

三结构域重组 FN 多肽表达质粒的构建及其 表达产物性质的初步鉴定

李明才* 冯作化** 李 东 张桂梅

(同济医科大学医学分子生物学研究室 武汉 430030)

摘 要 为探讨三结构域重组纤连蛋白(FN)在肿瘤治疗中的作用,构建了两个三结构域重组 FN 表达质粒 pF94-62 和 pF94-82,它们分别编码两个重组多肽 CH62(FN 的 Pro 1239-Ser 1515 经 Met 和 Ala 1690-Val 2049 相连)和 CH82(从 CH62 中删除了 Hep II C 端和 Cell II 结构域 N 端的 Pro 1953-Glu 1978)。含表达质粒 pF94-82 的工程菌经 37℃ 培养,CH82 得到表达,表达产物主要以包涵体形式存在,经尿素变性与复性处理后,通过肝素-琼脂糖亲和层析纯化,纯化产物进行细胞粘附试验。CH62 在大肠杆菌中的表达效率很低(5%),而 CH82 的表达效率很高(21%),提示 FN 分子中 Cell II 结构域的 N 端顺序是影响三结构域重组多肽在大肠杆菌中表达的关键结构。纯化的 CH82 具有结合肝素和结合细胞的功能,且结合细胞的能力比双结构域 FN 更强。CH82 的制备为进一步研究具有更强的抑制肿瘤转移作用及免疫调节作用的基因工程制品奠定了基础。

关键词 纤连蛋白,重组多肽,肿瘤转移

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0474-04

纤连蛋白(Fibronectin, FN)含有 2 个能与细胞结合的结构域(Cell I, Cell II)和 3 个能与肝素结合的结构域(Hep I, Hep II, Hep III)。FN 的双功能结构域(Cell I-Hep II)重组多肽具有抑制肿瘤转移的功能^[1],能在肿瘤细胞侵入其它组织的几个关键步骤中起抑制作用^[2,3],有效地阻止肿瘤细胞转移到肺和肝脏^[3]。如果在 Cell I-Hep II 双功能结构域重组多肽的 C 端再加上 FN 的 Cell II 结构域中的 CS1 片段,则重组多肽的功能更强^[2],但该多肽在大肠杆菌中的表达效率却很低^[1]。本文通过删除 CS1 序列 N 端 26 个氨基酸(Pro1953-Glu1978),构建的 Cell I-Hep II-CS1 三结构域重组多肽在大肠杆菌中具有较高的表达效率,并对其表达产物作了功能鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒与重组多肽

大肠杆菌 DH5 α , BL21(DE3)和质粒 pF207, pF94-50 均为本室保存,重组多肽 CH50 为本室表达纯化。其中 pF207 含有 FN cDNA 的 Sac I-EcoRI 片段(3078bp),编码人纤连蛋白的 Ser 1199-Phe

2224, pF94-50 是 Cell I-Hep II 重组多肽的表达质粒^[4],在大肠杆菌中表达 FN 的 Cell I-Hep II 双结构域多肽(CH50)。

1.2 细胞

黑色素瘤细胞 B16/F1 购自美国 ATCC 公司。

1.3 工具酶、DNA 与蛋白质分子量标准

T4DNA 连接酶、限制酶、DNA 与蛋白质分子量标准均购自华美生物工程公司。

1.4 PCR 引物

根据人纤连蛋白 Hep II-Cell II 结构域两端 DNA 序列设计了两对引物(复旦大学遗传所合成):

F3 5'-CCCAGTCCATGGCTATTCTCGCAC-3';

F5 5'-GAGAGAGAGAAGCTTGTTCATTCCGGCGGT-3';

F7 5'-CCTTCCAATCAAGATCTCGCTCTTC-3'。

1.5 DNA 片段的扩增与重组

按文献[5]进行。PCR 扩增 Hep II-Cell II 结构域的 cDNA 片段经 Sac I 和 Hind III 酶切后与相同酶切的 pF94-50 质粒重组构建质粒 pF94-62(表达的多肽为 CH62);将 PCR 扩增 Hep II 结构域的 cDNA 酶切分离得到的 Sac I-Bgl II 片段, pF94-62 的 Bgl II-Hind III 片段,与 Sac I 和 Hind III 酶切的

