论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1016-03

人 cubilin 蛋白功能片段原核表达系统的建立

李新伦,何娅妮,杨聚荣,梁海君,林 静,李开龙,丁涵露,张建国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要: 目的 构建编码白蛋白吞饮受体人 cubilin(hcubilin)蛋白配体结合域 CUB7-8 基因片段的原核表达载体,诱导表达并鉴定表达产物。**方法** 重组 DNA 技术构建原核表达载体 pGEX-hCUB7-8,IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 与免疫印迹法鉴定表达产物,Pull down 实验验证融合蛋白是否与白蛋白结合。**结果** 双酶切和测序鉴定表明 CUB7-8 片段插入正确,诱导表达后获得分子量为 52×10^3 的融合蛋白,该融合蛋白可以被抗 GST 抗体识别,并且可以和白蛋白结合。**结论** CUB7-8 基因片段编码的蛋白质能在原核细胞中正确表达,并且可以和白蛋白结合,这为进一步研究该功能域的结构与功能奠定了基础。

关键词: cubilin;pGEX-4T-1;融合蛋白;白蛋白

中图法分类号: Q51;Q591.2;Q75 **文献标识码**: A

Establishment of prokaryotic expression system of CUB7-8 fragment of hcubilin

LI Xin-lun, HE Ya-ni, YANG Ju-rong, LIANG Hai-jun, LIN Jing, LI Kai-long, DING Han-lu, ZHANG Jian-guo,
(Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct CUB7-8 fragment prokaryotic expression vector of humancubilin, the endocytic receptor for albumin and to induce expression and identify the expression product. **Methods** The expression vector pGEX-hCUB7-8 was constructed by recombinant DNA technology and the expressed protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting after induction by IPTG, then the interaction between the fusion protein and albumin was verified. **Results** pGEX-hCUB7-8 was constructed successfully and the coding region was inserted into the vector correctly. A new protein band, about 52×10^3, was observed by SDS-PAGE analysis after induction by IPTG and Western blotting. McAb against GST had positive reactions with the fusion protein. **Conclusion** CUB7-8 protein can be expressed in *E. coli.* expression system and will combine with albumin. It is applicable for further investigation of cubilin.

Key words: cubilin; pGEX-4T-1; fusion protein; albumin

cubilin 蛋白是分布于肾近曲小管、回肠及胎盘等组织上皮细胞的吞饮受体。在肾近曲小管,该蛋白介导近端肾小管对白蛋白、球蛋白、转铁蛋白等多种尿蛋白成分的重吸收[1,2]。cubilin 蛋白全长 3 623 aa,由 N-端,8 个 EGF 样结构和 27 个 CUB (C1r/C1s、Uegf、bone morphogenic protein-1)结构域组成,其中,CUB7-8 结构域是白蛋白的结合域[3]。为研究 cubilin 蛋白结构与功能的关系,我们选取 CUB7-8 蛋白进行原核表达。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370534)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370534)
作者简介:李新伦(1977-),男,山东省夏津县人,硕士研究生,医师,主要从事肾脏基础方面的研究。电话:(023)68757764
通讯作者:何娅妮,电话:(023)68757446
收稿日期:2005-12-16;修回日期:2006-03-14

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与宿主菌 表达载体 pGEX-4T-1、*E. coli.* JM109 为本实验室留存,*E. coli.* BL21DE3 为中南大学医学技术与情报学院周万军博士惠赠。

1.1.2 主要试剂 实验中所用的限制性内切酶、中分子 DNA 标准物、RT-PCR 试剂盒、IPTG 溶液均购自 TaKaRa 公司。TRIzol、DTT 购自 Invitrogen 公司。中分子量蛋白质标准品购自北京天为时代科技有限公司。质粒抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自 Omega 公司。GST 抗体购自 Pharmacia Biotech 公司。PMSF 购自 Ameresco 公司。Glutathione Sephorose 4B 购自默克公司。白蛋白购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 利用 NCBI 的核酸数据库,获得 hcubilin CUB7-8 片段的序列,设计引物并保证阅读框正确,在

上游引物 5′端加载 *Bam*H Ⅰ酶切位点，下游引物 3′端加载终止密码 TCA 和 *Xho* Ⅰ酶切位点：上游引物 5′-GGATCCTGCGGG GGTAATCTCACCACTTCAAG-3′，下游引物 5′-CTCGAGCCT-CAACCGTAAACAAACCAC TGCATCTG-3′，引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2.2　原核表达载体 pGEX-hCUB7-8 的构建　　提取人肾组织总 RNA，RT-PCR 获得目的基因 CUB7-8 片段。纯化后的 PCR 产物及载体 pGEX-4T-1 行双酶切，纯化、连接，获得原核表达载体 pGEX-hCUB7-8，以 *Bam*H Ⅰ与 *Xho* Ⅰ以及 *Bam*H Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切初步鉴定，并送北京三博远志生物公司测序。

