

双功能结构域重组 FN 多肽表达质粒的构建 及其表达产物的功能

张桂梅* 冯作化 李东 张慧

(同济医科大学医学分子生物学研究室 武汉 430030)

摘要 构建了纤维结合素(FN)的双功能结构域重组多肽的两个表达质粒,在大肠杆菌中表达了两个重组多肽:CH50(FN的Pro1239-Ser1515经Met和Ala1690-Thr1960相连)和CH56(FN的Pro1239-Thr1960)。两个多肽都具有结合肝素的功能,可通过肝素-琼脂糖亲和层析得到纯品,所得纯品亦都具有结合细胞的功能。CH50和CH56的制备为进一步研究其抑制肿瘤转移的作用奠定了基础。

关键词 纤维结合素,重组多肽,肿瘤转移

纤维结合素(Fibronectin, FN)是一种含有多个功能结构域的高分子糖蛋白。其中有两个能与细胞结合的功能结构域(Cell I, Cell II)和两个能与肝素结合的功能结构域(Hep I, Hep II)。将Cell I cDNA片段(编码Pro1239-Ser1515)和Hep II cDNA片段(编码Ala1690-Thr1960)经DNA重组后,在大肠杆菌中表达的FN的Cell I-Hep II双结构域多肽,仍保持着结合细胞和肝素的功能^[1],并能对肿瘤转移产生多环节的抑制作用^[2-4],有效地抑制肿瘤细胞转移到肺和肝脏^[5,6]。虽然其作用机理还有待于进一步研究,但目前所得的结果已充分显示出这种多肽是一种很有希望的抗肿瘤转移的生物制剂。目前国内尚未见报道。为进一步研究Cell I-Hep II双结构域多肽抑制肿瘤转移的机理和探讨该多肽在肿瘤治疗中的作用,我们在大肠杆菌中高效表达了双结构域重组FN多肽,并对其表达产物进行了功能鉴定。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)和质粒pF207、pRSET均为本室保存。其中pF207(本室构建)是将pFH111质粒^[7]中酶切得到的Sac I-Bgl II cDNA片段与pFH1质粒^[7]中酶切得到Bgl II-EcoR I cDNA片段重组连接并插入pUC19而成。pF207中的cDNA(Sac I-EcoR I, 3078bp)片段编码人纤维结合素的Ser1199-Phe2224。

1.2 细胞

黑色素瘤细胞B16/F1,购自美国ATCC公司。

1.3 工具酶与DNA

国家自然科学基金、湖北省自然科学基金资助课题。

本文于1995年8月28日收到。

限制酶、T4 连接酶、DNA 分子量标准均购自华美生物工程公司。

1.4 PCR 引物

根据人纤维结合素 Cell I 和 Hep II 结构域的两端顺序设计了两对引物(由复旦大学遗传所合成):

F1:5'-CCCAGCTGTTTCATATGCCCCACTGACCTG-3';

F2:5'-CGGTCACTTGCACCATGGATGGTTTGTGTC-3';

F3:5'-CCCAGTCCATGGCTATTCTGCACC-3';

F4:5'-CCAGTTGGGGAAGCTTCTATGTCTTTTTCC-3'.

1.5 DNA 片段的扩增与重组

以纯化的 pF207 质粒为模板,采用 PCR 方法^[8]扩增 Cell I 和 Hep II 的 cDNA 片段(94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 共 10 个循环)。PCR 产物的纯化、质粒的制备、酶切、酶连、重组 DNA 的筛选和克隆,均按文献[8]进行。整个重组构建过程中均用 DH5 α 为受体菌。

PCR 扩增的 Cell I 和 Hep II 结构域的 cDNA 片段经酶切后与 pRSET 质粒重组构建而成的表达质粒,命名为 pF94-50(以 pF94-50 表达的重组多肽即命名为 CH50)。将 pF94-50 用 EcoR I 和 Bgl II 同时酶切,分离出其质粒部分,与从 pF207 酶切分离得到的 EcoR I -Bgl II 片段(FN 的 cDNA 片段)重组连接,所得的重组表达质粒命名为 pF94-56(以 pF94-56 表达的重组多肽即命名为 CH56)。

