

文章编号: 1673-1689(2011)03-0475-06

# 人体中可溶性 VEGFR-2 酪氨酸激酶在大肠杆菌中的表达、纯化及活性测定

徐娟<sup>1</sup>, 王柯<sup>2</sup>, 杨润琳<sup>2</sup>, 黄彪<sup>2</sup>, 段作营<sup>1</sup>, 李华钟\*<sup>1</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省原子医学研究所 卫生部核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063)

**摘要:** 针对人体血管内皮生长因子受体 2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 受体型酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase, RTK) 进行体外表达, 并对表达和纯化条件进行优化。构建表达 VEGFR-2 酪氨酸激酶重组大肠杆菌, 通过研究不同诱导温度、IPTG 浓度、诱导时间和超声条件等对蛋白表达的影响, 采用 Ni-NTA 亲和层析法、Western Blot 法 ELISA 方法对重组蛋白进行纯化、鉴定和活性测定。成功地将 1 000 bp 左右的 VEGFR-2 酪氨酸激酶 DNA 片段插入载体 pQE30 中, 在优化条件下重组蛋白较好地可溶性表达。SDS-PAGE 表明重组蛋白相对分子质量约为 36 000, 与预期一致, Western Blot 分析表明它能与抗 Flk-1 和抗 His 抗体特异反应, ELISA 检测结果表明重组蛋白具有利用 ATP 催化底物磷酸化的激酶活性。通过重组 DNA 技术使人体 VEGFR-2 酪氨酸激酶在大肠杆菌得到可溶性表达, 纯化重组蛋白具有较高的活性。

**关键词:** 可溶性 VEGFR-2 激酶; 表达; 纯化; 活性测定

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

## Purification and Identification of the Soluble VEGFR-2 Kinases Expressed in *Escherichia coli*

XU Juan<sup>1</sup>, WANG Ke<sup>2</sup>, YANG Run-lin<sup>2</sup>, HUANG Biao<sup>2</sup>,  
DUAN Zu-ying<sup>1</sup>, LI Hua-zhong\*<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122; 2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Wuxi 214063)

**Abstract:** To improve the soluble expression of VEGFR-2 tyrosine kinase in *Escherichia coli* for further study on its biological activity. Different concentrations of IPTG, inducing times and temperatures are used to optimize the expression condition for the soluble recombinant VEGFR-2 tyrosine kinase in *Escherichia coli*. The recombinant protein is purified by affinity chromatography. Western Blot was used to identify this protein. The recombinant plasmid pQE30-TK encoding VEGFR-2 tyrosine kinase was constructed and soluble VEGFR-2 tyrosine kinase was expressed. SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of VEGFR-2 tyrosine kinase was about 36 000 as expected and Western blot analysis indicated that both antibodies for

收稿日期: 2010-05-22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2008530)。

\* 通信作者: 李华钟 (1958-), 男, 山东龙口人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物制药研究。

Email: hzhli@jiangnan.edu.cn

anti-Flk-1 and anti-His could react against the purified protein. Conclusion: The soluble human VEGFR-2 tyrosine kinase was expressed in *Escherichia coli* by the recombinant technique. The purified protein showed biological activity.

**Key words:** soluble VEGFR-2 tyrosine kinase, expression, purification, biological activity

人体血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为直接作用于人体血管内皮细胞, 是关键的血管内皮细胞增殖因子<sup>[1]</sup>。VEGF的这些生物学功能和效应是通过其特异性受体介导的。VEGF受体家族主要包括3个成员: VEGFR-1又称为Flt-1(Fms-like tyrosyl kinase-1)<sup>[2]</sup>、VEGFR-2又称为Flk-1/KDR(Fetal liver kinase-1/Kinase insert Domain-containing Receptor)<sup>[1]</sup>、VEGFR-3, 它们都属于受体酪氨酸激酶(RTK, receptor tyrosyl kinase)家族。其中研究表明VEGFR-2是VEGF促进血管内皮细胞分裂增殖, 提高血管通透性的主要调节因子, 并且在VEGF的信号传导中起主导作用, 对于肿瘤的发生, 发展至关重要<sup>[1-2]</sup>。VEGFR-2由7个类Ig结构域组成的胞外区; 一个跨膜结构区和胞质内酪氨酸激酶结构区组成<sup>[3]</sup>。VEGFR-2的胞外段是与VEGF结合的区域, 两者结合后VEGFR-2构象发生变化, 导致受体二聚化, 其胞内段酪氨酸位点发生自磷酸化, 激活下游的信号传导通路<sup>[4]</sup>。虽然VEGFR-2与配体的亲和力较VEGFR-1低, 但具有很强的酪氨酸激酶活性中心<sup>[5]</sup>, 胞内段6个酪氨酸残基可发生自磷酸化<sup>[6]</sup>, 位于活性中心的1054和1059残基自磷酸化可增强激酶活性<sup>[7]</sup>。可见受体胞内域的酪氨酸激酶在VEGFR-2的信号转导途径中起着关键的作用。新生血管的形成对恶性肿瘤的生长是必不可少的因素, 因此以VEGFR-2 TK为靶点进行药物设计和筛选已成为肿瘤治疗的有效途径之一。

