

人纤溶酶原 K5 突变体 I 的构建及其在大肠杆菌中的表达与纯化

蔡卫斌¹, 李朝阳², 杨中汉¹, 骆晓枫¹, 周世豪¹, 李民友³, 刘祖国², 高国全¹

(中山大学 1. 基础医学院生化教研室, 2. 中山眼科中心, 广东 广州 510080;

3. 广州市启源生物科技有限公司, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】构建人纤溶酶原 Kringle 5(K5)的突变体 Cys461-Cys540(K5 mut1), 在大肠杆菌中表达, 亲和层析纯化, 为探讨 K5 抗血管增生活性与 Kringle 结构域的关系提供基础。【方法】以 K5 全长 cDNA 为模板用 PCR 的方法扩增人纤溶酶原 K5 mut1 基因, 将其克隆进表达载体 pET-22b(+) 中, 并用限制性核酸内切酶酶切和 DNA 测序鉴定其连接正确; pET-22b(+)/K5 mut1 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 表达产物用固化 Ni²⁺-His Bind Resin 亲和层析方法纯化, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western blot 方法分析鉴定。【结果】PCR 扩增获得 258 bp 的人纤溶酶原 K5 mut1 基因片段, 正确插入 pET-22b(+) 载体, 在大肠杆菌中该基因编码蛋白的表达量占菌体总蛋白 13% 左右; SDS-PAGE 显示其相对分子质量 $M_r \approx 14.1 \times 10^3$, Western blot 证实该表达蛋白为 K5 mut1 重组蛋白, 经亲和层析后 K5 mut1 重组蛋白纯度大于 90%, 获得率约为 10 mg/L。【结论】成功构建人纤溶酶原 K5 mut1, 实现在大肠杆菌中高效表达, 亲和层析纯化获得较高纯度 K5 mut1 重组蛋白。

关键词: 纤溶酶原; 突变型 K5; 血管增生抑制因子; 突变; 基因表达

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0241-04

Construction, Expression and Purification of Human Plasminogen Kringle 5 Mutant I in *E. coli*

CAI Wei-bin¹, LI Chao-yang², YANG Zhong-han¹, LUO Xiao-feng¹, ZHOU Shi-hao¹,

LI Min-you³, LIU Zu-guo², GAO Guo-quan¹

(1. Department of Biochemistry, Basal Medical College, 2. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Guangzhou Qiyuan Biotech Co. Ltd, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】The purpose of the present study was to construct, express and purify human plasminogen kringle 5 mutant I(K5 mut1). The purified K5 mut1 recombinant protein will be employed to explore the correlation between the anti-angiogenic activity and the kringle domain of K5.【Methods】The gene of K5 mut1 was amplified from the K5 cDNA by PCR and inserted into the expression vector of pET-22b(+). The recombinant pET-22b(+)/K5 mut1 was transferred into *E. coli* of BL21(DE3) and identified by restriction enzyme analysis. K5 mut1 was expressed in *E. coli* induced by IPTG. and Ni²⁺-His Binding affinity-purified. The recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western blot analysis.【Results】The acquired mutant gene was 258 bp. The construct was expressed in *E. coli* at high level as soluble protein, accounting for 13% of the total bacterial proteins. The relative molecular mass of the protein appeared to be about 14.1×10^3 by SDS-PAGE. The purity of K5 mut1 reaches up to over 90% after purified by Ni²⁺-His Bind Resin affini-

收稿日期: 2003-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370313); 中华医学基金会资助项目(CMB-SUMS 学者项目#98-677); 教育部回国人员基金资助项目(2003); 广东省医学科研基金资助项目(A2003153); 广州市科技攻关重点基金资助项目(2003Z2-E4091)

作者简介: 蔡卫斌(1976-), 男, 湖北黄冈人, 硕士, 助教; 高国全, 副教授, 课题负责人, 通讯作者. E-mail: gaog@gzsums.edu.cn

ty chromatography. The identify of recombinant K5 mut1 was confirmed by Western blot analysis using anti-His tag antibody. An average of 10 mg of purified K5 mut1 was obtained from 1 litre of *E. coli* culture. 【Conclusion】 The construction, expression and purification of K5 mut1 in *E. coli* was successful.

