

人血管形成素在大肠杆菌中的融合表达、纯化及活性测定

杨 辉^{1*} 张英起¹ 颜 真¹ 韩 苇¹ 药立波² 苏成芝²

(¹ 第四军医大学生物技术中心, ² 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 西安 710032)

摘 要 RT-PCR 获取的血管形成素 Angiogenin cDNA 片段, 克隆入融合表达载体 pRSETB 中, 表达产物为 N 端融合了 His6 的融合蛋白, 以包涵体形式存在, 占菌体总蛋白的 10%。用 8mol/L 脲溶解包涵体, 利用 His6 与过渡态金属离子 Ni^{2+} 高亲和力结合的性质, 经 Ni^{2+} -NTA 亲和树脂一步法纯化, 获得纯度达 98% 以上 His6-ANG 融合蛋白, Western-blot 结果表明在相应分子量处有一条特异性条带。重组蛋白复性后活性测定表明, 在体外可促进鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 血管形成, 并可降解 tRNA。

关键词 血管形成素, His6 融合蛋白, 配体亲和层析

中图分类号 R318 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0055-04

肿瘤的发生、发展有赖于新生血管的不断形成, 人们一直寻找来自肿瘤细胞的介导血管生长的物质, 希望其能成为新的肿瘤治疗药物, 从而控制肿瘤生长^[1]。1985 年, 首次从人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞培养上清中发现了一种能诱导血管形成的物质, 命名为 Angiogenin(血管形成素, 简称 ANG)^[2]。hANG 的发现引起人们极大的兴趣, 但从人结肠腺癌 HT-29 细胞条件培养基中获取 hANG 的量, 不足以供 hANG 生理功能、抗原特性及潜在的临床应用等方面的研究应用, 为获取足够量的 hANG, 我们将 hANG cDNA 克隆入带有纯化标签的表达载体 pRSETB, 表达的目的蛋白的 N 端融合有 His6^[3], 便于利用金属螯合亲和层析柱对表达产物一步纯化, 获得有活性的重组蛋白, 为探索肿瘤发生、发展中肿瘤血管形成的意义、机制及相应的拮抗剂的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种和质粒: 表达 rhANG 的重组质粒 pRSET-ANG 由本实验室构建^[3], 质粒 pRSETB 含有 T7 启动子的融合表达载体, *E. coli* BL21(DE3) pLySs 含有 λ 溶原的 T7 RNA 聚合酶基因的表达宿主菌。

1.2 酶和试剂

限制酶, T4DNA ligase 为 GIBCO 公司产品;

IPTG、4-氯乙萘酚为上海生工产品; Ni^{2+} -NTA Sepharose 6B 为 Qiagen 产品; 山羊抗人 ANG 多抗、及辣根酶标记的鼠抗羊的二抗为 Santa Cruz 和北京中山公司产品。

1.3 DNA 重组

质粒提取, 酶切反应, DNA 电泳、回收、连接、转化参照分子克隆实验手册进行^[4]。

1.4 外源基因表达及表达产物溶解性分析

构建成功的重组表达质粒 pRSET-ANG 转化宿主菌 BL21(DE3) pLySs, 挑取单克隆即为 ANG 的表达菌株, 接种于含 Amp(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 中, 次日晨, 按 2% 转接, 37℃ 培养 3h, 加 IPTG 至终浓度 0.5mmol/L, 诱导表达 1~5h, 12% SDS-PAGE 电泳, 以鉴定是否有诱导产物表达。

诱导表达菌悬于 STE 中, 加入溶菌酶, 4% DOC, 2mmol/L MgCl_2 , DNase I, 搅拌片刻, 4℃ 下 12000r/min 离心 10min, 分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE。

1.5 表达产物的亲和纯化

诱导表达菌 1g, 冰浴, 悬于 5mL 缓冲液 B (8mol/L 脲, 0.1mol/L NaH_2PO_4 , 0.01mol/L Tris, Cl pH8.0), 搅拌至清亮, 10 000g \times 30min 离心, 上清即为细菌裂解液, 与 1mL 预先用缓冲液 B 平衡的 Ni^{2+} -NTA 树脂混合装柱。依次用 2 \times 4mL 缓冲液 C (8mol/L 脲, 0.01mol/L NaH_2PO_4 , 0.01mol/L Tris, Cl pH6.3) 洗去非特异吸附蛋白, 4 \times 0.5mL

