

凝血靶向通用效应因子 tTF/SA 融合蛋白的表达及活性鉴定

Expression and Characterization of Fusion Protein tTF/SA as a Universal Effector for Targeting Blood Coagulation

王 臻¹, 颜江华^{2*}, 王阶平¹, 谢莲英¹, 吴 娜¹

WANG Zhen¹, YAN Jiang-Hua^{2*}, WANG Jie-Ping¹, XIE Lian-Ying¹ and WU Na¹

¹ 厦门大学生命科学学院 厦门 361005

² 厦门大学医学院抗癌研究中心 厦门 361005

¹ School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

² Cancer Research Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 制备凝血靶向通用效应因子 tTF/SA 融合蛋白,并鉴定其生物学活性。利用 PCR 技术构建 tTF 与链霉亲和素 SA 的融合基因,克隆至表达载体 pET22(+),在 *E. coli* BL21(DE₃) 中表达,镍亲和层析柱纯化 tTF/SA 融合蛋白。凝血实验和 FX 活化实验鉴定融合蛋白中 tTF 的活性,ELISA 鉴定融合蛋白中 SA 与生物素 Biotin 结合的活性。获得序列正确的 tTF/SA/pET22(+) 重组子,融合基因在 *E. coli* BL21(DE₃) 中高效表达。纯化后的融合蛋白具有活化 FX、引起血液凝固的能力,且能与生物素结合。融合基因已成功在 *E. coli* BL21(DE₃) 中表达,tTF/SA 融合蛋白具有 TF 和 SA 活性。融合蛋白 tTF/SA 可作为通用效应因子,与生物素化的肿瘤组织血管特异性载体联用,实现选择性诱发肿瘤组织血管栓塞的多点治疗。

关键词 截短组织因子,链霉亲和素,融合蛋白,血管栓塞

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0218-05

Abstract To prepare a novel fusion protein (tTF/SA) as a universal effector for targeting therapy of blood coagulation and to analyze its biological activities. The fusion gene tTF/SA was constructed by PCR, then inserted into expression vector pET22 b(+), and expressed in *E. coli* BL21(DE₃). The fusion protein was purified using Nickel-affinity chromatography column. The activities of tTF moiety of the fusion protein were analyzed by clotting assay and FX activation assay, and the binding activities of Streptavidin (SA) to Biotin (B) were analyzed using ELISA. Results: The recombinant plasmid tTF/SA/pET22 b(+) with the correct sequence was obtained. The fusion gene tTF/SA was expressed with high yield in *E. coli* BL21(DE₃). The purified fusion protein retain the abilities of activating FX, inducing blood coagulation, and binding Biotin. The fusion gene tTF/SA was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE₃). The recombinant tTF/SA proteins retain the activities of TF and SA. The multitarget therapy of selectively inducing thrombosis in tumor blood vessels can be achieved by the combination of tTF/SA, as a universal effector, and biotinlated carriers directing to tumor blood vessels.

Key words truncated Tissue Factor, Streptavidin, fusion protein, thrombosis

Received: August 8, 2006; Accepted: December 4, 2006.

This work was supported by a grant from Fujian Natural Science Fund (No. C0410004), Xiamen University Innovation Fund for Science & Technology (No. XDKJ/CX20053026).

* Corresponding author. Tel: +86-592-2186980, Fax: +86-592-2186731, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

福建省自然科学基金项目 (No. C0410004), 厦门大学科技创新项目 (No. XDKJ/CX20053026).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

组织因子(TF)是一种分子大小约为 47 kD 的跨膜糖蛋白^[1],分布于血管内皮外侧,是凝血因子Ⅶ(FⅦ)的细胞表面受体,又是 FⅦ或激活的因子Ⅶa(FⅦa)的辅因子。TF 是凝血级联反应的始发因子^[2]。研究证明仅含有 TF 胞外区的截短组织因子(tTF, truncated tissue factor),仍保留与 FⅦ或 FⅦa 结合并激活 FX 和 FIX 的活性,但 tTF 对 FX 的激活能力要比完整的 TF 低 5 个数量级^[3],缺少跨膜组分的 tTF 在体内不能有效诱发凝血反应。但当 tTF 在靶点快速富集时可以诱发凝血反应,tTF 是一个潜在的凝血效应因子。1997 年 Huang 等首先报道^[4]抗肿瘤血管标志物抗体和具有潜在凝血功能 tTF 的融合蛋白可以选择性地诱发动物肿瘤组织血管栓塞,肿瘤消退。利用 tTF 融合蛋白选择性诱发肿瘤血管栓塞的方法是一种新颖的抗肿瘤方法。由于肿瘤组织单一靶点数量的有限性及表达的异质性,单载体介导的肿瘤血管靶向治疗效果并不理想,多靶点联合治疗是克服这一缺点的有效策略。生物素(Biotin,B)可与链霉亲和素(Streptavidin,SA)高亲和性结合,这种具有放大作用的 B/SA 复合系统已广泛应用于诊断与治疗^[5]。为实现载体介导的多靶点肿瘤组织血管靶向治疗,我们设想利用基因工程技术构建 tTF 与 SA 的融合蛋白作为通用效应因子,与生物素化的肿瘤血管靶向载体联合应用,以实现多靶点联合治疗。本文报道一种可用于多点靶向治疗的通用效应物——tTF/SA 融合蛋白的构建及其活性检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 BL21(DE₃)由本室保藏,质粒 pET22(K+)购自 Novagen 公司,SA/pET22b(+)由本实验室构建并保藏,tTF/pSK(+)质粒由美国南加州大学 Epstein 教授惠赠。