Key words: plasminogen; kringle 5; angiogenic inhibitor; mutation; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(3): 241-244]

人纤溶酶原 (human plasminogen, hPgn) 是一种包含有 5 个 Kringle 结构域的糖蛋白, 它的水解片段有抑制血管增生活性。1994 年 O'Reilly 等^[1]从荷瘤小鼠的尿液和血清中分离纯化得到血管抑素 (angiostatin), 它与人纤溶酶原 Kringle1-4 区有高度同源性。随后有实验证实血管抑素能特异性地抑制内皮细胞增殖, 也可以抑制原发瘤及转移瘤组织中的血管生成^[2]。1996 年 Cao 等^[3]比较了血管抑素中各个 Kringle 区的抗血管增生活性, 发现每个独立 Kringle 片段都能不同程度地抑制内皮细胞增殖, 而且单独的 K5 片段抗血管活性更强, 它是目前所知的抑制内皮细胞增殖和迁移最有效的纤溶酶原片段^[4, 5]。完整的 Kringle 结构对这些片段抗血管增生活性有重大影响。有研究证实破坏血管抑素 Kringle 环之间和环内部的二硫键能显著降低其抗内皮细胞增殖的活性^[3]。但是对 K5 的 Kringle 结构研究则有不同的看法。Ji 等^[6]用还原和烷基化处理的 K5 比 K5 本身具有更强的抗内皮细胞增生能力, 其原因可能是 Kringle 结构“掩盖”了 K5 中某些功能性基因与内皮细胞的有效作用; 而最近 Tarui 等^[7]用高浓度的尿素 (8 mol/L) 处理纯化的 K5, 能使 K5 丧失抗内皮细胞增殖和迁移的能力。本研究是在上述理论基础, 对 K5 分子进行改造, 删除野生型 K5 N 端 10 个氨基酸和 C 端 5 个氨基酸, 保留完整的 Kringle 结构域, 构建 K5 突变体 Cys461-Cys540 (K5 mut1) 并实现其在大肠杆菌中表达, 为进一步探讨 K5 抗血管增生活性与 Kringle 结构的关系打下基础, 同时建立起一种高效的、稳定可靠的蛋白纯化路线和方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

含人纤溶酶原 K5 基因的重组质粒 pET-22b (+)/K5, 由本室构建; 表达菌株 BL21(DE3) 和表达载体 pET-22b (+) 质粒从美国 NOVAGEN 公司购买。

1.2 实验材料

限制性核酸内切酶 EcoR I、Hind III 和 T4 DNA 连接酶 (美国 New England BioLabs); Pfu DNA

聚合酶 (美国 STRATAGENE 公司); DNA 胶回收试剂盒 (美国 Qiagen 公司); PCR 引物和 DNA 片段测序 (上海生物工程有限公司); IPTG、羧苄西林 (北京鼎国生物技术发展中心); His-tag 鼠源性单克隆抗体、HRP 标记的抗鼠多克隆抗体 (美国 Oncogene 公司); His Bind Resin 和 His Bind Buffer (美国 NOVAGEN 公司); ECL 化学发光试剂盒 (瑞士 Pharmacia Biotech); DC 法蛋白定量试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司), 其余为国产分析纯试剂。

1.3 聚合酶链反应扩增目的 DNA 片段

根据纤溶酶原 K5 基因序列设计引物, 上游引物 5'端含 EcoR I 识别序列 (5'-G↓AATTC-3'), 下游引物 5'端含 Hind III 识别序列 (5'-A↓AGCTT-3'), 引物序列如下: P1: 5'-ATGA ATTCGTGTATGTTTGGGAATGGG-3'; P2: 5'-GCCAAGCTTCACTGAGGGACATCACAGTAG-3'; 以含人纤溶酶原 K5 基因重组质粒 pET-22b (+)/K5 为模板, 通过 PCR 的方法扩增目的基因片段。PCR 循环反应条件: 95 °C 变性 80 s, 55 °C 退火 100 s, 72 °C 延伸 120 s, 共进行 30 个循环。

