

研究简报 ·

## 肿瘤转移相关蛋白 ST14 的表达、纯化及活性鉴定

葛维挺<sup>1),2),3)</sup>, 郑树<sup>2)</sup>\*, 孙立峰<sup>2)</sup>, 史影<sup>2)</sup>, 胡涵光<sup>2)</sup>, 丁克峰<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 浙江大学生命科学院, 杭州 310029; <sup>2)</sup> 浙江大学医学院附属二院肿瘤研究所, 杭州 310009;

<sup>3)</sup> 杭州华大基因研发中心, 杭州 310008)

### Expression and Purification of ST14, a Tumor Metastasis-associated Protein, and Its Activity Assay

GE Wei-ting<sup>1),2),3)</sup>, ZHENG Shu<sup>2)</sup>\*, SUN Li-feng<sup>2)</sup>, SHI Ying<sup>2)</sup>, HU Han-guang<sup>2)</sup>, DING Ke-feng<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

<sup>2)</sup> Cancer Institute, Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China;

<sup>3)</sup> Hangzhou Genomics Institute, Hangzhou 310008, China)

**Abstract** ST14 is one of the type II transmembrane serine proteases that correlates with the process of tumor metastasis. The C-terminal catalytic region (900 bp) of ST14 was cloned into the expression vector pGEX-4T-2 and the positive plasmid pGEX-4T-2-ST14 was transformed into *E. coli* BL21, then cultured and induced with IPTG. The chaperonin GroEL was found to be tightly associated with the fusion protein and co-purified with it by regular GST affinity chromatography. A method for the removal of contaminating GroEL from GST-ST14 fusion protein was described, the purity of product was 96.2%. Enzyme activity assay indicated that this fusion protein had serine protease activity.

**Key words** ST14 gene, fusion protein, serine protease, co-purification

中图分类号 Q78, Q55

细胞外基质包括基底膜和间隙基质, 主要由胶原、糖蛋白和蛋白多糖等一些物质组成, 具有维持细胞组织形态的作用, 是细胞间相互作用的重要场所。在肿瘤细胞的浸润和转移过程中, 必须有细胞外基质的降解过程, 研究发现多种蛋白酶与该过程有关, 包括丝氨酸蛋白酶家族中的纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶系统, 金属蛋白酶系统中的 MMP-2 和 MMP-9, 组织蛋白酶 B, 组织蛋白酶 D, 以及透明质酸酶, 胶原酶等<sup>[1]</sup>。

型跨膜丝氨酸蛋白酶 (Type transmembrane serine protease, TTSP) ST14 具有降解细胞外基质的能力, 并能激活 uPA 前体及 HGF/SF 前体, 参与肿瘤的生长, 浸润和转移过程<sup>[2~4]</sup>。该蛋白质由 855 个氨基酸残基组成, C 端是一个丝氨酸蛋白酶催化活性区, 长度为 236 个氨基酸残基, 其三维结构已由晶体衍射实验得到证实<sup>[5, 6]</sup>。

为进一步研究 ST14 蛋白在肿瘤转移中发挥的功能, 将该蛋白质 C 端丝氨酸蛋白酶催化活性区克

隆至 pGEX-4T-2 表达载体, 在大肠杆菌中高效表达得到了 GST-ST14 融合蛋白, 但在使用常规亲和层析方法分离时发生了共纯化现象, 根据共纯化蛋白的分子量大小推测可能为伴侣蛋白 GroEL<sup>[7, 8]</sup>。在样品预处理时使用变性蛋白结合 GroEL 而使 GST-ST14 和伴侣蛋白分开<sup>[9]</sup>, 同时改进亲和层析方法, 使用含 ATP 的缓冲液冲洗层析柱除去残留的 GroEL 蛋白, 从而得到了高纯度的 GST-ST14 融合蛋白, 并证实具有丝氨酸蛋白酶活性。该活性蛋白质的高效表达为下一步得到 ST14 蛋白的抗体, 研究 ST14 蛋白在肿

收稿日期: 2003-09-30, 接受日期: 2003-12-15

国家自然科学基金资助项目 (No. 30200325)

