

NK4 蛋白在大肠杆菌中的表达及其活性研究*

罗建平¹ 滑世轩¹ 赵行¹ 岑东^{2**} 吕建新¹ 涂植光³ 裴仁治²

(1 温州医学院 浙江省医学遗传学重点实验室 温州 325027 2 浙江省鄞州人民医院 宁波 315040)

(3 重庆医科大学医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆 400016)

摘要 NK4 蛋白是近年来发现的肝细胞生长因子的最佳拮抗剂。为规模化生产 NK4 蛋白,将 NK4 基因插入载体 pET-26b(+),构建重组原核表达载体 pET-26b(+)-NK4,并转化大肠杆菌 Rosseta(DE3)。转化菌经 IPTG 诱导后以包涵体形式大量表达重组蛋白,占菌体总蛋白的 42%。包涵体用盐酸胍溶解后经 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化,蛋白纯度约为 95%,经 Western blot 证实为 NK4 蛋白。纯化的重组蛋白行稀释复性后可抑制 Hela 细胞的贴壁、迁徙,并诱导其凋亡,证实制备的 NK4 蛋白具有生物活性。NK4 蛋白的成功制备将有助于 NK4 相关功能的深入研究。

关键词 NK4 蛋白 重组 表达 纯化 生物活性

中图分类号 Q819

NK4 是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF) α -链的含 447 个氨基酸的片段,包括 N-末端的发夹结构和 4 个 Kringle 结构,编码序列长度 1 434 bp,相对分子量 50 kDa,可经胰弹力蛋白酶水解 HGF 获得^[1]。NK4 保留了与受体 c-Met 结合的结构域,可与 HGF 竞争结合 c-Met 受体,但不能诱导 c-Met 的酪氨酸磷酸化,从而阻断 HGF/Met 系统的信号转导,抑制 HGF 的生物学效应,是目前已知的 HGF 的最佳拮抗剂^[2-4]。体外实验证实 NK4 可抑制 HGF 诱导的肿瘤细胞的增殖、迁徙和侵袭^[5-6]。此外,NK4 还能抑制血管新生^[1,2]。因此,NK4 在肿瘤治疗方面前景广阔。本文构建 NK4 原核表达载体,进行了在 *E. coli* Rosseta(DE3)的表达、纯化、复性及其生物学活性的初步研究,为规模化生产和功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 菌株 *E. coli* Rosseta(DE3)、*E. coli* DH5 α 为本室保存;重组载体 pVITRO₂-mcs-NK4 由

本室构建^[7];载体 pMD₁₉-T Simple 购自大连宝生物工程公司;载体 pET-26b(+)购自 Novagen 公司。

1.1.2 酶和试剂 限制性酶 *Nde* I 和 *Sal* I、质粒提取试剂盒、T₄ DNA 连接酶、DNA 胶回收试剂盒购自宝生物工程公司;Ni-NTA 亲和树脂购自上海申能博彩;兔抗人 HGF 多克隆抗体购自 Abcam 公司;羊抗兔 IgG 二抗购自碧云天生物研究所;PCR 引物由上海生工合成;DNA 聚合酶、氯霉素、卡那霉素等购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 NK4 基因的克隆 应用 Primer Express Software Program 2.0 设计引物,在上下游引物 5'端分别引入用于定向克隆的限制性内切酶 *Nde* I、*Sal* I 酶切位点,以含有 NK4 基因的重组载体 pVITRO₂-mcs-NK4 为模板扩增目的基因。上游引物:5'-GCCGCGATATGCAAAGGAAAAGAAGAAAT-3',下游引物:5'-GCGTCGACGACTATTGTAGGTGTGGTAT-3',扩增子长度 1 359 bp。扩增条件:95℃ 7 min、75℃ 3 min;变性和延伸条件分别为 94℃ 45 s 和 72℃ 2 min,退火温度由 64℃ 以每循环降 1℃ 的速率至 61℃,4 个循环;94℃ 45 s,60℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环。1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离特异性产物,DNA 胶回收试剂盒回收纯化 NK4 基因 cDNA 并测定浓度。将 NK4 基因 cDNA 与载体 pMD₁₉-T Simple 连接构建重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4,转化 *E. coli* DH5 α ,行氨

