

人血管能抑素基因的克隆、表达及其表达产物的纯化和生物活性测定

贺国安 罗进贤* 张添元 胡志上 李瑞芳

(中山大学 基因工程教育部重点实验室 广州 510275)

摘 要 :以人胎盘脐带组织为材料,提取组织总 RNA,用 net-RT-PCR 方法合成人血管能抑素 cDNA 基因,将该 cDNA 克隆进 pSP72 载体获得重组质粒 pSP72C, DNA 序列分析结果与预期序列一致。用 *Bam* H I 和 *Nde* I 双酶切,切下 pSP72C 上的血管能抑素 cDNA,插入 pET-3c 载体的相应位点获得重组表达质粒 pETC,转化 *E. coli* BL21(DE3), SDS-PAGE 分析显示,在 IPTG 诱导下,血管能抑素基因获得了高效表达,表达量约占菌体总蛋白的 27.9 %,主要以包涵体形式存在。包涵体经过洗涤、裂解、蛋白复性以及 Sephadex G-75 凝胶过滤层析等步骤后,获得了纯度达 91.4 % 的人血管能抑素。CAM 实验证明 10 μ g 纯化蛋白就能显著抑制鸡胚新生血管生成。

关键词 :血管能抑素,基因克隆与表达,蛋白纯化,抗血管生成

中图分类号 :Q78 ,R338 **文献标识码** :A **文章编号** :1001-6209(2003) 05-0607-06

肿瘤的生长和转移依赖于血管的生成^[1]。通过抑制肿瘤新生血管的生成,切断肿瘤的营养和氧气供给,抑制肿瘤细胞的生长和转移^[2],成为近年来肿瘤防治上的新策略。血管能抑素(Canstatin)是最近发现的新的血管生成抑制因子,它是胶原蛋白 IV 的 $\alpha 2$ 链的 C 端非胶原区(Noncollagenous 1 ,NC1)^[3]。本研究利用 net-RT-PCR 技术从人胎盘脐带总 RNA 中合成了人血管能抑素基因的 cDNA,并实现了其在大肠杆菌中的表达。鸡胚绒毛尿囊膜实验(Chorioallantoic membrane , CAM)结果显示,初步纯化后的表达产物具有抑制新生血管生成活性,为进一步研究它的抑制肿瘤活性及其临床应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

克隆质粒 pSP72 及其菌株 *Escherichia coli* DH5 α 由本室保存,表达质粒 pET-3c 及其菌株 *E. coli* BL21(DE3)由暨南大学药学院吴晓萍惠赠。

1.2 工具酶、主要试剂和分析软件

限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶等分别购自 GIBCO、BRL、Promega 和华美生物工程公司,RT-PCR 试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品,IPTG 为 Promega 公司产品,鸡胚种蛋购自佛山鸡场。蛋白序列分析软件为 ANTHEPROT 4.3(从生物软件网 <http://www.bio->

基金项目 广东省重点科技项目(2KM02502G)

* 通讯作者。Tel : 86-20-84112397 ;Fax :86-20-84036551 ;E-mail :lsbr02@zsu.edu.cn

作者简介 贺国安(1974 -),男,湖南临武人,博士生,从事分子生物学研究。E-mail :heguoan@263.net

收稿日期 2002-12-16,修回日期 2003-05-19

soft.net 上获得),电泳图片分析软件为 Pharmacia Biotech 公司的 Imagemaster® VDS V.3.0。

1.3 脐带组织总 RNA 的抽提

将液氮保存的脐带组织取出后迅速用无 RNase 污染的研钵研磨成粉末状,然后进行组织总 RNA 的抽提,具体方法见文献[4]。

1.4 套式 RT-PCR (nest-RT-PCR)

根据已报道的胶原蛋白 α(IV) 的序列^[5],设计能扩增血管能抑素基因的特异性引物 P3/P4,另外在该基因的两侧再设计一对外引物 P1/P2。各引物序列如下:P1 5'-AGGTGGT-GTGTCTGCTGTTTC-3'; P2:5'-ACAGTGGCTGGCAGGTCTAA-3'; P3:5'-CCGAATTCCATATG-GTCAGCATCGGCTACCTCCTGCTGA-3'; P4:5'-CCGGATCCGCGCCGCTACAGGTTCTTCATG-CACACCTGGCA-3'。以组织总 RNA 为模板,α(T)₇ 为引物,反转录合成 cDNA,再以此反转录产物为模板,外引物 P1/P2 为引物,进行第一次 PCR 扩增;第二次 PCR 扩增的引物为 P3/P4,模板为第一次的 PCR 扩增产物。反应条件:94℃ 4min,94℃ 1min,60℃ 1min,72℃ 1.5min,30 个循环,72℃ 1min。反转录和 PCR 扩增具体操作按 RT-PCR 试剂盒操作说明。

