

## 人肿瘤抗原基因 Delta-like4(DLL4) 可溶性表达、纯化及鉴定

刘建军<sup>1)</sup>, 胡月新<sup>2)</sup>, 焦扬<sup>1)</sup>, 赵瑜<sup>3)</sup>, 杨静<sup>1)</sup>, 何保丽<sup>4)</sup>

(1) 昆明医科大学分子临床医学研究院; 2) 科研实验中心; 3) 生物医学工程研究中心; 4) 动物学部, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 研究克隆肿瘤抗原人 DLL4 基因, 与原核表达载体可溶性融合表达、分离纯化及其鉴定, 并计划将其应用于 DLL4 特异性肺癌肿瘤疫苗研究过程中的抗血清滴度检测. **方法** 采用 PCR 方法扩增 DLL4 多核苷酸序列, 克隆入 pMD-18T 载体. 测序正确后, 将其亚克隆入 pGEX-KG 原核表达载体, 获得 pGEX-KG-hDLL4 载体. 以该载体转化 E.coli 菌株 BL21 (DE3), IPTG 诱导其表达, 裂解大肠杆菌, 以 GSTrap 亲和层析柱纯化目的蛋白, 采用 SDS-PAGE 电泳, Western Blot 方法鉴定目的蛋白的表达. **结果** PCR 扩增获得了 hDLL4 基因片段, 经测序证实与 GenBank 公布的序列一致, 重组的质粒经过 PCR、酶切鉴定, 证明重组质粒中已成功的插入了目的基因 hDLL4. 成功构建了该蛋白的原核表达载体 pGEX-KG-hDLL4. **结论** 融合蛋白 GST-hDLL4 在 25℃, IPTG 终浓度 0.5 mmol/L 条件下诱导表达, 以 GSTrap 亲和层析柱纯化, 获得纯化融合蛋白. 采用 SDS-PAGE, Western Blot 的方法可检测到目的可溶性融合蛋白 GST-hDLL4 的表达.

**[关键词]** DLL4; 原核表达; 亲和层析; 融合蛋白

**[中图分类号]** S852.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2013) 06 - 0026 - 04

## Soluble Expression, Purification and Identification of Human Tumor Antigen Delta-like4 (DLL4) Recombinant Protein

LIU Jian-jun<sup>1)</sup>, HU Yue-xin<sup>2)</sup>, JIAO Yang<sup>1)</sup>, ZHAO Yu<sup>3)</sup>, YANG Jing<sup>1)</sup>, HE Bao-li<sup>4)</sup>

(1) Institute of Molecular and Clinical Medicine; 2) Experimental Center for Medical Science Research; 3) The center of Biomedical Engineering Research; 4) Dept. of Laboratory Zoology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To clone human tumor antigen DLL4 gene, then induce its prokaryotic expression and separate, purify and identify the soluble fusion protein. The result is intended to apply in the DLL4-specific antiserum titer detection of lung cancer vaccine research process. **Methods** DLL4 segment was amplified by RT-PCR and cloned into pMD-18T vector. After sequencing, the DLL4 segment was sub-cloned into expression vector pGEX-KG to construct the expression plasmid pGEX-KG-hDLL4. The recombinant vector was transfected to BL21 (DE3) and GST fusion protein was expressed by IPTG. The protein was purified by GST affinity chromatography and identified by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. **Results** hDLL4 gene segment were obtained by PCR amplification, and the sequence was the same with the sequence which published by GeneBank after tested. We have successfully constructed the pProkaryotic expression vector pGEX-KG-hDLL4 by proving that the target gene hDLL4 had been inserted into the recombinant plasmid after PCR and enzyme digestion. **Conclusion** The fusion protein GST-hDLL4 could be induced under the condition that the temperature was 25 °C and the concentration of the IPTG was 0.5 mmol/L. After purified by GST affinity chromatography column, the

**[基金项目]** 云南省高校药学重点实验室项目 (2011YXZD01)

**[作者简介]** 刘建军 (1983~), 男, 湖南醴陵市人, 医学硕士, 助理实验师, 主要从事细胞培养研究工作.

**[通讯作者]** 何保丽. E-mail: [hb1117@sina.com](mailto:hb1117@sina.com)

expression of the soluble fusion protein could be tested by SDS-PAGE and Western blot.

