

人 LN α 4LG4-5 在毕赤酵母中的表达研究

Expression of Human LN α 4LG4-5 in *Pichia* Yeast

连继勤¹ 戴旭芳² 李晓辉^{1*} 何凤田^{1*}

LIAN Ji-Qin¹, DAI Xu-Fang², LI Xiao-Hui^{1*} and HE Feng-Tian^{1*}

¹ 第三军医大学基础医学系 重庆 400038

² 重庆师范大学特殊教育学院 重庆 400047

¹ Faculty of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

² Special Education College of Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China

摘 要 为实现人层粘连蛋白 α 4 链 LG4-5 组件(Human Laminin Alpha4 Chain LG4-5 Module, hLN α 4LG4-5)蛋白的分泌表达,采用 DNA 重组技术将 hLN α 4LG4-5 cDNA 片段插入分泌型酵母表达载体 pPICZ α A 中,构建了相应的重组表达质粒 pPICZ α A-LG45 并在 GS115 毕赤酵母菌株中表达。纯化蛋白后进行细胞学实验证明, hLN α 4LG4-5 有明显促进肿瘤细胞粘附和扩展的作用,为深入研究 LG4-5 组件结构与功能奠定了基础。

关键词 hLN α 4LG4-5, *Pichia* yeast, 基因表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0226-05

Abstract To carry out the secretive expression of human laminin alpha4 chain LG4-5 module (hLN α 4LG4-5), recombinant expression plasmid pPICZ α A-LG45 was constructed by inserting of hLN α 4LG4-5 cDNA into yeast expression vector pPICZ α A. The hLN α 4LG4-5 protein was expressed in GS115 *Pichia* yeast strain after induced by methanol, and purified target protein can obviously promote the expansion and adhesion of 293 cells.

Key words hLN α 4LG4-5, *Pichia* yeast, gene expression

肿瘤的浸润转移是导致宿主死亡的主要原因,而这一过程完全是癌细胞与宿主细胞及细胞外基质之间相互作用的结果。层粘连蛋白(Laminin, LN)作为细胞基底膜的主要结构组分之一,与肿瘤细胞的浸润转移密切相关^[1~3]。位于 LN α 链 C 末端的 G 结构域是 LN 与其受体及基质组份相互作用的重要部位,在肿瘤细胞的浸润转移过程中起着非常重要的作用,可促进肿瘤细胞的粘附、增殖、转移、新血管生成等过程的发生^[4,5]。LN 的 G 结构域由 5 个 LG 组件所组成,每个组件含 180~200 个氨基酸残基,分别含有不同受体的作用位点^[6],因此对这些组件及

其相关位点的研究将有助于揭示 LN 在疾病的发生发展尤其是肿瘤的浸润转移中所起的作用,并能针对性地制备相关的生物制剂,具有重要的理论和实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pMD18-T/hLN α 4LG4-5 由本课题组构建^[7]。酵母穿梭表达载体(*Pichia-E. coli*)pPICZ α A 和 *Pichia pastoris* 菌株(GS115 His⁺ Mut^s)为 Invitrogen 公司产品;限制酶、T4 DNA 连接酶及 Taq DNA 聚合酶

Received September 15, 2005; Accepted: November 3, 2005.

This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China(No.30400559).

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752262; E-mail: xhl@mail.tmmu.com.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30400559)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

均购自 Promega 公司;酵母培养基 Peptone、YNB(W/O)为 Difco 公司产品;生物素、羊抗兔 IgG、AP 均为 Gibco 公司产品;hLN α 4LG4-5 多抗兔血清由本课题组制备^[7]。

1.2 方法

1.2.1 酵母表达质粒的构建

采用亚克隆策略,将 hLN α 4LG4-5 cDNA 片段从 pMD18-T/hLN α 4LG4-5 克隆质粒定向克隆到 pPICZ α A 酵母表达质粒,酶切鉴定后进行序列测定。

1.2.2 酵母菌的转化与鉴定

根据 Invitrogen 公司 Pichia Expression Kit 进行酵母菌 GS115 感受态细胞的制备,将线性化的酵母表达质粒 pPICZ α A-LG45 在 1500V/25 μ F/200 Ω 条件下进行电转化。筛选在 MM 平板上生长缓慢而在 MD 平板上生长良好的菌株,玻璃珠法提取酵母总 DNA,用酵母载体通用引物(5'-GACTGGTTCGAATTGACAAGC-3' 和 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')进行 PCR 反应(反应条件为 94 $^{\circ}$ C 45s,55 $^{\circ}$ C 90s,72 $^{\circ}$ C 120s),检测目的基因在酵母基因组中的整合情况。

