论著

文章编号:1000-5404(2006)14-1464-03

hLNα4LG1基因克隆、表达及生物学活性检测

连继勤[1],戴旭芳[2],李晓辉[3],何凤田[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生物化学与分子生物学教研室,[3]药理学教研室,重庆 400038;[2]重庆师范大学特殊教育学院,重庆 400047)

提 要:目的 克隆并表达具有生物学活性的人层黏连蛋白α4链LG1组件(human laminin alpha4 chain LG1 module,hLNα4LG1)蛋白。**方法** RT-PCR扩增hLNα4LG1的cDNA片段并将其插入pMD-18T载体进行测序。将测序片段亚克隆入原核表达载体pET-28a并在BL21(DE3)大肠杆菌中进行表达,Western blot对表达蛋白进行鉴定。用Ni-NTA亲和柱对目的蛋白进行纯化,并通过细胞黏附与伸展实验对其生物学活性进行检测。**结果** 成功克隆了hLNα4LG1的cDNA片段,SDS-PAGE及Western blot分析显示,经IPTG诱导后BL21(DE3)/pET28a-LG1总蛋白中出现一条分子量为26×10^3的新蛋白带。与对照组相比,Ni-NTA亲和层析纯化的目的蛋白有明显促进A549细胞伸展与黏附的作用。**结论** 克隆并原核表达了hLNα4LG1蛋白,目的蛋白具有促进细胞黏附与伸展的活性,为深入研究hLNα4LG1的功能奠定了基础。

关键词:hLNα4LG1;基因克隆;原核表达

中图法分类号:Q279;Q51;Q78 **文献标识码**:A

Gene cloning, expression and biological function of hLNα4LG1

LIAN Ji-qin[1], DAI Xu-fang[2], LI Xiao-hui[3], HE Feng-tian[1] ([1]Department of Molecular Biology and Biochemistry, [3]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038; [2]Special Education College of Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: Objective To clone and express human laminin alpha4 chain LG1 module(hLNα4LG1) protein holding biological activity. Methods The cDNA encoding hLNα4LG1 was amplified by RT-PCR, then inserted into pMD-18T vector and sequenced. The hLNα4LG1 cDNA fragment was subcloned into pET-28a vector and expressed in BL21(DE3) strain. The hLNα4LG1 protein was detected by Western blotting and purified by Ni-NTA column. The biological activity of target protein was detected through cell adhesion and expansion test. Results The cDNA fragment of hLNα4LG1 was cloned successfully. While BL21(DE3)/pET-28a-LG1 bacterium was induced with IPTG, a new protein band with a relative molecular weight of 26 000 was shown. Purified hLNα4LG1 protein could promote the expansion and adhesion of A549 cells obviously, as compared with the control group. Conclusion The hLNα4LG1 was cloned and expressed successfully, on which the cells can adhere and expand.

Key words: hLNα4LG1; gene clone; prokaryotic expression

肿瘤的浸润转移是导致机体死亡的重要原因之一,而这一过程与肿瘤细胞与宿主细胞及细胞外基质之间的相互作用密切相关。层黏连蛋白(laminin,LN)作为细胞基底膜的主要结构组份之一,参与了肿瘤细胞的浸润转移[1]。位于LNα链C末端的G结构域是LN与其受体及基质组份相互作用的重要部位,在肿瘤细胞的浸润转移过程中起着非常重要的作用[2,3]。LN的G结构域由5个LG组件组成,每个组件含180~200个氨基酸残基,分别含有不同受体的作用位点[4],因此对这些组件及其相关位点的研究将有助于揭示LN在疾病的发生发展尤其是肿瘤的浸润转移中所起的作用,并可能成为治疗的靶点[5]。本研究以人LNα4链的LG1组件为研究对象,克隆、表达并检测目的蛋白的生物学活性,以期为相关作用位点的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜的人胎盘组织(产后,经家属同意)取自解放军208医院;Trizol RNA提取试剂购自Gibeco公司;MEM培养基为Roche公司产品;PCR引物由上海生工公司合成;RT-PCR试剂盒为Promega公司产品;限制性内切酶及pMD-18T克隆载体购

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400559)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400559)
作者简介:连继勤(1974-),男,山西省长治市人,博士,讲师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。电话:(023)68752943
通讯作者:李晓辉,电话:(023)68753397
何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2005-10-21;修回日期:2005-12-17

