

中华大蟾蜍 EDF-1 重组蛋白的原核表达、纯化及抗血清的制备

刘怡君 贾宇坤 王玲芳 刘虹杏 杨仙玉

(浙江农林大学动物科技学院, 临安 311300)

摘要: 通过实验获得中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 内皮分化相关因子 -1 (Endothelial differentiation related factor-1, EDF-1) 重组蛋白及高效价抗血清。在前期研究工作中已克隆中华大蟾蜍 *EDF-1* 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) (GenBank 登录号 K F769459), 但因密码子的偏好性使中华大蟾蜍原有密码子在原核细胞中发生识别困难, 重组蛋白原核表达未能成功。本文对中华大蟾蜍的 *EDF-1* 的 ORF 进行密码子优化, 委托公司合成并插入原核表达载体, 构建重组质粒 pET-28b-*EDF-1*-*Bufo*。将重组质粒转入大肠杆菌 (*E. coli*) 感受态细胞 BL21 (DE3), 使用 IPTG 诱导重组蛋白表达, 钴胶纯化重组蛋白, 纯化的重组蛋白免疫小鼠制备鼠抗重组中华大蟾蜍 EDF-1 的抗血清, 然后通过 Western-blot 和 ELISA 检测抗血清的特异性及其效价。重组中华大蟾蜍 EDF-1 得到良好表达, 抗血清特异性良好, 效价为 1 : 8 000。为进一步研究 EDF-1 的生物学功能奠定基础, 同时为研发抑制内皮细胞分化相关的抗肿瘤药物提供重要参考。

关键词: 中华大蟾蜍; 内皮分化相关因子 -1; 重组蛋白表达; 密码子优化

DOI : 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0291

Prokaryotic Expression, Purification and Antiserum Preparation of Recombinant EDF-1 of *Bufo gargarizans*

LIU Yi-jun JIA Yu-kun WANG Ling-fang LIU Hong-xing YANG Xian-yu

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300)

Abstract: This study aims to acquire the recombinant protein of endothelial differentiation related factor-1 (EDF-1) of *Bufo gargarizans* and high-titer antiserum. The open reading frame (ORF) of *EDF-1* of *B. gargarizans* has been cloned (GenBank accession number : K F769459) in previous studies. However, the recombinant protein using original ORF was not expressed in prokaryotic system due to the codon bias that might make the codons of *B. gargarizans* difficult to be recognized in prokaryotic cells. The codon of *EDF-1* ORF of *B. gargarizans* was optimized, synthesized chemically, and inserted into prokaryotic expression vector, thus the recombinant plasmid pET-28b-*EDF-1*-*Bufo* for prokaryotic expression was constructed. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* competent cells BL21 (DE3). The expression of recombinant EDF-1 of *B. gargarizans* was induced by IPTG, and the EDF-1 was purified with cobalt agarose. Then mice were immunized with the purified recombinant protein to prepare the antiserum against EDF-1. The specificity and titer of the antiserum was determined by Western blot and ELISA, respectively. As results, the recombinant EDF-1 of *B. gargarizans* was well expressed and the antiserum was highly specific, and the titer of the antiserum against recombinant EDF-1 of *B. gargarizans* was 1 : 8 000. These results lay a foundation for the further study of biological function of EDF-1 and provide important reference for development of antitumor drugs for inhibiting endothelia cell differentiation.

Key words: *Bufo gargarizans*; EDF-1; recombinant protein expression; codon optimization

收稿日期: 2018-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372149, 31772409)

作者简介: 刘怡君, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药材多肽类有效成分的基因克隆与研发; E-mail: 2441220499@qq.com;

贾宇坤同为本文第一作者

通讯作者: 杨仙玉, 女, 教授, 研究方向: 中药材多肽类有效成分的基因克隆与研发; E-mail: yangxy78@zafu.edu.cn

内皮分化相关因子-1 (Endothelial differentiation related factor-1, EDF-1) 最早是在 HIV-1-Tat 处理的人类内皮细胞中分离的, 具有抑制血管内皮细胞分化的作用^[1-2], 而肿瘤的生长和演进需要形成新血管来提供营养物质, 抑制肿瘤新血管的形成可以控制肿瘤的生长。

