

## 改善稀有密码子和氨基酸残基限制提高重组人 ADAM15 去整合素结构域蛋白表达水平

吴静<sup>1,2</sup>, 雷捷勇<sup>1</sup>, 张莲芬<sup>1,2</sup>, 花慧<sup>1</sup>, 金坚<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>工业生物技术教育部重点实验室, <sup>2</sup>江南大学医药学院分子药理研究室, 无锡 214122)

**摘要:**【目的】为提高重组人 ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) 15 去整合素结构域蛋白 (rhADAM15) 的表达水平。【方法】在详尽分析 rhADAM15 的 cDNA 和 GST(谷胱甘肽-S-转移酶)-ADAM15 结构的基础上, 选择表达宿主菌并对表达质粒进行改造。【结果】(1)选择能为大肠杆菌稀有密码子提供额外 tRNA 的 *Escherichia coli*. Rosetta(DE3)作为宿主菌, 将质粒 pGEX-ADAM15 转化于其中在最佳诱导表达条件下获得 298 mg/L 融合蛋白 GST-ADAM15; (2) 采用 PCR 体外定点突变技术将目标蛋白编码区稀有密码子 GGA(Gly<sup>425</sup>)替换为 GGC, 使融合蛋白表达水平提高 9.4%; (3) 通过消除凝血酶识别序列附近的 Pro-Glu-Phe 残基, 提高凝血酶酶切效率, 使 rhADAM15 产量提高了 35.7%; (4)在 GGA 替换为 GGC 基础上切除“Pro-Glu-Phe”残基, 使 rhADAM15 产量提高到 68 mg/L, 比分别切除“Pro-Glu-Phe”残基、GGA 替换为 GGC 和野生型提高了 19.2%、51.1%和 61.9%。

【结论】这一结果表明, 在充分认识目标蛋白特性的基础上定向选择表达宿主并改造表达质粒能实现外源蛋白高水平表达。

**关键词:** ADAM15 去整合素结构域; 大肠杆菌 Rosetta (DE3); 稀有密码子; PCR 定点突变; 抑制血管生成  
中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1067-08

ADAM15 是 ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) 蛋白家族中唯一在其去整合素结构域中含有 RGD 序列(Arg-Gly-Asp)的成员, 引起广泛的关注<sup>[1, 2]</sup>。Karkkainen 等采用原位杂交证实编码 ADAM15 的基因位于人类染色体 1q21.3, 该基因所在区域在多种癌细胞中扩增<sup>[3]</sup>。研究发现, ADAM15 在人类多种实体瘤细胞, 如乳腺癌、直肠癌、胃癌、卵巢癌等肿瘤细胞中过量表达<sup>[4-7]</sup>。这些研究表明 ADAM15 与肿瘤生长转移密切相关, 但其过量表达对肿瘤发展变化的影响机制尚不清楚。因此, 获得大量具有生物活性的重组 ADAM15 或其片段蛋白 (rhADAM15)对深入研究 ADAM15 在肿瘤发展变化中的作用机制, 指导新型靶向抗肿瘤药物的研制具有

重要意义。

影响外源蛋白表达水平及其生物活性的因素在于目标蛋白自身编码基因、表达宿主以及诱导表达的营养与环境条件。为了获得大量具有生物活性的目标蛋白, 长期以来研究人员在优化外源蛋白表达的生长温度、培养基组成、诱导物浓度及诱导最佳时机等方面做了大量工作, 在一定程度上提高了目标蛋白的表达水平<sup>[8-10]</sup>。以 ADAM15 或其片段蛋白 (rhADAM15) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 等宿主细胞中的表达为例<sup>[11, 12]</sup>, 尽管 ADAM15 蛋白在上述宿主中成功表达, 但是其表达水平情况则未见报道, 其原因可能在于对目标蛋白和表达宿主的特性及其之间关系缺乏充分认识。实际上对目标蛋白

基金项目: 国家自然科学基金(30772586)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-510-85918219; E-mail: jinjian31@hotmail.com

作者简介: 吴静(1981-), 女, 江苏大丰人, 博士研究生, 主要从事细胞与分子药理的研究。E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2008-02-15; 修回日期: 2008-04-17

和表达宿主的特性及相互关系认识的不足,使得表达宿主的选择具有较大的盲目性和偶然性,导致目标蛋白表达水平难以进一步提高。

本研究以 ADAM15 去整合素结构域蛋白(rhADAM15)在大肠杆菌中表达为研究模型,采用目标蛋白 cDNA 序列分析选择最佳表达宿主和目标蛋白氨基酸序列分析构建高效表达质粒等策略相结合,改善稀有密码子和氨基酸残基所引起的目标蛋白表达限制,实现了目标蛋白 rhADAM15 高效表达。这一研究结果为获得大量具有生物活性的外源蛋白提供了切实可行的技术思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株和细胞系:**含有人 ADAM15 去整合素结构域编码基因的质粒 pET-15b-ADAM15 由中科院上海药物所陈勤博士惠赠;原核表达质粒 pGEX-4T-1 由江南大学李华钟教授惠赠;大肠杆菌 XL-1 Blue、BL21 (DE3)、Rosetta (DE3)购自 Novagen 公司。人微血管内皮细胞(HMEC-1)由法国国家卫生医药研究院 U553 研究所(INSERM U553)陆核教授馈赠。

