论著

文章编号:1000-5404(2006)14-1476-03

用硫氧还蛋白融合表达系统表达小鼠内皮抑素的方法研究

马卫列,刘 芳,何承伟 (广东医学院生物化学教研室,湛江 524023)

提 要:目的 探索用硫氧还蛋白融合表达系统表达小鼠内皮抑素(endostatin)重组蛋白的最佳生产工艺路线。**方法** 用pThioHis-endo重组质粒转化不同的大肠杆菌BL21、JM109、DH5α,经几种不同浓度的异丙基硫代半乳糖苷(isopropylthio- galactoside,IPTG)诱导表达重组融合蛋白,或诱导表达不同时间后,采用SDS-PAGE分析表达产物;按所优化的条件进行重组内皮抑素的表达、包涵体的提取、洗涤、变性和复性,最后经Ni^+柱纯化,再通过SDS-PAGE分析纯化的结果。**结果** 3种大肠杆菌表达效果相差无几,最佳IPTG的浓度0.9 mmol/L,最佳诱导时间为5 h,经Ni^+柱纯化后可获得可溶性的重组内皮抑素。**结论** 利用本实验的优化条件可获得高产量、高纯度、可溶性的小鼠内皮抑素重组蛋白。

关键词:endostatin;硫氧还蛋白融合表达系统;融合蛋白

中图法分类号:Q503;Q51;Q591.2 **文献标识码**:A

To express mouse endostatin by thioredoxin fusion expression system

MA Wei-lie, LIU Fang, HE Cheng-wei (Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To explore the best technology to produce recombinant mouse endostatin by thioredoxin fusion expression system. **Methods** The recombinant plasmid pThioHis-endo was further transformed into different *E. coli.*, including BL21, JM109, DH5α. After induction with IPTG of different concentration or for different time period, thioredoxin-endo fusion protein was expressed in *E. coli.* and the product was identified by SDS-PAGE. The recombinant endostatin expression and extraction, wash, degeneration and refolding of inclusion bodies were carried out by the optimized route, and the product was further purified by affinity chromatography through Ni^+ column and identified by SDS-PAGE. **Results** No difference of endostatin expression in BL21, JM109, DH5α was found. The optimal concentration of IPTG was 0.9 mmol/L and optimal inductive phase was 5 h. The soluble recombinant endostatin could be obtained by affinity chromatography through Ni^+ column. **Conclusion** Soluble endostatin recombinant fusion protein of high purity and yield could be obtained by the optimized technique route.

Key words: endostatin; thioredoxin fusion expression system; fusion protein

内皮抑素(endostatin)是O'Reilly等[1]于1997年从小鼠血管内皮瘤中发现的一种血管生成抑制剂,相对分子质量为20 000。研究证明,内皮抑素是胶原XVIII的酶解产物,为其非胶原结构区的C末端片段。Yamanaka等[2]研究发现,将含有内皮抑素基因的病毒注入小鼠脑瘤瘤体内可明显抑制肿瘤生长。内皮抑素通过与血管内皮细胞表面的整和素(integrin)结合抑制新生血管的形成[3],控制肿瘤细胞的生长和转移,对正常细胞没有任何不良影响。因此,内皮抑素的研究为肿瘤的治疗开辟新的途径。

为了进一步探讨内皮抑素用于肿瘤生物治疗的可行性,本实验选用硫氧还蛋白融合表达系统表达内皮抑素,为了探索最佳的生产工艺路线,首先对几种不同的大肠杆菌表达效果进行比较,选择最佳菌株,其次用不同浓度的异丙基硫代半乳糖苷(isopropylthiogalactoside,IPTG)诱导蛋白质的表达,诱导的时间也各不相同,通过SDS-PAGE分析表达产物,制定最佳的表达方案;表达产物为包涵体,将包涵体纯化,利用硫氧还蛋白末端的组氨酸残基可专一性的结合镍的特性,通过镍柱亲和层析进一步对内皮抑素融合蛋白进行纯化,得到可溶性的、高纯度的内皮抑素融合蛋白,为以后大量生产及临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

硫氧还蛋白融合表达载体pThioHisA质粒由中国农业大学

基金项目:广东省卫生厅青年科研基金资助项目(B2000118),湛江市科技计划项目(2000072)

Supported by the Foundation for Young Scholars by Public Health Department of Guangdong Province(B2000118) and the Sci & Tech Research Foundation of Zhanjiang(2000072)

作者简介:马卫列(1970-),女,四川省盐亭县人,硕士,讲师,主要从事肿瘤生化方面的研究。电话:(0759)2388581-1, E-mail: wuyingjiang@163.com

