基因重组可溶性非融合血管生成抑制剂 Kringle 5 的 色谱分离和纯化

马丽娜, 吴 丹, 边六交*

(西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: Kringle 5 是血纤维蛋白溶酶原中特异抑制内皮细胞增生和迁移活性最高的一种血管生成抑制剂。该实验在前期成功克隆和表达可溶性非融合血管生成抑制剂 Kringle 5 的基础上, 建立了一种两步色谱法分离纯化 Kringle 5 的方法。首先用 SP Sepharose Fast Flow 强阳离子交换色谱柱对 Kringle 5 重组菌体破碎上清液进行初步分离, 然后再用丙烯葡聚糖凝胶 S-100 HR 凝胶排阻色谱柱对其进行进一步的纯化。采用本方法得到的可溶性非融合血管生成抑制剂 Kringle 5 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和高效凝胶排阻色谱检测其纯度大于 98%, 通过鸡胚尿囊膜法确定这种蛋白质具有抑制内皮毛细血管生长的活性。

关键词: 阳离子交换色谱; 凝胶排阻色谱; 血管生长抑制剂 Kringle 5; 分离; 纯化

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)08-0822-05

Isolation and purification of recombinant soluble and non-fusion angiogenesis inhibitor Kringle 5 using chromatography

MA Lina, WU Dan, BIAN Liujiao*

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The Kringle 5 domain of plasminogen is one of the most potent angiogenesis inhibitors known to date, which can inhibit cell proliferation and migration efficiently. In the study, on the foundation of successful clone and expression of recombinant soluble and non-fusion angiogenesis inhibitor Kringle 5, a two-step chromatographic method, including the use of SP Sepharose Fast Flow cation exchanger and Sephacryl S-100 HR size exclusion chromatography in sequence, was established to separate and purify angiogenesis inhibitor Kringle 5. On the SP Sepharose Fast Flow column, the buffer A consisted of 50.0 mmol/L acetic acid-sodium acetate (pH 5.2), and the buffer B consisted of buffer A with the addition of 0.5 mol/L sodium chloride (pH 5.2); on Sephacryl S-100 HR column, the elution buffer was 5.0 mmol/L phosphate solution (pH 7.0). Through the two-step chromatographic purification process, the purity of the obtained Kringle 5 was more than 98%. In addition, it was found that the obtained Kringle 5 could inhibit the blood vessel growth of chick embryo chorioallantoic membrane effectively. Finally it is concluded that this method can effectively separate active recombinant soluble and non-fusion angiogenesis inhibitor Kringle 5.

Key words: cation exchange chromatography (CEC); gel exclusion chromatography (GEC); angiogenesis inhibitor Kringle 5; separation; purification

恶性肿瘤是当前危害人类健康的主要疾病之一, 是一种常见病和多发病。血管生成可为肿瘤生长、转移提供营养物质, 所以阻断或抑制新生血管生成是治疗肿瘤的有效策略。目前, 用血管生成抑制

剂治疗肿瘤已成为肿瘤治疗研究的热点。与常规的肿瘤治疗药物相比, 血管生成抑制剂具有高效、低毒以及不易产生耐药性的特点^[1]。Kringle 5 是目前发现的抑制活性最强的血管生成抑制剂, 它是人纤

* 通讯联系人: 边六交, 教授, 博士生导师, 从事生物工程制药研究。E-mail: bianliujiao@sohu.com.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX09103696)。

收稿日期: 2012-03-12

溶酶原的酶解片段。人纤溶酶原由一个丝氨酸蛋白酶结构域和5个通过二硫键连接的联环结构域组成,即 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4 和 Kringle 5。Kringle 1~Kringle 4 共同构成血管生成抑制素。Kringle 5 环与血管生成抑制素相连,由80个氨基酸残基组成。血管生长抑制剂 Kringle 5 对于其他与血管生成有关疾病的治疗,如糖尿病、镰状细胞视网膜病^[2-4]、类风湿性关节炎等,也有重要的应用价值。因此,将血管生长抑制剂 Kringle 5 开发成为治疗肿瘤、视网膜充血等血管生成相关疾病的药品,将具有广阔的市场前景。