缓冲液 D(8 mol/L 脲 ,0.1 mol/L NaH₂PO₄ ,0.01 mol/L Tris. Cl pH5.9)及 4×0.5 mL 缓冲液 E(8 mol/L 脲 ,0.1 mol/L NaH₂PO₄ ,0.01 mol/L Tris. Cl pH4.5)洗脱特异性结合的 His6 融合蛋白 ,收集洗脱峰。D、E 洗脱峰用 10 mmol/l Tris. Cl pH8.0 ,0.1 mmol/l EDTA 充分透析 24 h ,收集纯化蛋白。分别取细胞裂解液、穿柱峰、洗脱峰进行 12 % SDS-PAGE 电泳 检测纯化产物。

1.6 Western-blot 检测纯化产物

纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 后 ,Bio-Rad 公司的电转移仪 将蛋白从凝胶转移至 NC 膜上 ,电转移结束后 ,NC 膜于封闭液中封闭后 ,与山羊抗人 ANG 多抗 37℃ 孵育 2 h ,辣根酶标记的鼠抗山羊二抗 37℃ 孵育 2 h ,显色液中室温避光显色 5 min ,蒸馏水冲洗终止反应。

1.7 蛋白含量测定

以牛血清白蛋白为标准品 ,样品及标准品中分别加 Folin 酚试剂混匀 ,40℃ 放置 10min ,以蒸馏水为空白对照 ,分光光度计 590nm 处 ,测各管光吸收值 换算蛋白含量。

1.8 表达产物活性鉴定

1.8.1 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)鉴定 :按文献[2]方法 ,受精鸡胚孵育 9d 后 ,蛋壳开直径 1cm² 左右窗口 ,纯化的重组蛋白加样于消毒灭菌小滤纸片上 ,置于鸡胚 CAM 上 ,灭菌封口膜封住蛋壳窗口 ,38℃ ,继续孵育 48h ,观察结果。

1.8.2 tRNA 水解活性鉴定 :按文献[5]方法 ,100μL 总反应体积中分别含 0.2 % ,0.3 % ,0.4 % ,0.5 % 的 tRNA ,30mmol/L Hepes pH 6.8 ,30mmol/L NaCl ,0.001 % HSA ,加入 1μmol/L rhANG ,37℃ 2h 后 ,调整 tRNA 浓度均为 0.5 % ,冰浴中加入等体积 6 % 高氯酸 ,冰浴 10min ,4℃ 15 600g 离心 10min ,1:3 稀释 测 A₂₆₀。

2 结果与讨论

2.1 T7 启动子控制下的 His6 融合表达质粒的构建

EcoR I /Hind III 双酶切 pUC19-ANG 重组质粒 ,回收 hANG cDNA ,克隆入表达载体 pRSETB 中 ,转化 E. coli JM109 ,挑取单克隆 ,提取质粒 DNA 酶切鉴定均含有 380bp 左右的片段 ,说明表达载体 pRSETB-ANG 构建成功。

2.2 hANG 成熟肽的诱导表达

pRSETB-ANG 转化表达宿主菌 BL21(pLysS) ,挑取单克隆 ,IPTG 诱导表达 ,12 % SDS-PAGE 结果

显示 ,诱导者在分子量 18kD 处有一条明显的深染新生蛋白带 ,与预计 His6-ANG 融合蛋白分子量大小基本相符。诱导 4h 后有一明显的重组蛋白表达条带(Fig. 1)。诱导表达菌 ,裂菌 ,上清和沉淀行 12 % SDS-PAGE(Fig. 2) ,结果表明表达产物存在于沉淀中 ,即表达的重组蛋白 His6-ANG 为包涵体。

