

KDR 酪氨酸激酶的克隆表达及纯化

刘春平, 张洋, 李元

中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所, 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

摘要: VEGF 作为一种血管内皮细胞有丝分裂原, 通过与内皮细胞表面特定受体结合, 从而导致新生血管的形成, 其中 VEGFR-2(KDR/Flk-1)在肿瘤血管形成中起重要作用, 因此其抑制剂有可能发展成为治疗肿瘤的新药。采用大肠杆菌成功表达了具有酪氨酸激酶活性的 KDR 酪氨酸激酶催化域(KDR-CD)。采用 RT-PCR 从人脐静脉内皮细胞中提取总 RNA, 获得 KDR-CD 的编码基因, 将其克隆至 pET-30a 载体, 在 *E. coli* BL21(DE3)中进行了成功表达, 采用 Ni-NTA 亲和层析对其进行了纯化, Western blotting 结果显示表达的 KDR-CD 蛋白自身磷酸化, 重组 KDR-CD 蛋白具有利用 ATP 催化底物发生磷酸化反应的激酶活性。

关键词: 血管生成, KDR 酪氨酸激酶, 大肠杆菌, 酪氨酸激酶活性

Cloning, Expression and Purification of KDR Tyrosine Kinase

Chunping Liu, Yang Zhang, and Yuan Li

Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology; Chinese Academy of Medical Science and Perking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: The catalytic domain of KDR kinase (KDR-CD) was amplified from RNA of HUVECs cells with RT-PCR and expressed in *E. coli* BL21(DE3) by plasmid pET30a as vector. The recombinant protein was purified with affinity chromatography (Ni-NTA). Western blotting showed that the recombinant KDR-CD was phosphorylated in *E. coli* BL21(DE3). The recombinant KDR-CD was identified to have kinase activity catalyzing the substrate phosphorylated with ATP in the enzymatic reaction.

Keywords: angiogenesis, KDR tyrosine kinase, *E. coli*, kinase activity.

血管生成(Angiogenesis)是毛细血管从已构建的毛细血管网中以出芽方式新生的过程, 参与许多生理和病理过程如胚胎发育、伤口愈合、糖尿病、关节炎、慢性炎症和肿瘤的发生及转移^[1]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)作为血管内皮细胞特异的有丝分裂原, 直接参与血管形成, 促进内皮细胞分裂增殖, 促使新生血管形成, 同时还能有效提高血管的通透性^[2-5]。VEGF 是

通过和其特异性受体结合发挥作用的, 其中 VEGFR-2(KDR/Flk-1)在调节内皮细胞增殖、分化反应中最为重要, 是内皮细胞 VEGF 信号传导的主要执行者。KDR 主要在内皮细胞表达, 由胞外 7 个 Ig 样结构域, 一个跨膜域和胞内域组成^[6]。VEGF 与 KDR 结合后受体二聚体化, 进一步激发 KDR 酪氨酸发生磷酸化, 导致自身酶活性和下游信号相关酶的激活, 从而调节血管内皮细胞相关反应^[6-8]。新生

Received: January 14, 2008; **Accepted:** March 27, 2008

Supported by: the Chinese National 863 High Technology Program (No. 2004AA2Z3784).

Corresponding author: Yuan Li. Tel: +86-10-63153320; E-mail: yuanwli@263.net

国家高科技研究与发展计划项目(No. 2004AA2Z3784)资助。

血管的形成对恶性肿瘤的生长是必不可少的因素,因此以 KDR 为靶位进行药物设计和筛选已成为肿瘤治疗的有效途径之一。

本研究将具酪氨酸激酶活性的人源 KDR 酪氨酸激酶催化域 (KDR-CD)在 *E. coli* BL21(DE3)中成功进行了表达,采用 Ni-NTA 亲和层析对蛋白进行了纯化,并对 KDR-CD 蛋白的酪氨酸激酶活性进行了研究,为进一步以其为靶点进行酶抑制剂筛选,获得抗肿瘤新药奠定了一定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒及菌种:质粒 pET-30a 及大肠杆菌 BL21(DE3)由中国医学科学院基础医学研究所陈松森教授馈赠。

