

富含二硫键的膜蛋白 p185 胞外区在大肠杆菌中的可溶性表达和性质鉴定 Soluble Expression and Characterization of Disulfide Bond-rich Subdomains of Membrane Protein p185 in *Escherichia coli*

李良维 刘海波 胡思怡 梁 顿 程联胜* 刘 兢

LI Liang-Wei , LIU Hai-Bo , HU Si-Yi , LIANG Dun , CHENG Lian-Sheng* and LIU Jing

中国科学技术大学生命科学学院细胞免疫学实验室 ,合肥 230027

School of Life Science , University of Science and Technology of China , Hefei 230027 , China

摘 要 Her2/c-erbB-2 基因(其产物为膜蛋白 p185)是表皮生长因子受体(EGFR)基因家族的一员,在约 30% 的乳腺癌中发现了其过量表达。为了鉴定抗 p185 单克隆抗体的抗原表位并进一步研究它们的相互作用,采用 PCR 的方法从含 Her2/c-erbB-2 基因的 pBabe/erbB-2 质粒中扩增了 p185 胞外区的富含二硫键的第一、二结构域和第四个结构域。产物克隆到 pGEX/4T-1 载体后,转化大肠杆菌 Origami B(DE3) pLysS 菌株,用低浓度 IPTG 进行低温过夜诱导后将菌体压力破碎,SDS-PAGE 检测表达上清,得到了可溶性表达的融合有 GST 的目的蛋白。经 ELISA、Western blot 等方法鉴定,可溶性表达产物具有完全的抗体结合活性,且当用凝血酶把 GST 切掉后该活性仍然保留。p185 胞外区融合蛋白的成功表达将为二硫键富含类蛋白的表达提供参考,并为将来具有肿瘤细胞生长抑制活性的抗 p185 单克隆抗体的抗原表位鉴定,以及为 EGFR 家族受体的结构和功能关系的研究打下基础。

关键词 p185 胞外区,融合蛋白,谷胱甘肽 S 转移酶

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0590-07

Abstract Transmembrane protein p185 (the product of Her2/c-erbB-2 gene) is a member of the epidermal growth factor receptor(EGFR) family. Its overexpression was found in about 30% of breast cancer. It is essential to obtain soluble extracellular domain(ECD) of p185, especially disulfide bond rich domains, for identifying the epitopes of anti-p185 antibodies and researching the interrelationship between the antigen and antibody. The disulfide bond rich domain I-II and domain IV of p185 ECD were amplified from plasmid pBabe/erbB-2 by PCR respectively. These two fragments were inserted into pGEX/4T-1 vector, transfected into *E. coli* Origami B(DE3) pLysS and expressed inductively by low concentration of IPTG and low temperature overnight. After the pressure lysis of cells, the supernatants were analyzed by SDS-PAGE and the result demonstrated that this GST-fusion protein was expressed solubly in the amount of 10~15mg/L. By the ELISA, Western blot and

Received :December 20 , 2004 ; Accepted : May 13 , 2005 .

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30400078), the Hi-Tech Research and Development Program(“ 863 ” Program) of China (No. 2001AA215381) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education , SRFDP(No. 20020358048).

* Corresponding author. Tel 86-551-3601437 ; E-mail : charlson@mail.ustc.edu.cn

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2001AA215381)、国家自然科学基金资助(No. 30400078)和高等学校博士学科点专项科研基金资助(No. 20020358048)。

other immunological assays, the fusion proteins and their GST cut-off derivatives both showed binding activities with several anti-p185 antibodies respectively. These results indicated that it was a feasible and effectual method to express disulfide bond rich domain I - II and domain IV of p185 ECD and this method may also be used to express other disulfide bond rich proteins.

