

# 一种新型融合蛋白(RGD)3/tTF 的基因表达与活性分析

## Gene Expression and Activities Analysis of a New Fusion Protein (RGD)3/tTF

颜江华\*, 杨桂旺, 王阶平, 吴娜, 庄国洪

YAN Jiang-Hua\*, YANG Gui-Wang, WANG Jie-Ping, WU Na and ZHUANG Guo-Hong

厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005

Cancer Research Center of Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**摘要** 为了发展一种新型的融合蛋白(RGD)3/tTF用于肿瘤血管的选择性栓塞治疗,利用PCR技术重组(RGD)3/tTF融合基因,克隆于pET22 b(+)载体,表达于*E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>)。用镍柱纯化融合蛋白。凝血实验与F活化实验检测融合蛋白tTF组分的活性。间接ELISA分析(RGD)3/tTF与 $\nu_3$ 的特异结合能力。pET22 b(+)/(RGD)3/tTF重组质粒成功获得并表达于*E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>)。纯化蛋白(RGD)3/tTF能有效诱发血液凝固,活化F。 (RGD)3/tTF与 $\nu_3$ 的特异结合能力比RGD/tTF提高了32%。新型融合蛋白(RGD)3/tTF已在*E. coli*系统成功表达,表达蛋白保持tTF的活性并显示比RGD/tTF更高的与 $\nu_3$ 的结合能力。

**关键词** tTF, RGD, 融合蛋白, 凝血

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0409-04

**Abstract** To develop a new fusion protein (RGD)3/tTF for the therapy of the selective thrombosis of tumor blood vessels. The fused gene (RGD)3/tTF was reconstructed by PCR, was cloned into vector pET22 b(+), and expressed in *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>). The fusion protein was purified through Nickel-affinity chromatography column. The tTF activity of the fusion protein was detected by clotting assay and F activation assay. The specific binding of (RGD)3/tTF to  $\nu_3$  was analyzed by indirect ELISA. The recombinant plasmid pET22 b(+)/(RGD)3/tTF was obtained and expressed in *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>). The purified fusion protein could induce blood coagulation, activate F. The ability of (RGD)3/tTF binding specifically to  $\nu_3$  was increased by 32%, compared with RGD/tTF. A new fusion protein (RGD)3/tTF was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>). The expressed proteins retained tTF activity and showed a higher binding to  $\nu_3$  than that of RGD/tTF.

**Key words** tTF, RGD, fusion protein, coagulation

整合素  $\nu_3/\nu_5$  等参与血管内皮细胞的迁移和血管生成,在静息血管内皮细胞不表达或少量表达,在肿瘤血管内皮细胞则高度表达,可作为肿瘤血管

内皮细胞特异性标志物和药物靶向治疗的靶点。含有 RGD(Arg-Gly-Asp)序列的多肽可以特异性识别并结合增殖内皮细胞的  $\nu_3/\nu_5$ 。RGD-4C 是 Ruoslahti

Received: October 16, 2006; Accepted: November 27, 2006.

This work was supported by the grants from the Fujian Natural Fund (No. C0410004), and the Xiamen University Innovation Fund for Science and Technology (No. XDKCX20053026).

\* Corresponding author. Tel: +86-592-2186980; Fax: +86-592-2186731; E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

福建省自然科学基金(No. C0410004)和厦门大学科技创新基金资助(No. XDKCX20053026)。

等<sup>[1]</sup>用噬菌体表面展示肽库技术成功地筛选出的对  $\alpha_3$  有高亲和力的配体。并已作为化学药物的载体成功用于肿瘤血管的靶向治疗<sup>[2]</sup>。截短组织因子 (truncated Tissue Factor, tTF) 是外源性凝血通路的促发因子, 已被作为效应因子用于诱发肿瘤血管栓塞<sup>[3]</sup>。为发展新型的选择性栓塞肿瘤血管的药物, 我们利用基因工程技术构建表达了载体 RGD-4C 与效应因子 tTF 的融合蛋白<sup>[4]</sup>, 发现 RGD/tTF 融合蛋白可以选择性诱发肿瘤血管栓塞, 但由于单一配体 RGD 与受体 ( $\alpha_3$ ) 的亲合力相对较低, 其融合蛋白的抗肿瘤效果并不理想。为了改善 RGD/tTF 融合蛋白与  $\alpha_3$  亲合力, 我们设计合成 3 个串联 RGD 与 tTF 的融合基因 (RGD)<sub>3</sub>/tTF, 成功表达于大肠杆菌, 并对其表达产物活性做初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 BL21 (DE<sub>3</sub>) 由本室保藏、质粒 pET22 b (+) 购自 Novagen 公司、tTF/pSK (+) 质粒由美国南加州大学 Epstein 教授惠赠。