收稿日期:2009-05-18 修回日期:2009-07-28

* 浙江省医药卫生科学研究基金(2003B172,2007A175)、宁波市医药卫生科学研究基金(2003079)、宁波市科技计划(2007C10065)资助项目

**通讯作者,电子信箱:cendong2002@163.com

芑霉素和 α -筛选。采用菌落 PCR、*Nde* I 和 *Sal* I 双酶切和序列分析等方法,鉴定目的基因。

1.2.2 NK4 重组表达载体构建 转化重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4 的 *E. coli* DH5 α 增菌后,提取重组载体行 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切。酶切产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离纯化,插入经相同双酶切的载体 pET-26b(+)。连接产物以冷 CaCl_2 法转化 *E. coli* Rosseta(DE3) 并行卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和氯霉素(34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)筛选,阳性菌株命名为 Rosseta(DE3)/pET-26b(+)-NK4。重组表达载体用菌落 PCR 和双酶切鉴定。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达 诱导时间优化:重组菌 Rosseta(DE3)/pET-26b(+)-NK4 接种于 LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素、34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素),37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,取 1ml 菌液以 1:50 行扩大培养,至 OD₂₆₀ 为 0.6 时加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG,诱导表达 5h。每 1h 取样 1 次,每次 80 μl ,加入 20 μl 5 \times 上样缓冲液,混匀后煮沸 5min,12000 r/min,3min,行 SDS-PAGE 分析。

IPTG 浓度优化:同上增菌后的重组菌 Rosseta(DE3)/pET-26b(+)-NK4 培养物分别加入终浓度为 0.1 mmol/L ~ 1.0 mmol/L IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 3 h 后取样同上处理分析。

诱导温度的优化:同上增菌后的重组菌 Rosseta(DE3)/pET-26b(+)-NK4 培养物加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG,分别于 16 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 3 h 后取样同上处理分析。

1.2.4 Western blot 分析 取诱导后的菌液行 12% SDS-PAGE,转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭。加 1:500 稀释的兔抗人 HGF 多克隆抗体^[8],4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗膜后加 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 单抗,室温振荡 1h。洗膜后采用 DAB 试剂盒显色。

1.2.5 重组蛋白的分离纯化 包涵体的洗涤:称量菌体湿重,以 1g 菌:20ml pH 8.0 细菌裂解液(50mmol/L Tris-HCl,0.1mol/L NaCl,0.5% Triton X-100,2mmol/L EDTA,1% β -ME,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶菌酶)混匀后超声裂解(400 W,10 s,间隔 20 s,300 次),4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min、10 min,弃上清,沉淀按序用 pH 8.0 包涵体洗涤液 A(2 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L EDTA,1% Triton X-100,5 mmol/L β -ME,50 mmol/L NaCl),B 液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0),C 液(ddH₂O),各 3 次。6 mol/L 盐酸胍溶解包涵体,测定蛋白浓度^[9]。

Ni-NTA 树脂亲和层析法^[10]纯化 NK4 蛋白:以 1ml

Ni-NTA 树脂:10 mg 蛋白挂柱,5 倍 NTA 体积的咪唑缓冲液平衡(流速 30ml/h),再用 20mmol/L ~ 200mmol/L 咪唑缓冲液连续洗脱(流速 15ml/h)。收集吸收峰值的洗脱液,行 SDS-PAGE 分析,同时以含其他浓度咪唑的吸收峰值洗脱液作为对照。

1.2.6 重组蛋白的复性 纯化的重组蛋白用 pH8.0 复性液(5% 甘油,0.1mol/L Tris-HCl,0.4mol/L 精氨酸,1 mmol/L GSH,0.2 mmol/L GSSH)行稀释复性。复性后按序用透析液 A 液(5% 甘油,0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L 精氨酸,pH 8.0),B 液(5% 甘油,0.1 mol/L Tris-HCl,pH 8.0),C 液(50 mmol/L PB,pH 8.0)行透析,各 3 次,每 6 h 换液 1 次。以牛血清白蛋白为标准制备标准曲线,采用考马斯亮蓝法测定复性蛋白浓度,真空冷冻干燥后于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.7 重组蛋白活性的测定 重组蛋白作用于 Hela 细胞培养物,观察其对后者的贴壁、迁徙和凋亡等的影响。在 Hela 细胞培养物中加入重组蛋白(7 $\mu\text{g}/\text{ml}$),常规培养,观察重组蛋白对细胞贴壁(培养 1.5 h)和凋亡(培养 24 h)的影响,以加入等量 PBS 的 Hela 细胞组作为对照。无菌盖玻片平放于 6 孔板中部,加入 Hela 细胞,常规培养,待其贴壁后将盖玻片取出,培养板底部出现边界整齐无细胞空白区。加入重组蛋白(7 $\mu\text{g}/\text{ml}$),常规培养 24 h 后观察重组蛋白对 Hela 细胞迁徙的影响,以加入等量 PBS 的 Hela 细胞组作为对照。

