

文章编号: 0529-6579 (1999) 06-0062-05

人纤溶酶原 kringle5 功能区基因 在大肠杆菌中的表达^{*}

陈广南, 罗进贤, 卢文菊, 张添元

(中山大学生物化学系/生物工程研究中心/生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要: 将人纤溶酶原 kringle5 功能区基因插入融合基因表达载体 pET-17bBamHI 位点, 构建成重组质粒 pETK23, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 IPTG 诱导下, 纤溶酶原 kringle5 功能区基因在重组转化菌株 BL21 (DE3, pETK23) 中获得高效表达, 表达产物以可溶性蛋白形式存在, 表达量占菌体总蛋白的 52.8%.

关键词: 人纤溶酶原; kringle5 功能区; 基因表达; 大肠杆菌

中图分类号: Q 78 **文献标识码:** A

1994 年, O'Reilly 等从携肺癌低转移突变株 (LLC-LM) 小鼠的尿液和血清中分离纯化得到血管生成抑制素 (angiostatin), 它与人纤溶酶原 kringle1~4 功能区同源性, 具有抑制毛细血管内皮细胞增殖、抑制血管生成和转移瘤生长的生物活性^[1]. 动物试验研究还表明, 血管生成抑制素对 LLC-LM 及 T241 纤维肉瘤细胞株、人乳腺癌、结肠癌、前列腺癌细胞株在小鼠体内形成的肿瘤也有很强的抑制作用^[2]. 最近, Cao 等^[3]发现人纤溶酶原的 kringle5 功能区有比 angiostatin 更强的抑制内皮细胞生长的活性, 是否具有抗血管生成和抗癌活性, 值得探讨.

本实验应用 PCR 技术, 以人纤溶酶原 cDNA 为模板^[4], 扩增了人纤溶酶原 kringle5 功能区的基因, 构建成含人纤溶酶原 kringle5 功能区基因的重组质粒 pMK26 (另文发表). 本文将人纤溶酶原 kringle5 功能区基因插入表达载体 pET-17b, 在大肠杆菌中获得了高效表达.

1 材料和方法

(1) 菌株和质粒: 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 为本室保存菌株, pMK26 是含人纤溶酶原 K5 功能区基因的质粒, 由本室构建. 表达载体 pET-17b 购自 Novagen 公司, 它含 T7 启动子、SD 序列、T7 转录终止信号.

(2) 工具酶和主要试剂: 限制性内切酶 *Eco*RI、*Bam*HI, T4DNA 连接酶购自 NEB 公

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

收稿日期: 1999-05-04 作者简介: 陈广南, 男, 1968 年生, 讲师, 博士研究生 通讯联系人: 罗进贤.

司和华美生物工程公司, 羊抗人纤溶酶原抗血清、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和二氨基联苯胺购自 Sigma 公司. 酶联葡萄糖菌蛋白 A (HRP-Protein A) 纯品购自上海生物制品研究所, 其它均为分析纯试剂.

(3) 质粒 DNA 的提取和操作: 质粒提取、限制性内切酶消化 DNA、酶切片段回收、DNA 连接、质粒转化、DNA 重组子鉴定等按文献^[5]的方法进行.

(4) 重组人纤溶酶原 kringle5 功能区基因的诱导表达: 将重组质粒 pET-17b 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得重组转化子 BL21 (DE3, pETK23), 接种单菌落于 2 mL 含氨苄青霉素 (50 mg/L) 的 LB 中, 37 °C 振荡培养至 A_{600} 为 0.3, 4 °C 冰箱放置过夜, 离心收集细菌, 转接于 20 mL LB (含氨苄青霉素 200 mg/L) 中, 37 °C, 250 r/min 培养至 $A_{600} \approx 0.4$, 加 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 继续摇养 3 h, 收集细菌.

(5) SDS 聚丙烯酰胺 (PAGE) 凝胶电泳和免疫印迹分析 (Western blot): 参照文献 [5].