1.1.2 工具酶及试剂 工具酶购自 NEB 公司,DNA 纯化试剂盒为 OMEGA 公司产品,DNA 序列分析由上海博亚公司完成。HRP 标记的 SA 购自上海生工公司,FⅦ和 FX 购自 Sigma。

1.1.3 引物 由上海生工合成。根据 SA cDNA 序列设计扩增 SA 的引物:P1(上游引物):GGCGGTGCTGGCTCTG 和 P2(下游引物):GTACTCGAGAGAGGCTGCAGA。根据 tTF cDNA 序列设计扩增 tTF 的引物:P3(上游引物):CATACCATGGCCTCTGGCACTACA 和 P4(下游引物):CACCAGAGCCACCACCGCC TTCTCTGAATTCCCC。P4 中下划线部分为 SA5'部分互补,波浪线部分为 tTF3'

部分互补。扩增 tTF/SA 的引物为:P3:CATA CCA TGGCCTCTGGCACTACA 和 P2:GTACTCGAGAGAGG CTGCAGA,分别引入内切酶位点 Nco I 和 Xho I。质粒 pET22b(+)的通用引物为 T7 启动子(5'-TAATACGACTCACTATA-3')和 T7 终止子(5'-GCT AGTTATTGCTC AGCGG-3')。

1.2 方法

1.2.1 融合基因 tTF/SA 的构建 以 SA 为模板,P1 和 P2 为引物,常规 PCR 扩增 SA 基因。以 tTF/pSK(+)为模板,P3 和 P4 为引物,常规 PCR 扩增 tTF 基因。在 PCR 反应体系中加入 tTF 基因产物和 SA 基因产物,退火融合得到 tTF/SA 模板(94℃预变性 4 min,94℃变性 30s,72℃退火延伸 1min,循环 5 次);再加入引物 P3、P2 扩增 tTF/SA 融合基因并在 5'和 3'端分别引入 Nco I 和 Xho I 内切酶位点(94℃变性 30s,56℃退火 30s,72℃延伸 45s,循环 30 次,72℃延伸 5min)。1%琼脂糖凝胶鉴定、DNA 胶纯化试剂盒回收纯化目的片段。

1.2.2 重组质粒的构建及转化 将纯化的 tTF/SA PCR 产物及载体 pET22(K+)分别用 Nco I 和 Xho I 进行双酶切,胶分离纯化回收,T4 DNA 连接酶于 16℃连接过夜,连接产物转化 E. coli BL21(DE₃),以氨苄青霉素抗性初筛,挑单克隆用 pET22 b(+)通用引物及 P3、P2 分别进行菌液 PCR 筛选,阳性克隆送上海博亚公司测序。

1.2.3 融合蛋白的表达及纯化 挑含正确重组质粒 tTF/SA/pET22(K+)的单菌落 37℃培养过夜,按 1:100 稀释至 2YT 中扩大培养后,通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度优化其表达条件。在扩大培养至 OD₆₀₀ 0.4~0.6 时加 IPTG 至终浓度 0.1mmol/L 诱导表达 6h。由于 pET22(K+)表达的 tTF/SA 融合蛋白 C 端带有 6×His 标签,故目的蛋白纯化方案参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的镍柱蛋白纯化操作手册。纯化后的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析鉴定,并采用 0.01mol/L PBS 透析复性。