\* 联系人: Tel: 0571-87784501, Fax: 0571-87214404,

E-mail: zhengshu@mail.hz.zj.cn

Received: September 30, 2003; Accepted: December 15, 2003

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30200325)

\* Corresponding author Tel: 0571-87784501, Fax: 0571-87214404,

E-mail: zhengshu@mail.hz.zj.cn

瘤组织中的表达分布情况,寻找和 ST14 蛋白相互作用的其他蛋白质提供了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

亚克隆载体 pGEM-T Easy 质粒购自 Promega 公司,原核表达载体 pGEX-4T2 购自 Pharmacia 公司, *E. coli* BL21 菌株由本研究所保存, *Bam*H 和 *Not* 酶购自大连宝生物工程公司, GSTrap FF 购自 Pharmacia 公司, tPA 显色底物购自 Sigma 公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。

缓冲液 A: PBS, 140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3.

缓冲液 B: 100 mmol/L TEA-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ATP, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, pH 7.3.

缓冲液 C: 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 谷胱甘肽, pH 8.0.

缓冲液用 0.45 mm 微孔滤膜过滤,置于 4 °C 保存备用。

### 1.2 重组质粒的构建

根据 ST14 基因 C 端催化活性区序列,设计引物如下:引物 1: 5'-GGATCCAA GGTGAAC GTCG TCACTTG3', 带有 *Bam*H 酶切位点;引物 2: 5'-G C GGCCGCCTACCCCA GTGTTCTE3', 带有 *Not* 酶切位点和终止密码子。以 Tca8113 细胞系的逆转录产物为模板扩增出 ST14 基因 C 端 900 bp。PCR 产物和 pGEM-T Easy 载体连接构建 pGEM-T Easy-ST14 亚克隆质粒,测序证实。再用 *Bam*H 和 *Not* 将 ST14 片段切下后连接到 pGEX-4T2 上构建得到表达载体 pGEX-4T2-ST14,限制酶切鉴定证实后用于蛋白表达。

### 1.3 GST-ST14 融合蛋白的诱导表达和条件优化

将阳性克隆转化 *E. coli* BL21,接种 7 ml LB 培养基(含 50 g/L 氨苄青霉素)中,37 °C 摇床培养过夜,按 1:100 接种到新鲜 LB 培养基(含 50 g/L 氨苄青霉素)中,37 °C 培养至 A<sub>600</sub> 为 0.8 时,加入异丙基硫代-D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.1 mmol/L 或 1 mmol/L,37 °C 诱导,以未诱导菌液作为阴性对照,10% SDS-PAGE 比较各个诱导条件下的蛋白表达量。

### 1.4 表达产物的纯化

1.4.1 常规 GST 亲和层析法 离心收集诱导表达的菌体,用 1/20 体积的 PBS 重悬,冰浴中超声破碎,低温 12 000 g 离心 20 min 后取上清,0.45 mm 微孔

滤膜过滤。按照 Pharmacia 公司手册上的方法,过 GSTrap FF 亲和层析柱纯化蛋白,使用的缓冲液为 A 和 C。

1.4.2 改进的 GST 亲和层析法 变性蛋白的准备:将 pGEX-4T2-ST14 重组质粒转化 *E. coli* 菌株 BL21,过夜培养后取适量菌液,离心收集菌体、破菌后离心取上清真空冷冻干燥制成干粉,加入少量 8 mol/L 尿素至干粉完全溶解,低温 12 000 g 离心 20 min,上清即为变性蛋白液,置于 4 °C 保存备用。诱导表达的破菌后离心上清用 0.45 mm 微孔滤膜过滤,每 10 ml 上清中加入 0.2 ml 的 500 mmol/L 的 ATP 溶液,37 °C 水浴 10 min,再加入 60 μl 变性蛋白液,37 °C 水浴 20 min,低温 12 000 g 离心后弃去出现的沉淀,留取上清。GSTrap FF 亲和层析柱用 5 ml 缓冲液 A 平衡,再将准备好的样品缓缓过柱,样品过柱后先用 5 ml 缓冲液 A 洗柱,再用 5 ml 缓冲液 B 洗柱,然后再用 5 ml 缓冲液 A 洗柱,最后加入 5 ml 缓冲液 C 将 GST-ST14 融合蛋白洗下得到纯化蛋白。