Key words extracellular domain of p185, fusion protein, GST

Her2/c-erbB-2 原癌基因编码分子量为 185kD 的跨膜糖蛋白 p185, 该蛋白属于受体酪氨酸激酶表皮生长因子受体(EGFR)家族的一员, 在 10% ~ 30% 左右的乳腺癌、卵巢癌、口腔癌、胃肠道癌症、肺癌和泌尿生殖器癌症中都发现有过度表达^[1]。目前在乳腺癌中, p185 已经被认为是一个预后因子、预测因子和治疗的靶蛋白^[2]。自从美国 FDA 批准人源化抗体 Herceptin 作为一种抗体药物治疗 p185 过表达乳腺癌以来, 针对 p185 的免疫疗法就成为该类肿瘤治疗的研究热点^[3,4]。本实验室在以往的研究中, 采用细胞表面包埋法得到了三株抗 p185 单克隆抗体且发现它们具有良好的肿瘤生长抑制活性, 其中的 A21 已被改造成嵌合抗体 chA21^[5]。嵌合抗体 chA21 具有和原始单抗 A21 完全相同的抗原识别表位, 并且同样具有体内和体外肿瘤细胞生长抑制活性。p185 为跨膜蛋白, 由胞外结构域、跨膜区和胞内酪氨酸激酶催化结构域组成, 其中胞外区可分为四个区: I 区和 II 区由第 22-371 位氨基酸残基组成, III 区和 IV 区分别由第 372-475 和第 476-649 位残基组成, 而 II 区和 IV 区是半胱氨酸富含区^[6]。这两个区域是有抑制活性的抗 p185 抗体的主要作用位点^[7]。Herceptin 结合在 p185 的 IV 区^[8], 而另一株已经上市的单抗 Pertuzumab 以及本研究组的抗体 A21 都结合于 I - II 区^[9]。为将本研究组的 A21 抗体开发成为抗体类候选药物, 本研究组拟通过对其表位的研究阐明它对肿瘤生长影响的机理, 以为进一步开展药物筛选的工作奠定基础。为此, 我们用重组大肠杆菌系统可溶性表达了 p185 的胞外 I - II、IV 区, 并对其与抗体的结合位点进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒, 大肠杆菌菌株:质粒 pGEX/4T-1, pBabe/erbB-2 的全基因构建到 pBabe 载体中, 由宾夕法尼亚大学医学院 Mark I. Greene 教授馈赠), T6-17 细胞(NIH/3T3 细胞稳定转染 Her2/c-erbB-2 基因而成), 大肠杆菌菌株 BL21(DE3) TG1、Origami B(DE3) pLysS 皆为本室保存。

1.1.2 主要试剂:限制酶、DNA Ligation Kit、碱性磷

酸酶、PCR 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; PCR 试剂购自北京赛百胜公司; 胶回收试剂盒购自华舜公司; 测序由北京三博公司完成; DNA 分子量标准购自华美公司; 异丙基- β -D 半乳糖苷(IPTG)、凝血酶(Thrombin)、Glutathione-agarose、苯甲基磺酰氟(PMSF, Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) 购自 Sigma 公司; 蛋白分子量标准购自 MBI 公司; 还原型谷胱甘肽购自上海生工生物工程公司; HRP 标记抗 GST 单抗购自 Amersham 公司; 96 孔酶标板购自 Nunc 公司; 化学发光(ECL)试剂盒购自 Pierce 公司; 压力破碎仪 FRENCH Press 为 Thermo 公司产品; Superdex G75 10/30 纯化柱及 AKTA 纯化系统购自 Amersham 公司。所有试剂均为分析纯。

1.1.3 引物

(1) 胞外区 I - II 区基因扩增:

上游引物为 EPI-fore: 5' gcc gaattc AGCACCCAAGTGTGCAC 3', 其中含 *Eco*R I 酶切位点; 下游引物为 EPI-rev: 5' gcc ctcgag tea GGCCAGGCAGTCAGAGTG 3', 其中含 *Xho* I 酶切位点及终止密码子。

(2) 胞外区 IV 区基因扩增:

片段 EP531 上游引物为 EP531-fore 5' gcc gaattc TGCAGCCAGTTCCTTCG; 下游引物为 EP531-rev: 5' gcc ctcgag tea GGCCACACACTGGTCAG。

片段 EP587 上游引物为 EP587-fore 5' gcc gaattc TGTGCCCACTATAAGG; 下游引物为 EP587-rev 5' gcc ctcgag tea AGGGCTGGCTCTCTGC。

片段 EPIV 上游引物为 EP531-fore 下游引物为 EP587-rev; 其中 EP531-fore 和 EP587-fore 含 *Eco*R I 酶切位点, EP531-rev 和 EP587-rev 含 *Xho* I 酶切位点及终止密码子。

1.2 方法

1.2.1 p185 胞外区(ECD) I - II 区表达载体 GST-EPI 的构建:以 EPI-rev 和 EPI-fore 为引物, 从含有 c-erbB-2 全长 cDNA 的质粒 pBabe/erbB-2 上扩增 p185 胞外区 I ~ II 区片段(S22-A254)。PCR 产物命名为 EPI, 经过分离纯化后, 用 *Eco*R I 和 *Xho* I 消化, 并与经 *Eco*R I 和 *Xho* I 消化的 pGEX/4T-1 连接构建表达载体, 转化宿主菌后抽提质粒进行 DNA 序列测

定。所有酶切、连接、转化和阳性克隆筛选等操作详见参考文献 [10]。

p185 胞外区 IV 表达载体的构建方法同胞外 I ~ II 区的构建方法。3 个 PCR 产物分别命名为 EP531 (C531-A586), EP587 (C587-P649), EPIV (C531-P649, 即 EP531 + EP587)。

