基础研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1235-04

人重组蛋白 nm23-H1 突变体原核表达纯化与鉴定

杨雪琴[1],周清华[2],王 东[1],王 阁[1],马 力[2],朱大兴[2]

(1.第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042;2.天津医科大学总医院天津市肺癌研究所,天津 300052)

【摘 要】目的:构建 nm23-H1 的 S120G,S120G-P96S 及 S44A 突变体原核表达载体,并在大肠杆菌中表达及纯化。方法:通过 PCR 方法扩增突变型 nm23-H1 目的片段,利用基因重组技术构建 pET28a-nm23-H1 突变型原核表达载体,并进行酶切和测序鉴定,鉴定正确克隆转化 BL21(DE3)溶源菌,进行蛋白表达及可溶性分析,同时采用 NI-NTA 镍柱亲和层析法进行纯化,应用 Western blot 方法对纯化后蛋白进行鉴定检测。结果:通过酶切和测序鉴定,pET28a-nm23-H1 突变型原核表达载体序列正确,编码框正确。转化溶源菌后能够表达目的蛋白,蛋白表达量高;其中,S44A 为可溶性表达,S120G 以可溶性表达为主,少部分为包涵体表达,而 S120G-P96S 则大部分为包涵体表达;Western blot 检测结果提示 3 个突变型 nm23-H1 蛋白分子量均为 20 kD,与预计值相符。结论:成功构建 nm23-H1 的 S120G,S120G-P96S 及 S44A 突变体原核表达载体,S120G 和 S44A 蛋白可以用于下一步实验研究,而 S120G-P96S 突变体则可能不适于下一步研究。

【关键词】nm23-H1;突变;原核表达

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-01

Prokaryotic expression, purification and identification of human mutant nm23-H1 protein

YANG Xue-qin, et al

(*Cancer Center, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct prokaryotic expression vector of mutant nm23-H1 (S120G, S120G-P96S, S44A), and then express and purify the proteins. *Methods*: Mutant nm23-H1 fragments were amplified by PCR. The prokaryotic expression vectors of pET28a-nm23-H1 were constructed by gene recombination technique and verified by restriction enzyme analysis and sequencing. The positive clones were transformed into E. coli BL21 (DE3) and soluble analysis of the expression was conducted in these systems. The proteins were purified by nickel column chromatography and identified by Western blot. *Results*: The sequences and open read frames of all the pET28a-nm23-H1 were completely correct. After transforming, these plasmids could express the target proteins. The protein production was very high. Among these mutant proteins, S44A was soluble expression and S120G was partly soluble. However, S120G-P96S was mostly in the inclusion bodies. The molecular weight of these mutant proteins was 20 kD detected by Western blot, which was as the same as the objective protein. *Conclusion*: We have succeeded in constructing the prokaryotic expression vectors of pET28a-nm23-H1 (S120G, S120G-P96S, S44A), and the S120G and S44A proteins can be used in following studies. However, S120G-P96S protein which expressed in this system may not be suitable for the following studies.

【Key words】Nm23-H1; Mutation; Prokaryotic expression

肿瘤的侵袭和转移是多基因、多因子共同作用的结果。转移抑制基因结构和功能的异常将导致对肿瘤转移表型的调控异常，最终引起肿瘤转移。nm23-H1 基因已被证明为肿瘤转移抑制基因,并与癌细胞的转移能力密切相关。但关于 nm23-H1 抑制肿瘤转移的生化机理目前并不清楚,已有研究表明不同位点的突变将影响 nm23-H1 的生物学功能[1],为此本实验在原有工作基础上进一步构建表达了 nm23-H1 的 S120G (120 位丝氨酸→甘氨酸),S120G-P96S(120 位丝氨酸→甘氨酸,96 位脯氨酸→丝氨酸)及 S44A(44 位丝氨酸→缬氨酸)3 个突变体的原核蛋白,拟进行进一步的实验研究。