2 结 果

2.1 NK4 重组克隆载体的构建与鉴定

NK4 基因 cDNA 与载体 pMD₁₉-T Simple 连接后成功构建重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4,转染 *E. coli* DH5 α ,筛选出阳性菌落。将菌落直接 PCR 产物、*Nde* I 和 *Sal* I 双酶切产物、重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4 提取物同时电泳,可见与目的片段大小相似的特异性条带(1 359 bp,图 1),提示重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4 成功构建。

取纯化的重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4,采用双脱氧链末端终止法在 ABI PRISM 377-96 型测序仪上行双向测序,序列测定结果与 Genebank 报道的 2.3 kb HGF mRNA 的 cDNA 序列(M60718)[长度为 2 306 bp, cds = (73,2 259)]报道区域(166,1 506)的序列相同,证实重组于载体 NK4 基因片段序列正确。

2.2 重组表达载体 pET-26b(+)-NK4 的构建与鉴定

将经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切后回收的重组克隆载体

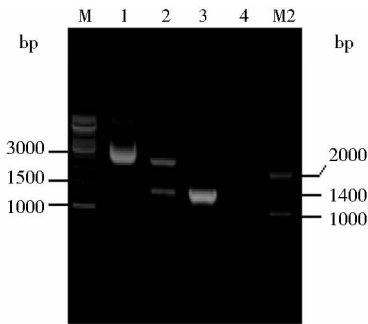


图1 重组克隆载体 pMD₁₉-T Simple-NK4 的鉴定

Fig.1 Identification of recombinant cloning vector pMD₁₉-T Simple-NK4

M₁, M₂:DNA markers;1:Uncleaved recombinant vector pMD₁₉-T Simple-NK4;2:Product of the recombinant vector pMD₁₉-T Simple-NK4 after *Nde* I, *Sal* I double restriction enzyme cleavage; 3:Direct PCR product of screened colony;4:Negative control

pMD₁₉-T Simple-NK4 和 pET-26b(+)的目的片段连接,成功构建重组表达载体 pET-26b(+)-NK4,转化 *E. coli* Rosseta(DE3),筛选出阳性菌落。将阳性菌落直接 PCR 产物、*Nde* I 和 *Sal* I 双酶切产物、重组载体 pET-26b(+)-NK4 提取物和未酶切重组载体 pMD₁₉-T Simple-NK4 同时电泳,可见与目的片段大小相似的特异性条带(1 359 bp,图 2),提示重组表达载体 pET-26b(+)-NK4 构建成功。

2.3 重组蛋白表达的诱导条件优化

诱导条件优化实验表明,当重组菌 Rosseta(DE3)/pET-26b(+)-NK4 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后重组蛋白达最高水平,延长诱导时间未能促进其表达(图 3A);重组菌经各浓度 IPTG 诱导 3 h 后发现组间重组蛋白表达量无明显差别(图 3B);重组菌在含 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中置 4 种温度诱导 3 h,发现 37℃ 组重组蛋白表达量最高(图 3C)。Western blot 证实重组菌经诱导后产生的 50 kDa 的重组蛋白为 NK4 蛋白(图 3D),提示重组菌 Rosseta(DE3)/pET-26b(+)-NK4 能表达 NK4 蛋白。因此,以 37℃,0.5 mol/L IPTG 诱导 3 h 作为 NK4 蛋白表达的诱导条件。

