

ErbB2 受体酪氨酸激酶激酶区的表达与纯化

江 希 周祥山* 张元兴

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要: 以 GFP 融合表达的形式在毕赤酵母中表达具有生物活性的受体酪氨酸激酶 ErbB2 的激酶区。构建受体酪氨酸激酶激酶区与 GFP 的融合表达载体 pPIC3.5K, 转化毕赤酵母 GS115, 通过组氨酸营养缺陷型筛选, G418 高拷贝菌株筛选, 以及摇瓶诱导表达筛选, 选取较高水平表达菌株进行 5 升罐培养, 以镍亲和层析手段纯化得到蛋白表达产物, 进行 SDS-PAGE 分析和酶联免疫反应检测酶活。结果表明在毕赤酵母中成功诱导表达了约 100 kD 的激酶融合蛋白并具有激酶活性。该研究为筛选 ErbB2 的抑制剂奠定了基础。

关键词: 受体酪氨酸激酶, 毕赤酵母, 克隆, 表达, RTK 活性

Expression and Purification of Receptor Tyrosine Kinase ErbB2 Kinase Domain

JIANG Xi ZHOU Xiang-Shan* ZHANG Yuan-Xing

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: The kinase domain of receptor tyrosine kinase(RTK) ErbB2 was expressed fused with GFP in *Pichia pastoris*. Recombinant expression vector pPIC3.5K was constructed in *Escherichia coli* TOP10. The right *P. pastoris* transformants were screened on *his*-deficient plates and YPD-G418 plates by turns after electroporation of recombinant vector, and then induced by methanol in baffled shake bottles. The strain with highest protein yield was scaled up in a 5 L fermentor. Recombinant protein was analyzed with tyrosine kinase assay after Ni²⁺ affinity chromatograph. Results showed that the 100 kD recombinant protein with tyrosine kinase activity was successfully expressed in *P. pastoris*.

Keywords: Receptor tyrosine kinase, *Pichia pastoris*, Cloning, Expression, RTK activity

ErbB2 是表皮生长因子受体家族的第 2 位成员。表皮生长因子受体(EGFR)家族, 也称为 HER 或 ErbB 家族, 在细胞信号转导中发挥重要作用, 是细胞生长、分化及存活的重要调节者。此家族包括 EGFR、ErbB2、ErbB3 及 ErbB4, 这些受体都是单链跨膜糖蛋白, 由胞外的配体结合区、跨膜区和与信号转导有关的有酪氨酸激酶活性的胞内区组成^[1]。

EGFR 受体家族的主要信号通路是 ras-raf-mitogen 蛋白激酶途径(Ras-MAPK 途径)和磷脂酰肌醇 3 激酶和下游的抗凋亡激酶(antiapoptotic kinase, Akt)途径(PI3K-Akt 途径)^[2]。

ErbB2 存在于胃肠道、呼吸道、生殖系统、胎盘上皮细胞等^[3], 其表达水平超过特定的阈值可促进肿瘤生长^[4]。通常情况下, ErbB2 只在胎儿时期表

* 通讯作者: Tel: 021-64253065; ✉ xszhou@ecust.edu.cn
收稿日期: 2008-01-22; 接受日期: 2008-03-24

达,到成年以后,用免疫组化染色只能在极少组织内发现其低水平表达于细胞表面。但多种人癌症细胞中存在 ErbB2 过度表达现象,如乳腺癌、卵巢癌等^[5-7]。正是由于 ErbB2 的过度表达,并定位于细胞表面,使 ErbB2 成为抗肿瘤治疗的理想靶位。

目前,以 ErbB2 为靶点的治疗策略有:抗 EGFR 受体的单克隆抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂等^[8]。小分子酪氨酸激酶抑制剂选择性地干预胞内酪氨酸激酶活性,因此阻断受体自身磷酸化和下游信号通路的激活^[9]。目前,蛋白酪氨酸激酶抑制剂已成为世界抗肿瘤研究的热点领域,已有多种蛋白酪氨酸激酶抑制剂进入二期临床试验阶段,有的已经上市^[10],但作为靶标的酪氨酸激酶来源极少,价格昂贵。