2.3 表达产物的亲和层析

His6-ANG 重组蛋白纯化通过过渡态金属离子

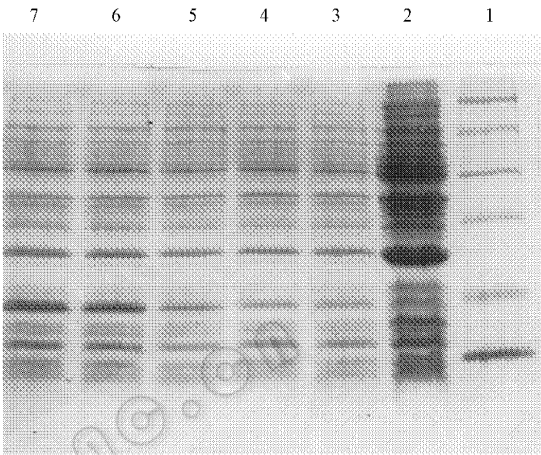


图 1 不同诱导时间 rhANG 表达的 SDS-PAGE
Fig.1 SDS-PAGE analysis of expressed hANG within 1~5h different time

- 1. Low-range protein molecular weight marker
- 2. Uninduced total bacterial proteins
- 3~7. Total bacterial proteins induced by IPTG for 1~5h

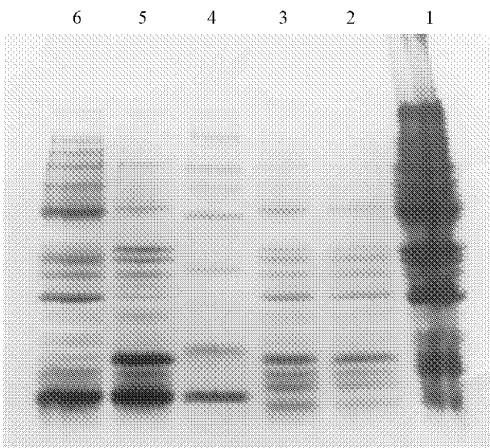


图 2 rhANG 表达产物形式的 SDS-PAGE 分析
Fig.2 Characterization of the expressed rhANG

- 1. Uninduced total bacterial proteins
- 2. Induced total bacterial proteins
- 3. Induced total bacterial proteins
- 4. Low-range protein molecular weight marker
- 5. Crude lysate precipitation of bacterial with IPTG induction
- 6. Crude lysate supernatant of bacterial with IPTG induction

Ni^{2+} 与多聚组氨酸的高亲和力结合性质而建立,将 Ni^{2+} 离子结合到 Agrose 上后,获得了固定化的 Ni^{2+} -NTA 树脂。含有 8mol/L 脲的 Buffer B 裂菌、溶解包涵体,上样后 His6-ANG 与 Ni^{2+} 充分结合,依次用不同 pH 值的缓冲液洗脱。收集洗脱峰行 SDS-PAGE(Fig. 3),可见裂菌上清及 D、E 洗脱峰中均有特异性的蛋白表达带,薄层扫描测定 D、E 洗脱峰目的蛋白的纯度在 98% 以上,Lowery 氏法测定蛋白含量为 0.212mg/mL。纯化的 His6-hANG 重组蛋白 Western-blot 结果(Fig. 4),可见在相应位置处有一阳性反应条带。

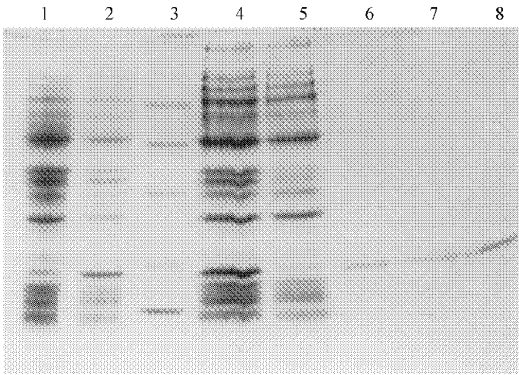


图 3 rhANG 纯化过程的 SDS-PAGE 图谱
Fig.3 Reduced SDS-PAGE during the rhANG purification procedure