纯化后的蛋白中含有 Tris-HCl 和谷胱甘肽,透析可除去。

### 1.5 酶活性的鉴定

1.5.1 GST-ST14 融合蛋白的酶活力测定 使用 tPA 显色底物(tissue plasminogen activator chromogenic substrate)鉴定纯化蛋白的丝氨酸蛋白酶活性,按照 Sigma 公司的操作手册进行,反应总体积 2 ml,包括 1.78 ml 缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl,30 mmol/L 咪唑、130 mmol/L NaCl),0.02 ml 的 GST-ST14 溶液和 0.2 ml 的显色底物。在 37 °C、pH 8.4、底物浓度为 0.2 mmol/L 的条件下测定 405 nm 波长处的吸光度变化,以 1 min 催化一个 μmol 的底物变化所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

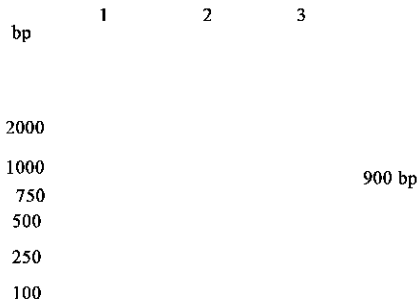
1.5.2 Aprotinin 对 GST-ST14 融合蛋白酶活性的抑制 酶活测定体系中加入 aprotinin 至终浓度为 0.1 μmol/L,空白对照不加 GST-ST14 蛋白,完全活性对照不加 aprotinin,测定 405 nm 波长处吸光度变化。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pGEX-4T2-ST14 的构建和鉴定

用设计的 PCR 引物扩增 Tca8113 细胞系的逆转录产物,得到 900 bp 左右的 PCR 产物,构建 pGEM-T easy-ST14 亚克隆质粒,将阳性克隆及 pGEX-4T2 质粒用 *Bam*H 和 *Not* 酶双酶切,构建 pGEX-4T2-ST14 表达质粒,转化到 *E. coli* BL21 中,*Bam*H 和

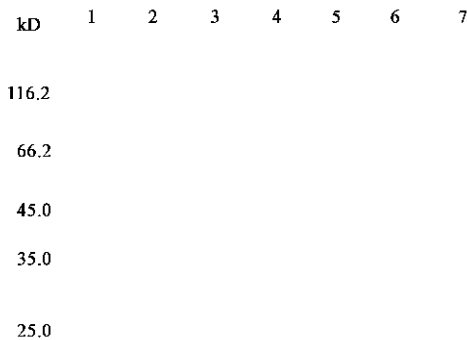
*Not* 酶双酶切鉴定观察到 900 bp 条带,结果与所选取的 *ST14* 基因 C 端片段大小一致 (Fig. 1).



**Fig. 1** Restriction enzyme digestion analysis of pGEX-4T2-*ST14*  
1: DL2000 marker; 2: pGEX-4T2-*ST14*;  
3: pGEX-4T2-*ST14* digested by *Bam*H<sup>I</sup> and *Not*I

**2.2 GST-ST14 融合蛋白的诱导表达及条件优化**

实验发现较低浓度的 IPTG 有利于提高表达量 (Fig. 2 泳道 3、6), 诱导 2 h 后表达量变化不大 (Fig. 2 泳道 3、4、5), 而将诱导温度从 37 降低到 30 对表达量影响不大, 较高的菌体浓度有利于提高表达量, 综合考虑 GST-ST14 融合蛋白在不同温度、IPTG 浓度、菌体浓度、诱导时间和溶氧量下面的表达情况, 后续实验均使用  $A_{600} = 0.8$  时的菌液 37、0.1 mmol/L IPTG 诱导 2 h 的菌液. 灰度扫描分析表明, 蛋白质表达量占细菌总蛋白 28.3% 左右.

