

## 技术与方法

## VEGF 受体 KDR 结合区的克隆与表达\*

宋述梅 寿成超<sup>1)</sup>

(北京市肿瘤防治研究所, 北京医科大学临床肿瘤学院, 北京 100034)

**摘要** KDR 是血管内皮生长因子 (VEGF) 的主要受体之一, 它在介导 VEGF 刺激内皮细胞增殖及血管通透性等生物学活性中起重要作用. 为了获得人重组的有 VEGF 结合活性的 KDR, 通过 RT-PCR 从人胎儿脐静脉内皮细胞 (EC) 扩增出编码 KDR 胞外 I ~ IV 区片段, 将其克隆在谷胱甘肽转移酶 (GST) 融合蛋白表达载体 pGEX2T 中, 并在大肠杆菌中获得稳定表达. 表达的融合蛋白 GST-KDR 以包涵体形式存在, 其分子质量约 66 ku 左右. 经碱变性法大量提取, 及制备胶电泳获得纯化的 KDR, 为进一步的研究奠定了基础.

**关键词** 血管内皮生长因子受体 (KDR), 结合区, 克隆, 表达

**学科分类号** O7

血管形成是肿瘤生长和转移的基础<sup>[1]</sup>. 肿瘤细胞能分泌许多因子直接或间接刺激肿瘤血管的生成. VEGF 是特异性较强的血管内皮细胞生长刺激因子, 它的两个受体 KDR 和 Flt-1 均属酪氨酸激酶受体第 III 亚型, 两者胞外均有 7 个 Ig 样结构域. 有研究表明<sup>[2]</sup>, KDR 胞外 Ig 样结构域 2 是主要的 VEGF 结合区, 但其侧翼结构域 1 和结构域 3 对受体与配基 VEGF 的结合也起一定作用. 结构域 4 能够维持受体的二聚体化, 有利于 VEGF 与受体的结合. 还有人研究<sup>[3]</sup>, KDR 主要负责 EC 的增殖活性和血管通透性, 而 Flt-1 与 EC 的形态与静止状态的维持有关. 为了获得有 VEGF 结合活性的 KDR 受体胞外区蛋白, 本文从人胎儿脐静脉内皮细胞中克隆了 KDR 胞外 I ~ IV 区 cDNA 片段, 构建了 KDR 融合蛋白表达载体 pGEX2T-KDR, 并在大肠杆菌 XL-1 Blue 中获得稳定表达, 通过碱变性及凝胶电泳获得了纯化的 KDR 融合蛋白, 为后续研究奠定了基础.

## 1 材料及方法

### 1.1 人脐静脉内皮细胞 RNA 提取及 RT-PCR

分离脐静脉内皮细胞并提取 EC 中总 RNA, 根据 KDR 胞外 cDNA 序列, 分别设计 KDR I ~ IV 5' 正义引物 (KDRS1: 5'-AAGGGATCCC-CCAGGCTCAGCATACAA-3') 及 3' 端反义引物 (KDRA1: 5'-GGCGAATTCGGGTGGACATAC-

ACAAC-3') 并在 KDRS1 和 KDRA1 中分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点. 以 KDRA1 为引物用 M-MLV 逆转录酶 (USB Co.) 按说明书行逆转录. 以逆转录的 cDNA 为模板以 KDRS1、KDRA1 为引物行 PCR 扩增. 扩增条件为: 94 °C 45 s, 44 °C 1 min, 72 °C 4 min, 两个循环后将退火温度升至 56 °C, 其余条件不变, 继续进行 30 个循环扩增.

### 1.2 PCR 产物的克隆及酶切和序列鉴定

PCR 产物用 4 mol/L 醋酸钠沉淀, 经琼脂糖凝胶电泳后切取目的条带, 用电洗脱法纯化回收, 经 *Bam*H I / *Eco*R I 酶切后与谷胱甘肽-S-转移酶表达载体 pGEX2T 连接 (T4 DNA 连接酶, GIBCO 公司产品), 连接产物用电转化法转化大肠杆菌 XL-1 Blue, 转化菌扩增后经碱变法提取质粒 DNA. 用 *Bam*H I / *Eco*R I 鉴定重组质粒的 KDR I ~ IV DNA 片段.