通讯作者:何承伟,电话:(0759)2388582

收稿日期:2005-04-02;修回日期:2006-01-10

生物学院微生物系杨苏生教授惠赠；pThioHisA-endo 重组质粒由本室制备，Nickel Chelate Affinity Matrix（Ni-CAM）树脂购自 Sigma 公司，大肠杆菌 BL21 菌株为本室保存；过硫酸铵，脱氧胆酸钠等购自华美生物工程公司。

1.2　方法

1.2.1　含有目的基因的重组质粒 pThioHisA-endo 融合蛋白的表达

1.2.1.1　重组质粒 pThioHisA-endo 转化不同的大肠杆菌　用 $CaCl_2$（0.1 mmol/L）分别处理 BL21、JM109、DH5α 细菌，制备感受态细菌；加 2 μl pThioHisA-endo 重组质粒（10 ng/μl）入 100 μl不同的感受态细菌中转化。

1.2.1.2　加入不同浓度的 IPTG 诱导融合蛋白的表达　在 D（590）为 0.5 左右的培养基中加入不同浓度的 IPTG，终浓度分别为 0、0.01、0.05、0.1、0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L，诱导 5 h，观察诱导蛋白质量的差别。4 000 r/min（4 ℃）离心收集菌体，-20 ℃保存备用。

1.2.1.3　加入 IPTG 后，诱导不同时间　在 D（590）为 0.5 左右的培养基中加入 IPTG，终浓度为 0.8 mmol/L，分别诱导 0、1、2、3、4、5、6、7 h，观察诱导蛋白质量的差别。4 000 r/min（4 ℃）离心收集菌体，-20 ℃保存备用。

1.2.2　表达产物的鉴定　取上述 -20 ℃冻存的各种条件下诱导获得的菌液，加入 1 μl PMSF（苯甲基磺酰氟）、5 μl 溶菌酶和 5 μl（1 mg/ml）的脱氧胆酸，不停摇动混匀，使细菌裂解，加入 5 μl DNaseI（1 U/μl），混匀，37 ℃ 1 h 离心，沉淀为不溶解蛋白，上清即为可溶性蛋白，分别取上清液和沉淀，加入上样缓冲液，沸水浴 5 min，用 10% SDS-PAGE 进行电泳，0.25% 考马斯亮蓝 R250 染色。电泳结束后，用灰度扫描软件分析重组蛋白的表达量。

1.2.3　融合蛋白的纯化

1.2.3.1　工程菌的发酵　取 IPTG 诱导 5 h 后的 BL_2 菌液 1.5 ml～2 L 含氨苄的 LB 培养基中，37 ℃培养 5 h 左右至 D（600）为 0.5，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，诱导 5 h，2 500 ×g（4 ℃）离心 8 min，收集诱导表达的菌体。

1.2.3.2　包涵体的纯化和洗涤　细菌沉淀悬浮于 200 ml buffer A（0.1 mol/L Tris-Cl pH 8.0，5 mol/L EDTA），加入溶菌酶（50 μg/ml），30 ℃放置 15 min，加入 0.1% 脱氧胆酸钠（SOC），超声破碎 10 s 5 次；8 000 ×g 离心 10 min（4 ℃），弃上清，得包涵体。洗涤是将沉淀重悬于含 0.1% SOC 的 buffer A 中，8 000 ×g 离心 10 min（4 ℃），弃上清；可重复洗涤 2 次。

1.2.3.3　包涵体的溶解　沉淀用 30 ml buffer B（0.05 mol/L Tris-Cl pH 8.0，1% 十二烷基肌酸钠，1 mol/L DTT）溶解，8 000 ×g，4 ℃离心 10 min，取上清液。

1.2.3.4　包涵体的透析和复性　上清转入截留分子量为 8 000的透析袋中，于 1 500 ml buffer C（0.05 mol/L Tris-Cl pH 8.0，0.1 mol/L DTT）透析 4 h（4 ℃），再重复透析 1 遍；样品再次放入 1 500 ml buffer D（0.05 mol/L Tris-Cl pH 8.0）中透析 4 h，2 遍；样品再次放入 1 000 ml buffer E（0.05 mol/L Tris-Cl pH 8.0，0.01 mmol/L氧化型谷胱甘肽，1 mmol/L 还原型谷胱甘肽）透析4 h，2 遍。最后样品放于 0.05 mol/L Tris-Cl pH 8.0 透析 5 h，2 遍，以去除谷胱甘肽。

1.2.3.5　镍柱亲和层析进一步纯化内皮抑素融合蛋白　将 Ni-CAM 亲和树脂装到层析柱里，用去离子水清洗树脂，平衡液冲洗，去处乙醇残留。将待纯化的蛋白质溶液加到层析柱内树脂上，加平衡液冲洗。当过柱后的平衡液 D（280）保持稳定，不再减少，接近平衡液本身的 pH 值时，开始用洗脱液洗脱含目的蛋白的 Ni-CAM 亲和树脂，收集含有目的蛋白的洗脱液。用考马斯亮蓝法测蛋白浓度，计算蛋白质获得率，并且再进行 1 次 SDS-PAGE 凝胶电泳，鉴定蛋白质的纯度。蛋白溶液保存于 -20 ℃中，供活性测定使用。