1.6 工程菌的制备和诱导表达

用重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选出转化子即为工程菌,按文献[1]的方法进行诱导表达。

1.7 重组多肽的纯化

工程菌诱导表达后采用超声波破菌,按文献[1]方法通过离子交换层析进行初步分离。CH50 表达菌的裂解物采用 CM-52(Whatman)进行分离,而 CH56 表达菌的裂解物则采用 DEAE-52(Whatman)进行分离。从离子交换柱收集的半纯品再经过 Heparin-agarose (Sigma)亲和层析柱进行纯化。纯化后的样品采用改良的 Lowry 法测蛋白量,并通过 10% SDS-PAGE 电泳进行分析。

1.8 细胞粘附试验

按文献[1]方法,将重组 FN 多肽(CH50 和 CH56)分别用 pH7.4 的 0.01mol/L PBS 稀释成 1mg/ml,包被 96 孔板。在 96 孔板中加入稀释好的重组 FN 多肽,50 μ l/孔,对照孔加入同样体积的 0.01mol/L PBS,置 4℃ 过夜。将 96 孔板用 0.01mol/L PBS 洗 3 次,每孔加入 3% 牛血清白蛋白 100 μ l(封闭),置 37℃ 1h。用 0.01mol/L PBS 洗板 3 次后,每孔加入用 0.25% 胰蛋白酶消化的黑色素瘤细胞 100 μ l(5×10^4 细胞),置 37℃ 温育 1h,用 0.01mol/L PBS 洗板 3 次,除去未粘附的细胞,每孔加入 50 μ l 0.01mol/L PBS,在倒置相差显微镜下观察、拍照。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建

Cell I 和 Hep II 两个功能结构域的 cDNA 片段都是通过 PCR 方法从 FN 的 cDNA 扩增而成。引物 F1 和 F2 用来扩增 Cell I 片段, F1 为 5' 引物, 引物中加入 Nde I 位点 (CATATG) 而引入了起始密码子, ATG 之后即为 FN 的 Pro1239 的密码子 (CCC); F2 为 3' 引物, 其中加入了一个 Nco I 位点 (CCATGG)。引物 F3 和 F4 用来扩增 Hep II 片段, F3 为 5' 引物, 其中加入了 Nco I 位点, F4 为 3' 引物, 其中将 FN 的 Asp1961 的密码子 GAC 改成终止密码子 TAG, 使肽链合成终止在 Thr1960, 在 TAG 之后加入了 Hind III 位点, 便于重组构建。