**1.1.2 主要试剂:**基因定点突变试剂盒(TaKaRa MutanBEST)、Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶和各种限制性内切酶购于 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒、胶回收纯化试剂盒购于 QIAGEN 公司;Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱购于 Amersham-Pharmacia Biotech 公司;蛋白定量试剂盒(Bicinchoninic acid, BCA)购于 Pierce 公司产品;低范围蛋白分子量 Marker(4.1-66 kDa) 购于上海生工生物工程技术服务有限公司。ADAM15 羊多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗羊二抗购于 R&D 公司,异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal)、3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)、氨苄青霉素、氯霉素和 MCDB131 培养基均购自 Sigma 公司。

### 1.2 融合蛋白基因的克隆

**1.2.1 PCR 扩增目的基因:**根据 ADAM15 去整合素结构域编码基因(Met<sup>420</sup>-Glu<sup>510</sup>)<sup>[13]</sup>,利用引物设计软件 oligo6.67,设计一对特异性引物 P<sub>1</sub>和 P<sub>2</sub>,上游引物为:5'-GGCGTCTGACTCATGGCTGCTTTCTGCGG-

AAATATG-3',下游引物为:5'-ATAGCGGCCGCTCACTCGCCATCCCCTAGGCTGAC-3',为下一步表达需要,分别在上、下游引物中引入 Sal 和 Not 酶切位点(斜体下划线),并在 Sal 酶切位点后添加 TC 碱基防止阅读框移位。PCR 扩增条件:95 3 min;95 1 min,60 1 min,72 1 min,循环 30 次;72 10 min。PCR 产物进行 1.5%琼脂糖电泳分析,并对目标条带切胶回收。

**1.2.2 表达质粒 pGEX-ADAM15 的构建:**PCR 产物经胶回收纯化后与 pUCm-T 载体用 T4DNA 连接酶 16 连接过夜,转化大肠杆菌 XL-1-Blue 感受态,涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上,菌落经蓝白斑筛选,抽提质粒用限制性内切酶 Sal 和 Not 双酶切,回收目的片段与同样酶切的含 GST-tag 的 pGEX-4T-1 表达载体 16 连接反应过夜,产物转化大肠杆菌 XL-1-Blue 感受态细胞,涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素 LB 平板上,挑选菌落、质粒抽提,酶切鉴定筛选阳性单克隆,构建表达质粒命名为 pGEX-ADAM15。

**1.2.3 突变表达质粒 pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15、pGEX- $\Delta$ 2-ADAM15 和 pGEX- $\Delta$ -ADAM15 的构建:**根据表达质粒 pGEX-ADAM15 的基因序列和突变引物设计原则<sup>[14]</sup>,设计一对方向相反的引物分别为 P<sub>3</sub>:5'-CATACCCGGGAATCCACGCGGATCCGATTT-3',P<sub>4</sub>:5'-GCTGCTTTCTGCGCAATATGTTTGTC-3',P<sub>4</sub>引入一个突变位点,即用 GGC 置换 ADAM15 第 425 位的编码甘氨酸的稀有密码子 GGA。以表达质粒 pGEX-ADAM15 为模版,P<sub>3</sub>和 P<sub>4</sub>为引物,采用基因定点突变试剂盒的操作方法,通过 PCR 反应扩增含有突变位点的 DNA 片段,回收 PCR 产物后进行末端平滑及 5'磷酸化处理,再用高效连接试剂 Ligation Solution I 进行自身连接(环化反应),然后转化大肠杆菌 XL-1-Blue 感受态细胞,采用 1.2.2 中所述方法获得突变表达质粒 pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15。突变质粒 pGEX- $\Delta$ 2-ADAM15 的构建方法与 pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15 类似,但是突变引物分别为:P<sub>5</sub>:5'-GGT-ATGGCTGCTTTCTGCGGAAAT-3',P<sub>6</sub>:5'-GGATC-CACGCGGAACCAG-3'。突变质粒 pGEX- $\Delta$ -ADAM15 的构建则以 pGEX- $\Delta$ 2-ADAM15 质粒为模版,P<sub>5</sub>和 P<sub>6</sub>为突变引物,其余操作方法与构建 pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15 相同(质粒的构建示意图如图 3 所示)。所获得的 4 种质粒由上海生工生物技术有限公司测序。

### 1.3 融合蛋白表达、纯化与鉴定

#### 1.3.1 融合蛋白 GST-ADAM15 的诱导表达和纯化:

将 pGEX-ADAM15 与 pGEX- $\Delta$ -ADAM15 质粒分别转化大肠杆菌 Rosea(DE3)感受态得到稳定表达菌株 Rosea (DE3)和 $\Delta$ Rosea (DE3),具体诱导表达和纯化融合蛋白的方法见参考文献[15],但是大肠杆菌 Rosea(DE3)的培养基为 LB 培养液(含氨苄青霉素 50 mg/L,氯霉素 34 mg/L)。采用蛋白定量试剂盒(BCA)方法进行蛋白质定量,取部分样品进行 SDS-PAGE 分析。

