

• 论 著 •

表皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶的表达、纯化及活性测定

李 林¹, 赵海丹¹, 李国伟², 陈 静², 沈 旭², 梅长林^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 200023)

[摘要] **目的:** 采用原核表达体系对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)受体型酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)进行体外表达、纯化及活性鉴定。**方法:** 以包含 EGFR cDNA 的 pRK5 质粒为模板, PCR 选择扩增编码 EGFR-RTK 的 cDNA 片段, 插入 pQE30 质粒后转染大肠杆菌 M15。IPTG 诱导表达融合蛋白, 包涵体蛋白经复性后亲和层析法纯化, ELISA 方法测定蛋白活性。**结果:** 成功地将 933 bp 的 EGFR-RTK cDNA 片段插入载体 pQE30 中, 构建了表达载体 pQE30-RTK。经诱导在原核表达系统中以包涵体形式高效表达了相对分子质量为 37 000 的 EGFR-RTK 融合蛋白, 表达量约占菌体总蛋白的 65.2%。复性、纯化后的 EGFR-RTK 蛋白经 ELISA 检测, 结果发现随着加入蛋白量的增加, 酶促反应产物磷酸化酪氨酸的量也逐渐增加, 两者具有线性关系。**结论:** 本实验成功地利用原核表达系统表达了具有生物学活性的 EGFR-RTK, 较传统的昆虫细胞表达系统更为简便、经济。

[关键词] 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶; 基因表达

[中图分类号] R 786

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1353-04

Expression, purification and bioactivity determination of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase

LI Lin¹, ZHAO Hai-Dan¹, LI Guo-Wei², CHEN Jing², SHEN Xu², MEI Chang-Lin^{1*} (1. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200023)

[ABSTRACT] **Objective:** To express the epidermal growth factor receptor (EGFR) protein tyrosine kinase (RTK) in *E. coli* and to detect its bioactivity after purifying the fusion protein. **Methods:** Using the plasmid pRK5 containing the EGFR cDNA as the template, we selectively amplified the fragment which coding EGFR-RTK. The fragment was then inserted into the prokaryotic expression vector (pQE30) and transformed into competent *E. coli* cells (M15). Fusion protein expression was induced by IPTG. After renaturation, the protein was purified by affinity chromatography and the bioactivity was examined by ELISA. **Results:** We successfully inserted EGFR-RTK cDNA fragment of 933 bp into vector pQE30 and constructed the expression vector pQE30-RTK. The fusion protein, with a molecular weight of 37 000, was efficiently expressed as inclusion in the prokaryotic expressive system with the yield of 65.2% total bacterial protein. After renaturation and purification, the recombinant protein was proven to be bioactive by ELISA. **Conclusion:** The expression and purification of the bioactive EGFR-RTK in prokaryotic expression system in this study is cheaper and easier than the traditional insect expression system.

[KEY WORDS] epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1353-1356]

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种广泛分布于许多细胞表面的跨膜糖蛋白, 相对分子质量约为 170 000。当 EGFR 与相应配体如表皮生长因子(EGF)结合后, 可激活 EGFR 胞内区的受体型酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)。RTK 具有自身磷酸化和底物磷酸化的生物学活性, 能催化信号蛋白中的酪氨酸残基磷酸化, 再通过级联反应, 促进细胞增殖、分化。除了调节正常生理过程之外, EGFR 在许多肿瘤和类肿瘤疾病如非小细胞性肺癌、乳腺癌、银屑病、多囊肾病中都有过度表达, 并与疾病的预后密切相关^[1]。因此以 EGFR-RTK 作为药物作用靶标

的药物设计与开发日益成为研究热点^[2,3]。为测定 EGFR-RTK 蛋白晶体结构, 进一步明确其致病作用, 并建立相应的药物筛选模型, 大量表达具有生物学活性的 EGFR-RTK 蛋白至关重要。目前已经成功应用昆虫表达体系表达了活性 EGFR-RTK^[4], 但该方法复杂且产量低。本研究将采用原核表达体系对 EGFR-RTK 蛋白进行体外表达、纯化及活性鉴

