

一种新型融合蛋白(RGD) β /tTF 的基因表达与活性分析 Gene Expression and Activities Analysis of a New Fusion Protein (RGD) β /tTF

颜江华* 杨桂旺 王阶平 吴 娜 庄国洪

YAN Jiang-Hua*, YANG Gui-Wang, WANG Jie-Ping, WU Na and ZHUANG Guo-Hong

厦门大学医学院抗癌研究中心 厦门 361005

Cancer Research Center of Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 为了发展一种新型的融合蛋白(RGD) β /tTF 用于肿瘤血管的选择性栓塞治疗,利用 PCR 技术重组(RGD) β /tTF 融合基因,克隆于 pET22 k(+) 载体,表达于 *E. coli* BL21(DE₃)。用镍柱纯化融合蛋白。凝血实验与 FX 活化实验检测融合蛋白 tTF 组分的活性。间接 ELISA 分析(RGD) β /tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 的特异结合能力。pET22 k(+) (RGD) β /tTF 重组质粒成功获得并表达于 *E. coli* BL21(DE₃)。纯化蛋白(RGD) β /tTF 能有效诱发血液凝固,活化 FX。(RGD) β /tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 的特异结合能力比 RGD/tTF 提高了 32%。新型融合蛋白(RGD) β /tTF 已在 *E. coli* 系统成功表达,表达蛋白保持 tTF 的活性并显示比 RGD/tTF 更高的与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合能力。

关键词 tTF, RGD, 融合蛋白, 凝血

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0409-04

Abstract To develop a new fusion protein(RGD) β /tTF for the therapy of the selective thrombosis of tumor blood vessels. The fused gene (RGD) β /tTF was reconstructed by PCR, was cloned into vector pET22 k(+), and expressed in *E. coli* BL21 (DE₃). The fusion protein was purified through Nickel-affinity chromatography column. The tTF activity of the fusion protein was detected by clotting assay and FX activation assay. The specific binding of (RGD) β /tTF to $\alpha_v\beta_3$ was analyzed by indirect ELISA. The recombinant plasmid pET22 k(+) (RGD) β /tTF was obtained and expressed in *E. coli* BL21(DE₃). The purified fusion protein could induce blood coagulation, activate FX. The ability of (RGD) β /tTF binding specifically to $\alpha_v\beta_3$ was increased by 32%, compared with RGD/tTF. A new fusion protein (RGD) β /tTF was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE₃). The expressed proteins retained tTF activity and showed a higher binding to $\alpha_v\beta_3$ than that of RGD/tTF.

Key words tTF, RGD, fusion protein, coagulation

整合素 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ 等参与血管内皮细胞的迁移和血管生成,在静息血管内皮细胞不表达或少量表达,在肿瘤血管内皮细胞则高度表达,可作为肿瘤血管

内皮细胞特异性标志物和药物靶向治疗的靶点。含有 RGD(Arg-Gly-Asp)序列的多肽可以特异性识别并结合增殖内皮细胞的 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ 。RGD-4C 是 Ruoslahti

Received: October 16, 2006; Accepted: November 27, 2006.

This work was supported by the grants from the Fujian Natural Fund (No. C0410004), and the Xiamen University Innovation Fund for Science and Technology (No. XDKJCX20053026).

* 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(No. C0410004)和厦门大学科技创新基金资助(No. XDKJCX20053026) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

等^[1]用噬菌体表面展示肽库技术成功地筛选出的对 $\alpha_v\beta_3$ 有高亲和力的配体。并已作为化学药物的载体成功用于肿瘤血管的靶向治疗^[2]。截短组织因子(truncated Tissue Factor, tTF)是外源性凝血通路的促发因子,已被作为效应因子用于诱发肿瘤血管栓塞^[3]。为发展新型的选择性栓塞肿瘤血管的药物,我们利用基因工程技术构建表达了载体 RGD-4C 与效应因子 tTF 的融合蛋白^[4],发现 RGD/tTF 融合蛋白可以选择性诱发肿瘤血管栓塞,但由于单一配体 RGD 与受体($\alpha_v\beta_3$)的亲合力相对较低,其融合蛋白的抗肿瘤效果并不理想。为了改善 RGD/tTF 融合蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 亲合力,我们设计合成 3 个串联 RGD 与 tTF 的融合基因(RGD)₃/tTF,成功表达于大肠杆菌,并对其表达产物活性做初步分析。