1.4 K5 突变体构建、重组体转化和鉴定

酚: 氯仿抽提 PCR 反应产物, 纯化突变 K5 基因片段 (K5 mut1)。用 EcoR I 和 Hind III 双酶切 pET-22b (+) 质粒 DNA 和 K5 mut1 基因片段, 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳回收目的基因片段和载体, 基因片段和载体片段以 1:1 分子比例进行连接反应。利用 CaCl₂ 制备感受态 BL21(DE3) 菌株, 进行重组体 pET-22b (+)/K5 mut1 转化。转化后的菌株接种在含有 50 mg/L 羧苄西林的培养平板上, 筛选阳性菌落进行扩增。pET-22b (+)/K5 mut1 重组体连接准确性和正确读码框架采用测序和 EcoR I 与 Hind III 双酶切方法进行鉴定, 酶切产物经 50 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳后银盐染色观察。

1.5 重组蛋白的诱导表达

转化后的阳性菌株扩增至 A₆₀₀ 达 0.4~0.6 时用终浓度为 0.6 mmol/L IPTG 低温 (25 °C) 诱导 10~14 h, 离心收集细菌, 沉淀重悬于 1 × SDS 细胞裂解液 (20 g/L SDS; 体积分数 10% 甘油; 1 g/L 溴酚蓝; 体积分数 2.5% β- 巯基乙醇; 0.05 mol/L Tris-Cl, pH 6.8), 超声破碎细菌, 裂解液 95 °C 加热

10 min, 5 000 × g 离心 10 min(TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂), 收集上清即为可溶性蛋白质提取液。160 g/L SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝 R-250 染色观察。

1.6 突变型 K5 蛋白纯化和鉴定

参照文献[8], 离心收集 IPTG 诱导表达后的细菌, 重悬于含有 200 mg/L 溶菌酶的结合缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄; 300 mmol/L NaCl; pH8.0), 37 °C 温育 3 h, 15 000 × g 低温离心 30 min(TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂), 收集上清, 调节 pH 至 8.0 后用孔径为 0.45 μm 的滤膜超滤, 处理好的样品用固化 Ni²⁺树脂亲和层析纯化。采用 SDS-PAGE 和 Western blot 的方法定性鉴定重组蛋白, 用 DC 法测定蛋白质浓度。

2 结 果

2.1 重组体 pET-22b(+)/K5 mut1 的构建、筛选与鉴定

根据质粒图谱特点和人纤溶酶原 K5 基因序列, 合理设计引物, 通过 PCR 扩增出大小约为 258 bp 的目的基因片段。将目的基因酶切后定向克隆进 pET-22b(+)的 EcoR I/ Hind III 位点, 构建了表达载体 pET-22b(+)/K5 mut1。

转化后的菌株能在含有 50 mg/L 羧苄西林选

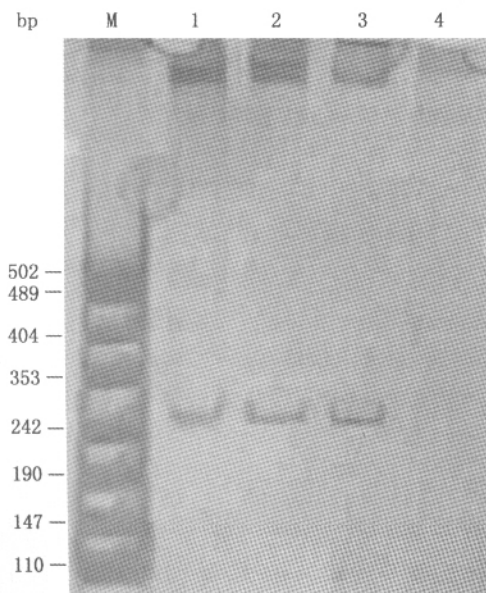


图 1 重组质粒 pET-22b(+)/K5 mut1 的酶切鉴定

Fig.1 Endonuclease identification of pET-22b(+)/K5 mut1
M: DNA marker; 1~3: pET-22b(+)/K5 mut1 digested by EcoR I and Hind III ; 4: pET-22b(+)/K5 mut1 without digestion

