

人内皮抑素基因的克隆以及在大肠杆菌中的可溶性表达研究

冯 怡^{*} 张艳红 朱旭东 冯玉梅 马清钧

(军事医学科学院 生物工程研究所 分子遗传实验室 北京 100850)

摘要 用 PCR 的方法从人胎肝 cDNA 文库中得到人内皮抑素基因, 克隆测序正确后连接到硫氧还蛋白融合表达载体上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 得到表达人内皮抑素的工程菌。用 IPTG 诱导表达, 表达量达到全菌蛋白的 64%。经分析硫氧还蛋白可以辅助内皮抑素可溶性表达, 表达的融合蛋白保持了天然蛋白的免疫学特性。而且表面带有多聚组氨酸的突变的硫氧还蛋白还简化了蛋白纯化的步骤, 使融合蛋白可以通过固相金属螯和层析 (IMAC) 的方法纯化。纯化后的融合蛋白经 IgA 蛋白酶的切割可得到大小正确的重组人内皮抑素, 用此方法获得的重组人内皮抑素可以在 CAM 试验中抑制新生血管的形成。高效可溶型表达内皮抑素的工程菌的构建成功, 为内皮抑素的生产应用打下了良好的基础。

关键词 内皮抑素 硫氧还蛋白 可溶性表达 抗新血管形成

肿瘤的生长和转移依赖于新血管的形成^[1], 是通过抗血管生成抑制肿瘤, 成为抗癌药物研发的新热点。内皮抑素是一种内源性新血管生成抑制因子, 用其重组蛋白直接注射小鼠就几乎完全抑制了肿瘤的生长和转移, 而且反复治疗没有毒性和耐药性的产生^[2]。显著的作用和优点使其成为抗新血管生成疗法最有前景的候选药物。目前在美国已经开始了用内皮抑素治疗肿瘤的 I 期临床试验。根据以往的研究, 用不同的系统表达重组内皮抑素各有优缺点^[3-5], 但都难以满足临床应用需要的用量。大肠杆菌表达系统常用于生物工程产品的生产, 表达量高, 但是内皮抑素在大肠杆菌中的表达以包涵体形式存在, 难于复性, 活性差。在大肠杆菌中获得内皮抑素的高效可溶性表达, 则可使其生产满足应用需要, 将促进它的临床应用。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司, 表达质粒 pETTrxHisL 为本室构建, 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21

(DE3) 为本室保存。人胎肝 cDNA 文库由崔立彬博士提供。

1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶, T4DNA 连接酶, TaqDNA 聚合酶为 Biolabs 公司产品。质粒提取试剂盒及 PCR 纯化试剂盒购自 Progeima 公司。Pharmacia Chelating Sepharose Fast Flow 层析填料为法玛西亚公司产品, 鼠抗人内皮抑素抗体为本室制备保存^[6], 辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中山公司, 其它试剂均为国产或进口分析纯, 鸡胚购自农科院养鸡场。

1.3 引物设计与合成

根据已知人内皮抑素基因编码序列和所用表达载体进行设计, 上游为 5'-AGCCCACCCGCCACAGCCACCGCGA-3' 下游为 5'-^{BamHI}GTCA GGATCCTTACTTGGAGGCAGTCATGA-3' 引物的合成由上海生工公司完成。

1.4 人内皮抑素基因的克隆及测序

以人胎肝 cDNA 文库 (Invitrogen) 为模板, 加入上下游引物各 50pmol, 甘油 10% Taq 酶 4U 含镁离子 Buffer10 μ l dNTP 各 2.5mmol/ml 总体积 100 μ l 覆盖石蜡油。首先 94 $^{\circ}$ C3min 期间加入 Taq 酶, PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C50s55 $^{\circ}$ C50s72 $^{\circ}$ C50s 共 30 个循环, 然