自大连宝生物公司；原核表达载体 pET28a 及其宿主菌 BL21（DE3）购自 Novagen 公司；质粒纯化试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为北京鼎国生物公司产品；金属螯合亲和层析介质（Ni-NTA）及小鼠抗人 His 抗体购自德国 Qiagen 公司。

1.2　方法

1.2.1　引物的设计与合成　　根据 GenBank 中的 hLNα4 cDNA 序列（登录号：002290），利用引物设计软件 DNASIS 分别设计了 LG1 组件的上、下游引物 5′-GTCAGAATTCTTCACGTCTCTGAGCCTGTAC-3′和 5′-GTCACTCGAGCTAACATGGCACTGATGTGGAG-3′。在上、下游引物的 5′端分别加入 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点及保护碱基 gtca，在下游引物中加入终止密码子互补序列 CTA。

1.2.2　hLNα4LG1 cDNA 的克隆与序列测定　　按 Trizol 试剂使用说明书提取胎盘组织总 RNA，以提取总 RNA 为模板，RT-PCR 扩增目的片段，条件为 94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min。扩增产物回收后用 T/A 法克隆入 pMD-18T 载体进行序列测定。

1.2.3　hLNα4LG1 原核表达载体的构建及表达　　按常规的分子生物学实验方法将 hLNα4LG1 cDNA 片段定向亚克隆至原核表达载体 pET-28a 中，转入 BL21（*DE*3）工程菌中用 IPTG 诱导表达（终浓度 1 mmol/L），12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定表达结果。

1.2.4　目的蛋白的 Ni-NTA 纯化　　按 Qiagen 公司 Ni-NTA 使用说明书进行。纯化蛋白经透析复性、SDS-PAGE 电泳和薄层扫描分析蛋白纯度后冻干保存。

1.2.5　hLNα4LG1 蛋白的 Western 印迹分析　　以 hLNα4LG1 的原核表达产物为抗原，按常规方法进行 Western 印迹分析，其中一抗使用 800 倍稀释的小鼠抗人 His 抗体、二抗为 1 500 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG，最后经 DAB 显色。

1.2.6　hLNα4LG1 生物学活性检测

1.2.6.1　目的蛋白对人肺癌 A549 细胞伸展率的影响　　将纯化的 hLNα4LG1 蛋白冻干粉溶于 PBS 溶液，配成 80 mg/L 浓度，再倍比稀释成 80、40、20、10、5 mg/L 5 种浓度，每浓度为一实验组。将各浓度按每孔 50 μl 包被 96 孔板，每种浓度 4 孔，阴性对照为 30 mg/L BSA。将 96 孔板置于 4 ℃过夜。用 PBS 液洗 2 次，加 30 mg/L BSA 室温封闭 1 h，PBS 再洗 2 次。将人肺癌 A549 细胞系用 0.25% 胰酶消化后收集细胞，用无血清 F-12 培养液清洗 2 遍，再用无血清 F-12 重悬细胞，调整细胞浓度至 1×10^7/L，以每孔 100 μl 接种于 96 孔板，37 ℃ 5% CO_2 条件下培养 2 h。取出培养板，倒置显微镜下观察各孔并照相。计数伸展细胞（即至少有 1 个细胞质突起的细胞）数和未伸展细胞数，每组至少计数 100 个细胞，计算伸展细胞的百分率。

1.2.6.2　目的蛋白对人肺癌 A549 细胞附着率的影响　　实验分组及 96 孔板的包被与 1.2.6.1 方法相同，另设一不作包被的空白对照组，用于计算附着率。接种细胞浓度为 2×10^7/L。常规培养 24 h 后吸去各孔培养液（空白组除外），PBS 洗 2 次以去除未贴壁的细胞，各孔加 100 μl 无血清 DMEM 培养液及 20 μl MTT［3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐］，继续培养 4 h，倒置显微镜下观察结晶物形成情况，吸去孔内培养液，每孔加入 150 μl 二甲亚砜（DMSO），在酶标仪 490 nm 下测光吸收值（OD 值），计算各组附着率。