1.1.2 工具酶及试剂: 工具酶购自 NEB 公司, DNA 纯化试剂盒为 OMEGA 公司产品, DNA 序列分析由上海博亚公司完成。鼠抗 6 × His mAb 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自上海生工公司, S2222 为上海申海生化科技公司生产,  $\alpha_3$ 、F 和 F 购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物: 由上海生工合成。根据 tTF cDNA 序列设计扩增 tTF 的引物, P1 (上游引物): TCTGGCACTACAAATACTGTGGC 和 P2 (下游引物): TTCTCTGAATTCCTTCTCTCC。根据文献<sup>[1]</sup>设计含有 3 个 RGD-4C (CDCRQDCFCGGGG) 的寡核苷酸 P3: CATACCATGGGC (TCCGATTGTCGCGGAGATTGCTTCTCCGGTGGAGCCGGGICT)<sub>3</sub> TCTGGCACTACAAATAC (其中划线部分为含 RGD-4C 序列, 波浪线部分为 tTF 5 端序列)。利用引物: P4: CATACCATGGGCTCCGATTGTC 和 P5: CTACCTCGAGTCTCTGAATTCCTTCTCTCC 在融合基因两端分别引入内切酶位点 *Nco* 和 *Xho*。

### 1.2 方法

1.2.1 融合基因 (RGD)<sub>3</sub>/tTF 的构建: 以 tTF/pSK (+) 为模板, P1 和 P2 为引物, 常规 PCR 扩增 tTF 基因。在 PCR 反应体系中加入 tTF 基因产物和引物 P3 (含 (RGD-4C)<sub>3</sub>), 退火融合得到 (RGD)<sub>3</sub>/tTF 模板

(94 预变性 5min, 94 变性 30s, 72 退火延伸 1min, 循环 5 次); 再加入引物 P4、P5 扩增 (RGD)<sub>3</sub>/tTF 融合基因并在 5 和 3 端分别引入 *Nco* 和 *Xho* 内切酶位点 (94 变性 30s, 60 退火 30s, 72 延伸 50s, 循环 30 次, 72 延伸 5min)。1% 琼脂糖凝胶鉴定、DNA 胶纯化试剂盒回收纯化目的片段。

1.2.2 重组质粒的构建及转化: 将纯化的 (RGD)<sub>3</sub>/tTF PCR 产物及载体 pET22 b (+) 分别用 *Nco* 和 *Xho* 进行双酶切, 胶分离纯化回收, T4 DNA 连接酶于 16 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>), 氨苄青霉素选择性培养板初筛, 挑单菌落用 pET22 b (+) 克隆基因测序引物及 P4、P5 分别进行菌液 PCR 筛选, 阳性克隆送上海博亚公司测序。

1.2.3 融合蛋白的表达及纯化: 挑含正确重组质粒 (RGD)<sub>3</sub>/tTF/pET22 b (+) 的单菌落 37 培养过夜, 按 1:100 稀释至 LB 中扩大培养后, 通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度优化其表达条件。以最佳培养条件扩大培养。由于 pET22b (+) 表达的 (RGD)<sub>3</sub>/tTF 融合蛋白 C 端带有 6 × His 标签, 目的蛋白纯化方法参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的镍柱蛋白纯化操作手册进行。纯化蛋白用 12% SDS-PAGE 分析, 并用干性蛋白转移电泳将纯化蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 加鼠抗 6 × His 抗体, 37 温育 1h, 再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 温育 30min, DAB 显色 10min, 数码相机拍照记录结果。纯化蛋白用 0.01mol/L PBS 透析复性。

1.2.4 融合蛋白 tTF 部分的活性鉴定:

凝血实验: 参照 Haubitz 等<sup>[5]</sup>凝血实验方法并稍作修改, 用 3.8% 的柠檬酸钠处理新鲜小鼠血液, 4000r/min 离心, 留血浆。凝血板每孔加血浆 30μL, 分别加系列浓度的 (RGD)<sub>3</sub>/tTF 和终浓度为 12.5mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>, 并设 RGD/tTF、(RGD)<sub>3</sub>/tTF 和 CaCl<sub>2</sub> 的对照组, 室温下记录从加入 CaCl<sub>2</sub> 至血浆开始出现不流动的时间。

F 活化实验——比色法<sup>[6]</sup>: TF-F<sub>a</sub> 复合物活化 F 可以使 S2222 (多肽对硝基苯胺复合物) 分解为多肽和对硝基苯胺, 后者在 405nm 有吸收峰, 测 OD<sub>405nm</sub> 可以间接反映 TF 活性水平。在 Tris 缓冲液中加系列浓度的 (RGD)<sub>3</sub>/tTF 或 BSA, 加 100nmol/L F, 37 温育 10min, 加 F 至终浓度 5nmol/L, 室温温育 10min, 加入 100mmol/L EDTA 终止反应, 加 2nmol/L 生色底物 S2222, 在 3min 之内用酶标仪测 OD<sub>405nm</sub>。

1.2.5 (RGD)3/tTF 与  $v_3$  特异性结合实验:RGD/tTF 融合蛋白 C 末端带 6 ×His 标签,参照 Kessler 等<sup>[7]</sup> 方法用间接 ELISA 分析 RGD/tTF 与  $v_3$  相结合的特异性。96 孔板包被  $v_3$  (5 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ L/孔) 4 过夜,1% BSA 封闭(200 $\mu$ L/孔),分别加入倍比稀释的 RGD/tTF(0.75 ~ 6 $\mu$ mol/L),相应浓度的 tTF/His 做对照,于 4 过夜。加入鼠抗 6 ×His mAb,37 温育 1h,再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37 温育 30min, TMB 显色 10min,加 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,测定 OD<sub>405nm</sub> 值。每步骤间用 PBST 洗 5 次,每次 3min。

## 2 结果

### 2.1 (RGD)3/tTF 的 PCR 组装

以质粒 tTF/pSK(+) 为模板 PCR 扩增获得大小为 657 bp 的 tTF,再与含 RGD-4C 的引物 P3 退火融合,得到 RGD/tTF 模板,经 PCR 扩增获得 RGD/tTF 产物,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,约在 800bp 处见单一条带,其大小与理论计算值(795bp)一致(见图 1)。

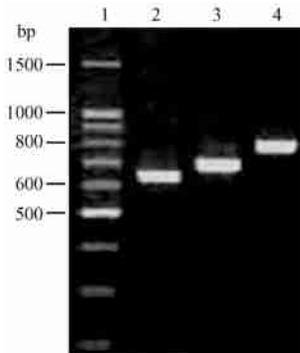


图 1 (RGD)3-tTF PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis  
1: DNA marker; 2: PCR product of tTF; 3: PCR product of RGD-tTF;  
4: PCR product of (RGD)3-tTF.

### 2.2 重组质粒的鉴定

经氨苄青霉素抗性初筛,PCR 筛选阳性克隆送上海博亚公司测序,经核苷酸序列和蛋白编码分析获得一正确重组质粒克隆。

### 2.3 融合基因 (RGD)3/tTF 在 E. coli BL21(DE<sub>3</sub>) 中的表达

含有融合基因 (RGD)3/tTF 的 DE<sub>3</sub> 重组子经系列浓度 IPTG 诱导表达,发现 IPTG 终浓度达 0.1mmol/L 时,目的蛋白表达量已达最大;再增加 IPTG 浓度,目的蛋白表达量增加不明显(见图 2)。以 0.2mmol/L IPTG 探测最佳诱导时间,发现于 37 诱导 6h 为最佳,延长时间表达量未见明显增加(见

图 3)。目的蛋白主要以包涵体形式表达,经镍柱纯化,12% SDS-PAGE 电泳,见单一蛋白纯化条带约位于 34kD 处(见图 4),用抗 6 ×His 抗体证实该纯化蛋白带为融合蛋白。纯化蛋白经 0.01mol/L PBS 透析复性,回收率约为 70%。

