

人血管生成抑制素基因在大肠杆菌中的融合表达^{*}

卢文菊 罗进贤^{**} 李文清

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘要 将人血管生成抑制素基因定向插入表达载体 pET-17b 的 *Bam* H 位点, 构建重组质粒 pETA2, 转化 *E. coli* BL21 (DE3). 在 IPTG 诱导下, 血管生成抑制素基因在重组转化株 *E. coli* BL21 (DE3, pETA2) 中获得高效表达. 表达产物以包涵体形式存在, 表达量占菌体总蛋白的 37.2%. 利用羊抗人纤溶酶原抗血清作为第一抗体, 免疫印迹分析证明表达产物具有特异的免疫原性.

关键词 人血管生成抑制素, 基因表达, 大肠杆菌, 免疫印迹

分类号 Q 78

血管生成旺盛是实体肿瘤组织得以迅速生长和转移的基础. 寻找高效低毒的血管生成抑制因子 (angiogenesis inhibition factor, AIF), 抑制血管生成, 切断肿瘤的营养供给和转移途径, 达到抑制肿瘤, 治疗肿瘤的目的, 成为当前肿瘤研究领域的热点之一.

临床上常见某些原位肿瘤经手术切除后, 往往加速其远位转移瘤的生长. 多年来, 这一现象的机制一直悬而未决. 1994年, O' Reilly 等人^[1]从接种 Lewis 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一种蛋白质, 命名为血管生成抑制素. 氨基酸序列分析显示, 血管生成抑制素与纤溶酶原的一个内部片段同源性超过 98%, 相当与其第 98~44 位氨基酸. 它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, 而完整的纤溶酶原来并不具有这一活性^[1]. 动物实验研究还表明, 血管生成抑制素对 LLC-LM 及 T24 纤维肉瘤细胞株在小鼠体内形成的原发瘤也有很强的抑制作用^[2]. 显示了其在肿瘤治疗研究领域诱人的应用前景.

应用 PCR 技术, 以人纤溶酶原 cDNA 为模板^[3], 扩增了 98~44 位氨基酸之间的核苷酸序列, 克隆在载体 pM1 上, 构建含血管生成抑制素基因的重组质粒 pMA1 (另文发表). 本文将人血管生成抑制素基因插入表达载体 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: *E. coli* C600, *E. coli* BL21 (DE3) 为本室保存菌株. pMA1 是含血管生成抑制素基因的质粒, 由本室构建. 表达载体 pET-17b 购自 Novagen 公司. 它含 T 启动

* 国家自然科学基金 (39670013) 和广东省自然科学基金资助项目 ** 通讯联系人

收稿日期: 1998-03-17 卢文菊, 女, 29岁, 讲师, 博士研究生

子, SD序列, T转录终止信号。

(2) 工具酶和主要试剂: 限制性内切酶 *Eco*R I, *Bam*H I, T₄ DNA连接酶等工具酶购自 Gibco BRL公司, Promega公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. 其他均为 AR试剂。

(3) 质粒 DNA的提取和操作: 质粒提取, 限制性内切酶酶切反应, 酶切片段回收, 连接反应, 质粒转化和快速鉴定按文献 [4] 的方法进行。

(4) 重组人血管生成抑制素的诱导表达: 将重组质粒 pETA2转化 *E. coli* BL21 (DE3), 获得重组转化子 *E. coli* BL21 (DE3, pETA2). 接种单菌落于 2 mL含氨苄青霉素 (50 mg/L) 的 LB中, 37℃摇养至 A_{600} 为 0.4~0.8, 4℃冰箱放置过夜, 离心收集菌体, 转接于 15 mL LB(含氨苄青霉素 200 mg/L)中, 37℃, 250 r/min摇养至 $A_{600} \approx 0.6$, 加 IPTG至终浓度为 0.4 mmol/L, 继续摇养 1~3 h, 收集菌体。