2.4 重组蛋白的分离纯化

将溶解的包涵体蛋白挂 Ni-NTA 柱后用梯度浓度咪唑缓冲液洗脱,取洗脱液测定纯度并行 SDS-PAGE 电泳,采用 Bradscan 凝胶图像分析软件分析洗脱效果。结果提示 60 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱的重组蛋白浓度

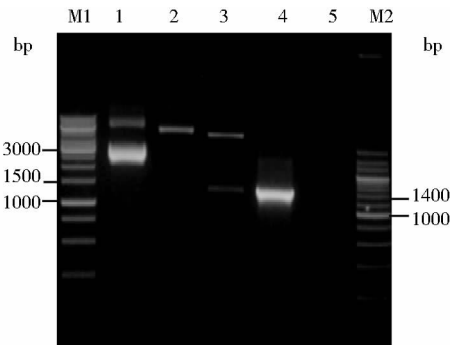


图2 重组表达载体 pET-26b(+)-NK4 的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant expression vector pET-26b(+)-NK4

M₁, M₂:DNA markers;1:Uncleaved recombinant cloning vector pMD₁₉-T Simple-NK4; 2: Uncleaved recombinant expression vector pET-26b(+)-NK4;3:Product of the recombinant vector pET-26b(+)-NK4 after *Nde* I, *Sal* I double restriction enzyme cleavage;4:Direct PCR product of screened colony; 5:Negative control

与纯度(95%)均理想,采用其他浓度咪唑缓冲液洗脱效果不佳(图 4)。

2.5 重组蛋白的复性与活性鉴定

以含 7 μg/ml 复性重组蛋白的 Hela 细胞培养物为观察组,以加等量 PBS 的 Hela 细胞为对照。结果发现:培养 1.5 h 后,对照组细胞已贴壁且形态呈梭型或不规则而观察组细胞形态仍为圆形,未发现贴壁生长(图 5);培养 24h 后,观察组细胞数量少,可见较多的凋亡细胞,而对照组细胞生长理想,凋亡细胞少见(图 6);细胞迁徙试验发现,培养 24h 后观察组细胞迁徙较对照组明显受抑制(图 7)。

上述结果提示 NK4 蛋白复性成功,且保留了生物学活性。

3 讨论

外源性蛋白表达通常采用真核表达和原核表达两种方式,前者获得的蛋白活性较高,但效率低,不便于规模化生产;后者成本低且可大量表达,虽存在蛋白易发生折叠错误形成无活性的包涵体等问题,但可通过复性使目的蛋白恢复生物学功能。

基于此,我们在现工作基础上构建 NK4 重组原核表达载体。在载体选择方面,鉴于载体 pET-26b(+)带有 6 个 His-Tag,在表达外源蛋白时可在 C-末端加 6 个组氨酸的标签,便于采用 Ni-NTA 树脂进行亲和层析以

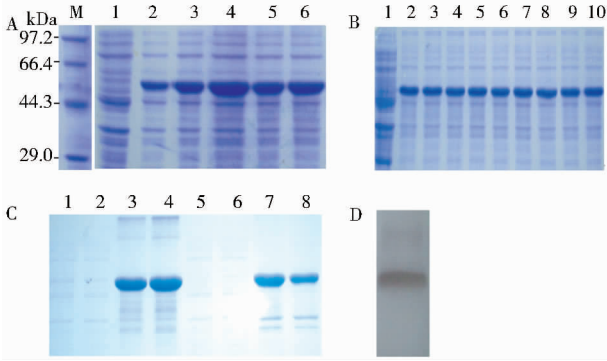


图3 重组蛋白表达诱导条件的优化和 Western blot 分析

Fig.3 Optimization of induction condition for recombinant protein expression and its identification by Western blot

(A) Optimization of induction time M: Protein marker; 1: Total protein of uninduced Rosseta (DE3)/pET-26b(+)-NK4; 2~6: Total protein of Rosseta (DE3)/pET-26b(+)-NK4 induced after 1h, 2h, 3h, 4h and 5h with IPTG, respectively (B) Optimization of induction concentration of IPTG 1: Total protein of uninduced Rosseta (DE3)/pET-26b(+)-NK4; 2~9: Total protein of Rosseta (DE3)/pET-26b(+)-NK4 induced by 0.1mol/L~0.8mol/L IPTG; 10: Total protein of Rosseta (DE3)/pET-26b(+)-NK4 induced by 1.0mol/L IPTG (C) Optimization of induction temperature 1~2: Supernatant induced by 37℃ and 30℃, respectively; 3~4: Precipitation induced by 37℃ and 30℃, respectively; 5~6: Supernatant induced by 25℃ and 16℃, respectively; 7~8: Precipitation induced by 25℃ and 16℃, respectively (D) Identification of NK4 protein by Western blot