1.2.3 hLN α 4LG4-5 的表达及鉴定

挑取酵母菌单克隆接种于 5mL YPD 液体培养基中,28~30 $^{\circ}$ C 培养 16~20h,离心收集菌体并重悬于 100mL BMGY 扩增培养基中,28~30 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600} = 2.0 \sim 6.0$,离心收集菌体,用 200mL BMMY 诱导培养基重悬,0.5% 甲醇浓度下培养 48h,以诱导目的蛋白的表达。离心,取上清,用斑点杂交、SDS-PAGE 及 Western blot 法检测目的蛋白分泌表达情况。简要步骤如下:诱导上清直接点于硝酸纤维素膜(NC 膜)或经 SDS-PAGE 分离后以半干法电转移到 NC 膜上,将 NC 膜短暂漂洗后依次经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h、与 hLN α 4LG4-5 多抗兔血清孵育 1h、与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 孵育 1h,每步完成后均严格洗膜,最后加 DAB 避光显色。

1.2.4 Ni²⁺亲和层析柱纯化 hLN α 4LG4-5

将含重组质粒 pPICZ α A-LG45 的酵母表达菌在 0.5L/1L 的 BMGY/BMMY 培养基中扩大培养并按上述条件进行甲醇诱导。诱导结束后离心收集上清,按 Ni²⁺-NTA 操作手册进行纯化,毛细管电泳分析纯化效果。纯化蛋白冷冻抽干后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 hLN α 4LG4-5 生物活性检测

(1)目的蛋白对 293 细胞伸展率的影响:将纯化的 hLN α 4LG4-5 蛋白冻干粉溶于 PBS 溶液,配成 80mg/L 浓度,再倍比稀释成 80mg/L、40mg/L、20mg/L、10mg/L、5mg/L 五种浓度,每种浓度为一实验

组。将各浓度按每孔 50 μ L 包被 96 孔板,每种浓度 4 孔,阴性对照为 30g/L BSA。将 96 孔板置于 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 液洗 2 次,加 30g/L BSA 室温封闭 1h, PBS 再洗 2 次。将 293 细胞用 0.25% 胰酶消化后离心收集,用无血清 F-12 培养液清洗 2 遍,再用无血清 F-12 重悬细胞,调整细胞浓度至 1×10^7 /L,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 条件下培养 2h。取出培养板,倒置显微镜下观察各孔并照相。计数伸展细胞(即至少有一个胞浆突起的细胞)数和未伸展细胞数,每组至少计数 100 个细胞,计算伸展细胞的百分率。

(2)目的蛋白对 293 细胞附着率的影响:实验分组及 96 孔板的包被与 1.2.5 的(1)方法相同,另设一不作包被的空白对照组,用于计算附着率。接种细胞浓度为 2×10^7 /L。常规培养 24h 后吸去各孔培养液(空白组除外),PBS 洗 2 次以去除未贴壁的细胞,各孔加 100 μ L 无血清 DMEM 培养液及 20 μ L MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐],继续培养 4h,倒置显微镜下观察结晶物形成情况,吸去孔内培养液,每孔加入 150 μ L 二甲亚砜(DMSO),在酶标仪 490nm 下测光吸收值(OD 值),计算各组附着率。

2 结果

2.1 重组质粒 pPICZ α A-LG45 的构建及鉴定

用限制酶 EcoR I 和 Not I 将 hLN α 4LG4-5 cDNA 片段从质粒 pMD18-T/hLN α 4LG4-5 上切下回收,将该片段克隆到表达载体 pPICZ α A 上,然后转化大肠杆菌。经 EcoR I /Not I 酶切鉴定正确。pPICZ α A-LG45 的酶切鉴定如图 1。

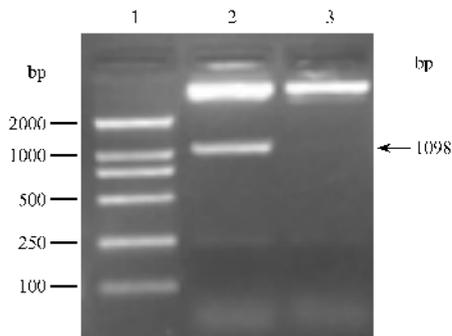


图 1 重组质粒 pPICZ α A-LG45 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pPICZ α A-LG45
1:DNA Marker DL2000; 2:pPICZ α A-LG45/EcoR I + Not I; 3:pPICZ α A/EcoR I + Not I.