根据 KDR I ~ IV 的 721 bp 和 363 bp 处分别有 *Hind* III 和 *Bgl* II 单酶切位点及载体 pGEX2T 中无上述两酶切这一特点, 选用 *Hind* III 和 *Bgl* II 与克隆位点的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行两两酶切鉴定: *Bam*H I / *Hind* III; *Hind* III / *Eco*R I; *Bam*H I / *Eco*R I; *Bam*H I / *Bgl* II; *Bgl* II /

\* 国家杰出青年科学基金的资助项目 (39525021).

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-12-11, 修回日期: 1999-05-17

*EcoR* I. 同时用双脱氧法进行 DNA 序列测定.

### 1.3 KDR 胞外 I ~ IV 区的表达

挑取经酶切鉴定的转化菌, 分别置 2 ml 含  $Amp^+$  LB 培养液试管中, 37 °C 震荡培养过夜, 次日稀释 2~5 倍, 继续培养 2 h ( $A_{600} = 1.0$ ) 时, 将菌液分装入两个试管中, 其中一管作为诱导的阴性对照, 而另一管加入异丙基硫代  $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG), 终浓度 1 mmol/L, 继续培养 3 h, 离心 (5 000 g, 10 min), 沉淀经适量 PBS 稀释后加等量  $2 \times$  SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 3~5 min 后行 SDS-PAGE, 鉴定表达的阳性克隆.

取经小样鉴定能表达 KDR 的阳性菌液少许, 置 100 ml 含  $Amp^+$  LB 培养液中, 37 °C 震荡培养过夜, 次日稀释成 500 ml, 继续培养 2 h ( $A_{600} = 1.0$ ) 时, 加入 IPTG, 终浓度 1 mmol/L, 继续培养 4 h, 离心 (5 000 g, 10 min), 沉淀用 PBS 洗后用细菌裂解液 (1 mmol/L 裂解酶, 1 mmol/L PMSF, 1% Triton X-100), 冰上放置 20 min, 间歇超声 30 s, 用包涵体洗涤及 40 mmol/L NaOH 变性法<sup>[4]</sup>提取 GST-KDR 融合蛋白.

### 1.4 人重组 KDR 的纯化及蛋白质免疫印迹鉴定

制备大的 10% SDS-PAGE 垂直胶, 将上述粗提取的 GST-KDR 融合蛋白加入等体积的  $2 \times$  上样缓冲液, 煮沸、上样, 100 V 电泳 5~6 h, 将电泳后的制备胶浸泡于 4 °C 0.1 mol/L KCl 溶液中大约 2~3 min, 至乳白色条带出现, 对照考马氏亮蓝染的小样 SDS-PAGE 胶切下目的带, 将其装入透析袋, 于水平电泳槽中 50 V 电泳洗脱过夜, 次日升至 100 V 继续电泳 1 h, 然后翻转电极电泳 3~5 min. 吸出透析袋内液体, 进行蔗糖包埋浓缩 .PBS 透析, 然后行 SDS-PAGE 胶鉴定其纯度及含量.

蛋白质免疫印迹按常规方法进行, 0.5  $\mu$ g 纯化 KDR 蛋白行 SDS-PAGE 并转移至 NC 膜上, NC 膜经 3% BSA 封闭后与 KDR I ~ IV 区单抗 3G9 (1 mg/L) 反应, 经酶标二抗及 DAB 显色观察 KDR McAb 与 KDR 抗原的反应性.

## 2 结 果

### 2.1 RT-PCR 及酶切和序列鉴定

用 Trisolv 提取液提取 EC 中总 RNA. 以逆转录的 KDR cDNA 为模板, 在 5 mmol/L  $Mg^{2+}$  浓度下进行 KDR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳分析, 可见于 1 170 bp 处出现一条特异条带, 与预计值相吻合 (图 1).

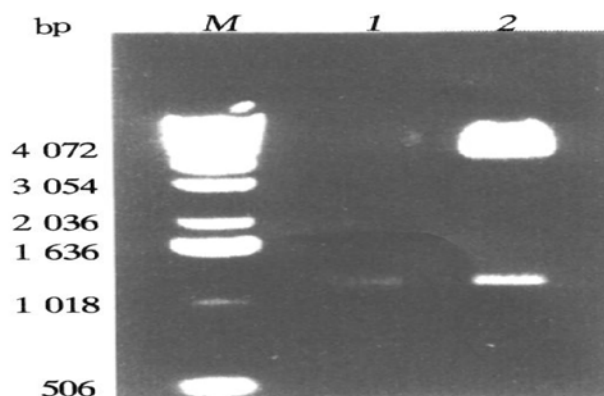


图 1 KDR (I ~ IV) 基因片段的 RT-PCR 及质粒 pGEX2T-KDR 克隆的鉴定

M: DNA 分子质量标准. 1: KDR (I ~ IV) RT-PCR 产物; 2: pGEX2T-KDR 经 *Bam*HI / *Eco*RI 酶切消化.

