

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )03-0185-05

## 血管基膜衍生多功能肽基因克隆、表达及空间构象分析

彭淑平, 方唯意, 戴文建, 邹小青, 刘红英, 石书红, 曹建国 ( 南华大学肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001 )

[ 摘要 ] **目的:** 构建血管基膜衍生多功能肽克隆和原核表达载体, 并对血管基膜衍生多功能肽氨基酸序列进行空间结构分析预测。**方法:** 用人源性 IgG3 上游铰链区连接肽连接的 Tumstatin 的 2 个功能区片段, 即血管基膜衍生多功能肽( VBMDMP ), 利用合成的 3 条长引物片段, 进行 PCR 扩增。克隆到 pUC19 载体, 酶切和测序鉴定。亚克隆构建原核表达载体 pGEX-4T-1-VBMDMP, IPTG 诱导表达, 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定表达产物。用 Glutathione Sepharose 4B 层析柱进行了亲和层析鉴定。将 VBMDMP 序列输入计算机, 利用 Antheprot 软件分析。**结果:** 血管基膜衍生多功能肽( VBMDMP ) 基因经限制性内切酶酶切和测序鉴定, 其大小和核苷酸序列正确, 与设计完全一致。获得了原核表达融合蛋白 GST-VBMDMP。Antheprot 分析显示, 人 IgG3 上游铰链区连接后的 Tumstatin 的 2 个功能区域能自由伸展。**结论:** 成功构建了血管基膜衍生多功能肽克隆和原核表达载体, 并对其进行了空间结构分析。

[ 关键词 ] 血管基底膜; 衍生肽; IgG3 上游铰链区; Tumstatin; 原核表达; 空间构象

[ 中图分类号 ] R318 [ 文献标识码 ] A

## Cloning, Expression and Space Conformation Analysis of Vascular Basement Membrane-Derived Multifunctional Peptide

PENG Shu-ping, FANG Wei-yi, DAI Wen-jian, ZOU Xiao-qing, LIU Hong-ying, SHI Shu-hong, CAO Jian-guo ( Cancer Research Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, China )

[ Abstract ] **Objective:** To construct cloning and prokaryotic expression vector of vascular basement membrane-derived multifunctional peptide and to analyze its space conformation. **Methods:** Vascular basement membrane-derived multifunctional peptide ( VBMDMP ) sequence obtained by polymerase chain reaction was cloned into vector pUC19. We also sub-cloned it into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The recombinant was confirmed by restriction endonuclease digestion and auto-sequencer. pGEX-4T-1-VBMDMP was transformed into *E. coli* JM109. 0.1 mmol/L IPTG can induce high expression of GST-VBMDMP. GST-VBMDMP was obtained by Glutathione Sepharose 4B columns. The space conformation of VBMDMP was predicted by using computer program Antheprot. **Results:** The recombinant VBMDMP gene confirmed by restriction endonuclease digestion and auto-sequencer was consistent with sequence we designed. The high expression of GST-VBMDMP was induced by 0.1 mmol/L IPTG in *E. coli* JM109. GST-VBMDMP was highly purified. The analysis of software Antheprot demonstrated that the two domains of tumstatin linked by upper hinge region of IgG3 can extend itself freely. **Conclusion:** The cloning and prokaryotic expression vector was successfully constructed.

[ Key words ] vascular basement membrane; derived peptide; upper hinge region of IgG3; tumstatin; prokaryotic expression; space conformation

\* 胶原 IV 是血管基底膜的主要大分子, 能促进细胞的黏附, 迁移, 分化和生长。组成胶原 IV 的核苷酸编码 6 条不同的  $\alpha$  链, 即  $\alpha 1$ - $\alpha 6$ , 胶原 IV 的每条  $\alpha$  链由三个部分组成: N-端的 7S 区域, 中间的三股螺旋区域, C-端的非胶原区域 1( NC1 )<sup>[1]</sup>。肿瘤抑素( Tumstatin ) 是来自人类胶原 IV $\alpha 3$  链的非胶原区域 1 具有抑制血