**1.3.2 融合蛋白 GST-ADAM15 的表达条件优化:**为研究诱导条件(主要包括诱导剂 IPTG 的用量、诱导时菌体 OD、诱导时间和诱导温度)对融合蛋白 GST-ADAM15 表达的影响,采用单因素实验研究不同 IPTG 用量(0.1、0.5 和 1 mmol/L)、IPTG 添加时菌体 OD 值(0.4、0.8 和 1.2)、温度条件(培养温度为 37 $^{\circ}$ C,诱导温度为 37 $^{\circ}$ C 或 30 $^{\circ}$ C)、诱导维持时间(4、6 和 8 h)对融合蛋白 GST-ADAM15 表达的影响。

**1.3.3 rhADAM15 蛋白的纯化和鉴定:**按 10 U 凝血酶/mg 蛋白的用量将凝血酶加入已纯化的融合蛋白液体中,于 4 $^{\circ}$ C 酶切 8 h,取部分酶切产物进行 SDS-PAGE 分析。将酶切产物用截留分子质量 3000 的超滤装置浓缩蛋白质浓度至 2 g/L 左右,再用 SephadexG-75 凝胶过滤柱分离目标蛋白。采用 BCA 法对蛋白质含量进行测定。蛋白质的 Western 杂交分析按照标准流程进行<sup>[16]</sup>。

#### 1.4 内皮小管形成分析

Matrigel 基质胶在冰上融化,均匀包被预冷的 96 孔板(70  $\mu$ L/孔),室温无菌条件下晾干,接种对数生长期密度为  $6 \times 10^5$  个/mL 的 HMEC-1 细胞 150  $\mu$ L/孔,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 60 min,加入 rhADAM15 样品,终浓度为 20  $\mu$ g/mL,继续培养 16 h 时在显微镜下观察并照相。

#### 1.5 rhADAM15 对新生血管生成的作用

采用鸡胚尿囊膜法(CAM)测 rhADAM15 对新生血管生成的作用,具体方法见参加文献[17]。

## 2 结果

### 2.1 ADAM15 去整合素结构域 cDNA 序列分析

将目的基因 DNA 片段插入载体 pGEX-4T-1 构建含有 ADAM15 去整合素结构域的重组表达质粒 pGEX-ADAM15 并转化于表达宿主 *E. coli* BL 21 中,获得的融合蛋白 GST-ADAM15 的浓度为 119 mg/L。进一步研究发现所表达的目标蛋白并不能破坏人微

血管内皮细胞(HMEC-1)形成内皮小管以及不抑制鸡胚尿囊膜新生血管的生成。那么,是什么原因导致目标蛋白表达水平偏低且无生物活性呢?

采用 Morris Maduro 开发的“*E. coli* Codon Usage Analysis 2.0”分析软件(<http://www.lifesci.ucsb.edu/~maduro/codonusage/usage2.0c.htm>)对人 ADAM15 去整合素结构域 cDNA 序列进行详尽分析发现,人 ADAM15 去整合素结构域 cDNA 中含有 14%的稀有密码子(甘氨酸密码子 GGA、GGG,脯氨酸密码子 CCC,亮氨酸密码子 TTG、CTA,精氨酸密码子 AGG、AGA)。这一结果表明,大量稀有密码子的存在导致重组蛋白表达的困难,必需选择能够为上述稀有密码子(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA)提供额外 tRNA 的菌株作为表达宿主,才有可能提高目标蛋白表达水平及生物活性。*E. coli* Rosetta(DE3)作为 BL21 的突变株,能够为上述稀有密码子提供额外 tRNA,将其作为 rhADAM15 的表达菌株可能提高蛋白的表达水平。

### 2.2 rhADAM15 在 *E. coli* Rosetta(DE3)中表达和条件优化

将质粒 pGEX-ADAM15 转化于表达宿主 *E. coli* Rosetta (DE3)中,于 37 $^{\circ}$ C、0.5 mmol/L IPTG 诱导 6 h。收集菌体、破碎细胞后所得的上清液经 SDS-PAGE

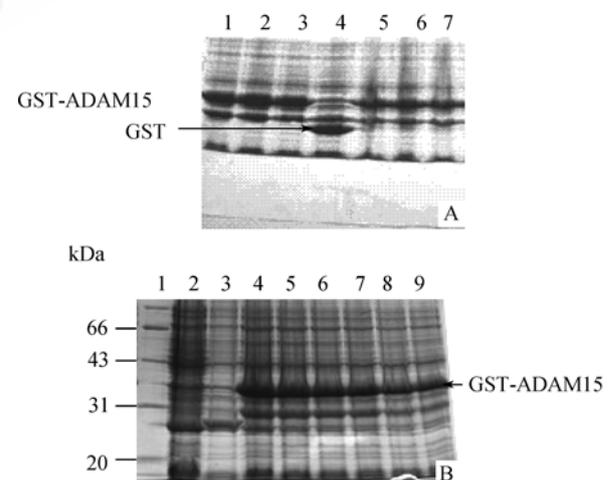


图 1 不同表达条件下融合蛋白 GST-ADAM15 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis on expression condition of fusion protein GST-ADAM15. (A) Effect of induction temperature and time. Lane 1-3, the temperature for culture and rhADAM15 expression was 37/37 $^{\circ}$ C, 37/30 $^{\circ}$ C, 30/30 $^{\circ}$ C, respectively; Lane 4, Rosetta (DE3) with plasmid pGEX-4T-1; Lane 5-7, IPTG induction time was 4, 6 and 8 h, respectively. (B) IPTG concentration and addition time. Lane 1, Marker; Lane 2-3, Rosetta (DE3) without IPTG induction; Lane 4-6, Rosetta (DE3) induction by 0.1, 0.5 and 1 mM IPTG, respectively; Lane 7-9, IPTG induction when OD was 0.4, 0.8 and 1.2, respectively.