[**Key words**] DLL4; Prokaryotic expression; Affinity chromatography; Fusion protein

肿瘤的血管发生与肿瘤的生长关系密切. 在肿瘤血管发生的分子机制的研究中, DLL4 的作用日益受到关注. DLL4 是研究发现的 Notch 通路中很有应用前景的抗肿瘤靶点<sup>[1]</sup>, 研究认为, 肿瘤血管内皮细胞高表达 DLL4, DLL4 可能在血管的生长过程中调节着血管内皮细胞的分化增殖, 从而达到控制血管生长的作用. 但目前对 DLL4 的认识还十分有限<sup>[2,3]</sup>. 为了在体外研究 DLL4 与各种血管生成异常疾病的靶向治疗效果, 本研究以人 DLL4-cDNA 为模板, 采用原核表达系统, 表达并纯化融合蛋白 GST/hDLL4 并进行蛋白印记检测, 旨在为其体外大量制备及其临床研究提供依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

逆转录试剂盒、限制性内切酶, T4 连接酶、pMD18-T 载体都为大连 takara 公司产品, 2x Extaq PCR master mix、Western ECL 试剂盒、山羊抗鼠 IgG-HRP 和显色试剂 TMB 均为北京康为世纪产品, 质粒纯化、胶回收试剂盒购自北京天根生物, GSTrap (1 mL) 亲和层析柱购自 GE healthcare 公司, 鼠抗人 DLL4 单克隆抗体购自 Abcam 公司, DH5a, BL21 (DE3) 感受态细胞购自大连 takata 公司. DLL4 的 cDNA 序列购自北京 Origene 公司, 载体 pGEX-KG 由本实验室保存.

### 1.2 PCR 产物的克隆和验证

PCR 扩增 DLL4 序列, 上下游引物分别为: 上游引物 5'< AAGGATCCATGGCGGCAGCGTCCCGG-A>3', 下游引物 5'< TTGAATTCTTATACCTCCGTG-GCAATGAC>3', 分别带有 BamHI 和 EcoRI 酶切位点. PCR 反应条件为 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 10min. 1%琼脂糖分离 PCR 扩增的特异性片段, 按试剂盒说明书纯化产物, 将目的基因亚克隆至 T 载体 pMD18-T 中, 经氨苄青霉素 (Amp) 抗性筛选阳性克隆, 双酶切及 PCR 验证是否有相应大小的外源片段插入, 最后经北京华大基因有限公司测序进一步验证.

### 1.3 pGEX-KG-DLL4 重组表达载体的构建

用 EcoRI/BamHI 双酶切 T 载体得到 hDLL4 片段, 同样用 EcoRI/BamHI 双酶切 pGEX-KG 载体, 用快速连接试剂盒连接双酶切产物, 22 °C 连接 30

min, 将 hDLL4 片段定向克隆到 pGEX-KG 载体上, 连接产物转化感受态 BL21 (DE3) 菌, Amp 平板筛选阳性克隆, 获得的阳性克隆经 PCR, 双酶切和测序鉴定, 将构建的重组质粒命名为 pGEX-KG-hDLL4.

### 1.4 诱导表达融合蛋白

挑取单个经重组质粒转化的菌落接种到含 100 mg/mL 氨苄青霉素 LB 液体培养基, 180 r/min, 37 °C 培养 14 ~ 16 h, 以按 1:100 的浓度转接 1 mL 新鲜菌液于 100 mL 含氨苄青霉素 LB 液体培养基中, 180 r/min, 37 °C 扩大培养至 A600 nm = 0.5 ~ 1.0 时, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的异丙基-B-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 160 r/min, 25 °C 培养 8 h 后取菌液.

### 1.5 表达产物 SDS-PAGE 电泳分析及纯化

离心收集菌体, 并计算湿菌重. 每克菌用 8 mL 破碎缓冲液 (PBS) 悬浮, 加入溶菌酶, 搅拌 1 h, 冻融处理 1 ~ 2 次, 然后超声: 150 W 功率, 10 s 超声, 90 s 间隔, 超声 10 min (约超声 4 ~ 5 次, 实际情况根据菌液粘稠情况定). 4 °C 条件下离心收集裂解上清液, 上清沉淀均取样 SDS-PAGE 检测. 并测量上清液体积.

将上述裂解液上清加到一根预平衡过的 GSTrap 亲和层析柱中, 流速 0.1 mL/min; 用 5 ~ 10 倍体积的 PBS/EDTA 洗涤柱, 流速 1.5 mL/min; 用 5 倍体积的谷胱甘肽缓冲液从柱上洗脱融合蛋白, 流速为 0.3 mL/min; 用紫外检测仪或通过各个组分的吸收读数, 在 280 nm 处监测融合蛋白的洗脱, 合并含 GST 融合蛋白的组分, 4 °C 保存.