- 1. Bacterial sample before induced
- 2. Bacterial sample after induced
- 3. Low-range protein molecular weight marker
- 4. Crude lysate supernatant
- 5. Flow through fraction
- 6. Wash fraction by bufferC
- 7. Elution fraction by bufferD
- 8. Elution fraction by bufferE

2.4 重组 hANG 生物学活性分析

2.4.1 鸡胚融毛尿囊膜鉴定 :纯化的重组 hANG 能有效刺激鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)的血管形成(Fig. 5),未加 rhANG 对照组 CAM 血管呈叶脉状分布,实验组 CAM 血管呈较典型的车轮辐辏状排列,血管密度明显增加。实验表明 100ng~10 μ g 重组 hANG 均能刺激 CAM 的血管形成。

2.4.2 tRNA 水解活性鉴定 :1 μ mol/L rhANG 与 tRNA 在 30mmol/L Hepes 30mmol/L NaCl 存在的条件下孵育 37 $^{\circ}$ C 2h,260nm 处的光吸收值结果显示 随着 tRNA 浓度的增加,光吸收值升高(Fig. 6),分别为 0.207 0.233 0.279 0.326,表明 rhANG 能有效降解 tRNA。

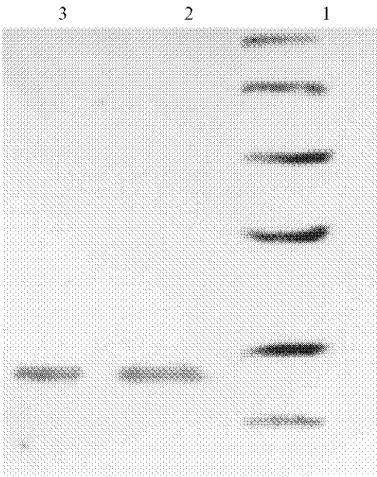


图 4 表达产物 rhANG 的 Western-blot 鉴定
Fig.4 Western-blot analysis of expressed rhANG
1. Low-range protein molecular weight marker ;
2. Purified rhANG by Ni^{2+} -NTA resin ;
3. Western-blot analysis of induced hANG recombinant

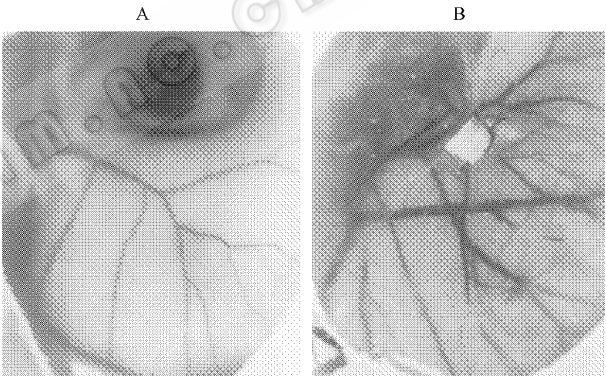


图 5 表达的 rhANG 的 CAM 活性鉴定
Fig.5 CAM assay depicting a positive and negative angiogenic response.

- A. Non-treated
- B. Treated by 100ng of rhANG

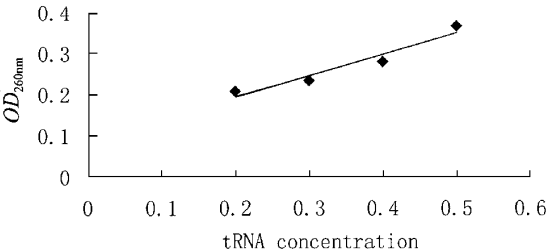


图 6 rhANG 水解 tRNA 活性
Fig.6 The activity of rhANG hydrolyze tRNA

3 讨 论

本研究工作中,我们使用含 T7 启动子的表达载体 pRSETB 和整合有 T7 gene 1 的宿主菌

BL21DE3 (pLysS), 表达目的蛋白。在 IPTG 诱导的条件下宿主菌表达 T7RNA 聚合酶, 识别表达载体上的 T7 启动子, 从而转录目的基因。由于 T7RNA 聚合酶活性极强, 转录效率是大肠杆菌 RNA 聚合酶的 5 倍^[6,7]。因此构建表达载体时, 首先转化不含 T7gene 1 的 *E. coli* JM109 鉴定正确后转化表达宿主菌 *E. coli* BL21 DE3 (pLysS), 以防止未诱导的细胞中少量存在的 T7RNA 聚合酶诱导目的蛋白表达, 对宿主细胞产生毒性作用^[6,7]。我们在实验过程中也发现转化菌在含 Amp 的 LB 平板上仅能保存几天。