目前,很多科学家已致力于寻找技术成熟、操作可控的表达系统生产酪氨酸激酶,但对于 ErbB2 的表达研究却很少,目前采用微生物表达 ErbB2 鲜见报道。Guo XN^[11]等曾运用昆虫表达系统来表达 ErbB2 的激酶区,但昆虫表达成本相对较高。鉴于毕赤酵母发酵工艺成熟、培养成本低^[12],本课题在毕赤酵母中表达受体酪氨酸激酶 ErbB2 激酶区蛋白,并利用亲和纯化的手段富集具有激酶生物活性的重组蛋白,提供一种来源方便价格低廉的酪氨酸激酶靶标蛋白,为酪氨酸激酶抑制剂的筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 TOP10 感受态,毕赤酵母 GS115 感受态,重组 pPIC3.5K 质粒购自 Invitrogen,含有目的基因的 pBluescript SK (+)质粒及大肠杆菌 DH5 α 菌株由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 培养基: LB(1%蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠,100 g/mL Ampicilin),固体培养基为上述成分再加入 2%琼脂粉制得。YPD(1%蛋白胨,2%酵母提取物,2%葡萄糖)。固体 MGY(13.4% YNB,10%甘油,2%琼脂粉,1 mol/L 山梨醇,4 $\times 10^{-5}$ %生物素)。MM(1.34% YNB,4 $\times 10^{-5}$ %生物素,0.5%甲醇)。

1.2.2 培养条件: 大肠杆菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ LB-Ampicilin 平板培养或 LB-Ampicilin 液体培养基 200 r/min 振荡培养;毕赤酵母在 30 $^{\circ}\text{C}$ MGY 平板培养、MM 或 YPD 培养基 200 r/min 振荡培养。液体培养基装液量

为 30 mL/150 mL 或 50 mL/250 mL。

1.3 主要仪器

PCR 仪购自 Bio-Rad 公司;紫外/可见分光光度计 UV751GD 购自上海分析仪器总厂;流式细胞仪 FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)由本校生物反应器工程国家重点实验室提供。

1.4 实验方法

1.4.1 目的基因的获得: 提取本实验室保藏的含 HIS₁₀-GFP 的 pPIC3.5K 质粒,及含有目的片段 Thrombin-ErbB2 序列的 pBluescript SK (+)质粒,均以 EcoR -Avr 进行双酶切。

1.4.2 表达载体的构建: 回收相应酶切片段 16 进行连接,构建含有 HIS₁₀-GFP-Thrombin-ErbB2 的目的质粒。以冷热法将质粒转化入大肠杆菌并涂板培养,挑取合适菌落 37 $^{\circ}\text{C}$ 液体培养,取少量菌液煮沸后作为菌落 PCR 模板,以 AOX 通用引物、Ex Tag 酶进行 PCR: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环后以核酸电泳验证阳性克隆。将初步验证为阳性的克隆进行 DNA 测序。

1.4.3 重组毕赤酵母菌株的筛选与培养: Sac 酶切将测序结果正确的质粒线性化,电转毕赤酵母 GS115。电转菌液立即涂在含有 1 mol/L 山梨醇的 MGY 平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培育 72 h~96 h,利用无菌水富集菌落,取少量菌液稀释到 10⁻⁵ 细胞/mL,涂布在含有不同浓度 G418 的 YPD 平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培育 2 d~5 d,以筛选高拷贝菌株, G418 浓度分别取 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、3.0 mg/mL、4.0 mg/mL。挑选形状大小合适的菌落,抽取酵母染色体,以 AOX 通用引物、Ex Tag 酶进行 PCR 验证。利用摇瓶培养阳性克隆,以甲醇诱导蛋白表达,挑选出表达量最高的菌株。