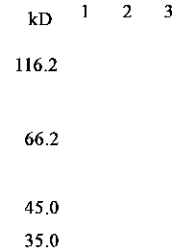


**Fig. 2** SDS-PAGE analysis of *E. coli* total proteins during protein expression  
1: Protein molecular marker; 2: BL21/pGEX-4T2-*ST14* before IPTG induction; 3, 4, 5: BL21/pGEX-4T2-*ST14* induced by 0.1 mmol/L IPTG for 2 hours, 4 hours, 6 hours, respectively; 6, 7: BL21/pGEX-4T2-*ST14* induced by 1 mmol/L IPTG for 2 hours and 4 hours

**2.3 GST-ST14 融合蛋白纯化及其方法改进**

常规 GST 亲和层析法可以有效分离得到 GST-

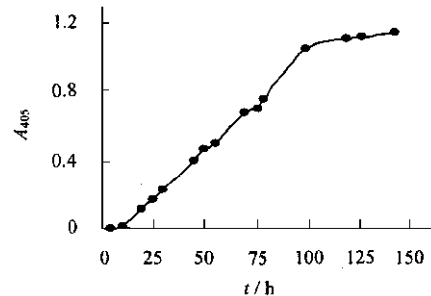
*ST14* 融合蛋白,但同时伴随一种分子量略小的蛋白质的共纯化 (Fig. 3 泳道 3), 反复调节层析条件均无法将其除去,使用离子交换层析技术也无法将两者分开,根据分子量大小及相关文献报道<sup>[7,9,10]</sup>,怀疑该共纯化蛋白为大肠杆菌中的伴侣蛋白 GroEL. 因此改进纯化方法,根据伴侣蛋白 GroEL 的特性,在样品预处理时加入 ATP 和变性蛋白孵育,同时增加缓冲液 B 冲洗柱子的步骤, GroEL 基本被清除干净,得到的纯化产物只含有 GST-ST14 蛋白 (Fig. 3 泳道 2), 灰度扫描分析纯度为 96.2% 左右.



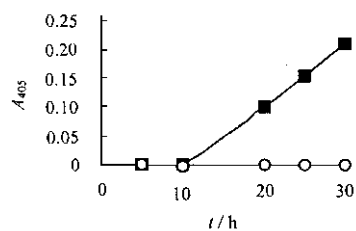
**Fig. 3** Eulution of GST-ST14 under various conditions  
1: Protein molecular weight marker; 2: Cell lysate incubated with ATP and denatured proteins before binding to GST FF;  
3: Purified with standard protocol (Pharmacia)

**2.4 产物酶活性鉴定**

经预实验确定该反应的线性范围 (如 Fig. 4 所示), 在该范围内测定 405 nm 下反应体系的吸光度变化, 计算得到 GST-ST14 融合蛋白的酶活力为 0.398 IU/L. 而浓度为 0.1 μmol/L 的胰蛋白酶抑制剂 aprotinin 能完全抑制 GST-ST14 融合蛋白的酶切活性 (如 Fig. 5 所示).



**Fig. 4** Enzymatic activity assay of GST-ST14



**Fig. 5** Effect of aprotinin on GST-ST14  
— Without aprotinin; — with aprotinin

### 3 讨论

真核生物蛋白质在原核表达系统中的大量表达往往无法形成正确的构象,而大量非天然构象蛋白质的存在则导致了细菌中伴侣蛋白的表达,伴侣蛋白的共表达提高了真核蛋白质可溶性表达,帮助真核蛋白形成正确的构象<sup>[8,11]</sup>. 无论是利用 GroEL 在体外促进包涵体蛋白复性,还是将外源基因和 GroEL 基因在原核细胞内共表达,帮助外源基因在表达过程中正确折叠,都已经得到了很多研究.