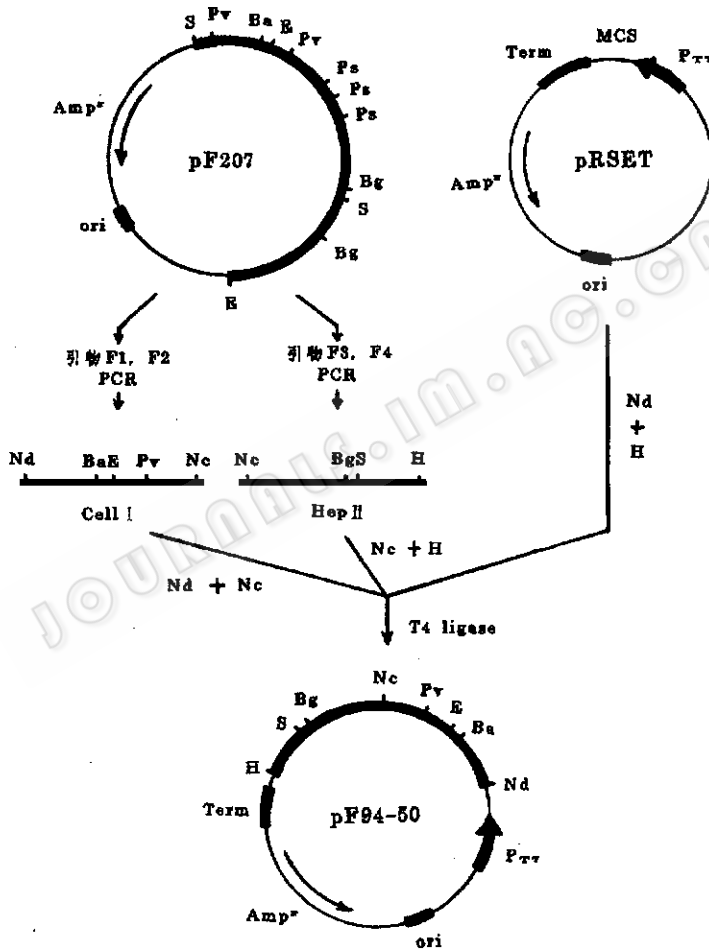


图 1 重组质粒 pF94-50 的构建示意图

Fig. 1 Scheme for the construction of recombinant plasmid pF94-50

Abbreviations in the scheme: S, Sac I ; Ba, BamHI ; E, EcoR I ; Ps, Pst I ; Bg, Bgl II ; H, Hind III ; Nd, Nde I ; Nc, Nco I ; Pv, Pvu II ; P_{T7}, T7 promoter; Term, transcription terminator; MCS, multiple cloning sites

表达质粒 pF94-50 的构建过程如图 1 所示, 在 pRSET 质粒中, Nde I 位点中的 ATG 即为翻译起始密码子, 因此, 合成的重组多肽不含任何附加的氨基酸。Cell I 和 Hep II 两

个片段之间是由 Ser1515 经 Met 与 Ala1690 相连, 3 个密码子为 TCCATGGCT, Met 是通过 Nco I 位点(CCATGG)引入的。带有 pF94-50 的工程菌所表达的 CH50 多肽, 为 FN 的 Cell I 结构域(Pro1239-Ser1515)和 Hep II 结构域(Ala1690-Thr1960)经 Met 连接而成的重组多肽。

表达质粒 pF94-56 的构建过程如图 2 所示。将从 pF207 中切出的 1.4kb EcoR I -Bgl II 片段(编码 FN 的 Asn1380-Ile1850)与切除了 0.89kb EcoR I -Bgl II 片段的 pF94-50 的载体部分进行重组连接, 即得到 pF94-56, 带有 pF94-56 的工程菌所表达的 CH56 多肽, 为 FN 的 Pro1239-Thr1960 片段。

