

可溶型三聚体血管生长抑制因子 Kringle 5 的克隆,表达,纯化及活性研究*

妙亮 徐立华 冀 霄 边六交**

(西北大学生命科学学院 西安 710069)

摘要 血管生长抑制因子 Kringle 5 是目前发现的抑制血管内皮细胞增殖和肿瘤生长的活性最强的纤溶酶原片段,特异性高而毒副作用小,在肿瘤的治疗方面具有潜在的巨大价值和广阔的应用前景。根据 K5 基因的序列设计 PCR 引物,通过 PCR 从已有的克隆载体扩增出人纤维蛋白溶酶原的 K5 部分基因,将 K5 基因克隆入原核表达载体 pET15b,经序列测定,成功构建了 pET15b-K5 非融合表达载体。将重组载体导入大肠杆菌中 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 分析目的蛋白主要以可溶形式存在于菌体中,破碎后上清通过阳离子交换层析,纯化获得纯度大于 95% 的目标蛋白,脱盐后对分子量测定推测形成了三聚体。通过鸡胚绒毛尿囊膜法证明蛋白产物对鸡胚绒毛尿囊膜血管增生有一定的抑制作用。

关键词 Kringle 5 克隆 分离纯化 生物活性

中图分类号 Q789

血管新生对于肿瘤的生长有着重要的作用,若能抑制新生血管的生成,则可有效阻断瘤体的营养,进而抑制肿瘤的增殖与转移,因此寻找能高效抑制血管生成的物质,阻断肿瘤血管的形成,是目前肿瘤治疗研究领域的一大热点^[1]。血管再生是一个包括内皮细胞迁移、附着、膜降解和新血管生成的多步骤过程。血管抑制素人纤维酶原具有五个结构类似的环,人纤维酶原被激活切割后形成的两部分都具有抑制血管增生的作用,前四个联环区(K1-K4)被称为 angiostatin, K5 是最后一个联环区结构,与 K1, K2, K3, K4 都有较高的同源性。与 angiostatin 相似,K5 也是一种内皮细胞增殖的特异性抑制剂^[2,4]。研究成功构建了重组菌 *E. Coli* BL21 (DE3)/pET15b-K5,对重组蛋白质 Kringle 5 的分离纯化工艺进行了研究,初步检测了活性,为后续的药物开发研究奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 重组菌 *E. Coli* BL21 (DE3)/

pET32a-K5,大肠杆菌 Top10、BL21 (DE3) 和质粒 pET15b (Novagen) 均为本实验室保藏。

1.1.2 试剂 琼脂糖、DNA 分子量标准,北京天根生化科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、DNA 连接酶、内切酶,Promega 公司;质粒小量提取试剂盒、基因凝胶回收试剂盒, Omega 公司;快速流 SP 琼脂糖凝胶 (S P Sepharose F. F.; 0.7 * 2.5 mm i. d.) 预装柱, GE 公司产品;低分子量蛋白 Marker (14.4 ~ 116kDa), Fermants 公司;蛋白 Marker (10 ~ 225kDa), 纽英伦生物技术(北京)有限公司。主要试剂,如酵母提取物、蛋白胨、异丙基硫代-β-D 半乳糖苷 (IPTG) 等均为分析纯。其他试剂均为分析纯或化学纯。5 ~ 7 天鸡胚购自养鸡场。

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸引物的设计与合成 根据 Kringle 5 DNA 序列,设计了能从重组质粒 pET32a-K5 中扩增出 Kringle 5 基因的上下游引物,并在其中分别加入了 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点:

上游引物 5' ATCATGCCATGGTGTCTCTCCCGGAT GTAG 3' (*Nco* I, 30bp)

下游引物 5' ACTTGCCTCGAGTTACGGGGCCGCAC ACTGAGG 3' (*Xho* I, 33bp)

收稿日期:2010-11-10 修回日期:2011-01-06

* 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09103-696)

