文章编号:1000-5404(2005)11-1109-04

论著

人层粘连蛋白 α4 链 LG3-4 组件的克隆和表达

戴旭芳[1],连继勤[2],张玉静[3],胡仲明[3] ([1]重庆师范大学特殊教育学院,重庆 400047;[2]第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038;[3]吉林大学和平校区生物化学与分子生物学教研室,长春 130062)

提 要:目的 利用基因工程技术获得重组人层粘连蛋白 α4 链 LG3-4 组件(human laminin Alpha4 LG3-4 Module, hLNα4LG3-4)蛋白并检测其抗原性。**方法** 采用 RT-PCR 方法从人胎盘组织扩增 hLNα4LG3-4 的 cDNA 片段,T/A 克隆法将其插入 pMD-18T 载体进行测序。亚克隆法构建原核表达载体 pET-28a-LG3-4,在 BL21(DE3)中表达 hLNα4LG3-4 融合蛋白。融合蛋白经 SDS-PAGE 鉴定、Ni-NTA 亲和层析纯化及 Western 印迹分析。**结果** 成功获得 hLNα4LG3-4 cDNA 片段,与 GenBank 中序列同源性为 98%,突变碱基不改变蛋白的氨基酸序列。12% SDS-PAGE 电泳检测显示:经 IPTG 诱导后 BL21(DE3)/pET28a-LG3-4 细菌裂解液总蛋白中出现一条分子量为 44×10^3 的新蛋白带,纯化后目的蛋白纯度达 95% 以上,且 Western 印迹可特异地检测到目的蛋白所对应转移带。**结论** 成功表达和纯化了 hLNα4LG3-4 蛋白,从而为研究 LG 组件在疾病发生过程中的作用及其功能位点打下了基础。

关键词:hLNα4LG3-4;克隆;表达
中图法分类号:Q513.2;Q785;Q786 **文献标识码**:A

Cloning and expression of human laminin alpha4 LG3-4 module

DAI Xu-fang[1], LIAN Ji-qin[2], ZHANG Yu-jing[3], HU Zhong-ming[3] ([1]Special Education College of Chongqing Normal University, Chongqing 400047, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Heping District of Jilin University, Changchun, 130062, China)

Abstract: Objective To express and detect the antigenicity of human laminin alpha4 LG3-4 module (hLNα4LG3-4) protein by gene engineering techniques. **Methods** The cDNA encoding hLNα4LG3-4 was amplified by RT-PCR from human placenta, then inserted into pMD-18T vector by T/A cloning and sequenced. Prokaryotic expression vector pET-28a-LG3-4 was constructed by recombinant DNA technique. The hLNα4LG3-4 fusion protein expressed in BL21(DE3)/pET system was identified by SDS-PAGE, purified by Ni-NTA resin, and assayed by Western blotting. **Results** The cDNA fragment of hLNα4LG3-4 was cloned successfully. While BL21 (DE3)/pET28a-LG3-4 bacterium was induced with IPTG, a new protein band with a relative molecular weight of 44 000 was shown on SDS-PAGE profile. hLNα4LG3-4 fusion protein of high purity (95%) was obtained and specific protein band was detected by Western blotting. **Conclusion** The hLNα4LG3-4 fusion protein was successfully expressed.

Key words: hLNα4LG3-4; cloning; expression

层粘连蛋白(laminin, LN)是广泛存在于多种动物及人类细胞基底膜基质中的一类大分子糖蛋白,是由 α、β 和 γ 链组成的异三聚体。目前至少已发现了 5 种 α 链(α1-α5)、3 种 β 链(β1-β3)和 3 种 γ 链(γ1-γ3),共有 14 种 LN 分子得到鉴定。α4 链是构成 LN-8 和 LN-9 的一种多肽链,主要存在于血管内皮、外周神经的束膜及发育中肌纤维周围的基底膜中[1]。研究表明层粘连蛋白 α4 链在胚胎的发育、微血管的形成和创伤愈合中发挥着积极作用[2],Ljubimova 等[3]也发现层粘连蛋白 α4 链在恶性胶质瘤和星形细胞瘤中过度表达,可能对肿瘤血管的形成和肿瘤的发展起着重要作用。而层粘连蛋白 α4 链这些作用的发挥大多是通过它 C 末端 G 结构域中的 LG 组件介导完成的,故近年来人们比较集中于对 α4 链 G 结构域的研究。目前,对层粘连蛋白 α4 链的研究主要是针对鼠 LAMA4 基因进行,如 Talts 等[4]进行了小鼠 α4 链 LG 组件在哺乳动物细胞中表达及其与受体结合的研究;Okazaki 等[5]用重组蛋白和合成肽片段筛选出鼠 α4 链 G 域的 4 个活性位点,并发现