2 实验结果

2.1 重组质粒的构建和酶切鉴定

用 *Bam*HI 将人纤溶酶原 kringle5 功能区基因从 pMK26 上切下 (图 1), 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收约 320 bp 大小片段, 与经 *Bam*HI 酶切的 pET-17b 进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 在含氨苄青霉素的 LB 琼脂平版上挑取转化子进行重组质粒筛选, 并分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切鉴定. 重组质粒用 *Bam*HI 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳显示大小 2 条带, 小带与 pMK26 经 *Bam*HI 酶切产生的约 320 bp 的人纤溶酶原 kringle5 功能区基因片段相同, 大带与 pET-17b 经 *Bam*HI 酶切产生的 3306 bp 大小的条带相同 (图 2), 表明重组质粒是由载体 pET-17b 及人纤溶酶原 kringle5 功能区基因重组而成的, 将该重组质粒命名为 pETK23. 为了证明人纤溶酶原 kringle5 功能区基因是否正向插入, 用 *Eco*RI 酶切重组质粒, 若基因正向插入, 应出现 2 条分别相当于 320 bp 及 3 306 bp 的带; 若反向插入则出现 3 584 bp 和 42 bp 的条带, 而图 2 出现的是 320 bp 和 3 306 bp 的两条带, 证明 pETK23 中人纤溶酶原 kringle5 功能区基因正向插入.

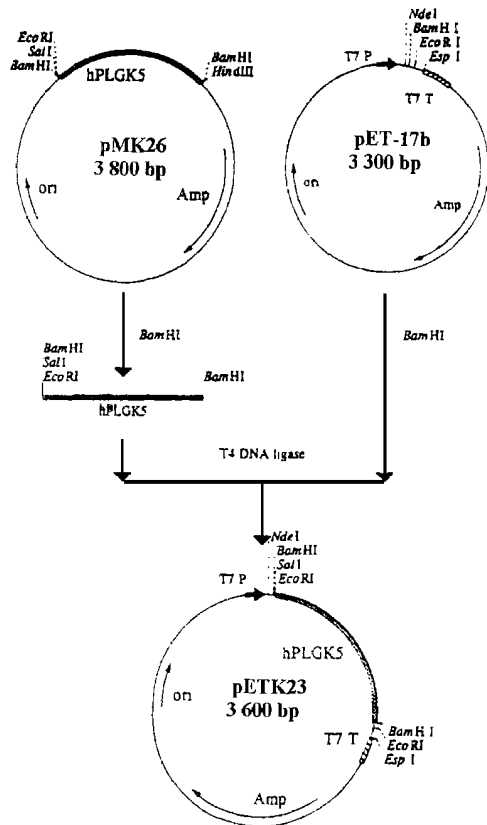


图 1 重组质粒 pETK23 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pETK23

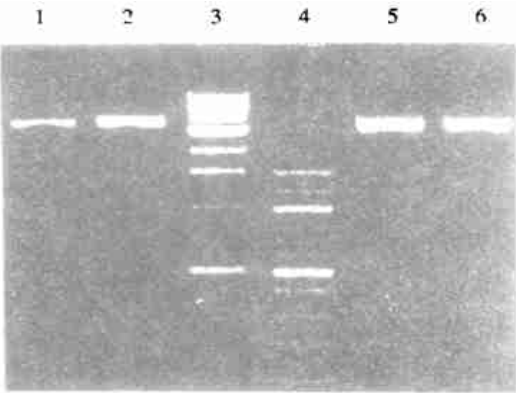


图 2 重组质粒 pETK23 的酶切分析

Fig 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pETK23
1. pET-17b/ *Bam*HI ; 2. pMK26/ *Bam*HI ;
3. 1 kb ladder; 4. 100 bp ladder;
5. pETK23/ *Eco*RI ; 6. pETK23/ *Bam*HI