收稿日期:1999-10-25,修回日期:2000-04-28。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370783)。

* 现工作单位:武汉市卫生防疫站,武汉 430022。

** 通讯联系人。

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

pF94-50 质粒的大片段进行三片段连接构建成质粒 pF94-82 表达的多肽为 CH82)

1.6 工程菌的制备和诱导表达

按文献 1 的方法进行诱导表达。

1.7 重组多肽的纯化和细胞粘附试验

工程菌诱导表达后采用超声波破菌 ,按文献 4] 进行纯化。细胞粘附试验也按文献 4]方法进行。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建

F3 是扩增 Hep II 结构域时所用的 5' 引物 ;F5 为 3' 引物 ,其中将 FN 的 Gly2049 的密码子 GGA 改成 TGA ,使肽链合成终止在 Val2049 ,在 TGA 之后加入了 Hind III 位点 ,便于重组构建。表达质粒 pF94-62 的构建过程如图 1 所示。将 PCR 产物的 Sac I 和 Hind III 酶切片段 (编码 Hep II 结构域的后半部分和 Cell II 结构域) 插入表达质粒 pF94-50 的 Sac I 和 Hind III 位点 ,即在 FN 的 Cell I 和 Hep II 结构域之后增加了 Cell II 结构域。

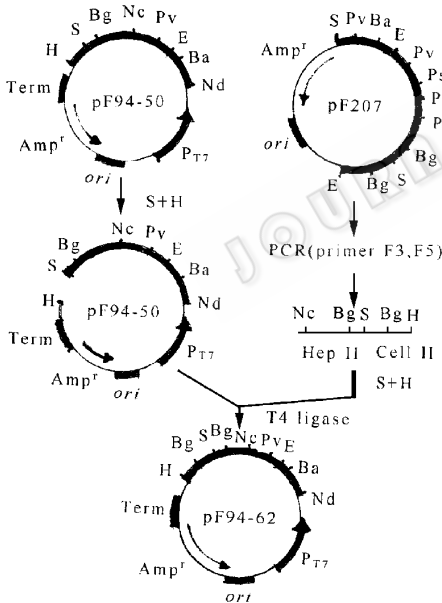


图 1 重组质粒 pF94-62 的构建示意图
Fig.1 Scheme for the construction of recombinant plasmid pF94-62

S : Sac I ; Ba : Bam HI ; E : Eco R I ; Ps : Pst I ; Bg : Bgl II ;
H : Hind III ; Nd : Nde I ; Nc : Nco I ; Pv : Pvu II ;
P₁₇ : T7 promoter ; Term : transcription terminator

引物 F7 是扩增 Hep II 结构域的 3' 引物 ,通过 在引物中将 Glu1952 的密码子之后 CCC 改成 ATCT 而引入 Bgl II 位点 ,以引物 F3 和 F7 扩增出 Hep II 结构域的 cDNA ,其 274bp 的 Sac I-Bgl II 小

片段与 pF94-62 中分离的 212 bp Bgl II-Hind III 片段通过 Bgl II 位点连接 ,即可将 Glu1952 和 Ile1979 直接连接在一起 ,从而删除了 Pro 1953-Glu1978 这一序列 ,它包括 Hep II 结构域 C 端的 8 个氨基酸和 Cell II 结构域 N 端的 18 个氨基酸。表达质粒 pF94-82 的构建过程如图 2 所示。pF94-62 和 pF94-82 质粒 PCR 产物的酶切鉴定结果如图 3