1.4.4 融合蛋白的纯化与验证: 用裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0, 10 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF, 1% NP-40)重悬离心菌体,加入 0.5 mm 玻璃珠进行阶段性机械破壁共约 5 min,破壁后离心收集上清,调节上清中盐浓度后,上样到经平衡处理的 IDA-Ni 纯化柱,以不同浓度的咪唑缓冲液洗脱,富集含 HIS 标签的融合蛋白。纯化过程尽量在低温下进行,纯化样品储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色和 Western Blot 检测纯化样品中融合蛋白的表达及纯化情况^[13]。

1.4.5 融合蛋白的活性检测: 根据 Sigma 公司酪氨酸激酶活性测试试剂盒提供的实验步骤, 采用酶联免疫法(ELISA)检测纯化过程中各组分的激酶活性。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建与筛选

提取含有 HIS₁₀-GFP 的重组 pPIC3.5K 质粒(10939 bp)和含有目的片段 Thrombin-ErbB2 序列的 pBluescript SK(+)质粒(4761 bp), 以 0.7%琼脂糖凝胶电泳验证, *EcoR* -*Avr* 对 2 个质粒分别进行双酶切。胶回收 pBluescript SK(+)上切下的 1844 bp 的片段和在 pPIC3.5K 重组质粒上切下的 9796 bp 长的片段, 使两者在 ligation mix 的作用下相连, 构建含有 HIS₁₀-GFP-Thrombin-ErbB 的目的质粒(约 11.6 kb), 其表达产物为 100 kD 的融合蛋白。该融合蛋白中的 HIS 标签可用于镍亲和纯化, 而 GFP 可方便使用荧光检测蛋白表达情况。

目的质粒转化入 TOP10 大肠杆菌并涂板, 挑取 V1-V14 的 14 个菌落, 以 AOX 通用引物进行菌落 PCR 筛选阳性克隆(图 1)。理论扩增的条带大小为 2800 bp 左右, 电泳初步验证其中 6 个克隆为阳性, 取 V6 单菌落进行测序, 测序结果与理论序列完全符合。

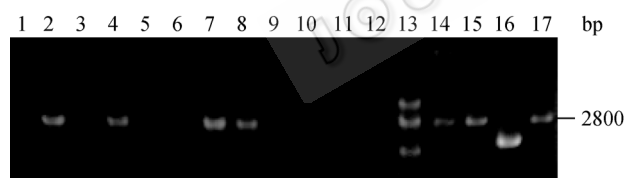


图 1 以 AOX 通用引物进行菌落 PCR 筛选阳性克隆

Fig. 1 Colony PCR with AOX universe primer

1, 14: 阳性对照; 2~12: V1~V11 菌落 PCR; 13: DNA Marker III; 15~17: V12~V14 菌落 PCR

1, 14: Positive control; 2~12: PCR of strain V1~V11; 13: DNA Marker III; 15~17: PCR of strain V12~V14

2.2 电转毕赤酵母 GS115 及高拷贝菌株的筛选

Sac 单酶切 V6 中抽提的质粒, 电转毕赤酵母 GS115。依次经过营养缺陷型平板和 G418 抗性平板的筛选, 挑取大小合适的菌落抽染色体进行 PCR 验证(图 2)。理论上, 若质粒所整合的酵母染色体的位置没有破坏野生的 *AOX1* 基因, 则以 AOX 通用引物扩增时可得到两条带(2200 bp 和 2800 bp), 其中 2200 bp 的条带为 *AOX1*, 2800 bp 的为目的基因, 该

菌株的表型为 Mut⁺, 即为甲醇利用快速型。如图 2 中, 有两株菌株(V6-9# 和 V6-10#)只扩增出了一条 2200 bp 的条带, 说明质粒未成功整合到酵母染色体上的特定位置; 而其余 4 株均成功整合, 且表型为甲醇利用快速型。