以蟾蜍 (*Bufo*) 为基源的蟾皮、蟾酥和蟾衣等, 作为传统中药, 具有解毒、抗菌、增强免疫力以及抗肿瘤等多种药理作用^[3-5], 广泛应用于多种疾病的临床治疗, 包括肿瘤的治疗^[6-9]。由于蟾皮制成的水溶性注射液——华蟾素, 具有良好的抗肿瘤效果, 且已有实验表明, 其抗肿瘤的有效成分是多肽类物质^[10-13]。

作者所在团队多年来从事蟾蜍皮肤相关功能性蛋白的基因克隆研究, 以分析蟾蜍皮肤中含有的多肽类有效成分^[13-17]。为能更好地挖掘蟾蜍皮肤的药用价值和开发新药潜能, 作者尝试将中华大蟾蜍 (*B. gargarizans*) EDF-1 开放阅读框 (Open reading frame, ORF)^[17] 亚克隆至原核表达载体诱导其重组蛋白的表达, 但是未能成功。因此本研究对中华大蟾蜍 EDF-1 的 ORF 进行了密码子优化, 并委托公司合成和构建原核表达重组质粒。本文将报告通过密码子优化构建中华大蟾蜍 EDF-1 原核表达载体的方法, 重组蛋白的诱导表达及纯化以及制备鼠抗重组中华大蟾蜍 EDF-1 的抗血清等的实验结果, 为后续研发抑制内皮细胞分化的相关制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 ICR 小鼠和鼠饲料购于浙江省实验动物中心, 小鼠为 40 日龄健康的雌鼠。

1.1.2 实验材料 大肠杆菌 (*E. coli*) 感受态细胞 BL21 (DE3)、PVDF 膜、Protein Maker、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、卡那霉素 (Kanamycin, Kan)、小鼠抗 His-tag 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体购自碧云天生物技术研究所; X-tract 和 BeyoGold™ His-tag Purification Resin (钴胶) 购自 Clontech 公司; 基因合成委托苏州金维智生物科技有限公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 在前期工作中构建的原核表达载体不能在宿主大肠杆菌顺利表达, 考虑可能因密码子的偏好性, 真核细胞的密码子在原核细胞中存在识别困难。通过 *E. coli* Codon Usage Analysis 2.1 软件进行密码子的偏好性分析。根据上述结果, 对方琦璐等^[17] 克隆的中华大蟾蜍 EDF-1 (GenBank 登录号 K F769459) 的 ORF 委托公司进行密码子优化, 化学合成, 并连接到原核表达载体 pET-28b, 构建密码子优化后的重组质粒 pET-28b-EDF-1-*Bufo*。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒 pET-28b-EDF-1-*Bufo* 转化至感受态细胞 BL21 (DE3) 中, 涂布于 LB 固体培养基 (含 50 mg/L Kan), 37℃ 倒置培养 12-15 h。次日, 取一单菌落接种于 1 mL LB 培养液 (含 50 mg/L Kan), 37℃ 恒温振荡培养 12-15 h。将过夜培养的菌液按 1% 的体积接种于 LB 培养液 (含 50 mg/L Kan), 在 37℃ 恒温震荡培养至 OD₆₀₀ 值 0.7-1.0 时, 加入 IPTG 使其终浓度分别为 0、0.001、0.01、0.1、1 mmol/L, 并在 30℃ 和 37℃ 分别进行重组蛋白的诱导表达。每隔 1 h 收集一次菌液, 通过离心收集菌体, 加入 1×SDS-PAGE 上样缓冲液裂解菌体并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 以探索重组蛋白诱导表达的最佳条件。使用 His-tag 单克隆抗体进行 Western-blot 以确定过量表达蛋白为目的蛋白。

1.2.3 可溶性检测及纯化 按上述最佳条件, 对重组中华大蟾蜍 EDF-1 进行大量诱导表达。在收集的 0.5 mL 培养的菌体中加入 40 μ L X-tract、0.05 μ L DNase I 和 0.5 μ L 12 mg/mL 溶菌酶使菌体彻底裂解, 然后 16 100 \times g 离心 20 min, 将分离的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE。根据可溶性检测结果, 收集上清, 按照钴胶使用说明, 取 2 mL 钴胶 (含 1 mL 储存液) 加入纯化柱内, 用平衡液 (pH 8.0) 置换储存液后, 加入上清使其与钴胶混合 1 h, 然后用 2 mmol/L 咪唑溶液 (pH 8.0) 洗涤 5 次, 150 mmol/L 咪唑溶液 (pH 8.0) 洗脱, 纯化的重组蛋白作为制备抗血清的抗原。