1.3　统计学方法

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS 10.0 统计软件进行双样本 t 检验。

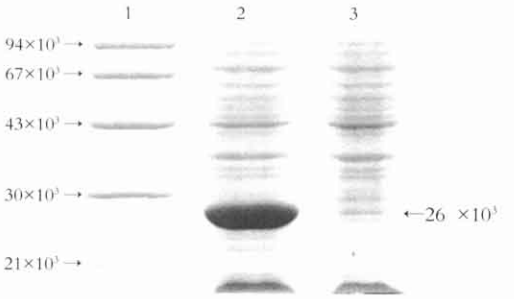
2　结果

2.1　hLNα4LG1 的序列测定

将克隆的 hLNα4LG1 cDNA 片段连入 pMD-18T 载体中，用通用引物 M13 进行测序，测序结果与 GenBank 中序列用 DNASIS 软件进行同源性比较，结果表明大小为 534 bp 的 hLNα4LG1 cDNA 序列与 GenBank 中序列（登录号 002290）完全一致（结果未列出）。

2.2　hLNα4LG1 在原核细胞中的表达结果

将构建好的原核表达载体转入 BL21（DE3）大肠杆菌中用 IPTG 进行诱导表达，12% SDS-PAGE 电泳结果可见与理论分子量（26×10^3）大小相符的目的蛋白带（图 1）。经薄层扫描分析，目的蛋白大约占菌体总蛋白的 42%。

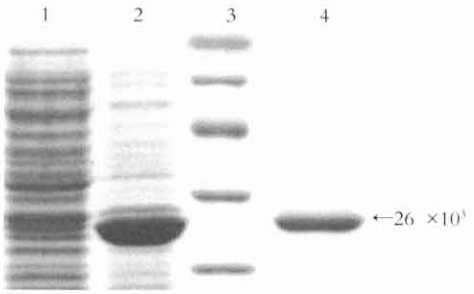


1：低分子量蛋白标准；2：pET-28a/hLNα4LG1 重组菌；3：pET-28a 对照菌

图 1　hLNα4LG1 重组菌的 12% SDS-PAGE 分析结果

2.3　目的蛋白的纯化结果

用 Ni-NTA 亲和介质纯化目的蛋白，12% SDS-PAGE 对纯化效果进行鉴定，结果如图 2。从图中可看出，与未纯化的蛋白相比，纯化后的 hLNα4LG1 蛋白含很少的杂蛋白，纯度在 95% 以上，纯化效果明显。

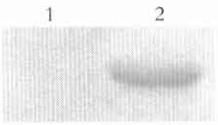


1：pET-28a 对照菌；2：pET-28a/hLNα4LG1 重组菌总蛋白；3：低分子量蛋白标准；4：纯化后的 hLNα4LG1 蛋白

图 2　hLNα4LG1 蛋白的纯化

2.4　hLNα4LG1 融合蛋白的 Western 印迹分析结果

以 hLNα4LG1 的原核表达产物为抗原，以小鼠抗人 His 抗体为一抗、以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗，进行 Western 印迹分析，结果（图 3）表明，使用小鼠抗人的 His 抗体可以很特异地检测到融合有 6×His 标签的 hLNα4LG1 目的蛋白带，进一步证实该蛋白带确实是我们所需的目的蛋白带，也初步说明所表达的 hLNα4LG1 蛋白具有良好的抗原性。



1：pET-28a 对照菌；2：pET-28a/融合蛋白重组菌

图3 融合蛋白 Western blot 分析结果

2.5 hLNα4LG1 蛋白的活性检测

2.5.1 hLNα4LG1 蛋白对人肺癌 A549 细胞伸展的影响 固相结合实验观察了人肺癌 A549 细胞在 hLNα4LG1 蛋白包被培养板上的伸展情况，并绘制了细胞的伸展率曲线（图4），结果显示，常规培养 90～120 min 后 10 mg/L 的目的蛋白即可促进肺癌细胞的伸展，当浓度达 40 mg/L 时，肺癌细胞的伸展率可达约 80%。倒置显微镜下形态学观察可见，肺癌细胞伸展良好，胞体丰满，细胞成梭形或多角形，即胞体周围有数个长短不等的细胞质突起，而阴性对照组细胞大多呈圆形，无细胞质突起，细胞几乎无伸展。结果表明，hLNα4LG1 蛋白有促进人肺癌 A549 细胞伸展的活性。