[基金项目] 上海市科委重大基础项目基金(02JC14029); 国家自然科学基金(30170901); 国家科技部重大科技专项基金(2002AA2Z3130)。

[作者简介] 李 林(1975-), 女(汉族), 博士生。

* Corresponding author. E-mail: chlmei@public1.sta.net.cn

定。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)菌株和质粒:包含 EGFR cDNA 的质粒 pRK5 由中国科学院上海药物研究所沈旭教授提供,表达载体 pQE30、表达宿主菌 M15 为德国 Qiagen 公司产品。(2)工具酶及主要试剂:各种限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶系 TaKaRa 公司产品,胶回收试剂盒为华舜公司产品,纯化树脂 Chelating Sepharose[®] Fast Flow 为 Pharmacia Biotech 公司产品,RTK 活性检测试剂盒购自 Chemicon 公司。

1.2 引物设计与 PCR 扩增 参考已报道的 EGFR-RTK cDNA 序列(GenBank, AF288738),采用 Primer Premier 5.0 程序设计引物,由康成公司合成,其中上游引物序列为 5'-ACT AGC ATG CCA GGA GAG GGA GC-3',位于第 2 050 位碱基,5'端添加 *Sph* I 位点;下游引物序列为 5'-CCG AAG CTT GTC TGT AGG ACT-3',位于第 2 982 位碱基,5'端添加 *Hind* III 位点。PCR 循环条件:以包含 EGFR cDNA 的 pRK5 质粒为模板,94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 100 s, 共进行 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3 融合蛋白表达载体的构建 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒纯化,将表达载体 pQE30 和目的基因片段经 *Hind* III 和 *Sph* I 双酶切,回收纯化后连接,转化感受态宿主菌 M15,在含氨苄青霉素和卡那霉素的平板上挑取单菌落筛选阳性克隆,酶切鉴定,并经 ABI PRISM[™] 3700 型 DNA 测序仪测序分析。构建的重组质粒称为 pQE30-RTK。

1.4 融合蛋白的诱导表达 将含有重组质粒的大肠杆菌 M15 在 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 μg/ml 和卡那霉素 25 μg/ml)中 37℃ 培养过夜,以 1:50 体积比接种在 LB 培养基中,继续培养至 D_{600} 值为 0.7~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 20℃ 诱导表达 6 h。

1.5 融合蛋白的复性、纯化及 SDS-PAGE 分析 收集菌体,加入裂解液和溶菌酶,冰浴 30 h,超声破碎菌体,4℃ 下 15 000 r/min 超速离心后沉淀经蔗糖溶液、2 mol/L 尿素等洗涤后溶于 8 mol/L 尿素溶液。将上清加入 10 倍体积复性液(20 mmol/L Tris, 0.25 mol/L NaCl, 0.5% NP-40, 0.4 mmol/L PMSF, 5.0 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 2.0 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 100 mmol/L EDTA),调整复性液中蛋白浓度约为 100 μg/ml, 4℃ 复性 24 h。高速离

心 15 h,收取上清与经 Ni 活化的树脂混合,用梯度咪唑溶液(10~100 mmol/L)洗涤并洗脱融合蛋白,分步收集流出液。SDS-PAGE 分析融合蛋白及其纯度。

1.6 RTK 活性测定 按 RTK 活性检测试剂盒说明进行。离心管内加入 RTK 底物、ATP/MgCl₂ 溶液及纯化的 EGFR-RTK 蛋白(或标准 RTK 蛋白), 37℃ 孵育 45 min,加入 120 mmol/L 的 EDTA 终止反应。每个样品设 2 个复孔,反应混合液加入酶标板 37℃ 孵育 30 min,洗涤液洗涤,加入封闭液 37℃ 孵育 30 min。去除液体,加入 HRP 偶联的抗磷酸化酪氨酸抗体,室温振荡孵育 1 h。加入 TMB 底物室温孵育 5~15 min,加入终止液后,立即用酶标仪读出 450 nm 处 *D* 值。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 琼脂糖凝胶电泳证实 PCR 扩增得到约 0.9 kb 特异性条带,片段大小与理论预期值一致(图 1)。