1.2.4 融合蛋白 tTF 部分的活性鉴定 ①凝血实验 参照 Haubitz 等^[6]凝血实验方法并稍作修改,用 3.8%的柠檬酸钠处理新鲜小鼠血液,4000r/min 离心,留血浆。凝血板每孔加血浆 30μL,分别加系列浓度的结合了有生物素标记的靶向载体的 tTF/SA 和终浓度为 12.5mmol/L 的 CaCl₂,设只加 tTF/SA 和只加 CaCl₂的空白对照,室温下记录从加入 CaCl₂至血浆开始出现不流动的时间。

② FX 活化实验:Hische 等^[7]发现,tTF-FⅦa 复合物活化 FX 可以使 S222C 多肽对硝基苯胺复合

物)分解为多肽和对硝基苯胺,后者在405nm有吸收峰,测吸光度可间接反映tTF水平。所以用FX活化实验进一步鉴定融合蛋白tTF部分的活性及其水平。在Tris缓冲液中加入系列浓度的tTF/SA或BSA,加100nmol/LFVII,37℃温育10min,加FX至终浓度5nmol/L,室温温育10min,加入100mmol/L EDTA终止反应,加2nmol/L生色底物S2222,在3min之内用酶标仪测OD_{405nm}。

1.2.5 融合蛋白tTF/SA与Biotin结合竞争性ELISA实验:24孔板包被Biotin-BSA(20μg/mL,100μL/孔),4℃过夜,10%羊血清封闭,分别加入SA-HRP(200μg/mL)和倍比稀释的tTF/SA(5~0.313μmol/mL),阴性对照孔加入tTF/SA为0μmol/mL。37℃温育1h,显色底物显色后加1mol/L H₂SO₄终止反应,测定OD_{405nm}值。每步骤间用PBST洗5次,每次3min。

1.2.6 融合蛋白tTF/SA与生物素化载体(B-M7,B-(RGD)^[8]和B-hu3D3^[9])结合竞争性ELISA实验:24孔板包被生物素化载体(B-M7,B-(RGD)₃和B-hu3D3)(20μg/mL,100μL/孔),4℃过夜,10%羊血清封闭,分别加入SA-HRP(200μg/mL)和倍比稀释的tTF/SA(5~0.3125μmol/mL),阴性对照孔加入tTF/SA为0μmol/mL。37℃温育1h,显色底物显色后加1mol/L H₂SO₄终止反应,测定OD_{405nm}值。每步骤间用PBST洗5次,每次3min。

2 结果

2.1 PCR扩增tTF/SA

以质粒tTF/pSK(+)为模板PCR扩增获得大小为657bp的tTF,同时PCR扩增模板SA获得大小为429bp的SA,再将tTF与SA基因退火融合,得到tTF/SA模板,经PCR扩增获得tTF/SA产物,1%琼脂糖凝胶电泳分析,在1086bp处见单一条带,其大小与理论计算值相一致(图1)。

2.2 重组质粒的鉴定

氨苄青霉素抗性初筛,两次菌液PCR筛选后阳性克隆送上海博亚公司测序,结果经核苷酸序列和蛋白编码分析获得一正确重组质粒克隆。

2.3 融合基因tTF/SA在E. coli BL21(DE₃)中的表达

含有tTF/SA/pET22(+)的E. coli BL21(DE₃)扩大培养后,一系列诱导剂浓度诱导表达,发现终浓度达0.05 mmol/L以后再增加IPTG浓度不能明显增加目的蛋白表达量(图2)。0.05mmol/L IPTG于37℃诱导6h为最佳,更长时间不能明显增加目的蛋白量。12% SDS-PAGE分析显示在分子大小约43kD

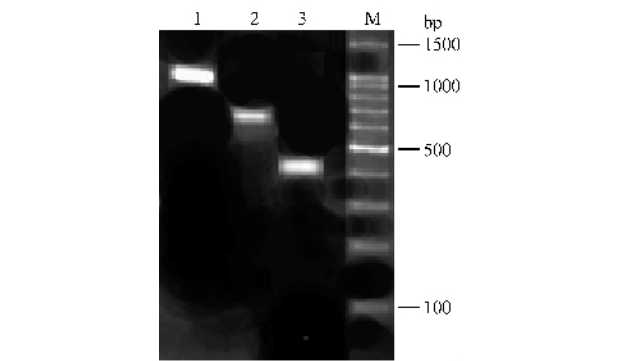


图1 tTF/SA PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis
1: PCR product of tTF/SA(1086bp); 2: PCR product of tTF(657bp); 3: PCR product of SA(429bp); M: DNA marker.