酶与主要试剂:限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶购自 Promega 或 TaKaRa 公司;磷酸化的酪氨酸单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司;山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记的二抗购自中杉金桥试剂公司;Hepes, 合成二肽底物 poly(Glu, Tyr)_{4:1} 和 Na₃VO₄购自 Sigma 公司; TRIzol 为 Invitrogen 公司产品; NBT/BCIP 购自 Promega 公司; IPTG 购自 MERCK 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 KDR-CD 基因的获得和重组质粒 pET-30a/KDR-CD 的构建

采用 TRIzol 试剂从人脐静脉内皮细胞(HUVEC)提取总 RNA。使用两步法 RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa), 以 Oligo(dT)-adaptor 为引物进行反转录。根据已知的 KDR-CD 基因序列设计引物, 引物 1 为 5'-GTGGATCCTGTGAACGACTGCTGCCTTATG-3', 引物 2 为 5'-CGAAGCTTTTAGTAGTCTTTGCCATCTG-3'(下划线分别示 BamH I 和 Hind III 酶切位点)。采用上述引物, 以反转录获得的 cDNA 为模版进行 PCR 反应。扩增的 KDR-CD 基因片段用 Blue Tank (ISCO, USA)回收, 以 BamH I-Hind III 双酶切该片段, 克隆至 BamH I-Hind III 酶切的 pET-30a, 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 从转化子(Ka^r)分离获得重组质粒 pET-30a/KDR-CD, 酶切检定并进行序列测定。

1.2.2 重组菌的诱导表达

将重组菌 *E. coli* BL21[pET-30a/KDR-CD]接种至 5 mL 含卡那霉素(25 g/mL)的 LB 培养基, 37°C 培养过夜, 按 1%的接种量转种至含卡那霉素(25 g/mL)的 LB 培养基, 37°C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 以不同浓度 IPTG (0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6 和 0.8 mmol/L)和不同时间(1 h、2 h、3 h、4 h、6 h 和 8 h)对重组菌 *E. coli* BL21[pET-30a/KDR-CD]进行了诱导培养, 以确定最佳诱导表达蛋白条件。

1.2.3 重组蛋白 KDR-CD 的纯化

将上述菌体悬浮于预冷的结合缓冲液(1 × binding buffer: 5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)中, 置冰浴进行超声波破碎, 10 000 r/min 离心 15 min 弃上清。按 100 mg 包涵体湿重加入 10 mL 包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 5 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl)洗涤后, 4°C 10 000 r/min 离心 15 min 弃上清, 重复上述步骤 3 次。加入 10 mL 包涵体裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 8 mmol/L 尿素, pH 8.0), 4°C 过夜。包涵体溶解后, 离心(15 000 r/min) 20 min, 取上清液用 4°C 预冷的复性液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 1 mol/L 尿素, 5 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.5 mol/L 精氨酸, pH 8.0)复性 4°C 48 h。然后在 4°C 以 50 倍体积透析液 A(20 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L 尿素, pH 8.0), 透析液 B(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)和透析液 C(去离子水)依次透析 3 次, 每次 6 h。透析后 4°C 10 000 r/min 离心 15 min 去沉淀, 进行冷冻干燥备用。样品溶于适量结合缓冲液中, 经 0.45 μmol/L 滤膜过滤后将样品溶液加至以结合缓冲液预平衡过的 Ni-NTA 亲和层析柱, 依次以 15 mL 洗涤缓冲液 (Washing buffer: 60 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)、5 mL 洗脱缓冲液 (Eluting buffer: 1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)进行洗脱, 流速为 8 min/mL。分管收集洗脱液体, 进行 SDS-PAGE 分析。合并含有目的蛋白的洗脱液, 4°C 用蒸馏水进行透析, 冷冻干燥, -20°C 保存。