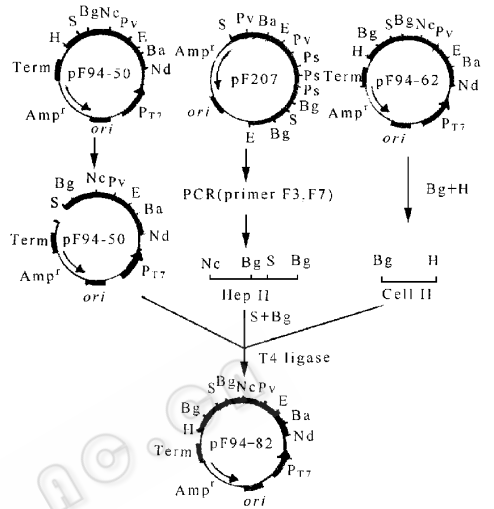


图 2 重组质粒 pF94-82 的构建示意图
Fig.2 Scheme for the construction of recombinant plasmid pF94-82

S : Sac I ; Ba : Bam HI ; E : Eco R I ; Ps : Pst I ; Bg : Bgl II ;
H : Hind III ; Nd : Nde I ; Nc : Nco I ; Pv : Pvu II ;
P₁₇ : T7 promoter ; Term : transcription terminator

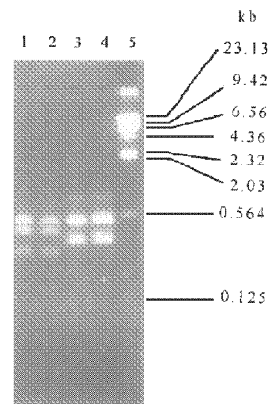


图 3 重组质粒 PCR 产物的 Bgl II 酶切图谱

Fig.3 Profile of restriction enzyme Bgl II digestion of PCR products of recombinant plasmids by agarose electrophoresis

- 1 : PCR product from pF207 with primers F3 and F5
- 2 : PCR product from pF94-62 with primers F3 and F5
- 3 : PCR product from pF207 with primers F3 and F7
- 4 : PCR product from pF94-82 with primers F3 and F7

所示(pF207 为对照质粒)。重组质粒 PCR 产物的酶切片段与对照质粒的结果、理论值相符。

2.2 工程菌的诱导表达

含质粒 pF94-82 的工程菌经诱导后,SDS-PAGE 电泳结果表明有明显特异表达产物带(图 4),扫描分析表明占菌体总蛋白 21% 以上,而携带 pF94-62 质粒的工程菌的总蛋白中只有一条难以分辨的微弱表达条带,表达效率为 5%。CH82 的分子量理论值为 67.1kD,电泳结果与理论值相符。

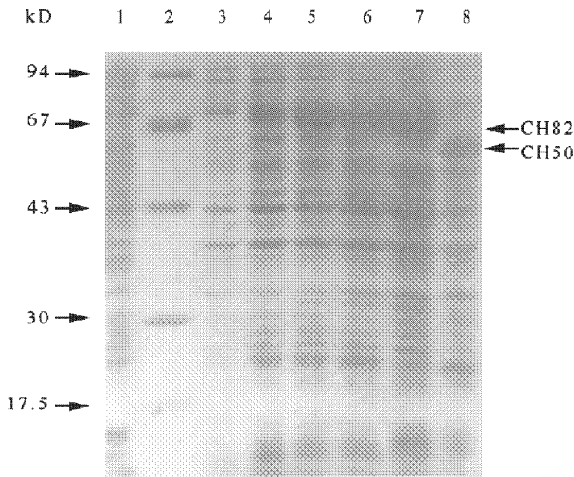


图 4 *E. coli* 中表达的重组 FN 多肽 SDS-PAGE 分析
Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant fibronectin polypeptides expressed in *E. coli*

1. The whole-cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) as a control;
2. Molecular weight markers;
3. The whole-cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) carrying pF94-62;
- 4, 5, 6, 7. The whole-cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) carrying pF94-82; induced for 1.5h, 3h, 6h, 20h respectively;
8. The whole-cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) carrying pF94-50