用 *Hind* III 分别与 *Bam*HI 或 *Eco*RI 消化 pGEX2T-KDR I ~ IV, 有 630 bp 和 449 bp 条带放出, 同样用 *Bgl* II 分别与 *Bam*HI 或 *Eco*RI 消化 pGEX2T-KDR I ~ IV 应分别有 272 bp 和 807 bp 条带放出, 结果与预计值完全相符 (图 2).

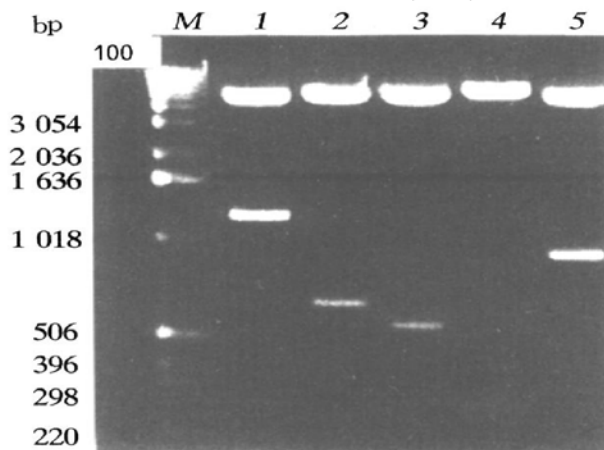


图 2 质粒 pGEX2T-KDR I ~ IV 的酶切鉴定

M: DNA 分子质量标准. 1: 质粒经 *Bam*HI / *Eco*RI 酶切消化; 2, 3: 质粒分别经 *Bam*HI / *Hind*III 和 *Hind*III / *Eco*RI 消化; 4, 5: 质粒分别经 *Bam*HI / *Bgl*II 和 *Bgl*II / *Eco*RI 消化.

pGEX2T-KDR I ~ IV 质粒 DNA 测序结果表明, 克隆的 KDR I ~ IV cDNA 片段与已知 KDR I ~ IV 区序列完全一致 (测序资料略).

### 2.2 GST-KDR I ~ IV 融合蛋白的表达与纯化

经酶切鉴定的阳性 XL-1Blue 菌, 在 IPTG 诱导下, 能稳定表达 KDR 融合蛋白, 表达蛋白占菌体蛋白的 5%, 分子质量约 66 ku, 与预计值基本相符 (图 3).

大量诱导阳性表达菌, 表达蛋白以包涵体形式存在, 经 10 mmol/L EDTA 包涵体洗液洗涤及 40 mmol/L NaOH 提取后, 又经凝胶电泳纯化及电洗脱后可获得纯化的 KDR 蛋白 (图 3).

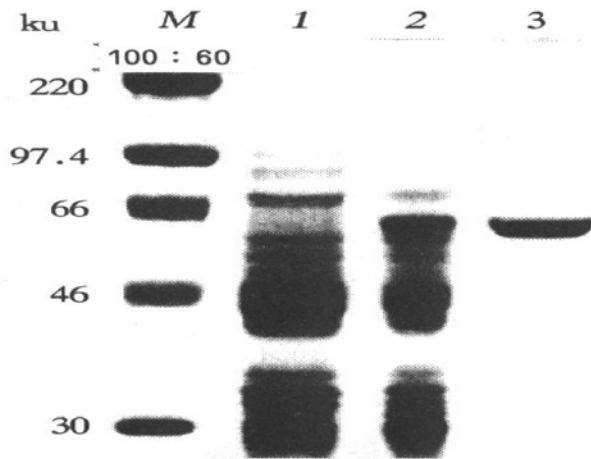


图 3 GST-KDR 在 XL-1Blue 细菌中的表达及纯化 KDR 蛋白

M: DNA 分子质量标准. 1: 未经 IPTG 诱导的 pGEX2T-KDR 转化的细菌蛋白; 2: 经 IPTG 诱导的 pGEX2T-KDR 转化的细菌蛋白; 3: 纯化的表达 KDR 蛋白.