作者介绍:杨雪琴(1974-),女,讲师,博士,
研究方向:肺癌转移抑制机理。

通讯作者:周清华,男,教授,E-mail:zhouqh1016 @yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

XL1-blue 菌和 BL21(DE3)溶原菌由本实验室保存;pET28a 载体由中山大学刘莉博士馈赠;pEGFP-nm23-H1 突变型质粒(S120G,S120G-P96S 及 S44A)均由本实验室构建[2]。

限制性内切酶 *Not* Ⅰ、*Nde* Ⅱ、*EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ，Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶，DNA 连接试剂盒均购自 TAKARA 公司。PCR 产物纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购自赛百盛公司。NI-NTA spin kits 蛋白纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。蛋白 marker 购自美国 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建与鉴定 由于 pEGFP-nm23-H1 质粒和 pET28a 载体之间没有合适的酶切位点，因此不能通过酶切连接来构建载体，S120G，S120G-P96S 及 S44A 3 个原核表达载体均通过 PCR 方法构建。具体过程如下：根据序列图谱设计引物，上游引物引入 *Nde* Ⅰ酶切位点，下游引物引入 *Not* Ⅰ酶切位点。上游引物：5'-GGGAATTCCATATGTTCGAATTCATGGCCAACTGTG-3'；下游引物：5'-ATAGTTTA GCGGCCGCTTATGGATCCTCATAGATCCAG-3'。PCR 反应体系采取试剂盒说明书建议用量：95℃ 3 min 预变性；94℃ 30 s 变性，61℃ 40 s 退火，72℃ 1 min 延伸，共 30 个循环；最后延伸 72℃ 6 min，4℃终止反应。2%琼脂糖凝胶电泳检测。胶回收法纯化、回收目的片断。扩增产物通过 *Nde* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切插入 pET28a 载体，重组质粒采用 *EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ酶进行酶切鉴定，鉴定正确的克隆再送大连宝生物公司测序。

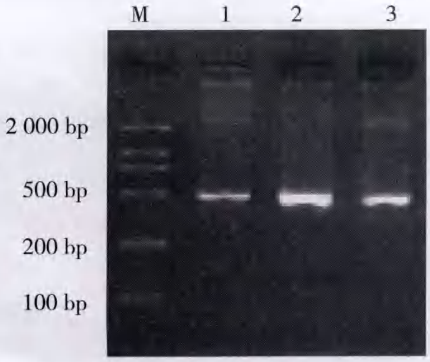
1.2.2 蛋白的诱导表达与纯化 上述鉴定正确的克隆转化 BL21（DE3）溶源菌表达。其中诱导温度为 30℃，诱导时间 4 h，IPTG 1mmol/L，可溶性分析采用超声裂解，离心后分别取沉淀和上清电泳。纯化方法按试剂说明书进行，非变性条件下纯化方法：细菌裂解采用溶菌酶 + 超声裂解，其中咪唑浓度采用 5 mmol/L 挂柱，10 mmol/L 和 20 mmol/L 洗涤，250 mmol/L 和 300 mmol/L 洗脱目的蛋白。变性条件下纯化方法：pH8.0 挂柱，pH6.3 洗涤 2 次，pH4.5 洗脱目的蛋白 2 次。

1.2.3 Western blot 鉴定 电泳时每孔上样量为 200 ng 纯化蛋白（5%的浓缩胶以及 12.5%的分离胶），电泳后转至 PVDF 膜（100 V，70 min），封闭液封闭 1 h（含 15%脱脂奶粉的 TBS 液），nm23-H1 抗体按 1∶1 000 稀释（稀释液为含 0.05%Tween 的 TBS 液），4℃孵育过夜，二抗山羊抗兔 IgG 按 1∶4 000 稀释，室温孵育 1 h，最后应用 ECL 化学发光法显色。

2 结 果

2.1 突变型 nm23-H1 PCR 扩增结果

应用 PCR 的方法从 pEGFP-nm23-H1 突变型质粒（S120G，S120G-P96S 及 S44A）分别扩增出 nm23-H1 相应的 3 个片段，经电泳显示条带特异，条带大小均为 503 bp，与预期结果相符（图 1）。