1.2.4 小鼠抗重组中华大蟾蜍 EDF-1 抗血清的制备及其特异性和效价检测 将纯化的重组中华大蟾蜍

EDF-1 (蛋白浓度约 1.5 $\mu\text{g/L}$) 35 mL 与弗氏完全佐剂 1:1 混匀, 在小鼠皮下多点注射; 两周后再与弗氏不完全佐剂 1:1 混匀皮下注射, 该步骤每周重复一次, 共免疫 4 次。最后一次免疫一周后心脏采血, 1 500 $\times g$ 离心 30 min, 上清即小鼠抗重组中华大蟾蜍 EDF-1 抗血清。抗血清的特异性通过 Western-blot 进行检测。效价检测使用间接 ELISA, 以纯化的重组中华大蟾蜍 EDF-1 (2 $\mu\text{g/mL}$) 为抗原, 以小鼠抗重组中华大蟾蜍 EDF-1 抗血清为一抗, 抗血清从最低稀释倍数 1:1000 连续 2 倍比稀释。显色后, 进

行 OD₄₅₀ 检测, 若抗血清与阴性对照的比值 (P/N) ≥ 2.1 , 即判定为有效效价。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-28b-EDF-1-Bufo 的获得

根据 *E. coli* Codon Usage Analysis 2.1 软件分析结果 (图 1) 显示中华大蟾蜍 EDF-1 有 16% 密码子在大肠杆菌中使用频率小于 10%, 存在识别困难的问题。委托公司优化中华大蟾蜍 EDF-1 ORF 的密码子并合成 (图 2), 连接至原核表达载体, 最终构建 pET-28b-EDF-1-Bufo 重组质粒。

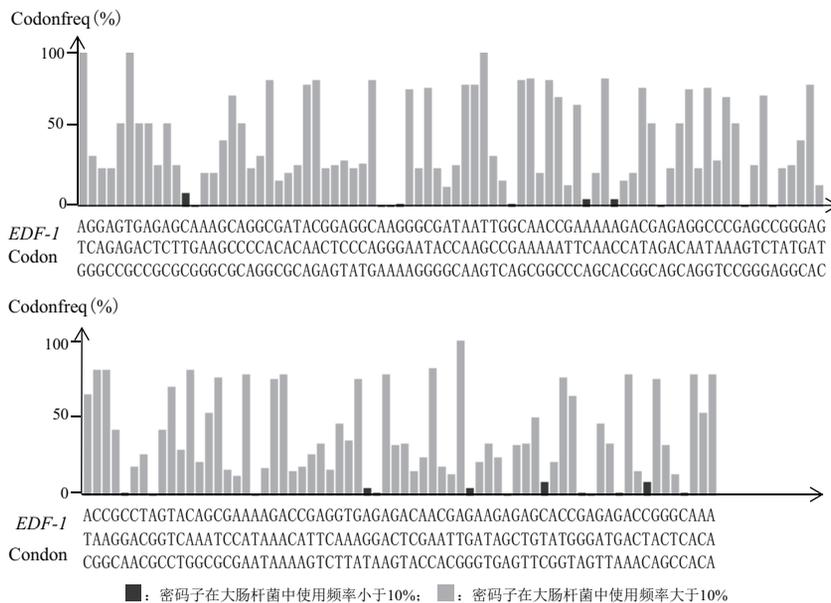


图 1 中华大蟾蜍 EDF-1 序列与大肠杆菌密码子偏好性分析

2.2 重组中华大蟾蜍 EDF-1 诱导表达条件的优化

将重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 后, 使用不同的 IPTG 浓度、时间和温度诱导重组中华大蟾蜍 EDF-1 的表达。SDS-PAGE 结果 (图 3) 显示, 除对照组和 IPTG 浓度为 0.001 mmol/L 的样品外, 其他样品均在 20 kD 附近出现明显过量表达的蛋白, 与预测的分子量 19.662 kD 非常接近, 并且随诱导时间的延长和 IPTG 浓度的增加表达量增加。为减少重组蛋白进入包涵体以及恒温振荡器的使用方便, 选取 37 $^{\circ}\text{C}$ (实验室常用)、0.01 mmol/L IPTG 和诱导 3 h 作为最佳表达条件。

