

高纯度可溶性嵌合蛋白 VEGI⁺ 的表达纯化

丁莉莉, 魏锐利*, 蔡季平, 李 由 (第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 制备纯化的新型血管生长抑制剂可溶性嵌合蛋白 VEGI⁺, 为进一步研究其活性奠定基础。**方法:** 应用 PCR 方法制备血管内皮细胞生长抑制因子(VEGI)与寡肽 CTTHWGFTLC 相嵌合的融合基因 VEGI⁺, 将 PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体中, 经酶切及测序鉴定后, 与原核表达载体 pET30a(+) 重组, 构建重组表达载体 pET30a-VEGI⁺, 转化大肠杆菌 BL21 并诱导表达, 纯化并鉴定表达产物。**结果:** 成功扩增融合基因 VEGI⁺, 构建的重组质粒 pET30a-VEGI⁺ 酶切鉴定结果与预期一致, 诱导后表达产物以包涵体为主。SDS-PAGE 电泳及 Western 印迹结果表明, 复性纯化后的嵌合蛋白 VEGI⁺ 相对分子质量约为 23 000, 纯度约为 90%。**结论:** 成功构建了重组表达载体, 并在大肠杆菌诱导表达, 亲和层析纯化后获得纯度较高的可溶性嵌合蛋白 VEGI⁺。

[关键词] 血管内皮生长抑制因子; 寡肽类; 基因融合

[中图分类号] Q 784 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1324-05

Expression and purification of high purity soluble chimeric protein VEGI⁺

DING Li-li, WEI Rui-li*, CAI Ji-ping, LI You (Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare a novel vascular endothelial growth inhibitor-soluble chimeric protein VEGI⁺, so as to lay a basis for studying its biological activity. **Methods:** Chimeric molecule VEGI⁺ was constructed by grafting oligopeptide CTTHWGFTLC to extracellular region of VEGI (VEGI₂₃₋₁₇₄). Before ligation into pET30a(+) expression vector, PCR product of the recombinant gene was cloned into pGEM-T vector and verified by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, then pET30a-VEGI was used to transfect BL21 (modified *E. coli* strain). The chimeric protein was purified by metal affinity chromatography. Western blotting and coomassie blue staining were used for protein identification. **Results:** The chimeric molecule VEGI⁺ was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The constructed pET30a-VEGI was confirmed by enzymatic digestion. The expression was mainly in the form of inclusion body. SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting revealed a chimeric protein about 23 000, with a purity of about 90%. **Conclusion:** We have successfully constructed the recombinant plasmid pET30a-VEGI⁺ and expressed it in *E. coli*. And we have obtained high purity of soluble chimeric protein VEGI⁺ through affinity chromatography.

[KEY WORDS] vascular endothelial growth inhibitor; oligopeptides; gene fusion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12): 1324-1328]

以新生血管作为肿瘤治疗的“靶点”已成为目前国内外研究的热点。采用基因工程方法将具有不同抑瘤机制的血管生成抑制剂融合在一起构建双功能嵌合分子正成为抗血管生成研究的新动向^[1]。VEGI⁺是一种具有抗血管生成及抑瘤作用的双功能嵌合分子, 由血管内皮细胞生长抑制因子 VEGI (vascular endothelial growth inhibitor) 与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9 的活性抑制剂十肽(CTTHWGFTLC)融合而成的重组蛋白。国内高虹等^[2]曾通过早期原核表达载体表达出具有抑瘤效果的 VEGI⁺ 重组蛋白, 但获得的却是非重折叠的蛋白沉淀。而对于一种用于治疗性研究的活性蛋白, 纯度高、可溶性好是其基本要求。为解决这一问题, 本研究应用基因重组技术将 VEGI 胞外区与抑制金属蛋白酶的寡肽基因融合后