M. marker；1. S120G；2. S120G-P96S；3. S44A

图 1 突变型 nm23-H1 的 PCR 扩增结果

2.2 突变型 pET28a-nm23-H1 重组质粒酶切鉴定与测序

质粒经 EcoR Ⅰ和 BamH Ⅰ酶切后，电泳结果显示插入片段为 490 bp 大小，与预计结果相符（图 2）。双酶切鉴定阳性结果送大连宝生物公司测序，结果插入序列完全正确，编码框亦正确无误。

2.3 突变型 nm23-H1 蛋白表达及可溶性分析

在 IPTG 1 mmol/L 浓度下，分别于诱导前及诱导后 6 h 取全菌 1 ml 电泳，从电泳结果可见，突变型 pET28a-nm23-H1 在 25~18.4 kD（接近 23 kD）处均有一不同于诱导前的蛋白条带，该条带即为目的蛋白。本载体的蛋白表达量高，蛋白表达一般在 37%~50%（图 3）。

另外，电泳结果还显示 S44A 为可溶性表达；而 S120G 除可溶性表达外，同时可见部分以包涵体的形式表达，约占 20.1%。S120G-P96S 则大部分为包涵体表达，少量为可溶性表达，包涵体占 72.1%（图 4）。

2.4 突变型 nm23-H1 蛋白纯化结果

本研究所表达的目的蛋白在氨基端都带有 6 × His 标签，因此纯化采用镍柱亲和纯化法，除 S120G-P96S 突变体在变性条件下进行纯化外，其余均在非变性条件下纯化。非变性条件下纯化应用 5 mmol/L 咪唑挂柱，分别用 10 mmol/L 和 20 mmol/L 洗涤杂蛋白，最后用 250 mmol/L 和 300 mmol/L 洗脱出目的蛋白。从电泳结果看，经纯化后可见在 25~18.4 kD（接近 23 kD）处有一单一蛋白条带，未见明显杂带，nm23-H1 蛋白回收率为 16%~30%，平均为 25%（图 5、图 6）。

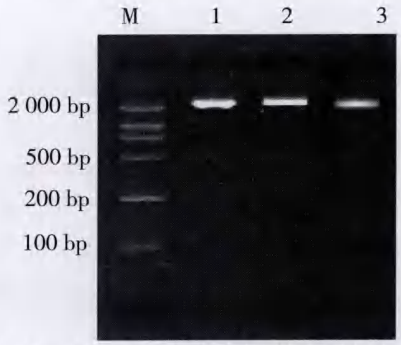
同样在变性条件下纯化，S120G-P96S 突变体应用 pH8.0 挂柱，pH6.3 洗涤杂蛋白两次，pH4.5 洗脱目的蛋白。从电泳结果可见在 25~18.4 kD（接近 23 kD）处有一单一蛋白条带，未见明显杂带，蛋白回收率为 39%（图 7）。

2.5 突变型 nm23-H1 蛋白 Western blot 检测结果

表达蛋白质为融合蛋白，即为 His-nm23-H1，3 个蛋白的预计分子量均为 20 kD，Western blot 采用兔抗人 nm23-H1 多克隆抗体检测，结果在 20 kD 处均有一目的条带，且条带特异，与预计大小相符（图 8）。

3 讨 论

nm23 基因是首先由美国国立癌症研究所 Steeg



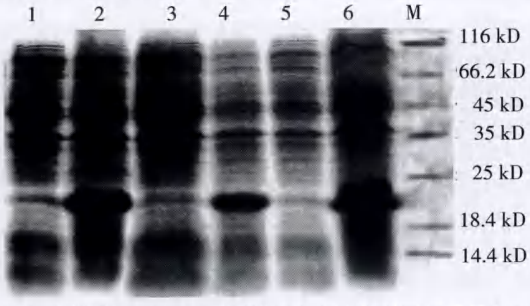
M. marker；1. S120G；2. S120G-P96S；3. S44A