目前,对于 Kringle 5 基因工程制备方法已有大量的研究报道。贾信贵等^[5]在成功构建工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) pET-32a/K5 的基础上,应用 Ni^{2+} 螯合的 Chelating Sepharose Fast Flow 亲和色谱和 Sephadex G-75 凝胶排阻色谱两步色谱法分离得到高纯度、有生物活性的 Kringle 5 融合蛋白质。查晓军等^[6]将 Kringle 5 与 RGDRGD (Arg-Gly-Asp-Arg-Gly-Asp) 短肽基因融合,改造人纤溶酶原 Kringle 5 基因,将 RGDRGD-Kringle 5 融合表达质粒转化入大肠杆菌诱导表达后,使用 GSTrap Fast Flow 色谱柱分离得到特异性的 RGDRGD-Kringle 5 融合蛋白质。陈显久等^[7]将不溶性表达载体 pBV220/Kringle 5 转化入大肠杆菌诱导表达后,应用 Ni^{2+} 螯合的 Chelating Sepharose Fast Flow 亲和色谱法纯化重组 Kringle 5 融合蛋白质,蛋白质纯度达98%。本文在成功构建工程菌 *E. Coli* BL21 (DE3)/pET15b-K5^[8]的基础上,诱导表达可溶性非融合蛋白质 Kringle 5,使用 SP Sepharose Fast Flow 离子交换色谱和 Sephacryl S-100 HR 凝胶排阻色谱法分离目标蛋白质,为 Kringle 5 非融合蛋白质进一步的药用研究奠定了基础。

1 实验部分

1.1 设备及材料

美国 GE 公司的 AKTA 型低压色谱系统;美国 Agilent 公司的 Agilent 1200 型高压色谱系统;上海智城分析仪器制造有限公司的 DYY-8B 型垂直蛋白质电泳仪;宁波新芝生物科技股份有限公司的 JY92-2 型超声细胞破碎仪;德国 Eppendorf 公司的 580 4R 型超速冷冻离心机;日本三洋 MCO-15 AC 型二氧化碳恒温培养箱。

重组菌 *E. Coli* BL21 (DE3)/pET15b-K5 为本实验室构建保存;SP Sepharose Fast Flow 强阳离子交换预装柱 (SP Sepharose F. F., 2.5 cm × 0.7

cm) 为 GE 公司产品;丙烯葡聚糖凝胶 S-100 HR 凝胶排阻色谱柱 (Sephacryl S-100 HR, 100 cm × 16 mm) 为自装柱;Shim-pack Diol 300 高效凝胶排阻色谱柱 (250 mm × 7.9 mm) 为岛津公司预装柱;低相对分子质量蛋白质标记 SM0431 ($M_r = 14\ 400 \sim 116\ 000$) 购自 Fermentas 公司;主要试剂如酵母提取物、胰蛋白胨、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 等均为分析纯。其他试剂为分析纯或化学纯。孵育 3~5 天的鸡胚购自养鸡厂。

1.2 重组 Kringle 5 的诱导表达

将本实验室保存的重组大肠杆菌在 37 °C 下培养过夜活化,然后转接到摇瓶中,在 LB 液体培养基 (含胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L) 中于 37 °C 下培养,培养至 600 nm 波长下的光密度 (OD_{600}) 值达到 0.4~0.6 时,加入 IPTG 诱导,使菌液中 IPTG 的终浓度为 1.0 mmol/L,然后降低温度至 30 °C 继续培养 5 h 终止。再将诱导培养的重组大肠杆菌发酵液于 4 000 r/min、4 °C 下离心 15 min,收集菌体沉淀并称重,按 1 g:10 mL 的比例加入 25.0 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (HAc-NaAc, pH 5.2),混匀后于冰浴条件下进行超声破碎 (破碎条件:破碎时间 10 s,间隔时间 15 s,次数 60 次)。将悬浮液于 15 000 r/min、4 °C 下离心 20 min,收集上清液和沉淀。

用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对上清液和沉淀进行检测 (沉淀处理:先用 2.0 mmol/L 尿素溶液洗涤 3 次,再用 7.0 mol/L 尿素溶液溶解沉淀),并与未诱导的菌体进行对比,确定目的蛋白质所在组分^[9]。