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 b(+)购自 Novagen 公司、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。鼠抗 6×His mAb 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自上海生工公司, S2222 为上海申海生化科技公司生产, $\alpha_v\beta_3$ 、FVII 和 FX 购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物 由上海生工合成。根据 tTF cDNA 序列设计扩增 tTF 的引物, P1(上游引物): TCTGGCACTACAAATACTGTGGC 和 P2(下游引物): TTCTCTGAATTCCCTTTCTCC。根据文献^[1]设计含有 3 个 RGD-4C(CDCRGDCFCGGGS)的寡核苷酸 P3: CATAACCATGGGC(TGCGATTGTCCGGAGATTGCTTCTGCGGTGGAGCGGGTCT)TCTGGCACTACAAATAC(其中划线部分为含 RGD-4C 序列,波浪线部分为 tTF 5'端序列)。利用引物: P4: CATAACCATGGGCTGCCATTGTC 和 P5: CTACCTCGAGTTCTCTGAATTCCCCTTTCTCC 在融合基因两端分别引入内切酶位点 Nco I 和 Xho I。

1.2 方法

1.2.1 融合基因(RGD)₃/tTF 的构建 以 tTF/pSK(+)为模板, P1 和 P2 为引物, 常规 PCR 扩增 tTF 基因。在 PCR 反应体系中加入 tTF 基因产物和引物 P3(含(RGD-4C)₃), 退火融合得到(RGD)₃/tTF 模板

(94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 72℃ 退火延伸 1min 循环 5 次); 再加入引物 P4、P5 扩增(RGD)₃/tTF 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, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 50s, 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(RGD)₃/tTF PCR 产物及载体 pET22 b(+)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), 氨苄青霉素选择性培养板初筛, 挑单菌落用 pET22 b(+)克隆基因测序引物及 P4、P5 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(RGD)₃/tTF/pET22 b(+)的单菌落 37℃ 培养过夜, 按 1:100 稀释至 LB 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。以最佳培养条件扩大培养。由于 pET22b(+)表达的(RGD)₃/tTF 融合蛋白 C 端带有 6×His 标签, 目的蛋白纯化方法参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的镍柱蛋白纯化操作手册进行。纯化蛋白用 12% SDS-PAGE 分析, 并用干性蛋白转移电泳将纯化蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 加鼠抗 6×His 抗体 37℃ 温育 1h, 再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37℃ 温育 30min, DAB 显色 10min, 数码相机拍照记录结果。纯化蛋白用 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^[5]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 30 μ L 分别加系列浓度的(RGD)₃/tTF 和终浓度为 12.5mmol/L 的 CaCl₂, 并设 RGD/tTF、(RGD)₃/tTF 和 CaCl₂ 的对照组, 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——比色法^[6] tTF-FVIIa 复合物活化 FX 可以使 S2222(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 OD_{405nm} 可以间接反映 TF 活性水平。在 Tris 缓冲液中加系列浓度的(RGD)₃/tTF 或 BSA, 加 100nmol/L FVII, 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

1.2.5 (RGD) β /tTF与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合实验 :RGD/tTF融合蛋白C末端带6 \times His标签,参照Kessler等^[7]方法用间接ELISA分析RGD/tTF与 $\alpha_v\beta_3$ 相结合的特异性。96孔板包被 $\alpha_v\beta_3$ (5 μ g/mL,50 μ L/孔)4 $^{\circ}$ C过夜,1%BSA封闭(200 μ L/孔),分别加入倍比稀释的RGD/tTF(0.75~6 μ mol/L)相应浓度的tTF/His做对照,于4 $^{\circ}$ C过夜。加入鼠抗6 \times His mAb,37 $^{\circ}$ C温育1h,再加入HRP标记的羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}$ C温育30min,TMB显色10min,加2mol/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 (RGD) β /tTF的PCR组装

以质粒tTF/pSK(+)为模板PCR扩增获得大小为657bp的tTF,再与含RGD-4C的引物P3退火融合,得到RGD/tTF模板,经PCR扩增获得RGD/tTF产物,1%琼脂糖凝胶电泳分析,约在800bp处见单一条带,其大小与理论计算值(795bp)一致(见图1)。

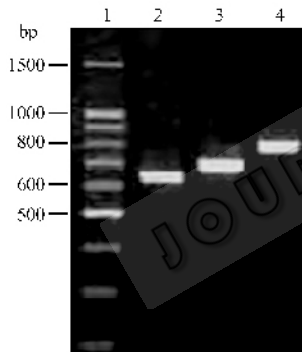


图1 (RGD) β -tTF PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

1 : DNA marker ; 2 : PCR product of tTF ; 3 : PCR product of RGD-tTF ; 4 : PCR product of (RGD) β -tTF.