选取甲醇利用快速型 Mut⁺菌株进行摇瓶培养, 以甲醇诱导融合蛋白表达, 利用流式细胞仪对融合蛋白 GFP 自发荧光进行检测(图 3)。

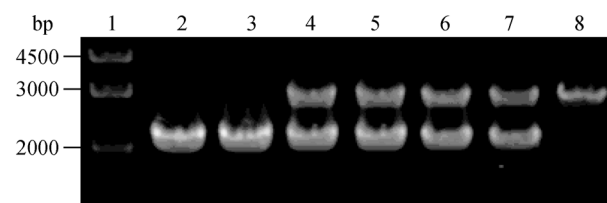


图 2 不同浓度 G418 平板上菌落的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR characterization of recombinants grown on plates of YPD-G418

1: DNA Marker III; 2: V6-9# (2.0 mg/mL G418); 3: V6-10# (2.0 mg/mL G418); 4: V6-17# (3.0 mg/mL G418); 5: V6-18# (3.0 mg/mL G418); 6: V6-28# (4.0 mg/mL G418); 7: V6-29# (4.0 mg/mL G418); 8: Positive control

在本实验中目的基因 ErbB2 和 GFP 是融合表达, 因此荧光强度和蛋白表达量在一定程度下存在相关性, 故在相同的条件下, 可以荧光强度来表征融合蛋白的表达水平。从图 3 可看出, 在刚开始诱导时, 细胞所发荧光处于本底水平, 当诱导时间达到 24 h, 各株菌的荧光水平都显著升高, 说明在甲醇的作用下, 酵母细胞开始大量生产 GFP 融合蛋白; 而当时间再延长, 各菌荧光水平逐步降低, 说明融合蛋白

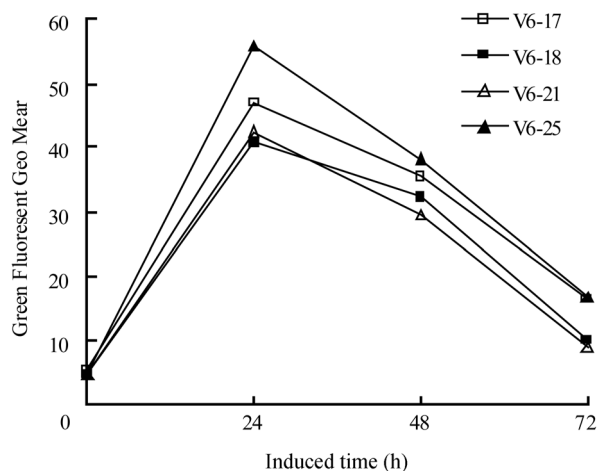


图 3 甲醇利用快型的重组毕赤酵母菌株摇瓶培养诱导表达

Fig. 3 Protein expression levels of 4 single colonies under induction by methanol in shaking flasks

在细胞内逐渐被水解。实验证明, 酵母细胞在 24 h 时的融合蛋白表达达到峰值, 选产量最高的 V6-25# 菌株表达蛋白进行纯化。

2.3 融合蛋白的纯化与验证

离心菌体经珠磨器破壁 5 min 后, 离心取上清, 利用 Ni^{2+} 亲和层析作用富集含有 HIS 标签的融合蛋白并超滤浓缩, SDS-PAGE 电泳经考马斯亮蓝染色, 以及 Western Blot 结果都显示在毕赤酵母中成功表达了 100 kD 的融合蛋白(图 4), 同时证明利用 250 mmol/L 的咪唑就足以将融合蛋白洗脱下来。

