论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0892-04

重组人可溶性补体受体1型SCR15-18片段表达纯化及生物活性鉴定

谭 兵[1,2],张德纯[2],汪正清[1] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2]重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 获得高表达、高纯度和高活性的可溶性补体受体1型SCR15-18(sCR1-SCR15-18)蛋白。**方法** 重组原核表达载体pET32a-sCR1-SCR15-18在大肠杆菌BL21中经不同IPTG浓度、诱导时间和温度诱导表达,超声破菌,提取包含体,经Ni^{2+}-NTA亲和层析后,选择不同氧化还原条件进行复性,进而检测其生物学活性。**结果** 得到了有较高表达量、较高纯度和较好生物学活性的sCR1-SCR-15-18蛋白。**结论** 优化了sCR1-SCR15-18蛋白的表达、纯化和复性的参数,所获结果为进一步动物体内保护实验研究奠定了基础。

关键词: 可溶性补体1型受体;表达;包含体;纯化;复性

中图法分类号: R392-33;R392.11;R392.13 **文献标识码:** A

Expression, purification and bioactivity identification of recombinant SCR15-18 domain of human soluble complement receptor type 1

TAN Bing[1,2], ZHANG De-chun[2], WANG Zheng-qing[1] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To prepare highly expressed, purified and refolded SCR15-18 of human soluble complement receptor type 1 (sCR1-SCR15-18) protein. **Methods** The expression of recombinant pET32-sCR1-SCR15-18 in *E. coli.*. BL21 was induced by IPTG of different concentrations for different time period under different temperatures and the bacteria were split by sonication. The sCR1-SCR15-18 protein was purified by Ni^{2+}-NTA resin affinity chromatography. The purified protein was refolded under different conditions. Then the bioactivity of the protein was analyzed. **Results** The sCR1-SCR15-18 protein of high expression, purity and bioactivity was attained. **Conclusion** The parameters of expression, purification and refolding of sCR1-SCR15-18 protein were optimized, which may pave a way for further studies.

Key words: soluble complement receptor type 1; expression; inclusion body; purification; refolding

补体受体1型(complement receptor type 1, CR1)是一种膜糖蛋白,为内源性补体活化抑制物。可溶性补体受体1型(soluble complement receptor type 1, sCR1)是CR1的胞外片段,保留了抑制补体活化作用等功能单位[1];它具有外源性及内源性活性,既可灭活组装于非自身细胞膜上的C3/C5转化酶,又可灭活自身细胞膜上形成的C3/C5转化酶,对补体的过度激活具有抑制和调节作用[2]。sCR1主要应用于防治有补体激活参与的疾病如:缺血再灌注损伤、并发机会感染、器官移植和心肺分流术等[3,4]。目前应用的sCR1均为CHO细胞表达产物,生产成本较高。为此我们构建了sCR1的原核表达体系,本室已成功构建了表达于大肠杆菌BL21中的pET32a-sCR1-SCR15-18原核表达载体[5]。以大肠杆菌为宿主细胞的原核表达体系,具有操作简单、生长时间快、成本低、产量高的优点。为了获得高纯度的活性蛋白,本研究对其表达、纯化及复性的条件进行了优化,以IPTG诱导蛋白表达,经Ni^{2+}-NTA agarose层析纯化,在不同氧化还原剂比例下复性,最后经补体溶血抑制试验观察纯化蛋白的活性,优化了sCR-SCR-15-18蛋白的表达、纯化和复性方法,为展开下一步大规模表达纯化及动物体内保护实验奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30471723)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471723)

作者简介: 谭 兵(1977-),男,重庆市人,硕士研究生,检验师,主要从事感染与免疫方面的研究。电话:(023)68752242,E-mail: tanbing77@sohu.com.cn

通讯作者: 汪正清,电话:(023)68752242,E-mail: wzq@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2006-09-25;**修回日期:** 2006-11-21

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

表达于大肠杆菌 BL21 中的重组 pET32a-sCR1-SCR15-18 质粒为本室构建并保存，IPTG、PMSF 购自 Genview 公司，Ni^{2+}-NTA agarose 购自 Qiagen 公司，氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽为 Amresco 公司产品，溶血素为重庆市药剂学校微生物学教研室惠赠。