2.2 转化子 His⁺ Mut^S 阳性克隆的鉴定

挑取 His⁺ Mut^S 表型的转化菌株,以其基因组 DNA 为模板,用酵母 5' AOX1 和 3' AOX1 通用引物

PCR 验证目的 DNA 与酵母基因组整合状况,部分结果如图 2。由于酵母基因组 DNA 中含有与引物同源的序列,片段大小约为 2.2kb,而对空载体的扩增大小应为 588bp,因此阴性对照转化菌的扩增片段应为 2.2kb 和 588bp 两条带,而阳性转化菌扩增条带大小应为 2.2kb 和 1.7kb(目的基因片段 1098bp 加空载体片段 588bp),从图 2 中可看到与理论分子量大小相符电泳条带,表明目的基因已在酵母基因组中得到整合。

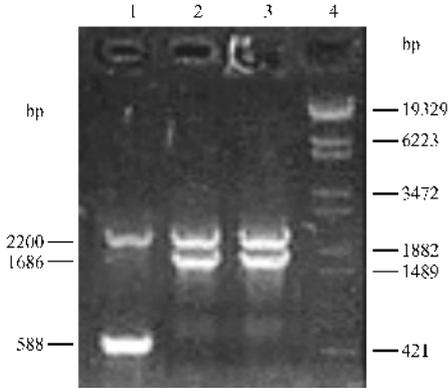


图 2 酵母转化子 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of yeast recombinants

1: pPICZ α transformant; 2, 3: pPICZ α -LG45 transformants; 4: λ -EcoT14 I DNA Marker.

2.3 目的基因的表达检测

2.3.1 斑点杂交分析 对 A、B、C、D 4 株转化菌在诱导后不同时间取样进行斑点杂交分析,分析结果见图 3。

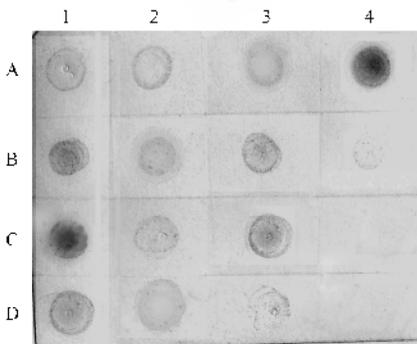


图 3 斑点杂交分析结果

Fig. 3 Dot-blot analysis of hLN α 4LG4-5 protein

A4: positive control; B4: negative control; A, B, C, D: A clone, B clone, C clone and D clone; 1, 2, 3: 48h, 60h and 72h after was induced respectively.

从图 3 可看出, C1(C 克隆诱导后 48h) 位点显色最明显,说明该菌株在诱导后 48h 分泌在上清中的 hLN α 4LG4-5 蛋白浓度最大。

2.3.2 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析 挑取上述阳性克隆,并以 pPICZ α 重组酵母菌作对照进行

诱导表达。甲醇诱导 48h 后取上清浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹分析。考马斯亮蓝染色表明 pPICZ α -LG45 在 42kD 处出现了一条特异的蛋白带(图 4),对照则没有相应条带。进一步用 Western blot 鉴定表明,杂交后可看到特异性蛋白带而含空载体 pPICZ α 的对照菌则无此反应(图 5),说明该蛋白带为重组菌株特异表达的 hLN α 4LG4-5 蛋白带。杂交带分子量较 SDS-PAGE 中的特征蛋白带稍小,原因可能是操作过程中造成了蛋白的部分降解所致。



图 4 hLN α 4LG4-5 表达上清 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of expressed hLN α 4LG4-5 from

cultural supernatant of GS115/ pPICZ α -LG4-5

1: marker; 2, 3: GS115/pPICZ α -LG4-5; 4: GS115/pPICZ α .