2.3 CH82 的纯化及其结合肝素的作用

从图 5 可见,含质粒 pF94-82 的工程菌经 37°C 诱导表达后制成的包涵体,溶解复性后得到的半纯品(CH82)再通过肝素-琼脂糖亲和层析柱,经 100mmol/L NaCl/PB pH7.0 充分洗柱后(可完全洗去非特异性粘附蛋白^[1]),再用 300mmol/L NaCl/PB pH7.0 进行洗脱,可得到纯度较高的 CH82。亲和层析的结果也证明 CH82 具有结合肝素的能力。

2.4 CH82 结合细胞的作用

采用黑色素瘤细胞检测 CH82 和 CH50 多肽结合细胞的作用,结果如图 6。两种多肽结合细胞的能力均呈浓度依赖关系。以 ED50(当结构的细胞达到最大结合量的一半时的 FN 多肽的浓度^[1])表示多肽的结合能力,CH82 约为 1 nmol/L,而 CH50

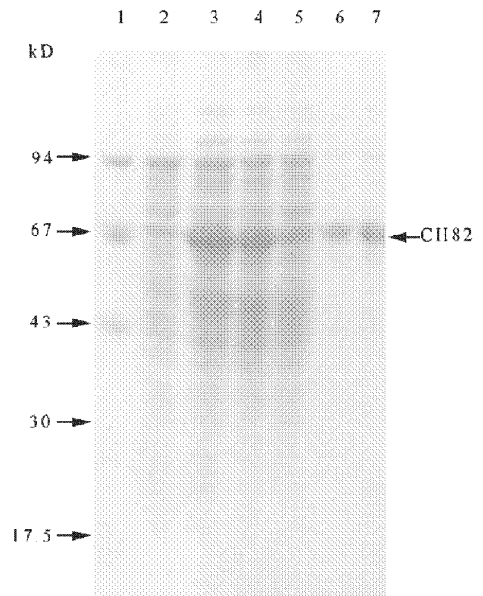


图 5 *E. coli* 中表达的 CH82 及其产物的 SDS-PAGE 分析
Fig.5 SDS-PAGE analysis of CH82 polypeptide expressed in *E. coli* and the purified product

1. Molecular weight markers
2. Bacteria lysate before induction
3. Bacteria lysate after induction
4. Pellet of expression bacteria lysate
5. Supernatant of expression bacteria lysate
6. The purified CH82 by Heparin-agarose chromatography
7. Inclusion bodies after denaturation and renaturation

为 8 nmol/L,CH82 结合黑色素瘤细胞的能力比 CH50 约高 8 倍左右。这些结果从功能上进一步证明,由上述途径得到的产物确为 CH82。

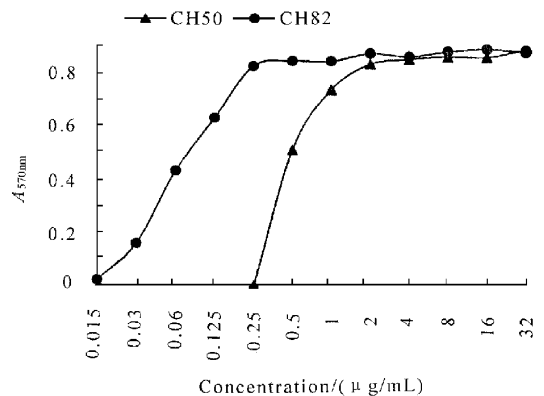


图 6 CH82 和 CH50 多肽粘附黑色素瘤 B16 细胞的比较
Fig.6 Attachment of B16 melanoma cells on the substrate coated with recombinant FN fragments CH82 and CH50