目前国内尚没有VEGFR-2酪氨酸激酶的可溶性表达, 多是通过包涵体的变性、复性获得, 这样在一定程度上降低了酶的活性。因此本实验旨在在大肠杆菌表达系统中表达可溶性人VEGFR-2酪氨酸激酶, 对诱导条件和纯化条件进行初步优化, 促进重组蛋白可溶性表达, 并对其功能进行初步鉴定, 为进一步以其为靶点构建药物筛选模型, 进行酶抑制剂药物筛选, 获得抗肿瘤新药奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 *E. coli* M15表达宿主菌、表达载体pQE30由江苏省原子医学研究所保存。

1.1.2 试剂 质粒DNA小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自上海捷瑞; TRIzol试剂购自Invitrogen公司; 各种限制性内切酶、DNA连接酶购自TaKaRa公司; 小鼠抗人His单克隆抗体购自中杉金桥; 羊抗鼠IgG-HRP二抗购自康成生物有限公司; 兔抗人Flk-1多克隆抗体, 酪氨酸磷酸化抗体PY99购自Santa Cruz公司; 羊抗兔IgG-HRP二抗购自上海申能博彩; N<sup>+</sup>NTA亲和树脂购自GE Healthcare公司; ECL发光试剂盒购自Santa Cruz公司; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 重组蛋白基因的获得和表达载体构建 采用Trizol试剂一步抽提人甲状腺癌组织总RNA, 以Oligo(dT)15作为引物进行反转录。参考已报道的VEGFR-2酪氨酸激酶cDNA序列(GeneBank, NM-002253), 采用Primer Primer5.0程序设计引物, 其中上游引物序列为5'-CGC GGATCC CTG AAG CTA GGT AAG CCT CTT GG-3'; 位于第2502位碱基, 5'端添加BamHI位点; 下游引物序列为5'-ACGCGTCGAC TTA ATT TCC CAA ATG TTC CAC CAAG-3', 位于第3846位碱基, 5'端添加SalI位点。PCR循环条件: 以反转录获得的cDNA为模板, 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共进行35个循环; 最后72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒纯化, 将表达载体pQE30和目的基因片段经BamHI和SalI双酶切, 回收纯化后连接, 转化感受态宿主菌M15, 在含有氨苄青霉素和卡那霉素的平板上挑取单菌落筛选阳性克隆, 酶切鉴定并进行测序分析。构建的重组质粒称为pQE30-TK。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达 已构建好的表达菌株接种于含氨苄青霉素、卡那霉素的新鲜LB培养液中, 37℃培养过夜, 次日以体积比1:100比例接种入4 mL新鲜LB培养液中扩大, 分别以不同时间

(0、1、3、5、7、9 h)、不同温度(20、22、25、28、37 °C)、不同终浓度的 IPTG(0.1、0.25、0.5、1 mmol/L) 诱导表达, 12 000 r/min, 离心 2 min 收集全部菌体, 等量细菌裂解液重悬, 冰上超声破碎。12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清及沉淀, 加入 6 倍体积上样缓冲液, 混匀后沸水煮 5 min, 取相同体积样品进行蛋白电泳, 通过 Western Blot 杂交 His 标签检测目的基因的可溶性表达情况。

**1.2.3 重组蛋白的超声** 表达菌株在最佳诱导条件下诱导表达, 离心收菌, 分别以不同超声时间(10、15、20、30 min)、不同超声功率(100、300、500、700 W) 超声破碎。12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清及沉淀。通过 Western Blot 杂交 His 标签检测目的基因的可溶性表达情况。