分析发现,在大约 37 kDa 处有新蛋白质条带产生。由于 GST 分子量约为 26 kDa,目标蛋白分子量约为 11 kDa,这一结果表明融合蛋白 GST-ADAM15 在 Rosetta (DE3)中得到表达。

采用单因实验对大肠杆菌生产融合蛋白 GST-ADAM15 的表达条件进行优化,结果显示(图 1),GST-

ADAM15 最佳表达条件是:菌体浓度 *OD* 为 0.8, IPTG 浓度 0.1 mmol/L,诱导温度 30 ,诱导时间 6 h。在最佳表达条件下,融合蛋白表达量占菌体总蛋白的 66%,经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化后浓度为 298 mg/L。

2.3 定点突变替换稀有密码子提高融合蛋白表达量  
尽管 Rosetta (DE3)能提供 GGA,而不能提供

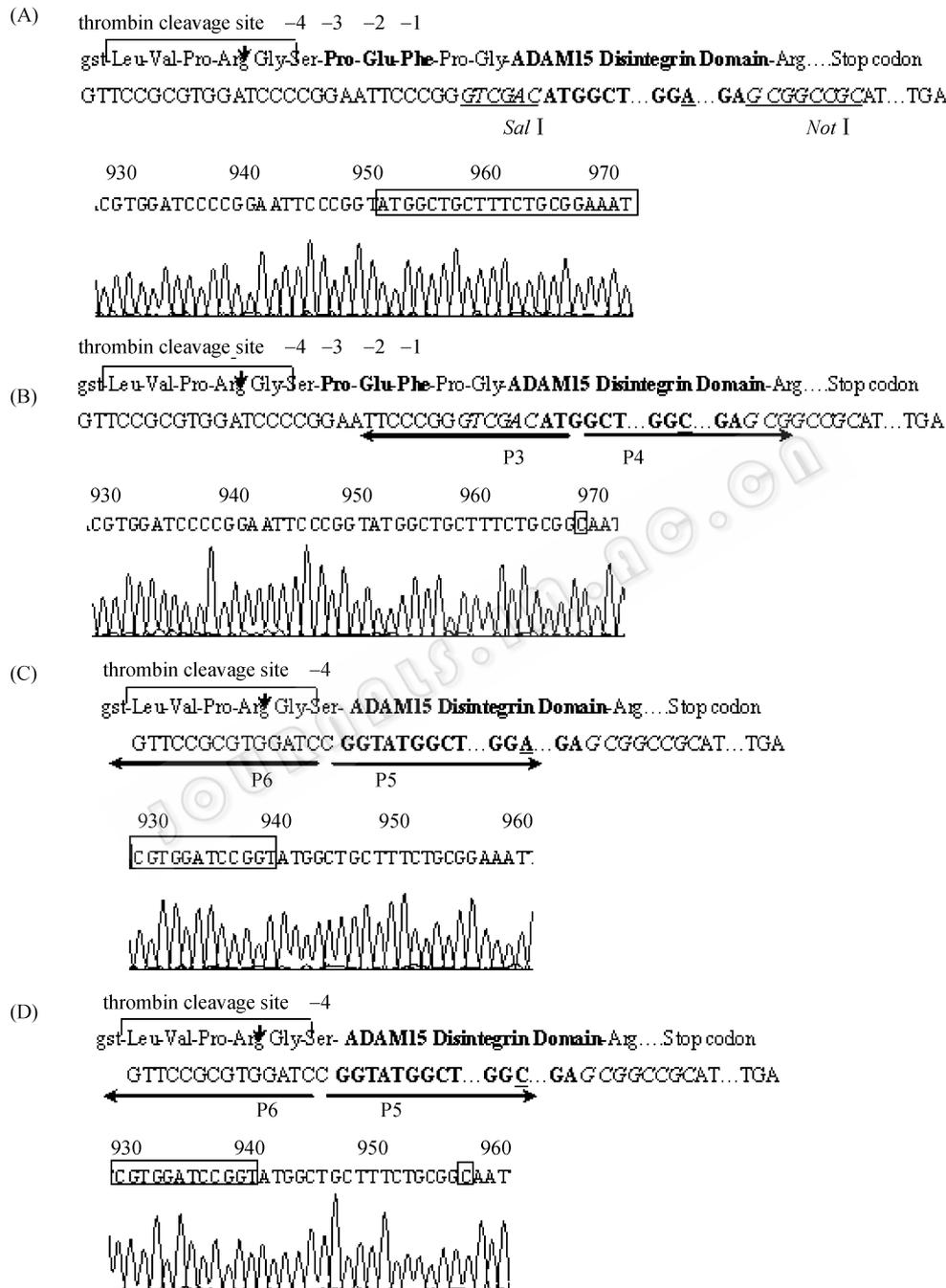


图 2 融合蛋白 GST-ADAM15 结构示意图及相应表达质粒的部分测序图谱

Fig. 2 Map of the fusion protein GST-ADAM15 and parts of the DNA sequences of the corresponding plasmid. (A) Wide-type GST-ADAM15 by cloning ADAM15 into pGEX-4T-1. (B) Engineered GST- $\Delta$ 1-ADAM15 by optimizing rare GGA codon with GGC. (C) Engineered GST- $\Delta$ 2-ADAM15 by deleting the amino acids residues of "Pro-Glu-Phe". (D) Engineered GST- $\Delta$ -ADAM15 by optimizing rare GGA codon with GGC and deleting the amino acids residues of "Pro-Glu-Phe".