1.3 重组 Kringle 5 的分离纯化

离子交换色谱 选用 SP Sepharose F. F. 色谱柱。洗脱缓冲液 A 液为 50.0 mmol/L 的醋酸-醋酸钠 (pH 5.2), B 液为含 0.5 mol/L NaCl 的 A 液 (pH 5.2)。洗脱程序:0~20 min, 100% B 液;20~40 min, 100% A 液;40~60 min, 从 100% A 液线性变化到 100% B 液。洗脱液流速为 1.0 mL/min^[10]。紫外检测波长为 280 nm。样品为 1.2 节制备的上清液 (约 2.0 mL)。收集分离后的各组分并对其进行 SDS-PAGE 分析。

凝胶排阻色谱 选用 Sephacryl S-100 HR 色谱柱。洗脱液为 5.0 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0),流速为 1.5 mL/min,紫外检测波长为 280 nm。样品为由阳离子交换色谱分离所得的含目标蛋白质组分的收集液 (约 10.0 mL)^[11]。收集各组分并对其进行 SDS-PAGE 分析。

1.4 Kringle 5 纯度的检测

应用 SDS-PAGE 对各步骤分离的 Kringle 5 各组份进行纯度测定。分离胶浓度为 12% (质量分数), 浓缩胶浓度为 3.5% (质量分数), 以银染进行染色分析^[12]。应用 Shim-pack Diol 300 凝胶排阻色谱柱检测纯化后 Kringle 5 的纯度, 流动相为 5.0 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 280 nm。

1.5 蛋白质浓度的测定

用 Bradford 法测定重组菌体破碎上清液和每步分离纯化后目标蛋白质组分的蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白质制作标准曲线, 从而计算出每一步蛋白质的回收率^[13,14]。

1.6 Kringle 5 活性的检测

对分离纯化后得到的重组 Kringle 5 溶液采用鸡胚尿囊膜法进行活性测定, 并用磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 作对照, 进行比较, 检测重组蛋白质是否具有活性^[15,16]。检测时, 二氧化碳恒温培养箱中 CO₂ 含量为 5%, 湿度控制在 40% ~ 60%。

2 结果与讨论

2.1 Kringle 5 重组菌体的诱导表达

图 1 给出了 Kringle 5 重组菌体诱导前后以及菌体破碎上清液和沉淀的 SDS-PAGE 分析图谱。由图 1 可见, 与未诱导的菌体相比, 诱导的菌体中可

图 1 IPTG 诱导前后菌体以及菌体破碎上清液和沉淀的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant bacteria induced with and without isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and that of supernatant and precipitate of the broken bacteria

Lane 1: non-induced bacteria; lane 2: IPTG-induced bacteria; lane 3: precipitate of the broken cells washed with 2.0 mmol/L urea and dissolved with 8.0 mol/L urea; lane 4: supernatant of the broken cells; lane 5: protein molecular marker.

以观察到明显的目的蛋白质条带, 其 M_r 约为 32 000, 与预测值 (约 30 000) 基本一致。Kringle 5 重组菌体破碎后, 在沉淀中没有目的蛋白质条带, 目的蛋白质 Kringle 5 主要存在于上清液中。

2.2 Kringle 5 的分离纯化

2.2.1 离子交换色谱分离纯化

将含有目的蛋白质的菌体上清液收集后, 分别在 SP Sepharose F. F. 强阳离子交换预装柱和 DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换预装柱 (DEAE Sepharose F. F., 2.5 cm $\times$ 0.7 cm) 上进行分离纯化。经 SDS-PAGE 分析表明, DEAE Sepharose F. F. 色谱柱分离效果不理想, 本文选择在 SP Sepharose F. F. 色谱柱上进行初步分离。

含有目的蛋白质的菌体上清液在 SP Sepharose F. F. 预装色谱柱上的分离图谱见图 2。由图 2 可见, 含有目的蛋白质的上清液经 SP Sepharose F. F. 离子交换色谱柱分离后可得到 3 个洗脱峰。对这 3 个峰进行 SDS-PAGE 分析 (见图 3), 结果说明: 峰 I 为流穿峰, 就是一些不带电荷或者带负电荷的物质。峰 II 为杂蛋白质峰, 峰 III 为目的蛋白质峰; 在目的蛋白质峰中仍然含有少量的杂蛋白质, 所以需将峰 III 组分进行进一步的纯化。