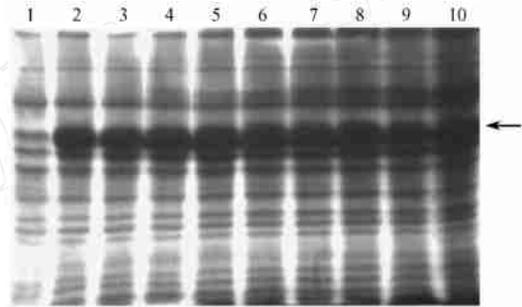


图 2 不同诱导时间条件下融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of expression of fusion protein induced with 0.2mmol/L IPTG of different times by SDS-PAGE  
1 ~ 10: expression of fusion protein induced with 0.1mmol/L IPTG for 0h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, and 10h, respectively.

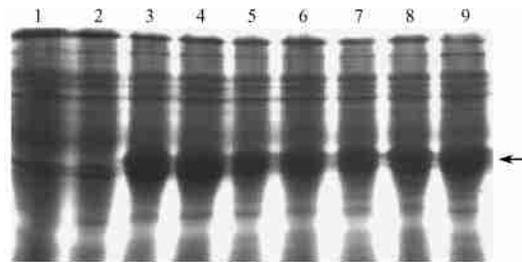


图 3 IPTG 浓度梯度条件下融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of expression of fusion protein induced with IPTG of different concentrations by SDS-PAGE  
1 ~ 9: expression of fusion protein induced with IPTG 0 mmol/L, 0.05mmol/L, 0.1mmol/L, 0.2mmol/L, 0.3mmol/L, 0.4mmol/L, 0.5mmol/L, 0.6mmol/L, and 0.7mmol/L; respectively.

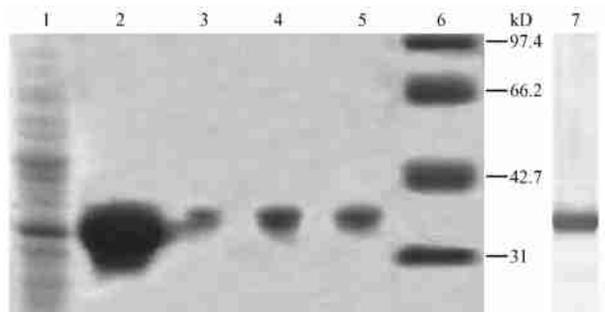


图 4 重组(RGD)<sub>3</sub>-tTF 的 Ni 柱纯化产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of the products of purification through Nickel-affinity chromatography column by SDS-PAGE  
1: total soluble protein; 2: total insoluble protein; 3 ~ 5: sample washed from the column with elute buffer; 6: protein marker; 7: purified proteins stained with Western blotting.

## 2.4 (RGD)3/tTF 活性鉴定

**2.4.1 凝血实验:**柠檬酸钠抗凝血浆在单独加 12.5mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  或 6 $\mu\text{mol/L}$  tTF 融合蛋白时,抗凝血浆 30min 内不凝(见表 1);在  $\text{Ca}^{2+}$  存在时,tTF 融合蛋白能有效促进血浆凝固,且随 tTF 融合蛋白浓度的增加,凝血时间相应缩短,同摩尔浓度 (RGD)3/tTF 促凝血活性与 RGD/tTF 相似。

表 1 tTF 融合蛋白的凝血作用  
Table 1 Clotting of tTF fusion proteins

Concentration		t/min	
tTF fusion protein / ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\text{CaCl}_2$ / (mmol/L)	(RGD)3/tTF	RGD/tTF
0	0	>30	>30
0	12.5	>30	>30
0.75	12.5	>30	>30
1.5	12.5	14.8 $\pm$ 1.8	15.4 $\pm$ 2.0
3	12.5	12.6 $\pm$ 2.3	12.3 $\pm$ 2.2
6	12.5	11.5 $\pm$ 2.5	11.3 $\pm$ 2.3
6	0	>30	>30

