维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0497 - 04

人 canstatin 基因的克隆、表达、纯化及其生物活性测定

张向荣,孙厚良,曾昭淳

(重庆医科大学基础医学院生物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆人 Canstatin cDNA,在 *E. coli* 中融合表达和纯化,并测定表达产物抑制新生血管生成活性。方法:从中国人胎盘组织提取总 RNA,RT - PCR 扩增出 Canstatin cDNA,克隆入 pTYB1 载体中并测序,构建原核表达载体 pTYB1 - hCAN,IPTG 诱导表达,几丁质亲和纯化,鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成实验进行活性测定。结果:RT - PCR 产物约为 700bp,测序结果与文献报道序列一致。构建了人 Canstatin 原核表达载体 pTYB1 - hCAN,在大肠杆菌中表达。纯化的融合蛋白在 CAM 实验中能明显抑制血管生成。结论:克隆、表达了具有生物学活性的人 canstatin 蛋白。

【关键词】canstatin;克隆;基因表达;蛋白质纯化;抗血管生成

【中国图书分类法分类号】Q78 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 11 - 10

Cloning, expression and purification of human canstatin and assay of its bioactivity

ZHANG Xiangrong, et al

(*The Department of Biochemistry, Academy of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone human canstatin cDNA, express it as fusion protein in *E. coli*, purify the fusion protein and determine its biological activity. *Methods*: Total RNA was extracted from Chinese placenta tissue. The canstatin cDNA was amplified by RT - PCR, then cloned into pTYB1 and sequenced; Prokaryotic expression vector pTYB1 - hCAN was constructed; fusion protein was expressed by using IPTG induction and purified by chitin column. The biological activity of the purified fusion protein was identified by using the chick embryo chorioallantoic membrane assay(CAM). *Results*: RT - PCR product was about 700 bp, its sequence was the same as that of canstatin reported. Prokaryotic expression vector pTYB1 - hCAN of human canstatin was constructed successfully, and the fusion canstatin protein was expressed in *E. coli*. The purity of the protein was 91.6%. The fusion protein could suppress the angiogenesis in CAM. *Conclusion*: The active human Canstatin is cloned and expressed as a bioactive form.

【Key words】Canstatin; Clone; Gene expression; Protein purification; Anti - angiogenesis

Canstatin 是Ⅳ型胶原蛋白 α_2 链的 C 端非胶原区(NC1)[1],它可能通过 Fas 信号转导通路有效抑制内皮细胞增殖、转移并诱导调亡,对移植在动物的实体瘤的生长有显著的抑制效果[2]。为了研究 Canstatin 对血管生成和肿瘤生长的具体作用机制,我们从人胎盘组织中扩增出其 cDNA,并构建了表达载体,在大肠杆菌中的诱导表达。初步纯化的 canstatin,具有抑制鸡胚新生血管(CAM)生成活性,为进一步研究其抑制新血管生成和肿瘤生长作用机制和临床应用奠定了基础。

作者介绍:张向荣(1979 -),男,硕士,
主要研究方向:基因制药的研究。

实验室:重庆市生物化学与分子药理学重点实验室。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌质粒、受体菌 DH5α 系本实验室保存;大肠杆菌表达菌株 ER2566(基因型 F - lamda - fhuA2 [lon] ompT lacZ:: T7 gene1 gal sulA11 D(mcrC - mrr) 114:: IS10 R(mcr - 73:: miniTn10 - - TetS) 2 R(zgb - 210:: Tn10) (TetS) endA1 [dcm]),NEB 公司;原核表达载体 pTYB1,NEB 公司。

1.1.2 工具酶及主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA polymerase 、IPTG 购于 promega 公司和宝生物工程(大连)有限公司;RT - PCR 试剂盒购于华舜生物工程有限公司;DNA 片段的回收采用 Qiagen Gel Extraction Kit;几丁质层析填料,抗几丁质结合区(chitin binding domain, CBD)单克隆抗体,购于 NEB 公司;碱性磷酸酶标记二抗和