择平板上生长, 形成单克隆菌落。

扩增阳性菌株, 提取重组质粒 DNA, 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切得到大小约为 258 bp 的 DNA 片段(图 1), 与预期结果相符, 表明载体构建正确。

2.2 重组体 pET-22b(+)/K5 mut1 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

细菌的裂解产物用 SDS-PAGE 分析显示: IPTG 诱导后的细菌在相对分子质量 $M_r = 14.1 \times 10^3$ 处有明显的蛋白表达带(图 2), 比 K5 的相对分子质量 ($M_r = 16 \times 10^3$) 稍小, 与理论推算值相符; 用凝胶成像系统(GENE GENIUS 公司产品)对凝胶进行灰度扫描, 结果显示重组蛋白表达量达到菌体总蛋白量的 13% (图 2)。

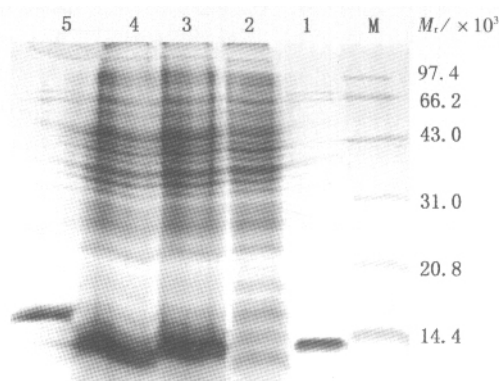


图 2 重组质粒 pET-22b(+)/K5 mut1 表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression and purification of K5 mut1 recombinant protein

M: protein marker; 1: the purified mutant K5; 2: sample before IPTG induction; 3-4: samples after IPTG induction; 5: the purified K5

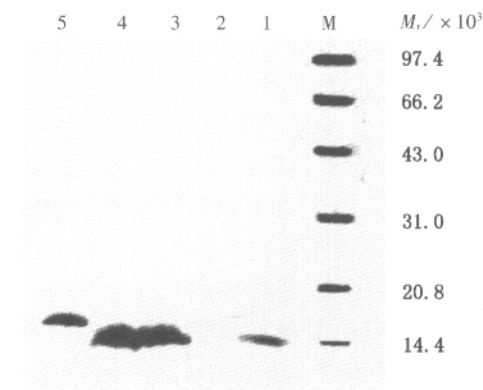


图 3 重组质粒 pET-22b(+)/K5 mut1 表达产物的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of expression of pET-22b(+)/K5 mut1

M: protein marker; 1: the purified mutant K5; 2: sample before IPTG induction; 3-4: samples after IPTG induction; 5: the purified K5

2.3 突变型 K5 蛋白的纯化与鉴定

诱导表达的细菌经溶菌酶充分消化后,离心取上清,用 Ni^{2+} -His Bind Resin 亲和柱纯化,可获得纯度在 90% 以上的可溶性蛋白(图 2),获得率约为 10 mg/L。Western blot 分析显示,纯化的重组蛋白和诱导后各组在相对分子质量 $M_r \approx 14.1 \times 10^3$ 处有明显的免疫杂交带,分子均比带有 His-tag 的 K5 蛋白小, IPTG 诱导前无杂交带(图 3)。