1.2　方法

1.2.1　重组质粒 pET32a-sCR1-SCR-15-18 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达条件优化　　将带有重组 pET32a-sCR1-SCR-15-18 质粒的大肠杆菌 BL21 活化过夜后，按 1% 接种于含氨苄青霉素（100 μg/ml）的 LB 培养基中，37 ℃、250 r/min 摇菌，待其生长至 $D(600)$ 值为 0.6～0.7 时，分别加入诱导剂 IPTG 为 0、2.0×10^{-4}、2.0×10^{-3}、2.0×10^{-2}、0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0、4.0 mmol/L 的不同终浓度；不同时间 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8 h；诱导温度：20、25、30、37 ℃ 的条件下诱导表达，诱导表达产物进行 12% SDS-PAGE，优化出最佳诱导表达条件。

1.2.2　分离包含体　　诱导表达的细菌，经 5 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min 收菌，每克细菌加入 5 ml 裂解液缓冲液（10 mmol/L Tris，100 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，0.1 mmol/L PMSF，pH 8.0）重悬，冰浴超声碎菌（功率 300 W，每次 3 s，间隔 3 s）至菌液半透明，经革兰染色观察 95% 细胞已破碎。

10 000 × g 4 ℃ 离心 15 min。加入 9 倍体积漂洗缓冲液（10 mmol/L Tris，100 mmol/ L NaH_2PO_4，2 mol/ L 尿素，0.5% TritonX-100，pH 8.0 ）重悬沉淀，5 min 后 12 000 × g 4 ℃ 离心 20 min，重复漂洗操作 2 次。

1.2.3　Ni^{2+}-NTA agarose 亲和层析柱纯化　　用缓冲液 A（8 mol/L 尿素，0.1 mol/L NaH_2PO_4，0.01 mol/L Tris，pH 8.0）溶解包含体，4 ℃ 过夜，12 000 × g 4 ℃ 离心 25 min，取上清经 0.22 μm 滤膜过滤。过滤后的上清过 Ni^{2+}-NTA agarose 柱，上样完后先用缓冲液 A 冲洗，然后以缓冲液 B（8 mol/L 尿素，0.1 mol/L NaH_2PO_4，0.01 mol/L Tris，pH 6.3）洗柱直至 $D(280)$ 小于 0.01，以缓冲液 C（8 mol/L 尿素，0.1 mol/L NaH_2PO_4，0.01 mol/L Tris，pH 4.5）洗脱目的蛋白。收集各段洗液行 12% SDS-PAGE 分析。

1.2.4　透析复性　　将纯化的 sCR1-SCR-15-18 蛋白溶液浓度调至 150 μg/ml，在 4 ℃ 下进行透析复性。按尿素浓度递减梯度不同分为 A、B 两个组。A 组中按谷胱甘肽氧化型（GSSG）和还原型（GSH）的比例不同分为 A1、A2、A3 和 A4 4 个组。各组中透析液中物质含量见表 1。透析后 4 ℃ 下用 20% 聚乙二醇 20 000 浓缩，离心取上清，BCA 法检测蛋白浓度，－70 ℃ 冷冻保存。

表 1　各组透析液中物质含量

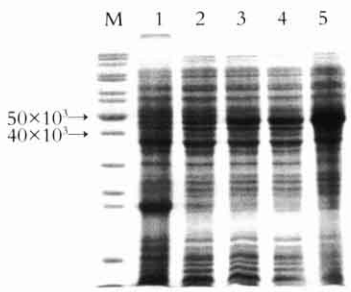
指标	A1（透析液）			A2（透析液）			A3（透析液）			A4（透析液）			B（透析液）				
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
氧化型谷胱甘肽（mmol/L）	0.1	0.1	–	0.3	0.3	–	0.5	0.5	–	–	–	–	0.1	0.1	0.1	0.1	–
还原型谷胱甘肽（mmol/L）	0.9	0.9	–	0.7	0.7	–	0.5	0.5	–	–	–	–	0.9	0.9	0.9	0.9	–
尿素（mol/L）	2.0	0.5	–	2.0	0.5	–	2.0	0.5	–	2.0	0.5	–	4.0	3.0	2.0	0.5	–
三羟甲基氨基甲烷（mmol/L）	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
乙二胺四乙酸（mmol/L）	–	–	10	–	–	10	–	–	10	–	–	10	–	–	–	–	10
pH 值	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