GGG 和 TTG 密码子的 tRNA。但若突变 RGD 序列中编码甘氨酸(第 485 位)的 GGG 会影响 rhADAM15 的特异性结构;另一方面,目的片段中 TTG 在 *E. coli* 稀有密码子中具有最高使用频率。因此,作者将目的片段中数量大且使用频率低的 GGA 密码子突变为 GGC (图 2-B),得到质粒 pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15,转化 *E. coli* Roseta (DE3),最佳表达条件下融合蛋白 GST- $\Delta$ 1-ADAM15 的表达量为菌体总蛋白的 72%,浓度为 326 mg/L,比未经定点突变的野生型融合蛋白 GST-ADAM15 的产量提高了 9.4%。

#### 2.4 改善凝血酶酶切效率提高 rhADAM15 产量

对于融合蛋白来说,凝血酶的酶切效率是影响目标蛋白产量的关键因素。在对融合蛋白 GST-ADAM15 结构域的分析时发现(图 2-A),凝血酶识别序列-3 位 Pro 因其环状结构而减小了凝血酶识别的灵活性,而连接肽序列中 Pro 的存在会形成一个 X-Pro 连接,阻止了目标蛋白的折叠;同时,-2 位的 Glu 为酸性氨基酸,也影响酶切效率。凝血酶属于丝氨酸蛋白酶,在精氨酸和赖氨酸残基后剪切,最优的酶切位点为 P4-P3-Pro-Arg↓P1'-P2'(P4 和 P3 为疏水性氨基酸,P1'和 P2'为非酸性氨基酸)。

为提高凝血酶的酶切效率,增加目标蛋白的产量,将 GST-ADAM15 连接框中 Pro-Glu-Phe 氨基酸残基消除,构建了突变表达质粒 pGEX- $\Delta$ 2-ADAM15 (图 2-C);同样方法在 pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15 基础上构建得到突变表达质粒 pGEX- $\Delta$ -ADAM15(图 2-D)。将测序正确的突变质粒 pGEX- $\Delta$ 2-ADAM15 和 pGEX- $\Delta$ -ADAM15 分别转化 *E. coli* Roseta (DE3)并表达,在最佳表达条件下获得 298 mg/L 融合蛋白 GST- $\Delta$ 2-ADAM15 和 326 mg/L GST- $\Delta$ -ADAM15(较 GST-ADAM15 提高了 9.4%)。

将 4 种融合蛋白 GST-ADAM15(野生型)、GST-

$\Delta$ 1-ADAM15(稀有密码子替换)、GST- $\Delta$ 2-ADAM15(消除氨基酸残基)和 GST- $\Delta$ -ADAM15(稀有密码子替换和切除氨基酸残基)在相同条件下进行凝血酶消化,并经过 SephadexG-75 凝胶过滤柱纯化,分别得到 42、51、57 和 68 mg/L 的 rhADAM15 蛋白(纯度为 95%)(图 3-A)。其中,Pro-Glu-Phe 氨基酸残基的消除使 rhADAM15 产量提高 35.7%(表 1)。这一结果表明,GST-ADAM15 连接框中 Pro-Glu-Phe 氨基酸残基的消除能显著提高凝血酶的酶切效率,从而提高 rhADAM15 的产量。

#### 2.5 rhADAM15 的 Western blot 杂交鉴定

将从上述 4 种融合蛋白中纯化获得的 rhADAM15 蛋白分别用抗 ADAM15 多克隆抗体进行蛋白质杂交鉴定。结果显示,rhADAM15 在 11 kDa 附近显示单一条带,与目标蛋白分子质量一致(图 3-B)。而且,4 种蛋白经氨基酸序列表明所含氨基酸残基完全相同。因此,初步判定这四种蛋白均为重组人 ADAM15 去整合素结构域的重组蛋白片段。

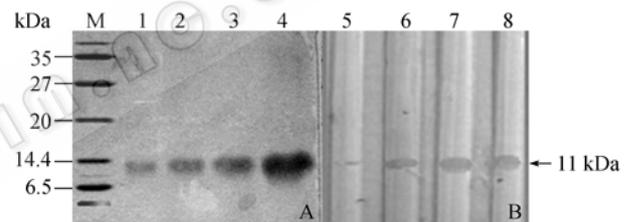


图 3 4 种 rhADAM15 蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 分析(A) 及对应 Western blot 杂交鉴定(B)

Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE and Western blot analysis of purified rhADAM15. A: Tricine-SDS-PAGE analysis. Lane 1-4, the purified rhADAM15 from the fusion protein GST-ADAM15, GST- $\Delta$ 1-ADAM15, GST- $\Delta$ 2-ADAM15 and GST- $\Delta$ -ADAM15, respectively. B: Western blot analysis. Lane 5-8, blots of rhADAM15 from the fusion protein GST-ADAM15, GST- $\Delta$ 1-ADAM15, GST- $\Delta$ 2-ADAM15 and GST- $\Delta$ -ADAM15, respectively.