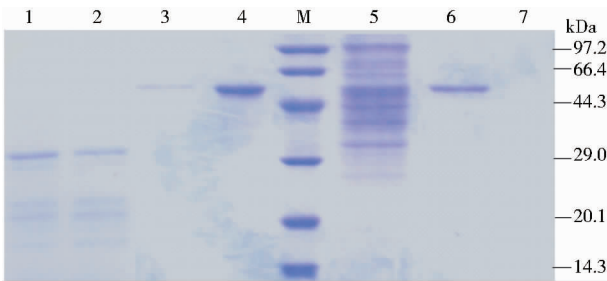


图4 重组蛋白的 Ni-NTA 亲和层析纯化
Fig.4 Purification of recombinant protein by Ni-NTA affinity chromatography

M: Protein marker;1:Liquid penetration of sample; 2~7: The eluent with 0, 40, 60, 80, 100, 200 mmol/L glyoxalin buffer

分离纯化目的蛋白^[10]。因此我们采用载体 pET-26b(+)与 NK4 基因重组,构建了 NK4 原核表达载体

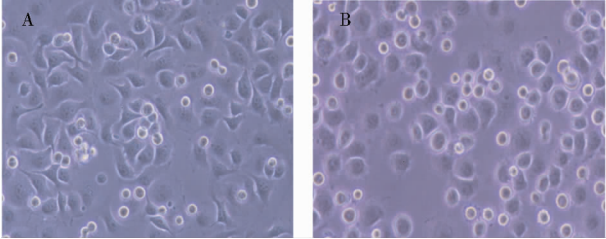


图5 重组蛋白对 HeLa 细胞贴壁的影响 (×200)
Fig.5 Effect of recombinant protein on HeLa cell adherence

(A) Control group cultured for 1.5h (B) Test group cultured for 1.5h in presence of 7μg/ml recombinant protein

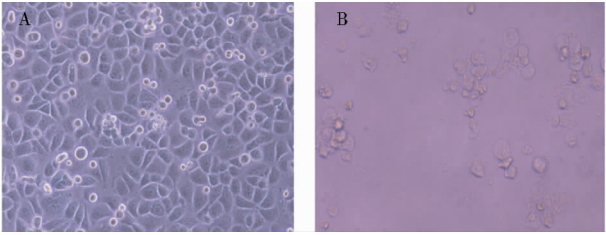


图6 重组蛋白对 HeLa 细胞凋亡的影响 (×200)
Fig.6 Effect of recombinant protein on HeLa cell apoptosis (original magnification, ×200)

(A) Control group cultured for 24h (B) Test group cultured for 24h in presence of 7μg/ml recombinant protein

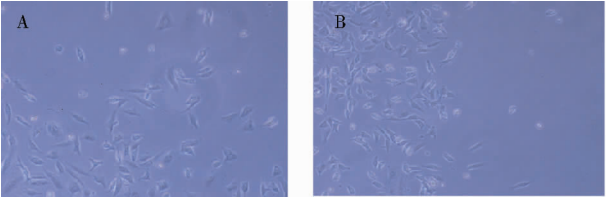


图7 重组蛋白对 HeLa 细胞迁徙的影响 (×200)
Fig.7 Effect of recombinant protein on HeLa cell migration

(A) Control group cultured for 24h (B) Test group cultured for 24h in presence of 7μg/ml recombinant protein

pET-26b(+)-NK4,经卡那霉素和和氯霉素联合筛选、转化菌直接 PCR、Nde I 和 Sal I 双酶切产物和测序等证实了 NK4 基因的成功重组。

重组菌 Rosseta (DE3)/pET-26b(+)-NK4 的表达效率是该项工作的重点。为此我们对 NK4 基因表达的诱导条件(诱导时间、温度和诱导剂 IPTG 浓度)进行了优化,并行 SDS-PAGE 确认。优化结果表明,在 37℃、0.5 mmol/L IPTG、诱导时间 3 h 等条件下重组蛋白表

