DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.020
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
1084 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)12-1084-04

TAP系统分离纯化MT1-MMP-hTAP融合基因蛋白复合物及表达效应评估

俞炽阳[1], Yang Mao-zhou[2] ([1]第三军医大学西南医院妇产科, 重庆 400038; [2]Bone and Joint Center, Henry Ford Hospital, Detroit MI 48202 USA)

提 要:目的 应用TAP系统分离纯化的MT1-MMP-hTAP蛋白复合物的表达效应。方法 应用TAP系统分子生物学特性采用IgG和钙调蛋白亲和胶粒二次亲和层析法分离纯化MT1-MMP-hTAP蛋白复合物。PAP免疫染色及Western blot法检测蛋白表达效应。结果 PAP免疫染色显示MT1-MMP-hTAP融合基因在鸡成纤维细胞内有效表达,融合蛋白染色呈深蓝色,Western blot法检测经TAP系统分离纯化后MT1-MMP-hTAP蛋白复合物分子稳定表达在相应68×10[3]位置。结论 TAP系统分离纯化MT1-MMP-hTAP蛋白复合物及其在动物细胞的构建成功并有效表达为在人类肿瘤细胞建立TAP纯化蛋白质体系和寻找MT1-MMP-hTAP相互作用蛋白提供了方法学支持。

关键词:MT1-MMP-hTAP融合基因;TAP系统;蛋白质纯化
中图法分类号:Q556.9;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Isolation and purification of protein complexes of MT1-MMP-hTAP fusion gene using tandem affinity purification system in chick fibroblast cells and evaluation of the expression effect

YU Chi-yang[1], YANG Mao-zhou[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China; [2]Bone and Joint Center, Henry Ford Hospital, Detroit MI 48202 USA)

Abstract: Objective To construct the fusion gene of membrane-type matrix metalloproteinase1-humanized tandem affinity purification (MT1-MMP-hTAP) and to evaluate the expression of its protein complexes isolated and purified using tandem affinity purification (TAP) system. Methods The MT1-MMP-hTAP protein complexes were isolated and purified using the IgG-agarose beads and calmodulin-sepharose beads affinity chromatography according to the molecular and biological features of TAP system. The expression levels of its protein complexes were determined by PAP immunostaining and Western blotting. Results PAP antibody immunostaining showed that MT1-MMP-hTAP protein complexes (dark blue) were expressed in chick fibroblast cells. Western blot analysis of its protein complexes using MT1-MMP specific antibody showed a prominent band (68×10[3]) of mobility consistent with fully processed MT1-MMP-hTAP after being cleaved by the TEV proteinase. Conclusion The construction of TAP system in chick fibroblast cells and expression of MT1-MMP-hTAP protein complexes will be helpful for the studies of the MT1-MMP-hTAP interaction proteins in the human tumor cells.

Key words: MT1-MMP-hTAP fusion gene; TAP system; protein purification

侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的生物学特征。早期诊断和探明侵袭转移的规律是降低肿瘤患者病死率的关键。金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族作为一类具有蛋白水解酶活性的蛋白质,以基质MMPs尤其是膜型金属蛋白酶1(membrane-type matrix metalloproteinase1, MT1-MMP)的作用与恶性肿瘤的侵袭和转移关系密切[1]。而MT1-MMP等功能性蛋白质发挥作用大多与其相互作用蛋白有关。本研究通过TAP(tandem affinity purification, TAP)系统,应用人类化TAP基因(humanized tandem affinity purification, hTAP)与MT1-MMP基因构建融合,分离纯化MT1-MMP-hTAP融合蛋白,观察其在动物细胞的表达效应。为寻找MT1-MMP相互作用蛋白以及在人类肿瘤细胞建立TAP纯化蛋白质体系提供方法学支持,对阐明细胞之间蛋白质互动激活与肿瘤侵袭和转移的规律具有重要意义。