后72℃延伸7min取6μl PCR产物用1%琼脂糖进行电泳检查。纯化后的PCR产物用T4连接酶与pGEM-T载体(Promega)连接,连接产物转化大肠杆菌DH5α菌株,37℃培养过夜从转化平板上挑取白色转化子直接进行菌落PCR鉴定,选取一个含有目的基因的克隆,培养并用DNAminiprep试剂盒(Promega)提取质粒DNA(按说明书操作)本室PE373A自动测序仪测序。

1.5 表达载体 pETTrxHis-endostatin 的构建

用pfu酶从测序正确的PGEM-T-Endostatin质粒上扩增出两端为平末端的内皮抑素基因,用PCR纯化试剂盒纯化回收;表达载体pETTrxHis用SmaI 30℃酶切2h,纯化回收;目的片段和载体片段用T4 DNA连接酶16℃连接过夜,连接产物转化感受态的DH5α涂布氨苄平板37℃温箱培养过夜;挑取新鲜克隆直接进行菌体PCR鉴定,提取阳性克隆的质粒,用BamHI酶切鉴定插入方向;选取一个正向插入的阳性克隆送出测序。

1.6 人内皮抑素融合蛋白的高效可溶性表达

构建成功的pETTrxHis-endostatin转化感受态的BL21(DE3),涂布含氨苄的LB平板,37℃培养过夜,挑取单克隆,接种于5ml LB培养基中,37℃摇床培养10h,取2ml菌液加入甘油至终浓度20%,分成小份冻存于-70℃。其余菌液按1:100接种于50ml LB培养基中,37℃培养至OD=0.6左右,加入IPTG至终浓度1mmol/L然后于25℃诱导培养4h,离心收集诱导后的菌体,超声破碎或渗透压休克处理,然后14000r/min离心30min,将离心上清和沉淀用SDS-PAGE电泳分离,凝胶薄层扫描分析。

1.7 融合表达蛋白的初步固相金属螯和层析 (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 纯化分析

发酵菌液经超声破碎离心,分别收集包涵体和可溶性上清,对于可溶性上清直接纯化;对于包涵体首先进行超声洗涤去除大部分杂质,用6mol/L盐酸胍溶解包涵体然后用复性液(0.1mol/L Tris·Cl, 0.5mol/L 精氨酸, 1mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 1mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 8.0)对变性的包涵体复性(100℃, 48h)取上清,合并所有样品,用Pharmacia Chelating Sepharose Fast Flow柱进行金属螯合层析,用50mmol/L Tris·Cl, 500mmol/L NaCl(pH=8.0)平衡,250mmol/L咪唑洗脱,收集洗脱峰,12% SDS-PAGE分析洗脱液-20℃冻存。

1.8 IgA 蛋白酶对融合蛋白的切割及切割效果的 SDS-PAGE 分析。

在磷酸盐缓冲液 PBS(pH7.4)中将IgA蛋白酶10单位与纯化好的融合蛋白约1mg于37℃孵育2h,孵育后用SDS-PAGE电泳分析切割效果,并用抗人内皮抑素抗体进行免疫印记鉴定,检查切割效果。

1.9 融合表达蛋白的免疫印迹鉴定

Trx-Endo融合蛋白和IgA蛋白酶切割过的融合蛋白经SDS-PAGE分离后,按分子克隆实验指南的方法转移至硝酸纤维素膜;用丽春红-S染色显带,标出表达带位置,脱色后用含5%BSA的封闭液,于室温轻摇过夜,弃去封闭液,加入稀释好的鼠抗人内皮抑素多抗^[6],37℃轻摇2h,用200ml Tris-Tween洗膜3次,每次15min,与1:5000稀释好的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗37℃轻摇孵育2h,用200ml Tris-Tween洗膜3次,每次15min,最后一次洗膜后加入含H₂O₂和DAB的显色液显色,显色适度后用1mol/L H₂SO₄终止。酵母表达的重组人内皮抑素作为阳性对照。

1.10 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验

9日龄的鸡胚在气室下方开0.5cm²的小洞露出尿囊膜,分别把沾有5μg bFGF, 5μg bFGF和内皮抑素融合蛋白100μg的无菌滤纸小块(4mm²)放于尿囊膜上,用无菌透明胶封口,于37℃孵箱中继续培养48h,打开鸡胚观察。