1.2.3　融合蛋白的诱导表达与纯化　　阳性质粒分别转化大肠杆菌（*E. coli.* BL21DE3、JM109），挑取单克隆菌株接种于 LB 培养基（含 Amp 100 μg/ml），37 ℃，200 r/min 振荡培养至 $D(600)=0.6\sim0.8$ 时，采取不同 IPTG 浓度（0.01、0.05、0.1、0.2、0.4 mmol/L），不同诱导温度（37、33、30 ℃），进行表达。各取 1 ml 诱导表达后菌液行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），以 SDS-PAGE 薄层扫描比较各种诱导条件下重组融合蛋白及可溶性蛋白在菌体总蛋白中所占的比例。采用最优表达条件，进行大量表达，收集产物，超声破菌，离心后分别取上清和沉淀行 SDS-PAGE，估算可溶性蛋白在融合蛋白中所占的比例。同时取上清与平衡后的谷胱甘肽-sepharose 4B 混合，室温孵育 60 min，反复离心、PBS 洗涤，沉淀与谷胱甘肽洗脱缓冲液（50 mmol/L Tris · Cl，pH 8.0，10 mmol/L 还原型谷胱甘肽）混合，室温下轻摇 20 min，离心后，取上清（纯化的蛋白）和未经纯化的蛋白行 SDS-PAGE。

1.2.4　免疫印迹分析　　蛋白产物经 SDS-PAGE 后，电转移至硝酸纤维素滤膜上，5% 的脱脂奶粉封闭 30 min 后，加入小鼠抗 GST 单克隆抗体（1∶1 000），反应 1 ~ 2 h，洗涤后加辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG，反应 1 h，DAB 显色。

1.2.5　GST 结合洗脱实验（GST pull-down assay）　　分别取纯化的 GST、GST 融合蛋白固定于 1 ml 谷胱甘肽-sepharose 4B，蛋白 bingding buffer（142.5 mmol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$，0.2% Nonidet P-40，10 mmol/L HEPES，pH 7.2，1 mmol/L EDTA）冰浴 30 min 后，加入白蛋白溶液，PBS 洗涤 10 次后，谷胱甘肽洗脱缓冲液洗脱 3 次，收集洗脱产物进行 SDS-PAGE。

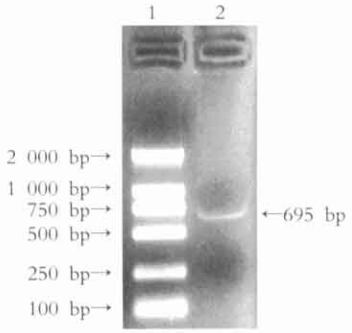
2　结果

2.1　原核表达载体 pGEX-hCUB7-8 的构建及鉴定

RT-PCR 扩增人肾 RNA 得到长度为 695 bp 的 hCUB7-8 片段（图 1）。载体 pGEX-hCUB7-8 经 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ以及 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切分别得到 695 bp 和 602 bp 片段（图 2），说明筛选质粒为正向插入。测序结果显示 pGEX-hCUB7-8 插入片段与 GenBank 发表序列完全一致，阅读框正确。

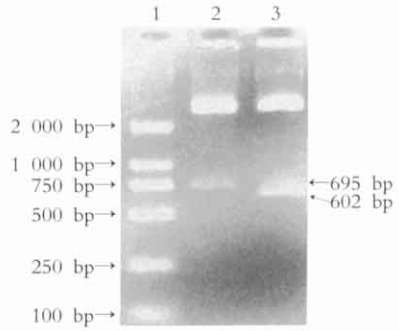
2.2　融合蛋白的诱导表达与纯化

与对照组 pGEX-4T-1 比较，pGEX-hCUB7-8 重组质粒在不同菌株的宿主菌中均有大小约 52×10^3 的外源蛋白表达，分子量大小与理论预测值相符。薄层扫描分析，融合蛋白在 0.05 mmol/L IPTG、37 ℃诱导条件下 *E. coli.* 表达量最高，占总表达蛋白的 25% ~30%，可溶性蛋白在 0.05 mmol/L IPTG、30 ℃条件下 *E. coli.* 表达量最高，约占总 BL21DE3 菌液中蛋白的 10%。纯化后蛋白在约 52×10^3 的位置出现单一条带（图 3）。



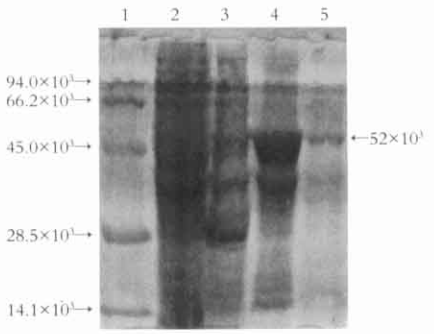
1：DNA 标准 DL2000；2：PCR 产物

图 1　RT-PCR 扩增结果



1：DNA 标准 DL2000；2：重组载体 *Bam*H Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切；3：重组载体 *Bam*H Ⅰ与 *Xho* Ⅰ双酶切