表达的目的蛋白 N 端融合了 His6, 利用 His6 与过渡态金属离子 Ni^{2+} 高亲和力结合的特性^[8], 通过 Ni^{2+} -NTA 树脂对 His6-ANG 融合蛋白直接一步纯化, 而文献报道的 ANG 纯化往往需要 HPLC、C18 疏水层析柱等较为复杂的步骤。此外 Ni^{2+} 与 His6 的亲和力极高, 且不需要任何功能性结构, 在表达量不太高的情况下及变性剂存在的条件, 仍能够有效地结合并纯化重组目的蛋白。我们在 8mol/L 脲变性条件下对表达的重组蛋白的包涵体直接进行纯化, 纯化的蛋白用 10mmol/L Tris, Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0 充分透析复性。同时 pRSET 载体表达的 His6 融合蛋白与我们常用的 GST-融合蛋白相比, N 端仅融合了 4kD 左右的片段, 而 GST 的分子量为 26kD, 所以对表达产物的功能影响较小, 一般不需要用蛋白水解酶切去融合部分。本研究工作也证实融合蛋白 His6-ANG 在体外促进 CAM 血管形

成, 并且能够降解 tRNA, 表明其活性未受到影响。

我们应用融合表达载体 pRSETB 在大肠杆菌表达人血管形成素 (ANG) 经过 Ni^{2+} -NTA 树脂纯化、复性后, 获得活性较好的目的蛋白, 且纯化步骤大大简化, 为进一步研究 ANG 在肿瘤血管形成中的作用及寻找其相应的拮抗剂打下一定的基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442~447
- [2] Fett J W, Stryom D J, Lobb R R *et al.* Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 1985, **24**: 5480~5486
- [3] YANG H (杨辉), ZHANG Y Q (张英起), YAN Z (颜真) *et al.* Cloning And expression of human angiogenin cDNA in *E. coli*, *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报) 2000, **16**(4): 35~39
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press, 1989
- [5] Deneffe P, Kovarik S, Guitton J D *et al.* Chemical synthesis of a gene coding for human angiogenin, its expression in *Escherichia coli* and conversion of the product into its active form. *Gene*, 1987, **56**: 61~70
- [6] Benjamin P C, Chen Tsonwin Hai. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *E. coli* as host. *Gene*, 1994, **139**: 73~75
- [7] Ralf-Schoefer. The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *E. coli*. *Gene*, 1993, **124**: 83~85
- [8] Kroll D J, Abdel-Hafiz H A-B, Marcel T *et al.* A multifunction prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA and Cel Biologio*, 1993, **12**: 441~445

Human Angiogenin : Expression , Purification , Biological Assay

YANG Hui^{1*} ZHANG Ying-Qi¹ YAN Zhen¹ HAN Wei¹ YAO Li-Bo² SU Cheng-Zhi²

(1. The Fourth Military Medical University Biotechnology Center, 2. The Fourth Military Medical University
Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an 710032 China)

Abstract Angiogenin cDNA was obtained by RT-PCR, and cloned into the fusion expression vector pRSETB. The recombinant Angiogenin protein was fused with His6 at its N-terminal and expressed as inclusion body. The expression level was about 10% of the total bacteria protein. After dissolved in 8mol/L urea, the recombinant protein was purified by Ni^{2+} -NTA chelating resin, according to the high affinity of His6 with Ni^{2+} . The biological assay indicated that purified rhANG could induced the new blood vessel formation on CAM and degraded tRNA *in vitro*.

Key words angiogenin, His6 fusion protein, affinity chromatography