2.2.2 凝胶排阻色谱分离纯化

将离子交换色谱柱分离得到的含有重组 Kringle 5 的组分 (图 2 中的峰 III) 收集后, 在 Sephacryl S-100 HR 凝胶排阻色谱柱上进行进一步的分离纯

图 2 含有 Kringle 5 的上清液在 SP Sepharose F. F. 色谱柱上的分离图谱

Fig. 2 Chromatogram of the supernatant including recombinant Kringle 5 on SP Sepharose F. F. column

Solid line: UV adsorption at 280 nm; broken line: conductivity of elution solution.

Column size: 2.5 cm $\times$ 0.7 cm; buffer A: 50.0 mmol/L acetic acid-sodium acetate (pH 5.2); buffer B: 50.0 mmol/L acetic acid-sodium acetate with the addition of 0.5 mol/L sodium chloride (pH 5.2); sample: 2.0 mL of the supernatant; the flow rate of elution solution: 1.0 mL/min.

化。由图 4 可见,图 2 中的峰Ⅲ组分再经 Sephacryl S-100 HR 凝胶排阻色谱柱分离后,得到了 4 个峰, SDS-PAGE 分析表明(见图 5),在峰 B 中含有纯的目的蛋白质,且含量很高。

图 3 图 2 中各组分的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the fractions obtained from Fig. 2

Lane 1: fractions I in Fig. 2; lane 2: fraction III in Fig. 2; lane 3: fraction II in Fig. 2; lane 4: protein molecular marker.

图 4 图 2 中组分Ⅲ在 Sephacryl S-100 HR 色谱柱上的分离图谱

Fig. 4 Chromatogram of the fraction III in Fig. 2 on Sephacryl S-100 HR column

Solid line; UV adsorption at 280 nm; broken line; conductivity of elution solution.

Column size: 100 cm × 16 mm; elution buffer: 5.0 mmol/L phosphate solution (pH 7.0); the flow rate of elution solution: 1.5 mL/min; sample: 10.0 mL of the fraction III in Fig. 2.

2.3 Kringle 5 的纯度检测

由图 5 可见,经过 SP Sepharose F. F. 色谱柱和 Sephacryl S-100 HR 色谱柱两步色谱分离纯化后,所得的重组 Kringle 5 具有较高的纯度。为了进一步检测其纯度,将在 Sephacryl S-100 HR 柱上分离得到的含有 Kringle 5 的组分在 Shim-pack Diol 300 高效凝胶排阻色谱柱上进行检测(结果见图 6)。基线波动出现的小峰均是一些非蛋白质组分,它们可能是盐溶液中的小分子杂质。目标蛋白质的纯度很高,纯度大于 98%,达到了分离的效果。

图 5 图 4 中各组分的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the protein fractions obtained from Fig. 4

Lane 1: supernatant of the broken cells; lane 2: protein molecular marker; lane 3: fraction A in Fig. 4; lane 4: fraction B in Fig. 4; lane 5: fraction C in Fig. 4; lane 6: fraction D in Fig. 4.

图 6 图 4 中组分 B 在 Shim-pack Diol 300 柱上的凝胶排阻色谱分析图谱

Fig. 6 Chromatogram of purified Kringle 5 on Shim-pack Diol 300 column

Column size: 250 mm × 7.9 mm; elution buffer: 5.0 mmol/L phosphate solution (pH 7.0); the flow rate of elution solution: 1.0 mL/min; UV detection at 280 nm; sample: 500 μL of the purified Kringle 5 fraction (fraction B in Fig. 4).

