pSPK13 和 pBluscript, 从前者回收约 0.75 kb 含 K1—3 基因的片段, 与后者的 2.9 kb 片段连接, 产物转化 *E. coli* DH5 α , 在含氨苄青霉素 (100 mg/mL) 平板上挑取转化子提取质粒, 经酶切

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670013); 广东省自然科学基金资助项目 (960052)

收稿日期: 2000-06-27; 作者简介: 陆幸妍 (1963—), 女, 讲师; 通讯联系人: 罗进贤。

和电泳分析证后, 将重组质粒命名为 pBSK13 (图 1); 用 *Eco*R I 酶切 pBSK13, 回收 K1-3 基因, 与经 *Eco*R I 酶切的 pET-17b 连接获得含 K1-3 基因的表达载体 pET-K13, 然后将 pET-K13 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 在含氨苄青霉素 (100 mg/mL) 平板上挑取转化子, 经提取质粒酶切鉴定证明该质粒含 K1-3 基因 (图 2) 最后将 pET-K13 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 获得工程菌 *E. coli* BL21 (DE3, pEK13) .

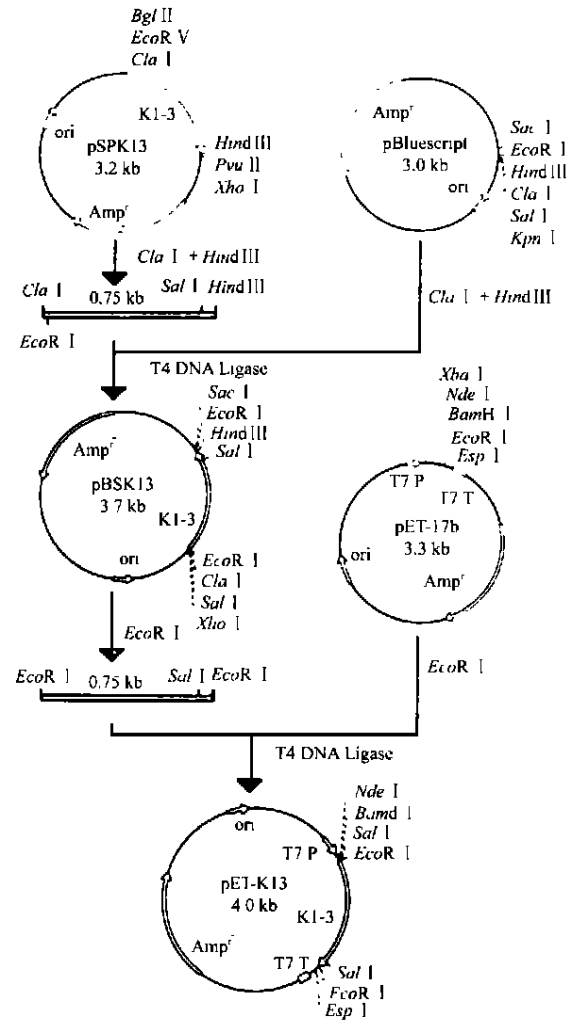


图 1 重组质粒 pET-K13 构建图

Fig 1 Schematic diagram of recombinant plasmid pET-K13

2.2 重组人纤溶酶原融合蛋白的诱导表达

E. coli BL21 (DE3, pET-K13) 经诱导培养 3 h, 取 1 mL 培养物离心收集菌体, 悬浮于 100 μ L dH₂O 中, 加入等体积 2 $\times$ 加样缓冲液, 沸水浴 5 min, 离心, 取 20 μ L 上清液进行 SDS-PAGE, 结果如图 4a, 在凝胶电泳约 3 500 附近呈

现 1 条浓重的新蛋白带, 凝胶扫描显示其含量约占菌体总蛋白的 24% (图 5, 第 5 峰为表达产物). 超声破碎菌体并离心后, 分别取裂解液上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 显示新蛋白带留在沉淀中, 表明该重组蛋白在菌体内大部分以包涵体形式存在 (图 4a).

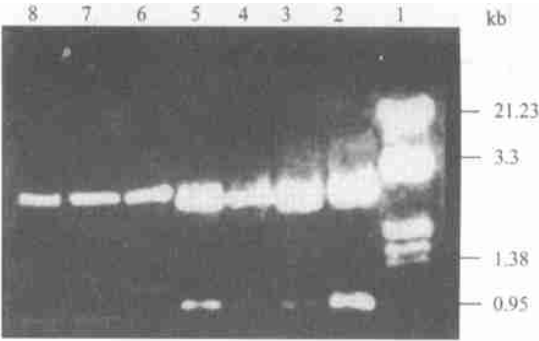


图 2 重组质粒 pET-K13 酶切分析

Fig 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pET-K13

- 1 λ DNA + *Eco*R I + *Hind* III;
- 2 pBluescript + *Cla* I + *Hind* III;
- 3 pSPK13 + *Cla* I + *Hind* III;
- 4 pBSK13 + *Cla* I + *Hind* III;
- 5 pBSK13 + *Eco*R I ; 6 pET-17b + *Eco*R I ;
- 7 pET-K13 + *Eco*R I ; 8 pET-K13 + *Sal* I