2.2 重组人纤溶酶原 K5 功能区融合蛋白的诱

取 1.5 mL 培养液离心收集细菌，悬浮于 50 μ L STE (pH 8.0) 中，沸水浴加热 5 min，离心取上清，加等体积的 2 倍上样缓冲液，混匀，沸水浴加热 3 min，取 40 μ L 样品进行 ρ 为 12% SDS-PAGE，18 mA 恒流电泳 1 h。图 3a 的结果显示：含重组质粒 pETK23 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 3 h 诱导，相对分子质量为 20 000 附近明显出现一条浓重的新蛋白带。凝胶薄层扫描显示诱导 2 h 的表达量占菌体总蛋白的 52.8%。用超声波破碎菌体，离心后分别取裂解液的上清和沉淀进行电泳，发现表达产物保留在上清中，表明重组蛋白以可溶性蛋白形式存在于菌体中 (图 4)。

2.3 重组蛋白的免疫印迹分析

将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白带通过 100 mA 恒流电泳 75 min 转移至硝酸纤维素膜上，晾干，5%脱脂奶封闭过夜，与 1:250 稀释的人纤溶酶原抗血清 30 $^{\circ}$ C 温浴 2 h，再与 1:50 稀释的 HRP-Protein A 30 $^{\circ}$ C 温浴 2 h，最后用二氨基联苯胺显色 (图 3b)。从图中可见，在与 SDS-PAGE 凝胶的新蛋白带相应位置上出现阳性反应带，说明表达的重组人纤溶酶原 kringle5 功能区融合蛋白能与入纤溶酶原抗血清发生抗原抗体反应。

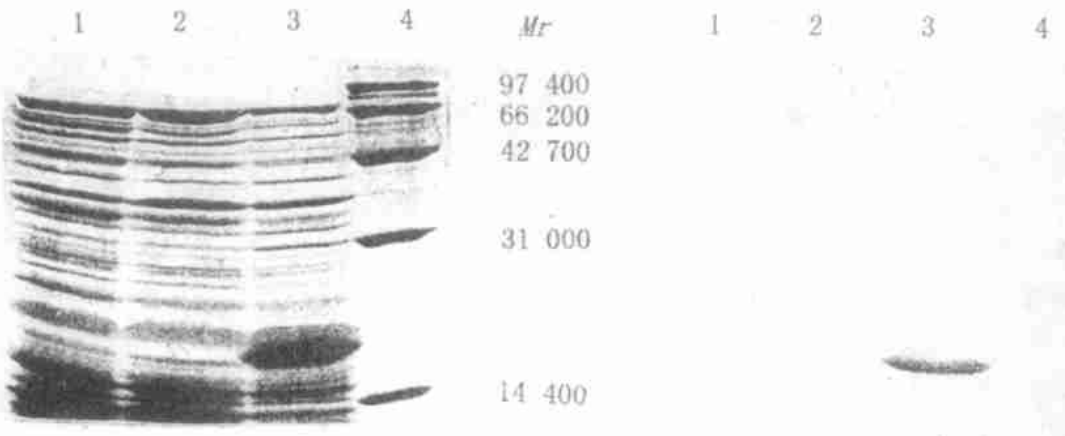


图 3 *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 表达产物的 SDS-PAGE (a) 和免疫印迹分析 (b)

Fig 3 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of the expression product of *E. coli* BL21 (DE3, pETK23)

1. *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 未诱导; 2. *E. coli* BL21 (DE3, pET-17b) 诱导 3 h;
3. *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 诱导 3 h; 4. 相对分子质量标准

