文章编号:1000-5404(2007)09-0817-03

论著

人HT036蛋白的原核表达及鉴定

彭 旭,袁顺宗,王晓娟,甘成军,王庆红,陈烯伟,张小容,胡晓红,罗高兴,吴 军 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 原核表达人HT036蛋白并鉴定其正确性。**方法** 采用PCR技术,扩增人HT036蛋白编码序列,克隆至原核表达载体pET30a(+)中,用IPTG诱导表达,免疫印迹鉴定。**结果** PCR扩增得到了目的DNA片段,克隆至原核表达载体后经酶切与测序鉴定正确,并在大肠杆菌中获得高效表达,用抗His抗体鉴定融合蛋白表达正确。**结论** 成功构建了重组原核表达载体并正确表达了HT036蛋白。

关键词:HT036蛋白;原核表达;增生性瘢痕
中图法分类号:Q503;Q511;Q591.2 **文献标识码**:A

Prokaryotic expression and identification of human HT036 protein

PENG Xu, YUAN Shun-zong, WANG Xiao-juan, GAN Cheng-jun, WANG Qing-hong, CHEN Xi-wei, ZHANG Xiao-rong, HU Xiao-hong, LUO Gao-xing, WU jun (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express human HT036 protein in *Escherichia coli* (*E. coli.*) and identify it. **Methods** The cDNA sequence obtained by PCR was cloned into the prokaryotic expression plasmid pET30a (+). The target protein was expressed in *E. coli.*. induced by IPTG and analyzed by Western blotting. **Results** The interest gene was identified by restriction endonucleases digestion and DNA sequencing. The protein was highly expressed in *E. coli.*. **Conclusion** We successfully expressed the HT036 protein.

Key words: HT036; prokaryotic expression; hypertrophic scar

增生性瘢痕一直是困扰烧伤后期临床治疗的难题,也是长期以来国内外学者研究的难点和重点。为探索增生性瘢痕可能的发生机制,我们曾利用基因芯片技术发现在早期增生性瘢痕中p311基因(GenBank ID:hsu36189)的表达与对照组有着显著差异[1,2]。P311基因编码含68个氨基酸的分子P311蛋白,相对分子质量为8×10^3[3],研究表明P311基因参与神经元损伤修复[4]和成纤维细胞向肌成纤维细胞转化过程[5]。为了进一步探讨P311基因在创伤修复过程尤其增生性瘢痕发生发展中的的作用机制及可能存在的上下游调控模式,我们利用酵母双杂交系统筛选了人肝cDNA文库,得到了其中能与P311蛋白相互作用的HT036蛋白[6]。HT036蛋白为一未知新蛋白,全长204氨基酸。本研究在此基础上克隆人HT036基因构建至原核表达载体在大肠杆菌中表达并鉴定表达产物正确性,为进一步研究HT036蛋白功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

pET30a(+)原核表达载体、大肠杆菌菌株DH5α和DE3(BL21)PlysS由本室保存。PCR引物由上海鼎安生物科技有限公司合成;凝胶回收试剂盒为V-gene产品;质粒提取试剂盒为Omega产品;限制性核酸内切酶*Eco*RⅠ和*Sal*Ⅰ、T_4 DNA连接酶、PCR反应试剂盒购自大连宝生物公司;鼠抗His单克隆抗体、化学发光试剂为Santa Cruz公司产品;HRP标记羊抗鼠IgG为武汉博士德产品;考马斯亮蓝试剂购自科润生物公司;其他常规化学试剂为分析纯以上产品。

1.2 方法

1.2.1 引物 为保证阅读框正确,避免移码突变,根据HT036编码序列和表达载体特点,分别设计带酶切位点的上下游引物。

上游引物:5′-CAGAATTCATGGGGCTGGGGGCCGTCC-3′(下划线处为*Eco*RⅠ酶切位点);下游引物:5′-CAGTCGACGTCACTGCCCAGCCTCTGGGTG-3′(下划线处为*Sal*Ⅰ酶切位点)。

作者简介:彭 旭(1978-),男,湖南省长沙市人,硕士研究生,医师,主要从事烧伤创面修复方面的研究。电话:(023)68752688
通讯作者:罗高兴,电话:(023)68754006
吴 军,E-mail:junwupro@public.eta.cq.cn
收稿日期:2006-08-05;修回日期:2006-11-13

1.2.2 模板 以本室前期酵母双杂交系统筛选出的阳性克隆重组载体 $pACT_2$-HT036 为模板。

1.2.3 PCR 扩增 50 μl 反应体系组成:10 × PCR buffer 5 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl,2.5 mmol/L dNTP 1 μl, *Taq* 酶 1 μl,引物各 0.5 μl,DNA 模板 1 μl,ddH_2O 38 μl。扩增程序为:94 ℃预变性 5 min,然后 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 30 循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物纯化与回收 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,于长波下快速切取 630 bp 左右目的条带,再用 V-gene凝胶回收试剂盒回收,回收产物经紫外分光光度计测定纯度和浓度。