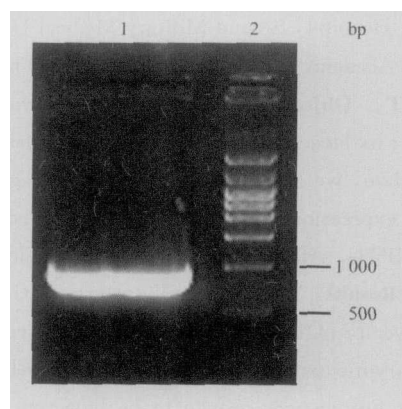


图 1 EGFR-RTK 的 PCR 扩增片段的凝胶电泳分析

Fig 1 Gel electrophoresis of PCR products of EGFR-RTK

1: PCR products of EGFR-RTK(0.9 kb); 2: DNA marker

2.2 表达载体 pQE30-RTK 的构建 质粒经 *Hind* III 和 *Sph* I 双酶切出现约为 3.4 kb 和 0.9 kb 2 条特异性条带,前者与 pQE30 大小一致,后者与插入片段大小一致(图 2)。经测序与报道的 EGFR-RTK 序列一致,证实已经成功构建了表达载体 pQE30-RTK。

2.3 目的蛋白的表达 表达载体 pQE30-RTK 转化 M15 菌株,经 IPTG 诱导,12% SDS-PAGE 分析表明在相对分子质量约 37 000 处新增条带,表达形式部分为可溶性蛋白,大部分存在于包涵体内,表达量约占细菌总蛋白的 65.2%(图 3)。

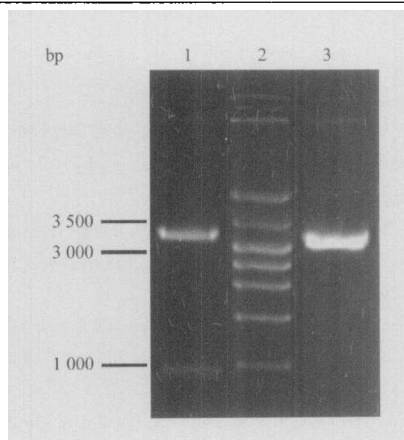


图2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig 2 Electrophoresis of double enzymatic digestion of recombinant plasmid

1: pQE30-RTK digested by *Hind* III / *Sph* I ;
2: DNA marker; 3: pQE30 digested by *Hind* III / *Sph* I

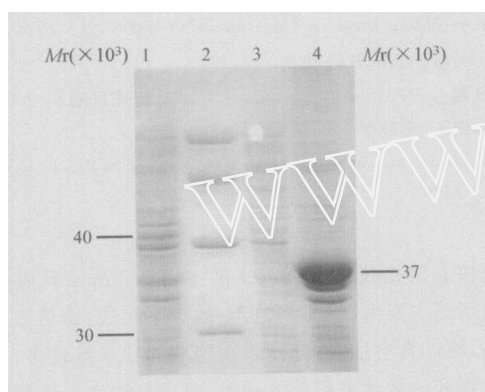


图3 SDS-PAGE 分析 EGFR-RTK 的表达

Fig 3 Expression of EGFR-RTK by SDS-PAGE

1: Bacterial extracts of RTK-M15 un-induced; 2: Protein molecular mass marker; 3: Supernatant of bacterial extracts of RTK-M15 induced; 4: Sediment of bacterial extracts of RTK-M15 induced

2.4 包涵体蛋白的复性与纯化 包涵体复性、Ni柱纯化后经 SDS-PAGE 分析, 得到相对分子质量约 37 000 的单一一条带, 与 RTK 的理论计算值相符, 纯度为 94.7% (图 4)。