达量达到最高水平,约占菌体总蛋白的 42%,且经 Western blot 证实重组目的蛋白为 NK4 蛋白。

制备的 NK4 蛋白的生物学活性的保持是本项工作的另一重点。我们采用 Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化以包涵体形式表达的重组蛋白,纯度达 95%。随之进行重组蛋白的复性,并以 7 μ g/ml 复性重组蛋白作用于 Hela 细胞以观察重组蛋白的生物活性。结果表明,重组蛋白可明显抑制 Hela 细胞的贴壁和迁徙,并促进其凋亡,提示制备的 NK4 蛋白保留了生物学活性。

本研究结果将有助于规模化生产 NK4 蛋白和 NK4 相关功能研究等后续工作。

参考文献

- [1] Date K, Matsumoto K, Shimura H, et al. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. FEBS Lett, 1997, 420(1):1~6
- [2] Jiang W G, Hiscox S E, Parr C, et al. Antagonistic effect of NK4, a novel hepatocyte growth factor variant, on *in vitro* angiogenesis of human vascular endothelial cells. Clin Cancer Res, 1999, 5(11):3695~3703
- [3] Kanehira M, Xin H, Hoshino K, et al. Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Cancer Gene Ther, 2007, 14(11):894~903
- [4] Okasora T, Jo J I, Tabata Y. Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA. Gene Ther, 2008, 15(7):524~530
- [5] Fujiwara H, Kubota T, Amaike H, et al. Suppression of peritoneal implantation of gastric cancer cells by adenovirus vector-mediated NK4 expression. Cancer Gene Ther, 2005, 12(2):206~216
- [6] Du W, Hattori Y, Yamada T, et al. NK4, an antagonist of hepatocyte growth factor (HGF), inhibits growth of multiple myeloma cells; molecular targeting of angiogenic growth factor. Blood, 2007, 109(7):3042~3049
- [7] 滑世轩,岑东,吕建新,等. NK4 基因的克隆及在 Raji 细胞的表达. 中国生理病理杂志, 2009, 25(5):1031~1037
Hua S X, Cen D, LU J X, et al. Chinese Journal of Pathophysiology, 2009, 25(5):1031~1037
- [8] Son G, Hirano T, Seki E, et al. Blockage of HGF/c-Met system by gene therapy (adenovirus-mediated NK4 gene) suppresses hepatocellular carcinoma in mice. J Hepatol, 2006, 45(5):688~695
- [9] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社, 2001:20~34
Wang J Z, Fan M. A Handbook of Protein Technology. Beijing: Science Press, 2001:20~34
- [10] Li M, Su Z G, Janson J C. *In vitro* Protein Expr Purif, 2004, 33(1):1~10

Expression of NK4 Protein in *Escherichia coli* and Its Biological Characterization Analysis

LUO Jian-ping¹ HUA Shi-xuan¹ ZHAO Hang¹ CEN Dong² LÜ Jian-xin¹ TU Zhi-guang³ PEI Ren-zhi²

(1 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

(2 Zhejiang Yinzhou People's Hospital, Ningbo 315040, China)

(3 Faculty of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Diagnostics of Education Ministry of China, Chongqing Medical University, Chongqing 410006, China)

Abstract NK4 protein is considered as the best antagonist of hepatocyte growth factor in recent years. In order to produce and study the biological characteristics of NK4 protein, the complete coding sequences of NK4 gene were cloned into vector pET-26b(+) to construct recombinant prokaryotic expression vector pET-26b(+)-NK4. After induction with IPTG, the strain of *E. coli* Rosseta (DE3) transformed successfully with the recombinant expression vector expressed recombinant protein existed in format of inclusion body strongly. The inclusion body, 42% of the total protein in *E. coli*, was dissolved by guanidine hydrochloride and purified by Ni-NTA column. The purified protein, about 95% purity, was confirmed by Western blot as NK4 protein. These results showed that recombinant protein could inhibit adherence, migration and induce apoptosis of Hela cell, which suggested that NK4 protein acquired retained its biological activity. The findings will be helpful to further study of NK4 function associated.

Key words NK4 protein Recombination Expression Purification Biological activity