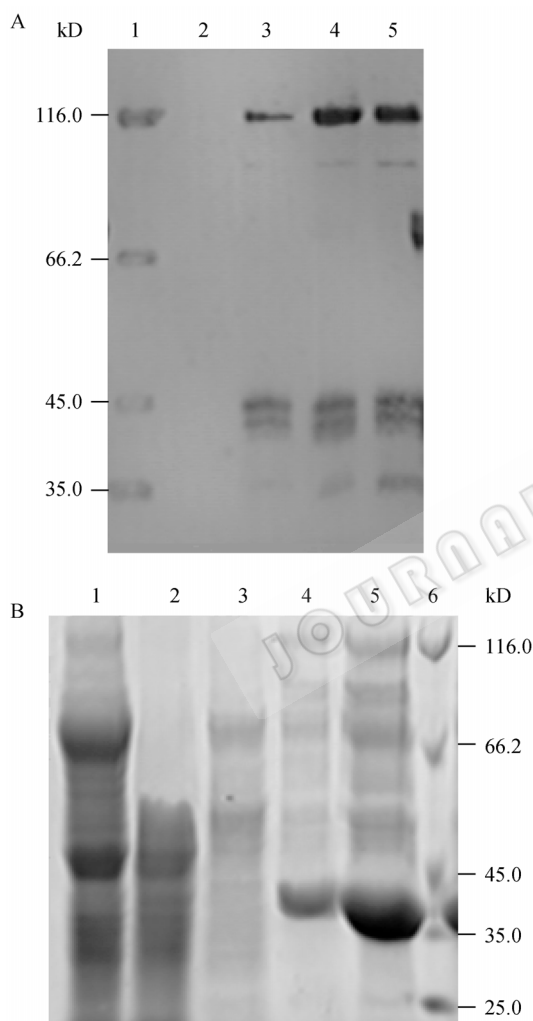


图 4 利用 Ni 亲和层析纯化蛋白样品验证
Fig. 4 Western Blot (A) and SDS-PAGE (B) verification of samples after Ni affinity chromatography

A: 1: Marker; 2: 100 mmol/L 咪唑洗脱液; 3: 250 mmol/L 咪唑洗脱液; 4: 500 mmol/L 咪唑洗脱液; 5: 750 mmol/L 咪唑洗脱液。B: 1: 裂解上清; 2: 上样流穿; 3: 平衡液; 4: 250 mmol/L 咪唑洗脱液; 5: 250 mmol/L 咪唑洗脱产物浓缩; 6: Marker
A: 1: Marker; 2: 100 mmol/L imidazole elution; 3: 250 mmol/L imidazole elution; 4: 500 mmol/L imidazole elution; 5: 750 mmol/L imidazole elution. B: 1: Lysate supernatant; 2: Flow through; 3: Buffer A; 4: Eluted protein with 250 mmol/L imidazole; 5: Concentrated protein in 250 mmol/L imidazole elution; 6: Marker

如图 4(A)所示, 当利用 100 mmol/L 咪唑洗脱时, 没有检测到目的蛋白, 而用 250 mmol/L、500 mmol/L、750 mmol/L 咪唑洗脱时, 在 100 kD 处有明显的目的条带, 说明 250 mmol/L 的咪唑就可有效地将融合蛋白洗脱下来。从图 4(B)中可看出, 在流穿液和 A 相平衡液冲洗的样品中, 观察不到 100 kD 的条带, 而用 250 mmol/L 的咪唑洗脱样品中, 可看到有明显的目的蛋白条带, 说明融合蛋白与纯化介质的结合能力强, 不易随流动相流失, 减少了纯化过程的蛋白损失。

2.4 融合蛋白的活性检测

利用 tyrosine kinase assay kit 检测洗脱产物的酶活(图 5), 结果显示细胞裂解沉淀中没有检测到激酶活性, 说明目的蛋白基本存在于裂解上清中, 是一个可溶性蛋白, 而在细胞碎片中由于大量杂质的影响掩盖了激酶的活性。上样流穿液和 A 相平衡液中同样没有酶活, 又一次证明了介质与 HIS 融合蛋白的强结合能力。两次用 250 mmol/L 的咪唑洗脱时, 检测到的酶活都明显高于阳性对照, 说明纯化得到的蛋白含有酪氨酸激酶生物活性, 同时也证明通过纯化去除杂质后激酶活性即可检出。