1.2.2 GST 融合蛋白的表达及条件优化 测序正确的克隆接种 3mL LB 摇菌过夜, 抽提质粒后分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, TG1 菌株和 Origami B 菌株, 进行表达条件的摸索。

(1) 温度以及大肠杆菌菌株对目的蛋白可溶性表达的影响 对表达条件的摸索在 500mL 摇瓶中进行 (每瓶均为 200mL LB 培养基)。BL21 (DE3) 菌株、TG1 菌株、Origami B 菌株 3 种菌株分别于 37°C 诱导 2h、28°C 诱导 4h 和 16°C 过夜诱导三种条件进行表达。以 6000r/min、10min 离心收集菌体 (Beckman J-20 JA14 转子), 弃尽上清, 称量 3 种菌株的菌体湿重。其后以 50mmol/L PBS (pH7.4) 重悬 (PBS 用量保证 3 种菌株在单位体积 PBS 中有相同的菌体蛋白总量), 压力破碎仪破碎之 (压力为 1280psi), 15 000 r/min (Beckman J-20 JA17 转子) 离心 20min, 收集上清, 菌体裂解得到的沉淀则重溶于 PBS。上清、沉淀以 12% 的 SDS-PAGE 检测。对电泳胶版进行光密度扫描后得到目的蛋白所在条带的相对含量。

(2) 其他条件对目的蛋白可溶性表达的影响 对 Origami B 菌株, 16°C 诱导过夜的表达条件, IPTG 浓度在 0.1 ~ 1mmol/L 范围内以及转速在 200 ~ 250 r/min 范围内分别对可溶性蛋白的表达量进行分析。

1.2.3 蛋白的纯化 细菌裂解液离心得到的上清经超声破碎 5min 打断基因组 DNA 以减低粘稠度, 随后经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 除去颗粒杂质。处理后的上清先通过已用 10 个柱体积 PBS (pH7.4) 平衡过的 Glutathione-agarose 柱, 再用 50 个柱体积左右的平衡液 (含 1% Triton X-100) 清洗柱子, 洗掉杂蛋白; 然后再用 PBS 洗掉 Triton X-100; 最后用洗脱液 (50mmol/L Tris-HCl (pH9.5) 和 10mmol/L 还原型谷胱甘肽) 洗脱目的蛋白并收集。洗脱样品随后用 10% SDS-PAGE 检测。

1.2.4 直接 ELISA 用本实验室 CHO 系统表达的嵌合抗体 chA21 包被 96 孔酶标板 2h, PBS-T 洗 3 次, 每次 2min, 封闭剂 (含 1% 脱脂奶粉的 PBST) 封闭 1h, PBS-T 洗 3 次, 然后把样品 (细菌裂解液破碎上清或纯化的 GST 融合蛋白) 倍比稀释加到板上 (阴性对照为相同条件下表达 GST 蛋白的菌体裂解

液上清或纯化的 GST 蛋白), 每孔 100 μ L, 振荡 1h 后加入 HRP 标记抗 GST 单抗 (1:3000 稀释), 振荡反应 1h, PBS-T 洗 3 次, 最后用 OPD 底物显色并以 1mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 检测其 490nm 吸收值。

1.2.5 竞争 ELISA 通过直接 ELISA 法先确定一 OD 值在 0.5 ~ 2.5 之间的 GST 融合蛋白的浓度 (即稀释比例), 然后把纯化的 chA21 包被的酶标板封闭 1h 后加入由不同稀释度的 T6-17 裂解液和 Glutathione-agarose 柱纯化的 GST 融合蛋白构成的混合液反应 1h, PBS-T 洗 3 次, 随后 HRP 标记抗 GST 单抗反应 1h, 显色反应后 490nm 测定吸收值。

1.2.6 高表达 p185 蛋白的 T6-17 裂解液的制备方法 取 T6-17 细胞密度 80% 以上的 250mL 细胞培养瓶, 弃去培养上清; 后以 PBS (pH7.2) 清洗细胞 1 次, 弃去 PBS; 加入 500 μ L 细胞裂解液 (50mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 1% Triton, 150mmol/L NaCl, 10mmol/L PMSF) 至细胞培养瓶, 混匀后冰上放置 40min; 收集细胞裂解液高速离心 (Eppendorf Centrifuge 5415D, 15000r/min, 10min), 分装后于 -70°C 短期保存。

1.2.7 Western blot 洗脱样品 SDS-PAGE 分离蛋白后转至醋酸纤维膜 (NC 膜), 封闭剂 (含 5% 脱脂奶粉的 PBS-T) 封闭 1h, 加入 HRP 标记抗 GST 单抗 (1:5000 稀释) 反应 1h, PBS-T 洗 5 次后用 PBS 洗 3 次, 最后用 ECL 系统显影。