** 通讯作者,电子邮箱:bianliujiao@sohu.com

1.2.2 构建 pET15b-K5 表达质粒 以质粒 pET32a-K5 为模板,用上述引物和 Taq 聚合酶扩增 K5 基因,PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,在紫外灯下切掉目的条带,用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化目的片段,回收扩增产物后和 pET15b 质粒分别用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切,酶切片段同样凝胶回收后用 T_4 连接酶 16℃ 恒温过夜酶连。

连接产物转化至 Top10 感受态细胞,涂布于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选转化子。提取转化子质粒 DNA 作为模板,用设计引物 PCR 法筛选阳性克隆,并进一步用 T7 启动子通用引物进行 DNA 测序验证,序列分析由上海生物工程公司进行。PCR 条件:95℃ 5min;95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环;72℃ 7min。

1.2.3 表达菌种的培养及诱导表达 提取序列正确的重组质粒,转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,构建用于表达重组蛋白的工程菌。从转化的平板上挑取单克隆,接入 5ml LB 培养基中(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素),37℃,220r/min 过夜培养;次日,按 1% 的接种量接入新鲜的 LB (100 μ g/ml 氨苄青霉素)培养基中,37℃,220r/min 培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 时,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG,降低温度至 30℃ 开始诱导表达^[5-6]。诱导 5 h 后取 1 ml 菌液,离心后收集沉淀,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 3.5%,以考马斯亮蓝 R-250 进行染色分析。

将诱导培养的重组大肠杆菌发酵液于 6 000 r/min、4℃ 下离心 6 min,收集菌体沉淀称重,按 1g:10ml 的比例加入 20mmol/L 的 HAc-NaAc 缓冲液 (pH5.0),混匀后于冰浴条件下进行超声破碎(破碎条件:破碎时间 10s、间隔时间 15s、次数 60 次)。将悬浮液于 11 000 r/min、4℃ 下离心 20min,收集上清液和沉淀,用 Bradford 法测定上清蛋白浓度,用 SDS-PAGE 对上清和沉淀进行检测(沉淀处理:先用 2.0 mol/L 的尿素洗涤,再用 8.0 mol/L 的尿素溶解沉淀,均离心取上清),并与诱导菌体进行对比,确定目的蛋白的表达形式^[7-8]。

1.2.4 Kringle 5 的分离纯化 离子交换柱选用 1.0ml SP Sepharose F. F. 强阳离子预装柱。洗脱液 A 液:20mmol/L HAc-NaAc (pH5.0);B 液:含 1mol/L NaCl 的 A 液。先用 A 液平衡色谱柱,取 1.0ml 收集的上清组分上样,等流穿峰出现后进行梯度洗脱。收集色谱峰,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。洗脱条件:洗脱体积 20ml,梯度范围 0% B ~ 100% B,洗脱流速为 1.0ml/

min,紫外检测波长 280nm。收集各组分进行 SDS-PAGE 分析^[9-11]。

1.2.5 Kringle 5 的纯度检测 应用 SDS-PAGE 对分离的 Kringle 5 所在组分进行纯度测定。分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 3.5%,以考马斯亮蓝 R-250 进行染色分析。

1.2.6 蛋白浓度测定 用 Bradford 法测量上清和接收组分中的蛋白浓度,以 BSA 作为标准蛋白做标准曲线,计算蛋白得率。

1.2.7 蛋白质溶液的脱盐 选用 5.0 ml Sephadex G-25 凝胶过滤层析柱,先用 20mmol/L HAc-NaAc (pH 5.0) 缓冲液充分平衡,将离子交换层析收集的目标蛋白洗脱峰进样后再用平衡缓冲液进行等度洗脱,洗脱流速为 1.0 ml/min。此步骤对蛋白溶液进行脱盐,以便于下一步的冻干。