2.2 重组质粒的鉴定

经氨苄青霉素抗性初筛,PCR筛选阳性克隆送上海博亚公司测序,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(RGD) β /tTF在*E. coli* BL21(DE₃)中的表达

含有融合基因(RGD) β /tTF的DE₃重组子经系列浓度IPTG诱导表达,发现IPTG终浓度达0.1mmol/L时,目的蛋白表达量已达最大;再增加IPTG浓度,目的蛋白表达量增加不明显(见图2)。以0.2mmol/L IPTG探测最佳诱导时间,发现于37 $^{\circ}$ C诱导6h为最佳,延长时间表达量未见明显增加(见

图3)。目的蛋白主要以包涵体形式表达,经镍柱纯化,12% SDS-PAGE电泳,见单一蛋白纯化条带约位于34kD处(见图4),用抗6 \times His抗体证实该纯化蛋白带为融合蛋白。纯化蛋白经0.01mol/L PBS透析复性,回收率约为70%。

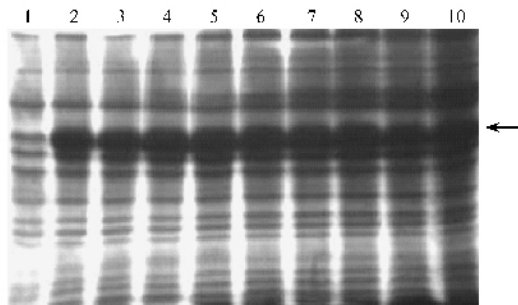


图2 不同诱导时间条件下融合蛋白表达的SDS-PAGE分析

Fig.2 Analysis of expression of fusion protein induced with 0.2mmol/L IPTG of different times by SDS-PAGE

1~10 : expression of fusion protein induced with 0.1mmol/L IPTG for 0h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, and 10h, respectively.

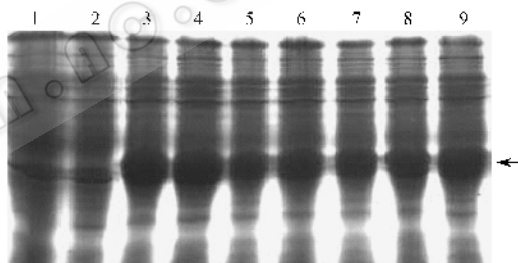


图3 IPTG浓度梯度条件下融合蛋白表达的SDS-PAGE分析

Fig.3 Analysis of expression of fusion protein induced with IPTG of different concentrations by SDS-PAGE

1~9 : expression of fusion protein induced with IPTG 0 mmol/L, 0.05mmol/L, 0.1mmol/L, 0.2mmol/L, 0.3mmol/L, 0.4mmol/L, 0.5mmol/L, 0.6mmol/L, and 0.7mmol/L ; respectively.

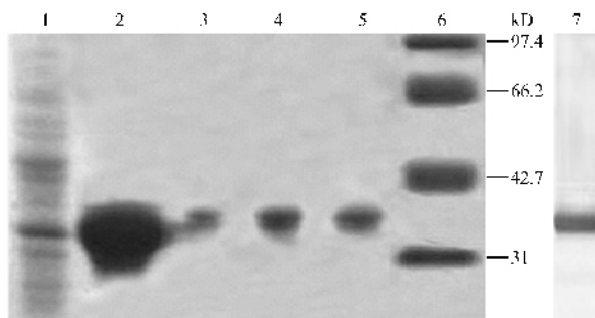


图4 重组(RGD) β -tTF的Ni柱纯化产物SDS-PAGE分析

Fig.4 Analysis of the products of purification through Nickel-affinity chromatography column by SDS-PAGE

1 : total soluble protein ; 2 : total insoluble protein ; 3~5 : sample washed from the column with elute buffer ; 6 : protein marker ; 7 : purified proteins stained with Western blotting.