而 GroEL 在给蛋白质表达带来好处的同时也带来了共纯化的问题,非天然构象蛋白质和伴侣蛋白之间的疏水性结合很紧密,难以使用常规蛋白质分离技术将其分开<sup>[12]</sup>. 实验中我们曾使用离子交换层析技术分离 GST-ST14 蛋白和 GroEL 的复合物,结果发现只有一个洗脱峰,无法将两者分开. GroEL 与非天然构象蛋白结合时形成由 14 个亚基组成的双层 7 元环状蛋白复合体,每个亚基由 equatorial、intermediate 和 apical 三个结构域组成, GroEL 与底物的结合主要是 apical 结构域和底物蛋白的疏水性结合,而 ATP 的结合与水解则可导致底物蛋白和 GroEL 的脱离<sup>[13-15]</sup>. 根据伴侣蛋白 GroEL 的特性,已经发展了多种方法来从共纯化的 GroEL 中分离目的蛋白质. Thain 提出了用 ATP 或 ATP-GroES 冲洗亲和层析柱去除 GroEL 的方法<sup>[10]</sup>,任艳丁介绍了用 ATP-GroEL 冲洗亲和层析柱的方法<sup>[12]</sup>,这两个方法需要使用纯化的 GroES 或 GroEL,大大增加了实验成本和复杂性,而且不适合有较多 GroEL 存在的情况. 不使用 GroES 和 GroEL,仅使用 ATP 冲洗亲和层析柱在很多情况下无法有效去除 GroEL 蛋白<sup>[12]</sup>.

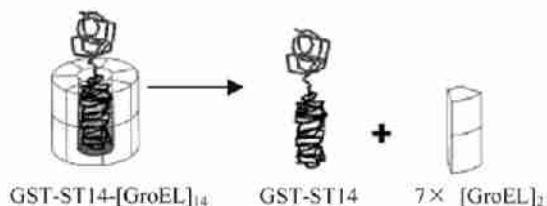


Fig. 6 Hypothetical model for the release of the GST-ST14 from GroEL.

本实验在样品的预处理中加入适量的变性蛋白和 ATP,在合适的温度和缓冲液中, GroEL 从 GST-ST14 蛋白上脱离下来转而结合到变性蛋白上,形成沉淀后被离心除去,残留部分在过柱时可被缓冲液 B 洗去. 缓冲液 B 的冲洗并非必须步骤,但是考虑到

如果在样品预处理时加入过多变性蛋白会导致样品中大量蛋白形成沉淀, GST-ST14 蛋白也随之损失,所以适当控制变性蛋白的加入量,以增加 GST-ST14 蛋白的含量,是经济有效的,残留的 GroEL 可在缓冲液 B 的作用下除去.

由于 ST14 蛋白在距 C 端 38 个和 68 个氨基酸残基处分别有一个因子 a(factor a)和凝血酶的剪切位点,因此后续实验中均使用完整的 GST-ST14 融合蛋白. 酶活性测定过程中发现该融合蛋白活性很低,通常在水浴 15 到 20 个小时后才检测到产物,并在此后数十小时内线性缓慢增长. 文献[7]中提到 ST14 蛋白可能有一个酶原激活过程,单链酶原经剪切后形成双链活性形式, GST-ST14 融合蛋白的酶活力测定过程是否也有这一过程,尚待进一步研究. Aprotinin 能完全抑制 GST-ST14 的丝氨酸蛋白酶活性,aprotinin 蛋白含有 Kunitz 结构域,与多篇文献中报道的 ST14 蛋白的抑制物一致<sup>[6,16,17]</sup>. 在纯化过程中发现该融合蛋白较易降解,怀疑和该蛋白具有丝氨酸蛋白酶活性有关,分析 ST14 蛋白 C 端片段,可以找到 25 个丝氨酸蛋白酶的酶切位点,因此存在该蛋白发生自身剪切的可能. 加入适量蛋白酶抑制剂后可以保持蛋白的稳定性,避免蛋白的降解问题,保证了纯化蛋白的完整性和酶活性.

ST14 蛋白是与肿瘤转移关系密切的一种重要的丝氨酸蛋白酶,在多种癌症的转移过程中扮演了重要角色,该蛋白质全长 855 个氨基酸残基, cDNA 全长 3 142 bp<sup>[2,3,18]</sup>,但全长基因在原核细胞中难以高效表达,且易形成包涵体,给分离纯化带来很大困难,本实验选取 ST14 基因 C 端具有丝氨酸蛋白酶催化活性的区域,成功表达得到了具有活性的融合蛋白,为下一步制备单克隆抗体,研究该蛋白质在肿瘤发生和转移中的作用以及在肿瘤组织中的分布情况等工作打下了很好的基础.