pF94-50 和 pF94-56 的酶切鉴定结果如 PlateI-D 所示。所得酶切片段与理论值相符。

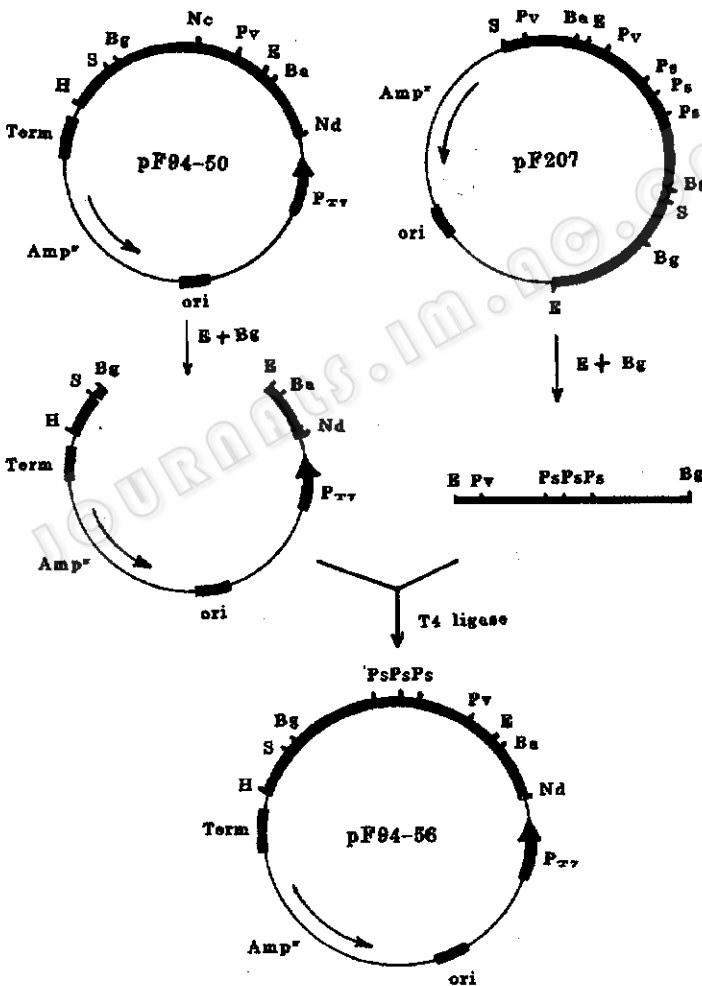


图 2 重组质粒 pF94-56 的构建示意图

Fig.2 Scheme for the construction of recombinant plasmid pF94-56

Abbreviations in the scheme are the same as those in Fig.1

2.2 CH50 和 CH56 的纯化及其结合肝素的作用

从 PlateI-E 可见, SDS-PAGE 电泳结果表明: ①含 pF94-50 和 pF94-56 质粒的工程菌

经诱导后,菌体总蛋白中均有一条很粗的表达蛋白条带。CH50 的分子量理论值为 59.7kDa, CH56 为 78.6kDa,电泳结果与理论值相符;②从氨基酸顺序可知,CH50 中的碱性氨基酸(R+K)与酸性氨基酸(D+E)的比值是 56:52,为碱性蛋白,CH56 中的(R+K):(D+E)=67:76,为酸性蛋白,相应的工程菌裂解物可通过 CM-52 分离得到 CH50 的半纯品,通过 DEAD-52 分离得到 CH56 的半纯品,表明 CH50 确为碱性蛋白,CH56 为酸性蛋白;③将离子交换层析后得到的半纯品再通过肝素-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,可得到纯度很高的 CH50 和 CH56。亲和层析的结果同时也证明 CH50 和 CH56 都具有结合肝素的能力。

2.3 CH50 和 CH56 结合细胞的作用

采用黑色素瘤细胞检测 CH50 和 CH56 多肽结合细胞的作用,结果如 Plate I-A, B, C。用 PBS 处理的对照孔中,无细胞粘附;而用 CH50 和 CH56 包被孔中,均有大量的黑色素瘤细胞粘附,表明 CH50 和 CH56 都有结合细胞的功能。

