

血管抑制素功能结构域 K1 与 PKA 底物磷酸化基序的融合表达及磷酸化标记*

李福洋 何 鹏 刘新平 苏成芝 杨静华 药立波**

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 通过 RT-PCR, 从人肝组织中扩增出血管形成抑制素(angio statin) cDNA 的 K1 片段, 经 DNA 序列分析证实其正确性; 将 K1 与 GST 融合并带上 17 个氨基酸的 PKA 底物磷酸化基序, IPTG 诱导表达, 以还原型谷胱甘肽偶联的琼脂糖凝胶亲和层析直接从细菌裂解上清中纯化融合蛋白; 以 PKA 催化单位将³²P 通过磷酸化作用标记至纯化的蛋白, 再用凝血酶切去 GST, 进行 SDS-PA GE .放射自显影结果显示, GSTag-K1 和 Tag-K1 分别在 40 kD 和 17 kD 处有信号强而特异的显影条带, 表明带有磷酸化序列的蛋白能够被 PKA 特异地磷酸化标记 .

关键词 血管生成抑制素, 蛋白标记, 融合表达

中图分类号 Q 78

Fusion Expression of Functional Domain K1 of Angiostatin with PKA Phosphorylating Motif and Labeling of the Protein by Phosphorylation

L I Fu-yang, HE Peng, L U Xin-ping, SU Cheng-zhi,
YANG Jing-hua, YAO Li-bo**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract The first kringle domain of angiostatin was amplified from human liver tissue by RT-PCR. Sequence analysis indicated that the amplified fragment was correct. K1 fragment was fused with GST and 17 amino acid sequence of cAMP response element binding protein which could be phosphorylated by PKA specifically. The fusion protein displayed high level soluble expression in *E. coli* by the induction of 0.1 mmol/L IPTG, and the expression protein were purified directly from supernatant of *E. coli* lysis by affinity chromatograph with reduced glutathione-linked agarose. γ -³²P were labeled to purified protein through phosphorylation reaction mediated by PKA, and GST was cut off by thrombin. The labeled protein was assigned to 15% SDS-PA GE and radiograph. The results indicated that recombinant K1 fused with PKA phosphorylating motif could be labeled with ³²P by PKA specifically.

Key words Angiostatin, Protein labeling, Fusion expression

血管生成抑制因子的研究是抗肿瘤研究的一个热点, angiostatin 是其中强而特异的新生血管形成抑制因子, 已显示出潜在的应用前景, 但其作用机理仍不清楚, 因而其受体的寻找成为一个热点. 因为得到受体不仅有可能从根本上阐明其作用机理, 还有可能从新的途径解决 angiostatin 的应用问题, 比如新的肽类或小分子化学药物的筛选.

在配体和受体相互作用的研究中常需将已知蛋白进行标记, 其中常用放射性¹²⁵I 进行标记, 但¹²⁵I

的放射性损伤比较大, 如能以³²P 取代¹²⁵I 将大大降低实验操作的损伤性. 本实验克隆和表达了人

* 国家杰出青年自然科学基金资助课题 (39825113, 39625032),

** 联系人 Tel: (029) 3374516

E-mail: biyao@fmmu.edu.cn

李福洋, 男, 1969 年 1 月生, 博士, 讲师

收稿日期: 1999-08-20, 修回日期: 2000-01-28

angiotatin 的最小功能结构域 K1, 并与 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREBP) 上 17 个氨基酸的 PKA 磷酸化基序进行融合表达。通过 PKA 对此基序的磷酸化作用, 将 γ - 32 P-ATP 上的 32 P 标记到蛋白上, 为 angiotatin 受体或相互作用分子的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pUC 载体及菌种均由本教研室保存; 带有 17 个氨基酸的 PKA 磷酸化序列的载体 pGSTag 由美国拉霍亚变态反应研究所 Kawakami 教授惠赠。PCR 引物由西安美联生物技术有限公司合成; Taq, dNTP, Mini-Prep 质粒快速提取试剂盒与反转录试剂盒系 promega 产品, 各种限制酶及 klenow 酶均系宝灵曼产品, IPTG、谷胱甘肽-Agarose、凝血酶、PKA 均为 Sigma 产品, [γ - 32 P]ATP 购自北京亚辉公司。Tripure RNA 提取试剂盒为 Gibico 产品。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 的提取