1.5 重组质粒 pSP72C 构建和血管能抑素 cDNA 序列分析

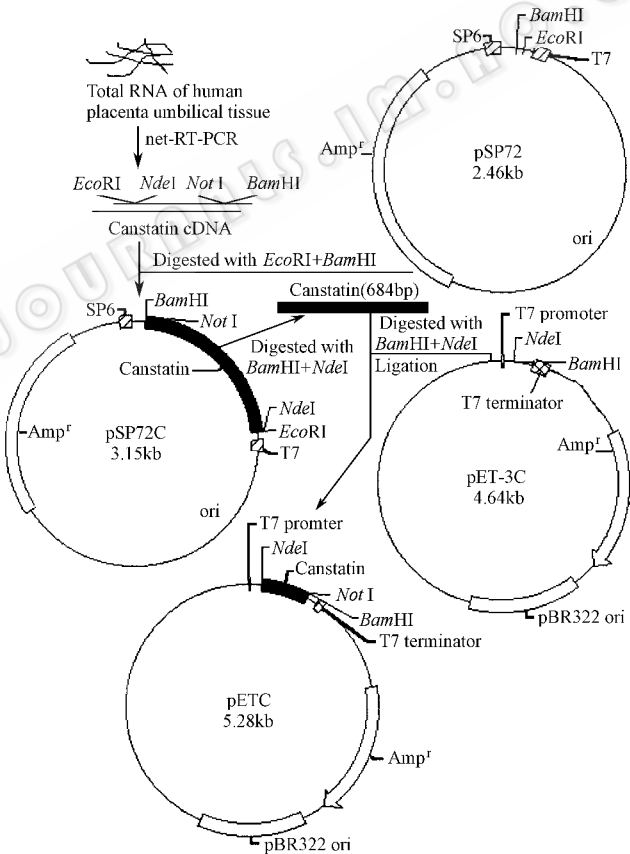


图 1 质粒 pSP72C 和 pETC 的构建

Fig. 1 Construction of pSP72C and pETC

将 net-RT-PCR 获得的含血管能抑素基因的 cDNA 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切回收后 ,克隆进 pSP72 中获得含血管能抑素基因的重组子 pSP72C(图 1)。以通用引物 T7/SP6 为序列分析引物正反两端对重组子 pSP72C 中的血管能抑素基因进行序列分析。序列分析由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.6 表达质粒 pETC 构建和血管能抑素基因在大肠杆菌中诱导表达

用 *Bam*H I 和 *Nde* I 双酶切下重组质粒 pSP72C 上的血管能抑素基因 ,克隆进质粒 pET-3c 中获得表达质粒 pETC(图 1)。将经鉴定含有目的片段的表达质粒 pETC 转化 *E. coli* BL21(DE3)获得重组转化子 *E. coli* BL21(DE3 pETC)。接种单菌落于 2 mL 含有氨苄青霉素(100 mg/mL)的 LB 培养基中 37 ℃过夜培养 ,次日按 1:100 的量接种于 5 mL LB 培养基中 ,37 ℃培养至 *OD*₆₀₀ = 0.6 ,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L ,37℃诱导表达 8 h ,然后冷冻离心收集菌体 ,按文献 [6]方法进行 SDS-PAGE 分析表达产物。

1.7 血管能抑素的纯化

将诱导表达后的菌液离心收菌体 ,按 50 mL/g 重悬于 STE 溶液[100 mmol/L NaCl , 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0) , 1 mmol/L EDTA]中 ,超声破碎 ,离心收集沉淀 ,获得粗制包涵体。之后用洗液 I (STE + 0.05 % TritonX-100)洗液 II (STE + 2 mol/L 尿素)和 1 mol/L NaCl 溶液重复冲洗粗制包涵体 2 ~ 3 次 ,获得纯净的包涵体。将纯净包涵体按 20 mL/g 的量裂解在包涵体裂解液[50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0) , 10 mmol/L EDTA , 8 mol/L 尿素 , 10 mmol/L β-巯基乙醇]中 ,然后在冰上缓慢加入 10 ~ 20 倍量的蛋白复性液[50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0) , 10 mmol/L EDTA , 2 mol/L 尿素 , 5 mmol/L β-巯基乙醇 , 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione , GSH) , 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione , GSSG)]并置于 4 ℃冰箱中过夜复性。将蛋白复性液进行超滤浓缩后进行 Sephadex G-75 凝胶过滤层析 ,平衡缓冲液和洗脱缓冲液成份为 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0) , 10 mmol/L EDTA , 5 mmol/L β-巯基乙醇 , 1 mmol/L GSH , 1 mmol/L GSSG。洗脱流速为 0.5 mL/min ,在 280 nm 波长处测定洗脱液的吸光度 A 值 ,取各波峰洗脱液进行 SDS-PAGE 分析 ,确定目标蛋白的洗脱峰。收集目标峰各管 ,在 0.1 mol/L 的 PBS(pH8.0)中充分透析后 ,用 PEG-20000 浓缩至蛋白浓度约 5 mg/mL ,之后过滤除菌 , - 20 ℃保存备用。