1.2.4 Western blotting 分析

样品进行 SDS-PAGE 后, 凝胶置于转移缓冲液 (39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris-HCl, 0.0375%

SDS, 20%甲醇)中漂洗, 采用转膜仪(Bio-Rad SEMI-DRY TRANSFER)进行蛋白印迹转移, 将蛋白电转移(0.65 mA/cm²)至硝酸纤维素膜, 转移进行 2 h, 然后将膜置于丽春红 S 溶液(0.1%丽春红, 5% HAc)浸泡 5 min, 确定标准蛋白分子量条带位置, 再以蒸馏水漂洗脱色, 将膜置入杂交袋, 加入含 5%脱脂牛奶的 TBS 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5), 4°C 封闭过夜。弃溶液后加入小鼠磷酸化酪氨酸的单克隆抗体(用含 5%脱脂牛奶的 TBS 1:1000 稀释), 室温缓振 2 h, 以 TBS-T(含 0.5% Tween-20 的 TBS)洗膜 3 次, 加入碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体(用含 5%脱脂牛奶的 TBS 1:1000 稀释), 室温缓振 2 h 将膜取出, 经 TBS-T 漂洗 3 次, 置于 NBT/BCIP 显色液中显色, 室温下避光轻摇, 待染色蛋白条带清晰出现时, 将膜取出置蒸馏水中终止显色。

1.2.5 酪氨酸激酶活性测定(ELISA 法)^[9]

于 96 孔培养板每孔加入 1.5 μg 酪氨酸激酶反应底物 poly(Glu, Tyr)_{4:1}, 37°C 保温过夜。弃包被液后用 PBS(0.024% KH₂PO₄, 0.144% Na₂HPO₄, 0.02% KCl, 0.8% NaCl, pH 7.4)洗板 3 次, 晾干。在 50 μL TK 缓冲液(50 mmol/L Hepes pH7.4, 20 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L MnCl₂, 0.2 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L 二硫苏糖醇)中加入终浓度为 10 μmol/L 的 ATP 和 2 μL KDR-CD, 于 37°C 保温 1 h 进行激酶反应。弃上述激酶反应液后, 用 PBS-T(含 0.1% Tween-20 的 PBS)洗板 3 次, 再用 PBS 洗板 3 次, 晾干。每孔加入 200 μL 含 3%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 溶液进行封闭, 室温放置 1 h。弃封闭液, 用 PBS-T 洗板 3 次, 再用 PBS 洗板 3 次, 晾干。每孔加入 100 μL 小鼠磷酸化酪氨酸的单克隆抗体(1:1000 稀释), 室温放置 2 h。弃上述反应液, 用 PBS-T 洗板 3 次, 再用 PBS 洗板 3 次, 晾干。每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)多克隆抗体(1:2000 稀释), 室温放置 2 h。弃上述反应液, 用 PBS-T 洗板 3 次, 再用 PBS 洗板 3 次, 晾干。每孔加入 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)和 H₂O₂ 各 50 μL, 室温放置 1 h 后, 加入 100 μL 1 mol/L HCl 终止反应, 使用酶标比色计在 450 nm 检测样品光密度值(OD), 本实验中设立样品空白对照。

基于上述方法, 对 KDR-CD、底物 poly

(Glu,Tyr)_{4:1}、ATP、Mg²⁺及 Mn²⁺浓度对酶反应影响进行了研究。

2 结果

2.1 KDR-CD 表达载体的构建和鉴定

以人脐静脉内皮细胞(HUVECs)提取的总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增获得 KDR-CD 编码基因, 将其克隆至 pET-30a 并转化至 *E. coli* BL21(DE3), 从转化子提取重组质粒 pET-30a/KDR-CD, 采用 BamH I-Hind III 双酶切该质粒, 及其为模板进行 PCR 验证, 均获得 1.1 kb 的基因片段, 说明 KDR-CD 成功插入 pET-30a 载体中(图 1)。核苷酸测序结果显示插入的 KDR-CD 与已知序列完全一致(GenBank Accession No. AF063658)。