2 结果与讨论

2.1 内皮抑素基因的扩增

以人胎肝cDNA文库为模板,PCR扩增出人内皮抑素基因,经1%琼脂糖电泳观察,大小约570bp与预期一致(图1)。

2.2 PCR产物的克隆及序列分析

PCR产物分离纯化后与T载体连接,连接产物转化大肠杆菌DH5α,从过夜培养的平板上挑取白色菌落,通过菌体PCR鉴定出阳性菌落,选取一个阳性菌落测序,结果与文献报道的编码人胶原XVIII NC1结构域C末端188个Aa的DNA序列一致^[7],与设计相同。

2.3 硫氧还蛋白-内皮抑素融合表达载体的构建

所用含硫氧还蛋白的载体pETTrxHisL为本室崔立斌博士构建,所带硫氧还蛋白基因经人工改

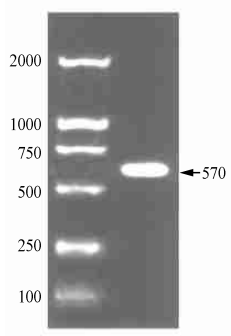


图 1 endostatinPCR 产物 1% 琼脂糖电泳分析图

Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis analysis of amplified endostatin cDNA

1: DL2000 DNA molecule weight marker; 2: PCR product of human Endostatin

构,在其活性位点(-Cys⁻Gly33-Pro34-Cys⁻)的 Gly33-Pro34 之间人工插入了多聚组氨酸 (His) 5Gly⁻, 并且折叠后呈现于硫氧还蛋白的表面。我们可方便地用金属螯和层析的方法纯化表达出的融合蛋白,简化了下游工作。而且在硫氧还蛋白和下游的外源基因之间还加入了 IgA 蛋白酶切割的识别位点,融合表达的蛋白可用 IgA 蛋白酶切割去掉硫氧还蛋白,获得所需目的蛋白。多克隆位点的限制性内切酶为 *Sma*I, 可以被切割形成平端,我们采用平端连接策略。用高保真的 pfuDNA 聚合酶从测序正确的 pGEMT-endostatin 上通过 PCR 的方法扩增出平端的内皮抑素 cDNA 片段,纯化后与用 *Sma*I 单酶切的 pETTrxHisL 连接,转化感受态的 DH5 α , 通过菌体 PCR 鉴定出阳性克隆,挑取阳性克隆用 *Bam*HI 单酶切鉴定插入方向,原载体多克隆位点下游是一个 *Bam*HI 位点,插入的人内皮抑素基因片段的 C' 末端引物中有外加的 *Bam*HI 位点,如果反向插入,则可用 *Bam*HI 切下目的片段(图 2)。

对经酶切鉴定正确的 pETTrxHis⁻endostatin 进行测序,结果表明读码框正确,与设计一致。

2.4 硫氧还蛋白-内皮抑素融合蛋白的表达

转化了 pETTrxHis⁻endostatin 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导表达,可以得到占全菌体 62% 以上的融合表达蛋白,SDS-PAGE 电泳分析显示融合表达的内皮抑素其表观分子量为 31.5kDa,与预期一致。分别对超声破碎的表达菌的上清和沉淀部分进行 SDS-PAGE 电泳分析,发现融合表达的蛋白一部分为位于可溶性表达上清中(图 3)。诱导后 2~3h 达到表达量的峰值(图 4),对诱导后 3h 的全菌体

蛋白(图 4, B1) 分离条带进行光密度扫描,显示表达的蛋白占全菌蛋白的 64.7%(图 4, A)。

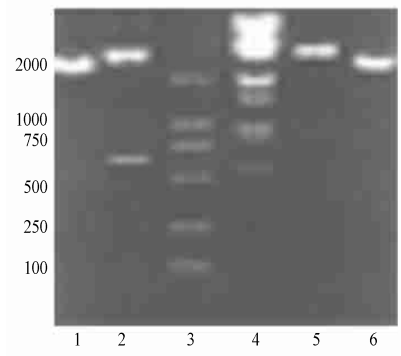


图 2 pETTrxHis endostatin 酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme cut of pETTrxHis endostatin

