

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0283-04

重组人 canstatin 的克隆、表达及其活性鉴定

蒋日成, 方唯意, 冬毕华, 董琳, 唐运莲, 彭淑平, 周建国, 曹建国(南华大学肿瘤所, 湖南衡阳 421001)

[摘要] 目的: 克隆并表达 canstatin 基因, 初步检测其抑制血管生成的活性。方法: 采用 RT-PCR 方法从人胚肝组织中钓取 canstatin cDNA, 克隆入 pMD18-T 载体中, 并测序鉴定。在 QIA 表达系统中表达, Ni 柱亲和层析纯化。进行生物学活性鉴定。结果: 经序列分析所获 684 bp 人 canstatin 基因与报道一致, 重组进 pQE30 表达载体, IPTG 诱导表达并纯化成功, 表达产物能明显抑制血管生成。结论: 成功构建人 canstatin cDNA 克隆和表达载体并在大肠杆菌 M15 中高效表达。纯化回收产物在鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)实验中具有明显抑制血管生成活性。

[关键词] canstatin; 逆转录聚合酶链反应; 克隆; 原核表达; 活性鉴定

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

Cloning and Expression of Human Canstatin and Identification of Its Biological Activity

JIANG Ri-cheng, FANG Wei-yi, DONG Bi-hua, DONG Lin, TANG Yun-lian, PENG Shu-ping, ZHOU Jian-guo, CAO Jian-guo (Cancer Research Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[Abstract] **Objective:** To clone and to express human canstatin gene and investigate biological activity of the recombinant protein. **Methods:** The cDNA of canstatin was amplified with RT-PCR from fresh fetal liver and was cloned into pMD18-T vector, and was sequenced. Then canstatin cDNA was cloned into the BamH I and Hind III sites of pQE30 and expressed with induction of IPTG. After the purification under native conditions, The biological activity of the recombinant protein was identified by the chick embryo chorioallantoic membrane assay (CAM). **Results:** The sequence of the amplified DNA fragment is consistent with that of the known gene. The recombinant protein was highly expressed after induction with IPTG. Biological assay results indicate that the recombinant canstatin protein could suppress the new blood vessel formation in CAM *in vitro*. **Conclusion:** The cloning and expression vector of canstatin cDNA has been constructed successfully. The recombinant canstatin protein was highly expressed in *E. coli* M15. In the CAM, the recombinant protein has highly suppressive effects on the vessels in chick embryo chorioallantoic membrane.

[Key words] canstatin; RT-PCR; clone; prokaryotic expression; identification of biological activity

* 血管生成是肿瘤生长、浸润及转移扩散的重要途径, 新生血管为肿瘤细胞提供充足的氧气和营养, 通过血管内皮细胞表达的生长因子, 刺激肿瘤细胞增殖。因此通过抑制血管生成从而抑制肿瘤的生长已经成为当今肿瘤治疗的新靶点。

canstatin^[1]是继血管生成抑制素(angiostatin)^[2]、内皮抑素(endostatin)^[3]之后最新发现的基底膜来源的血管生成和肿瘤生长抑制因子, 为IV型胶原 α_2 链的非胶原(NC1)区。研究表明, 它能有力地抑制内皮细胞管结构的形成, 有效抑制内皮细胞的增殖、转移并诱

导凋亡。同时在移植瘤模型的体内实验中显示出对实体肿瘤生长的显著的抑制作用。

为了探索 canstatin 对血管生成和肿瘤生长的抑制作用, 我们从人胚肝组织中分离出 canstatin cDNA, 构建其克隆和表达载体, 诱导蛋白表达, 进行活性鉴定。为进一步研究及临床应用奠定了基础。

* [作者简介] 蒋日成(1976-), 男, 山东烟台人, 硕士, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

[通讯作者] 曹建国

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli DH5 α 由闫宏伟博士惠赠。*E. coli* M15 由王建博士惠赠。质粒 pMD18-T 克隆载体购自 TaKaRa 公司。质粒 PQE30 表达载体购自 QIAGEN 公司(基因公司代理)

1.2 试剂

M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)购于 Promega 公司(华美公司代理);T₄DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 及 Xba I, DNA 分子量标准:购于 MBI 公司(上海生工代理);低分子量标准蛋白质购于华美公司。UNIQ-10 总 RNA 抽提试剂盒、低熔点琼脂糖回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。Ni-NTA 蛋白亲和纯化试剂盒(Ni-NTA Spin Kit):购自 QIAGEN 公司(基因公司代理)。

1.3 组织标本

肝胚组织从南华大学附属第一医院妇产科引产儿中获得。

1.4 引物

根据 Genbank 中报告的序列设计而成。并用 GeneTool 软件辅助分析。

上游引物:5'-CGGGATCCGTCAGCATCGGCTACCTC-3';
下游引物:5'-CCCAAGCTTCAGGTTCTTCATGCACACC-3';
上下游引物 5'端分别携带 BamH I 和 Hind III 酶切位点。逆转录引物为 OligdT₁₈。逆转录引物购自 MBI 公司;PCR 引物由上海生工合成。