1.2.8 GST 的切除 GST 的去除采用柱上酶切法, 即在过 Glutathione-agarose 亲和柱时, 不加含还原型谷胱甘肽的洗脱液洗脱而直接加入凝血酶 (即 Thrombin, 每毫克蛋白加入 10u 酶量) 至 Glutathione-agarose 柱中室温低速振荡过夜; 第 2 天直接用 PBS 洗脱样品, 用超滤杯浓缩之。如样品仍含 GST, 可再过一遍 Glutathione-agarose 柱。

2 结果

2.1 质粒的构建

GST 融合的质粒见图 1a I - II 区 GST-EPI: 采用 PCR 法扩增得到 p185 胞外 I - II 区基因 (S22-A254), 产物长度为 699bp。引物起始位点是第 22 位氨基酸, 前 21 个氨基酸是信号肽。IV 区的 3 个克隆: EP531 (C531-A586), EP587 (C587-S649) 和 EPIV (EP531 + EP587) 经过 PCR 方法得到的基因的长度分别为 168bp, 189bp 和 357bp。

酶切连接到 pGEX/4T-1 载体后, 挑克隆双酶切鉴定 (图 1b) 后测序鉴定之。

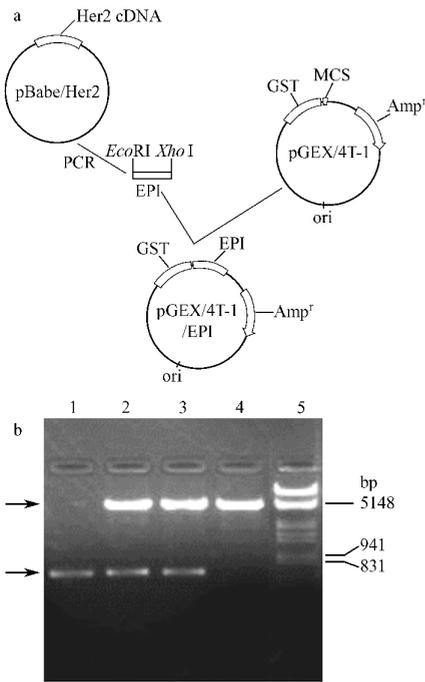


图 1a 表达载体 pGEX/4T-1/EPI 的构建

图 1b EPI 基因克隆至 pGEX/4T-1 所获质粒 pGEX/4T-1/EPI 的酶切鉴定

Fig. 1a Scheme for construction of the expression vector pGEX/4T-1/EPI ;

Fig. 1b Confirmation of vector pGEX/4T-1/EPI by restriction endonuclease *EcoR* I / *Xho* I digestion

1 : EPI gene amplified by PCR ; 2 : pGEX/4T-1/EPI clone1 + *EcoR* I / *Xho* I ; 3 : pGEX/4T-1/EPI clone2 + *EcoR* I / *Xho* I ; 4 : pGEX/4T-1 + *EcoR* I / *Xho* I ; 5 : Lambda DNA *Hind* III / *EcoR* I markers.

2.2 GST 融合蛋白的表达

2.2.1 菌体、培养条件对可溶性 GST-EPI 蛋白量的影响 我们发现 BL21(DE3), TG1 和 Origami B 3 种菌株在相同温度下 GST-EPI 的表达结果相近。IPTG 浓度在 0.1 ~ 1mmol/L 范围内, 摇床转速在 200 ~ 250r/min 范围内, 可溶性 EPI 蛋白量无可见的变化。图 2 显示了 BL21(DE3) 菌株, 37°C 诱导 2h ; TG1 菌株 28°C 诱导 3h 和 Origami B 菌株, 16°C 过夜诱导 3 个条件的 SDS-PAGE 的结果。光密度扫描结果的表明 37°C 表达条件下, 可溶性 GST-EPI 蛋白量太少无法估计, 28°C 表达条件下, 可溶性蛋白量占细菌总可溶性蛋白量的 3.35% ; 16°C 表达条件下, 可溶性蛋白量占细菌总可溶性蛋白量的 15.87%。

2.2.2 可溶性蛋白 GST-EPI 抗体结合活性的测定 : 由图 3 可以看出, 三种菌(BL21(DE3), TG1 和 Origami B) 在 16°C 时菌体裂解液上清的抗体结合活性为 28°C 的 5 倍和为 37°C 的 10 倍, 说明 16°C 时可溶性 GST-EPI 蛋白的表达量高于其他两种温度。同