作者简介:俞炽阳(1961-),男,湖北省武汉市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事辅助生殖医学和高危妊娠方面的研究,发表论文12篇。
电话:(023)68754410

收稿日期:2004-04-05;修回日期:2004-05-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　细胞株

鸡成纤维细胞DF-1(#CRL-12203)细胞株来源于美国ATCC公司。使用DMEM培养液(含4 mmol/L L-谷氨酸盐; 1.5 g/L碳酸氢钠; 5%FBS), CO_2培养箱内常规培养。

1.2　融合基因构建

人源化TAP基因来源于原始TAP基因并由美国Yang M.博士重新改建合成。分别设计不同PCR引物扩增、克隆、合成人源化TAP基因CBP、TEV、IgG等功能部位。MT1-MMP基因序列来源于GenBank, 合成不同PCR引物, 使用的引物有5′-GGC TGT GCT CGC GCT GGG CCA TGC-3′; 5′-GGC CCA GCG CGT GCA CAG CCA CCA G-3′; 5′-GTT CGA AGG AAG CGC TAT GGG CCC AAC ATC TG-3′; 5′-GGG CCC ATA GCG CTT CCT TCG AAC ATT GGC-3′; 5′-CGA AGG AAG CGC TAC GGA GGC CGG CCG GAT GAG-3′; 5′-CCG GCC TCC GTA GCG CTT CCT TCG AAC ATT GGC-3′。设计以下引物: 5′-GCG ACT AGT CAC CAT GTC TCC CGC CCC AAG AC-3′; 5′-CTA GCG GCC GCG ACC TTG TCC AGC AGG GAA CG-3′, 覆盖RNA起始码(AUG), 在终止码(TAA; TAG; TGA)前结束并衔接到hTAP基因, PCR扩增获得cDNA产物。以cDNA为模板PCR扩增获得足量所需DNA, 应用上述引物扩增的PCR预期目的片段最终全长552 bp。1%琼脂凝胶电泳及酶切证实获得正确的MT1-MMP-hTAP融合基因并经DNA序列测定证实与GenBank完全一致无误。

1.3　克隆基因于反转录病毒表达载体

以*Nhe*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Pme*Ⅰ等工具酶亚克隆MT1-MMP-hTAP融合基因或加碱性磷酸酶基因(BP)于pcDNA 3.1-Zeo(+)质粒, PCR条件为: 94 ℃ 7 s、61 ℃ 30 s、70 ℃ 107 s, 共27个循环, 最后再于72 ℃延伸7 min。所得目的片段以*Cla*Ⅰ内切酶克隆于RCAS(replication competent retroviral avian vector system)病毒表达载体src部位(SLAX 12 NCO), 所用Cla12质粒来源于美国NIH肿瘤研究所Hughes S.博士惠赠。

1.4　脂质体转染

使用Lipofect AMINE plus (GIBCO-Life公司, 美国)转染系统, 按说明书操作。将上述含MT1-MMP-hTAP融合基因病毒表达载体转染鸡成纤维细胞株CRL-12203, 5% DMEM液培养, 24 h后RCAS(BP)病毒颗粒转录复制即可持续将基因信息感染临近细胞, 5 d后在细胞内可检测出表达产物。

1.5　MT1-MMP-hTAP融合基因表达产物检测

经PAP抗体1∶250免疫染色或碱性磷酸酶过氧化氢底物DAB化学显色证实, 常规Western blot方法检测表达蛋白, 收集细胞, PBS洗涤3次, 4 ℃条件下加1× 蛋白酶抑制剂(Roche公司, 美国)于匀浆器内匀浆, 低温离心, 35 000× g, 3 h。收集离心管底部蛋白颗粒, 采用SiO_2法或TCA法处理样品, SDS-PAGE凝胶电泳, PAP抗体1∶250或MT1-MMP特异抗体1∶1000及Western blot方法检测蛋白分子表达相应位置。