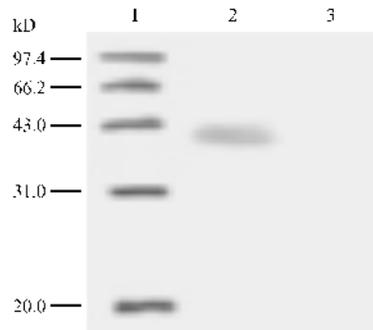


图 5 hLN α 4LG4-5 表达上清的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of cultural supernatant containing hLN α 4LG4-5 protein

1: marker; 2: GS115/ pPICZ α -LG4-5; 3: GS115/ pPICZ α .

2.4 hLN α 4LG4-5 蛋白的纯化及活性分析

表达蛋白经 Ni²⁺-NTA 纯化,毛细管电泳分析证实纯度达 95.3%。蛋白冻干粉用 PBS 配成 80mg/L、40mg/L、20mg/L、10mg/L、5mg/L 五种浓度对 293 细胞进行细胞伸展与粘附的活性分析,每种浓度做 4 个平行实验,取平均值。

2.4.1 hLN α 4LG4-5 蛋白对 293 细胞伸展的影响 固相结合实验观察了 293 细胞在 hLN α 4LG4-5 蛋白包被培养板上的伸展情况,并绘制了细胞的伸展率曲线(见图 6)结果显示,与对照组相比,常规培养 90-120min 后 10mg/L 的目的蛋白即可促进 293 细胞的

伸展,当浓度达40mg/L时,细胞的平均伸展率可达80%。倒置显微镜下形态学观察可见,细胞伸展良好,胞体丰满,细胞成梭形或多角形,即胞体周围有数个长短不等的胞浆突起,而阴性对照组细胞大多呈圆形,无胞浆突起,细胞几乎无伸展。结果表明,hLN α 4LG4-5蛋白有促进293细胞伸展的活性。

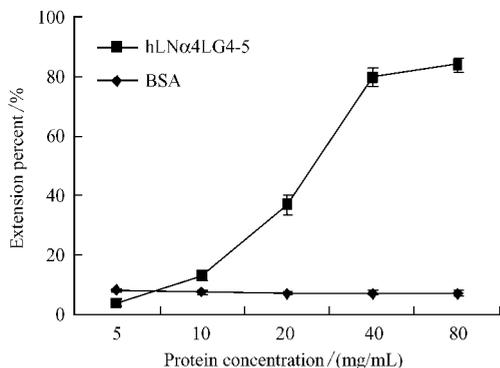


图6 hLN α 4LG4-5对293细胞伸展的影响

Fig. 6 Extension percent of 293 cells on hLN α 4LG4-5 protein

2.4.2 hLN α 4LG4-5蛋白对293细胞附着率的影响:用MMT法检测293细胞在hLN α 4LG4-5上的附着率,结果见图7。从图7可见,与对照组相比,随着hLN α 4LG4-5蛋白浓度的增加,细胞附着率逐渐增大,当蛋白浓度在10mg/L以上时,作用尤其显著($P < 0.01$),说明hLN α 4LG4-5蛋白可有效促进293细胞的附着。

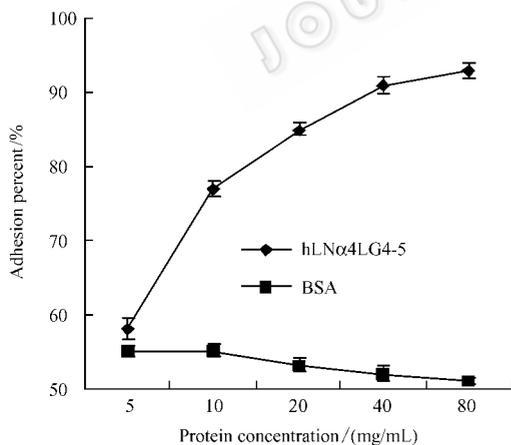


图7 hLN α 4LG4-5对293细胞粘附的影响

Fig. 7 Adhesion percent of 293 cells on hLN α 4LG4-5 protein

3 讨论

层粘连蛋白 α 4链(Human Laminin Alpha4, hLN α 4)是构成LN-8和LN-9的一个组份,主要在内皮、外周神经的束膜及发育中肌纤维周围的基底膜中表达^[8]。 α 4链的缺失会导致胚胎及新生儿期婴儿出血和微血管生成受到抑制,LG组件在这一过程