1.2.5 pET30-HT036 表达载体构建 将凝胶回收产物和 pET30a(+)分别用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切,酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳并回收纯化,T_4 DNA 连接酶进行连接,转化大肠杆菌 DH5α,挑取阳性克隆经 PCR 和酶切初步鉴定正确后,转化大肠杆菌 DE3(BL21)PlysS,将初步鉴定正确的阳性克隆送上海生工公司测序。

1.2.6 诱导表达 分别挑取 pET30-HT036 目的菌落和 pET30a(+)空载体单菌落接种于 5 ml 卡那抗性 LB 培养基 37 ℃振摇过夜,按 1∶100 比例转接至 10 ml 新鲜卡那抗性培养基继续 37 ℃振荡培养至 $D(600)$ 约 1.0,各取出 1 ml 菌液(作为对照)后,加入 1 mol/L IPTG 9 μl 至终浓度为 1 mmol/L,继续振摇 4 h 后各留取 1 ml 菌液。

1.2.7 诱导表达的动力学研究 按 1.2.6 方法诱导表达,分别取加入 1 mmol/L IPTG 后 1、2、4、8 h 培养菌液各 1 ml;另外分别用 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L IPTG 进行诱导,4 h 后取培养菌液各 1 ml。

1.2.8 表达产物的 SDS-PAGE 电泳 培养菌液于 12 000 r/min离心 1 min 后分别收集菌体和培养上清,菌体用 100 μl 0.01 mol/L PBS 混悬,冰浴超声破碎后,加入 2 × SDS 上样缓冲液煮沸 5 min,各取 10 μl 行 SDS-PAGE 电泳(5% 积层胶,15% 分离胶),凝胶用考马斯亮蓝染色。

1.2.9 表达产物的 Western blot 鉴定 将 1 mmol/L 0、1、2、4、8 h表达产物 SDS-PAGE 电泳后,半干法(1 mA/cm^2,60 min)电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加入鼠抗 His 单克隆抗体(1∶1 000 稀释),4 ℃过夜,1‰TBST 洗膜,加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1∶5 000稀释),37 ℃孵育 1 h,1‰TBST 洗膜,化学发光试剂检测。

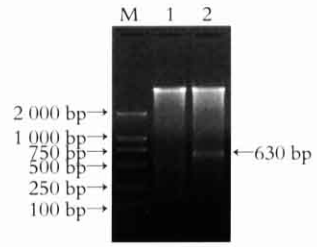
2 结果

2.1 重组原核表达载体的构建

pET30-HT036 经双酶切后,可见大小约 630 bp 的目的片段,经测序证实结果正确,表明原核表达载体构建成功。结果见图 1。

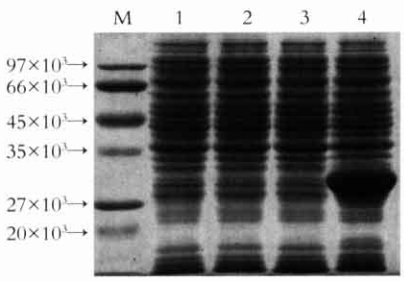
2.2 重组蛋白的诱导表达

携带 pET30-HT036 重组质粒的 DE3(BL21)PlysS 菌株经 IPTG 诱导后表达相对分子质量约 29×10^3 的重组蛋白(由 N 端 His-Tag;thrombin;S-Tag;enterokinase 和 HT036 蛋白组成)。SDS-PAGE 电泳结果见图 2。



M:DNA 标准(DL 2000);1:pET30a(+)双酶切;2:pET30-HT036 双酶切

图 1 pET30-HT036 双酶切电泳图

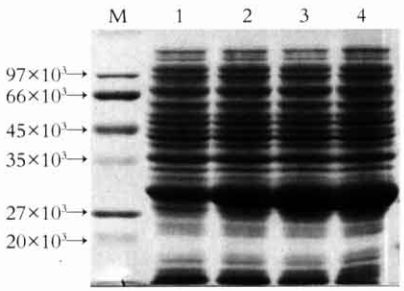


M:蛋白标准;1,2:诱导前后 pET30a(+);3,4:诱导前后 pET30-HT036

图 2 重组蛋白的诱导表达

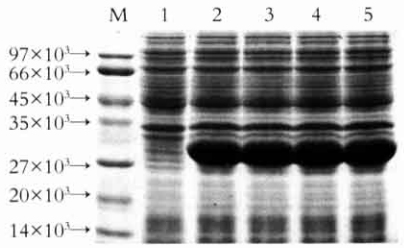
2.3 诱导表达的动力学研究

将各诱导表达时相点和不同浓度 IPTG 诱导产物 SDS-PAGE 后,考马斯亮蓝染色,结果分别见图 3、4。用 Bio-Rad Quantity One 软件分析表达蛋白占总蛋白比例,发现诱导 4 h 最好(达 21%),本实验 IPTG 不同浓度之间诱导未见明显差异。