[ 基金项目 ] 湖南省卫生厅重点科研项目( 2001-Y055 ); 湖南省教育厅科研项目( 99C202 )

[ 作者简介 ] 彭淑平( 1976- ), 女, 湖南省浏阳县人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学方面的研究

[ 通讯作者 ] 曹建国

管生成和肿瘤生长作用的因子<sup>[1]</sup>。它的 2 个功能区域:(74-98 氨基酸)<sup>[2-3]</sup>和(197-215 氨基酸)<sup>[4-5]</sup>功能肽分别具有抑制血管内皮细胞增殖、诱导内皮细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的活性,而(197-215 氨基酸)功能肽作为整体的一部分时,不显示抗肿瘤细胞增殖的功能。有学者分析,可能是 Tumstatin 的 197-215 氨基酸功能肽活性区域受体结合部位被掩盖,阻碍了与受体的结合,影响了功能的发挥<sup>[6]</sup>。因此,我们设计了一种用人源性 IgG3 上游铰链区连接肽<sup>[7]</sup>连接的 Tumstatin 的 2 个功能区即血管基膜衍生多功能肽(vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, VBMDMP),人工合成了该基因序列,并克隆到 pUC19 载体和亚克隆至 pGEX-4T-1 质粒,重组质粒 pGEX-4T-1-VBMDMP 在大肠杆菌 JM109 中获得了表达。同时对 VBMDMP 进行了空间结构的分析和预测。

cgggatcc aca atg cca ttc tta ttc tgc aat gtc aat gat gta tgt aat ttt gca tct cga aat gat tat tca tac

BamH I I M P F L F C N V N D V C N F A q R N D Y q Y

Tumstatin 74-98aa 序列

tgg ctg acc cca ctt ggt gac aca act cac aca tcc gga tgc aac tac tat tca aat tcc tac agt ttc tgg ctg

W L T P L G D T T H T S G C N Y Y S N S Y S F W L

IgG3 上游铰链区序列

Tumstatin 197-215aa 序列

gct tca tta aac cca gaa aga aagctc cc

A S L N P E R Hind III

根据肿瘤抑素两个功能区和 IgG3 上游铰链区的序列,结合 Peptool 软件分析,设计并合成了 3 条引物:

F1: CCGGATCCACAATGCCATTCTTATTCTGCAA  
TGTC AATGATGTATGTAATTTTCATCTCGAAATGATT  
ATT ( BamH I )

F2: TGCATCTCGAAATGATTATTCATACGGGCTG  
ACCCCACTTGGTGACACAACCTCACACATCCGGATGAT  
GCAAC

R1: CCCAAGCTTTCTTTCTGGGTTTAATGAAGCC  
AGCCAGAACTGTAGGAATTTGAATAGTAGTTGCATCC  
GGATGTGTGAG ( Hind III )

以 F2 为模板,R1 为引物进行延伸反应: F2 5 μl, R1 5 μl, 10 × 连接缓冲液 10 μl, dNTP 16 μl; H<sub>2</sub>O 63 μl, 94℃ 30 s, 在 10 min 内冷却至 55℃, 加入 Taq 酶 1 μl, 保温 5 min, 72℃ 5 min。以延伸产物为模板, F1、R1 为引物进行 PCR 反应: F1 1 μl, R1 1 μl; 延伸反应液 1 μl, dNTP 10 μl, 10 × Taq 酶缓冲液 1 μl, H<sub>2</sub>O 76 μl; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环。用乙醇沉淀 DNA, TE 液溶解。

产物鉴定: 1% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 30 min, 在紫外灯下观察并用凝胶成像系统照相。另外一管于