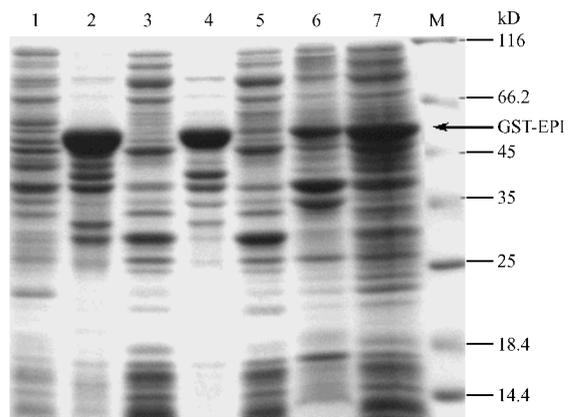


图 2 GST-EPI 不同表达条件下的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of GST-EPI under different conditions

1 : cell lysate before IPTG induction ; 2 : the pellet of BL21(DE3), lysate cultured at 37°C and induced with IPTG for 2h ; 3 : the supernatant of BL21(DE3), lysate cultured at 37°C and induced with IPTG for 2h ; 4 : the pellet of TG1 , lysate cultured at 28°C and induced with IPTG for 3h ; 5 : the supernatant of TG1 , lysate cultured at 28°C and induced with IPTG for 3h ; 6 : the pellet of Origami B , lysate cultured at 16°C and induced with IPTG overnight ; 7 : the supernatant of Origami B , lysate cultured at 16°C and induced with IPTG overnight.

时, 同在 16°C 条件下, Origami B 菌株的抗体结合活性略好于 BL21(DE3) 和 TG1 两种菌株。可能是由于 Origami B 菌株存在较好的辅助氧化重折叠的作用。

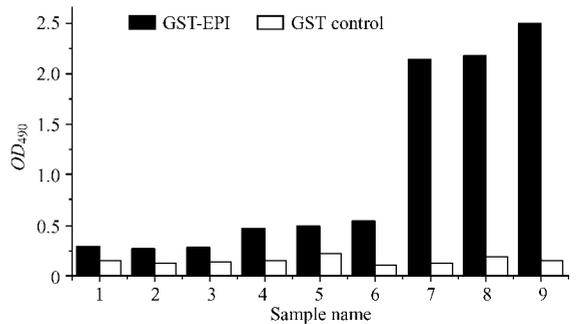


图 3 不同表达条件下 GST-EPI 蛋白的抗体结合活性的 ELISA 结果

Fig. 3 Relative activity by ELISA of GST-EPI in the lysates from different cultures

1 : BL21(DE3), 37°C, 2h ; 2 : TG-1 , 37°C, 2h ; 3 : Origami B , 37°C, 2h ; 4 : BL21(DE3), 28°C, 3h ; 5 : TG-1 , 28°C, 3h ; 6 : Origami B , 28°C, 3h ; 7 : BL21(DE3), 16°C, overnight ; 8 : TG-1 , 16°C, overnight ; 9 : Origami B , 16°C, overnight.

2.2.3 根据条件优化的结果确定最后大规模表达所采用的条件是 : 菌株采用 BL21 突变株 Origami B , LB 培养基, 0.1mmol/L IPTG, 200r/min, 16°C 诱导过夜 (16 ~ 20h)。在该表达条件下, 尽管仍有部分目的蛋白以包含体形式存在于沉淀中, 但上清中仍可纯化出 GST-EPI 蛋白 10 mg/ml 通过 Bradford 法测定。

每批次表达量略有不同) ,足以满足活性测定和蛋白质晶体生长的需求。

2.2.4 p185 蛋白 IV 区融合蛋白的表达 利用上述方法 构建并表达了 3 个含 p185 IV 区部分基因的克隆 EP531、EP587、EPIV ,其中克隆 EPIV 的基因序列是 EP531 与 EP587 之和(即 C531-S649) 。 EPIV 包含有美国上市的抗体药物 Herceptin 的完整表位 ,该表位为空间表位 ,而 EP531 和 EP587 两个克隆都只包括该表位的一部分。细菌裂解液上清的 SDS-PAGE 结果见图 4。

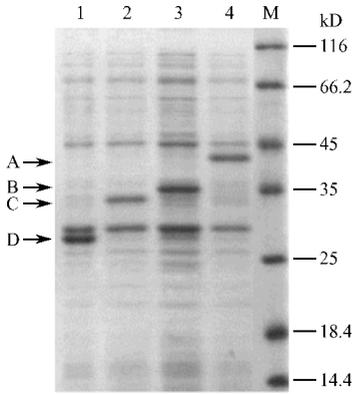


图 4 p185 蛋白胞外 IV 区 3 个克隆的 SDS-PAGE 结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of three clones of partial IV domain genes of p185 ECD

1 :the supernatant of GST control vector 2 :the supernatant of EP531 3 :the supernatant of EP587 4 :the supernatant of EPIV . The arrows indicate four products expressed by Origami B (Lane 1 ,D :GST ; Lane 2 ,C : EP531 ; Lane 3 ,B :EP587 ; Lane 4 ,A :EPIV) .