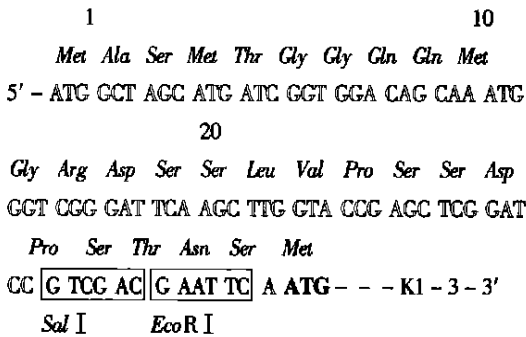


图 3 重组质粒 pET-K13 中 5'-端 T7- RNA 聚合酶基因片段与 K1-3 基因融合序列 (编码融合蛋白 N-端 26 个氨基酸)

Fig 3 The junction sequence between the T7 RNA polymerase gene fragment and K1-3 gene in pET-K13 空心字母示 T7-噬菌体 RNA 聚合酶基因片段碱基序列

2.3 重组蛋白的 Western blot 印迹分析

图 4 (b) 的结果显示, 与 SDS-PAGE 凝胶新蛋白带对应的相应位置上呈现 Western blot 阳性反应带, 证明该重组蛋白对人纤溶酶原抗血清有特异性免疫原性.

本文成功实现人纤溶酶原 K1-3 功能区基

因在大肠杆菌的高效融合表达，为下一步对表达产物的复性、纯化及生物学活性测定奠定基础。

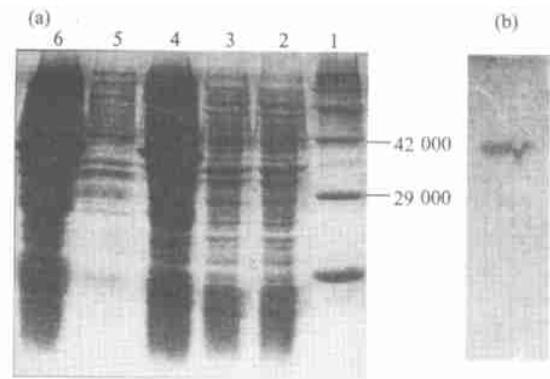


图 4 *E. coli* BL21 (DE3, pET-K13) 表达产物 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析

Fig 4 SDS-PAGE and Western blot analysis of expression product of *E. coli* BL21 (DE3 pET-K13)

(a) 1 蛋白质相对分子质量标准;

2 *E. coli* BL21 (DE3, pET-K13) 未诱导;

3 *E. coli* BL21 (DE3, pET-17b) 诱导 3 h;

4 *E. coli* BL21 (DE3, pET-K13) 诱导 3 h;

5 *E. coli* BL21 (DE3, pET-K13) 诱导 3 h 的裂解物上清液;

6 *E. coli* BL21 (DE3, pET-K13) 诱导 3 h 的裂解物沉淀

(b) *E. coli* BL21 (DE3, pET-K13) 诱导 3 h 的 Western blot 阳性反应带

参考文献:

[1] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J] . Natl Cancer Inst, 1994, 82: 4—6.

[2] O’REILLY M S, HOLMGREN L, SHING Y, et al. Angiogenesis: novel angiogenesisinhibitor that mediates the suppression of metatases by a Lewis lung carcinoma [J] . Cell, 1994, 79: 315—328.

[3] O’REILLY M S, HOLMGREN L, CHEN C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice [J] . NatureMed, 1996, 2 (6): 689—692.

[4] MACDONALD N J, MURAD A C, FOGIER W E. The tumor suppresing activity of angiostatin protein residues within kingles 1—3 [J] . Biochem Biophys Res Commun 1999, 264 (2): 469—477.

[5] SAMBOOK J, FRIISCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A laboratoty manual [M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratoty Press, 1989. 16—46; 880~897; 882.

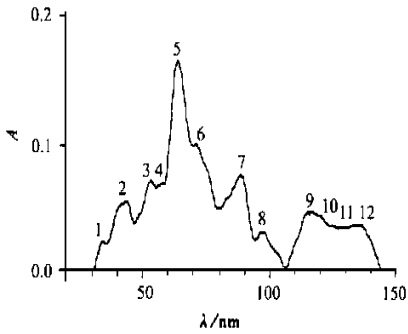


图 5 *E. coli* BL21(DE3, pET-K13)

表达产物 SDS-PAGE 凝胶扫描分析

Fig 5 SDS-PAGE gel scanning analysis of expression product of *E. coli* BL21(DE3, pET-K13)

第 5 峰为表达产物

Efficient Expression of Human Plasminogen Kringle 1—3 Domain Gene in *E. coli*

LU Xing yan, SHENG Jie, ZHANG Tian yuan, LUO Jin xian
(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education,
Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The kringle 1—3 domain (K1—3) of plasminogen is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. The gene expression of the K1—3 domain of human plasminogen in *E. coli* is reported. The K1—3 gene was first inserted into the expression vetor pET—17b, resulting in plasmid pET—K13. pET—K13 was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The transformant *E. coli* BL21 (DE3, pET—K13) was used to detect the gene expression. SDS PAGE result showed that the K1—3 gene was efficiently expressed in *E. coli* BL21 (DE3, pET—K13) by IPTG induction. The expressed product constitutes 24% of the total bacterial protein as estimated by densitometer and exists as inclusion body. Western blot result indicates that the recombinant protein reacts with antiseum against human plasminogen.

Keywords: kringle 1—3 domain of human plasminogen; gene expression; *E. coli*; Western blot