**1.2.4 重组蛋白的纯化** 按前文方法分别在培养基中接种表达菌种, 在最佳诱导条件下诱导表达后, 用 1 × PN(20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0) 磷酸盐缓冲液悬浮细菌, 加入 0.1 mol/L PMSF, 冰浴搅拌。超声波破碎后, 取上清液。同时取经结合缓冲液(20 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2.5 mol/L NaCl, pH 7.4) 预平衡的 Ni-NTA 亲和层析柱, 将上述裂解上清液过柱, 依次经过 80 mmol/L ~ 300 mmol/L 咪唑缓冲液连续除杂, 1 mL/管, 分管收集除杂液。最后 500 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱, 控制流速为 1 mL/min, 分管收集洗脱液。洗脱液再经 PD-10 柱缓冲液置换成 PBS(0.14 mol/L NaCl, 11 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。SDS-PAGE, 参见《分子克隆实验指南》<sup>[8]</sup>, 12 g/dL 分离胶和 5 g/dL 浓缩胶, 电泳完毕后进行考马斯亮蓝 R-250 染色, 并用凝胶成像系统成像。

**1.2.5 重组蛋白的鉴定** 样品经 SDS-PAGE 电泳后, 湿法电转移到 PVDF 膜上, 丽春红染色确定标准蛋白分子量条带位置, 然后用含 5 g/dL 脱脂牛奶的 TBS 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 140 mmol/L NaCl, pH 7.5) 室温封闭 1 h, TBST(TBS, 体积分数 0.1% Tween-20) 缓冲液洗涤 3 次, 弃溶液后分别加入兔抗人 Flk-1 多克隆抗体(用含 1.25 g/dL 脱脂牛奶的 TBS 体积比为 1:500 稀释)、小鼠抗人 His 单克隆抗体(用含 1.25 g/dL 脱脂牛奶的 TBST 体积比为 1:1000 稀释), 4 °C 摇床孵育过夜; 次日用 TBST 洗膜后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 IgG(用含 1.25 g/dL 脱脂牛奶的 TBST 体积比为 1:3000(V:V) 稀释、羊抗鼠二抗 IgG(用含

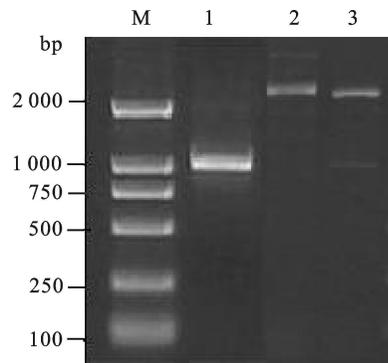
1.25 g/dL 脱脂牛奶的 TBST 体积比为 1:5000 稀释), 室温下缓摇 1 h, TBST 洗膜, 最后 ECL 显影, 洗片。

**1.2.6 重组蛋白的活性检测** 采用 ELISA 方法<sup>[9]</sup>, 底物 polyE4Y 在 TBS(20 mmol/L Tris-HCl, 140 mmol/L NaCl, pH 7.5) 中稀释到 15 μg/mL, 100 μL/孔包被 96 孔板, 4 °C 过夜。次日, 用 TBST(TBS, 体积分数 0.1% Tween-20) 洗板, 在 100 μL 反应液(50 mmol/L HEPES, 12.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L MnCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25 μmol/L ATP) 中加入不同浓度 VEGFR-2 酪氨酸激酶 37 °C 温育 1 h。反应结束后, TBST 洗板 3 次, 然后加入小鼠磷酸化酪氨酸的单克隆抗体 PY99 体积比为 1:1000, 稀释在 TBST 中) 100 μL/孔室温温育 1 h, TBST 洗板 3 次; 接着加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(H+L) 多克隆抗体(1:1000(V:V), 稀释在 TBST 中) 室温温育 1 h, TBST 洗板 6 次; 加入 TMB 底物室温孵育 5~15 min, 加入终止液后, 立即用酶标仪读出 450 nm 处 OD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组蛋白表达载体构建和鉴定

琼脂糖凝胶电泳证实 PCR 扩增得到约 1 000 bp 特异性条带, 片段大小与理论预期值一致。从转化子中提取重组质粒 pQE30-TK, 采用 BamHI+Sall 双酶切, 出现约为 3.4 kb 和 1 000 bp 2 条特异性条带, 前者与 pQE30 大小一致, 后者与插入片段大小一致。经测序与报道的基因序列完全一致(GenBank Accession No. NM-002253)。说明 VEGFR-2 酪氨酸激酶基因片段成功插入 pQE30 载体中(图 1)。