(5) SDS 聚丙烯酰胺 (PAGE)凝胶电泳和免疫印迹 (western blot)分析: 参照文献 [4]。

2 实验结果

2.1 重组质粒 pETA的构建和酶切鉴定

用 *Bam*H I 将人血管生成抑制素基因从 pMA1上切下 (图 1), 走 α 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收约 1 000 bp 大小片段, 与经 *Bam*H I 酶切的 pET-17b 进行连接, 连接产物转化 *E. coli* C600, 在含氨苄青霉素的平板上挑取转化子进行质粒检测, 筛选重组质粒, 并分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切进行鉴定. 重组质粒用 *Bam*H I 酶切后, 在 α 1% 琼脂糖凝胶电泳上显示大小 2条带, 小带与 pMA1经 *Bam*H I 酶切下的约 1 033 bp 的血管生成抑制素基因带相同, 大带与 pET-17b经 *Bam*H I 酶切形成的 3 306 bp 的条带相同 (图 2). 表明重组质粒是由载体 pET-17b及血管生成抑制素基因重组而成的, 将该重组质粒命名为 pETA2. 为了证明血管生成抑制素基因是否正向插入, 用 *Eco*R I 酶切重组质粒, 若基因正向插入, 应出现 2条分别相当于 1 033及 3 306 bp 的带; 若反向插入只能看见 4 297bp 的带, 另一条小带只有 42 bp, 看不见. 而图 2 出现的是 1 03和 3 306 bp 的 2条带, 证明 pETA2中血管生成抑制素基因是正向插入。

2.2 重组人血管生成抑制素融合蛋白的诱导表达 取 1 mL培养液离心收集菌体, 悬浮于 50 μ L TE (pH 8.0) 中, 加入等体积的 2倍载样缓冲液, 沸水浴加热 5 min, 离心, 取 10 μ L上清上样进行 SDS-PAGE, 34 mA恒流电泳 1 h. 图 3a

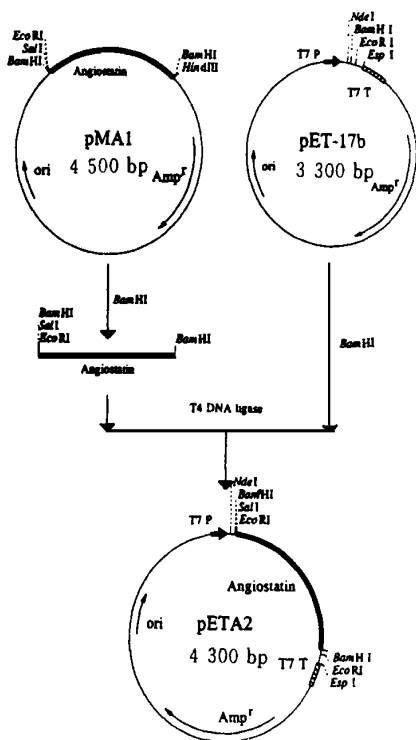


图 1 重组质粒 pETA2的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pETA2

的结果显示: 含重组质粒 pETA2的 *E. coli* BL21 (DE3)经 1h 诱导, M_r 为 43 000附近已出现 1条明显的新蛋白带, 2 h诱导表达量显著增高. 凝胶薄层扫描显示诱导 2 h的表达量占菌体总蛋白的 37. 2%. 延长诱导时间至 3 h, 表达量下降. 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时, 发现表达产物保留在沉淀中, 表明重组蛋白以包涵体形式存在于菌体中.

2.3 重组蛋白的免疫印迹分析

将 SDS-PAGE凝胶上的蛋白条带通过 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 °C 温浴 2 h, 再与 1: 50 稀释的 HRP-Protein A 30 °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, 说明表达的重组人血管生成抑制素蛋白能与入纤溶酶原抗血清发生抗原抗体反应.



图 2 重组质粒 pETA2的酶切分析
Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pETA2
1 λ DNA /EcoRI + HindIII; 2 pET-17b /BamHI; 3 pMA1 /BamHI; 4 pETA2 /BamHI; 5 pETA2 /EcoRI

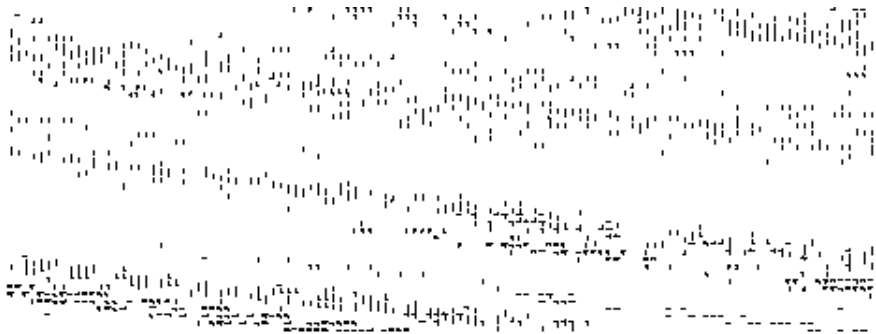


图 3 *E. coli* BL21 (DE3, pETA2) 表达产物的 SDS-PAGE (a) 和免疫印迹 (b) 分析
Fig. 3 SDS-PAGE (a) and western blot(b) analysis of the expression product of *E. coli* BL21(DE3, pETA2)