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400559)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400559)
作者简介:戴旭芳(1974-),女,山西省长治市人,硕士,助教。电话:(023)65363468
通讯作者:连继勤,电话:(023)68775193,E-mail:lianjiqin@sina.com
收稿日期:2004-12-21;**修回日期**:2005-01-20

LG组件具有促进细胞粘附的功能；Gonzalez等[6]发现，在血管基底膜的α4链通过G域中LG组件与α5β3、α3β1和α6β1整合素相互作用，相应抗体可抑制鼠血管的形成等，而有关人LNα4链LG组件的深入研究报道还很少。因此，深入探讨人LNα4链LG组件的结构与功能以及针对其功能位点进行药物设计，可望为抑制肿瘤细胞的转移及新血管生成提供新的方案。基于此目的，本研究以人LNα4链的LG3-4组件为研究对象，旨在表达具有生物活性的hLNα4LG3-4蛋白，为其相关作用位点及后期研究提供目标蛋白，并对临床上相关疾病的检测、诊断和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织材料 新鲜的人胎盘组织(自然分娩后)，取自解放军208医院妇产科。

1.1.2 菌株与质粒 JM109菌株为本室保存，pMD-18T克隆载体为TAKARA公司产品，原核表达载体pET28a及其宿主菌BL21(DE3)购自Novagen公司。

1.1.3 分子生物学试剂 Trizol试剂购自GIBCO公司；限制性内切酶*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ及T4 DNA连接酶、*Ex Taq*酶为TaKaRa公司产品，AMV反转录酶为Promega公司产品、质粒纯化试剂盒及琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒为北京鼎国生物公司产品，金属螯合亲和层析介质(Ni-NTA)购自德国QIAGEN公司。其它试剂均购自长春宝泰克公司。

1.1.4 抗体 兔抗人hLNα4LG4-5多克隆抗体由本课题组制备；HRP标记的山羊抗兔IgG为华美公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 根据GenBank发表的人层粘连蛋白α4链cDNA序列，分别设计hLNα4LG3-4的上、下游引物GTCAGAATTCCCAGAAGACTCACTTATATC和GTCACTCGAGCTAGCAAGGGGTCACACTGAATG。在引物的5′端分别添加*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ的酶切位点以及保护碱基GTCA，在下游引物中加入终止密码子互补序列CTA。扩增片段长度为1 239 bp。

1.2.2 hLNα4LG3-4 cDNA的克隆与测序 取新鲜人胎盘组织，用Trizol试剂提取法提取总RNA；以提取总RNA为模板，以Oligo-dT为引物进行RT反应；将RT反应产物做模板，用合成的特异性引物进行PCR反应，条件为94 ℃变性2 min，94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min，共35个循环；最后72 ℃延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行鉴定。将PCR产物纯化、克隆至pMD-18T载体中，TA克隆按试剂盒说明书进行操作。提取阳性克隆质粒，用*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ进行双酶切鉴定。初步鉴定正确的质粒送上海基康公司进行序列测定。测序结果用DNASIS软件与GenBank中序列进行同源性比较分析。

1.2.3 hLNα4LG3-4原核表达载体的构建及表达 按常规的分子生物学实验方法将hLNα4LG1 cDNA片段定向亚克隆至原核表达载体pET-28a中，对重组质粒进行*Eco*RⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切及PCR鉴定后转入BL21(DE3)菌株中进行诱导表达。诱导时，在接种2 h后按终浓度1 mmol/L加入IPTG，继续培养4 h。取诱导菌1 ml，离心收集菌体，加100 μl 1倍的SDS加样缓冲液，振荡混匀后100 ℃加热5～10 min。用12%的SDS-PAGE凝胶电泳鉴定表达结果。

1.2.4 Western印迹 将经过SDS-PAGE检测后的诱导表达菌，进行样品处理和SDS-PAGE电泳后，将表达产物电转移至硝酸纤维素膜(在4 ℃冷室中以恒定电流60 mA电转移过夜)，经封闭过夜后，先后与一抗(1∶200稀释的兔LG4-5多克隆抗体)、二抗(1∶1 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG)进行反应(分别在室温摇动反应2 h，期间洗涤3次)，最后用二氨基联苯胺(DAB)底物反应液显色，显色后的NC膜进行拍照分析。