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 JM109, 载体 pUC19, T<sub>4</sub>DNA 连接酶均为 TakaRa 公司产品; pGEX-4T-1, Glutathione Sepharose 4B 层析柱购自安玛西亚公司。Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶 BamH I, Hind III, EcoR I, Sal I 购自 MBI 公司, 蛋白质分子量标准为华美公司产品; IPTG, X-gal 购自 MBI 公司; Acr, Bis, DTT, 考马斯亮蓝 R-250、氯仿、异戊醇、溴乙锭、二甲苯青、溴酚兰、DNA 分子量标准、dNTP、SDS、Tris、EDTA、Rnase 为上海生工产品; 大肠杆菌完全培养基 LB(1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% 氯化钠, pH7.0) 为上海生工产品。

### 1.2 VBMDMP 基因合成

设计的序列如下:

PE310 全自动荧光测序仪测序。

### 1.3 VBMDMP 的克隆

酶切反应: PCR 反应液 20 μl, 10 × 酶切缓冲液 3 μl, BamH I 3 μl, Hind III 3 μl, H<sub>2</sub>O 64 μl, 37℃ 1 h, 用乙醇沉淀 DNA, 20 μl TE 液溶解沉淀。

反应体系: pUC19 20 μl, 10 × 酶切缓冲液 3 μl, BamH I 3 μl, Hind III 3 μl, H<sub>2</sub>O 64 μl; 37℃ 1 h, 用乙醇沉淀 DNA, 20 μl TE 液溶解沉淀。

连接反应: 插入 DNA(酶切后) 2 μl, pUC19(酶切后) 1 μl, H<sub>2</sub>O 2 μl, 16℃ 30 min。

转化: 将连接液全量转化大肠杆菌 JM109 感受态细菌, 取 50 μl, 100 μl 铺含 IPTG, X-gal 和氨苄青霉素(100 μg/ml) 的新鲜平板。

重组子的筛选: 挑取白色单菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 200 r/min 振荡过夜。提取质粒并行 BamH I, Hind III 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 同时取少量用 Sanger 双脱氧终止法于 PE310 全自动荧光测序仪测序。

### 1.4 pGEX-4T-1-VBMDMP 表达载体构建及在大肠杆菌中的表达

用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切 pUC19-

VBMDMP 质粒,重新设计引物 F1 和 F2,两端带 EcoR I 和 Sal I 酶切位点。

F1: GCGAATTCACAATGCCATTCTTATCTG( EcoRI )

F2: GCGTCGACTCTTTCTGGGTTAATGAAG( SalI )

PCR 扩增目的片段,用 PCR 产物回收试剂盒回收目的片段 VBMDMP, EcoR I 和 Sal I 双酶切 pGEX-4T-1 和目的片段 VBMDMP,回收酶切后的 pGEX-4T-1 和目的片段 VBMDMP,以 1:6 摩尔数之比加入 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接过夜,转化感受态 *E. coli* JM109。氨苄青霉素筛选阳性克隆。挑取阳性克隆于含氨苄青霉素 100 μg/ml 的 LB 培养基中 37℃ 过夜培养,小量提取质粒,酶切、PCR、测序鉴定。取鉴定后的单克隆菌落于 5 ml LB 培养基,37℃ 过夜培养,以 1:100 接种于新鲜培养基 250 r/min 振荡 3 h,加入 IPTG 0.1 mmol/L 诱导 3~10 h,取 1 ml 菌液,12 kg × 5 min 离心收集菌体。用 PBS 洗涤 1 次,加入等体积的蛋白质上样缓冲液,沸水浴中 5 min 后上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳( SDS-PAGE ),浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,电泳缓冲液采用 Tris-甘氨酸系统。

### 1.5 VBMDMP 的鉴定和纯化

重组菌株菌液 100 ml 诱导 4 h 后,培养液 5 kg × 10 min 收集菌体,悬浮于 1 ml 预冷的 PBS( 150 mmol/L NaCl, 16 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4 )中,冰上超声破碎细胞 10 × 30 s 然后加入预冷的 Triton X-100 至终浓度 1%,4℃ 温和搅拌 30 min,离心 12 kg × 5 min,收集破碎的上清液过 Glutathione Sepharose 4B 层析柱;PBS, pH7.3 充分洗脱,然后用 5~10 倍柱床体积的还原型谷胱甘肽洗脱( 20 mmol/L ),浓缩收集成分即为纯化的 GST-VBMDMP。