1.2.8 Kringle 5 的分子量测定 将冻干后的 Kringle 5 直接用 MALDI-TOF-MS 分析。

1.2.9 Kringle 5 的活性测定 取孵化 5 ~ 6d 的鸡胚,以 75% 乙醇擦拭外壳后在气室顶端处开窗,用虹膜刀切破壳膜,暴露出绒毛尿囊膜,用进样器将待测药物加至尿囊膜上,灭菌透明胶带封窗后放入孵化箱。孵化 72h 后,揭除透明胶带,固定,取膜制作标本。拍照,观察鸡胚绒毛尿囊膜血管增生情况^[12]。对照组用 HAc-NaAc (pH 5.0) 缓冲液。

2 结果

2.1 大肠杆菌重组子的 PCR 检测

用设计的引物对具有抗性的重组子提取质粒进行 PCR 检测(图 1)。结果扩增出约 300bp 的 DNA 片段,与以重组表达载体 PET32a-K5 为模板扩增的结果一致;而空载体 PET15b 扩增结果为阴性。证明 PCR 阳性的重组子中有外源 DNA 片段的插入,初步说明 K5 基因已整合到质粒基因组中,以 T7 启动子通用引物作为测序引物进行 DNA 测序鉴定,无碱基错配,确定重组质粒构建成功。

2.2 重组菌 *E. Coli* BL21 (DE3)/pET15b-K5 的表达分析

图 2 和图 3 分别给出了 Kringle 5 重组菌体诱导表达和菌体破碎后的 SDS-PAGE 分析图谱。由图 2 可见,诱导后与未诱导的菌体相比,可以明显观察到目的蛋白条带,与预测的分子量相比推测形成了一个稳定的蛋白质三聚体;而由图 3 可见,在沉淀处理液中没有蛋

白条带,说明没有形成包涵体,而上清中有明显条带,说明目的蛋白获得了可溶性表达。

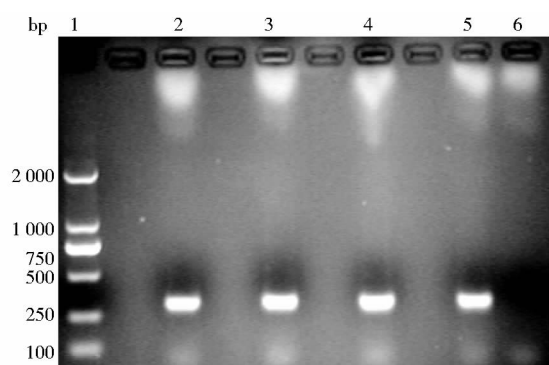


图1 重组质粒的PCR鉴定

Fig. 1 The identification PCR of recombinant vector

1: DNA ladder; 2: Vector pET32a-K5; 3-5: Vector pET15b-K5; 6: Vector pET15b

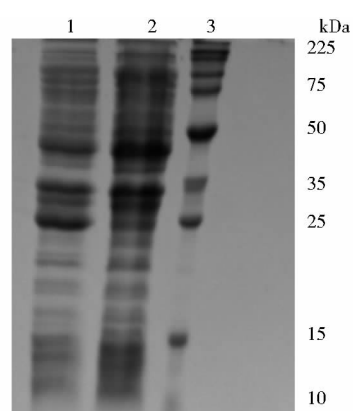


图2 重组菌 *E. Coli* BL21(DE3)/pET15b-K5 的诱导表达

Fig. 2 Expression of recombination bacteria

E. Coli BL21(DE3)/pET15b-K5

1: IPTG-induced bacterial cell; 2: Non-induced bacterial cell; 3: Protein molecular weight marker (the molecular weights from top to bottom are 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 and 10kDa, respectively)

2.3 Kringle 5 的分离纯化

将含有重组蛋白 Kringle 5 的上清收集后,在阳离子色谱柱 (SP Sepharose F. F.) 上进行分离,经 SDS-PAGE 分析(图4),分离效果理想,在组分 II 中只有一条带,根据分子量判断应为目的蛋白。