1.5 人胚肝组织总 RNA 提取

将液氮冻存的新鲜肝胚组织约 100 mg 放入研钵中,倒入少许液氮,尽力研磨使其成为粉末状。按照 UNIQ-10 总 RNA 抽提试剂盒提供的方法提取总 RNA。

1.6 RT-PCR 扩增 canstatin 基因

取胚肝组织总 RNA 3 μ g,用 OligdT₁₈引物合成 cDNA 第一链。反应体系为 5 \times 反应缓冲液 4 μ l; 20 U/ μ l 核糖核酸酶抑制剂 1 μ l;10 mmol/L dNTP 2 μ l;OligdT₁₈引物 1 μ l;200 U/ μ l M-MLV 逆转录酶 1 μ l;加无核酸酶去离子水至总体积 25 μ l。37 $^{\circ}$ C 5 min,42 $^{\circ}$ C 1 h,70 $^{\circ}$ C 灭活 10 min。以所获 cDNA 为模板,用 Taq DNA 聚合酶扩增人 canstatin 基因全序列,长度为 684 bp。PCR 扩增反应体系为:胚肝组织 cDNA 模板 2 μ l;10 \times Buffer 2.5 μ l;20 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ l;10 mmol/L dNTP 0.5 μ l;25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l;Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l,加去离子水至总体积 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 1 min,94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电

泳分析扩增产物。

1.7 PCR 产物的克隆

PCR 扩增产物 18 ng 与 pMD18-T 载体 50 ng 混合,于 10 μ l 反应体系 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,得到连接产物:pMD18-T/canstatin。取适量的上述连接反应液转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板,同时进行蓝白筛选。

1.8 阳性重组克隆的筛选和序列测定

挑取白色菌落、蓝色菌落各 1 个分别入适量含氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。用碱裂解法制备质粒 pMD18-T/canstatin。重组质粒用 BamH I 和 Hind III 双酶切及 Xba I 单酶切鉴定。用蓝色菌落质粒酶切作阴性对照。取含有重组质粒的菌液 2 ml,用 M13 引物由上海生工基因组 DNA 测序仪序列分析。

1.9 canstatin 原核表达载体的构建

经测序证实的重组质粒 DNA 以 BamH I 和 Hind III 双酶切纯化回收后,与同样处理的 pQE30 表达载体经 T₄DNA 连接酶连接,构建 pQE30-canstatin 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选阳性克隆,碱裂解法提取质粒以 PCR 及 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定。然后转化大肠杆菌 M15,少量培养,提取质粒双酶切鉴定。

1.10 canstatin 蛋白表达与纯化

挑取 pQE30-canstatin 阳性 M15 大肠杆菌克隆入 5 ml 含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养,次晨取菌液 3 ml 接种到 60 ml 含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基中剧烈振荡培养至 OD₆₀₀为 0.6 左右,加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,继续培养 6 h,诱导表达前及其后每 2 小时取菌液 1 ml,12 000 g 离心取菌(同时于诱导表达 4 h 时取菌 50 ml,离心取菌,-70 $^{\circ}$ C 备用),加入 1 \times SDS 上样缓冲液,沸水浴处理 5 min,离心取上清 20 μ l,用 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 12%)对表达产物进行鉴定。

经鉴定有产物表达后,将 -70 $^{\circ}$ C 冻存细菌置于冰上融解 15 min,裂解细菌后,用咪唑(imidazole)进行溶解、洗脱,按 Ni-NTA Spin Column 试剂盒提供方法进行蛋白亲和纯化。

1.11 重组蛋白的生物活性鉴定

将纯化回收的重组蛋白透析 2 次,聚乙二醇(PEG)浓缩,将蛋白浓度调至约 0.5 g/L。用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)实验进行蛋白活性鉴定:取孵育 9 d 的受精鸡胚,于照卵灯下寻找胚头,在胚头右下方 0.5 ~ 1.0 cm 处开约 1.0 cm²窗口,暴露绒毛尿囊膜,拍照后分别将不含有重组蛋白和含有 10.0 μ g 重组蛋白的灭菌 PBS 各 50 μ l 加样于对照组和实验组 CAM 灭菌滤纸上,灭菌透明胶带封口后置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度下孵化

48 h, 观察血管生长情况。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增人 canstatin 基因

以胚肝组织 cDNA 为模板, PCR 扩增 canstatin 基因, 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。人 canstatin cDNA 片段长度为 684 bp。PCR 产物长度与其基本一致, 初步证实为人 canstatin cDNA (图 1)。

图 1 人 canstatin 基因 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 The amplification product of human canstatin gene with RT-PCR

