文章编号:1000-5404(2008)01-0019-04

论著

人重组蛋白 P311 的原核表达纯化与鉴定

谭江琳,袁顺宗,彭 旭,马 兵,罗高兴,吴 军 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,创伤,烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 原核表达人增生性瘢痕新候选相关蛋白 P311,并对该重组蛋白进行纯化、鉴定。**方法** 通过 PCR 方法扩增人 P311 基因,利用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点将其克隆至谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-s-transferase,GST)融合蛋白表达载体 pGEX-4T-1 中,转化大肠杆菌 BL21(DE3)后,经异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(isopropyl-β-D-5-thiogalactoside,IPTG)诱导表达,用 SDS-PAGE、Western blotting 等方法鉴定表达产物,并用谷胱甘肽-琼脂糖小珠亲和纯化表达的 GST-P311 蛋白。**结果** 重组载体 pGEX-4T-P311 经酶切与测序鉴定证实构建成功。导入大肠杆菌进行表达,表达产物相对分子量为 34KD 左右,与预期值相符。该条带经免疫印迹检测鉴定为 GST 抗体阳性,获得了纯化的 GST-P311 蛋白。**结论** 构建了 pGEX-4T-P311 原核表达载体,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达,亲和纯化获得较高纯度的 GST 融合蛋白,为下一步继续研究 P311 的生物学功能奠定了基础。

关键词:P311;原核表达;增生性瘢痕
中图法分类号:R341;R394-33 **文献标识码:**A

Prokaryotic expression, purification and identification of human P311 protein

TAN Jiang-lin, YUAN Shun-zong, PENG Xu, MA Bing, LUO Gao-xing, WU Jun (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital; Chongqing Key Laboratory of Proteomics of Diseases, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express, purify and identify human P311 protein, a candidate protein in hypertrophic scar formation. Methods The cDNA sequence of human P311 obtained by PCR was cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1 containing glutathione-s-transferase (GST). pGEX-4T-P311 was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The expression of GST-P311 fusion protein was induced by IPTG, identified by both SDS-PAGE and Western blotting, and then purified with glutathione-sepharose beads. Results The restriction endonuclease digestion and the sequencing of recombinant plasmid demonstrated that pGEX-4T-P311 vector was successfully constructed. The relative molecular weight of expressed protein was about 34×10^3 which was as the same as the objective protein, and the corresponding protein was identified by the immunoblotting with antibody against GST. Conclusion pGEX-4T-P311 vector is correctly constructed, and the GST-P311 fusion protein is successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified.

Key words: P311; prokaryotic expression; hypertrophic scar

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤创伤异常修复的一种不良结局[1],瘢痕组织挛缩引起的功能障碍和影响美观是该疾病困扰临床后期治疗的难题。既往研究表明成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化在纤维化发生和瘢痕形成过程中起着非常重要的作用[2],但是目前关于参与增生性瘢痕发生发展的基因及其调控机制尚未完全清楚。我们在前期的实验中,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)呈显著表达[3-5]。同时 Pan 等[6]证实在创伤愈合中 P311 的高表达能促进成纤维细胞向肌纤维母细胞转化,使 TGF-β1 和参与活化 TGF-β1 的基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 表达降低,从而抑制胶原蛋白 1 和 3 表达,最终产生抗纤维化的作用。最近 Shi 等[7]还发现 P311 能促进肌成纤维细胞细胞迁移,富集在创面周围,引起创面收缩。但是

基金项目:国家自然科学基金(30571922;30672174);重庆市科委自然科学基金(2006BB5093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571922, 30672174) and Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2006BB5093)
作者简介:谭江琳,女,重庆市垫江县人,博士研究生,主要从事烧伤创面修复方面的研究,电话:(023)68752688;E-mail:jianglintan@yahoo.com.cn
通信作者:吴 军,E-mail:junwupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2007-03-28 修回日期:2007-09-20

由于 P311 蛋白的 N 端含有 PEST 结构域[8]，易被泛素化通路降解，半衰期极短，导致 P311 的表达有一定的难度，因此为了能成功表达相对不易被降解的人 P311 蛋白，我们构建了带 GST 标签的人 P311 重组蛋白表达载体 pGEX-4T-P311，在大肠杆菌中进行了表达，并利用抗 GST 抗体对融合蛋白进行了检测，为进一步探讨 P311 生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