1.6　TAP系统纯化MT1-MMP-hTAP融合蛋白

按Rigaut[2]方法应用TAP系统纯化MT1-MMP-hTAP融合蛋白。收集经确定已表达MT1-MMP-hTAP融合蛋白的细胞, 4 ℃条件下加RIPA细胞裂解液及1× 蛋白酶抑制剂(Roche公司, 美国)于匀浆器内匀浆, 冰上留置2～3 h澄清后, 低温离心, 80 000× g, 3 h。取上清液(含融合蛋白)约10 ml加0.1% NP-40及预先用IPP150和CEB缓冲液洗涤的IgG亲和胶粒200 μl (Sigma公司, 美国), 4 ℃持续混摇过夜。次日进行第1次亲和层析, 将已经与IgG亲和胶粒结合的上清液过聚乙烯层析柱(BD公司, 美国), IPP150和CEB及TEV酶缓冲液洗涤层析柱4次, 加TEV酶缓冲液1 ml和TEV酶100 U (Gibco-life公司, 美国)酶切作用2 h, 收集滤出液1 ml (含MT1-MMP及其蛋白复合物和-hTAP蛋白的CBP部分)备用, 停留在层析柱上hTAP蛋白的IgG部分以及与IgG位点结合的杂蛋白被去除。第2次亲和层析, 第1次收集的备用滤出液1 ml加3倍的钙调蛋白缓冲液稀释并用$CaCl_2$调整至3 mmol/L浓度加缓冲液洗涤的钙调蛋白亲和胶粒200 μl (Stratagene公司, 美国)室温作用2 h, 过层析柱, 没有hTAP蛋白CBP结合位点的其它蛋白随滤出液被去除, 含hTAP蛋白CBP结合位点的MT1-MMP蛋白复合物及其钙调蛋白亲和胶粒停留在层析柱上, 缓冲液洗涤3次, 再用1～2 ml含2 mmol/L EGTA; 1 mmol/L Mg^{2+}; 10 mmol/L Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl等试剂的缓冲液竞争结合钙调蛋白亲和胶粒上钙离子位点将MT1-MMP及其蛋白复合物从层析柱上洗脱即为纯化的MT1-MMP蛋白复合物。样品处理同前或－20 ℃保存备用。

1.7　MT1-MMP及其蛋白复合物鉴定

SiO_2法或TCA法处理纯化样品, 用10%或4%～16%的梯度SDS-PAGE凝胶电泳, Western blot方法和MT1-MMP特异抗体检测相应蛋白分子带表达位置。拟通过银染法寻找、鉴定已知或未知的相互作用蛋白。

2　结果

2.1　PAP抗体免疫染色及Western blot方法检测MT1-MMP-hTAP融合蛋白表达产物

应用PAP(peroxide anti peroxide, PAP)抗体含IgG位点可结合hTAP上IgG位点, 同时含过氧化氢位点可与DAB显示剂显色的特征, 证实克隆于病毒表达载体系统MT1-MMP-hTAP融合蛋白在鸡成纤维细胞CRL-12203内的表达效应正常(图1, 2)。

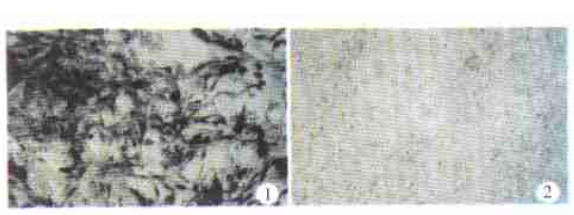


图1　细胞内**MT1-MMP-hTAP**融合蛋白染色呈深蓝色　(PAP×400)

Fig 1　MT1-MMP-hTAP protein complexes (dark blue) expressed in cells (PAP× 400)

图2　**CRL-12203**对照组细胞内不显色　(PAP× 400)