2.4 Kringle 5 纯化总结

Kringle 5 经 SP Sepharose F. F. 色谱柱分离后,所得的重组 Kringle 5 已经具有较高的纯度(约为 98%)。

分离情况见表1。由表1可知,经过 SP Sepharose F. F. 色谱柱分离后组分 II 中 Kringle 5 占破碎后上清中

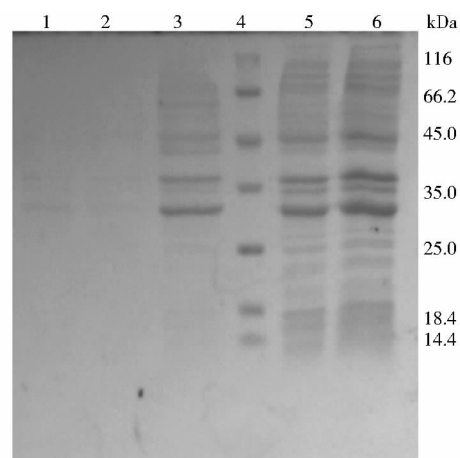


图3 菌体破碎后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the broken bacteria

1: Precipitation of the broken cells washed with 2.0 mol/L urea; 2: Precipitation of the broken cells washed with 8.0 mol/L urea; 3: Supernatant of the broken cells; 4: Protein molecular weight marker (the molecular weights from top to bottom are 116, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 and 14.4kDa, respectively); 5-6: Induced bacterial cell

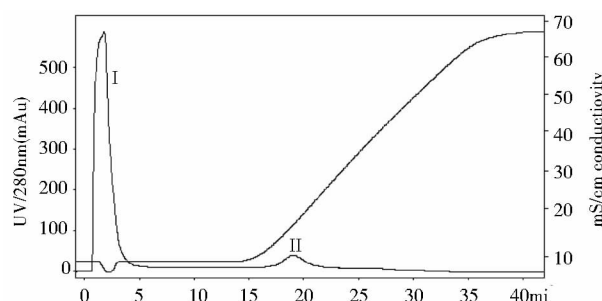


图4 含有重组 Kringle 5 的上清组分在 SP Sepharose F. F 色谱柱上的分离图谱

Fig. 4 Chromatogram of the supernatant of the broken cells on SP Sepharose F. F. column

表1 经一步色谱分离纯化后含有目的蛋白组分占总蛋白比率

Table 1 The protein rate after one-step chromatographic method for separation and purification

组分	体积 (ml)	蛋白浓度 (mg/ml)	蛋白质量 (mg)	蛋白得率 (%)
破碎上清	1.0	25.71	25.71	
SP Sepharose F. F. 组分 II	3	2.56	7.68	29.87

总蛋白的 29.87%。

2.5 Kringle 5 的分子量测定

将冻干后的 Kringle 5 直接用 MALDI-TOF-MS 分析,质谱图谱见图5,分子量为 28 884.18,与理论分子

量相比推测形成了稳定的三聚体。

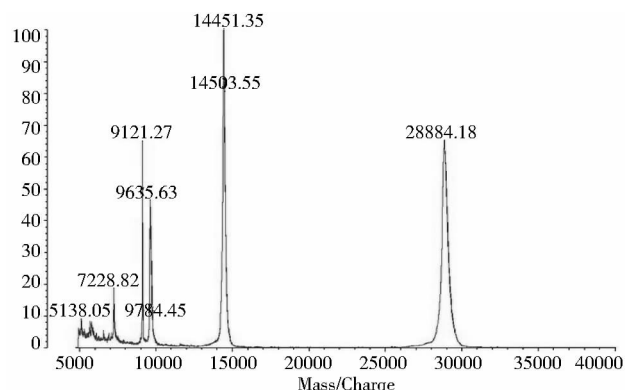


图5 Kringle 5 的 MALDI-TOF-MS 分析

Fig. 5 Analysis of Kringle 5 with MALDI-TOF-MS

2.6 重组菌体表达产物的活性检测活性

对脱盐后得到的 Kringle 5 蛋白溶液,采用鸡胚绒毛尿囊膜法进行活性测定,并用 HAc-NaAc (pH 5.0) 缓冲液作对照(图6)。可见对照组(图6a)中鸡胚绒毛尿囊膜二级血管和三级血管明显比实验组(图6b)中的多,说明纯化后的 Kringle 5 对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成有抑制作用。