1 M_r 标准; 2 *E. coli* BL21(DE3, pETA2)未诱导; 3 *E. coli* BL21(DE3, pETA2) BL21(DE3, pET-17b) 诱导 2 h; 4 *E. coli* BL21(DE3, pETA2)诱导 1 h; 5 *E. coli* BL21(DE3, pETA2)诱导 2 h; 6 *E. coli* BL21(DE3, pETA2)诱导 2 h裂解物上清; 7 *E. coli* BL21(DE3, pETA2)诱导 2 h裂解物沉淀

3 讨论

基因工程的目的之一就是选择一合适的表达系统使有实际应用价值的蛋白高效表达, 且保持或恢复生物活性. 大肠杆菌具有繁殖快, 营养要求低, 操作简单等特点, 对于勿需糖基化, 磷酸化等修饰即呈现生物活性的蛋白来说, 无疑是一首选的表达系统. 血管生成抑制素具有高效抑制血管生成和肿瘤生长的特性, 在控制肿瘤发生发展方面有重要的应用前景. 其生物活性决定于它的 Kringle结构^[5]. 还未有研究资料显示与其修饰成分有关系.

pET-17b 是一原核融合型高效表达载体, 克隆位点上游有 1 段蛋白质编码序列, 表达效率可高达 50% 以上. 真核基因与原核基因融合, 使转录和翻译的起始由正常的大肠杆菌核苷酸序列所控制, 有利于真核基因的表达和产物的稳定^[4]. 本研究将人血管生成抑制素基因插入在 pET-17b 的 T 启动子, SD 序列, NdeI 位点的下游构建阅读框架正确的重组质粒 pE-TA2, 使血管生成抑制素基因在大肠杆菌中获得了高效融合表达, 表达产物 N 端 25 个氨基酸由载体序列所编码. 重组产物形成包涵体, 方便纯化. 免疫印迹分析证明重组血管生成抑制素具有天然蛋白的免疫原性, 下一步将对表达产物进行复性, 纯化和血管生成抑制活性的测定.

肿瘤的存在使血液中血管生成抑制素的浓度增加^[6], 可望成为肿瘤诊断的一个指标, 用于肿瘤的基础研究, 临床诊断, 病情监测, 指导制订治疗方案等. 人血管生成抑制素在大肠杆菌中的高效表达, 使大量制备纯品成为可能, 为建立快速灵敏的免疫学检测方法提供抗原和标准品.

参 考 文 献

- 1 O' Relly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79 315~ 328
- 2 O' Reilly M S, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*, 1996, 2 689~ 692
- 3 Forsgren M, Raden B, Israelsson M, et al. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett*, 1987, 213 254~ 260
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~ 46, 880~ 897, 882
- 5 Cao Y, Ji R W, Davidson D, et al. Kringle domains of human angiostatin. *J Biol Chem*, 1996, 271 (46): 29461~ 29467
- 6 Dong Z, Kumar R, Yang X, et al. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1997, 88 801~ 810

Human Angiostatin Its High-level Expression in *E. coli*

Lu Wenju* Luo Jinxian Li Wenqing

Abstract Angiostatin is a recently discovered angiogenesis inhibitor, capable in inhibiting the proliferation of endothelial cells and the growth of tumor and has the potential for clinical application. Human angiostatin gene was cloned on the BamHI site of pET-17b resulting in the plasmid pETA₂ which was then transformed into *E. coli* BL21(DE3). Angiostatin was efficiently expressed in recombinant strain *E. coli* BL21(DE3, pETA₂) by IPTG induction. The expression product constitutes about 37.2% of the total soluble protein and exists in the form of inclusion body. Western blot analysis demonstrates that it reacts positively with goat anti human plasminogen antisera.

Keywords human angiostatin, gene expression, *E. coli*, western blot

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China