处有一特异条带(图3),与报道相一致,且目的蛋白主要以包涵体形式存在。

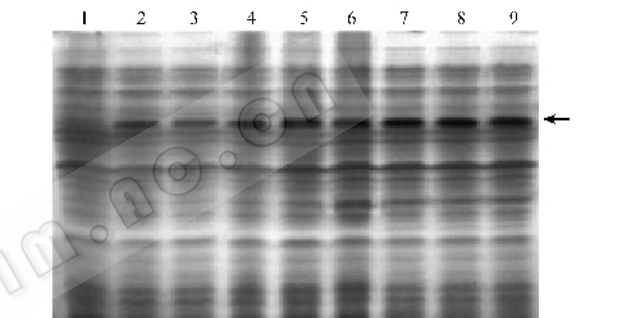


图2 IPTG浓度梯度条件下融合蛋白表达的SDS-PAGE分析
Fig. 2 Analysis of expression of fusion protein under IPTG induction of different concentrations by SDS-PAGE

1~9: fusion protein induced with IPTG 0 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.02 mmol/L, 0.03 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.06 mmol/L, 0.07 mmol/L, 0.09 mmol/L and 0.1 mmol/L, respectively.

2.4 tTF/SA活性鉴定

2.4.1 凝血实验:观测不同浓度tTF/SA对血浆凝固时间的影响,结果见表1。体系中仅加12.5 mmol/L Ca²⁺或6μmol/L tTF/SA时,30min内未见血浆凝固;在有Ca²⁺(12.5mmol/L)存在时,tTF/SA能有效的促进血浆凝固,且随tTF/SA浓度的增加凝血时间缩短,表明tTF/SA具有促凝活性。

Concentration		t/min
tTF/SA(μmol/L)	CaCl ₂ (mmol/L)	
0	0	> 30
0	12.5	> 30
0.75	12.5	> 30
1.5	12.5	15.5
3	12.5	11.6
6	12.5	11.5
6	0	> 30

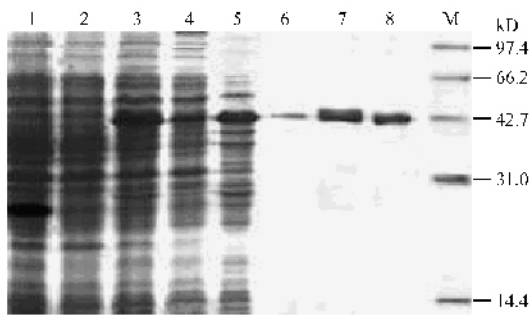


图 3 Ni 柱纯化重组 tTF/SA 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of purified tTF/SA through Nickel-affinity chromatography column by SDS-PAGE

1: blank vector; 2: cell extract without IPTG induction; 3: cell extract with IPTG induction; 4, 5: supernatant, and precipitate after ultrasonication, respectively; 6, 7, 8: purified protein; M: protein markers.

2.4.2 F χ 活化实验: 分别测 0.01 μ mol/L、0.1 μ mol/L、1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 融合蛋白和 BSA 在 F χ 活化反应后的 OD_{405nm}。结果表明融合蛋白在 1 μ mol/L 以上时能有效活化 F χ 而增强 405nm 处吸收峰, 而同浓度的 BSA 没反应(图 4)。