1.2.5　sCR1-SCR-15-18 蛋白生物学活性检测　　常规法采取豚鼠血分离血清。实验分两组：①补体溶血组：取 0.1 ml 血清于试管中，加入 0.1 ml 巴比妥缓冲液混匀，37 ℃ 水浴 45 min，再加入 1.8 ml 巴比妥缓冲液使血清最终为 1∶20 稀释，然后加入溶血素、绵羊红细胞测量血清中总补体活性，用 CH50 法[6]；②sCR1-SCR-15-18 蛋白抑制补体溶血组：各组复性后的重组蛋白，用巴比妥缓冲液稀释使蛋白含量为 200 μg/ml，除用 0.1 ml 稀释后的各组复性蛋白溶液替换 0.1 ml 巴比妥缓冲液以抑制血清中补体活性外，其余步骤同补体溶血组。血清中总补体活性减去用重组蛋白抑制后的补体活性，即为重组蛋白抑制的补体活性。

2　结果

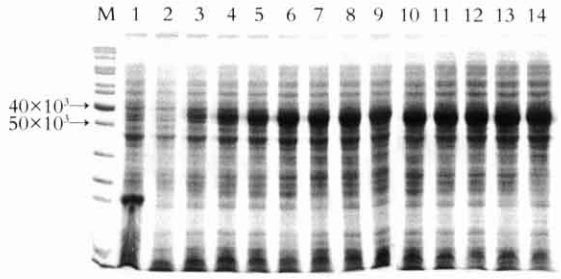
2.1　重组质粒 pET32a-sCR1-SCR-15-18 的表达

SDS-PAGE 分析显示：IPTG 浓度、诱导时间相同而诱导温度不同时，在 37 ℃ 诱导时重组蛋白表达量最高（图 1），37 ℃ 为最佳诱导温度；IPTG 浓度、诱导温度相同而诱导时间不同时，当诱导时间超过 4.0 h 后重组蛋白表达量增加不明显（图 2），4.0 h 为最佳诱导时间；诱导温度、时间相同而 IPTG 浓度不同时，当 IPTG 在 0.2～4.0 mmol/L 间时重组蛋白表达量相差不明显（图 3），因此最佳的 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L。同时经凝胶扫描分析，重组蛋白占总菌体蛋白的 27%。



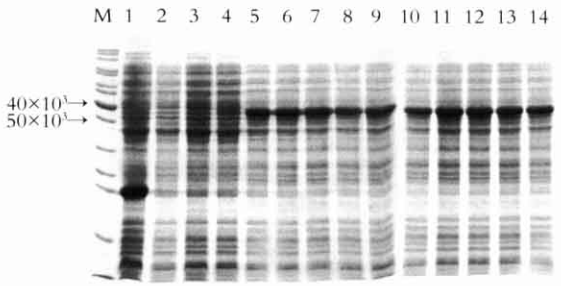
M：标准；1：pET32a 载体诱导后；2－5：诱导温度分别为：20、25、30、37 ℃

图 1　重组蛋白在不同温度下诱导表达



M:标准;1:pET32a 载体诱导后;2-14:诱导时间分别为:0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8 h

图2 重组蛋白经不同诱导时间诱导表达

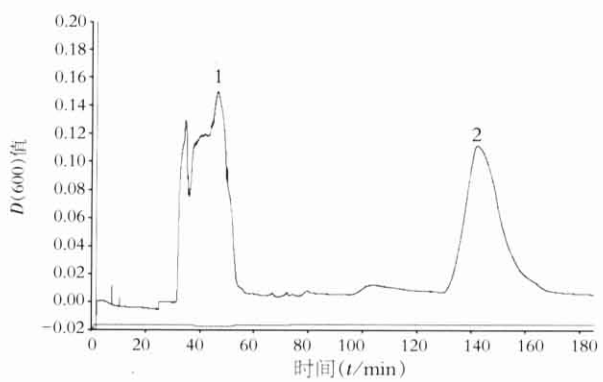


M:标准;1:pET32a 载体诱导后;2-14:IPTG 诱导浓度分别为:0、2.0×10^{-4}、2.0×10^{-3}、2.0×10^{-2}、0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0、4.0 mmol/L