构建重组质粒 pET30a-VEGI⁺, 并通过优化的原核表达方法获得高纯度、可溶性嵌合重组蛋白 VEGI⁺, 为进一步更有效地研究其抗肿瘤活性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株 含 VEGI 基因的质粒由第二军医大学基础部微生物学教研室姚静娟博士惠赠, *E. coli* DH5 α 、表达菌株 BL21、pGEM-T 购自 Promega 公司; 原核表达载体 pET30a 购自 Novagen 公

[基金项目] 上海市科委专项基金(05nm05010)。Supported by Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (05nm05010)。

[作者简介] 丁莉莉, 硕士。E-mail: dllnj81805@163.com

* Corresponding author. E-mail: ruiliwei@gmail.com

司。

1.2 主要试剂及工具酶 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I、*T₄* 连接酶、*Ex Taq* 酶、IPTG、DNA 标准相对分子质量均购自 TaKaRa 公司;兔抗 His 多克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、His-Ni²⁺ 金属螯合纯化柱等均购自 Proteintech 公司,其余试剂均为国产化学分析纯。

1.3 引物设计 根据 VEGI 基因序列结合 pET-30a 载体的多克隆位点,应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 自行设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列如下:上游 5'-GCG TCT AGA ATG TGT ACA ACT CAC TGG GGT TTC ACA CTT TGC CAA GTG AGA CAA ACT CCC ACA -3',内含 *Xba* I 酶切位点(下划线)、起始密码、寡肽(CTTHWGLTLC)相对应的密码和 VEGI 25 位以后氨基酸编码序列(即胞外区);下游 5'-GCG CTC GAG TAG TAA G AA GGC TCC AAA-3'是与 VEGI 的 C 端编码序列互补的序列,并引入 *Xho* I 酶切位点(下划线)。

1.4 PCR 扩增 VEGI⁺ 融合基因 以含 VEGI 基因的质粒为模板,以合成的上下游引物进行 PCR 扩增。扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s 变性,60℃ 30 s 退火,72℃ 45 s 延伸;循环 35 次;最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 VEGI⁺ 基因片段的克隆与测序 PCR 扩增产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳、胶回收纯化 VEGI⁺ 基因片段后,与 pGEM-T 载体连接并转化 DH5 α ,阳性转化子作质粒制备并酶切鉴定,重组质粒命名为 pGEM-T-VEGI⁺,并送上海鼎安生物公司进行测序鉴定。

1.6 VEGI⁺ 基因片段亚克隆入表达载体 pET30a 将 pGEM-T-VEGI⁺ 重组质粒以 *Xho* I、*Xba* I 双酶切并回收目的基因片段,与同样双酶切的 pET30a 表达载体连接,转化 DH5 α ,常规筛选阳性克隆并酶切鉴定。

1.7 嵌合蛋白 VEGI⁺ 的诱导表达及鉴定 将鉴定后的重组质粒 pET30a-VEGI⁺ 转化表达菌株 BL21,选取多个重组菌落接种于 LB 中培养过夜,按 1 : 100 比例转接入新的 LB 培养基中,培养至 D_{600} 值为 1.0 时,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 37℃ 诱导表达 6 h,以 pET30a 空载体转化大肠杆菌 BL21 作为对照,4℃ 离心收集细菌,将诱导前后的细菌裂解,取少量样本进行 SDS-PAGE 电泳和 Western 印