### 1.6 VBMDMP 构象分析

将血管衍生多功能肽对应的氨基酸序列输入计算机,利用 Antheprot 软件进行蛋白质结构的分析预测。

## 2 结果

### 2.1 VBMDMP 基因合成

为了便于克隆,在该序列两端设计了 BamH I 和 Hind III 的酶切位点,先将两段引物延伸后,进行 PCR 反应,取反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到 180 bp 左右的条带( 图 1 ),与设计基因序列 177 bp 一致。

### 2.2 pUC19-VBMDMP 克隆载体的构建

BamH I 和 Hind III 双酶切目的片段和载体 pUC19,用 T4DNA 连接酶连接过夜后,转化大肠杆菌 JM109 感受态细菌,得到重组质粒 pUC19-VBMDMP,酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳,出现了质粒大片段和 180 bp 左右的

条带,初步认为获得了重组子( 图 2 )。为进一步确证,对该重组子进行了序列分析,插入的序列与完全相符。

图 1 PCR 产物的鉴定

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products

M: Marker; 1, 2: PCR products

图 2 质粒 pUC19-VBMDMP 的酶切鉴定

Fig. 2 Recombinant plasmid pUC19-VBMDMP digested with BamH I and Hind III

M: Marker; 1, 2: pUC19-VBMDMP digested with BamH I and Hind III; 3: Negative control

### 2.3 pGEX-4T-1-VBMDMP 表达载体构建及在大肠杆菌中的表达及纯化

用 EcoR I 和 Sal I 双酶切 pGEX-4T-1- VBMDMP,得到质粒片段和 180 bp 左右的条带,而 pGEX-4T-1 空质粒仅有质粒大片段条带,可知得到重组的 pGEX-4T-1- VBMDMP( 图 3 )。测序鉴定无错码和移码突变,36~212 bp 与预计的序列完全一致。

由( 图 4 )可见,对照 JM109 组( 转化有载体质粒 pGEX-4T-1 )可诱导 26 kD 的特异蛋白( GST 片段 ),转化有重组质粒 pGEX-4T-1- VBMDMP 的 JM109 经 IPTG 诱导后,在 33 kD 左右出现一条新的蛋白带,与预期的

分子量大小相吻合,而在 26 kD 处的蛋白带消失了,说明插入的外源基因已经成功地在大肠杆菌中表达,并与 GST 形成了融合蛋白。可溶性成分直接用 Glutathione Sepharose 4B 层析柱纯化表达产物上清液,得到单一的 GST-VBMDMP 融合蛋白(如图 5 所示)。GST-VBMDMP 占大肠杆菌表达产物的 18.5%,纯化效率为 90%。

伸展。

### 3 讨论

肿瘤的生长和转移依赖于组织内新生血管的形成<sup>[8]</sup>。后者不仅为肿瘤提供营养物质和代谢产物的通路,而且以旁分泌的方式刺激肿瘤的生长。因此,抑制肿瘤的新生血管的形成和抑制肿瘤细胞的增殖均能控制肿瘤的生长。Tumstatin 的空间构象不影响抑制血管生成的活性,却限制了它的抑制肿瘤细胞增殖的功能。本研究设计了人源性 IgG3 上游铰链区连接肽连接 Tumstatin 的 2 个功能区的血管基膜衍生多功能肽。人源性 IgG3 上游铰链区由 11 个氨基酸组成,柔性好,不影响连接两端肽段的空间构象。Antheptrot 软件分析获得了 VBMDMP 的二级空间构象图谱, IgG3 上游铰链区连接肽位于 26 ~ 37 aa,其两端均有松散结构,它两端连接的片段可以自由伸展,能保障连接两端肽段空间构象的独立性。VBMDMP 可能实现抑制肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞增殖的功能。