2.2 PCR 产物的克隆及酶切鉴定

PCR 产物在连接液的作用下直接克隆到 pMD18-T 载体中, 转化后挑阳性菌落, 经 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 获得 684 bp 左右条带; 并选择 canstatin cDNA 片段内 483 bp 处 Xba I 酶切位点酶切纯化回收的 DNA 片段, 获得 483 bp 和 201 bp 2 条条带。与预期结果基本一致。证实扩增片段已经插入载体中(图 2)。

重组质粒 pMD18-T/canstatin 经上海生工序列分析测定, 结果显示插入片段为 684 bp, 编码 227 个氨基酸, 与 Genbank 中的报道序列进行比较, 证实二者序列一致。部分测序结果(见图 3), 自第 60 个碱基开始为目的基因序列。

图 3 人 canstatin cDNA 序列分析

Fig. 3 Sequence of human canstatin cDNA

2.4 重组表达载体 pQE30-canstatin 的构建和鉴定

将人 canstatin 片段次级定向克隆入 pQE30 表达载体中, 重组质粒 pQE30-canstatin 经 PCR 及 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 获得 684 bp 条带, 与预期结果基本一致。证实片段已经插入载体中(图 4)。

图 4A 重组质粒 pQE30-canstatin 结构简图

Fig. 4A The brief structure of the recombinant plasmid PT5: T5 promoter; LacO: Lac operator; RBS: Ribosome-binding site; 6 × His: 6 × His tag sequence; MCS: Multiple cloning site; LacI^q: LacI^q repressor gene

图 2 pMD18-T/canstatin 质粒的酶切鉴定(BamH I and Hind III)

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of plasmid pMD18-T/canstatin

- 1: Negative control(plasmid pMD18-T digested with BamH I and Hind III);
2: pMD18-T/canstatin digested with BamH I and Hind III ;
3: Canstatin fragment digested with Xba I ; M: Marker

2.3 人 canstatin cDNA 序列分析

2.5 重组质粒在大肠杆菌中表达与纯化

pQE30-canstatin 重组质粒转化的阳性 M15 大肠杆菌, 在 1.0 mmol/L IPTG 诱导下, 表达于 4 h 达高峰。表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 12%)融合蛋白分子量为 26 kD(Canstatin 蛋白示分子量约为

24 kD),与推测蛋白大小相仿,所表达的蛋白约占总菌体蛋白的20%。经 Ni-NTA Spin Column 进行蛋白亲和纯化后获得高纯度的重组蛋白(图5)。

图 4B pQE30-canstatin 重组质粒 PCR 及 BamH I 和 HindIII 双酶切鉴定

Fig. 4B Amplification with PCR and restriction enzyme analysis with BamH I and HindIII of pQE30-canstatin plasmid
M: Marker; 1: pQE30-canstatin plasmid digested with BamH I and HindIII; 2: pQE30-canstatin plasmid without digestion; 3: Amplification of pQE30-canstatin plasmid with PCR

图 5 pQE30-Canstatin 重组克隆表 canstatin in E. coli M15

M: Protein weight marker; 1: Before IPTG induction; 2: 2 h after IPTG induction; 3: 4 h after IPTG induction; 4: 6 h after IPTG induction; 5: Canstatin purification on Ni-NTA spin coloum

2.6 canstatin 活性测定

鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)实验结果显示:对照组血管呈叶状生长,加样后血管密度无降低;而 canstatin 蛋白实验组加样后能明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成(图6)。

3 讨论

许多疾病的发生是由持续的失控性血管生长所致,肿瘤的生长和转移是血管生成依赖性过程。早在

70 年代 Folkman 就提出对实体瘤采用抑制血管生成的治疗方法。canstatin 是IV型胶原 α_2 链的非胶原(NC1)区,具有独特的调节性结构。最新研究表明 canstatin 可剂量依赖性抑制内皮细胞管结构形成,有效抑制内皮细胞增殖和转移,且能诱导内皮细胞凋亡。

图 6 Canstatin 蛋白对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成的影响

Fig. 6 Effect of canstatin on angiogenesis in CAM
A: Before treatment with canstatin;
B: After treatment with canstatin

为了深入对 canstatin 的研究,我们成功克隆了 canstatin 基因,并按正确的阅读框架将其次级定向克隆入 pQE30 表达载体中,与氨基末端的 6-组氨酸亲和标记物作为融合蛋白进行诱导表达。在天然状态下获得高纯度 canstatin 重组蛋白,该重组蛋白能在 M15 大肠杆菌中稳定表达,产量较高,表达量约占总菌体蛋白的20%。pQE30 表达载体具有的 6-组氨酸标记物序列编码的 6-组氨酸融和尾比通常应用的标记物分子量小,免疫原性低,亲和性极好。回收到的表达产物经实验证明具有明显抑制新生血管生成的活性。从而为 canstatin 的真核表达和单克隆抗体的制备提供了依据,为进一步探讨其作用机制及在血管生成相关疾病治疗中的应用奠定了基础。

[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(2): 1209-1215.
[2] O'Reilly MS, Holmtrén L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma[J]. Cell, 1994, 79: 315-328.
[3] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88: 277-285.