2.3 GST-EPI 融合蛋白的纯化

将处理后的菌体裂解液上清用 Glutathione-agarose 亲和柱纯化 ,SDS-PAGE 结果显示 :亲和柱一步纯化即可达 80% 以上的纯度。55kD 附近的即为

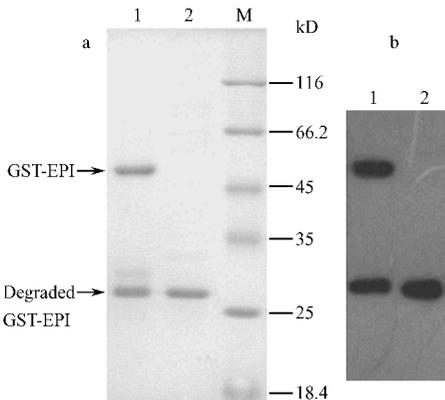


图 5 GST-EPI 蛋白经 Glutathione-agarose 纯化的 SDS-PAGE 结果 (a) 和 Western blot 分析 (b)

Fig.5 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of GST-EPI purified by Glutathione-agarose

1 :purified GST-EPI 2 :purified GST control

目的蛋白条带 ,在 28kD 处也有较为明显条带 ,见图 5 28kD 条带可能为降解条带或为转录提前终止的产物 ,可用分子筛的方法除掉。采用 Superdex G-75 分子筛初步纯化后电泳结果显示 :目的蛋白可达 95% 以上的纯度(图 6)。

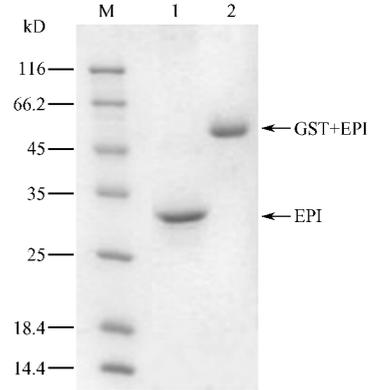


图 6 EPI 和 GST-EPI 蛋白经 Glutathione-agarose 亲和柱和 Superdex G-75 分子筛纯化产物的 SDS-PAGE 结果

Fig.6 SDS-PAGE analysis of EPI 和 GST-EPI purified through Glutathione-agarose and Superdex G-75 1&2 represent the purified EPI&GST-EPI respectively .

2.4 GST-EPI 直接 ELISA 和竞争 ELISA 的结果

直接 ELISA 结果表明 ,3 种菌株 16℃ 过夜表达的融合蛋白 GST-EPI 和本研究室抗 p185 的嵌合抗体 chA21 均有很强结合的活性 ,而阴性对照(相同条件下表达的 GST 蛋白)则没有阳性反应(图 3) 。竞争 ELISA 结果表明 :表达的融合有 GST 的蛋白 EPI 和 T6-17 细胞裂解液(含有全长的 p185 蛋白)有相同的抗体结合位点(图 7) 。其后又以纯化的全长 p185 蛋白重复了竞争 ELISA 实验 ,得到与 T6-17 细胞裂解液相同的结果(数据未显示)。

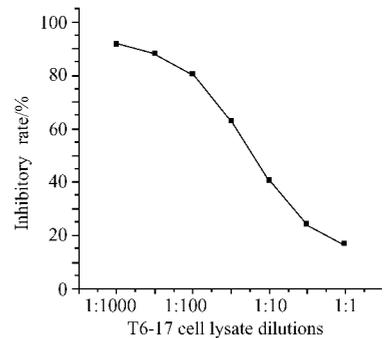


图 7 表达产物 GST-EPI 与 T6-17 裂解液的竞争 ELISA 的结果(其中 T6-17 裂解液含有天然状态下的 p185 蛋白)

Fig.7 The competitive ELISA results of the GST-EPI protein and lysate of T6-17 (lysate of T6-17 containing the natural p185)

另外 EP531、EP587、EPIV 细胞裂解液上清的直接 ELISA 检测的结果见表 1 ,可见除含有完整

Herceptin 结合表位的 EPIV 表达产物外,而其他两个表达产物与 Herceptin 均无明显阳性反应。进一步表明了该方法对富含二硫键的 p185 胞外 IV 区的表达也是可行而且有效的。