图 3 质粒 pGEX-4T-1-VBMDMP 的酶切鉴定

Fig.3 Electrophoresis of digested recombinant plasmid pGEX-4T-1-VBMDMP

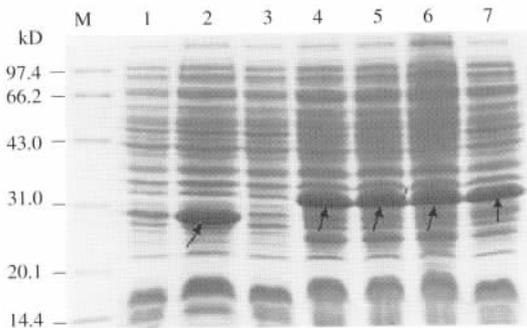


图 4 pEGX-4T-1-VBMDMP 在 *E. coli* JM109 中的表达

Fig.4 The expression of pGEX-4T-1-VBMDMP in *E. coli* JM109

M: Protein weight marker; 1: GST before IPTG; 2: GST 4 h after IPTG induction; 3: GST-VBMDMP before IPTG; 4 ~ 7: GST-VBMDMP 2, 4, 6, 10 h after IPTG induction

#### 2.4 VBMDMP 的构象分析

将血管基膜衍生多功能肽序列输入计算机,利用 Antheptrot 软件进行分析。该软件测得蛋白质的分子量为 6.38 kD,等电点为 4.395,在第 14 ~ 20 氨基酸和第 35 ~ 38 位氨基酸区域存在信号肽的潜在切割位点。二级结构图显示: IgG3 上游铰链区连接肽位于 26 ~ 37 aa,其两端均有松散结构,它两端连接的片段可以自由

图 5 GST-VBMDMP 的纯化

Fig.5 Purification of GST-VBMDMP

M: Protein weight marker; 1: GST before purification; 2: GST after Purification; 3: GST-VBMDMP before purification; 4: GST-VBMDMP after purification

VBMDMP 由 55 个氨基酸组成,分子量较小,在细菌表达产物作用下容易降解,因此,采用 GST 融合蛋白的形式使之稳定表达,并用 GST 柱进行了亲和层析鉴定和纯化。

#### [参考文献]

[1] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 21340-21348.  
 [2] Petitclerc E, Ariel Boutaud, Archie Prestayko, et al. New func-

tions for non-collagenous domains of human collagen[ J ]. J Biol Chem, 2000, 275: 8051-8061.

- [ 3 ] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, *et al.* Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane[ J ]. J Biol Chem, 2000, 275: 21340-21348.
- [ 4 ] Monboisse JC, Garnotel R, Bellon G, *et al.* The  $\alpha 3$  chain of type IV collagen prevents activation of human polymorphonuclear leukocytes[ J ]. J Biol Chem, 1994, 269( 37 ): 25475-25482.
- [ 5 ] Han J, Ohno N, Pasvco S, *et al.* A cell binding domain from the  $\alpha 3$  chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cells[ J ]. J Biol Chem, 1997, 272( 33 ): 20395-20401.
- [ 6 ] Fawzi A, Robinet A, Monboisse JC, *et al.* A peptide of the alpha

3( IV )chain of type IV collagen modulates stimulated neutrophil function via activation of camp-dependent protein kinase and Ser/Thr protein phosphatase[ J ]. Cell Signal, 2000, 12( 5 ): 327-335.

- [ 7 ] Rheinnecker M, Hardt C, Ilag LL, *et al.* Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen[ J ]. J Immunol, 1996, 157( 7 ): 2989-2997.
- [ 8 ] Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications[ J ]. N Engl J Med, 1971, 18( 285 ): 1182-1186.