迹鉴定。

1.8 嵌合蛋白 VEGI⁺ 的复性与纯化 将收集的菌体用 50 mmol/L Tris(pH 7.5) 重悬(1 g 菌体用 20 ml 液体重悬),4℃ 超声破碎菌体,10 000 r/min 离心(Heraeus 全能型高速冷冻离心机) 30 min,收集可溶性上清和包涵体,取少量进行 SDS-PAGE 电泳分析。将离心得到的包涵体用 8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄、0.01 mol/L Tris(pH 8.0) 室温变性 2 h,10 000 r/min 离心 30 min,收集上清。将收集的上清用 0.45 μ m 的滤膜过滤后用 His-Ni²⁺ 金属螯合柱纯化。装 10 ml 的 His-Ni²⁺ 金属螯合柱,用 5 倍柱体积的平衡液(8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄、0.01 mol/L Tris、10 mmol/L imidazole pH 8.0) 平衡,上样(流速为 2 ml/min)。上样完备后,再用 5 倍柱体积的平衡液平衡,然后用 5 h 将 8 mol/L 尿素的平衡液逐步减为不含尿素的平衡液,此为蛋白的柱上复性过程。当蛋白复性完成后,用 5 倍柱体积的洗脱液(0.02 mol/L PB、0.5 mol/L imidazole) 洗脱,收集蛋白峰。蛋白电泳检测其纯化情况。将洗脱收集的蛋白再进行分子筛纯化,收集蛋白峰,进行电泳,确定对应的目的蛋白。

1.9 Western 印迹鉴定 取 15 μ l 样品做常规 SDS-PAGE 电泳。取出凝胶置于 PVDF 膜上,在转移缓冲液中电转移 1 h,电流为 360 mA;转移结束后,用 10% 脱脂奶粉封闭膜 1 h,加入 1 : 500 的 Rabbit Anti-His 抗体与膜作用 1 h,PBS 洗涤 3 次。加入 1 : 5 000 的 HRP 标记的 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) 与膜作用 1 h,经 PBS(含 0.1% Tween 20 的 PBS) 洗涤 3 次;膜置于 DAB 底物液中显色。

2 结果

2.1 VEGI⁺ 融合基因的制备 PCR 技术扩增 VEGI 胞外区与寡肽 CTTHWGFTLC 的融合基因 VEGI⁺,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,PCR 扩增产物与预期相符,大小为 496 bp(图 1)。

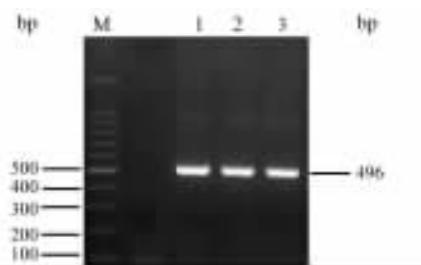


图 1 VEGI⁺ PCR 产物 DNA 电泳

Fig 1 DNA electrophoresis for PCR product of VEGI⁺

M:100 bp DNA ladder; 1-3:VEGI⁺ fusion gene

2.2 pGEM-T-VEGI⁺的制备及鉴定 将上述 PCR 扩增产物克隆到 pGEM-T 载体中,转化大肠杆菌 DH5 α ,将筛选获得的阳性克隆进行 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定,电泳结果出现与 PCR 产物大小相当的片段。同时取酶切鉴定后的阳性克隆送上海鼎安生物公司进行序列测定,结果表明与预期的基因序列相一致。

2.3 重组表达载体 pET30a-VEGI⁺的亚克隆及鉴定 将测序证实的 pGEM-T-VEGI⁺重组质粒以 *Xho* I、*Xba* I 双酶切并回收目的基因片段,与同样双酶切的 pET30a 表达载体连接,转化 DH5 α ,常规筛选阳性克隆并酶切鉴定,结果出现预期大小的片段(图 2),证实成功制备重组表达质粒 pET30a-VEGI⁺。

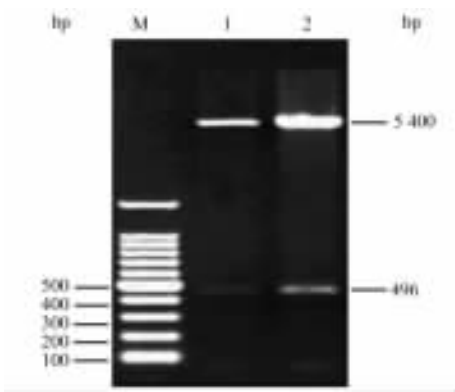


图 2 重组质粒 pET30a-VEGI⁺的酶切鉴定结果
Fig 2 Identification of recombinant plasmid pET30a-VEGI⁺ by restriction enzyme digestion