表 1 不同方法构建表达质粒时的蛋白表达情况比较

Table 1 Comparison of the results with different strategies

Strains	Plasmid	GST-ADAM15/(mg/L) <sup>a</sup>	rhADAM15/(mg/L)
<i>E. coli</i> BL21	pGEX-ADAM15	119	18
<i>E. coli</i> Roseta (DE3)	pGEX-ADAM15	298 (0%) <sup>b</sup>	42 (0%)
<i>E. coli</i> Roseta (DE3) (With GGA changed to GGC)	pGEX- $\Delta$ 1-ADAM15	326 (9.4%)	45 (7.1%)
<i>E. coli</i> Roseta (DE3) (With "Pro-Glu-Phe" deleting)	pGEX- $\Delta$ 2-ADAM15	298 (0%)	57 (35.7%)
<i>E. coli</i> Roseta (DE3) (With GGA changed to GGC and "Pro-Glu-Phe" deleting)	pGEX- $\Delta$ -ADAM15	326 (9.4%)	68 (61.9%)

<sup>a</sup> The protein concentration was determined by BCA Assay. <sup>b</sup> The increase percent when compared with that of rhADAM15 expressed in *E. coli* Roseta (DE3).

## 2.6 rhADAM15 的生物活性分析

将4种方法获得的rhADAM15蛋白分别作用于内皮细胞(HMEC-1),观察蛋白作用对内皮小管形成的影响。实验结果表明(图4),4种蛋白在剂量为20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,作用时间为16 h时,均可抑制HMEC-1内皮小管的形成,但来源于GST- $\Delta$ -ADAM15的rhADAM15可完全破坏内皮小管形成;源于GST- $\Delta$ 2-ADAM15的rhADAM15部分破坏内皮小管形成;源于GST-ADAM15和GST- $\Delta$ 1-ADAM15的rhADAM15抑制作用相似,较前两

者有所减弱。同时,采用鸡胚尿囊膜法(CAM)检测来源于GST- $\Delta$ -ADAM15的rhADAM15对新生血管生成的作用,结果表明(图5),rhADAM15在剂量为20  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 时,能明显抑制鸡胚尿囊膜新生血管的生成,并呈现剂量依赖性。这一结果表明,通过选择能提供稀有密码子的表达宿主 *E. coli* Rosetta (DE3)可以获得具有生物活性的rhADAM15蛋白,并且在优化稀有密码子及提高凝血酶酶切效率获得高产量的rhADAM15蛋白时,该蛋白也表现出较高的生物活性。

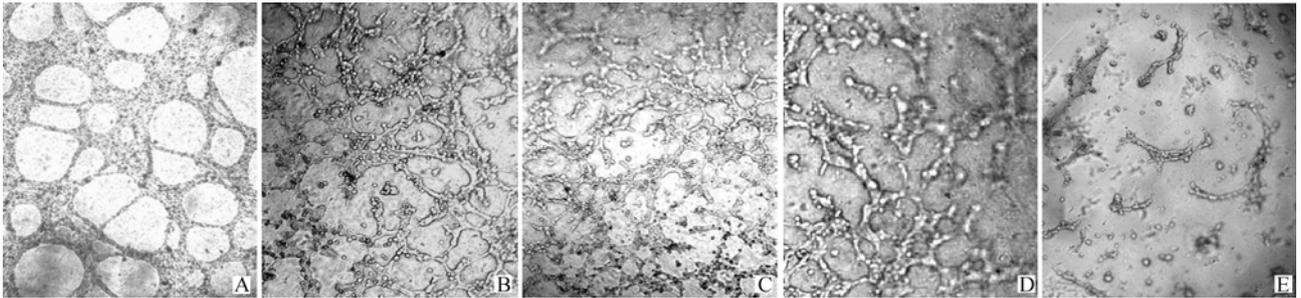


图4 4种rhADAM15蛋白对内皮小管形成的作用

Fig. 4 Effect of rhADAM15 on HMEC-1 tube formation. The four different rhADAM15 at the concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were incubated with HMEC-1 for 16 h, respectively. A was the control, B, C, D and E are respect to the rhADAM15 from the fusion protein GST-ADAM15, GST- $\Delta$ 1-ADAM15, GST- $\Delta$ 2-ADAM15 and GST- $\Delta$ -ADAM15, respectively.