3 讨 论

恶性肿瘤在体内的转移是目前肿瘤治疗中面临的最大难点之一,至今仍缺乏有效的防治手段。双功能结构域(Cell I -Hep II)重组 FN 多肽在肿瘤治疗中具有极大的应用潜力,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细胞结合^[4],抑制瘤细胞穿过基质^[3,4],抑制瘤细胞与基底膜上的层粘连素结合^[2];而这正是肿瘤细胞侵入其他组织的最重要的三个步骤。FN 分子中的各个功能结构域都是由几个同源重复结构组成的。Cell I 和 Hep II 功能结构域中都含有三个 III 型重复结构^[9]。III 型重复结构是由约 90 个氨基酸组成,都不含链内二硫键。在天然的 FN 分子中,Cell I 和 Hep II 两个功能结构域之间还含有两个 III 型重复结构(III-11 和 ED-A)。在 CH50 中,我们通过 DNA 重组而删除了 III-11 和 ED-A。CH50 的结构与 Kimizuka 等人重组表达的 Cell I -Hep II 结构相同。这一重组多肽抑制肿瘤转移的作用,是仅仅因为除去了 FN 中的其他功能结构域,还是因为删除了 III-11 和 ED-A,尚未得到证实。此外, FN 中的 Cell I 结构域能够促进巨噬细胞产生肿瘤坏死因子^[10], Cell I -Hep II 重组多肽是否仍然对巨噬细胞有调节作用,这种作用是否需要 III-11 和 ED-A 的存在,都需要进一步研究。为此,在构建和表达了 CH50 的基础上,我们构建和表达了 CH56,在 Cell I 和 Hep II 之间恢复了 III-11 和 ED-A。从初步得到的结果看,在 Cell I 和 Hep II 之间增加了 III-11 和 ED-A 之后,重组多肽由碱性蛋白转变成酸性蛋白,这是因为 III-11 和 ED-A 中含有大量的酸性氨基酸,(D+E):(R+K)=24:11。但是这不影响重组多肽结合肝素和细胞。这两个多肽结合细胞时是否产生不同的信号,其调节作用是否不同,目前还不清楚。研究 CH50 和 CH56 多肽在抑制肿瘤细胞转移和调节巨噬细胞杀癌活性等方面有无差别,将会进一步揭示重组 FN 多肽结构与功能之间的关系。这是我们正在进行的工作。

参 考 文 献

- [1] Kimizuka F, Taguchi Y, Ohaate Y *et al.* J Biochem. 1991; **110**:284~291.
- [2] Saiki I, Makabe T, Yoneda J *et al.* Jpn J Cancer Res 1991, **82**:1112~1119.
- [3] Matsumoto Y, Saiki Y, Makabe T *et al.* Jpn J Cancer Res 1991, **82**:1130~1138.
- [4] Yoneda J, Saiki I, Kobayashi H *et al.* Jpn J Cancer Res 1994, **85**:723~734.
- [5] Saiki I, Murata J, Makabe T *et al.* Jpn J Cancer Res 1990, **81**:1003~1011.
- [6] Saiki I, Matsumoto Y, Murata J *et al.* Jpn J Cancer Res 1991, **82**:1120~1129.
- [7] Kornblihtt A, Umezawa K, Vibe-Pedersen K *et al.* The EMBO J 1985; **4**(7):1755~1759.
- [8] Sambrook J, Fritch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, a laboratory manu. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [9] Hynes R O. Fibronectins. Springer-Verlag New York Inc. 1990.
- [10] Beezhold D H, Personius C. J Leukoc Biol. 1992, **51**(1):59.