1.2.5 蛋白纯化 用Ni^{2+}亲和层析柱对目的蛋白进行纯化。纯化方法按Qiagen公司Ni-NTA使用说明书进行。12% SDS-PAGE电泳确定纯化效果。对纯化蛋白采取逐步降低尿素浓度的方法透析除去尿素，使变性蛋白在此过程中自然复性，得到纯化的人LNα4LG3-4融合蛋白。

2 结果

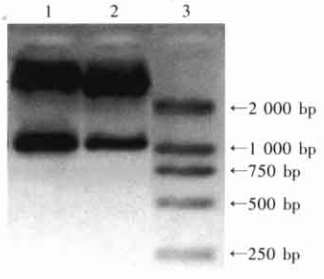
2.1 hLNα4LG3-4基因的克隆

以人胎盘组织的总RNA为模板，经RT-PCR扩增出大小为1 239 bp的hLNα4LG3-4 cDNA片段，大小与预期一致。

测序分析：将hLNα4LG3-4 cDNA片段连入pMD18-T载体中，用通用引物M13进行测序，将测序结果与GenBank中人LNα4序列用DNASIS软件进行同源性比较，结果证明：hLNα4LG3-4基因大小为1 239 bp，与LN4的同源性为99.8%，共有2处发生了突变，分别为1 029位的T变为C和1 209位的T变为C，但编码氨基酸并没有发生改变，仍为天冬氨酸(Asp)与丝氨酸(Ser)，表明该克隆可用于后续的表达研究。

2.2 原核表达载体的构建及鉴定

采用亚克隆的方法构建hLNα4LG3-4基因的原核表达载体pET-28a-LG34，重组阳性克隆经*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ双酶切后产生1 239 bp大小的片段(图1)，表明载体构建成功。



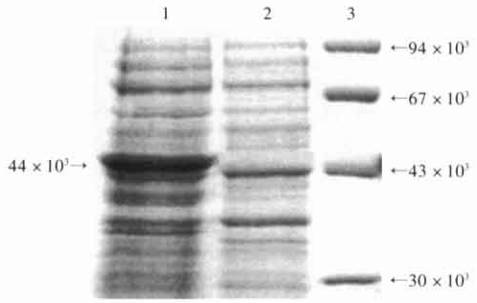
1,2：pET-28a-LG34/*Eco*RⅠ + *Xho*Ⅰ；3：DL2000 marker

图1 重组体pET-28a-LG34的酶切鉴定

Fig 1 Identification of pET-28a-LG34 recombinant

2.3 hLNα4LG3-4的诱导表达

将构建好的原核表达载体pET-28a-LG34转入致敏的BL21(DE3)大肠杆菌中进行诱导表达，12% SDS-PAGE电泳结果(图2)显示清晰的表达蛋白带，大小与理论分子量(44×10^3)相符。



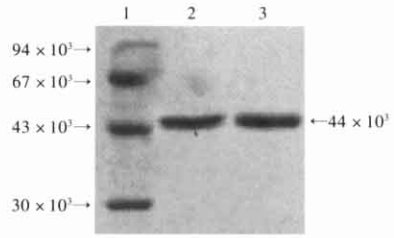
1: Recombinants expressing the hLNα4LG3-4; 2: Negative control; 3: Protein marker

图 2　hLNα4LG3-4 重组菌的 12% SDS-PAGE 分析结果

Fig 2　Analysis of the hLNα4LG3-4 recombinants by 12% SDS-PAGE

2.4　hLNα4LG3-4 蛋白的纯化

hLNα4LG3-4 在原核细胞中的表达形式主要是包涵体，纯化时首先采用常规超声碎菌法制备目的蛋白的包涵体，然后将制备的包涵体用镍柱 Ni-NTA 介质进行亲和层析纯化，纯化结果见图 3。用凝胶成像分析系统进行的初步分析表明，纯度达 95%以上，将含纯化蛋白的洗脱液透析后冷冻抽干，获得纯化后目的蛋白。



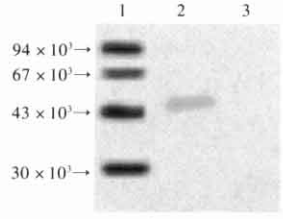
1: Protein marker; 2, 3: hLNα4LG3-4 protein after purification