参照试剂盒操作说明进行: 取 50 mg 新鲜肝组织, 加入 1 ml Tripure 溶液, 匀浆; 将匀浆液转移至 1.5 ml 离心管, 加 0.2 ml 氯仿, 充分振荡, 10 000 g 离心 15 min, 取上清, 加 0.5 ml 异丙醇, 沉淀 RNA。70% 异丙醇洗涤, 晾干, 用无 RNase 水溶解。取 10 μ g RNA 进行反转

1.2.2 引物设计

利用计算机软件 OLIGON 和 PCGENE 进行辅助分析, 设计出扩增 K1 的引物:

Up stream primer: 5'-CGAA TTCA TGCTCTC A GA GTGCAA GACTGGG-3'

Down stream primer: 5'-CGTCGACCA CACT CAA GAATGTCGCA GT-3'

1.2.3 扩增反应 95 变性, 60 退火, 延伸 90 s, 循环 35 次, 扩增出 K1 片段。

1.2.4 扩增产物的克隆与测序

电泳回收 PCR 扩增产物, 将 K1 片段以 *EcoR* I-*Sal* I 进行酶切, 连入 pUC19 载体, 转化 XL blue 感受态细胞, 铺板、培养、挑克隆, 以蓝白筛选和酶切鉴定挑出带有 K1 插段的阳性克隆, 并以 Mini-Prep 试剂盒快速提取质粒送样测序。

1.2.5 蛋白的重组表达与纯化

以 *EcoR* I-*Sal* I 将 K1 从 pUC19 上切下, 分别克隆至 pBluscript 和 pGEX-4T-1 载体, 以 *Bam* H

I-*Sal* I 从 pBluscript 上切下 K1 片段克隆至 pGSTag。将 pGEX-4T-K1 (重命名为 pGST-K1) 和 pGSTag-K1 转入 DH5 α 菌株, IPTG 诱导表达。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表明重组蛋白为可溶性表达, 超声裂解细菌, 裂解上清用谷胱甘肽-Agarose 进行亲和层析纯化。

1.2.6 重组蛋白的标记与放射自显影

取 1 μ g 纯化的 GSTag-K1 加 5 μ Ci γ - 32 P-ATP, 0.01 单位 PKA, 在 30 μ l 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中 30 反应 30 min, 取出 15 μ l 加 1 单位凝血酶, 室温反应 2 min, 加 5 μ l 蛋白电泳上样缓冲液, 煮 5 min, 进行 15% SDS-PAGE; 然后用塑料保鲜膜将胶包起, 压上 X 光胶片于暗盒中曝光 24 h, 冲洗、显影。

2 结 果

2.1 PCR 扩增反应和 pUC19-K1 的酶切鉴定

PCR 扩增出约 240 bp 的片段, 将此片段克隆到 pUC19, 酶切分析结果显示, 所挑取的克隆可用 *EcoR* I-*Sal* I 切下约 240 bp 的插段 (Fig. 1)。

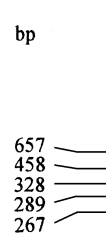


Fig 1 1.5% Agarose gel electrophoresis of PCR products and restriction enzyme assay of recombinant plasmid. Lane 1: RT-PCR products; Lane 2: Marker (pGEM 3zf/Hae III); Lane 3 pUC19-K1/*EcoR* I-*Sal* I