表 1 p185 蛋白胞外 IV 区 3 个克隆的 ELISA 结果

Table 1 The ELISA results of three clones of partial IV domain genes of p185 ECD

	EP531	EP587	EPIV	GST	Purified p185
Herceptin	-	-	+	-	+
Irrelative Mab	-	-	-	-	-

2.5 凝血酶对融合蛋白 GST-EPI 的消化以及消化后的 GST 蛋白的去除

裂解上清用 Glutathione-agarose 一步纯化后,洗脱液加入凝血酶作用过夜,发现 50kD 左右的 GST-EPI 融合蛋白条带消失,出现了另外两个主要条带:30kD 左右的是目的蛋白 EPI,26kD 的是切掉的 GST(图 8)。此电泳图显示,融合蛋白 GST-EPI 可以被凝血酶完全消化为 GST 蛋白和 EPI 蛋白。图中,凝血酶消化下的 GST 蛋白在 26kD 附近,比单独表达的 GST 蛋白(分子量 28kD)略小,这是因为单独表达的 GST 蛋白多出了 15 个氨基酸(即从多克隆位点至终止密码子的一段氨基酸序列)。如果把 GST-EPI 结合在 Glutathione-agarose 上与凝血酶室温作用过夜,然后再经透析和分子筛进一步纯化则可得到纯度高于 95% 的目的蛋白(见图 6)。

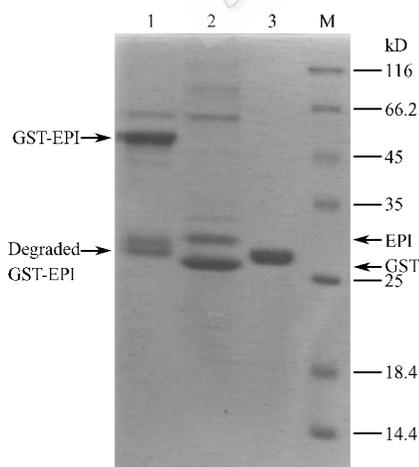


图 8 表达产物 GST-EPI 经凝血酶酶切的 SDS-PAGE 结果

Fig. 8 SDS-PAGE analysis after the cleavage of GST-EPI by Thrombin

1: GST-EPI protein purified by Glutathione-agarose; 2: the cleavage product by Thrombin; 3: GST protein control.

2.6 融合蛋白稳定性

融合蛋白稳定性较好,反复冻融和 25℃ 过夜放

置经 SDS-PAGE 检测后均无发现降解,且用 ELISA 检测发现其抗体结合活性亦无损失(数据未显示)。图 8 显示,凝血酶消化后,26kD 的 EPI 蛋白量与 30kD 的 GST 相比有明显减少,说明当 GST-EPI 蛋白在 GST 被切除之后,导致部分 EPI 蛋白不稳定而降解。将凝血酶消化前和消化后的蛋白溶液稀释相同倍数后铺板进行 ELISA 检测(图 9),发现 OD_{490nm} 吸光度从 2.0 下降到 1.2,说明凝血酶消化后,部分 EPI 蛋白由于降解或者结构不稳定而失活,导致抗体结合活性有一定程度下降。

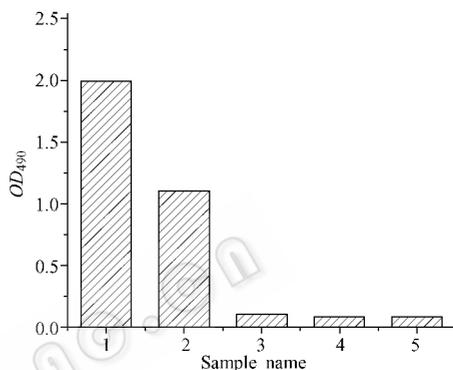


图 9 融合蛋白 GST-EPI 切除 GST 前后的 ELISA 结果

Fig. 9 The ELISA of GST-EPI and EPI obtained after GST-EPI cleavage by thrombin

1: GST-EPI; 2: EPI obtained after GST-EPI cleavage at 22℃ by thrombin for 16h; 3: GST; 4: thrombin(20U/mL); 5: negative control(BSA).

3 讨论

很多膜蛋白和分泌蛋白都具有复杂的空间结构和大量的二硫键,给这类蛋白的异源表达带来很大的挑战性。酵母表达系统对蛋白的加工能力较强,但目前常用的酵母表达系统对富含二硫键蛋白的加工能力也很差,且表达周期长,成本高。哺乳动物细胞系统在表达结构复杂、富含二硫键蛋白时的确具有很大优势,但由于表达量很低、成本高、纯化困难等原因使该系统的使用也受到限制。所以如果可能,原核表达系统仍为蛋白表达的首选。然而,常用的大肠杆菌表达体系中由于没有膜系统的存在,不能像真核生物那样在细胞器内造成还原性环境,所以难以形成正确的二硫键。有不少文献报道了利用 GST 融合表达蛋白^[11],但是仍然存在一些问题,如:可溶性差,表达量低。而关于 p185 胞外区的表达,迄今还没有在大肠杆菌系统中可溶性表达的报道。有人曾经纯化过 p185 蛋白的胞外区^[12],但是成本高,而且量很低:每毫克细胞裂解上清蛋白, p185 蛋白收获率为 1.129 × 10⁻⁵ mg,而且含有疏水区的膜蛋