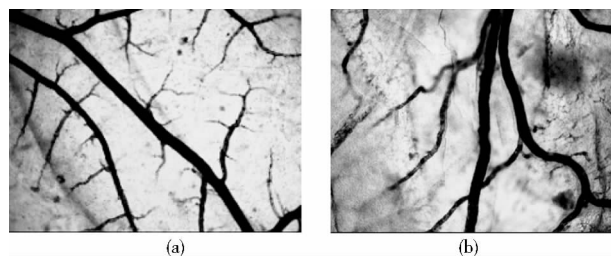


图6 鸡胚绒毛尿囊膜法检测 K5 的生物活性(CAM)

Fig.6 Bio-activity identification of Kringle 5 by chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)

(a) CAM treated with HAc-NaAc (b) CAM treated with purified Kringle 5

3 结 论

到目前为止,基于 Kringle 5 已经有了几种不同的融合蛋白,考虑到融合蛋白中所带的标签有可能对活性造成影响,试图构建非融合载体来生产目标蛋白,在生产过程中不带有各种标签。

在实验过程中出现了不可逆的可溶性稳定三聚体,目前为止还没有找到避免聚集出现的方法,还有待后续试验探索改进。实验中出现的三聚体以可溶性的形式表达,而大多数实验中形成的蛋白质聚集体会

以包涵体的形式出现,未来药物的开发试图从单聚体和三聚体两种途径来进行,并且对蛋白质表达过程中聚集体的形成进行详细深入的研究。

对表达产物的活性实验中发现这种聚集体并没有丧失活性,而且纯化的过程亦简单经济。在基因工程产品中,多聚体的出现是个不可避免的现象,Susan 等^[13]和井明艳等^[14]对此做了详尽的综述。同源多聚体的出现大多是由于疏水和静电作用力所致的,同时与 pH、温度、蛋白浓度、盐浓度等都有关系^[15-16],可以考虑从这些方面对整个实验过程加以改进。

蛋白质发生异常折叠形成蛋白质多聚体,这在重组蛋白质生产中是普遍存在的现象,但比较确切的机制目前还没有定论,需要科研工作者做出进一步的努力。蛋白质折叠问题的研究是生命科学研究的重要内容,随着各种科研理论和技术不断发展,希望在未来能逐渐研究清楚蛋白质多聚体的形成机理,并在此基础上有效地调节蛋白质的正确折叠。蛋白质折叠异常通常会引起构象和结构发生有害的变化,从而引起疾病^[17]。这方面的研究成果可以帮助人们更深入地探讨机体内与蛋白质聚集体相关疾病的发病成因,最终能够治疗这类疾病。

参考文献

- [1] Cao Y, Tumor angiogenesis and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005, 59(2): 340-343.
- [2] Ji W R, Barrientos L G, Llinas M, et al. Selective inhibition by Kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247(2): 414-419.
- [3] Ji W R, Castelkino F J, Chang Y, et al. Characterization of Kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Faseb*, 1998, 12(15): 1731-1738.
- [4] Nguyen T M, Subramanian I V, Kelekar A, et al. Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells. *Blood*, 2007, 109(11): 4793-4802.
- [5] 边六交, 党红艳, 杨晓燕. 原核表达融合型血管生成抑制剂 Kringle 5 发酵条件的优化和初步纯化. *高校化学工程学报*, 2006, 20(5): 775-780.
Bian L J, Dang H Y, Yang X Y, *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2006, 20(5): 775-780.
- [6] 周涟, 罗进贤, 张添元. 血管生成抑制素基因工程大肠杆菌的高密度发酵研究. *微生物学报*, 2003, 43(2): 228-235.