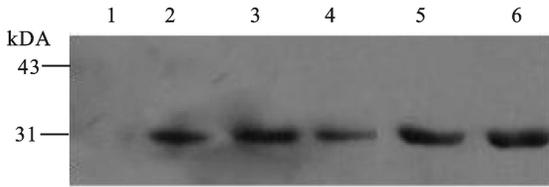
M: DNA 标准分子量; 1. PCR 产物; 2. pQE30-TK: 未酶切的重组质粒; 3. pQE30-TK: 经酶切的重组质粒

图 1 重组质粒 pQE30-TK 酶切分析

Fig. 1 Restrictive analysis of recombinant plasmid pQE30-TK

## 2.2 重组蛋白诱导表达和诱导条件优化

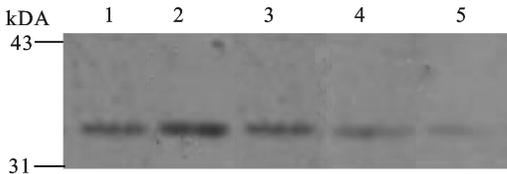
如图2所示,加入IPTG启动诱导后,有His标记的目的蛋白开始表达,并随诱导时间的增加,上清液中可溶性重组蛋白表达量均有增加,但5h时由于未知原因表达量降低,重复实验均出现该情况。分别采用20、22、25、28、37℃不同温度诱导,22℃诱导上清液中融合蛋白表达比其它温度明显增加(见图3)。在22℃条件下随着IPTG浓度的增加,诱导上清液中融合蛋白表达量相差不大,0.5 mmol/L较其它浓度相对高些(见图4)。因此,选择最适诱导条件为诱导温度22℃,IPTG浓度0.5 mmol/L,诱导时间3h。



1~6: 可溶性蛋白经0、1、3、5、7、9 h诱导表达情况

图2 诱导时间对可溶性 VEGFR-2 酪氨酸激酶表达的影响

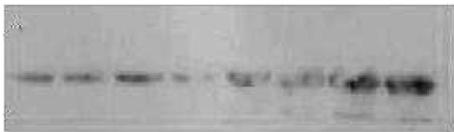
Fig. 2 Effect of induction time on the soluble VEGFR-2 tyrosine kinase expression



1~5: 可溶性蛋白分别在20、22、25、28、37℃

图3 诱导温度对可溶性 VEGFR-2 酪氨酸激酶表达的影响

Fig. 3 Effect of temperature VEGFR-2 tyrosine kinase expression



1~4: IPTG 终浓度为0.1、0.25、0.5、1 mmol/L时重组蛋白可溶表达;5~8: IPTG 终浓度为0.1、0.25、0.5、1 mmol/L时重组蛋白包涵体表达

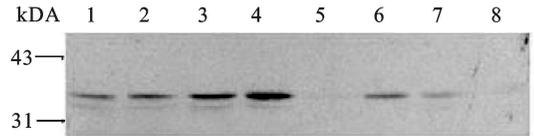
图4 IPTG 浓度对可溶性 VEGFR-2 酪氨酸激酶表达的影响

Fig. 4 Effect of IPTG on the soluble VEGFR-2 tyrosine kinase expression

## 2.3 超声条件优化

将经细菌裂解液重悬的菌液分别超声10、15、20、30、12 000 r/min离心10 min, Western Blot检测不同超声时间所获上清液中可溶性融合蛋白表达情况。随着超声时间的延长,可溶性蛋白表达量

升高,固定超声时间30 min,分别采用不同的超声功率(100、300、500、700 W),结果显示,300 W时重组蛋白获得良好的可溶性表达(见图5)。因此,选择最适超声条件为300 W,30 min。



1~4: 超声时间分别为10、15、20、30 min时重组蛋白的可溶性表达;5~8: 超声功率分别为100、300、500、700 W时重组蛋白的可溶性表达

图5 超声条件对可溶性 VEGFR-2 酪氨酸激酶的影响  
Fig. 5 Effect of sonication on the soluble VEGFR-2 tyrosine kinase protein

## 2.4 重组蛋白纯化

根据上述优化的诱导条件,表达菌株在温度为22℃,IPTG浓度为0.5 mmol/L条件下诱导3h,300 W超声30 min,上清挂N+NTA柱后用梯度浓度咪唑缓冲液除杂,通过SDS-PAGE显示,200 mmol/L咪唑缓冲液已有目的蛋白洗下,但仍有大量杂蛋白,300 mmol/L咪唑缓冲液除杂效果较好,同时500 mmol/L咪唑缓冲液洗脱的重组蛋白浓度与纯度(91.5%)满足后续实验需求,并且洗脱的主要蛋白条带相对分子质量约36 000,与VEGFR-2酪氨酸激酶的预计相对分子质量大小一致(见图6)。