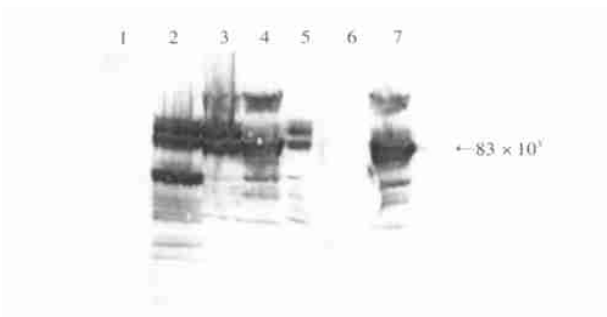
Fig 2　Negative staining of the control cells of CRL-12203　(PAP× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 应用 Western blot 方法和 PAP 抗体、MT1-MMP 特异抗体鉴定 TAP 系统纯化的 MT1-MMP 及其蛋白复合物

正常情况下 MT1-MMP 蛋白分子为 63×10^3; TAP 蛋白分子为 20×10^3(其中 CBP 部分蛋白分子为 5×10^3; 蛋白 A-IgG 蛋白分子部分为 15×10^3)。MT1-MMP-hTAP 融合蛋白分子全长为 83×10^3, MT1-MMP-CBP 蛋白分子部分全长为 68×10^3。

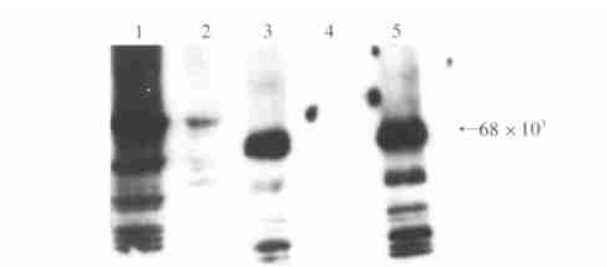
应用 PAP(peroxide anti peroxide, PAP)抗体显示转染细胞内 MT1-MMP-hTAP 融合蛋白分子带 83×10^3 位置, CRL-12203 细胞对照组和细胞培养液呈阴性, 见图 3。应用 MT1-MMP 特异抗体显示 TAP 系统分离纯化 MT1-MMP-hTAP 融合蛋白不同阶段蛋白分子 $\times10^3$ 位置, 见图 4。说明经分离纯化后, 其他蛋白被有效去除, MT1-MMP-CBP 部分的蛋白复合物表达始终存在 68×10^3 位置。



1: CRL-12203 control cells; 2—5: MT1-MMP-hTAP protein complexes on the membranes; 6: DMEM culture medium; 7: MT1-MMP-hTAP protein complexes dissolved in RIPA buffer

图 3 PAP 抗体显示 MT1-MMP-hTAP 融合蛋白分子 83×10^3 表达位置

Fig 3 Localization of MT1-MMP-hTAP protein complexes (83×10^3) using PAP antibodies



1: MT1-MMP-hTAP protein complexes before purification; 2: Filtered liquid from first IgG affinity chromatography; 3: Eluate from first IgG affinity chromatography after being cleaved by the *TEV* proteinase; 4: Filtered liquid from second calmodulin affinity chromatography; 5: Eluate from second calmodulin affinity chromatography

图 4 MT1-MMP 特异抗体显示 TAP 系统纯化 MT1-MMP-hTAP 融合蛋白分子 83×10^3 表达位置

Fig 4 Localication of MT1-MMP-hTAP protein complexes (83×10^3) using MT1-MMP specific antibodies after TAP system

3 讨论

虽然肿瘤转移的规律及其复杂性, 涉及诸多因素, 如蛋白水解酶、血管生成因子、黏附因子, 信号转导等, 但 MT1-MMP 的作用已受到广泛重视。MT1-MMP 是一种存在于细胞膜表面的膜蛋白, 正常情况下很少表达, 含量极微。肿瘤细胞在侵袭转移前不但自身表达活跃, 而且可诱导激活邻近正常细胞或基底细胞表达 MT1-MMP, MT1-MMP 的局限化和激活与基质水解以及转移关系密切[3~5]。