2.3 可溶性检测

可溶性检测 (图 4) 表明, 重组中华大蟾蜍 EDF-1 蛋白主要分布于上清中, 小部分分布于包涵体中。

2.4 重组目的蛋白的免疫印迹检测

为确定过量表达重组蛋白是目的蛋白, 使用 His-tag 抗体作为一抗实施 Western-blot 检测。结果 (图 5, 泳道 2 和 4) 显示, IPTG 诱导的样品在分子量 20 kD 附近出现明显的信号, 与 SDS-PAGE 结果吻合, 表明该蛋白确实为目的蛋白。

Before optimization	ATGGCGGAGAGCGACTGGGACACCGTGACCGTGCTCAGGAAGAAGGCCACCGCAGCG	60
After optimization	ATGGCCGAAGCGATTGGGATACCGTTACCGTGCTGCCAATAAAGGTCGACCGCCCGCC	60
	M A E S D W D T V T V L R K K G P T A A	
Before optimization	CAGGCCAAGTCCAACACGGCAGTACTGCAGTGCAGAGAAGAGGAGAGCTGGAGACG	120
After optimization	CAGGCCAAAAGCAACACGGCAGTTACCGCAGCCAGCGTCCGGTGAAGAACTGGAGACC	120
	Q A K S K Q A V T A A Q R R G E E L E T	
Before optimization	TCCAAAAATGGTCTGCCGGACAGAACAAGCAGCAGTGCATCACAAGAAACACAGCCAAAG	180
After optimization	AGCAAAAAATGGAGCGCCGGTCAGAACAAAACAGCATGTGATCACAATAAATACCGCCAAA	180
	S K K W S A G Q N K Q H V I T K N T A K	
Before optimization	CTGGACAGAGACCCGAAGAGTGCATCAGCAGGGTGCCGCTAGAGGTGGGCAAGTGC	240
After optimization	CTGGACCGCGAAACCGAAGAACTGCATCATGATCGCGTGCCCTCTGGAAATGGGTAAGGTT	240
	L D R E T E E L H H D R V P L E V G K V	
Before optimization	ATCCAGCAGGGCCGACAATCCAGGGGCTTCACTCAGAAGGACCTGGCCACGAAAATAAAT	300
After optimization	ATTCAGCAGGGCCCGCAGAGCCCGGGTTTACCGCAGAAGGATCTGGCCACCAAGATCAAC	300
	I Q Q G R Q S R G F T Q K D L A T K I N	
Before optimization	GAAAAACCAAGTGTATGCCGATTATGAAAGTGGAAAAGCGATTCCAAGCAACCAAGTGC	360
After optimization	GACAAGCCCGAGGTGATTGCCGATTATGAAAGCGCAAGGCCATTCCGACCAACCAAGTGC	360
	E K P Q V I A D Y E S G K A I P S N Q V	
Before optimization	ATGGGGAAGATTGAGAGAGCGATTGGTCTCAAGCTGCGTGGAAAGGATATGGAAAACCA	420
After optimization	ATGGGCAAAATCGAACCGCCATCGGTCTGAAACTGCGTGGCCCGGATATGGTAAACCG	420
	M G K I E R A I G L K L R G R D I G K P	
Before optimization	CTCGAAGCGGTCCCAAAACCAAA	444
After optimization	CTGGAAGCGTCCGAAAACCAAA	444
	L E A V P K T K	