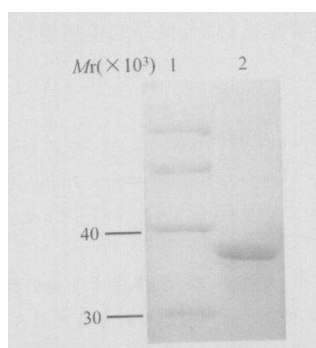


图4 SDS-PAGE 分析 EGFR-RTK 的纯化

Fig 4 Purification of EGFR-RTK by SDS-PAGE

1: Protein molecular mass marker;
2: Purified protein of EGFR-RTK

2.4 EGFR-RTK 活性检测 根据蛋白质量和 D_{450} 值绘制曲线 (图 5)。可见随着加入 EGFR-RTK 蛋白量的增加, 酶促反应产物磷酸化酪氨酸的量也逐渐增加, 两者具有线性关系, 即表达的重组 EGFR-RTK 具有将底物蛋白的酪氨酸残基磷酸化的生物学活性。

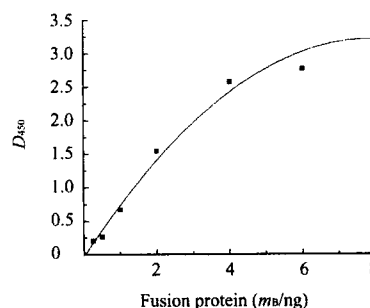


图5 ELISA 方法检测酪氨酸激酶活性

Fig 5 Tyrosine kinase activity assay by ELISA

3 讨论

获得 EGFR-RTK 蛋白的传统方法是从细胞或组织中分离、纯化, 或采用昆虫表达体系进行真核表达, 这些方法存在操作复杂、产量低等缺点。因此, 本实验采用原核表达系统来表达活性 EGFR-RTK。所选用的 pQE30 表达载体属于质粒 pDS 家族的低拷贝质粒, 在 T_5 启动子的作用下能高效表达氨基端含 6 个组氨酸 (6×His Tag) 的融合蛋白。6×His Tag 相对分子质量很小, 仅为 840 (其他 Tag 如 GST 为 26 000), 且 His 在生理 pH 范围内不带电荷, 不影响融合蛋白的结构、功能和免疫原性, 纯化后无需蛋白酶剪切。pQE30 的宿主菌 M15 含有的低拷贝质粒 pREP4, 所表达的阻遏蛋白 lac 能同 pQE30 的 lac 操纵子序列结合, 严密调控重组蛋白的表达。表达的融合蛋白通过 6×His Tag 与螯合在树脂上的金属镍离子 (Ni^{2+}) 成键特异性吸附于树脂, 再通过高浓度咪唑洗脱得以纯化。

与其他在大肠杆菌中高效表达的蛋白相同, EGFR-RTK 在大肠杆菌中绝大多数是以包涵体形式存在, 包涵体的形成可获得高表达、高纯度的重组蛋白, 避免细胞水解酶对蛋白质的破坏, 但往往无法获得具有活性的蛋白。本实验在包涵体增溶时加入还原剂 GSH 打开蛋白质中所有二硫键, 避免含二硫键的杂蛋白影响包涵体的溶解。此外还加入了金属螯合剂 EDTA 螯合 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子, 以免与还原态的巯基发生氧化反应。复性过程中采用了氧

化型/还原型谷胱甘肽(GSH/GSSG)作为氧化-还原系统,通过促使不正确形成的二硫键的快速交换反应,提高了正确配对的二硫键的产率^[5]。为提高蛋白的复性效率,变性蛋白在复性液中浓度控制在 0.1~1 mg/ml,复性缓冲液的 pH 值宜控制在 7.0~8.0,还应注意变性剂的起始浓度、去除速度以及离子强度等条件^[6]。

本实验成功地将 933 bp 的 EGFR-RTK cDNA 片段插入表达载体 pQE30,构建了表达载体 pQE30-RTK,在大肠杆菌中表达了相对分子质量为 37 000 的融合蛋白,该融合蛋白相当于 EGFR 的胞内 RTK 片段第 684~994 位氨基酸。融合蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式高效表达,表达量约占菌体总蛋白的 65.2%。变性 RTK 蛋白经复性、纯化后显示了良好的生物学活性,为下一步研究蛋白质三维结构,建立以 EGFR-RTK 为靶标的药物筛选模型奠定了基础。

(上接第 1352 页)