1: purified pETTrxHisL with trans insert; 2: BamHI single cut of trans insert; 3: DL2000 DNA marker; 4: DNA HindIII/EcoRI double cut marker; 5: BamHI single cut of pETTrxHisL with cis insert; 6: purified pETTrxHisL with cis insert

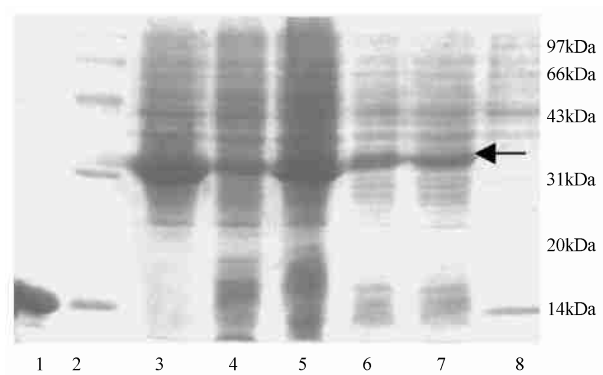


图 3 内皮抑素融合表达定位分析

1:pETTrxHisL 表达周质(硫氧还蛋白); 2: 分子量标准; 3: pETTrxHisL N4endo 表达菌破碎后不溶沉淀; 4: pETTrxHis N4Endo 表达全菌体; 5: pETTrxHis N4endo 表达菌破碎后可溶上清; 6, 7: pETTrxHisL N4endo 表达菌破碎后可溶上清; 8: pETTrxHisL N4Endo 表达菌诱导后周质蛋白

2.5 融合表达蛋白的纯化

我们用于与内皮抑素融合表达的硫氧还蛋白插入了 5 个组氨酸,并且这 5 个组氨酸位于折叠后的金属硫蛋白分子表面,所以我们用金属螯和层析的方法对于内皮抑素融合蛋白工程表达菌的可溶性裂解上清用 Pharmacia Chelating Sepharose Fast Flow 进行了纯化(图 5)。

2.6 融合蛋白用 IgA 蛋白酶切割及 Western 鉴定

融合表达的硫氧还蛋白与 C 端的内皮抑素之间有 IgA 蛋白酶识别位点,经 IgA 蛋白酶体外切割后可以完全分成大小正确的两部分,并且通过抗内皮抑素抗体的 Western 鉴定说明切割完全(图 6)。