### 1.6 Western Blot 鉴定

纯化得到的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 转移到 0.45 μm 的 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶或 BSA 封闭过夜, 以鼠抗人 DLL4 抗体 (1:500) 为一抗, 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:2 000) 为二抗孵育 1 h, 洗膜后用 ECL 显色.

## 2 结果

### 2.1 DLL4 序列的获取及序列测定

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后得到大小约 2 000 bp 的特异性单一条带, 与 T 载体连接后测序, 结果显示目的基因插入质粒中, 片段

长度为 2 058 bp, 见图 1. 与 GeneBank 数据库 (AF253468.1) 对比, 序列完全一致.

## 2.2 重组表达载体 pGEX-KG-hDLL4 的鉴定

重组表达载体 pGEX-KG-hDLL4 的质粒用 EcoRI/BamHI 双酶切后 (条带 1-3), 与 DLL4 阳性对照 (条带 4) 共同琼脂糖电泳检测, 见图 2. 结果显示重组子 1-3 (条带 1-3) 与阳性对照条带一致, 送测序公司测序鉴定, 与 GeneBank 数据库比较, 序列完全一致.

## 2.3 目的重组蛋白的表达及纯化

取 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导, 25℃ 培养 8 h 后的菌液, 裂解后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测, 并将细菌裂解上清用于 GSTrap 亲和层析, 见图 3.

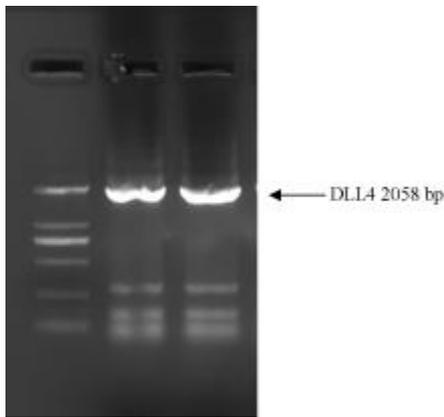


图 1 DLL4 基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 The PCR amplification electrophoretogram of DLL4 gene

条带 1:DNA Marker DL2, 000, 从上至下分别为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp. 条带 2, 3 为 DLL4 PCR 扩增条带.

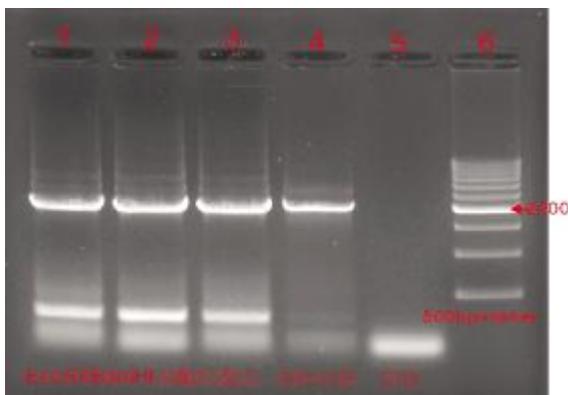


图 2 重组载体双酶切鉴定

Fig. 2 The recombinant vector identified by double digestion

带 1-3:重组质粒 EcoRI/BamHI 双酶切;带 4:阳性 PCR 产物对照;带 5:阴性对照;带 6:500bp DNA Marker.

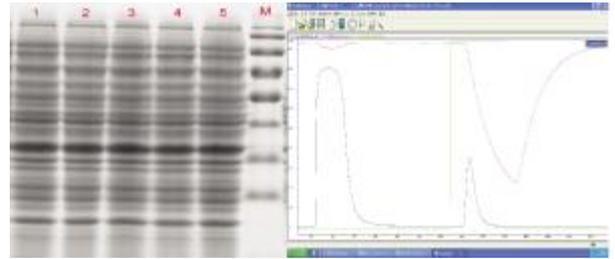


图 3 重组蛋白的诱导表达及其纯化

Fig. 3 Inducible expression and purification of the recombinant protein

左图:条带 1-5 为 IPTG 诱导后 25℃ 培养不同时间的取样电泳图;M 为蛋白 Marker, 从上往下分别为 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25KD, DLL4-GST 融合蛋白大小为 100KD;右图:为融合蛋白 GSTrap 亲和层析示意图, 左边峰图为蛋白样本上样后的穿透峰, 右边的是洗脱峰 (融合蛋白) .

## 2.4 目的蛋白的鉴定

纯化得到的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, western blot 检测, 重组蛋白的分子量为 100 kD, 见图 4, 与设想的重组蛋白大小一致 (GST:26 kD, DLL4:74 kD) .