M:100 bp DNA ladder; 1-2:pET30a-VEGI⁺ digested by *Xho* I and *Xba* I

2.4 嵌合蛋白 VEGI⁺的诱导表达 诱导后在相对分子质量约 23 000 处有明显的蛋白条带(图 3),蛋白相对分子质量与预期基本一致。将收集的菌体重悬后在冰水中超声碎菌,高速离心收集上清和包涵体,SDS-PAGE 蛋白电泳显示其表达形式以包涵体为主(图 4)。

2.5 嵌合蛋白 VEGI⁺的复性、纯化及鉴定 纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(图 5)及 Western 印迹分析(图 6),结果表明:复性和纯化的蛋白为嵌合蛋白 VEGI⁺,相对分子质量约为 23 000,纯度约为 90%。

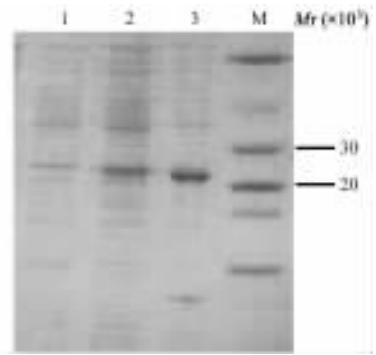


图 3 嵌合蛋白 VEGI⁺诱导前后的 SDS-PAGE 结果

Fig 3 SDS-PAGE for VEGI⁺ chimeric protein before and after induction

1:Total protein for vector-transformed BL21 bacteria; 2: Total protein for bacteria before induction; 3: Total protein for bacteria after induction; M:Middle molecular protein marker

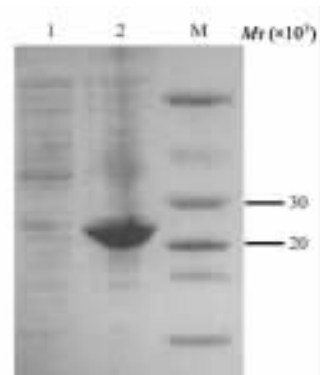


图 4 嵌合蛋白 VEGI⁺超声碎菌后 SDS-PAGE 结果

Fig 4 SDS-PAGE for VEGI⁺ chimeric protein after disruption of bacteria by ultrasound

1:Bacteria lysis supernatant; 2: Inclusion after bacteria lysis; M: Middle molecular protein marker

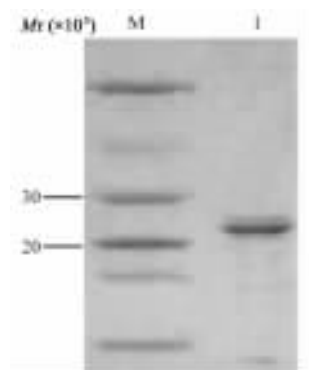


图 5 纯化后的 VEGI⁺蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig 5 SDS-PAGE for purified VEGI⁺ fusion protein