图3 重组蛋白经不同 IPTG 浓度诱导表达

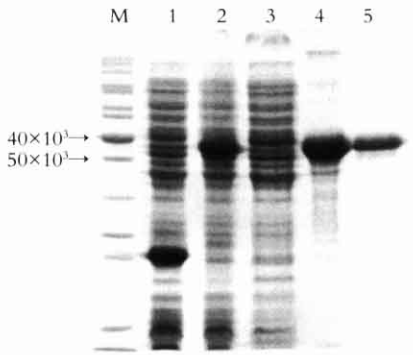
2.2 Ni^{2+}-NTA agarose 亲和层析柱纯化结果

细菌经超声破碎后离心取上清及沉淀行 SDS-PAGE 显示目的蛋白主要以包含体形式存在,包含体洗涤后用尿素溶解,然后经 Ni^{2+}-NTA agarose 亲和层析柱纯化,从亲和层析纯化图谱可见(图4),用 pH 4.5 的缓冲液 C 洗脱时,出现单一洗脱峰;SDS-PAGE 电泳显示(图5)得到的重组蛋白纯度高,凝胶扫描分析显示纯度为 95%。表明采用亲和层析可实现 sCR1-SCR-15-18 蛋白的一步纯化。



1:亲和层析穿过峰;2:亲和层析洗脱峰

图4 重组蛋白的亲和层析纯化



M:标准;1:pET32a 载体诱导后;2:重组子 pET32a-sCR1-SCR15-18 诱导后;3:超声后的上清液;4:超声后的包含体;5:亲和层析纯化的 sCR1-SCR15-18 蛋白

图5 重组蛋白的纯化电泳图

2.3 复性结果

重组蛋白在不同条件下经过透析复性,各组蛋白的质量回收率分别为 56.7%(A_1)、67.6%(A_2)、58.3%(A_3)、38.6%(A_4)和 62.4%(B)。

2.4 生物学活性检测结果

血清总补体溶血活性为 333 U/ml,用经不同复性条件复性的重组蛋白抑制后血清中补体活性分别为 200 U/ml(A_1)、133 U/ml(A_2)、166 U/ml(A_3)、250 U/ml(A_4)和 166 U/ml(B)。因此各小组抑制的补体活性分别为 133 U/ml(A_1)、200 U/ml(A_2)、167 U/ml(A_3)、83 U/ml(A_4)和 167 U/ml(B)。以上结果表明 A_2 小组重组蛋白抑制补体溶血反应活性最高抑制了 200 U/ml,此结果提示透析液中 GSSG 为 0.3 mmol/L GSH 为 0.7 mmol/L 时透析复性效果较好;B 组与 A_1 组对比表明透析液中尿素浓度梯度逐步递减复性效果较好。

3 讨论

CR1 由跨膜区域、胞内区域和胞外串联排列的 30 个短同源重复序列(short consensus repeats, SCR)构成,每个 SCR 含 60~70 氨基酸。据推测在两对半胱氨酸间形成的二硫键的作用下,每个 SCR 形成一个三袢环状结构[7]。sCR1 是 CR1 的胞外片段,是一种能有效抑制补体活性的功能蛋白。近年来,国外学者研制的 sCR1 已用于多种保护动物损伤保护实验[3,8,9],但均为 CHO 细胞表达,其产量不高造成生产成本过高。sCR1 结合 C3b 功能区域片段 SCR15-18 既可灭活 C3/C5 转化酶,又能结合 C3b,抑制 C5a 及 C5b-9 等片段的生成,因此我们利用该功能区域构建了原核表达体系质粒 pET32a-sCR1-SCR15-18。我们的实验通过对目的蛋白表达、纯化和复性参数的优化来提高产量。

为了使目的蛋白在太肠杆菌中获得高水平的表达，除了选择理想的表达载体和宿主菌外，还需优化其诱导条件，其中 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间最为重要。本研究观察了 12 个不同 IPTG 剂量时蛋白的表达情况，发现开始阶段随着 IPTG 浓度的增加目的蛋白的表达量升高，但当 IPTG 达到 0.2 mmol/L 后再加大 IPTG 的量目的蛋白表达的水平也不会增加。诱导时间也同样是达到 4.0 h 后再延长诱导时间目的蛋白的表达无明显增加。选择的4 个温度中，37 ℃时外源蛋白的表达量最高。因此在 37 ℃、IPTG 终浓度0.2 mmol/L 和诱导时间 4.0 h 的条件下，重组蛋白可获得较好的表达。