阴影：优化后的碱基

图2 中华大蟾蜍 EDF-1 优化前和优化后 ORF 碱基序列

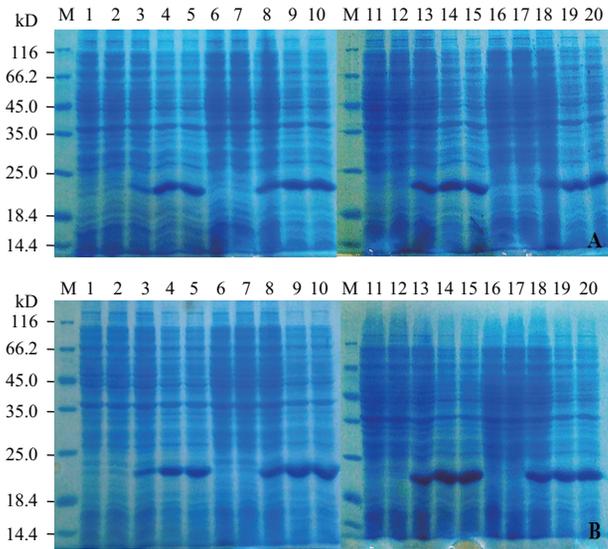


图3 重组中华大蟾蜍 EDF-1 在不同温度、IPTG 浓度、时间条件下的诱导表达

2.5 小鼠抗EDF-1-Bufo抗血清的特异性及其效价检测

Western-blot 检测结果 (图6) 显示, 小鼠抗重组中华大蟾蜍 EDF-1 的抗血清特异性良好。检测

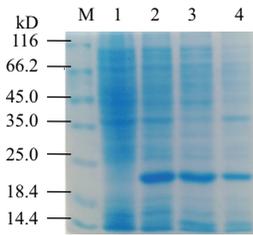


图4 重组中华大蟾蜍 EDF-1 可溶性检测

图4 重组中华大蟾蜍 EDF-1 可溶性检测

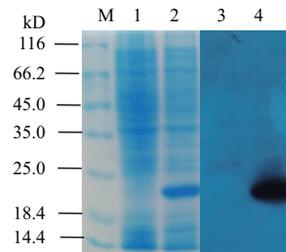
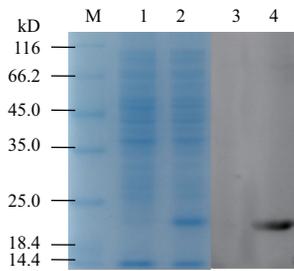


图5 重组中华大蟾蜍 EDF-1 的 Western-blot 检测

图5 重组中华大蟾蜍 EDF-1 的 Western-blot 检测

OD₄₅₀ 结果 (表1) 显示, 抗血清稀释倍数达到 1 : 8 000 时, P/N 值为 3.1, 大于 2.1, 稀释倍数达到 1 : 16 000 时, P/N 值为 2.01, 小于 2.1, 故该抗血清效价为 1 : 8 000。



M: 标准蛋白; 1, 2: SDS-PAGE; 3, 4: Western-blot; 1, 3: 未诱导样品; 2, 4: IPTG 诱导 3 h 的样品

图 6 重组中华大蟾蜍 EDF-1 以抗血清为一抗的 Western-blot 检测

表 1 EDF-1-Bufo ELISA 检测效价结果

Dilution	OD ₄₅₀	P/N	+/-
1: 1 000	1.45	11.19	+
1: 2 000	0.89	7.20	+
1: 4 000	0.58	4.67	+
1: 8 000	0.38	3.10	+
1: 16 000	0.25	2.02	-
1: 32 000	0.18	1.46	-
Negative control	0.12		

+ : 有效稀释; - : 无效稀释

3 讨论

内皮细胞是位于血管内表面的单层扁平上皮细胞, 组成血管的内壁。因此, 无内皮细胞的分化, 就没有新血管的形成。临床与动物实验证明, 肿瘤的生长及演进也需要通过生成新血管为其提供所需营养^[18]。没有新生血管的营养供应, 肿瘤在直径或厚度达到 1-2 mm 后将不再增大, 因此抑制肿瘤血管生成的研究是当前的研究热点之一^[19-20]。

EDF-1 具有抑制内皮细胞分化的作用, 能够阻断新血管生成。EDF-1 不仅在人类的内皮细胞中分离得到^[1], 在小鼠、壁虎中也克隆到该蛋白编码的基因^[2]。研究发现, 血管的形成和血管完整性与一氧化氮 (NO) 在组织中的浓度息息相关, 而 EDF-1 可以通过与细胞质中的钙调素结合, 降低一氧化氮合成酶的活性, 从而减少 NO 的含量^[21-24]。又有研究发现, EDF-1 与家蚕 (*Bombyx mori*) 的 MBF-1 (Multiprotein Bridging Factor-1) 和盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 早期发育相关的 H7 高度同源, 因此有人提出, EDF-1 可能是转录激活因子, 通过结合通用转录因子 TBP (TATA Binding Protein)

调节基因的表达, 进而参与内皮细胞分化的抑制, 但此观点有待进一步验证^[1, 25-26]。

4 结论

本研究首次优化中华大蟾蜍 EDF-1 ORF 的密码子, 构建其原核表达载体, 明确重组中华大蟾蜍 EDF-1 原核表达的最佳条件, 获得特异性和效价优良的小鼠抗中华大蟾蜍重组 EDF-1 的抗血清, 为今后对 EDF-1 生理功能等进一步研究奠定了良好基础。