### 2.3 蛋白质免疫印迹鉴定 GST-KDR I~IV 融合蛋白

纯化的 GST-KDR I~IV 蛋白经 SDS-PAGE 并转至 NC 膜, 用 KDR I~IV McAb 检测其反应特异性. 结果表明: GST-KDR I~IV 能与经过鉴定的 KDR I~IV 区单抗特异反应, 而与无关的小鼠抗体不反应 (图 4).

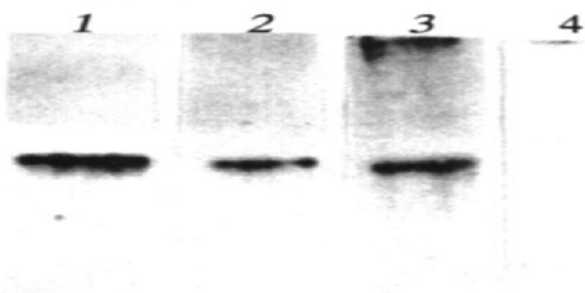


图 4 KDR I~IV 区 McAb 的蛋白质免疫印迹分析

1, 2: KDR 纯化 McAb3G9 及其杂交瘤上清分别与 KDR I~IV 蛋白的特异性反应; 3: KDR McAb 1E4 上清与 KDR I~IV 蛋白的阳性反应; 4: 阴性对照, 正鼠 IgG 与蛋白 KDR I~IV 的阴性反应.

## 3 讨 论

血管内皮细胞生长因子受体 (KDR) 在介导 VEGF 刺激血管内皮细胞增殖中起重要作用. 与

Flt-1 一样, KDR 也属酪氨酸激酶受体, 细胞外区域 (ECD) 含 7 个免疫球蛋白样区, KDR 仅与 VEGF 有高亲和性, 而 Flt-1 不仅结合 VEGF 而且也可结合胎盘源生长因子 (PIGF)<sup>[5]</sup>. 研究表明, KDR 和 Flt-1 蛋白经 VEGF 诱导后有不同信号传导特点及生物学活性. KDR 具有强烈的配基依赖的磷酸化, VEGF 的血管形成刺激作用与 KDR 有关而与 Flt-1 无关<sup>[2]</sup>. KDR 基因缺乏的裸鼠不能形成新生血管, 可于胚胎期第 8~9 天时死亡<sup>[4]</sup>. 多种研究表明, 实体瘤的形成与 KDR 刺激 EC 增殖有直接的关系. 制备可溶性的 KDR 受体蛋白用以竞争抑制 VEGF 与 EC KDR 的结合对抑制肿瘤生长有潜在的临床应用意义.

Davis-Smyth T 等<sup>[2]</sup> 研究证实 KDR 胞外结构域 2 含有 VEGF 结合位点, 而其侧翼结构域 1 和结构域 3 对结构域 2 结合也有一定影响. 考虑到结构域 4 有维持受体二聚体化的作用, 因此我们从胎儿脐静脉 EC 克隆了 KDR 胞外 I~IV 区基因片段并获得了在原核细胞的稳定表达. 所克隆的 KDR 胞外 I~IV 区基因经酶切鉴定及序列测定均为目的片段, 且所表达蛋白经蛋白质免疫印迹证实确为目的蛋白, 表达蛋白的 VEGF 结合活性实验正在进行中.

扩增 KDR 胞外 I~IV 区时, 我们用 KDR 反义引物代替 Olig dT 合成第一股 cDNA 链, 既提高了 PCR 扩增产物的特异性又克服了在逆转录时因 Oligo dT 结合位点远离欲扩增区域而可能导致目的基因片段不能转录之虞.

本实验室曾克隆了 KDR 胞外 V~VII 区<sup>[6]</sup>, 研制了其相应单抗<sup>[7]</sup>, 对 KDR 在不同来源肿瘤组织的表达进行了研究<sup>[8]</sup>. 随着 VEGF 与 KDR 结合区域的进一步阐明, 我们在既往工作的基础上又克隆和表达了 KDR 的胞外 I~IV 区, 以期获得能与 VEGF 直接结合的 KDR 受体表达产物, 为进一步的抗肿瘤生物治疗应用研究奠定基础.