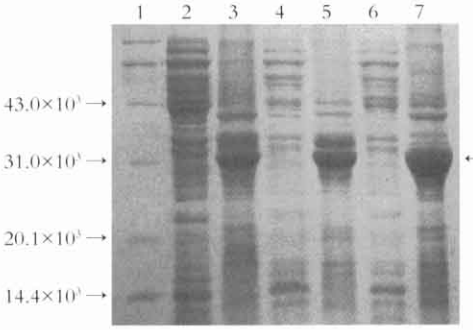
1.3　统计学方法

采用 Excell 2003 软件 t 检验。

2　结果

2.1　融合蛋白表达的鉴定

2.1.1　不同的大肠杆菌表达结果　将菌体裂解离心后分别取其上清和沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，表达产物在相对分子量约 32×10^3 处出现了 1 条明显的新蛋白带，其大小与理论推算的融合蛋白相对分子量相符合（内皮抑素为 20×10^3，硫氧还蛋白为 11.7×10^3），不论哪种大肠杆菌，融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中，上清液组几乎未见有重组蛋白区带；灰度扫描软件分析显示 BL21 菌株目的蛋白表达量约占菌体总蛋白的 35.9%，JM109 为 35.0%，DH5α 为 36.1%，3 种大肠杆菌表达目的蛋白的量无明显差异（$P>0.05$），以 BL2 菌株做为后续研究（图 1）。

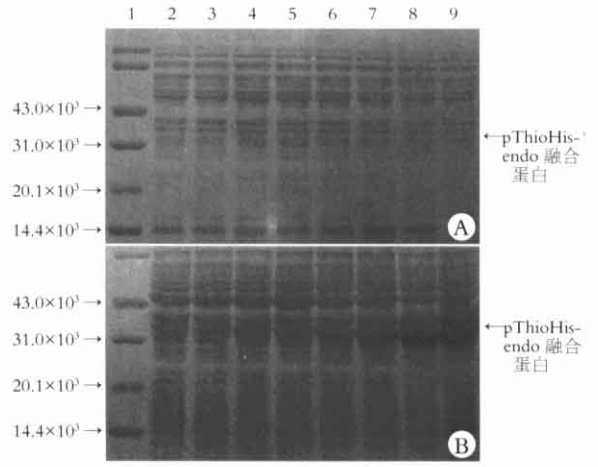


1：蛋白标准；2，3：DH5α 工程菌表达的 pThisHis-endo 融合蛋白 + 1 mmol/L IPTG 上清液和沉淀；4，5：JM109 工程菌表达 pThisHis-endo + 1 mmol/L IPTG 上清和沉淀；6，7：BL21 工程菌表达的 pThisHis-endo + 1 mmol/L IPTG 上清和沉淀

图 1　10%SDS-PAGE 鉴定 pThioHisA-endo 重组质粒在 3 种不同大肠杆菌中的表达

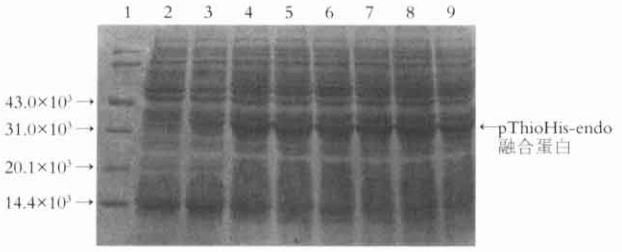
2.1.2　加入不同浓度的 IPTG 诱导融合蛋白的表达结果　SDS-PAGE 凝胶电泳检测结果可知，随着 IPTG 浓度加大，蛋白表达量增加，0.9 mmol/L 组表达量最高，1.2 mmol/L 组的表达量低于 0.9 mmol/L 组。融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中，上清液组几乎未见有重组蛋白区带（图 2）。

2.1.3　加入 IPTG 后诱导不同时间融合蛋白表达结果　SDS-PAGE 凝胶电泳检测结果可知，在第 5 小时和第 6 小时蛋白表达量最高，第 7 小时有所降低。故诱导 5 h 为最佳诱导时间，融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中（图 3），上清液组几乎未见有重组蛋白区带。



A:上清液; B: 总蛋白. 1:蛋白标准; 2:未加 IPTG 诱导的融合蛋白; 3:0.01 mml/L IPTG 诱导的融合蛋白; 4-9:分别为 0.05、0.1、0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L IPTG 诱导