维普资讯 http://www.cqvip.com

BCIP/NBT,购于北京中山生物技术有限公司;鸡胚种蛋购于重庆市卫生防疫站;其它主要化学试剂为进口或国产分析纯产品。

1.1.3 组织标本 人胎盘组织取自重庆医科大学附属第一医院妇产科临床标本。

1.1.4 引物 根据胶原蛋白 α_2(Ⅳ)的序列[3]和 Genbank 中报告的序列设计扩增的特异性引物 P1 和 P2,并用 primer premier 5 软件辅助分析,PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。引物序列如下:P1:5′-GGAATTCCATATG-GTCAGCATCGGCTACCTC-3′,含有 Nde Ⅰ(CA! TATG)酶切位点和保护性碱基 GGAATTC;P2:5′-CCGCTC-GAGCAGGTTCTTCATGCACACC-3′,含有 Xho Ⅰ(C! TC-GAG)酶切位点和保护性碱基 CCG。

1.2 方法

1.2.1 人胎盘组织总 RNA 提取 取出液氮保存的新鲜人胎盘组织,迅速用尤 RNase 污染的研钵研磨成粉末状,然后按照 Trizol 试剂(Gibco BRL)的操作说明抽提总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 扩增人 canstatin 基因 按照华舜公司的操作说明,用 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增人 canstatin cDNA。

1.2.3 pTYB1-hCAN 表达载体的构建 1%琼脂糖电泳 PCR 产物,回收目的 DNA 片段 用限制性内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ分别双酶切 DNA 片段和 pTYB1 质粒,回收所需片段。取回收的人 canstatin 片段产物 6μl,回收的质粒片段 2μl,连接缓冲液 1μl,T4 DNA 连接酶 1μl,总体积 10μl,16℃连接过夜。用 5μl 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 平板筛选转化子,碱裂解法提取质粒,限制性内切酶鉴定重组质粒,阳性克隆命名为 pTYB1-hCAN。对阳性克隆测序由上海博亚生物技术有限公司 ABI377 测序仪完成。

1.2.4 人 canstatin cDNA 基因片段在大肠杆菌中诱导表达 用 pTYB1-hCAN 转化大肠杆菌 ER2566,获得重组转化子 *E. coli* ER2566(pTYB1-hCAN)。将转化子接种于 2ml 含有氨苄青霉素(100mg/L)的 LB 液体培养基中过夜培养,次日按 1∶500 接种于 10ml 含有氨苄青霉素(100mg/L)的 LB 液体培养基中,37℃培养至 A600 约为 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.3mmol/L,30℃诱导表达 6 小时,离心收集菌体。

1.2.5 人 canstatin 表达产物的鉴定 冰浴下超声破碎菌体,离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE(5%浓缩胶,10%分离胶)电泳,用 Quantity one 凝胶分析软件分析电泳图谱,测出人 Canstatin 融合蛋白占菌体总蛋白质的含量。

将电泳凝胶上的蛋白转印到 PVDF 膜上,后者经封闭后与兔抗 CBD 单克隆抗体反应 1h,而后与二抗反应 1h,经漂洗后显色,显色系统为碱性磷酸酶。

1.2.6 人 canstatin 表达产物的纯化 收集诱导表达后的菌体,重悬于适量溶液 A(20 mmol/L Hepes pH8.0,500mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA)中。冰浴中超声破菌,条件:功率 300W,超声 10s,间隔 10s,90 个循环。离心收集沉淀,获得粗制包涵体。然后用洗液Ⅰ(溶液 A+0.1% Triton X-100),洗液Ⅱ(溶液 A+2mol/L 尿素)和 1mol/L NaCl 溶液依次冲洗粗制包涵体,用裂解液 1ml(20mmol/L Hepes pH8.0,500mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,10mmol/L DTT,10mol/L 尿素)裂解包涵体,在冰浴条件下,将裂解后的包涵体,缓慢加到约 10 倍体积的包涵体稀释液中(20mmol/L Hepes pH8.0,500mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,10mmol/L DTT),4℃放置 3h。按 Impact-CN 系统提供方法进行蛋白亲和层析纯化。收集目标峰各管,用蛋白质复性液(PBS+1mol/L GSH+1mmol/L GSSG)透析复性后,再用 PBS 透析 2 次,聚乙二醇(PEG)浓缩,BCA 法测定蛋白含量,-20℃保存备用。