中发挥着重要作用^[9]。对LG组件结构与功能的研究最初是通过水解LN-1的E3和E8片段进行的,其中E3为 α 1LG4-5,E8为 α 1LG1-3。研究发现,LG组件中含有许多LN受体的结合位点,如肝素、整合素等。2000年,Talts等^[10]将重组的小鼠 α 4LG1-3和 α 4LG4-5组件在哺乳动物细胞中进行了表达,并将表达的组件与层粘连蛋白受体肝素、整合素、 α -营养不良聚糖及硫脂类进行了结合研究,发现LG组件上含有这些受体的结合位点,并能够增加由整合素介导的细胞粘附。Yokoyama等还在LG4组件中发现了一种环状肽,这种肽对肿瘤细胞具有强的粘附性,并含有肝素结合位点^[4]。进一步的研究表明LG组件还与肿瘤细胞的浸润转移密切相关^[11]。目前,LG组件上的相关功能位点正在进一步确认中,因此如果能筛选到相关序列来封闭这些位点,或通过构建LG组件的突变体来抑制相关受体的作用,则可为与LG组件作用相关疾病的治疗提供新型候选制剂。

本课题组曾将hLN α 4LG4-5蛋白在大肠杆菌中进行表达纯化,表达量达到40%以上,但目的蛋白主要以包含体形式表达,且序列中的两个糖基化位点不能被糖基化修饰,纯化产物活性不高。课题组选用的pPICZ α A表达载体是Invitrogen公司近年来开发的一种分泌型酵母表达载体,表达的目的蛋白可通过融合的6 \times His标签进行亲和纯化。实验中hLN α 4LG4-5蛋白在毕赤酵母GS115菌株中得到了成功表达,表达量约为培养上清中总蛋白的25.64%。目的蛋白以分泌形式表达于培养基中,这样不仅避免了产物被细胞内蛋白酶降解和因产物在细胞内堆积所造成的毒性作用而影响细胞代谢,而且大大简化了产物的分离纯化过程,为工业化大规模生产提供了便利条件。利用Ni²⁺-NTA介质可有效纯化目的蛋白,且hLN α 4LG4-5蛋白具有良好的促进293细胞伸展和粘附的活性,从而为进一步研究LG组件在介导细胞粘附、血管生成及肿瘤转移过程中的作用和途径奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Laidler P, Litynska A, Hoja-Lukowica D *et al.* Characterization of glycosylation and adherent properties of melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 2: 1-7
- [2] Fujita M, Khazenzon NM, Bose S *et al.* Overexpression of beta1-chain-containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(4):

- [3] Yuen HW , Ziober AF , Gopal P *et al.* Suppression of laminin-5 expression leads to increased motility , tumorigenicity , and invasion. *Exp Cell Res* , 2005 , **309**(1) : 198 – 210
- [4] Yokoyama F , Suzuki N , Haruki M *et al.* Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides. *Biochemistry* , 2004 , **43**(42) : 13590 – 13597
- [5] Spessotto P , Gronkowska A , Deutzmann R *et al.* Preferential locomotion of leukemic cells towards laminin isoforms 8 and 10. *Matrix Biol* , 2003 , **22**(4) : 351 – 361
- [6] Hibino S , Shibuya M , Engbring JA *et al.* Identification of an active site on the laminin alpha5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy. *Cancer Res* , 2004 , **64**(14) : 4810 – 4816
- [7] Lian JQ(连继勤) , Dai XF(戴旭芳) , Zhang YJ(张玉静) *et al.* Prokaryotic expression and polyclonal antiserum preparation of human laminin alpha4 LG4-5 module. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*(第三军医大学学报) , 2005 , **27**(17) : 1729 – 1731
- [8] Iivanainen A , Korttesmaa J , Herron GS *et al.* Primary structure , developmental expression , and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain. *J Biol Chem* , 1997 , **272**(44) : 27862 – 27868
- [9] Kleinman HK , Koblinski J , Lee S *et al.* Role of basement membrane in tumor growth and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* , 2001 , **10**(2) : 329 – 338
- [10] Talts JF , Sasaki T , Miosge N *et al.* Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha 4 chain and its proteolytic processing in tissues. *J Biol Chem* , 2000 , **275**(45) : 35192 – 35199
- [11] Zhou Z , Doi M , Wang J *et al.* Deletion of laminin-8 results in increased tumor neovascularization and metastasis in mice. *Cancer Res* , 2004 , **64**(12) : 4059 – 4063