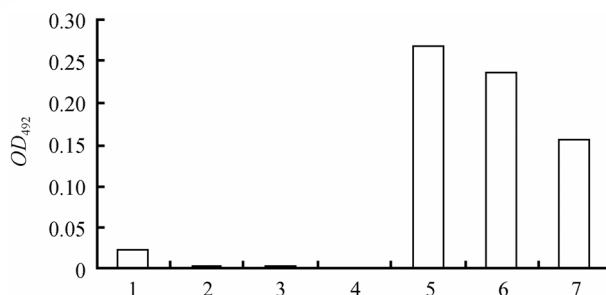


图 5 Ni 亲和层析样品的激酶活性

Fig. 5 Tyrosine kinase assay of purified protein samples

1: 空白对照; 2: 破壁细胞裂解沉淀; 3: 上样流穿; 4: 平衡液; 5: 250 mmol/L 咪唑洗脱峰; 6: 第 2 次纯化 250 mmol/L 咪唑洗脱峰; 7: EGFR 阳性对照

1: Blank; 2: Sediment of cell lysate; 3: Flow through; 4: Buffer A; 5: Eluted with 250 mmol/L imidazole; 6: Eluted with 250 mmol/L imidazole in another purification procedure; 7: EGFR standard sample

3 讨论

本研究在大肠杆菌 TOP10 菌株中成功构建了含有 ErbB2 受体激酶区基因的 pPIC3.5K 融合表达载体, 并在毕赤酵母中利用甲醇诱导促进融合蛋白表达, 通过流式细胞术可方便地检测出带 GFP 融合蛋白的

表达情况。破菌后利用镍亲和纯化, 用 250 mmol/L 咪唑就可将含 HIS 标签的融合蛋白洗脱下来, 这表明在毕赤酵母中 ErbB2 融合蛋白可以稳定表达; 纯化样品经过活性测定, 证明融合蛋白确实具有酪氨酸激酶活性。本实验进一步为筛选蛋白酪氨酸激酶抑制剂打下了良好的基础。

致 谢: 中科院上海药物研究所丁健研究员、林莉萍研究员、童林江博士、谢华博士在本课题检测等方面提供了支持。

参 考 文 献

- [1] Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non small cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 2003, 4: 397–406.
- [2] 朱孝峰, 刘宗潮, 曾益新. 酪氨酸激酶受体的信号转导途径与肿瘤治疗. *药学报*, 2002, 37(3): 229–234.
- [3] Press MF, Jones LA, Gndolphin W, *et al.* HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Prog Clin Biol Res*, 1990, 354A: 209–221.
- [4] Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(1): 1–11.
- [5] Wang S, Sabnian MH, Frenkel E, *et al.* Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol*, 2000, 53(5): 374–381.
- [6] Scheurle D, Jahanzeb M, Aronsohn RS, *et al.* HER-2/neu expression in archival non-somal cell lung carcinomas using FDA-approved Herceptin test. *Anticancer Res*, 2000, 20(6): 2091–2096.
- [7] Seliger B, Rongeur Y, Atkins D, *et al.* HER-2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogeneous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer*, 2000, 87(3): 349–359.
- [8] Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 6845–6857.
- [9] Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med*, 2002, 8(1): 17–23.
- [10] 林莉萍, 丁 健. 针对分子靶点的抗肿瘤药物研究进展. *中国新药杂志*, 2006, 15(3): 167–174.
- [11] Guo XN, Zhong L, Zhang XH, *et al.* Evaluation of active recombinant catalytic domain of human ErbB-2 tyrosine kinase, and suppression of activity by a naturally derived inhibitor, ZH- 4B. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1673: 186–193.
- [12] Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, 18: 119–138.
- [13] FM 奥斯伯, RE 金斯顿, R 布伦特著. 马学军, 舒跃龙等译校. 精编分子生物学实验指南. 第四版. 北京: 科学出版社, 2005, pp.333–373.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H 、 *Eco*R 、 *Msp* 、 *Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。