图 2 突变型 pET28a-nm23-H1 重组质粒双酶切鉴定结果

等[3]发现的。她们在鼠 K-1735 黑色素瘤的 cDNA 文库中通过差异杂交筛选出一个 cDNA 克隆，用这种 cDNA 与 7 株具有不同转移能力的 K-1735 细胞株的 mRNA 进行 Northern 印迹杂交，结果显示此基因在每个细胞株的表达分别与它们的转移能力呈负相关；原位杂交也显示其在低转移细胞株中的转录表达比高转移细胞株增高 10 倍。遂将此基因命名为 nm23 基因（non-metastasis 编号为 23 的 cDNA 基因克隆）。目前已发现人类该基因家族有 8 个成员：nm23-H1、nm23-H2、DR-nm23、nm23-H4、nm23-H5、nm23-H6、nm23-H7 和 nm23-H8。其中研究最多的是 nm23-H1 基因。nm23-H1 基因定位于 17q21.3，该位点被认为非常靠近 p53 基因位点，是许多肿瘤形成基因定位及易发生等位基因杂合性缺失的热点区域，全长约 10 kb，中间隔有 4 kb，含有 5 个外显子和 4 个内含子，其 5'末端含有一 598 个核苷酸的序列的启动子组件。nm23-H1 的 mRNA 由 533 个核苷酸组成，产生的蛋白质含有 152 个氨基酸，分子量为 17 kD。

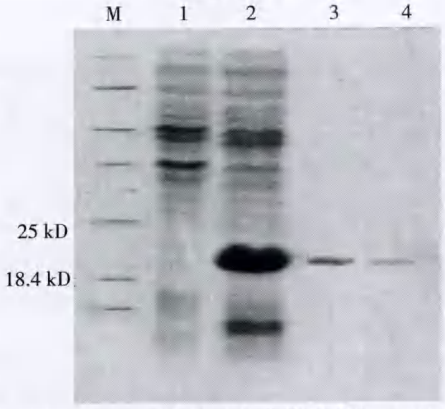
但目前关于 nm23-H1 抑制肿瘤转移的生化机理还并不清楚，研究发现 nm23-H1 蛋白形成的 118 位点组氨酸磷酸化中间体，参与了核苷二磷酸激酶（NDPK）[4]，香叶基-法尼基磷酸转移酶[5]，组氨酸蛋白激酶[6]，以及可能的丝氨酸蛋白激酶活性[7]。这些活性均与细胞的侵袭转移有关[8]。而 120 位的丝氨酸位于 118 位组氨酸磷酸化位点 2 个氨基酸之后，为一潜在的磷酸化位点[9]，被认为通过与甘氨酸氢键的形成有助于活性袋构象的形成。在幼儿神经纤维瘤中的大量数据表明，S120G 突变体（丝氨酸突变为甘氨酸）发生于 22%（6/28 例）的侵袭性（Ⅳ期）肿瘤[10]。丝氨酸 44 位点为另一种非组氨酸的耐酸性磷酸化形式，它可能具有独立的 NDPK 酶活性的生化功能。另外，nm23-H1 中 96 位点的脯氨酸突变为丝氨酸（P96S），为果蝇中的 AWD 蛋白（nm23 同源物）在发育过程中的突变形式。在果蝇中，该突变体与 pn 突变共同存在时，会导致果蝇在第三次中间形态时发生致死性改变[11]。因此对 nm23-H1 突变体蛋白的构建将有助于对 nm23-H1 抑制肿瘤转移机理的深入研究。

本研究在国内首次构建了 nm23-H1 的 S120G 和 S44A 原核蛋白。研究发现 S44A 为可溶性表达；而 S120G 除可溶性表达外，同时可见部分以包涵体的形式表达。但所表达蛋白是否具有生物学活性，还需进一步的酶活性检测，包括其 NDPK 活性及组