M:Middle molecular protein marker; 1:Purified VEGI⁺ chimeric protein

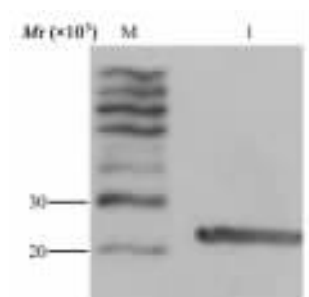


图 6 纯化后的 VEGI⁺ 蛋白 Western 印迹分析

Fig 6 Western blotting analysis of purified VEGI⁺ fusion protein

M: Prestained protein marker; 1: VEGI⁺ chimeric protein

3 讨论

肿瘤的血管生成是一个复杂调控的多步骤过程。Kerbel 等^[3] 研究证实肿瘤一方面借助新生血管获得充分的营养供给, 另一方面通过血管进行转移和扩散。目前, 通过抑制血管生成治疗肿瘤的抑瘤思路已经取得共识, 成为国内外肿瘤治疗研究的热点。已报道的抗血管生成基因治疗研究多是通过转基因、反义技术、核酶等方法, 升高或降低某个血管生成相关基因的表达^[4]。各种不同形式的抗血管生成阻断剂目前已进入不同期的临床试验, 其中尤以针对 VEGF 及 VEGF 受体的抑制剂较多^[5], 但这些抑制剂主要是从肿瘤血管生成过程的单一环节阻断血管生成。美国 FDA 2004 年批准了第一个抗血管生成药物 (avastin, 抗 VEGF 抗体) 用于治疗晚期结直肠癌, 取得了较好的临床疗效^[6-7]。但它也只是单一阻碍了 VEGF 与内皮细胞表面受体结合。

然而, 进一步的研究^[8] 发现单纯阻断血管生成某个环节所产生的抑瘤作用毕竟有限。血管生成的多步骤性、调控的复杂性为我们提供了更多的治疗靶点。不少研究者设想联合应用两个作用在血管生成不同环节的血管生成抑制因子可能会产生协同作用, 发挥更强的抑瘤作用, 这种设想不久便得到了很多实验的证实。Scappaticci 等^[9] 将内皮抑素基因和血管抑素基因巧妙的进行融合, 创造出更强大的血管生成抑制基因 Statin-AE, 体内实验证实其明显优于单独用药和联合用药的治疗效果。李喆等^[4] 将内皮抑素 (hENDO) 和血管内皮细胞生长抑制因子 (VEGI151) 两种强效内源性血管生成抑制基因进行融合, 其表达产物能通过抑制内皮细胞增殖, 降低微血管密度, 从而降低肿瘤细胞的增殖速率, 增加细胞凋亡, 治疗组动物的抑瘤率达到 88.57%。

VEGI 作为肿瘤坏死因子超家族成员之一, 特

异表达于内皮细胞, 通过诱导内皮细胞凋亡, 激活核转录因子 NF- κ B 和维持 G₀/G₁ 期细胞生长停滞从而抑制血管内皮细胞增生, 抑制内皮细胞迁移和新生血管形成^[10-11]。研究证实可溶性 VEGI 可使肿瘤体积明显缩小, 肿瘤内微血管大大减少, 成瘤率明显下降^[11-12]。这说明 VEGI 通过抑制新生血管形成发挥抗肿瘤活性。寡肽 CTTHWGFTLC 可有效抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性, 从而抑制肿瘤的生长和转移^[13]。以上的研究说明 VEGI 和寡肽两者发挥作用的靶点不同, 具有各自独特的作用途径, 理论上能从不同环节阻断肿瘤血管生成而发挥协同作用。

国内学者高虹等^[2] 选用表达载体 pPROEXT-MHTb 构建的 VEGI⁺ 蛋白能够抑制鸡胚尿囊膜血管新生, 通过抑制血管新生对 Lewis 肺癌小鼠移植瘤的早期发展起到抑制作用。但 VEGI⁺ 蛋白以不溶状态逐渐沉淀下来, 蛋白质重折叠效率极低。以非重折叠的沉淀形式进行活性实验, 虽能抑制鸡胚尿囊膜血管新生, 但作为一种治疗性蛋白药物研究尤其是用于动物或人体研究, 仍有一定的局限性。