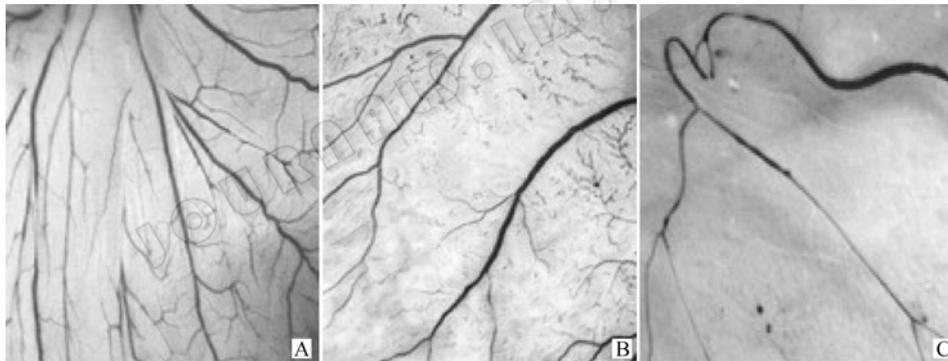


图5 rhADAM15蛋白对鸡胚尿囊膜新生血管的形成的作用

Fig. 5 Effect of rhADAM15 on CAM. CAM were treated with rhADAM15 for 60 h, harvested and photographed. (A) rhADAM15, 0  $\mu\text{g}/\text{egg}$ ; (B) rhADAM15, 20  $\mu\text{g}/\text{egg}$ ; (C) rhADAM15, 40  $\mu\text{g}/\text{egg}$ .

## 3 讨论

在本研究中发现,ADAM15去整合素结构域蛋白表达于 *E. coli* BL21 时尽管获得了一定量的rhADAM15,但没有生物活性。对ADAM15去整合素结构域的cDNA分析时发现,其结构域中含有14%的稀有密码子(甘氨酸密码子GGA、GGG,脯氨酸密码子CCC,亮氨酸密码子TTG、CTA,精氨酸密码子AGG、AGA)。这些稀有密码子的存在可能是导致rhADAM15在宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3)中表达水平

有限和生物活性缺失的主要原因。类似地,Jeon OH等尽管在毕赤酵母中获得了具有生物活性的ADAM15去整合素结构域蛋白,但却难以在大肠杆菌中表达<sup>[11]</sup>。Zhang和Trochon等在在宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 中以GST融合蛋白的形式表达了ADAM15去整合素结构域蛋白并发现其可以与整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 相互作用,并具有抑制肿瘤细胞的生长、转移和血管形成等重要功能,但没有报道该蛋白的表达产量情况<sup>[12,18]</sup>。最近,Lu等同样在 *E. coli* DH5 $\alpha$ 中获得了ADAM15去整合素结构域蛋白,并进一步发现其具有抑制气管平滑肌细胞的

迁移和粘附功能,但仍然没有涉及该蛋白的表达产量<sup>[9]</sup>。

本研究在对目标蛋白 ADAM15 去整合素结构域的 cDNA 及其与 GST 融合蛋白序列进行分析的基础上,采用定向选择高效表达宿主、定点突变替换稀有密码子和改造酶切位点等策略,提供 rhADAM15 高效表达所需的稀有密码子和高效酶切位点,实现了 rhADAM15 大量积累。表 1 详细列出了不同策略对融合蛋白表达水平和 rhADAM15 产量的影响:(1)当选用 *E. coli* BL21 作为宿主菌时,尽管有 119 mg/L 融合蛋白 GST-ADAM15 表达,但 rhADAM15 没有生物活性;(2)基于稀有密码子分析定向选择能改善由于稀有密码子造成表达限制的 Rosetta (DE3)作为表达宿主,融合蛋白 GST-ADAM15 表达水平提高到 298 mg/L,比 *E. coli* BL21 为宿主菌时提高了 150%,rhADAM15 产量提高了 130%,且表现出较高的生物活性;(3)将 ADAM15 去整合素结构域中甘氨酸稀有密码子 GGA 替换为 GGC,融合蛋白的表达量提高到了 326 mg/L,提高了 9.4%,但不能提高 rhADAM15 产量;(4)仅消除 GST-ADAM15 表达框中“Pro-Glu-Phe”残基,并不能有效地提高融合蛋白的表达量,但能使 rhADAM15 产量提高 35.7%(与野生型比较)。如同时切除“Pro-Glu-Phe”残基和 GGA 替换为 GGC,则使 rhADAM15 产量提高到 68 mg/L,比分别切除“Pro-Glu-Phe”残基、GGA 替换为 GGC 和野生型提高了 19.2%、51.1%和 61.9%。类似地,在 *E. coli* BL21 (DE3)和 Rosetta (DE3)中分别表达含有稀有密码子的人类肿瘤抑制因子 LKB1,发现从 Rosetta (DE3)中获得的重组蛋白无论表达量还是对肝癌细胞生长的抑制率明显高于 BL21 (DE3)<sup>[20]</sup>。同时与 *E. coli* BL21 (DE3)相比,在 Rosetta (DE3)中表达含有稀有密码子的 5-氨基酮戊酸合成酶(ALA),也获得了较高的产量<sup>[9]</sup>;消除重组人  $\alpha$  干扰素(rhIFN $\alpha$ )凝血酶识别位点附近的“Pro-Glu-Phe”残基使得 rhIFN $\alpha$ 产量达到 100 mg/L<sup>[10]</sup>。

采用不同方法制备的 rhADAM15 均能与抗 ADAM15 抗体发生特异性反应,并破坏内皮细胞在 Matrigel 基质胶上形成内皮小管(图 4),其中,联合采用密码子优化和“Pro-Glu-Phe”氨基酸残基消除的方法获得的 rhADAM15 蛋白表现出明显地破坏作用。而且,该方法获得的 rhADAM15 蛋白可明显抑制鸡胚尿囊膜新生血管的生成,表明其具有潜在的抑制肿瘤新生血管形成的作用。因此,本研究所提出的研究策略为进一步提高重组蛋白的表达量提供了新的途