**2.4.2 F 活化实验:**分别测 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$  和 10 $\mu\text{mol/L}$  tTF 融合蛋白和 BSA 在 F 活化反应后的  $OD_{405\text{nm}}$ 。结果(见图 5)显示 (RGD)3/tTF 融合蛋白在 1 $\mu\text{mol/L}$  以上时能有效活化 F,并增强 405nm 处吸收峰,其量效关系与 RGD/tTF 相似;而同浓度的 BSA 则没有反应。

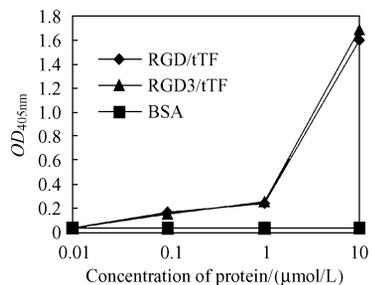


图 5 tTF 融合蛋白对 F 的活化作用

Fig. 5 Activation of tTF fusion protein on F

**2.4.3 (RGD)3/tTF 与  $v_3$  特异性结合分析:**间接 ELISA 检测 RGD/tTF 与  $v_3$  相结合的特异性。实验结果(见图 6)表明 (RGD)3/tTF 和 RGD/tTF 均可与  $v_3$  特异性结合,其结合程度与剂量相关并呈饱和现象,同摩尔浓度 RGD3/tTF 与  $v_3$  的结合能力强于 RGD/tTF。当 tTF 融合蛋白浓度为 0.24 $\mu\text{mol/L}$  时,(RGD)3/tTF 和 RGD/tTF 的  $OD_{405\text{nm}}$  分别为 1.25 和 0.95。而单纯的 tTF 与  $v_3$  不反应。

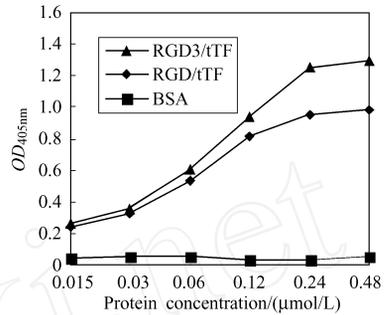


图 6 (RGD)3/tTF 与  $v_3$  特异性结合分析

Fig. 6 The analysis of (RGD)3/tTF specific binding to  $v_3$

## 3 讨论

本文利用基因工程技术成功构建表达了 3 个串联 RGD-4C 与 tTF 的新型融合蛋白 (RGD)3/tTF。凝血实验与 F 活化实验结果表明融合蛋白 (RGD)3/tTF 保持了组分 tTF 的促凝血活性; $v_3$  特异性结合实验结果证明 (RGD)3/tTF 可与  $v_3$  特异性结合,并且其最大结合能力比 RGD/tTF 约提高了 32% ( $P < 0.01$ );表明融合蛋白中 3 个串联 RGD 能更有效地与  $v_3$  结合。通过串联方式增加 RGD 结合模块 (Motif),可以有效增加 TF 融合蛋白载体组分 RGD 与受体  $v_3$  的结合能力,改善 TF 融合蛋白的定位与富集速度。可以期望 (RGD)3/tTF 在动物肿瘤模型治疗实验中,能更有效地诱发肿瘤组织血管栓塞,取得更好的抗肿瘤作用。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, **380** (6572): 364 - 366.
- [2] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 1998, **279** (5349): 377 - 380.
- [3] Huang XM, Molema GM, King S, *et al.* Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 1997, **275** (5299): 547 - 550.
- [4] Yang GW (杨桂旺), Zhuang GH (庄国洪), Wang JP (王阶平), *et al.* Expression and characterization of fusion protein RGD/tTF for targeting therapy of cancer. *Chinese J of Immunology* (中国免疫学杂志), 2006, **22** (4): 71 - 74.
- [5] Haubitz M, Brunkhorst R. Influence of a novel rapamycin analogon SDZ RAD on endothelial tissue factor and adhesion molecule expression. *Transplant Proc*, 2002, **34**: 1124 - 1126.
- [6] Hische EA, Tutuarima JA, Helm HJ. Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, 1981, **27**: 1427 - 1430.
- [7] Kessler T, Bieker R, Padro T, *et al.* Inhibition of tumor growth by RGD peptide-directed delivery of truncated tissue factor to the tumor vasculature. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**: 6317 - 6324.