白的纯化要达到较高的纯度存在一定的困难。

本文对用大肠杆菌系统表达富含二硫键的 p185 胞外区的条件进行了探索。结果表明,采用大肠杆菌菌株 Origami B(DE3) pLysS、GST 融合表达载体、低 IPTG 浓度、低诱导温度等条件对 p185 胞外 I - II、IV 区的表达最为有益,其中影响较大的是低温诱导和 GST 对融合蛋白的辅助折叠功能。GST 的存在对于稳定 EPI 蛋白的复杂结构较为有利,切除 GST 会在一定程度上造成其稳定性和抗原结合活性的下降,而低温诱导较为关键,即使不同的大肠杆菌菌株也可以得到相似量的可溶蛋白,此外,Origami B 在蛋白二硫键的正确形成上也起到了一定的作用^[13,14],该菌株在对于可溶性目的蛋白的活性上有一定的帮助。本文的工作将为以后表达类似蛋白质提供一种有益的借鉴。另外,值得注意的一点是分子量小的蛋白质用本文的方法可得到表达量更高的可溶蛋白,对于两个结构复杂程度相近的融合蛋白 EPI 和 EPIV 在相同条件下得到的可溶成分的量,分子量大的产率较低。

在 EGFR 家族中,四个家族成员在序列上具有很高的同源性,在结构上也具有很类似的结构,I - II 和 IV 区都是富含二硫键的结构域。有文献报道^[7],EGFR 家族成员相互磷酸化主要是依靠这两个结构域的相互作用。如果 EGFR 家族成员之间的相互作用被抑制,其胞内区的磷酸化作用就被抑制,从而使得 EGFR 家族蛋白失活达到抑制肿瘤生长的功效。因此表达 p185 蛋白的这两个富含二硫键的结构域对于研究 EGFR 家族成员之间的相互作用有一定的作用。本研究还表明嵌合抗体 chA21 的表位在 p185 蛋白胞外的 I - II 区。上述结果为进一步解开抗体 chA21 与 p185 相互作用区域的空间结构,研究 chA21 抑制肿瘤细胞生长机理,寻求更好的治疗 p185 过表达性肿瘤的途径打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hynes NE, Stern DF. The biology of *erbB-2/neu/HER-2* and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1198**: 165 - 184
- [2] Fehm T, Maimodis P, Weitz S *et al.* Influence of circulation *c-erbB-2* serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients, *Breast Cancer Research and Treatment*, 1997, **43**: 87 - 95
- [3] De Bono JS, Rowinsky EK. The *ErbB* receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, **8** (4 Suppl): S19 - 26
- [4] Isola JJ, Holli K, Oksa H *et al.* Elevated *erbB-2* oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer*, 1994, **73**: 652 - 658
- [5] Cheng LS, Liu AP, Yang JH *et al.* Construction, expression and characterization of the engineered antibody against tumor surface antigen, p185 *c-erbB-2*. *Cell Research*, 2003, **13**(1): 35 - 48
- [6] Kumagai T, Davis JG, Greene MI *et al.* The role of distinct p185 extracellular subdomains for dimerization with the epidermal growth factor receptor and EGF-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(10): 5526 - 5531
- [7] Yip YL, Novotny J, Edward M *et al.* Structural analysis of the *ErbB-2* receptor using monoclonal antibodies: implications for receptor signaling. *International Journal of Cancer*, 2003, **104**: 303 - 309
- [8] Cho HS, Mason Karen, Ramyar KX *et al.* Structure of the extracellular region of *Her2* alone and in complex with the *Herceptin* Fab. *Nature*, 2003, **421**: 756 - 760
- [9] Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF *et al.* Insights into *ErbB* signaling from the structure of the *ErbB2*-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 2004, **5**: 317 - 328
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Xu FL(徐发良), Gu CG(顾长国), Hu CX(胡承香) *et al.* Expression of human myeloid differentiation protein-2 in *E. coli*. *Journal Fourth Military Medicine University(第四军医大学学报)*, 2004, **25**(14): 1256 - 1259
- [12] Li XH(李中华), Qin HL(秦慧莲), He QZ(何球藻). Purification and identification of p185 *Her2/neu* tumor antigen by affinity chromatography technique. *Chinese Journal of Immunology(中国免疫学杂志)*, 2000, **15**: 381 - 383
- [13] Santala V, Lamminmaki U. Production of a biotinylated single-chain antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal Immunology Methods*, 2004, **284**(12): 165 - 175
- [14] Prenkumar L, Bageshwar UK, Gokhman I *et al.* An unusual halotolerant alpha-type carbonic anhydrase from the alga *Dunaliella salina* functionally expressed in *E. coli*. *Protein Expression Purification*, 2003, **28**(1): 151 - 157