径;另一方面,所获得的高产量 rhADAM15 为深入研究 ADAM15 抗肿瘤机理奠定了坚实的物质基础,也为 ADAM15 或其片段蛋白在癌症治疗中的应用提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] Arribas J, Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(1): 57-68.
- [2] Eto K, Puzon-McLaughlin W, Sheppard D, et al. RGD- independent binding of integrin  $\alpha_9\beta_1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 34922-34930.
- [3] Karkkainen I, Karhu R, Huovila AP. Assignment of the ADAM15 gene to human chromosome band 1q21.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 88(3-4): 206-207.
- [4] Komiya K, Enomoto H, Inok I, et al. Expression of ADAM15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(6): 1158-1173.
- [5] Schutz A, Hartig W, Wobus M, et al. Expression of ADAM15 in lung carcinomas. *Virchows Arch*, 2005, 446(4): 421-429.
- [6] Martin J, Eynstone LV, Davies M, et al. The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 33683-33689.
- [7] Kuefer R, Day K, CKleer CG, et al. ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease. *Neoplasia*, 2006, 8(4): 319-329.
- [8] Ahn SJ, Seo JS, Kim MS, et al. Cloning, site-directed mutagenesis and expression of cathepsin L-like cysteine protease from *Uronema marinum* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 156(2): 191-198.
- [9] Fu W, Lin J, Cen P. 5-Aminolevulinic acid production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(4): 777-782.
- [10] Rabhi-Essafi I, Sadok A, Khalaf N, et al. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Eng Des Sel*, 2007, 20(5): 201-209.
- [11] Jeon OH, Kim D, Choi YJ, et al. Novel function of human ADAM15 disintegrin-like domain and its derivatives in platelet aggregation. *Thromb Res*, 2007, 119(5): 609-619.
- [12] Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM, et al. Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant

- disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res*, 2004, 64(6): 2062–2069.
- [13] Kratzschmar J, Lum L, Blobel, CP, *et al.* Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem*, 1996, 271(9): 4593–4596.
- [14] Rabhi I, Guedel N, Chouk I, *et al.* A novel simple and rapid PCR-based site-directed mutagenesis method. *Mol Biotechnol*, 2004, 26(1): 27–34.
- [15] Huang CJ, Chen CY. High-level expression and characterization of two chitinases, ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(1): 8–17
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] Tong YG, Zhang XW, Zhao WM, *et al.* Anti-angiogenic effects of Shiraiachrome A, a compound isolated from a Chinese folk medicine used to treat rheumatoid arthritis. *Eur J Pharmacol*, 2004, 494(2-3): 101–109.
- [18] Zhang XP, Kamata T, Yokoyama K, *et al.* Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM-15) with integrin  $\alpha v\beta 3$ . *J Biol Chem*, 1999, 273: 7345–7350.
- [19] Lu D, Xie S, Sukkar MB, *et al.* Inhibition of airway smooth muscle adhesion and migration by the disintegrin domain of ADAM-15. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(4): 494–500.
- [20] Liu J, Hu T, Hou X.. High-level expression of functional tumor suppressor LKB1 in *Escherichia coli*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(10): 779–786.

## Improving production and bioactivity of recombinant human disintegrin domain of ADAM15 (rhADAM15) in *Escherichia Coli*

Jing Wu<sup>1,2</sup>, Jianyong Lei<sup>1</sup>, Lianfen Zhang<sup>1,2</sup>, Hui Hua<sup>1</sup>, Jian Jin<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical and Molecular Biotechnology, School of Pharmaceutical and medical, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** [Objective] To enhance the production and bioactivity of recombinant human disintegrin domain of ADAM15 (A Disintegrin and Metalloproteinase 15) (rhADAM15) in *Escherichia coli*. [Methods] The expression host was chose and the recombinant expression plasmid pGEX-ADAM15 was constructed, based on analysis of the cDNA sequence of rhADAM15. [Results] (1) 298 mg/L GST (Glutathione-S-transferase)-ADAM15 and 42 mg/L rhADAM15 were achieved when choosing *E. coli* Rosetta (DE3) as the expression host that could supply additional tRNA for rare codons. (2) The GST-ADAM15 expression level increased to 326 mg/L after changing the rare codon GGA (Gly<sup>425</sup>) to GGC by PCR (Polymerase Chain Reaction)-based site-directed mutagenesis. (3) The rhADAM15 concentration increased to 57 mg/L by deleting the “Pro-Glu-Phe” at the GST-ADAM15 junction to improve the thrombin cleavage efficiency. (4) Finally, by combinational introduction of the favorable codons and suitably eliminating of certain amino acid sequence, rhADAM15 concentration reached the highest level (68 mg/L). [Conclusion] The high expression of heterologous protein could be achieved by releasing rare codon usage and amino acids residues restriction.

**Keywords:** recombinant ADAM15 disintegrin domain; *Escherichia coli* Rosetta (DE3); rare codons; PCR site-directed mutagenesis; anti-angiogenesis

Supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30772586)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918219 E-mail: jinjian31@hotmail.com

Received: 15 February 2008/ Revised: 17 April 2008