M: 标准蛋白分子量;1: 未纯化的上清原液;2~15: 分别用不同浓度的咪唑溶液将可溶性重组蛋白洗脱(4~6: 80 mmol/L; 5~7: 100 mmol/L; 8~10: 200 mmol/L; 11~13: 300 mmol/L; 14~15: 500 mmol/L)

图6 重组蛋白纯化的SDS-PAGE分析

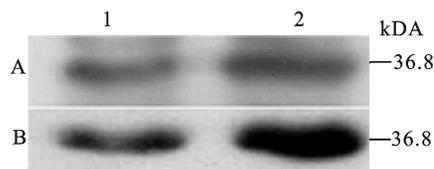
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein

## 2.5 Western Blot 鉴定

将纯化蛋白分别用抗His抗体与抗Flk-1抗体进行Western Blot,结果如图7显示,融合蛋白不仅能与小鼠抗人His抗体反应,同时也能与兔抗人Flk-1抗体反应,说明该蛋白为VEGFR-2酪氨酸激酶。

## 2.6 重组蛋白活性检测

根据前述方法对重组VEGFR-2酪氨酸激酶进行活性检测,图8显示不同浓度的VEGFR-2酪氨酸



A: 1~2: 经 Flk-1 抗体鉴定结果; B: 1~2: 经 His 抗体鉴定结果

图7 纯化蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 7 Western blot analysis of VEGFR-2 tyrosine kinase protein

酸激酶在 ATP 存在的条件下, 其活性与酶浓度呈剂量效应, 当 VEGFR-2 激酶量达到 100 ng/孔时激酶活性最高。即表达的重组 VEGFR-2 酪氨酸激酶具有将底物蛋白的酪氨酸残基磷酸化的生物学活性。

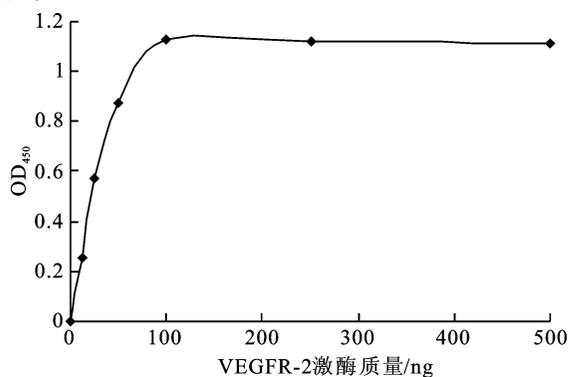


图8 不同量重组 VEGFR-2 酪氨酸激酶的活性测定

Fig. 8 Biological activity of different concentration of the VEGFR-2 tyrosine kinase protein

### 3 讨论

大量研究表明 VEGF 及其受体在血管形成 (Angiogenesis) 中起重要作用, 其中 VEGFR-2 是主要的信号传导者, 通过与 VEGF 结合从而激活磷酸化级联反应。VEGFR-2 TK 被认为是许多疾病特别是癌症治疗的潜在靶点, 因此 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂可能成为研究治疗肿瘤新药的有效途径之一。

目前国内外研究者主要采用真核细胞特别是 SF9 昆虫细胞表达 VEGFR-2 的催化区域<sup>[9-11]</sup>, 和真核系统相比较, 其在大肠杆菌中表达较方便易行, 表达量高且表达产物分离纯化相对简单, 但是, 在实际工作中, 有些外源基因不能自发折叠卷曲有一定空间结构的特定功能的蛋白质, 而是以一种不

溶性的沉淀即包涵体的形式存在于细胞内。外源基因在大肠杆菌中的高效表达受很多因素的影响, 如原核表达质粒, 诱导时间和温度, 诱导前菌的生长状态, 诱导剂的使用浓度等<sup>[12]</sup>。

诱导温度对蛋白表达有重要影响, 37 °C 下诱导常常会使一些蛋白累积形成包涵体, 而在低温下诱导则产生较多可溶性的蛋白。本实验中, 22 °C 诱导, 上清液中融合蛋白表达量较高, 对优化蛋白表达体系有重要作用, 而其他温度上清液中蛋白表达较少。