3 讨 论

恶性肿瘤在体内的转移是目前肿瘤治疗中面临的
的最大难点之一,至今仍缺乏有效的防治手段。双

功能结构域(Cel II-Hep II)重组 FN 多肽在肿瘤治疗中具有很大的应用潜力,因为它能够抑制肿瘤转移过程中的多个环节:抑制瘤细胞与血管内皮结合^[3],抑制瘤细胞穿过基质^[3],抑制瘤细胞与基底膜上的层粘连素(Laminin)结合^[2],而这正是肿瘤细胞侵入其它组织的最重要的三个步骤。将 Cell I-Hep II 双结构域重组 FN 多肽的 C 端连接上 CS1 片段所形成的三结构域重组多肽,结合肿瘤细胞的能力比双结构域多肽强,但其在大肠杆菌中的表达效率(4%~6%)远远低于双结构域重组 FN 多肽(15%~20%)^[1],不能大量制备。表达效率降低的原因显然是因为增加了 CS1 片段。当 CS1 片段直接重组于 Cell I 的 C 端而制备的 Cell I-CS1 重组体,在大肠杆菌中的表达效率也非常低(1%~2%)^[1]。其原因是 CS1 片段导致重组多肽的稳定性降低^[1]。

本文最初构建的三结构域重组多肽(CH62)表达效率很低。而在保留 CS1 片段中细胞结合位点 LDV 的前提下,通过 DNA 重组删除 CS1 的 N 端序

列构建的重组多肽(CH82)在大肠杆菌中的表达效率大大提高,达到了双结构域重组多肽的表达水平(21%)。证明 CS1 片段 N 端的 Pro1953-Glu1978 是影响表达效率的关键结构。删除 CS1 片段中 N 端序列可导致 CS1 片段的构象改变使得它与 Cell I-Hep II 重组成的三结构域多肽稳定性增强,从而提高了表达效率。

CH82 没有删除 Hep II 结构域的任何活性位点,并保留了 CS1 片段的 LDV 三肽结构,因而有两个结合细胞的结构域(Cell I, Cell II),因此不降低结合肝素的能力,可通过肝素-琼脂糖亲和层析得到纯品,而结合黑色素瘤细胞的能力大大高于 Cell I-Hep II 双结构域重组多肽。这与 Kimizuka 等人在 Cell I-Hep II 的 C 端增加 CS1 片段的效果一样^[1],但 CH82 的表达效率(21%)提高了。CH82 多肽含有两个结合细胞的功能结构域,深入研究比较其在肿瘤治疗中与双结构域重组多肽的差别,将会进一步揭示重组 FN 的结构与功能。

参 考 文 献

- [1] Kimizuka F, Taguchi Y, Ohaate Y *et al.* *J Biochem*, 1991, **110**:284
- [2] Saiki I, Makbe T, Yoneda J *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 1991, **82**:1112
- [3] Yoneda J, Saiki I, Kobayashi H *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 1994, **85**:723
- [4] Feng Z H, Zhang G M, Li D *et al.* *J Tongji Med Univ*, 1996, **16**:70
- [5] Sambrook J, Fritch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning a laboratory manu.* 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Construction of Expression Plasmids Harboring Genes Encoding Recombinant FN Polypeptides with Triple-domain and Preliminary Characterization of the Products Expressed in *Escherichia coli*

LI Ming-Cai FENG Zuo-Hua LI Dong ZANG Gui-Mei

(Department of Medical Molecular Biology, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

Abstract To investigate the important role of recombinant triple-domain FN polypeptide in tumor therapy, two expression plasmids pF94-62 and pF94-82 were constructed and used to express triple-domain polypeptides of human FN in *E. coli*. The expressed polypeptides were CH62 (Pro 1239-Ser 1515 of FN linked with Ala 1690-Val 2049 through Met) and CH82 (CH62 without Pro 1953-Glu 1978). CH82 polypeptide was expressed as inclusion bodies in *E. coli* cultured at 37°C. After denaturation with 8mol/L urea and renaturation, the polypeptides were purified by the affinity chromatograph with Heparin-agarose and the purified product was analysed by cell adhesion assay. The expression level of CH62 in *E. coli* was very low(5%), but that of CH82 was very high(21%); it suggested that N terminal sequence of Cell II in FN was the key sequence which influence the expression of triple-domain polypeptide in *E. coli*. The purified product was capable of binding heparin and cells and it had a better binding activity than bifunctional-domain FN polypeptides. The production of CH82 polypeptide provided a fundamental basis for further study of recombinant product with better function of antimetastasis and immune regulation.

Key words Fibronectin, recombinant polypeptide, metastasis © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>