在中华大蟾蜍皮肤中 EDF-1 的发现揭示蟾蜍皮肤相关药物中, EDF-1 很可能是其中的多肽类有效成分之一。

参考文献

- [1] Dragoni I, Mariotti M, Consalez G G, et al. EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation [J]. J Biol Chem, 1998, 273 (47): 31119-31124.
- [2] De BL, Mariotti M, Dragoni I, et al. Cloning and characterization of murine EDF-1 [J]. Gene, 2001, 275 (2): 299-304.
- [3] 危晓莉, 汪晓莺, 汤伟, 等. 华蟾素对慢性乙型肝炎患者外周血来源树突状细胞的影响 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23 (4): 54-56.
- [4] Hirai Y, Morishita S, Ito C, et al. Effects of bufadienolides and some kinds of cardiotonics on guinea pig hearts [J]. Folia Pharmacologica Japonica, 1992, 100 (2): 127-135.
- [5] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45 (21): 3185-3189.
- [6] Li C, Hashimi SM, Cao S, et al. The mechanisms of chansu in inducing efficient apoptosis in colon cancer cells [J]. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine: 2013 (12): 849054.
- [7] 邢立凯, 王杰, 张勇, 等. 华蟾素联合化疗治疗中晚期胃肠道肿瘤的 Meta 分析 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2016, 25 (7): 779-786.
- [8] 于滨, 于慧, 苏智祥, 等. 华蟾素片辅助治疗癌痛的疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2015 (36): 3997-3999.
- [9] Qin TJ, Zhao XH, Yun J, et al. Efficacy and safety of gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced gallbladder carcinoma [J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14 (33): 5210-5216.
- [10] 吴旭, 高波, 杨健, 等. 华蟾素注射液多肽成分体外抗肿瘤活

- 性研究 [J]. 药学报, 2012, 47 (6): 822-826.
- [11] 汤伟. 华蟾素抗恶性肿瘤的临床应用进展 [J]. 中医药导报, 2017 (12): 41-44.
- [12] Wei X, Si N, Zhang Y, et al. Evaluation of bufadienolides as the main antitumor components in cinobufacin injection for liver and gastric cancer therapy [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (1): e0169141.
- [13] 胡巧玲, 张姝芳, 杨仙玉, 等. 中华大蟾蜍 *mcl-1* 基因克隆及其重组蛋白在原核体系中的诱导表达 [J]. 药学报, 2013, 48 (10): 1624-1628.
- [14] 袁进强, 徐跃, 杨仙玉, 等. 日本蟾蜍聚集素 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 生物技术通报, 2013 (1): 156-161.
- [15] 张姝芳, 袁进强, 黄慧, 等. 日本蟾蜍 *mcl-1* cDNA 的克隆及生物信息学分析 [J]. 生物技术通报, 2013 (4): 179-184.
- [16] 徐跃, 宋敏国, 杨仙玉, 等. 中华大蟾蜍 *galectin-3* cDNA 的克隆、序列分析及原核表达载体的构建 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34 (4): 46-52.
- [17] 方琦璐, 岳继萍, 杨仙玉. 两种蟾蜍 *EDF-1* cDNA 的克隆及其生物信息学分析 [J]. 中国药科大学学报, 2014, (4): 480-485.
- [18] Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20 (4): 409-426.
- [19] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. *General Pharmacology*, 2003, 35 (5): 225-226.
- [20] Man K, Ng KT, Xu A, et al. Suppression of liver tumor growth and metastasis by adiponectin in nude mice through inhibition of tumor angiogenesis and down regulation of Rho kinase/IFN-inducible protein 10/matrix metalloproteinase 9 signaling [J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16 (3): 967-977.
- [21] Van HR, De WM, Van DE, et al. Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (50): 48803-48807.
- [22] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Journal of Pathology*, 2003, 199 (1): 8-17.
- [23] Ballabio E, Mariotti M, Benedictis LD, et al. The dual role of endothelial differentiation related factor-1 in the cytosol and nucleus: modulation by protein kinase A [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2004, 61 (9): 1069-1074.
- [24] Leidi M, Mariotti M, Maier JAM. EDF-1 contributes to the regulation of nitric oxide release in VEGF-treated human endothelial cells [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2010, 89 (9): 654-660.
- [25] Bolognese F, Pitarque-Marti M, Cicero VL, et al. Characterization of the human EDF-1 minimal promoter: Involvement of NFY and Sp1 in the regulation of basal transcription [J]. *Gene*, 2006, 374 (1): 87-95.
- [26] Mariotti M, De BL, Avon E, et al. Interaction between endothelial differentiation related factor-1 and calmodulin *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (31): 24047-24051.

(责任编辑 狄艳红)