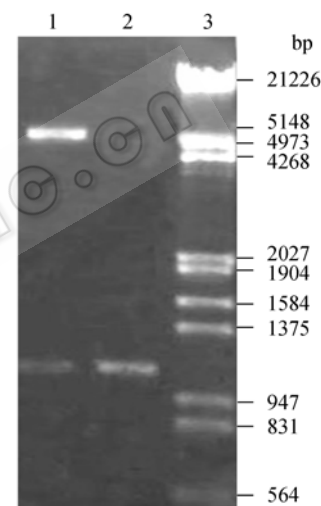


图 1 重组质粒 pET30a/KDR-CD 的酶切分析

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pET30a/KDR-CD

1: pET-30a/KDR-CD digested by BamH I -Hind III;
2: PCR product; 3: molecular weight marker

2.2 重组的 KDR-CD 蛋白的表达及纯化

KDR-CD 基因克隆至 pET-30a 并转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 结果表明, 重组菌 *E. coli* BL21[pET-30a/KDR-CD]在 0.1 mmol/L IPTG 诱导下, 37°C 培养 4 h 表达重组 KDR-CD 最佳, 蛋白主要以包涵体的形式存在, 分子量为 41 kD 与预期值相符。重组 KDR-CD 包涵体经复性后, 采用 Ni-NTA 亲和柱层析柱进行了纯化(图 2), HPLC 分析纯度为 95.72%。

2.3 蛋白质印迹(Western blotting)

采用磷酸化酪氨酸的抗体对纯化的重组 KDR-CD 进行了 Western blotting, 结果显示在没有

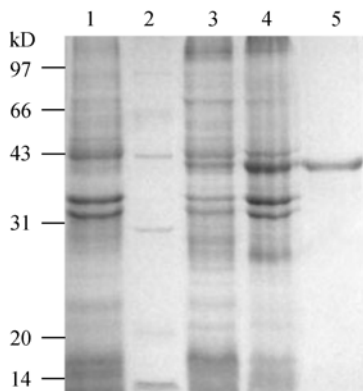


图2 大肠杆菌表达蛋白和纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the protein expressed by *E. coli* and the purified sample

1: *E. coli* [pET-30a]; 2: molecular weight marker; 3: *E. coli* [pET-30a/KDR-CD]; 4: inclusion body of *E. coli* [pET-30a/KDR-CD]; 5: purified KDR-CD from inclusion body

加入外源 ATP 的情况下, 重组蛋白在 41 kD 处出现单一杂带, 这表明重组 KDR-CD 能使底物 poly (Glu, Tyr)_{4:1} 酪氨酸磷酸化, 从而能和磷酸化酪氨酸的抗体结合, 说明表达的蛋白是自身磷酸化的酪氨酸激酶(图 3)。

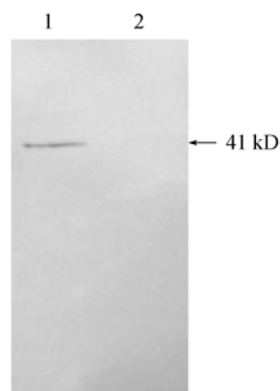


图3 重组 KDR-CD 蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis for recombinant KDR-CD
1: *E. coli* [pET-30a /KDR-CD]; 2: *E. coli* [pET-30a]

2.4 重组 KDR-CD 的酪氨酸激酶活性测定

根据前述方法对重组 KDR-CD 进行酪氨酸激酶活性测定, 图 4A 显示不同浓度的 KDR-CD 在 ATP 存在的条件下, 能使底物 poly(Glu, Tyr)_{4:1} 的酪氨酸发生磷酸化反应, 如图所示其活性与酶浓度呈剂量效应, 当 KDR-CD 酶量达到 2 μL/孔时酪氨酸激酶活性最高。