由于功能性蛋白质发挥作用大多有其相互作用蛋白有关, MT1-MMP 一定也有其相互作用蛋白。因此如何获得最能影响 MT1-MMP 功能的相互作用蛋白, 建立一种高效特异纯化目的基因及其相互作用蛋白的方法至关重要。已有学者通过 MMP 抑制剂(TIMPs)干扰所有 MMP 的功能后, 可有效阻断肿瘤细胞的侵袭和转移。表明多种 MMP 之间的相互作用在肿瘤的转移和发展过程中起者至关重要的作用, 不管是局部侵袭或血管增生导致的远处转移都是肿瘤细胞与邻近细胞, 尤其是基底层细胞蛋白质生物学特征改变的结果。这种存在于细胞之间的相互作用蛋白改变如何导致上述结果的机制尚不清楚。本研究通过在鸡成纤维细胞建立 MT1-MMP-hTAP 融合基因及其 TAP 系统蛋白复合物纯化方法体系, 探讨其融合蛋白表达效应, 寻找目的基因的相互作用蛋白是其最终目的。本研究结果证实 PAP 抗体免疫染色 MT1-MMP-hTAP 融合基因在细胞内转染效果确切; Western blot 方法提示融合蛋白持续表达且蛋白分子稳定在 83×10^3 与 MT1-MMP-hTAP 融合蛋白分子全长相符; 经 TAP 系统 IgG 和钙调蛋白二次亲和层析后, 与 IgG 亲和胶粒结合的杂蛋白以及不能与钙调蛋白亲和胶粒结合的其它蛋白被去除, 而持续存在表达较强的 68×10^3 蛋白带与 MT1-MMP-hTAP 蛋白复合物(不含 IgG 蛋白分子部分 15×10^3)分子大小相符。上述研究表明在动物细胞已初步建立 TAP 系统分离纯化 MT1-MMP 蛋白复合物系统且效果稳定可靠, 值得进一步完善和探索应用于人类肿瘤细胞, 为寻找 MT1-MMP 及其相互作用蛋白以及邻近细胞相互作用之间的关系提供理论和方法学依据。

hTAP 基因是一种可与任何产生蛋白质的基因相拼接的人工合成基因。目前 TAP 系统作为一种特异高效的纯化蛋白方法已受到广泛关注。Rigaut 等[2]首先利用蛋白 A 具有两个 IgG 结合位点和钙调蛋白肽(calmodulin-binding peptide, CBP)即能保持功能又能有效标记的特点, 同时嵌入一个特殊的 TEV(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶识别位点于两者之间, 形成 TAP 标

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

记基因。利用 TAP 基因与目的基因融合，克隆于酵母菌或大肠杆菌，表达出融合蛋白。TAP 基因表达的蛋白经 TEV 蛋白酶切后，蛋白 A 和 CBP 及其结合的蛋白复合物被分为两个部分，经 IgG 和钙调蛋白亲和层析柱后，目的基因表达的蛋白及其复合物被有效的分离出来[6]。由于基因密码在不同生物机体的差异，TAP 基因主要在低等生物如酵母菌中有效地表达，而在高等生物细胞中表达困难，目前有关 TAP 系统的应用国外仅有少数报道，国内尚少见文献报道。Yang 首次成功合成能在动物细胞内高效表达的人源化 TAP 基因（hTAP）。使 TAP 系统应用于探索人类细胞蛋白质的纯化成为可能。应用银染法寻找已知或未知的 MT1-MMP 相互作用蛋白及其序列测定，对阐明细胞之间蛋白质互动激活与肿瘤侵袭和转移的规律具有重要意义。同时 TAP 系统纯化蛋白的构建完成也为 hTAP 基因应用于人类其它目的基因相互作用蛋白的分离和纯化提供理论依据支持。