- Zhou L, Luo J X, Zhang T Y. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 228-235.
- [7] 贾信贵, 边六交. 两步柱色谱法分离纯化重组肿瘤血管生长抑制因子 Kringle 5. *色谱*, 2007, 25(3): 344-347.
- Jia X G, Bian L J. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 25(3): 344-347.
- [8] 汪家政. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 23-24.
- Wang J Z. *Protein Technical Manual*. Beijing: Science Press, 2000. 23-24.
- [9] 陈浩, 陈于红, 张菁, 等. 人纤溶酶原 Kringle 5 基因的克隆、表达及产物纯化和性质鉴定. *南京大学学报(自然科学版)*, 2001, 37(2): 218-222.
- Chen H, Chen Y H, Zhang J, et al. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2001, 37(2): 218-222.
- [10] 梁欣. 复杂蛋白质样品中目标组分柱层析分离纯化策略研究. 西安: 西北大学, 化工学院, 2009.
- Liang X. *Isolation and purification strategy of target protein in binary - and ternary - protein mixture on column chromatography*. Xi'an: Northwest University, College of Chemistry & Chemical Engineering, 2009.
- [11] 吴鹏, 杨晓燕, 边六交. 一种从蛇毒中纯化神经生长因子的新工艺. *色谱*, 2004, 22(1): 1-4.
- Wu P, Yang X Y, Bian L J. *Chinese Journal of Chromatography*, 2004, 22(1): 1-4.
- [12] 王亚妮, 刘先宁. 重组人色素上皮细胞衍生因子融合蛋白的制备及其抑制新生血管活性的研究. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 12-17.
- Wang Y N, Liu X N. *China Biotechnology*, 2008, 28(12): 12-17.
- [13] Susan J, Janet M T. *Principles of protein-protein interactions*. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93(1): 13-20.
- [14] 井明艳, 孙建义. 蛋白质的折叠调控与包涵体的形成. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 30(6): 690-696.
- Jing M Y, Sun J Y. *Journal of Zhejiang University(Agric. & Life Sci.)*, 2004, 30(6): 690-696.
- [15] Kazumasa S, MotoHisa O, Yuji G. Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH3. *Protein Science*, 2001, 10(11): 2325-2335.
- [16] Thongnam M, McClements D J. Influence of pH, ionic strength, and temperature on self-association and interactions of sodium dodecyl sulfate in the absence and presence of chitosan. *Langmuir*, 2005, 21(1): 79-86.
- [17] Welch W J. Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2004, 15(1): 31-38.

Cloning, Expression, Purification and its Biological Activity Study of the Soluble Tripolymer Recombinant Angiogenesis Inhibitor Kringle 5

MIAO Liang XU Li-hua JI Xu BIAN Liu-jiao

(College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The Kringle 5 domain of plasminogen, which was previously shown to inhibit angiogenesis in vitro and vivo, is one of the most potent angiogenesis inhibitors described to date. The Kringle 5 gene was amplified from pET32a-K5 by PCR, and then was inserted into pET15b to construct a prokaryotic vector pET15b-k5. The target protein was highly expressed in *E. coli* BL21(DE3) and was mainly present in the precipitation observed by SDS-PAGE. The protein was purified by ion-exchange chromatography (SP Sepharose Fast-Flow) using the NaCl linear gradient strategy. The analysis results of SDS-PAGE showed that the purity of obtained Kringle 5 was about 98%. After desalting with size-exclusion chromatography, it was found that it inhibited the blood vessel growth of chick embryo chorioallantoic membrane effectively. This simple, effective method may be applied in the future in mass production of Kringle 5 and lay a solid base for detailed evaluation of bioactivities of Kringle 5.

Key words Kringle 5 Cloning Separation and purification Biological activity