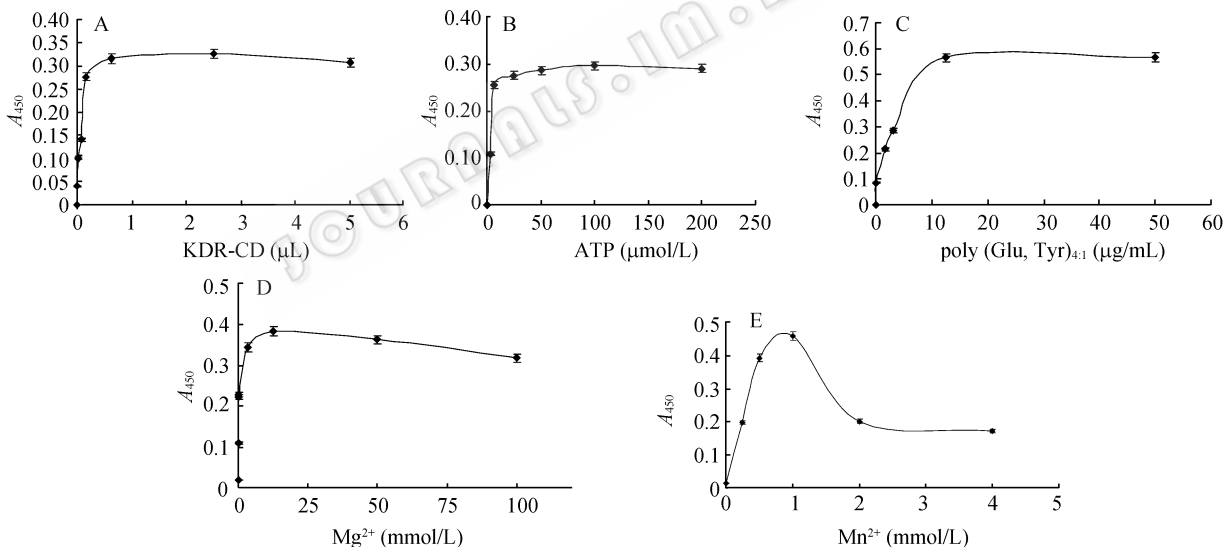


图4 酶浓度(A)、ATP(B)、多肽底物(C)、Mg²⁺浓度(D)和 Mn²⁺(E)对重组 KDR-CD 催化激酶反应的影响

Fig. 4 Effects of concentrations of the enzyme(A), ATP(B), substrate peptide (C), Mg²⁺(D) and Mn²⁺(E) on kinase reaction catalyzing by the recombinant KDR-CD

为了优化重组 KDR-CD 酪氨酸激酶活性测定的条件、分别对底物 poly(Glu,Tyr)_{4:1} 浓度、ATP 浓度、Mg²⁺及 Mn²⁺的反应浓度进行了研究。对 ATP 和 poly (Glu,Tyr)_{4:1}, 分别固定其一浓度不变, 改变另一底物的浓度, 结果表明 poly (Glu,Tyr)_{4:1} 最

适浓度为 1.5 μg/孔(图 4B), ATP 的最适浓度为 25 μmol/L (图 4C)。研究还表明 Mg²⁺和 Mn²⁺的最佳浓度分别为 12.5 mmol/L 和 0.5 mmol/L (图 4D, 图 4E), 当二价离子 Mg²⁺和 Mn²⁺浓度超过上述值时激酶反应受到抑制。

3 讨论

大量研究表明 VEGF 及其受体在血管形成 (Angiogenesis) 中起重要作用, 其中 KDR 是主要的信号传导者, 通过与 VEGF 结合从而激活磷酸化级联反应^[2,3]。被认为是许多疾病特别是癌症治疗的潜在靶点, 因此 KDR 酪氨酸激酶抑制剂可能成为研究治疗肿瘤新药的有效途径之一。