2.4 Kringle 5 的纯化效率

由表 1 可知,重组蛋白质 Kringle 5 经 SP Sepharose F. F. 色谱柱分离后,目标蛋白质组分Ⅲ(见图 2)的蛋白质含量占菌体破碎上清液蛋白质含量的 25.4%;组分Ⅲ再经过 Sephacryl S-100 HR 色谱柱分离后,目标蛋白质组分 B(见图 4)的蛋白质含量占菌体破碎上清液蛋白质含量的 18.8%。即目标蛋白质 Kringle 5 的得率达到 18.8%。

2.5 Kringle 5 的活性测定

由图 7 可见,对照组(图 7a)中鸡胚绒毛尿囊膜二级血管和三级血管明显比实验组(图 7b)中的多,说明纯化后的重组蛋白质对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成有抑制作用。

表 1 破碎上清液依次经 SP Sepharose F.F. 柱和 Sephacryl S-100 HR 柱纯化后的蛋白质含量及占总蛋白的比率
Table 1 Protein content and ratio in total protein of the supernatant of the broken cells purified on SP Sepharose F.F. column and Sephacryl S-100 HR column in turn

Fraction	Volume/mL	Protein content/(g/L)	Protein quantity/mg	Ratio in total protein/%
Supernatant of the broken cells	2.0	10.20	20.40	—
Fraction III collected from SP Sepharose F.F.	10.0	0.518	5.18	25.4
Fraction B collected from Sephacryl S-100 HR	15.0	0.256	3.84	18.8

图 7 鸡胚尿囊膜法检测 Kringle 5 的生物活性
Fig. 7 Bio-activity identification of Kringle 5 by chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)
a. CAM treated with phosphate solution; b. CAM treated with purified Kringle 5.

3 结语

本文建立了一种用 SP Sepharose Fast Flow 离子交换色谱和 Sephacryl S-100 HR 凝胶排阻色谱分离纯化可溶性非融合重组血管生成抑制剂 Kringle 5 的方法,采用本方法能得到高纯度、具有生物活性的血管生成抑制剂 Kringle 5,为血管生成抑制剂 Kringle 5 的药用研究奠定了一定基础。

参考文献:

[1] Chen Y, Liu Z G, Xiao Q G. Chinese Ophthalmic Research (陈媛, 刘祖国, 肖启国. 眼科研究), 2007, 25(5): 397
[2] Chen W, Huang X, Mo W, et al. Chinese Ophthalmic Research (陈武, 黄欣, 莫炜, 等. 眼科研究), 2010, 28(3): 231
[3] Dong L, Li B. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine (董丽, 李彪. 国际放射医学核医学杂志), 2008, 32(2): 69
[4] Song Z, Li X X, Yu W Z, et al. International Journal of Ophthalmology (宋哲, 黎晓新, 于文贞, 等. 国际眼科杂志), 2007, 7(2): 380
[5] Jia X G, Bian L J. Chinese Journal of Chromatography (贾信贵, 边六交. 色谱), 2007, 25(3): 344
[6] Zha X J, Wang P, Li B G, et al. West China Journal of Pharmaceutical Sciences (查晓军, 王鹏, 李保国, 等. 华西

药学杂志), 2007, 22(1): 22
[7] Chen X J, Xie J, Zhang Y H, et al. Chinese Journal of Biologicals (陈显久, 解军, 张悦红, 等. 中国生物制品学杂志), 2011, 24(9): 1101
[8] Miao L, Xu L H, Ji X, et al. China Biotechnology (妙亮, 徐立华, 冀霄, 等. 中国生物工程杂志), 2011, 31(3): 18
[9] Bian L J, Dang H Y, Yang X Y. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities (边六交, 党红艳, 杨晓燕. 高校化学工程学报), 2006, 20(5): 775
[10] Wang L, Zhou L L, Qian X H, et al. Chinese Journal of Chromatography (王璐, 周兰兰, 钱小红, 等. 色谱), 2010, 28(4): 368
[11] Deng Z H, Sun H, Lin Y, et al. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology (邓志会, 孙贺, 林岩, 等. 中国生物化学与分子生物学报), 2011, 27(8): 768
[12] Guo Y J. Experiment Technology of Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press (郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社), 1999
[13] Ye W M, Han H X, Fan L Y, et al. Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences (叶伟民, 韩焕兴, 范列英, 等. 上海医学检验杂志), 1996, 11(4): 207
[14] Zhang Z T, Liu J S, Xu Q, et al. Food and Machinery (张志涛, 刘金生, 许强, 等. 食品与机械), 2011, 27(5): 128
[15] Hou W H, Fang T, Chai Y R, et al. Protein Express Purif, 2006, 47: 93
[16] Youn M R, Park M H, Choi C K, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343: 917