图2 不同浓度 IPTG 诱导的 pThioHisA-endo 重组质粒在大肠杆菌中的表达

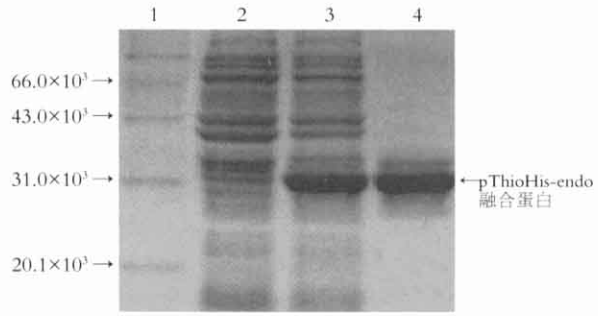


1:蛋白标准; 2:未经 IPTG 诱导的融合蛋白; 3-9: IPIG 分别诱导 1、2、3、4、5、6、7 h

图3 加入 0.8 mml/L IPTG 后诱导不同时间的 pThioHisA-endo 重组质粒在大肠杆菌中的表达(总蛋白)

2.2 内皮抑素融合蛋白纯化结果的鉴定

经过对包涵体的提取、溶解、复性、透析、镍柱亲和层析等步骤,内皮抑素融合蛋白被纯化,经过 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定,在相对分子量约 32×10^3 处仅见 1 条目的蛋白区带,纯度可达 95%(图 4)。



1:蛋白标准; 2:未经 IPTG 诱导的融合蛋白; 3:经 IPTG 诱导的融合蛋白; 4:经镍柱亲和层析纯化的硫氧还融合蛋白

图4 10% SDS-PAGE 电泳鉴定镍柱亲和层析纯化的硫氧还融合蛋白

3 讨论

内皮抑素作为一种较强的血管生成抑制药,治疗肿瘤具有光谱、低毒及不产生耐药性等特点,因而备受关注。重组内皮在美国已进入Ⅱ期临床实验阶段,对多种肿瘤都有确切的治疗效果[4]。重组内皮抑素常用的表达系统有大肠杆菌、毕赤酵母菌和真核细胞等。用一般的大肠抗菌表达体系每升发酵液虽能得到 30~40 mg 纯内皮抑素,但 99% 未经正确折叠而无活性。昆虫细胞和酵母细胞表达体系[5]虽能表达出有活性的蛋白质,但产量低,每升发酵液仅能得到 10 mg 以下纯内皮抑素,且其构建过程复杂,培养条件较苛刻,总的结果是成本高,产量小。如何获得成本低、产量高、制备过程简单的方法成为一个研究的方向。

为了高效、低成本制备内皮抑素,本实验选用硫氧还蛋白融合蛋白表达系统,它特别适用于在大肠杆菌中高产量表达可溶性蛋白质。借助硫氧还蛋白的分子伴侣作用,表达出的蛋白质大多能正确折叠并表现出全部生物学活性。本实验选用 pThioHisA 作为表达载体,其特点是克隆有大肠杆菌的硫氧还蛋白(thioredoxin, trxA)基因,表达的硫氧还蛋白分子量为 11.7×10^3。硫氧还蛋白的特点是在编码的外源蛋白的 N 端和 C 端均有利于检测及纯化的融合蛋白标签,N-端的 HP-TrxA 可增加翻译的效率和外源蛋白的溶解性,C-端有 6 个组氨酸残基,使重组蛋白可通过镍柱亲和层析技术得以快速纯化。本研究主要目的是为了摸索内皮抑素重组蛋白表达的最佳生产路线,将小鼠内皮抑素基因插入 pThioHisA 载体,转化不同的大肠杆菌,用不同浓度的 IPTG 诱导蛋白表达,IPTG 诱导不同时间段,确立最终的实验方案,此方案低成本、高产出,流程简单,获得的目的蛋白效果显著。本实验选用 pThioHisA 载体,同时还希望获得可溶性蛋白,但其表达仍主要以包涵体形式存在。经过对包涵体的提取、溶解、复性、透析、镍柱亲和层析等步骤可获取可溶性蛋白。

参考文献:

[1] O'REILLY M S, BOEHM T, SHING Y, *et al*. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.

[2] YAMANAKA B, ZULLO S A, RAMSEY J, *et al*. Induction of therapeutic antitumor antiangiogenesis by intratumoral injection of genetically engineered endostatin-producing Semliki Forest virus [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(10): 796-802.

[3] REHN M, VEIKKOLA T, KUKK-VALDRE E, *et al*. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(3): 1024-1029.

[4] CAPILLO M, MANCUSO P, GOBBI A, *et al*. Continuous infusion of endostatin inhibits differentiation, mobilization, and clonogenic potential of endothelial cell progenitors[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 377-382.

[5] DHANABAL M, RAMCHANDRAN R, VOLK R, *et al*. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 189-197.

(编辑 周 芳)