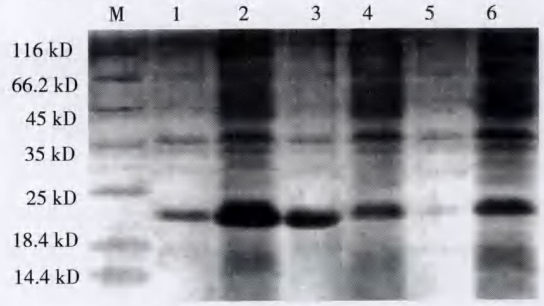
1. S120G- 诱导前；2. S120G- 诱导后；3. S120G-P96S- 诱导前；4. S120G-P96S- 诱导后；5.S44A- 诱导前；6. S44A- 诱导后；M. marker

图 3　突变型 BL21(DE3)-pET28a-nm23-H1 诱导前后的蛋白表达



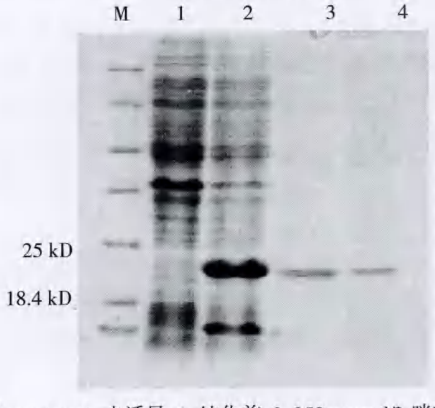
M. marker；1. 未诱导；2. 纯化前；3. 250 mmol/L 咪唑洗脱；4. 300 mmol/L 咪唑洗脱

图 5　S120G 突变体非变性条件下纯化



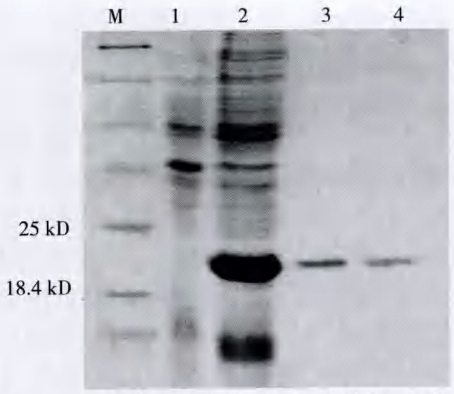
M. marker；1. S120G- 沉淀；2. S120G- 上清；3. S120G-P96S- 沉淀；4. S120G-P96S- 上清；5. S44A- 沉淀；6. S44A- 上清

图 4　突变型 BL21(DE3)-pET28a-nm23-H1 蛋白表达可溶性分析



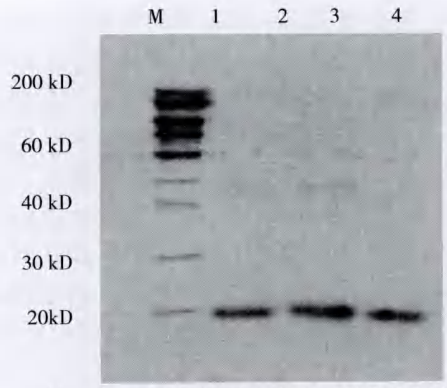
M. marker；1. 未诱导；2. 纯化前；3. 250 mmmol/L 咪唑洗脱；4. 300mmol/L 咪唑洗脱