### 参考文献 (References)

- 1 Jones P A, DeClerck Y A. Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin, and collagen by metastatic human tumor cells. *Cancer Res*, 1980, **40**(9):3222 ~ 3227
- 2 Cao J, Zheng S, Zheng L, Cai X, Zhang Y, Geng L, Fang Y. A novel serine protease SNC19 associated with human colorectal cancer. *Chin Med J (Engl)*, 2001, **114**(7):726 ~ 730
- 3 Lin C Y, Anders J, Johnson M, Sang Q A, Dickson R B. Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J Biol Chem*, 1999, **274**(26):18231 ~ 18236
- 4 Satomi S, Yamasaki Y, Tsuzuki S, Hitomi Y, Iwanaga T, Fushiki T. A

- role for membrane-type serine protease (MT-SP1) in intestinal epithelial turnover. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **287**(4):995 ~ 1002
- 5 Szabo R, Wu Q, Dickson R B, Netzel-Arnett S, Antalis T M, Bugge T H. Type transmembrane serine proteases. *Thromb Haemost*, 2003, **90**(2):185 ~ 193
- 6 Friedrich R, Fuentes-Prior P, Ong E, Coombs G, Hunter M, Oehler R, Pierson D, Gonzalez R, Huber R, Bode W, Madison E L. Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *J Biol Chem*, 2002, **277**(3):2160 ~ 2168
- 7 Keresztesy Z, Hughes J, Kiss L, Hughes M A. Co-purification from *Escherichia coli* of a plant beta-glucosidase-glutathione S-transferase fusion protein and the bacterial chaperonin GroEL. *Biochem J*, 1996, **314**:41 ~ 47
- 8 杨运桂,童芹,郑卫东,钱友存,杨胜利,龚毅. 分子伴侣过量表达对蛋白质分泌及可溶性的影响. 中国生物化学与分子生物学报 (Yang Yun-gui, Tong Qin, Zheng Wei-dong, Qian You-cun, Yang Sheng-li, Gong Yi. The effect of over-expression of chaperones on the secretion and the solubility of proteins. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2000, **16**(3):382 ~ 387
- 9 Rohman M, Harrison-Lavoie K J. Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins. *Protein Expr Purif*, 2000, **20**(1):45 ~ 47
- 10 Thain A, Gaston K, Jenkins O, Clarke A R. A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL. *Trends Genet*, 1996, **12**(6):209-210
- 11 Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem*, 1995, **270**(43):25328 ~ 25331
- 12 任艳丁. 从共纯化 GroEL 中分离 GST 融合蛋白的方法. 国外医学遗传学分册 (Ren Yan-ding. Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins. *Foreign Med Sci: Genetics*), 1998, **21**(2):102
- 13 Viitanen P V, Gatenby A A, Lorimer G H. Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Protein Sci*, 1992, **1**(3):363 ~ 369
- 14 刘炎. 分子伴侣功能的研究进展. 国外医学遗传学分册 (Liu Yan. Research advance on the chaperone's function. *Foreign Med Sci: Genetics*), 2002, **25**(2):70 ~ 73
- 15 Rye H S, Burston S G, Fenton W A, Beechem J M, Xu Z, Sigler P B, Horwich A L. Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature*, 1997, **388**(6644):792 ~ 798
- 16 Oberst M, Anders J, Xie B, Singh B, Ossandon M, Johnson M, Dickson R B, Lin C Y. Matriptase and HAF1 are expressed by normal and malignant epithelial cells *in vitro and in vivo*. *Am J Pathol*, 2001, **158**(4):1301 ~ 1311
- 17 Oberst M D, Johnson M D, Dickson R B, Lin C Y, Singh B, Stewart M, Williams A, al-Nafussi A, Smyth J F, Gabra H, Sellar G C. Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAF1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res*, 2002, **8**(4):1101 ~ 1107
- 18 Underwood L J, Tanimoto H, Wang Y, Shigemasa K, Parmley T H, O'Brien T J. Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 1999, **59**(17):4435 ~ 4439