参考文献：

[1] Mzrie Stastna. Matrix metalloproteinases in the diagnosis and treatmentof tumor diseases[J]. Biomarkers and Environment, 2000, 3(1): 12－22.
[2] Rigaut G, Shevchenko S, Rutz B, *et al*. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(10): 1030－1032.
[3] English W, Holtz B, Vogt G, *et al*. Characterization of the role of the "MT-loop" an eight-aminoacid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinase[J]. J Biol Chem, 2001, 276(45): 42018－42026.
[4] Murphy G, Gavrilovic L. Proteolysis and cell migration: creating a path [J]? Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(5): 614－621.
[5] Kheradmand F, Rishi K, Werb Z. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 4): 839－848.
[6] Puig O, Caspary F, Rigaut G, *et al*. The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification[J]. Methods, 2001, 24(3): 218－229.

（编辑 刘洪娥）

文章编号：1000-5404(2004)12-1087-02

个案与短篇

晚期及复发性子宫颈癌手术治疗 10 例分析

Operative treatment for advanced or recurrent carcinoma of the cervix in 10 cases

王 琳，梁志清，常 青，李玉艳，王 丹 （第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038）

由于子宫颈癌普查工作的广泛开展和癌前病变的阻断治疗，其发病率和病死率已大幅度下降。但晚期和复发性子宫颈癌的治疗仍然十分困难，病死率高，手术治疗常规限于Ⅰa～Ⅱa 期患者。近两年来，我们对晚期宫颈癌也采用了手术治疗，取得较好疗效，现报告如下。

1 临床资料与方法

1.1 临床资料

2001 年 1 月至 2002 年 12 月，我科共收治晚期及复发性宫颈癌患者 12 例，对其中 10 例采用了以手术为主的综合治疗。患者年龄 31～45 岁，平均（38.2±4.7）岁。10 例中 9 例为晚期宫颈癌，1 例为复发癌。根据 FIGO（1995 年）分期[1]：Ⅱb 期 1 例，ⅢA 期 3 例，ⅢB 期 5 例，ⅣA 期 1 例。组织学类型：菜花状 5 例，颈管增粗型 2 例，盆腔肿块型 2 型，溃疡型 1 例。病理学类型：宫颈鳞状细胞癌 7 例，腺癌 2 例，宫颈透明细胞癌 1 例。

作者简介：王 琳（1964－），女，四川省巴中市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事子宫内膜异位症方面的研究，发表论文 27 篇。电话：（023）68754409

收稿日期：2003-08-22；修回日期：2004-03-10

1.2 手术方式

基本行子宫超广泛切除术加盆腔淋巴清扫术。由于Ⅲ期宫颈癌癌组织累及阴道达下 1/3 或侵犯达盆壁，手术时多采用膀胱截石位，在距癌灶下方 1～2 cm 处环形切开阴道壁，经阴道向上推，上、下联合切除大部分阴道，所有 10 例患者均有盆腔淋巴转移，1 例转移至腹主动脉旁，术时予以清除。1 例左输尿管末端及膀胱被侵犯，左输尿管显著增粗，切除左输尿管末端及部份膀胱，将膀胱形成肌瓣后与输尿管吻合。另 1 例盆腔肿块 6 cm，压迫左输尿管，左输尿管上段高度扩张，左肾功能严重受损，分离并切除肿瘤，将左输尿管末端切除后吻合至右输尿管，并放置支架。1 例术中出血＞1 000 ml（13 000 ml），其余患者出血均在 1 000 ml 以内，平均（736±87）ml。

1.3 术后治疗及随访

术后 7 d 均上化疗 1 个疗程（5-氟尿嘧啶＋顺铂），4 周后再放疗（外照射），有 2 例术前已行腔内后装足量放疗，术后未再放疗。拟上 3 个疗程化疗，其中 6 例已上完。术后平均留置尿管时间（14.4±3.2）d，术后坚持定期随访，每 2 月随访 1 次，复查内容包括肝、双肾及盆腔 B 超或 CT，阴道细胞学和阴道镜检查，盆腔检查，胸片等。

（下转 1090 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net