图 6　S44A 突变体非变性条件下纯化



M. marker;1.未诱导;2.纯化前;3.pH4.5 洗涤;4.pH4.5 洗涤

图 7　S120G-P96S 突变体变性条件下纯化



M.marker;1.S120G;2.S120G-P96S;3.S44A

图 8　突变型 nm23-H1 蛋白的 Western blot 检测

氨酸、丝氨酸激酶活性等

目前国际上尚无关于 nm23-H1 S120G 和 P96S 双突变体的研究。而 S120G 和 P96S 均为目前自然状态下可检测的两种突变形式,因此 120G 和 P96S 联合突变对于 nm23-H1 生化机理的深入研究具有重要意义。本研究观察到,S120G 突变体的原核表达部分以包涵体的形式出现,而增加了 P96S 突变后的联合突变体则完全以包涵体的形式表达。这说明突变位点的改变有可能影响了蛋白的折叠与构象。我们曾经尝试对该蛋白进行复性,但均未成功。因此初步的研究表明 S120G-P96S 可能不适合原核表达。但近年的研究发现同样具有折叠缺陷的 S120G 在变性条件下纯化后再通过自身磷酸化可以使之迅速恢复至正常的有活性的折叠状态,而 S120G 联合 118 位组氨酸突变后由于失去了该组氨酸磷酸化的中间体则不能复性。因此介于 S120G-P96S 联合突变恰好位于 118 位组氨酸两边,该突变体构象是否掩盖了 118 位点而阻止了自身磷酸化,S120G-P96S 联合突变体能否通过自身磷酸化而恢复构象需要我们进一步研究[12]。

本实验所构建的蛋白为融合了 6 个组氨酸的 His-nm23-H1 融合蛋白,预测蛋白分子量为 20 kD,但在电泳时发现,其表现出的分子量位于 18.5~25 kD,接近 23 kD,而 Western blot 结果表明其分子量为 20 kD,考虑前后不一致的结果可能与所用分子量 marker 不同有关。因此本实验所表达蛋白质与理论值相符。

酶切、测序、Western blot 鉴定结果表明本实验所构建的重组质粒完全正确,S120G 和 S44A 蛋白可以用于下一步实验研究,而 S120G-P96S 原核蛋白则需进一步的复性研究。

参 考 文 献

[1] Yoshida B, Sokoloff M, Welch D, et al. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field[J]. J Nat Cancer Inst, 2000,92(21):1717-1730.

[2] 朱大兴, 周清华, 王艳萍, 等. 利用定点突变技术构建突变 nm23-H1 和 EGFP 融合基因[J]. 中国肺癌杂志,2006,9(2):117-122.

[3] Leone A,Flatow U,King C,et al.Reduced tumor incidence metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23 transfected melanoma cells [J]. Cell,1991,65(1):25-35.

[4] Salerno M, Ouatas T, Palmieri D, et al. Inhibition of signal transduction by the nm23 metastasis suppressor: possible mechanisms[J]. Clin Exp Metastasis, 2003,20(1):3-10.

[5] Wallet V, Mutzel R, Troll H, et al. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development[J]. J Natl Cancer Inst,1990,82(14):1199-1202.

[6] Wagner P, Vu N D. Phosphorylation of geranyl and farnesyl pyrophosphates by Nm23 proteins/nucleoside diphosphate kinases[J]. J Biol Chem,2000,275(45):35570-35576.

[7] Wagner P D, Steeg P S, Vu N D. Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(17):9000-9005.

[8] Inoue H, Takahashi M, Oomori A, et al. A novel function for nucleoside diphosphate kinase in Drosophila[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996,218(3):887-892.

[9] MacDonald N, Freije J, Stracke M, et al. Site-directed mutagenesis of nm23-H1. Mutation of proline 96 or serine 120 abrogates its motility inhibitory activity upon transfection into human breast carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 1996,271(4):25107-25116.

[10] Chang C, Zhu X-x, Thoraval D, et al. Nm23-H1 mutation in neuroblastoma[J]. Nature,1994,370(6488):335-336.

[11] Timmons L, Shearn A. Germline transformation using a prune cDNA rescues prune/killer of prune lethality and the prune eye color phenotype in Drosophila[J]. Genetics, 1996,144(4):1589-1600.

[12] Mocan I, Georgescauld F,Gonin P,et al. Protein phosphorylation corrects the folding defect of the neuroblastoma (S120G) mutant of human nucleoside diphosphate kinase A/Nm23-H1 [J]. Biochem J,2007,403 (1):149-156.

(责任编辑:冉明会)