IPTG 是一种有效的乳糖操纵子诱导剂, 可与阻遏物结合促进基因的表达。随着 IPTG 浓度的升高, 融合蛋白的表达量也逐渐增加, 但兼顾试剂成本, 应选择最佳的 IPTG 浓度, 故以 0.5 mmol/L 为最佳 IPTG 浓度。同时研究显示, IPTG 诱导 VEGFR-2 激酶表达的最适宜时间为 3 h, 诱导时间过短会影响蛋白的积累量, 过长也并不能使融合蛋白的表达量明显增加。

该菌种选用表达载体为 pQE30, 具有 6 个 His 标签结构, 每个 His 含有一个咪唑基团, 这个结构带有很多额外电子, 对于带正电的化学物质有静电引力。而 Ni-NTA 层析柱正是利用这一原理, 使目的蛋白被结合, 通过使用不同梯度的洗脱液将杂质洗下, 但洗脱液浓度过低则不能把杂质去除彻底, 影响后续实验, 但浓度过高会将目的蛋白洗下, 造成损失, 影响回收率, 因此本研究中选择除杂的最适咪唑缓冲液浓度为 300 mmol/L, 洗脱的咪唑缓冲液浓度为 500 mmol/L。

研究中采用了 polyE4Y 二肽作为反应底物, 尽管它是一种合成肽, 但重组 VEGFR-2 对其磷酸化效果好, 显示了重组 VEGFR-2 的酪氨酸激酶活性, 与文献中检测结果相比, 本研究中 VEGFR-2 激酶活性较高, 主要原因可能是因为文献中 VEGFR-2 激酶为包涵体形式存在, 经过变性、复性后活性降低, 而本研究中 VEGFR-2 激酶表达为可溶性的, 没有经过变性、复性等处理, 所以保持较好的酶活。

本研究对 VEGFR-2 酪氨酸激酶段进行原核表达, 对其诱导表达及超声条件进行初步优化, 获得了良好的可溶性表达, 并进行纯化, 确定其抗原性和特异性, 激酶活性较高, 为进一步研究该蛋白功能, 建立以此为靶点的高通量药物筛选模型奠定了基础。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor ( VEGF) signaling during tumor progression[ J], **Crit Rev Oncol Hematol**, 2007, 62 (3) 179- 213.
- [ 2 ] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[ J]. **Exp Cell Res**, 2006, 312( 5) : 549- 560.
- [ 3 ] Roskoski R Jr, VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation[ J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2008, 375( 3) : 287- 91.
- [ 4 ] 陈川. 以 VEGF/VEGFR 为靶点的抗肿瘤药物的研究进展[ J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14( 3) : 291- 300.  
CHEN Chuan. Development of anti-tumor drugs targeting VEGF/ VEGFR: a progress[ J]. **Chinese Journal of Cancer Bi-therapy**, 2007, 14(3): 191- 300. (in Chinses)
- [ 5 ] Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor[ J]. **J. Biol. Chem** 1994, 269( 43) : 26988- 26995.
- [ 6 ] Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule T SAd in tumor angiogenesis[ J], **EMBO J**. 2005, 24(13) : 2342- 2353.
- [ 7 ] Kendall RL, Rutledge RZ, Mao X, et al. Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues[ J]. **J Biol Chem** 1999, 274 ( 10) : 6453- 6460.
- [ 8 ] F. 奥斯伯, 等著, 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[ M]. 北京: 北京科学出版社, 1998.
- [ 9 ] ZHONG L, GUO XN, ZHANG XH. Expression and purification of the catalytic domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2 for inhibitor screening[ J]. **Biochim Biophys Acta**. 2005, 1722( 3) : 254- 61.
- [ 10 ] Parast CV, Mroczkoski B, Pinko C. Characterization and kinetic mechanism of catalytic domain of human vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase ( VEGFR2 TK), a key enzyme in angiogenesis[ J]. **Biochemistry**, 1998, 37 (47) : 16788- 16801.
- [ 11 ] Zhao G, Robert BP, Jonathan MY. Characterization and development of a peptide substrate-based phosphate transfer assay for the human vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase. **Anal Biochem**. 2007, 360( 2) : 196- 206.
- [ 12 ] 王洪斌, 董丹, 许冰等. 蓖麻毒素 A 链基因的克隆表达、纯化及其活性[ J]. 食品与生物技术学报. 2010, 29( 1) : 145- 149.  
WANG HB, DONG dan, XU bing, et al. Expresson, purification and characterization of Ricin A from *E. coli*[ J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**. 2010, 29(1): 145- 149. (in Chinses)