本研究中表达产物绝大部分是无生物活性的包含体，需要经过变性、复性及进一步纯化才能获得高纯度的活性蛋白。但同时包含体的形成可避免细胞中蛋白酶对目的蛋白的降解，也便于分离目的蛋白。包含体离心沉淀后可用 TritonX-100 和 EDTA 或尿素洗涤，从聚集的外源蛋白中除去可溶的粘附的细菌蛋白，多数情况下调整洗涤条件可使包含体中外源蛋白的纯度达到 90% 以上[10]。实验中我们通过调整 TritonX-100 和尿素的浓度发现使用 2 mol/ L 尿素加 0.5% TritonX-100 洗涤可得到纯度较高的包含体，有利于后期的蛋白纯化。溶解包含体后利用融合蛋白带有组氨酸标记的特性，使用 Ni^{2+}-NTA agarose 亲和层析后就获得了高纯度的目的蛋白，表明采用亲和层析可实现 sCR1-SCR-15-18 蛋白的一步纯化。

包含体经过变性溶解后，最重要的是使目的蛋白恢复活性。对于结构中含有二硫键的蛋白质来说，半胱氨酸能否形成正确的二硫键是其分子复性的一个重要因素。sCR1-SCR-15-18 蛋白中含有 4 对二硫键，我们在透析液中加入不同比例氧化/还原谷胱甘肽的氧化还原体系，并经补体溶血反应抑制实验证实找到了对于 sCR1-SCR-15-18 蛋白复性最为有利的氧化还原条件。在不同条件下进行复性所得的回收比率不一样，我们发现在无谷胱甘肽氧化还原体系中，透析时有肉眼可见的蛋白沉淀析出，故此种条件下回收率最低。表明透析复性时引入一个氧化还原体系是必要的。实验中还显示将纯化后的目的蛋白直接放入含尿素浓度为 0 mol/L 、0.5 mol/L 或 1.0 mol/L 的透析液中，目的蛋白将大量沉淀析出；而先放入含尿素浓度为 2.0 mol/L 的透析液中透析一段时间后再放入含 0.5 mol/L 尿素的透析液中，则只偶见少量蛋白沉淀析出。表明透析复性的起始阶段，透析液中维持一定的变性剂浓度是必需的。同时通过对比发现透析液中尿素浓度梯度逐步递减复性效果较好。我们用补体溶血反应抑制试验来验证复性的效果，采用了 CH50 法，此法采用 50% 溶血作为终点指标比 100% 溶血敏感同时还可进行简单的定量。应用此法优化了复性时的条件参数，同时也证实了我们制备的重组蛋白在体外确有抑制补体活性的功能。本实验在已经成功构建 pET32a-sCR1-SCR15-18 原核表达载体的基础上，对其表达、纯化和复性进行了各种不同参数的优化，得到了较高纯度和活性的 sCR1-SCR-15-18 蛋白，为下一步研究工作奠定了基础。

参考文献：

[1] Weisman H F, Bartow T, Leppo M K, *et al*. Soluble human complement receptor type 1: *in vivo* inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis[J]. Science, 1990, 249(4965): 146 - 151.

[2] 罗　雪，汪正清. 补体受体 1 型的结构功能及 sCR1 基因克隆表达的策略[J]. 创伤外科杂志, 2005, 7(6): 475 - 477.

[3] Quigg R J. Use of complement inhibitors in tissue injury[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(9): 430 - 436.

[4] Lazar H L, Bokesch P M, Van-Lenta F, *et al*. Soluble human complement receptor 1 limits ischemic damage in cardiac surgery patients at high risk requiring cardiopulmonary bypass[J]. Circulation, 2004, 110(11 Suppl 1): II274 - II279.

[5] 罗　雪，汪正清. 人 sCR1 结合 C3b 结构域基因的克隆及在大肠杆菌中高效表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(15): 1551 - 1554.

[6] 陶义训. 免疫学和免疫学检验[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社, 1997: 133 - 140.

[7] Ishii N, Kato H, Wang P H. Observation by electron microscopy on recombinant soluble human complement receptor type 1 (sCR1) and its derivative, aglyco-sCR1, from CHO cells[J]. Enzyme Microb Technol, 2003, 33(4): 482 - 487.

[8] Morgan B P, Rushmere N K, Harris C L. Therapeutic uses of recombinant complement receptors[J]. Biochem Soc Trans, 1998, 26(1): 49 - 54.

[9] Hart M L, Walsh M C, Stahl G L. Initiation of complement activation following oxidative stress. *In vitro* and *in vivo* observations[J]. Mol Immunol, 2004, 41(2-3): 165 - 171.

[10] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京：科学出版社, 2002: 1256 - 1259.

（编辑　陈聪连）