1.2.7 人 canstatin 重组蛋白的生物活性测定 用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成实验进行重组蛋白生物活性测定:取 9 天的受精鸡胚,于照卵灯下寻找胚头,在胚头下方 0.5~1.0cm 处开约 1.0cm² 窗口,暴露绒毛尿囊膜,分别以浸有 10μl PBS 和 10μg Canstatin 的无菌滤纸小块(5mm²)放于对照组和实验组尿囊膜上,灭菌透明胶带封口后,在 37℃孵室中继续培养 48h,打开鸡胚观察血管生成情况[4]。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增人 canstatin 基因片段

以胎盘组织为原料,进行 RT-PCR 扩增,获得一 700bp DNA 片段,与预期片段大小基本一致(图 1)。

2.2 pTYB1-hCAN 表达载体的构建与鉴定

按照上述构建方法获得的重组质粒,进行酶切和 PCR 鉴定,得到两个有插入片段的阳性克隆(图 2),插入片段的大小约为 700bp,与预期的人 Canstatin 基因大小基本一致,重组质粒经 T7 引物,Intein 反向引物正反向序列测定,结果与文献报道序列[1]一致。表明人 Canstatin 已成功插入 pTYB1 表达载体。

2.3 人 canstatin 基因片段在大肠杆菌中诱导表达和鉴定

按 1.2.4 的方法,对 *E. coli* ER2566(pTYB1-hCAN)进行诱导表达,SDS-PAGE 结果显示(图 3),与未诱导的比较,在大小约为 80 kD 的位置出现 1 条蛋白质表达条带,由 Quantity one 凝胶分析软件分析可知,该带蛋白约占菌体总蛋白的 37.2%。超声破碎菌体并离心后,对裂解液上清液和沉淀进行 SDS-PAGE,显示目标蛋白质主要在沉淀中,表明该融合蛋白质在菌体中主要以不溶性的包涵体存

维普资讯 http://www.cqvip.com

在。Western 印迹分析(图 4)确定了该条带为人 canstatin 的融合蛋白。

2.4 人 canstatin 表达产物的纯化

按 1.2.5 的方法进行人 canstatin 表达产物的纯化,获得了高纯度的重组蛋白(图 5),Quantity one 凝胶分析软件分析纯度达到 91.6%,重组蛋白总的回收率约为 17.4%。

2.5 人 canstatin 重组蛋白的生物活性测定

鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)实验表明:PBS 阴性对照组 CAM 血管网茂盛;而 Canstatin 重组蛋白在 10ug 剂量下能明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成,说明人 canstatin 重组蛋白具有抑制 CAM 新生血管生成的活性。

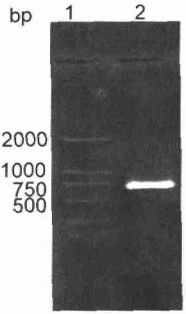


图 1 人 canstatin 基因 RT-PCR 扩增产物

1. DNA marker; 2. RT-PCR 产物

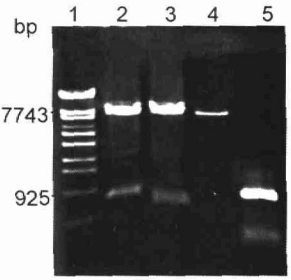


图 2 pTYB1-hCAN 重组质粒的鉴定

1. DNA marker; 2. 重组 pTYB1-hCAN 质粒 Xba Ⅰ/Xho Ⅰ酶切产物; 3. 重组 pTYB1-hCAN 质粒 Nde Ⅰ/Xho Ⅰ酶切产物; 4. pTYB1 质粒 Nde Ⅰ/Xho Ⅰ酶切产物; 5. pTYB1-hCAN 质粒为模板的 PCR 产物

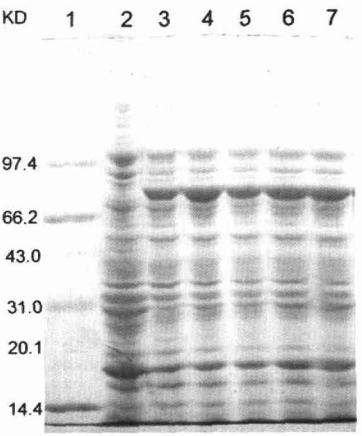


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

1. 蛋白质分子量标准; 2. 未经 IPTG 诱导的 *E. coli* ER2566(pTYB1-hCAN)菌体总蛋白; 3、4、5、6、7. IPTG 诱导的 *E. coli* ER2566(pTYB1-hCAN)菌体总蛋白