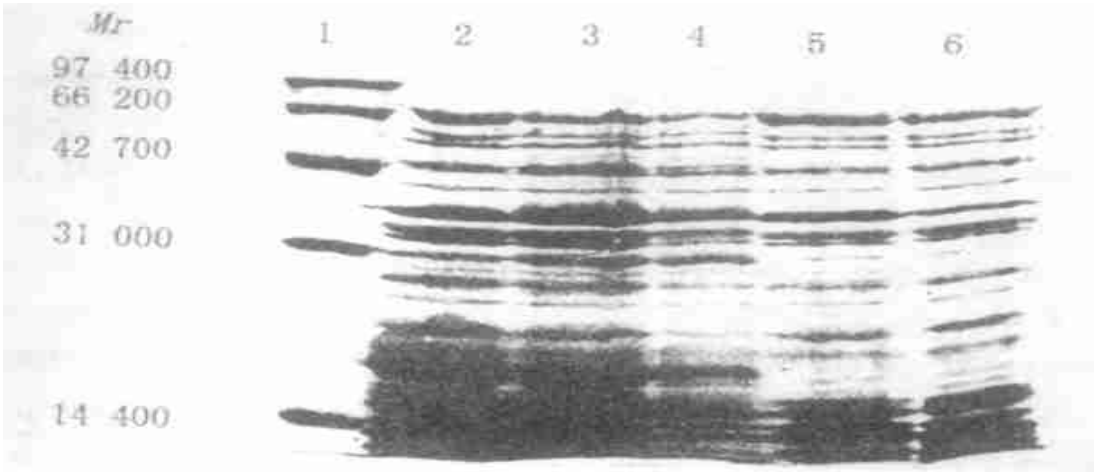


图 4 *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 表达产物超声破碎后的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression product of *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) after sonitation

- 1 相对分子质量标准; 2 *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 诱导 3 h;
- 3 *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 诱导 3 h 裂解物上清;
- 4 *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 诱导 3 h 裂解物沉淀;
- 5 *E. coli* BL21 (DE3, pET-17b) 诱导 3 h; 6 *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) 未诱导

3 讨 论

在大肠杆菌中高水平表达的重组蛋白多会形成包涵体，形成包涵体的蛋白纯化时，经变性/复性后，正确折叠的蛋白质的产量不稳定，回收率低，更有些蛋白基本上不能正确折叠^[3]。本研究结果的一大特点是在大肠杆菌中高效表达的产物，以可溶性蛋白的形式存在，原因可能是与纤溶酶原 kringle5 功能区的结构有关。Cao 等^[3]曾在大肠杆菌中表达鼠纤溶酶原 kringle5 功能区，表达产物也以可溶性蛋白形式存在。人纤溶酶原 kringle5 功能区具有抑制毛细血管内皮细胞增殖^[3]、迁移^[6]的作用，这是血管形成过程的两个关键步骤，推测人纤溶酶原 kringle5 功能区可能具有抑制血管形成和肿瘤生长的特性。本文的工作为探索这些特性打下基础。

参考文献:

[1] O'REILLY M S, HOLMGREN L, SHING Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a *Levis lung carcinoma* [J] . *Cell*, 1994, 79: 315 ~ 328.

[2] O'REILLY M S, HOLMGREN L, CHEN G, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice [J] . *Nat Med*, 1996, 2: 689 ~ 692.

[3] CAO Y, CHEN A, AN S S A, et al. Kringle5 of plasminogen is a novel angiogenesis inhibitor of endothelial cell growth [J] . *J Biol Chem*, 1996, 272 (36): 22924 ~ 22928.

[4] FORSGREN M, REDEN B, ISRAELSSON M, et al. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen [J] . *FEBS Lett*, 1987, 213: 254 ~ 260.

[5] SAMROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16 ~ 46, 880 ~ 897.

[6] JI W R, BARRIENTOS L G, LLINAS M, et al. Selective inhibition by kringle5 of human plasminogen on en-

endothelial cell migration, an important process in angiogenesis [J] . Biochem Biophys Res Commun, 1998, 242 (2): 414~419.

Expression of Kringle 5 of Human Plasminogen in *E. coli*

CHEN Guang-nan^{*}, LUO Jin-xian, LU Wen-ju, ZHANG Tian-yuan

Abstract: Kringle 5 of human plasminogen is a recently discovered inhibitor of endothelial cell growth and migration. It may also suppress angiogenesis and tumor growth. The gene encoding kringle 5 of human plasminogen was cloned in the *Bam*H I site of pET-17b giving rise to the plasmid pETK23 which was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Kringle 5 of human plasminogen was efficiently expressed in recombinant strain *E. coli* BL21 (DE3, pETK23) by IPTG induction. The expression product constitutes about 52.8% of the total protein and exists in the form of soluble protein. Western blot analysis demonstrates that it reacts positively with goat anti human plasminogen antisera.

Keywords: human plasminogen; kringle5 domain; gene expression; *E. coli*

^{*} Department of Biochemistry and Biotechnology Research Center, State Key Laboratory of Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China