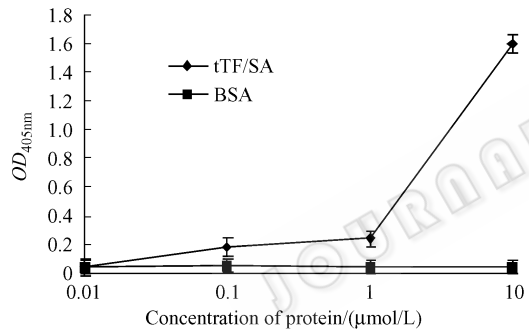


图 4 tTF/SA 对 F χ 活化作用

Fig. 4 F χ activation by tTF/SA

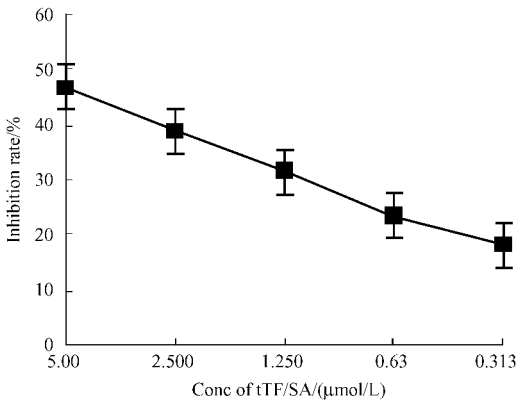


图 5 tTF/SA 对 SA-HRP 与 Biotin 结合的竞争抑制作用

Fig. 5 Competitive inhibition of tTF/SA on binding of SA-HRP to Biotin

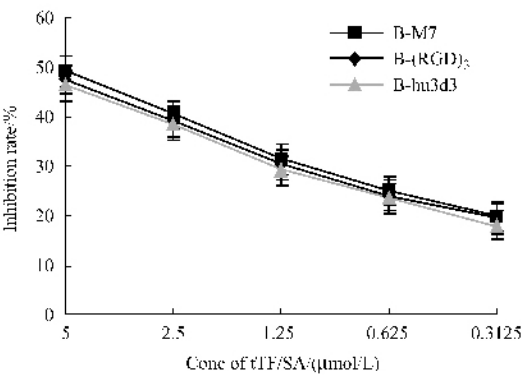


图 6 tTF/SA 对 SA-HRP 与 B-M7, B-(RGD)₃ 和 B-hu3D3 结合的竞争抑制作用

Fig. 6 Competitive inhibition of tTF/SA on binding of SA-HRP to B-M7, B-(RGD)₃, and B-hu3D3

2.4.3 tTF/SA 与 Biotin 结合竞争 ELISA 分析: 实验结果显示纯化后的 tTF/SA 融合蛋白可竞争性抑制 SA-HRP 与 Biotin 的结合, 阴性对照物抑制率为 0, 在 tTF/SA 为 5 μ mol/mL 时, 其抑制率为 46.83%(图 5)。实验结果表明通用效应因子能与 Biotin 结合。

2.4.4 tTF/SA 与生物素化载体(B-M7, B-(RGD)₃ 和 B-hu3D3)结合竞争 ELISA 分析: 实验结果显示纯化后的 tTF/SA 融合蛋白可竞争性抑制 SA-HRP 与生物素化载体(B-M7, B-(RGD)₃ 和 B-hu3D3)的结合, 阴性对照物抑制率为 0, 当 tTF/SA 为 5 μ mol/mL 时, 其抑制率分别为为 49.03%, 47.56% 和 46.38%(图 6)。实验结果证明 tTF/SA 具有通用性, 可与生物素化的不同载体结合。

3 讨论

单一载体与 tTF 融合蛋白只能结合单一的靶点, 各单一靶点在肿瘤组织内的分布存在着数量的限制及其表达时空的不均一性, 常常导致单一靶点靶向治疗疗效不佳甚至失效。联合靶向治疗是克服上述问题的一种有效的策略。利用 SA 与 Biotin 的结合特性, 以 tTF/SA 融合蛋白作为通用效应物, 通过与多种交联有 Biotin 的载体联用, 可以实现选择性诱发肿瘤组织血管栓塞的多点靶向治疗, 产生更好的抗肿瘤作用。本研究利用基因工程技术获得了 tTF/SA 融合蛋白, 并在体外证实 tTF/SA 融合蛋白中各组分的活性及其与多种生物素化载体结合的能力, 表明通用效应因子与多种生物素化载体联合应用实现多点靶向治疗的可行性。本工作为进一步开展体内选择性诱发肿瘤血管栓塞的多点靶向治疗奠定基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Spicer EK , Horton R , Bloem L , *et al.* Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor : Primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1987 , **84** :5148 – 5152.
- [2] Davie EW , Fujikawa K , Kisiel W. The coagulation cascade : initiation , maintenance , and regulation. *Biochemistry* , 1991 , **30** : 10363 – 10370.
- [3] Ruf W , Rehemtulla A , Morrissey JH , *et al.* Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* , 1991 , **266** :2158 – 2166.
- [4] Huang XM , Molema G , King S , *et al.* Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* , 1997 **275** :547 – 550.
- [5] Zhang XQ(张晓春). Advance in biotin-avidin technology. *Modern Preventive Medicine* , 2001 , **28** :485 – 486.
- [6] Haubitz M , Brunkhorst R. Influence of a novel rapamycin analogon SDZ RAD on endothelial tissue factor and adhesion molecule expression. *Transplant Proc* , 2002 , **34** :1124 – 1126.
- [7] Hische EA , Tutuarima JA , Helm HJ. Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* , 1981 , **27** :1427 – 1430.
- [8] Pasqualini R , Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* , 1996 , **380** :364 – 366.
- [9] Wang JR(王阶平) , Zhuang GH(庄国洪) , Yang GW(杨桂旺) , *et al.* Gene 's construction , expression and activity analysis of humanized single-domain antibody against human lung cancer. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*(细胞与分子免疫学杂志) , 2006 , **22** :193 – 195.