M:蛋白标准;1-4:IPTG(1 mmol/L)诱导 pET30-HT036 后 1、2、4、8 h

图 3 不同诱导时相点 SDS-PAGE 电泳图

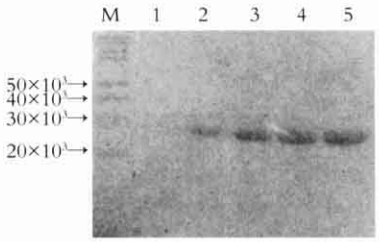


M:蛋白标准;1-5:IPTG 诱导浓度 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L(4 h)

图 4 不同浓度 IPTG 诱导 SDS-PAGE 电泳图

2.4　融合蛋白的鉴定

Western blot 化学发光(120 s/张)分析显示，经诱导的菌体裂解物与鼠抗 His 单克隆抗体反应，在相对分子质量约 29×10^3 处出现单一条带，而未经诱导的菌体裂解物则无此反应，说明所表达的融合有 N 端 6 × His 的目的蛋白是正确的，见图 5。



M：蛋白标准；1：阴性对照；2－5：诱导蛋白

图5　重组蛋白的免疫印迹分析

3　讨论

烧伤后增生性瘢痕的发生机制尚不清楚，组织学上以成纤维细胞的过度增生和细胞外基质的过度聚集为特征[7]。细胞外基质、成纤维细胞和细胞因子是研究的热点。我们在基因芯片发现早期增生性瘢痕中 P311 基因表达显著差异后，通过构建 P311 蛋白诱饵表达载体，利用酵母双杂交系统筛选出与之相互作用蛋白 HT036。HT036 蛋白很可能是目前存在于哺乳动物细胞内的结构、功能未知的一种新蛋白，有可能与 P311 蛋白和内皮抑制素的作用机制有关[8]。最新 NCBI 蛋白序列比对提示 HT036 蛋白又名羟基丙酮酸异构酶同系物，而羟基丙酮酸异构酶在乙醛酸代谢通路中能特异性催化羟基丙二酸半醛向羟基丙酮酸转化，最后经由丝氨酸转变为丙酮酸盐[9,10]。但是 HT036 蛋白和增生性瘢痕有什么样的关系？在增生性瘢痕发生发展中起什么样的作用？这些都是值得我们去深入探讨的问题。

本实验在克隆了 HT036 基因编码序列后，构建至原核表达载体 pET30a(＋)，经 IPTG 诱导后进行表达，由于 pET30a(＋)载体带有 6 个连续组氨酸残基序列(6 × His Tag)，在重组质粒进行诱导表达时，6 × His Tag 与 HT036 蛋白片段共同表达，为进一步鉴定和纯化提供了亲和位点。我们还探索了其最佳表达条件，从而为 HT036 蛋白的大量表达奠定了基础。总之，这些都将为我们后续探讨 HT036 蛋白在增生性瘢痕中的作用创造了条件，为了解增生性瘢痕的发生机制提供帮助。

参考文献：

[1] 马　兵，吴　军，易绍萱，等. 表达谱基因芯片筛选烧伤后增生性瘢痕相关基因的研究[J]. 中华创伤杂志，2001，17(6)：334－337.

[2] 马　兵，吴　军，易绍萱，等. 烧伤后早期增生性瘢痕相关细胞骨架基因表达研究[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(1)：29－31.

[3] Studler J M, Glowinski J, Levi-Strauss M. An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood[J]. Eur J Neurosci, 1993, 5(6): 614－623.

[4] Fujitani M, Yamagishi S, Che Y H, *et al*. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve[J]. J Neurochem, 2004, 91(3): 737－744.

[5] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, *et al*. P311 induces a TGF-beta1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype[J]. J Clin Invest, 2002, 110(9): 1349－1358.

[6] 袁顺宗，吴　军，易绍萱，等. 以酵母双杂交系统从成人肝 cDNA 文库中筛选与研究 P311 相互作用蛋白的基因序列[J]. 第三军医大学学报，2005，27(14)：1428－1431.

[7] 陈　壁. 增生性瘢痕机制研究进展[J]. 中华创伤杂志，2001，17(6)：325－326.

[8] 张宝林，贾向旭，苑晓玲，等. 酵母双杂交技术研究与内皮抑制素相互作用的蛋白质[J]. 军事医学科学院院刊，2003，27(3)：180－182，219.

[9] De-Windt F E, Van-Der-Drift C. Purification and some properties of hydroxypyruvate isomerase of *Bacillus fastidiosus*[J]. Biochim Biophys Acta, 1980, 613(2): 556－562.

[10] Ashiuchi M, Misono H. Biochemical evidence that *Escherichia coli* hyi(orf b0508, gip) gene encodes hydroxypyruvate isomerase[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1435(1－2): 153－159.

（编辑　薛国文）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn(校外稿件请邮寄)

本刊编辑部