3 讨 论

K5 是目前所知的抗血管增生活性最强的人纤溶酶原水解片段,它由一个完整的 Kringle 结构和末端氨基酸序列构成^[9], Kringle 结构中包含有 3 个二硫键 Cys461-Cys540, Cys482-Cys523 和 Cys511-Cys535。有研究发现 Kringle 结构阻碍了 K5 中某些功能性基团与内皮细胞的有效作用,用还原剂和烷化剂打断 K5 中二硫键,可以减轻这种“掩盖效应”,充分暴露有效基团^[6]。目前还不清楚 Kringle 结构中哪些有效基团与 K5 的活性密切相关。本研究根据野生型 K5 的空间结构特征、氨基酸组成特点和编码基因序列,合理设计引物,通过基因工程的方法删除了野生型 K5 分子 N 末端 10 个氨基酸残基和 C 末端 5 个氨基酸残基,保留了从 N-末端 C-M-F-G 到 C-末端 V-P-Q-C 之间的 80 个氨基酸,这种突变型的 K5 相对分子质量 $M_r \approx 14.1 \times 10^3$, 比野生型的 K5(相对分子质量 $M_r \approx 16 \times 10^3$) 分子小。

分泌型表达载体 pET-22b(+) 质粒和宿主菌 BL21(DE3) 为本研究所采用的表达系统,它能高效、快速地表达和纯化重组蛋白^[10]。本实验以 pET-22b(+)/K5 重组体为模板扩增 K5 mut1 基因,在上、下游引物 5'端分别设计 EcoR I、Hind III 酶切位点,以便将目的 DNA 片段定向克隆进 pET-22b(+) 质粒载体。在质粒 pET-22b(+) 目的基因插入位点的 5'端具有编码信号肽的序列,通过信号肽可以直接将产物分泌到大肠杆菌内膜与外膜之间的周质,在周质内氧化环境下,形成二硫键继之正确折叠成功能性蛋白,同时信号肽被切除^[10]。载体 pET-22b(+) 在目的基因插入位点的 3'端含有编码 6 个组氨酸的序列,诱导表达后在重组蛋白 Mut K5 的 C 末端带有连续 6 个组氨酸的标签,它能和 Ni^{2+} -His Bind Resin 亲和柱结合,极大地提高了重组蛋白纯化的效率和纯度。在本实验中层析后可溶性蛋白的纯度大于 90%, 得率约为 10 mg/L, SDS-PAGE 显示重组蛋白的相对分子质

量 $M_r \approx 14.1 \times 10^3$, Western Blot 方法也检测到在相对分子质量 $M_r \approx 14.1 \times 10^3$ 处有明显的免疫杂交带,表明该表达纯化系统可以高效、高纯度获得人纤溶酶原 K5 片段突变体重组蛋白质。该系统也可用于其它多种基因编码蛋白的表达纯化^[8,11]。

我们成功地构建了人纤溶酶原 K5 缺失突变体 K5 mut1, 并在大肠杆菌中进行了表达,纯化后获得人纤溶酶原 K5 片段突变体重组蛋白质。

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 Lewis lung carcinoma[J]. Cell, 1994, 21(79): 315-28.
- [2] O' Reilly M S, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice[J]. Nat Med, 1996, 2(6): 689-92.
- [3] Cao Y, Ji R W, Davidson D, et al. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 29461-7.
- [4] Cao Y, Chen A, An S S, et al. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth[J]. J Biol Chem, 1997, 272(36): 22924-8.
- [5] Gao G(高国全), Li Y, Gee S, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5 [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (11): 9492-7.
- [6] 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[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(2): 414-9.
- [7] Tarui T, Miles L A, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v) beta(3) in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(43): 39562-8.
- [8] Zhang D, Kaufman P L, Gao G(高国全), et al. In-travitreal injection of plasminogen kringle5, an endogenous angiogenic inhibitor, arrests retinal neovascularization in rats[J]. Diabetologia, 2001, 44(6): 757-65.
- [9] Lu H, Dhanabal M, Volk R, et al. Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(3): 668-73.
- [10] 李 彪,朱承谟,吴祥甫. 抗 CEA 单链抗体与人 hTNF- α 融合基因的构建、表达和纯化[J]. 上海免疫学杂志, 1999, 19(5): 271-4.
- [11] Gao G(高国全), Shao C, Zhang S X, et al. Kallikrein-binding protein inhibits retinal neovascularization and decreases vascular leakage[J]. Diabetologia, 2003, 46 (5): 689-98.

(编辑 张敏瑞)