图 2　酶切鉴定



1：蛋白标准；2：空菌组；3：空载体组；4：融合蛋白组；5：纯化后的融合蛋白

图 3　融合蛋白在大肠杆菌中的表达

2.3　免疫印迹分析

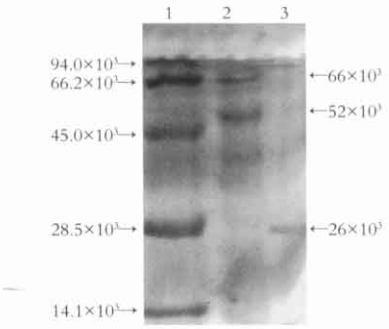
融合蛋白经 12% SDS-PAGE、电转移后，用小鼠抗 GST 单克隆抗体作一抗进行免疫印迹分析，出现 1 条阳性反应带（图 4），大小与预期值一样。

2.4　GST 结合洗脱实验

SDS-PAGE 证实，GST 融合蛋白组，在约 66×10^3 位置出现特异条带，而 GST 蛋白组仅在 26×10^3 位置出现条带（图 5），证实表达的融合蛋白可以和白蛋白结合。



图4 诱导表达产物的免疫印迹分析



1：蛋白标准；2：融合蛋白组；3：GST 蛋白组

图5 融合蛋白的 pull down 实验

3 讨论

蛋白尿是慢性肾病病程进展的独立危险因素。尿白蛋白，既是肾小球疾病的标志物，又可引起肾小管上皮细胞损伤[4]。白蛋白在内吞过程中或内吞后，可通过 PKC 途径，活化 NADPH，产生 ROS，随之活化多种信号途径，产生多种炎症介质、趋化因子和凋亡诱导因子，募集单核/巨噬细胞和 T 淋巴细胞间质浸润，引发炎症和纤维化，启动肾小管上皮细胞凋亡，从而引起一系列的损伤，最终导致慢性肾功能衰竭[5-7]。

cubilin 蛋白是肾小管上皮细胞重吸收白蛋白途径的第 1 道关口，具有“开关”或“板机”(switch or trigger)作用，和另一受体 megalin 共同完成白蛋白对信号途径的激活，在白蛋白尿肾损害中起着极为重要的作用[8,9]。但是，在 I-G 综合征患者以及 cubilin 缺陷狗，均出现大量白蛋白尿，但肾组织无明显病理改变，并且不会进展为慢性肾功能衰竭。反义 cubilin 表达载体，能抑制培养的肾小管上皮细胞对白蛋白的重吸收，并且可明显减少 MCP-1 和 RANTES 的表达，说明通过抑制 cubilin 对白蛋白的重吸收，能减少炎症介质的表达[10]。那么，通过找寻 cubilin 蛋白和白蛋白的精确结合位点，并通过作用于该位点而干预配受体的结合，理论上能够阻断或减少白蛋白的重吸收，抑制白蛋白转运，从而减缓白蛋白肾损害的进展。由于 cubilin 蛋白分子量高达 460×10^3，其结构特点使全长 cubilin 分子获得高效表达难以实现，针对 cubilin 蛋白各段生物学功能不同的特性，选取能够与白蛋白结合的 CUB7-8 功能片段，进行原核表达，并通过蛋白结合沉降实验证实表达蛋白具有生物学活性，便于下一步实验中，引进突变等研究方法，精确定位 cubilin 蛋白与白蛋白的结合位点，为进一步研究 cubilin 蛋白转运白蛋白的功能以及干预 cubilin 蛋白与白蛋白的结合对白蛋白肾损害的影响奠定基础。

参考文献：

[1] MOESTRUP S K, VERROUST P J. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia[J]. Annu Rev Nutr, 2001, 21: 407-428.

[2] BIRN H, FYFE J C, JACOBSEN C, *et al*. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption[J]. J Clin Invest, 2000, 105(10): 1353-1361.

[3] YAMMANI R R, SEETHARAM S, SEETHARAM B. Identification and characterization of two distinct ligand binding regions of cubilin[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 44777-44784.

[4] IMAI E, NAKAJIMA H, KAIMORI J Y. Albumin turns on a vicious spiral of oxidative stress in renal proximal tubules[J]. Kidney Int, 2004, 66(5): 2085-2087.

[5] TANG S, LEUNG J C, ABE K, *et al*. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. J Clin Invest, 2003, 111(4): 515-527.

[6] DONADELLI R, ZANCHI C, MORIGI M, *et al*. Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kappaB- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2436-2446.

[7] NAKAJIMA H, TAKENAKA M, KAIMORI J Y, *et al*. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(2): 276-285.

[8] RUSSO L M, BAKRIS G L, COMPER W D. Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(5): 899-919.

[9] GEKLE M. Renal tubule albumin transport[J]. Annu Rev Physiol, 2005, 67: 573-594.

[10] 何娅妮，杨聚荣，蒋建新，等. Cubilin 在白蛋白刺激肾小管上皮细胞表达 MCP-1、RANTES 中的作用[J]. 中华医学杂志，2004，84(21)：1804-1809.

(编辑 龙 亮)