[ 收稿日期 ] 2002 - 12 - 09

[ 修回日期 ] 2003 - 04 - 30

## · 研究简报 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X ( 2003 )03-0189-01

### 胰腺癌病人外周血树突状细胞体外扩增及表型检测

孙早喜<sup>1</sup>, 孙诚谊<sup>1</sup>, 王福生<sup>2</sup> ( 1. 贵阳医学院附院外科, 贵州 贵阳 550001; 2. 解放军 302 医院生物工程室, 北京 100039 )

胰腺癌(pancreatic carcinoma, PC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,早期诊断率和手术切除率均较低。胰腺癌细胞对放化疗不敏感,以往的生物免疫治疗很不满意,因而胰腺癌的治疗十分棘手,预后十分恶劣,被列为二十一世纪医学顽固堡垒,所以,以提高胰腺癌总体疗效为目的规范化综合治疗成为当前研究的重要课题。树突状细胞(dendritic cells, DC)在综合治疗中显得特别重要,已知 DC 是人体内最具潜能的抗原提呈细胞,能提呈抗原给 MHC-I (class I major histocompatibility complex, MHC-I) 类限制性 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 MHC-II (class II major histocompatibility complex, MHC-II) 类限制性 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞,诱导特异性免疫反应,同时提供共刺激分子、细胞因子及细胞黏附分子,在抗肿瘤中发挥重要作用。DC 的数量极少,特别是肿瘤病人外周血更少,并且肿瘤病人 DC 表型不成熟和功能缺陷。已证实,联合应用粒/巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 白介素 4(interleukin-4, IL-4) 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 能引起 DC 增殖并进一步增强 DC 免疫功能及表面免疫分子表达。本研究旨在通过对正常人和胰腺癌病人外周血 DC 的扩增和表型检测比较,为胰腺癌的 DC 临床免疫治疗提供理论依据。

MHC-I, II 类分子的表达受分化、外来免疫、炎症刺激的调节,并且 MHC-I 表达于所有的有核细胞,而 MHC-II 只表达于淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞、活化 T 细胞和一些其他类型细胞;MHC-I, II 类基因和分子的转录与表达受到协同调节;细胞因子可以调节许多不同类型的

MHC-I, II 类基因的转录速度。

用淋巴细胞分离液同时分别分离等量(10 ml)正常人和胰腺癌病人肝素抗凝新鲜全血以获得单核细胞,以 PBS 液洗涤单核细胞 2~3 次(尽量洗去血小板)。用贴壁法分别获取 DC,以 hGM-CSF, hIL-4, hTNF- $\alpha$ , PC3 肿瘤相关抗原(PC3 tumor associated antigen, PC3 TAA)分别刺激培养正常人或胰腺癌病人 DC,隔天 1/3 量换液,并追加细胞因子,分别在加细胞因子前,加细胞因子后的第 2 天,第 4~5 天,第 7~8 天在倒置显微镜下观察 DC 的形态,7~8 d 后收集 DC,并利用流式细胞仪检测 DC 表型。

研究结果显示,体外多种细胞因子和肿瘤相关抗原能有效地引起 DC 增殖,平均 10 ml 正常人外周血 DC 为  $(1.2 \sim 2.0) \times 10^8 L^{-1}$ , 10 ml 胰腺癌病人外周血 DC 为  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^8 L^{-1}$ , 典型的 DC 形态为多角形、毛刺状、或聚集成向阳花状,并悬浮于细胞液中。获得的 DC 高表达 CD80, CD83, CD86(正常人表达比胰腺癌病人略高,胰腺癌病人培养后表达比培养前明显增高),低表达 CD1a(正常人和胰腺癌病人相比较,其区别不明显)。

本研究表明,体外多种细胞因子和肿瘤相关抗原可使正常人、胰腺癌病人外周血 DC 扩增和成熟,这为 DC 在胰腺癌的特异性和非特异性免疫治疗提供了条件。

[ 关键词 ] 树突状细胞; 单核细胞; 胰腺癌; 细胞因子

[ 中图分类号 ] R735.9; R730.3 [ 文献标识码 ] D

[ 收稿日期 ] 2003 - 01 - 10

[ 修回日期 ] 2003 - 03 - 20