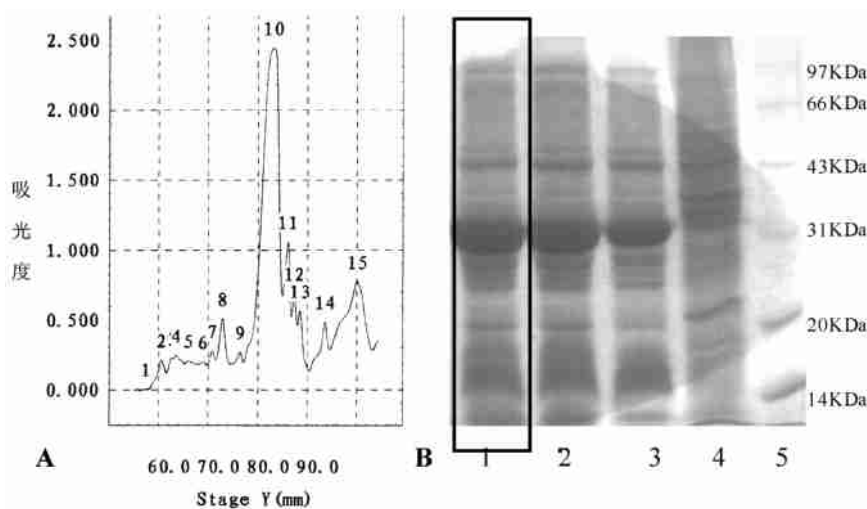


图 4 融合表达硫氧还蛋白 人内皮抑素的电泳分析

Fig. 4 SDS PAGE analysis of *E. coli* expressed Trx Endo fusion protein

A: SDS-PAGE thin layer scanning analysis No. 10 denote the expressed protein; B: 1: pETTrx His- Endo transformed *E. coli* strain, 3h after induce; 2: pETTrxHis Endo transformed *E. coli* strain, 2h after induce; 3: pETTrxHis Endo transformed *E. coli* strain, 1h after induce; 4: pETTrxHis Endo transformed *E. coli* strain un induce; 5: protein molecular weight marker

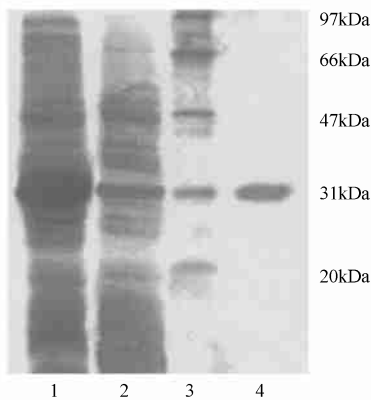


图 5 融合表达蛋白金属螯和层析纯化的 SDS PAGE 分析

Fig 5 SDS PAGE analysis of each fraction Trx- endostatin

1: whole cell lysis; 2: supernatant after binding; 3: molecule weight stander; 4: purified Trx- endostatin

2.7 重组可溶表达的人内皮抑素(rhEN)可以抑制鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)的新血管生成(图 7) 内皮抑素是很有前景的抗血管生成肿瘤治疗候选药物, 活性内皮抑素的获得一直是其研发中需要解决的难题。其天然含量甚微, 只有通过基因工程技术进行生产。大肠杆菌的遗传背景清楚, 体外操作容易, 可大规模, 高密度发酵且培养基成分要求简单, 一直是基因工程多肽类药物生产研究中的首选表达宿主细胞^[8]。但是许多外源蛋白在大肠杆菌内高量表达时以包涵体形式存在, 必须通过复

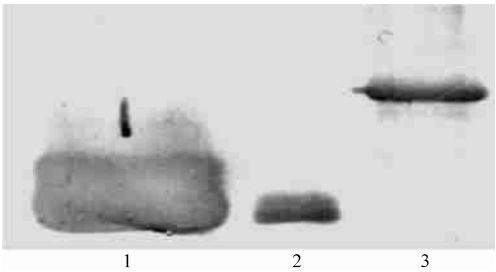


图 6 IgA 蛋白酶切割硫氧还蛋白 内皮抑素融合蛋白的内皮抑素 Western 鉴定

Fig. 6 Western blot analysis of Trx Endo fusion protein cutting by IgA proteinase

1: yeast produced human endostatin; 2: Trx Endo cutting by IgA proteinase; 3: Trx Endo fusion protein

性才能恢复天然的空间结构和生物功能, 根据以往报道内皮抑素在大肠杆菌中的表达都是不溶的包涵体形式并且难于复性^[3]。在大肠杆菌系统中使内皮抑素高效可溶性表达, 将解决内皮抑素基因工程生产的一个难题。大肠杆菌硫氧还蛋白(Thioredoxin) 与外源蛋白融合表达时具有分子内伴侣的作用, 许多融合于大肠杆菌硫氧还蛋白 C 端的细胞因子基因都能在胞内以可溶状态表达, 并且正确折叠获得与天然蛋白相近的生物活性^[9]。我们将内皮抑素基因融合于硫氧还蛋白的 C 端, 获得了高效可溶性表达, 而且我们所用硫氧还蛋白在其活性位点(-Cys Gly₃₃-Pro₃₄-Cys-) 的Gly₃₃-Pro₃₄之间插入