图 3　hLNα4LG3-4 蛋白的纯化

Fig 3　Purification of hLNα4LG3-4 protein

2.5　hLNα4LG3-4 表达产物的 Western 印迹鉴定

对经 SDS-PAGE 检测到的阳性表达蛋白做进一步的 Western 印迹鉴定，鉴定结果(图 4)可看到，阳性表达菌的 Western 印迹检测图出现与其 SDS-PAGE 电泳图相对应的特异性显色带，说明用人层粘连蛋白 α4 链 LG4-5 组件的多克隆抗体经 Western 印迹检测到的蛋白确实是我们的目的蛋白，即 hLNα4LG3-4 蛋白，且具有良好的抗原反应性。



1: Protein marker; 2: Western blotting of hLNα4LG3-4 protein; 3: Western blotting of negative control

图 4　hLNα4LG3-4 表达产物的 Western blot 分析

Fig 4　Western blotting of hLNα4LG3-4 expression product

3　讨论

层粘连蛋白 LG 组件位于层粘连蛋白 α 链的 C 端，每个组件约含 200 个氨基酸残基，串联排列的 5 个 LG 组件(LG1 ~ LG5)构成了 G 结构域。LG 组件含有许多作用位点，层粘连蛋白通过这些位点与其受体(如整合素、肝素等)相互作用，从而参与细胞外基质的构建、促进细胞粘附、增殖、分化等重要的生理过程。进一步的研究表明 LG 组件还与肿瘤细胞的浸润转移密切相关，如 Yokoyama 等[7]在 LG4 组件中发现了一种环状肽，这种肽对肿瘤细胞具有强的粘附性，并含有肝素结合位点。

本实验旨在通过原核表达系统表达获得真核基因蛋白，即 hLNα4LG3-4 蛋白，所以实验采用了 mRNA 出发的 cDNA 基因克隆方案。克隆过程使用了 *Ex Taq* 高保真 DNA 聚合酶和方便快速的 T/A 克隆法，测序结果表明我们正确地克隆了 hLNα4LG3-4 基因，突变的碱基不影响该基因所编码的蛋白质，可进行下一步的表达工作；原核表达中，我们采用了常用的 pET-28a 表达载体，结果证实，hLNα4LG3-4 蛋白在 BL21(DE3)细菌中获得了高效表达。由于 pET 表达系统会在表达产物的 5′端加上一段 6 × His 标签序列，可用镍柱进行亲和纯化，本实验用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA 介质对表达蛋白进行了纯化，纯化效果良好。为进一步验证 hLNα4LG3-4 表达的正确性，表达产物又进行了 Western 印迹检测，由于 LG4-5 组件与 LG3-4 组件具有部分相同的氨基酸序列，LG4-5 组件蛋白的抗体可与 LG3-4 组件蛋白特异性结合，从而可特异性地检测 LG3-4 组件的表达产物，所以在 Western 印迹检测中，我们用本课题组已制备好的兔 LG4-5 组件的多克隆抗体作一抗，辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 作二抗，进行反应，通过二氨基联苯胺(DAB)底物显色，特异性地检测到 LG3-4 组件目的蛋白，进一步判定在 BL21(DE3)细菌中获得高效表达的蛋白就是人层粘连蛋白 α4 链 LG3-4 组件蛋白，且具有很好的抗原性，这将为下一步的研究工作提供了必要的物质基础。

需要指出的是，由于原核细胞往往不能对所表达的蛋白进行正确的翻译后加工如进行糖基化修饰等，表达产物常呈包含体形式存在，影响了产物的活性。经分析，本实验所表达的 hLNα4LG3-4 蛋白中含有两个糖基化修饰位点，其功能还不是很清楚。对纯化后的目的蛋白进行复性和活性测定，结果目的蛋白具有一定的促细胞粘附活性。进一步对表达条件进行优化，发现在诱导温度为 20 ℃时目的蛋白呈可溶性形式表达，且具有较好的生物活性(相关结果本研究未列出)，

进一步的优化表达和纯化工作正在进行之中，这也为相关蛋白的表达工作提供了一条很好的思路和途径。

参考文献：

[1] Iivanainen A, Kortesmaa J, Sahlberg C, *et al*. Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain[J]. J Biol Chem, 1997, 272(44): 27862 - 27868.