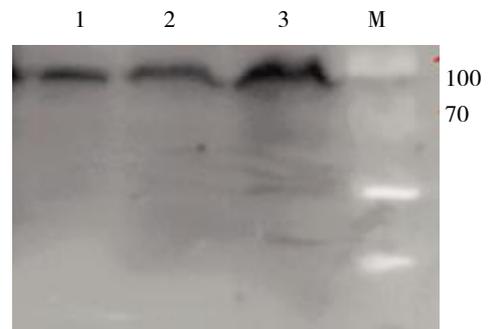


图 4 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 4 The recombinant protein identified by western blot

条带 1-3 是表达纯化得到的融合蛋白 WB 检测得到的条带, 分子量大小为 100 kD (与实验设计一致), M 为蛋白分子量标准.

## 3 讨论

随着免疫学、分子生物学与基因工程技术的发展, 多种肿瘤抗原的发现, 肿瘤免疫治疗再度成为国际上肿瘤治疗的热点之一. DLL4 在肿瘤细胞中高表达, 在正常组织中不表达或低表达. Notch 配体 delta 样配体 4 (delta-like ligand 4, DLL4) 是在内皮根尖细胞血管生成的萌芽阶段所表达的重要成分<sup>[4]</sup>, 研究显示, 免疫编码 DLL4 的 DNA 疫苗在非

诱导的原位移植乳腺癌小鼠体内严重阻碍了肿瘤血管的生成<sup>[5]</sup>。

本研究选用 BL21 (DE3) 大肠杆菌作为宿主细胞对目的基因进行原核表达, 所表达的目的蛋白有较高的稳定性<sup>[6]</sup>。本实验表达的蛋白经过诱导等条件优化后, 目的蛋白为可溶性表达, 而且表达量比较高。所表达的蛋白含 GST 标签, 通过 GSTrap 亲和层析可以方便得到较高纯度的融合蛋白。为后续实验提供了基础。

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤, 肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率占恶性肿瘤的首位。在当前的治疗策略中, 免疫治疗成为新兴的研究热点, 肿瘤 DNA 疫苗 (DNA Vaccine) 是肿瘤免疫治疗的一种重要策略之一<sup>[7]</sup>。而编码 DLL4 的 DNA 疫苗已然成为在抑制肿瘤血管生成上起到显著作用的新型基因靶点, 成为一种防治病理性血管生成和复发性恶性疾病辅助治疗的新的治疗策略<sup>[8,9]</sup>。另外, 商品化的 DLL4 抗体不多, 而且价格较贵。笔者实验得到的目的蛋白可用于 DLL4 抗血清的制备与检测, 为进一步研究 DLL4 抗原在免疫治疗中的作用奠定基础<sup>[10]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] ARTAVANIS T, SAKONAS S, RAND M D, et al. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5412):770 - 776.
- [2] OHISHIKI, KATAYAMA N, SHIKU H, et al. Notch signaling in hematopoiesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(2):143 - 150.
- [3] LAURET E, CATELAIN C, TITEUX M, et al. Membrane-bound delta-4 notch ligand reduces the proliferative activity of primitive human hematopoietic CD34+ CD38- low cells while maintaining their LTC-IC potential [J]. *Leukemia*, 2004, 18(4):788 - 797.
- [4] SEGARRA M, WILLIAMS C K, SIERRA M, et al. Dll4 activation of Notch signaling reduce stem or vascularity and inhibit stem or growth [J]. *Blood*, 2008, 112(5):1904 - 1911.
- [5] JOHN R, SHUTTER SS, WEI F, et al. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(11):1313 - 1318.
- [6] LAVALLIE E R, MCCOY J M. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6(5):501 - 506.
- [7] HE F, WANG L, HU X B, et al. Notch and BCR signaling synergistically promote the proliferation of Raji B lymphoma cells [J]. *Leuk Res*, 2009, 33(6):798 - 802.
- [8] BKHALLER, ABRAVE, EWALLGARD, et al. Therapeutic efficacy of a DNA vaccine targeting the endothelial tip cell antigen delta-like ligand 4 in mammary carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(30):1 - 11.
- [9] LIUMA. DNA vaccines: a review [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2003, 253(14), 402 - 410.
- [10] LIN J, LIU J, LU M, et al. High-level soluble expression, purification, and functional characterization of the recombinant human leukemia inhibitory factor: a potential general strategy for the recombinant expression of cytokines consisting of four alpha-helices in a bundle [J]. *Protein Pept Lett*, 2011, 18(7):690 - 698.

(2013 - 01 - 03 收稿)