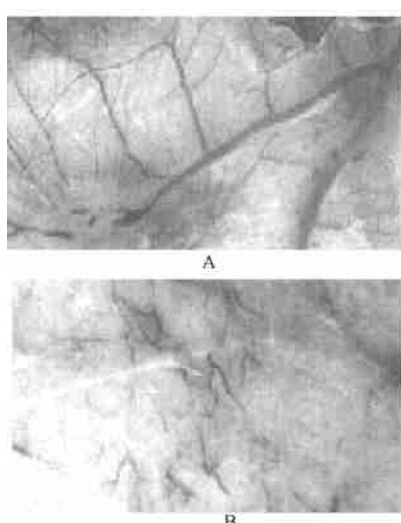


图7 重组可溶表达的人内皮抑素可以抑制鸡胚绒毛尿囊膜的新血管生成

A: 50 μ g/ml bFGF stimulate angiogenesis in CAM; B: rhEN inhibits bFGF induced angiogenesis in CAM

了多聚组氨酸, 折叠后位于分子表面, 使得我们可以通过金属螯和的方法对可溶性表达上清进行纯化, 极大地简化了生产步骤, 有良好的应用前景。此外在融合表达的外源蛋白和硫氧还蛋白之间还加有 IgA 蛋白酶特异识别的位点, 通过用 IgA 蛋白酶体外切割, 在温和条件下得到了所需的蛋白, 切割后的 Western 印迹显示出大小正确的单一条带, 表明切割效率可达 100%。初步的生物活性实验结果显示, 大肠杆菌表达的可溶性重组人内皮

抑素可以抑制 CAM 的新血管形成, 具有预期的生物活性, 进一步的活性研究正在进行中。

参考文献

[1] Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? Clowes G H A. memorial award lecture. Cancer Res, 1986, 46: 467~ 473

[2] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature, 1997, 390(6658): 404~ 407

[3] Ó Reilly M S, Boehm T, Folkman J, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, 1997, 88(2): 277~ 285

[4] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, et al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. Cancer Res, 1999, 59(1): 189~ 197

[5] Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, et al. Cloning, expression, and *in vitro* activity of human endostatin. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(2): 345~ 352

[6] 冯怡, 崔立斌, 刘传喧, 等. 内皮抑素在毕赤酵母中的表达、纯化与生物功能的研究. 生物工程学报, 2001, 17(3): 278~ 282

[7] Suk P O H, Matthew L Waman, Michael F Seldin, et al. Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the $\alpha 1$ (XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21

[8] Harris T J R. Expression of eukaryotic gene in *E. coli*. In: Genetic engineering, Williamsen R, Ed. 127~ 185, 1983

[9] McCoy M. A thioredoxin gene fusion system that circumvents inclusion body formation in *E. coli*. Biotechnology, 1993, 11: 187~ 193

Research about Soluble Expression of Human Endostatin in *E. coli*

FENG Yi ZHANG Yan-hong FENG Yu-mei MA Qing-jun

(Beijing Institute of Biotechnology Beijing 100850, China)

Abstract Endostatin is a potent, endogenous inhibitor of angiogenesis, which corresponds to the C-terminal fragment of collagen XVIII. cDNA coding for human endostatin was obtained from a human fetal liver cDNA library using PCR. After subcloned into the express vector pETTrxHisL and subsequenced to prove its correctness, pETTrxHisL-endostatin was transformed to *E. coli* BL21(DE3). The fusion protein Trx-Endostatin was expressed as soluble form, and can be purified by IMCA (Immobilized metal affinity chromatography) method. The SDS-PAGE thin layer scanning analysis found expression level was more than 64% total protein, and the Mol. Weight was about 31.5kDa. Western blot analysis indicate the immunoreactive was identical with natural hEndostatin. Biological activity was confirmed by CAM angiogenesis assay, the soluble human endostatin expressed by *E. coli* is potent to inhibit the angiogenesis in CAM.

Key words Endostatin Thioredoxin Soluble expression Anti-angiogenesis