研究表明 KDR 酪氨酸激酶催化域有 6 个自磷酸化位点^[6, 10]: Tyr 951, Tyr 996, Tyr 1054, Tyr 1059, Tyr 1175 和 Tyr 1214, 自磷酸化位点参与调节受体的激酶活性。本文研究的 KDR-CD 催化域包括 816 至 1175 位的氨基酸, 采用载体 pET-30a 在 *E. coli* BL21(DE3) 进行了表达, 蛋白质印迹 (Western blotting) 结果显示重组蛋白 KDR-CD 能使底物 poly(Glu, Tyr)_{4:1} 酪氨酸磷酸化, 从而能和酪氨酸磷酸化的抗体结合出现单一的蛋白杂交带, 这表明在没有加入外源 ATP 条件下, 重组 KDR-CD 可以利用 *E. coli* BL21 菌体内源的 ATP 发生自身磷酸化反应, 与文献报道相符^[6]。这说明本文表达的酪氨酸激酶催化域足以保证酪氨酸激酶能自磷酸化, 表明分子间的自磷酸化是催化域所固有的, 独立于其他结构域而存在。

酪氨酸激酶受体的研究表明典型的自磷酸化位点需要有一个或两个酸性氨基酸残基结合至磷酸化酪氨酸的残基端。由于 KDR 受体的天然底物至今尚未确定, 因此根据相关报道^[10] 本实验采用了 [poly(Glu, Tyr)_{4:1}]₂ 肽作为反应底物, 尽管 poly(Glu, Tyr)_{4:1} 是一种合成肽, 但在本实验中, 重组 KDR 对 poly(Glu, Tyr)_{4:1} 的磷酸化效果好, 显示了重组 KDR 的酪氨酸激酶活性, 因此该底物可进一步用于构建酪氨酸激酶抑制剂筛选模型的研究。

目前国内外研究者主要采用真核细胞特别是 SF9 昆虫细胞表达 KDR 的催化区域^[9, 11, 12], 并以此为基础建立了筛选酪氨酸激酶抑制剂的模型, 其表达的重组蛋白既有自身磷酸化的也有非磷酸化的, Parast 等^[11] 研究显示磷酸化的 KDR-CD 要比非磷酸化的形式稳定。和真核表达系统相比较, KDR 在大肠杆菌表达较方便易行, 表达量高且表达产物分离纯化相对简单, 本研究拟以重组 KDR-CD 为靶点, 构建酪氨酸激酶抑制剂筛选模型, 为获得酪氨酸

激酶的抑制剂创造良好条件。由于未获得商品 KDR-CD 酪氨酸激酶, 因此在酶活性研究未设定阳性对照。

REFERENCES

- [1] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, **86**: 353–364.
- [2] Vries C, Escobedo JA, Ueno H. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, **255**: 989–991.
- [3] Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **187**: 1579–1586.
- [4] Shalaby F. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in FLK-1-deficient mice. *Nature*, 1995, **376**: 62–66.
- [5] Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 603–606.
- [6] Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P. Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **205**: 728–738.
- [7] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 30336–30343.
- [8] Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*, 2001, **26**: 25–35.
- [9] Zhong L, Guo XN, Zhang XH. Expression and purification of the catalytic domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2 for inhibitor screening. *Biochimica Biophysica Acta*, 2005, **1772**: 254–261.
- [10] Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, 2001, **20**: 2768–2777.
- [11] Parast CV, Mroczkoski B, Pinko C. Characterization and kinetic mechanism of catalytic domain of human vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase (VEGFR2 TK), a key enzyme in angiogenesis. *Biochemistry*, 1998, **37**: 16788–16801.
- [12] Zhao G, Robert BP, Jonathan MY. Characterization and development of a peptide substrate-based phosphate transfer assay for the human vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase. *Analytical Biochemistry*, 2007, **360**: 196–206.