1.8 CAM 法新生血管生成抑制实验

鸡胚绒毛尿囊膜(Chick choriollantoic membrane ,CAM)方法 参照文献 [7]进行。

2 结果和讨论

2.1 血管能抑素 cDNA 的获得

第一次 PCR 扩增的产物大小约为 1100 bp ,第二次 PCR 扩增的产物大小约为 684 bp ,均与实验设计一致(图 2)。

2.2 重组质粒 pSP72C 构建及血管能抑素 cDNA 序列分析

重组质粒 pSP72C 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶

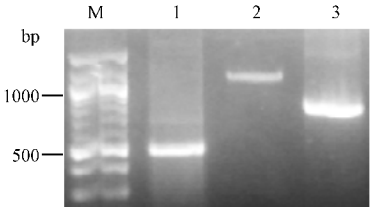


图 2 套式 RT-PCR 产物的凝胶电泳分析
Fig.2 Analysis of the products of nest-RT-PCR
M. 100bp DNA ladder ; 1. Positive control ;
2. RT-PCR ; 3. nest RT-PCR.

切出现一条约 684 bp 的带 ,表明血管能抑素 cDNA 基因已经克隆进 pSP72 载体中。T7/SP6 正反两端序列分析表明 ,所获得的血管能抑素基因序列与已报道的相应序列完全一致 ,进一步证明 pSP72C 载体构建正确。

2.3 表达载体 pETC 构建及血管能抑素基因序列分析

表达质粒 pET-3c 是利用 T7 RNA 聚合酶的启动子来启动外源基因的表达 ,它的起始密码子处为 *Nde*I 酶切位点(图 1)。在引物设计时 ,直接在目的基因前加上 *Nde*I 酶切位点 ,以便实现 T7 RNA 聚合酶的启动子直接启动目的基因的表达。pETC 序列分析结果如下所示 :TATA CATAT GGTCAGCATC (方框处为 *Nde*I 酶切位点 ,下划线为目的基因序列) ,目标基因处于 pET-3c 的起始密码子 ATG 下 ,且阅读编码正确。

2.4 血管能抑素基因在大肠杆菌中的表达

SDS-PAGE 分析结果显示(图 3) ,经 IPTG 诱导的 BL21(DE3 ,pETC)在 25 kD 的位置上出现一条新的蛋白带 ,而未诱导的 BL21(DE3 ,pETC)以及诱导的 BL21(DE3 ,pET-3c)在相应的位置不出现这一条带。用蛋白分析软件对血管能抑素基因的氨基酸序列进行分析可知 ,血管能抑素基因共有 227 个氨基酸 ,分子量为 24987.62 Da ,说明新的蛋白带可能是表达的血管能抑素蛋白。凝胶图片经凝胶分析软件分析可知 ,所表达的目标蛋白约占菌体总蛋白的 27.9 %。超声破碎菌体并离心后 ,分别取裂解液上清和沉淀进行 SDS-PAGE ,显示目标蛋白主要留在沉淀中 ,表明该蛋白在菌体内主要以不溶性的包涵体形式存在。

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed product
M. Protein marker ; 1. BL21(DE3 ,pET-3c) induced ;
2. BL21(DE3 ,pETC) uninduced ; 3. Supernatant of
BL21(DE3 ,pETC) induced ; 4. Sonicated pellet of
BL21(DE3 ,pETC) induced ; 5. Purified inclusion body ;
6. Purified protein after Sephadex G-75 gel filtration.

2.5 表达产物的纯化

血管能抑素的纯化结果显示(图 3) ,包涵体经洗液 I、洗液 II 和 1mol/L NaCl 溶液重复洗涤 3 次后 ,SDS-PAGE 显示纯净包涵体中目标蛋白纯度达到了 69.8 % ,表明包涵体的洗涤可以去除细胞碎片和一些杂蛋白 ,起到一定的蛋白纯化作用。包涵体再经过裂解、蛋白复性、超滤以及 Sephadex G-75 凝胶过滤层析等步骤后 ,目标蛋白在 SDS-PAGE 中显示一条带 ,凝胶分析软件分析纯度达到了 91.4 %。