pET30a 载体是目前常用且技术较成熟的一种高效原核表达载体, 其表达蛋白的 N 端和 C 端带有便于表达蛋白分离纯化及鉴定的 6 个 His 标签; 载体内部自带的凝血酶原蛋白可与目的蛋白进行融合表达从而大大增加了表达产物的可溶性; 两蛋白间具有可被凝血酶蛋白酶切割的位点, 可极方便的进行目的蛋白分离纯化。本研究将 VEGI 和寡肽相嵌合, 通过基因重组的方法成功构建了嵌合分子 VEGI⁺, 通过条件摸索及原核表达体系的优化, 使其在大肠杆菌原核表达 pET30a 系统中获得了高效表达。表达蛋白主要是以包涵体为主, 不仅能有效防止细胞内蛋白酶对目的蛋白的水解作用, 更加稳定, 还便于去除杂质蛋白使目的蛋白大量聚集。采用不破坏重组蛋白的一级结构的尿素作常用变性剂, 之后采用柱上复性的方法, 将尿素溶解的包涵体目的蛋白结合到 His-Ni²⁺ 柱, 缓慢地去除平衡液中的尿素, 使目的蛋白逐渐复性, 亲和层析纯化后成功获得了大量的高纯度、可溶性好的嵌合蛋白 VEGI⁺, 为进一步探讨 VEGI⁺ 蛋白活性及可能的作用机制奠定了基础, 也为研制开发可能的新一代抗肿瘤血管抑制剂提供了条件。

(志谢 本研究得到第二军医大学基础部微生物学教研室姚静娟博士和重庆医科大学生化与分子生物学教研室黄轶博士的技术支持和无私帮助, 在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Veenendaal L M, Jin H, Ran S, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of a VEGF121/rGelonin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 7866-7871.
- [2] 高虹, 刘思国, 刘思金, 等. 嵌合分子 VEGF⁺ 的构建、表达及其抗血管生成和抗肿瘤活性[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23: 62-66.
- [3] Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 727-739.
- [4] 李喆, 方国恩, 闻兆章, 等. 新型血管生成抑制人内皮细胞抑制素——血管内皮细胞生长抑制因子 151 治疗胃癌的实验研究[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22: 230-234.
- [5] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development[J]. Nature, 2005, 438: 937-945.
- [6] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 350: 2335-2342.
- [7] Jain R K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. Science, 2005, 307: 58-62.
- [8] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33: 357-369.
- [9] Scappaticci F A, Contreras A, Smith R, et al. Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced anti-angiogenic and antitumor activity[J]. Angiogenesis, 2001, 4: 263-268.
- [10] 张珉, 王路, 王宏卫, 等. 血管内皮细胞生长抑制因子 N 端部分缺失对生物活性的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35: 133-137.
- [11] Zhai Y, Yu J, Iruela-Arispe L, et al. Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEGF₁, a novel cytokine of the TNF superfamily[J]. Int J Cancer, 1999, 82: 131-136.
- [12] Chew L J, Pan H, Yu J, et al. A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor[J]. FASEB J, 2002, 16: 742-744.
- [13] Koivunen E, Arap W, Valtanen H, et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 768-774.
- [收稿日期] 2007-06-26 [修回日期] 2007-10-31
[本文编辑] 贾泽军

· 消息 ·

《第二军医大学学报》征订启事

《第二军医大学学报》是由第二军医大学主办的国内外公开发行(CN31-1001/R, ISSN 0258-879X)的综合性医药卫生类学术期刊, 1980年6月创刊。本刊面向全国和海外作者征稿, 主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果。由著名肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超院士任主编。辟有: 院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、个案报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构和高等医药院校的师生。

本刊一直被《中文核心期刊要目总览》确认为“中国综合性医药卫生类核心期刊”; 是“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”; 被包括万方数据——中国数字化期刊群、中国学术期刊综合评价数据库等在内的国内所有重要检索系统收录, 并被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、英国国际农业与生物科学中心(CA-BI)文摘数据库、俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)、波兰《哥白尼索引》等国际检索系统收录。先后获得“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”、“第三届国家期刊奖提名奖”和“首届全国高校精品科技期刊奖”。

本刊为月刊, A4开本, 80g铜版纸彩色双胶印刷, 每期定价15元, 全年共180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373), 漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址: 上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部, 邮编: 200433

联系人: 商素芳 电话: 021-25074352, 021-25074340 转 824 分机

E-mail: bxue@smmu.edu.cn 或 bxue304@yahoo.com.cn

网址: http://www.ajsmmu.cn 或 http://journals.smmu.edu.cn