2.4 (RGD) β /tTF 活性鉴定

2.4.1 凝血实验:柠檬酸钠抗凝血浆在单独加 12.5mmol/L Ca^{2+} 或 6 $\mu\text{mol/L}$ tTF 融合蛋白时,抗凝血浆 30min 内不凝(见表 1);在 Ca^{2+} 存在时,tTF 融合蛋白能有效促进血浆凝固,且随 tTF 融合蛋白浓度的增加,凝血时间相应缩短,同摩尔浓度(RGD) β /tTF 促血凝活性与 RGD/tTF 相似。

表 1 tTF 融合蛋白的凝血作用

Table 1 Clotting of tTF fusion proteins

Concentration		t/min	
tTF fusion protein ($\mu\text{mol/L}$)	CaCl_2 (mmol/L)	(RGD) β /tTF	RGD/tTF
0	0	> 30	> 30
0	12.5	> 30	> 30
0.75	12.5	> 30	> 30
1.5	12.5	14.8 \pm 1.8	15.4 \pm 2.0
3	12.5	12.6 \pm 2.3	12.3 \pm 2.2
6	12.5	11.5 \pm 2.5	11.3 \pm 2.3
6	0	> 30	> 30

2.4.2 F χ 活化实验:分别测 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ tTF 融合蛋白和 BSA 在 F χ 活化反应后的 $OD_{405\text{nm}}$ 。结果(见图 5)显示 (RGD) β /tTF 融合蛋白在 1 $\mu\text{mol/L}$ 以上时能有效活化 F χ ,并增强 405nm 处吸收峰,其量效关系与 RGD/tTF 相似,而同浓度的 BSA 则没有反应。

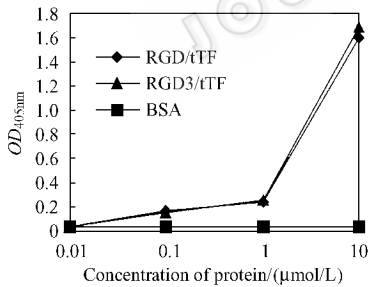


图 5 tTF 融合蛋白对 F χ 的活化作用

Fig.5 Activation of tTF fusion protein on F χ

2.4.3 (RGD) β /tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合分析:间接 ELISA 检测 RGD/tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 相结合的特异性。实验结果(见图 6)表明(RGD) β /tTF 和 RGD/tTF 均可与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合,其结合程度与剂量相关并呈饱和现象,同摩尔浓度 RGD β /tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合能力强于 RGD/tTF。当 tTF 融合蛋白浓度为 0.24 $\mu\text{mol/L}$ 时,(RGD) β /tTF 和 RGD/tTF 的 $OD_{405\text{nm}}$ 分别为 1.25 和 0.95。而单纯的 tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 不反应。

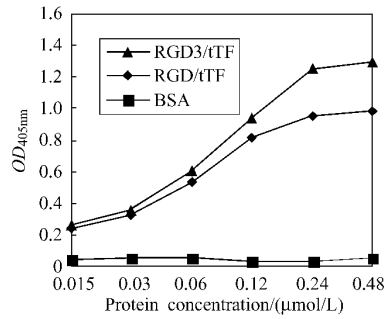


图 6 (RGD) β /tTF 与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合分析

Fig.6 The analysis of (RGD) β /tTF specific binding to $\alpha_v\beta_3$

3 讨论

本文利用基因工程技术成功构建表达了 3 个串联 RGD-4C 与 tTF 的新型融合蛋白(RGD) β /tTF。凝血实验与 F χ 活化实验结果表明融合蛋白(RGD) β /tTF 保持了组分 tTF 的促凝血活性; $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合实验结果证明(RGD) β /tTF 可与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合,并且其最大结合能力比 RGD/tTF 约提高了 32%($P < 0.01$)表明融合蛋白中 3 个串联 RGD 能更有效地与 $\alpha_v\beta_3$ 结合。通过串联方式增加 RGD 结合模块(Motif),可以有效增加 TF 融合蛋白载体组分 RGD 与受体 $\alpha_v\beta_3$ 的结合能力,改善 TF 融合蛋白的定位与富集速度。可以期望(RGD) β /tTF 在动物肿瘤模型治疗实验中,能更有效地诱发肿瘤组织血管栓塞,取得更好的抗肿瘤作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, **380**(6572): 364-366.
- [2] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 1998, **279**(5349): 377-380.
- [3] Huang XM, Molema GM, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 1997, **275**(5299): 547-550.
- [4] Yang GW (杨桂旺), Zhuang GH (庄国洪), Wang JR (王阶平), et al. Expression and characterization of fusion protein RGD/tTF for targeting therapy of cancer. *Chinese J of Immunology* (中国免疫学杂志) 2006, **22**(4): 71-74.
- [5] 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.
- [6] Hische EA, Tutuarima JA, Helm HJ. Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, 1981, **27**: 1427-1430.
- [7] Kessler T, Bieker R, Padro T, et al. Inhibition of tumor growth by RGD peptide-directed delivery of truncated tissue factor to the tumor vasculature. *Clin Cancer Res* 2005, **11**: 6317-6324.