## 参 考 文 献

- 1 Adrian Harris. Antiangiogenesis for Cancer Therapy. Lancet, 1997, 349 (suppl II): 13~15
- 2 Davis-Smyth T, Chen H, Park J, et al. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. EMBO J, 1996, 15 (18): 4919~4927
- 3 Yoshiji H, Gomez E D, Shibuya M, et al. Expression of VEGF, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. Cancer Res, 1996, 56 (9): 2013~2016
- 4 Strawn L M, McMahon G, Schreck H A R, et al. Flk-1 as a

- target for tumor growth inhibition. *Cancer Res*, 1996, **56** (15): 3540~ 3545
- 5 Menred A, Thierauch K-H, Martiny-Baron G, *et al.* Novel antibodies directed against the extra-cellular domain of the human VEGF-receptor type II. *Hybridoma*, 1997, **16** (5): 465~ 471
  - 6 Song S M, Shou C C. Cloning of vascular endothelial growth factor receptor (KDR) and its prokaryotic expression. *Chin J Biochem & Mol Biol*, 1998, **14** (1): 57~ 61
  - 7 Song S M, Wu J, Shou C C. Preparation and identification of monoclonal antibody against human vascular endothelial cell growth factor receptor. *J Beijing Med Univ*, 1998, **30** (6): 509~ 511
  - 8 Song S M, Wu J, Shou C C. Expression of VEGF receptor KDR in different originated carcinomas. *Chinese Journal of Cancer Research*, 1998, **10** (3): 104~ 108

**Cloning and Expression of Truncated KDR Binding to Vascular Endothelial Growth Factor.** SONG Shu-Mei, SHOU Cheng-Chao (*Beijing Institute for Cancer Research, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*).

**Abstract** VEGF receptor, KDR, is one of the main

VEGF receptors, and it plays important role in VEGF stimulating endothelial cell (EC) proliferation and vascular permeation. To obtain active recombinant KDR which can bind VEGF *in vitro*, RT-PCR was used to clone KDR (I ~ IV) DNA fragment from human umbilical vein EC. The cloned KDR (I ~ IV) fragment was identified with enzyme digestion and sequencing and then cloned into fusion protein expression vector pGEX2T. The GST-KDR fusion proteins were expressed in *E. coli* XL1-blue after inducing by IPTG. The fusion proteins were extracted from bacterial inclusion body with basic denature method and purified with preparing SDS-PAGE gel followed by electric elution.

**Key words** KDR, binding domain, cloning, expression

## 双波长/双光束分光光度计数据处理系统的改进\*

周宏伟 林波海 吴 维 张幼苓 王丽华

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

闵小山

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 通过加入计算机和设计新软件, 双波长/双光束分光光度计数据处理能力得到大大增强. 仪器原来依靠绘图仪输出, 手量手算, 数据处理能力弱, 限制了它的使用, 尤其是在动力学测定上. 现在由计算机控制数据采集, 显示多条曲线, 显示数值, 在曲线上自动寻峰, 光滑曲线, 任意缩放图形, 并用激光打印机输出. 介绍了升级后的系统结构, 及其在关于磷脂酰乙醇 (PE) 对  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运能力影响的研究中的应用.

**关键词** 双光束, 双波长, 分光光度计, 数据处理, 磷脂酰乙醇

**学科分类号** TH744.12, R318.6, TH773, Q73

双波长/双光束分光光度计既能以双光束方式又能以双波长方式测量; 既能扫描样品的吸收或透射光谱, 又能记录样品反应的动力学过程. 双波长方式对于测量浑浊样品 (如完整细胞的悬浮液) 和光吸收峰相互重叠的多组分样品特别有利, 比通常的单波长分光光度测定更灵敏更有选择性<sup>[1]</sup>. 由于双波长/双光束分光光度计具有这些优良的功能, 它在生物学, 医学和化学的广泛领域中得到应用<sup>[2]</sup>.

但是双波长/双光束分光光度计大多是 80 年代

初期进口的产品, 在操作和数据处理上存在很多不足: 存储容量很有限, 只能通过绘图仪画出曲线, 曲线上各点的数值必须手量手算, 曲线画出后几乎就不能再对数据作任何处理. 仪器的这些不足之处严重影响了其在科研中的应用. 我们为双波长/双光束分光光度计设计了数据采集电路和通信控制电路, 配置了计算机和激光打印机, 编制了数据采集和处理程序, 使系统的性能得到了很大的提高. 本

\* 国家自然科学基金资助项目 (39870220) 和中国科学院大型仪器升级改造项目 (S96054).

收稿日期: 1998-07-03, 修回日期: 1998-11-13