局部麻醉下进行,减少了整个乳腺癌根治手术全身麻醉的时间。详见表 1。

表 1 乳腺癌快速活检定性诊断方法与手术活检定性诊断方法的比较

($n=26, \bar{x} \pm s, t/\text{min}$)

分 组	手术时间	病理冰冻检查时间	根治手术全身麻醉时间
快速活检定性	8.2±2.3*	30.5±4.1	130±26*
手术切除活检定性	26.8±4.1	28.8±2.1	178±31

* $P<0.05$ 与手术切除活检定性诊断组比较

3 讨 论

乳腺癌容易发生血行转移和局部播散,极有可能直接接触肿瘤组织的手术切除活检方法容易造成癌细胞血行转移和局部播散。一项经典的、具有代表性的乳腺癌组织病理学研究显示在癌肿周围 2 cm 范围以外进行切除时约有 43% 的癌细胞残留率^[1],国内的资料亦显示活检 3 cm 范围以内近癌区乳腺组织内癌细胞残留率为 41%,3 cm 范围以外远癌区乳腺组织内癌细胞残留率为 18%^[2],显然传统的切除活检非常容易造成医源性播散已是不争的事实。有人曾经尝试术前细针针吸细胞学检查替代术中切除活检^[2,3],以减少术中直接接触肿瘤组织的机会,对预防癌细胞术中血行播散和减少局部种植均有重要意义。但是其标本不能够进行病理学冰冻检查,且阳性率和灵敏度有限,不宜推广使用。因此迫切需要寻求一种术前快速、简便、准确、实用、安全的定性诊断方法,用来指导乳腺癌手术治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression [J]. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 4): 31-39.
- [2] Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 2958-2970.
- [3] Dancy JE, Schoenfeldt M. Epidermal growth factor receptor inhibitors in clinical trials [J]. *Oncology*, 2001, 15 (6): 748-750.
- [4] Greenfield C, Patel G, Clark S, et al. Expression of the human EGF receptor with ligand stimutable kinase activity in insect cells using a baculovirus vector [J]. *EMBO J*, 1988, 7(1): 139-146.
- [5] Clark DB. Protein refolding for industrial processes [J]. *Curr Opin Biotech*, 2001, 12(2): 202-207.
- [6] Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 28(1): 1-8.

[收稿日期] 2004-04-27

[修回日期] 2004-09-06

[本文编辑] 邓晓群

由核心活检技术发展起来的 Mammotome 乳腺病灶微创旋切系统主要由旋切刀和真空抽吸泵组成,旋切刀由套管针组成,辅以真空抽吸,能使每次切取的标本量较多,另外通过内套管针的运动可将标本送出,可重复操作。本研究采用乳腺旋切技术建立的术前快速定性诊断方法可以在真空吸引下连续多次扇形旋切,切取较足量的组织标本进行冰冻病理学检查,对于早中期的乳腺癌患者,通过该方法能及时有效的获得确诊,不延误后续手术治疗。对于晚期乳腺癌患者能够在微创伤下提供明确诊断并分型,为放疗等辅助治疗提供依据。尤其对一些乳腺较大、丰满、病灶较小、部位深在的患者,该方法比传统活检方法能更准确、有效、微创地取得标本,且能保证标本量足够行病理学检查。与经典的手术切除活检方法相比较其操作时间短、阳性率高、无痛苦,减少了手术麻醉时间,这对于乳腺癌术前快速明确病理诊断、指导手术治疗具有重要意义,具有良好的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Holland R, Veling SH, Mravunac M, et al. Histologic multifocality of Tis, T1-2 breast carcinomas. Implications for clinical trials of breast-conserving surgery [J]. *Cancer*, 1985, 56(5): 979-990.
- [2] 马 榕, 张建平, 王建丽, 等. 乳腺癌术前细针针吸细胞学替代术中切除活检的指征探讨 [J]. *中国普通外科杂志*, 1998, 7(5): 276-278.
- [3] 孙 进. 乳腺癌术前针吸细胞学替代检查术中切除活检的指征探讨 [J]. *交通医学*, 2000, 14(6): 705.

[收稿日期] 2004-07-30

[修回日期] 2004-11-15

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群