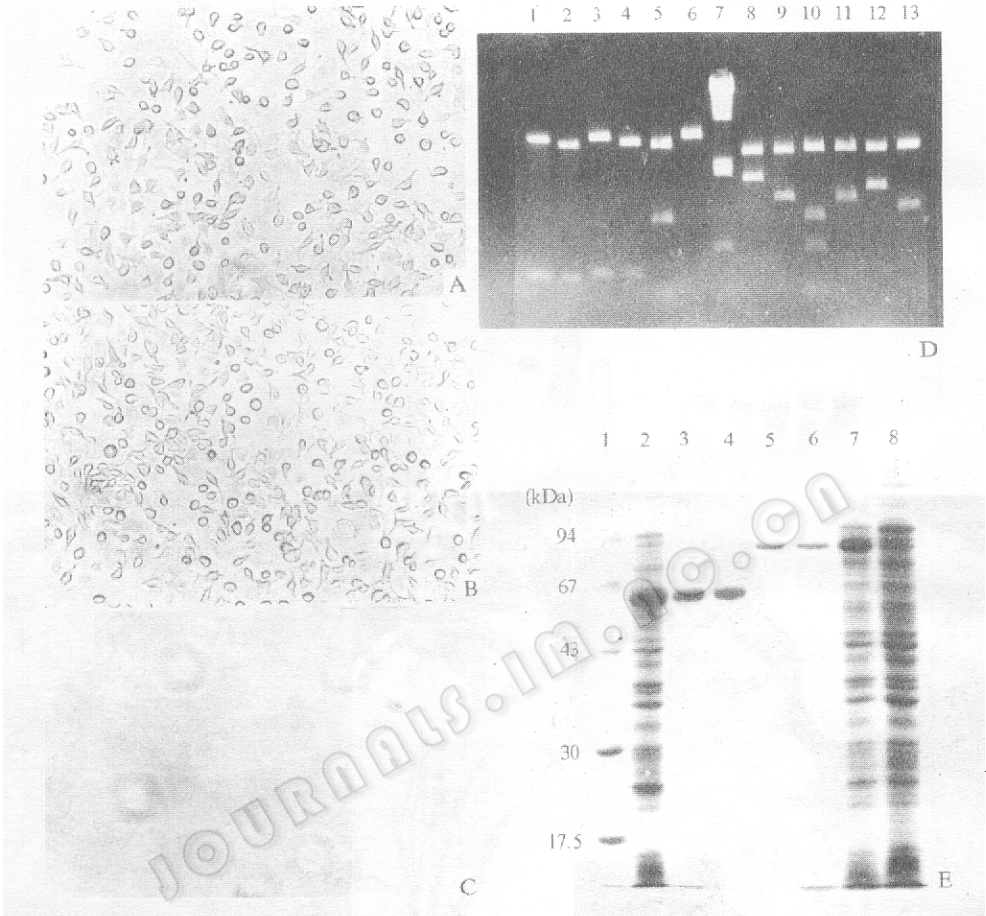
**Construction of Expressing Plasmids of Recombinant FN Polypeptides
with Double-domain and the Characterization of the Products
Expressed in *Escherichia coli***

Zhang Guimei Feng Zuohua Li Dong Zhang Hui

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

Abstract Two expressing plasmids have been constructed and used to express two double-domain recombinant polypeptides of fibronectin (FN) in *E. coli*. One is CH50 (Pro1239-Ser1515 of FN linked with Ala1690-Thr1960 of FN through Met) and the other is CH56 (Pro1239-Thr1960 of FN). Both of two polypeptides are capable of binding heparin and can be purified by heparin-agarose affinity chromatography. The purified products are capable of binding cells. The production of CH50 and CH56 polypeptides provides a fundamental basis for further study of the antimetastasis function of recombinant fibronectin polypeptides.

Key words Fibronectin, recombinant polypeptide, metastasis



A, B, C. Attachment of B16 - F1 melanoma cells on a substrate coated with recombinant FN fragments CH50 and CH56. Trypsinized B16 - F1 cells were incubated on a 96 - well plate coated with one of the following polypeptides: A, CH50; B, CH56; C, none.

D. Profile of restriction enzyme digestion of the recombinant plasmids pF94 - 50 and pF94 - 56 by agarose electrophoresis

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. pF94-56, Hind III + SacI | 8. pF94-56, Hind III + BamHI |
| 2. pF94-50, Hind III + SacI | 9. pF94-50, Hind III + BamHI |
| 3. pF94-56, Hind III + Bgl II | 10. pF94-56, Hind III + EcoR I + Pst I |
| 4. pF94-50, Hind III + Bgl II | 11. pF94-50, Hind III + EcoR I |
| 5. pF94-56, Hind III + Pst I | 12. pF94-56, Hind III + Pvu II |
| 6. pF94-50, Hind III + Pst I | 13. pF94-50, Hind III + Pvu II |
| 7. λ DNA, Hind III digest | |

E. Profile of the expression and purification of CH50 and CH56 polypeptides by SDS - PAGE. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, the whole - cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) carrying pF94 - 50; lane 3, fraction containing CH50 from CM - 52 chromatography; lane 4, CH50 purified with heparin - agarose; lane 5, CH56 purified with heparin - agarose; lane 6; fraction containing CH56 from DEAE - 52 chromatography; lane 7, the whole - cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) carrying pF94 - 56; lane 8, the whole - cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) as a control.