2.2 K1 的序列测定与分析

序列分析结果表明, 该克隆的扩增片段系 K1 片段, 序列完全正确 (Fig. 2)。

2.3 GSTAG-K1 的表达与纯化

SDS-PAGE 分析表明, GSTag-K1 呈可溶性表达, 分子量约为 40 kD, 并经还原型谷胱甘肽-琼脂糖凝胶亲和层析纯化获得 (Fig. 3)。

2.4 放射自显影结果

经过标记的 GSTag-K1 和 Tag-K1 分别在 40、17 kD 处有强而特异的显影信号。凝血酶可切去 GST, 释放出 Tag-K1, 但仍可以看到由于反应不完

全而部分未被切开的 GSTag-K1 在 40 kD 的一条显影带, 见 Fig 4 .

MetLeuSerGluCysLysThrGlyAsnGlyLysAsnTyrArgGlyThrMet
GAATTCATGCTCTCAGAGTGCAGACTGGGAATGAAAGAACACAGAGGGACGATG

SerLysThrLysAsnGkyIleThrCysHlnLysTrpSerSerThrSerThrSerProHis
 TCCAAAACAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTTCCACTTCTCCCCACAGACCT

ArgProArgPheSerProAlaThrHisProSerGluGlyLeuGluAsnTyrCysArgAsn
 AGATTCTCACCTGTACACACCCTCAGAGGGACTGGAGGAGAACTACTGCAGGAATCCA

ProAspAsnProGlnGlyProTrpCysTyrThrThrAspProGluLysArgTyrAspTyr
 GACAACGATCCGAGGGGCCCTGGTGTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTAC

CysAspIleLeuGluCys SalI
TGGGACATTCTTCAGTGTGGTCCAG

Fig 2 The sequence of ampified K1 cDNA and amino acid U n d e r l i n e d sequence are primers, shaded part are K1 domain

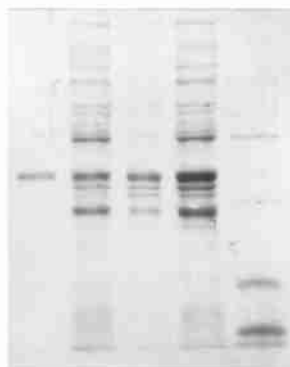


Fig 3 12% SDS-PAGE analysis of expression and the purified protein (a) 1. Protein marker; 2 Control; 3 Induced expression of GST-K1; 4~ 6 induced expression of GSTag-K1; (b) 1. Protein marker; 2 Induced expression of GSTag-K1 (total protein); 3, 4 Protein of supernatant; 5 Purified GSTag-K1

1 2

— 40 ku (GSTag-K1)
— 17 ku (Tag-K1)

Fig 4 SDS-PA GE and autoradiograph analysis of ³²P labeled protein 1. GSTag-K1; 2 GSTag catalyzed by thrombin

3 讨 论

Angiostatin 是特异的血管形成抑制因子, 是当前研究的一个热点. 目前认为其主要通过特异地抑制新生血管内皮细胞的增殖和迁移来阻断新生血管的形成^[1,2], 而有关 angiostatin 作用于内皮细胞上的靶位点是什么, 它又是通过什么样的信号转导通路传递其抑制信号, 目前都一无所知. 因而寻找其受体或相互作用分子, 对研究其作用机理以及筛选对抗血管形成药物有着十分重要的意义.