[2] Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, *et al*. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins[J]. J Biol Chem, 2001, 276(20): 17550 - 17558.

[3] Ljubimova J Y, Lakhter A J, Loksh A, *et al*. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis[J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5601 - 5610.

[4] Talts J F, Sasaki T, Miosge N, *et al*. Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha4 chain and its proteolytic processing in tissues[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35192 - 35199.

[5] Okazaki I, Suzuki N, Nishi N, *et al*. Identification of biologically active sequences in the laminin alpha 4 chain G domain[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37070 - 37078.

[6] Gonzalez A M, Gonzales M, Herron G S, *et al*. Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior *in vitro* and angiogenesis in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 16075 - 16080.

[7] Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, *et al*. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides[J]. Biochemistry, 2004, 43(42): 13590 - 13597.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)11-1112-01

BAC-TO-BAC 昆虫/杆状病毒系统在真核表达人 N 端脂多糖结合蛋白的研究中的应用

Application of BAC-TO-BAC insect/baculovirus system on eukaryotic expression of human N-terminal LBP

殷育松，王晓东，刘友生 （第三军医大学西南医院病理科，重庆 400038）

昆虫细胞表达体系自成功表达人 β 干扰素以来，已成为制备基因工程产品的优选体系。我们选用该系统成功构建 N 端脂多糖结合蛋白（nLBP）基因杆状病毒载体并进行重组蛋白的表达，现就该系统在实验研究中的应用及体会报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Grace 昆虫细胞培养基（11300-043）、SF-900 II SFM（10902-088）和 sf21 昆虫细胞购自 GIBCO（Invitrogen）公司；6×His 亲和纯化 TALON 柱芯（Cat. 8908-2）购自 Clontech 公司。

1.2 重组病毒的构建

1.2.1 外源基因转座入 Bacmid 及 pBacmidLBP 的鉴定 将 1 ng pFASTBACnLBP 重组质粒 DNA 与 100 μl DH10BAC 感受态细胞混匀，按常规方法转化后于 37 ℃培养 24 ~ 36 h。经蓝白斑筛选挑取白色重组单菌落接种后，提取 Bacmid DNA。

1.2.2 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 以 pUC/M13 引物进行 PCR 扩增，F：5′-CCCAGTCAGGACGTTGTAAAACG-3′；R：5′-AGGGGATAACAATTTCACACAGG-3′。

1.3 重组病毒的鉴定

1.3.1 Bacmid DNA 转染 sf21 细胞及目的基因 PCR 鉴定 轻取 10 μl 新鲜提取的重组 Bacmid DNA 于 100 μl SF-900IISFM 培养的 sf21 细胞中，同样取 6 μl CELLFECTIN，转染后 72 h，收获上清即得重组病毒。经 3 代病毒扩增后，以裂解细胞的 DNA 为模板，nLBP 基因引物进行 PCR 扩增。F：5′-GTCGAC TGCACTGGGAATCAAGGA-3′；R：5′-AAGCTT AATCTCTGTTGTAACTGG-3′。

1.3.2 病毒空斑分析 接种 1×10^6 cells/孔于 6 孔培养板，28 ℃培养 4 ~ 6 h，每孔加入 500 μl 不同稀释度的第 3 代病毒，培养 4 ~ 5 d 后数出空斑数并计算病毒滴度。

1.4 重组病毒的表达[1]

1.4.1 重组病毒的蛋白表达及其产物的纯化 将 MOI 加入处于对数生长期的 Sf21 细胞中，感染 1 ~ 2 h 后，将培养基换为 SF-900 II SFM，28 ℃培养 65 ~ 72 h 收集上清。常规洗脱蛋白质，Lowry 法测定蛋白质浓度，BIO-RAD 毛细管电泳进一步鉴定纯化蛋白的纯度。

1.4.2 SDS-PAGE 及 Western Blot 样品经 12% SDS-PAGE 电泳及凝胶银染，Western Blot 采用 6×His 特异抗体间接检测 C 端融合有 6×His 的重组蛋白。

（下转 1119 页）

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39970757，30000171）
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970757, 30000171)

作者简介：殷育松（1970 - ），男，安徽省太湖县人，硕士研究生，实验师，主要从事病理学技术方面的研究。电话：(023)66681548
通讯作者：王晓东，E-mail：xiaodong_wang@nssm.edu

收稿日期：2004-12-28；修回日期：2005-01-27