图 4 表达产物的蛋白印迹分析

3 讨 论

抑制肿瘤的血管生成、阻断肿瘤的"营养"供应,让肿瘤"饿死",从而阻止肿瘤的生长和转移,是近年来发现的肿瘤治疗的又一新思路[5],2003 年被美国《科学》杂志评为很有希望的肿瘤辅助治疗手段。Ⅳ型胶原为血管基底膜的重要组成成分,它的 C 端 NC1 结构域参与胶原Ⅳ网架组成,对血管基底膜的形成,维持至关重要。Arresten[6]、Canstatin、Tumstatin[7]分别是Ⅳ(α1)、Ⅳ(α2)、Ⅳ(α3)的 C 端 NC1 结构域,都被证明具有抗新生血管生成和抑制肿瘤

维普资讯 http://www.cqvip.com

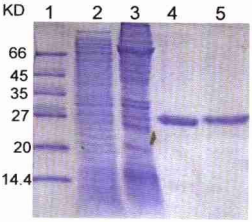


图 5 表达产物的纯化

1. Marker; 2. 未经诱导的 pTYB1 - hCS 转化菌体总蛋白; 3. IPGT 诱导后的 pTYB1 - hCS 菌体总和; 4. 5. nT 质纯化后的表达产物

细胞生长的活性。通过对 Tumstatin 的研究[7], 加上 Canstatin 和 Tumstatin 结构和功能上具有一些相似性, 推测 Canstatin 抗新生血管生成和抑制肿瘤细胞生长活性可能分布在不同的结构域。Canstatin 参与血管生成调节也可能是依赖整联蛋白介导的细胞相互作用。对在体外血管内皮细胞增殖抑制试验表明: Canstatin ED_{50} 是内皮抑素 ED_{50} 1/3[5], 其抑制肿瘤生长的效力可能超过内皮抑素[8], 在肿瘤治疗方面可能更具有应用前景。

本文克隆了人 Canstatin 基因片段, 并实现了在大肠杆菌中的表达, 经过初步纯化。CAM 实验初步表明 Canstatin 具有抗新生血管生成的活性。从而为 Canstatin 的真核表达、单克隆抗体和多克隆抗体的制备及临床应用奠定了基础。至于人 Canstatin 从Ⅳ型胶原上的释放方式、抗新生血管生成和抑制

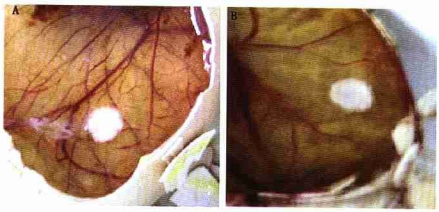


图 6 人 Canstatin 重组蛋白对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成的抑制

A: PBS 阴性对照组; B: 实验组(10ug Canstatin 重组蛋白)

肿瘤细胞生长的作用机制及调控机制有待于进一步研究。由于原核表达人 Canstatin 为不溶性包涵体的限制, 我们正在进行人 Canatatin 在毕赤酵母中表达的研究。

参 考 文 献

[1] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix - derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2000; 275: 1209 - 1215.

[2] Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits AKt activation and induces Fas - dependent apoptosis in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2003; 278: 37632 - 37636.

[3] Hostikka SL, Tryggvason K. The complete primary structure of the alpha 2 chain of human type IV collagenvand comparison with alpha 1(IV) chain[J]. J Biol Chem, 1988; 263: 19488 - 19493.

[4] 付生法, 陆应麟, 张朝山, 等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术[J]. 军事医学科学院院刊, 1993; 17(4): 294 - 296.

[5] Folkman J. Anti - angiogenesis: New concept of therapy of solid tumor[J]. Ann Surg, 1972; 75: 409 - 416.

[6] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, et al. Anti - angiogenic cues from vascular basement membrane collagen[J]. Cancer Res, 2000; 70: 2520 - 2526.

[7] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively, et al. Tumsatin, an endothelial cell - specific inhibitor of protein synthesis[J]. Science, 2002; 295: 140 - 143.

[8] O'Reily MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997; 88: 277 - 285.