2.6 人血管能抑素的生物活性测定

孵化第 6 天的鸡胚开窗后 ,以定性滤纸为

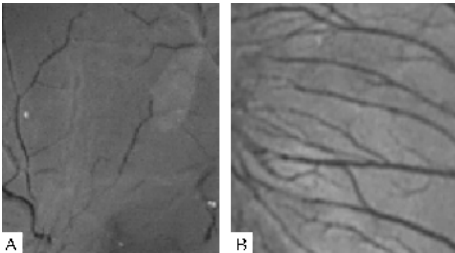


图 4 人血管能抑素对 CAM 血管生成的抑制作用(4×)

Fig.4 Inhibition of canstatin on CAM angiogenesis(4×)

A. Treated with canstatin(10 μg/embryo) ;
B. PBS control.

载体 ,加入体积为 $10\ \mu\text{L}$ 的 $10\ \mu\text{g}$ 纯化后的血管能抑素 ,同时设置 $10\ \mu\text{L}$ 的 PBS 阴性对照 ,每组 5 个鸡胚。继续孵育 48h 后开窗观察 ,结果表明(图 4) , $10\ \mu\text{g}$ 的人血管能抑素就能显著地抑制鸡胚新生血管的形成 ,而 PBS 阴性对照组鸡胚血管网茂盛 ,说明纯化的人血管能抑素具有抑制新生血管生成的活性。

致谢 感谢中山大学第三附属医院妇产科主任李小毛教授给予的热忱帮助 !

参 考 文 献

- [1] Folkman J. Anti-angiogenesis : New concept of therapy of solid tumors. *Ann Surg* , 1972 , **175** : 409 ~ 416.
- [2] 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. *Cell* , 1994 , **79** : 315 ~ 328.
- [3] Kamphaus G D , Colorado P C , Panka D J , *et al.* Canstatin , a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* , 2000 , **275** : 1209 ~ 1215.
- [4] 贺国安 ,肖火根 ,张曙光 ,等 . 番木瓜环斑病毒畸叶株系的 CP 基因克隆和序列分析 . 中国病毒学 , 2001 , **16** (4) : 369 ~ 372.
- [5] Hostikka S L , Tryggvason K. The complete primary structure of the $\alpha 2$ chain of human type IV collagen and comparison with the $\alpha 1$ (IV) chain. *J Biol Chem* , 1988 , **263** : 19488 ~ 19493.
- [6] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [7] 付生法 ,陆应麟 ,张朝山 ,等 . 检测血管生成作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术 . 军事医学科学院院刊 , 1993 , **17** (4) : 294 ~ 297.

Cloning and Expression of Human Canstatin and its Purification and Bioactivity

He Guoan Luo Jinxian* Zhang Tianyuan Hu Zhishang Li Ruifang

(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract : Total RNA was extracted from placenta umbilical tissue and the canstatin cDNA was amplified from total RNA by net-RT-PCR technique. The amplified cDNA was cloned into pSP72 and sequenced. The canstatin cDNA was cut down from pSP72C with *Bam*H I / *Nde* I and ligated into the vector pET-3c. The resultant plasmid pETC was then transformed into *E. coli* BL21(DE3). The canstatin gene was efficiently expressed after IPTG induction as a 25 kD band on SDS-PAGE. The expressed product constituted approximately 27.9 % of the total bacterial proteins estimated by densitometry and existed mainly as inclusion body. The inclusion bodies were washed , lysed , refolded and purified on the Sephadex G-75 gel filtration column to a purity of 91.4 % . CAM assay showed

that 10 μ g purified canstatin is enough to inhibit the angiogenesis of chicken embryo microcapillary vessel.

Key words :Canstatin , Gene cloning and expression , Protein purification , Anti-angiogenesis

Foundation item : Science and Technology Project of Guangdong Province(2KM02502G)

* Corresponding author. Tel : 86-20-84112397 ; Fax : 86-20-84036551 ; E-mail : lsbr02@zsu.edu.cn

Received date : 12-16-2002



The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

Li Jilun Academician
(*College of Biology , Chinese Agricultural University ,Beijing 100094 ,China*)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

Tan Huarong Professor
(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China*)

Lu Deru Professor
(*Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shaihai 200433 ,China*)

Wang Aoquan Professor
(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China*)

Qu Yinbo Professor
(*School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 ,China*)

Xu Jianguo Professor
(*National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention ,Beijing 102206 , China*)

MEMBERS OF THE BOARD

Cai Yongfeng	Chen Yongqing	Cheng Chi	Dong Xiuzhu	Fan Yunliu
Guo Jun	Hu Fuquan	Hu Yuanyang	Huang Li	Lu Chengping
Min Hang	Qian Shijun	Shao Yiming	Sheng Jun	Tang Hong
Tien Po	Wang Ping	Wang Huaming(USA)	Xie Hong	Yang Susheng
Zhai Zhonghe	Zhang Yaoping(USA)	Zheng Tianling	Zhu Baoquan	Zhuge Jian

MANAGING EDITORS

Wang Jinfang Wang Min