K1 是 angiostatin 的四个环饼样结构 (K1-1-4, K1-4) 中抑制血管内皮细胞增殖活性最高的一个结构域, 分子量小, 结构也相对简单, 比完整的 angiostatin 容易操作. 因而我们克隆了 K1 片段, 并将其与 CREBP 上的一段 17 个氨基酸的 PKA (Protein Kinase A) 特异性磷酸化基序融合表达. 与 GST-K1 相比, 此 17 个氨基酸的 Tag 无明显影响 K1 与 GST 融合表达的水平, 对表达蛋白的溶解性也无任何影响. 放射自显影结果表明, 经过纯化的 GSTag-K1 和切除 GST 的 Tag-K1 都可被 PKA 磷酸化, 从而被 [γ -³²P]ATP 上的 γ -³²P 特异地标记. 与¹²⁵I 标记蛋白相比, 前者条件温和, 反应特异, 而且标记效率也较高, 因而操作剂量也很小; 同时由于标记的³²P 放射性半衰期短, 放射性损伤也小, 易于防护, 因而可操作性好, 但是此方法只能用来标记重组表达蛋白, 而不能标记天然蛋白. 本实验克隆表达融合有 CREBP 磷酸化基序的 K1 蛋白在寻找 angiostatin 受体和相互作用分子的研究中有重要的作用.

参考文献 (References)

- 1 Cao Y, Ji R W, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance S G, O Reilly M S, Linas M, Folkman J. Kringle of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells *J. Biol Chem.* 1996, **271** (46): 29461~ 29467
- 2 Ji W R, Castellino F J, Chang Y, Deford M E, Gray H, Villarreal X, Kondri M E, Marti D N, Linas M, Schaller J, Kramer R A, Trail P A. Characterization of kringle domains of angiostatin as an antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis *FASEB J*, 1998, **12**(15): 1731~ 1741

中国生物化学与分子生物学会关于征集 2001 年度 英国皇家学会奖学金人选的通知

英国皇家学会 (Royal Society) 奖学金项目 (Royal Fellowships) 是英国女王伊莉莎白二世于 1986 年 10 月对我国进行国事访问时宣布设立的。其内容是英国皇家学会资助由其中方合作机构推荐的科技人员到英国对口单位进行合作研究一年。奖学金的基金来源于英国海外开发署和英国公司的赞助以及私人捐赠。

中国获得该奖学金的学者在英国期间,除进行正常的课题研究工作外,还可到欧洲其他国家参加一次学术会议,并参观访问英国其他研究机构和有关公司。

一. 人选条件和合作课题

1. 已获得博士学位,现主持或参与国家或部级(或省(自治区、直辖市)级)重点科研项目者(需提供证明材料);
2. 年龄在 40 岁以下,有一定的实际工作经验和较强的研究工作能力;
3. 较熟练地掌握英语;
4. 拟在英国进行的合作研究课题应属于英国较先进的领域。学科主要是理、工、农科,重点是应用科学,医科原则不予考虑。

二. 选拔、推荐及录取

1. 各地选送人员材料经中国生物化学与分子生物学会初评后,选出 1~2 名候选人推荐给中国科协。中国科协根据各单位推荐的人选情况择优向英国皇家学会推荐。英国皇家学会的专家小组将一一评审科协推荐的人选,对录取者英国皇家学会将发给正式录取书。申请者不得同时再申请其他英国皇家学会以外的奖学金项目。如有违反者,一经发现,将立即取消其申请资格。

2. 被推荐的人选应来自非中国科学院、中国医学科学院、教委系统的研究机构或大学等。

3. 被推荐人选需提供国家外语水平考试 (EPT) 成绩,并将考试成绩单(中英文)作为申请材料附件。(EPT 成绩两年之内有效)。曾在外国工作、学习 6 个月以上或有相当于 EPT 英语成绩者可免试。

三. 出国手续

中国科协将协助英国皇家学会正式录取的人员办理出国手续。

四. 出访费用

赴英单程旅费由本人所在单位解决,在英费用由英国皇家学会提供(伦敦 800 英镑/月,外地 750 英镑/月)。

如想申请英国皇家学会奖学金者,请于 2000 年 9 月 30 日前与中国生物化学与分子生物学会秘书处联系,索取正式表格及申请程序。

联系地址:北京朝阳区大屯路 15 号 中国生物化学与分子生物学会秘书处 邮编:100101

电话:(010)64889892, E-mail: csbm@sun5.ibp.ac.cn