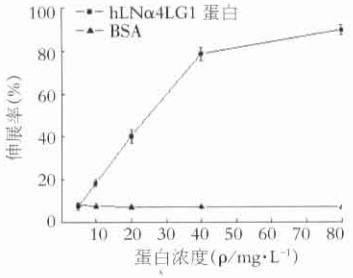


图4 hLNα4LG1 蛋白对肺癌 A549 细胞伸展率的影响

2.5.2 hLNα4LG1 蛋白对人肺癌 A549 细胞附着率的影响 用 MMT 法检测人肺癌 A549 细胞在 hLNα4LG1 上的附着率，结果见图5。随着 hLNα4LG1 蛋白浓度的增加，肺癌细胞附着率逐渐增高，当浓度在 10 mg/L 以上时，作用尤其显著（$P<0.01$），说明 hLNα4LG1 蛋白可有效促进肺癌细胞的附着。

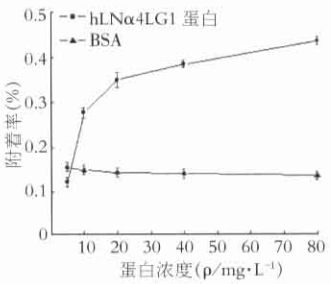


图5 hLNα4LG1 蛋白对肺癌 A549 细胞附着率的影响

3 讨论

LNα4 链是构成 LN-8 和 LN-9 的一个组分，主要在内皮、外周神经的束膜及发育中肌纤维周围的基底膜中表达[6]。α4 链的缺失会导致胚胎及新生儿期婴儿出血和微血管生成受到抑制，同时与肿瘤转移过程中微血管的生成有关，LG 组件在这些过程中发挥着重要作用[7]。α4 链的 G 域包含 LG1-LG5 5 组件部分，其中 LG1 组件含有 αVβ3 和 β1 整合素的结合位点，用这两种整合素的抗体可抑制内皮细胞对 LG1 的黏附[7]。到目前尚未确定这些相关受体在 LG1 组件上的具体作用位点及这些位点是否与肿瘤细胞的浸润转移相关。本研究以 hLNα4LG1 为研究对象，表达重组的 hLNα4LG1 蛋白并检测其生物学活性，旨在研究 LG1 组件与肿瘤浸润转移的关系并为相关功能位点的研究打下了基础。本研究所克隆的 hLNα4LG1 cDNA 片段与 GenBank 中序列（登录号 002290）同源性为 100%，可进行下一步的研究工作。为高效表达 hLNα4LG1 蛋白，本研究选用了 T7 表达系统中的 pET-28a 表达载体。pET 系列载体以 T7 为启动子，可使目的基因得到高效转录与翻译。在实验中观察到，在 IPTG 终浓度为 2 mmol/L，诱导时间 4 h 时，目的蛋白表达量达到最大（占菌体总蛋白量的 40% ～45%）。由于该表达系统在目的表达产物的 N 端融合了一段 6×His 的标签序列，可以很方便的使用镍柱纯化目的蛋白并进行免疫学鉴定，本实验使用 Ni-NTA 亲和介质很好地纯化了目的蛋白，并特异地检测到了相应的目的蛋白带。生物学活性检测表明，所制备的 hLNα4LG1 具有明显促进人肺癌 A549 细胞黏附和伸展的活性，且具有剂量依赖效应，从而为进一步研究 LG 组件在介导细胞黏附及肿瘤浸润转移过程中的作用和途径打下了基础。

参考文献：

[1] PAEZ-PEREDA M, KUCHENBAUER F, ARZT E, *et al*. Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix[J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(10): 1487－1494.

[2] YOKOYAMA F, SUZUKI N, HARUKI M, *et al*. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides[J]. Biochemistry, 2004, 43(42): 13590－13597.

[3] SPESSOTTO P, GRONKOWSKA A, DEUTZMANN R, *et al*. Preferential locomotion of leukemic cells towards laminin isoforms 8 and 10 [J]. Matrix Biol, 2003, 22(4): 351－361.

[4] HIBINO S, SHIBUYA M, ENGBRING J A, *et al*. Identification of an active site on the laminin alpha5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy[J]. Cancer Res, 2004, 64(14): 4810－4816.

[5] 戴旭芳，连继勤，张玉静，等. 人层粘连蛋白 α4 链 LG3-4 组件的克隆和表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(11)：1109－1112.

[6] IIVANAINEN A, KORTESMAA J, SAHLBERG C, *et al*. Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain[J]. J Biol Chem, 1997, 272(44): 27862－27868.

[7] GONZALEZ A M, GONZALES M, HERRON G S, *et al*. Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior *in vitro* and angiogenesis *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 16075－16080.

（编辑 汪勤俭）