原核表达载体 pGEX-4T-1、大肠杆菌 *E. coli* DH5α、BL21(DE3)PlysS 及含 P311 基因序列的重组载体 pCMV-Myc-P311 为本室保存。P311 的基因编码序列由其发现者 Levi-Strauss Matthieu 教授惠赠，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 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶、PCR 反应试剂盒购自大连宝生物公司；兔抗 GST 多克隆抗体购自武汉三鹰公司；化学发光试剂为 Santa Cruz 公司产品；HRP 标记羊抗兔 IgG 为武汉博士德产品；考马斯亮蓝试剂购自科润生物公司；Polyvinylidne fluoride(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司；谷胱甘肽琼脂糖小珠购自 Amersham 公司。其他常规化学试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增人 P311 基因 根据 P311 基因的编码序列设计带 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点的上下游引物。上游引物为：5′-TTTTGGATCCATGGTGTATTACCCAGAACTC-3′(含 *Bam*H Ⅰ酶切位点)，下游引物为：5′-TATACTCGAGTTAAAAAAAGTG-GAGGTAACTG-3′(含 *Xho* Ⅰ酶切位点)。以 pCMV-Myc-P311 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系(50 μl)组成为：10 × PCR buffer 5 μl，$MgCl_2$ 3 μl(25 mmol/L)，dNTP 4 μl(2.5 mmol/L)，r*Taq* 酶 1 μl(5 U/μl)，引物各 0.5 μl(0.2 μmol/L)，DNA 模板 1 μl(377 μg/ml)，ddH_2O 35 μl。扩增参数为：94 ℃预变性 5 min，然后 94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃复性 30 s，30 个循环后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物预期片段长约 240 bp，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定后用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化。

1.2.2 pGEX-4T-P311 表达载体的构建 将凝胶回收产物 P311 和原核表达载体 pGEX-4T-1 分别用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切，酶切产物用 1.0 % 琼脂糖凝胶回收纯化。分别取回收后的目的片段及载体片段，以 6∶1(目的片段∶载体片段)比例混合，在 T_4 DNA 连接酶的作用下 16 ℃连接过夜，然后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，37 ℃孵箱培养过夜，挑取阳性克隆扩增、提取质粒后进行酶切反应，经初步鉴定正确后送上海生工公司测序。

1.2.3 P311 重组蛋白的诱导表达 挑选构建成功的重组质粒 pGEX-4T-P311 和和空质粒 pGEX-4T-1 转化 BL21(DE3)感受态细胞，37 ℃培养过夜后，分别挑取重组载体和空载体的单克隆菌落接种于 5 ml 含 Amp 的 LB 培养基中，37 ℃培养过夜。各取上述过夜菌 100 μl 转接入 10 ml 含 Amp 的新鲜 LB 中，37 ℃振荡培养至 *D*(600)为 0.8 ~ 1.0 时，各取 1 ml 菌液记为 0 h(作为对照)，然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续振荡培养，分别各取加入 IPTG 后 1、2、4 h 菌液 1 ml。将收取的菌液于 4 000 r/min 离心 1 min 后收集沉淀，用 100 μl 0.01 mol/L 冰 PBS 混悬。冰浴超声裂解，各加入 2 × SDS 上样缓冲液 100 μl，煮沸 5 min，12 000 r/min 离心 3 min。取上清 20 μl 进行 SDS-PAGE 电泳(5% 积层胶，12% 分离胶)，凝胶用考马斯亮蓝染色。

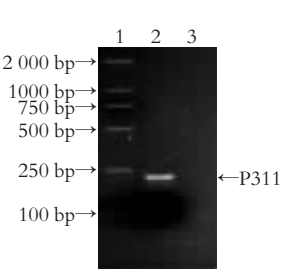
1.2.4 P311 重组蛋白的 Western blot 鉴定 取上一步实验获得的实验组和对照组上清 20 μl 经 SDS-PAGE 分离后，半干法(2 mA/cm^2，30 min)电转移至 PVDF 膜，以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入兔抗 GST 多克隆抗体(1∶1 000 稀释)，4 ℃过夜。1‰ TBST 洗膜，10 min/次，共 4 次，最后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1∶2 000 稀释)，室温下孵育 1 h，1‰TBST 洗膜，10 min/次，共 4 次，最后加入化学发光试剂显色，于 Bio-Rad 凝胶成像仪显影。

1.2.5 P311 重组蛋白的纯化及 Western blot 鉴定 分别接种 2 ml 重组菌和空载菌的过夜菌液至 200 ml 含 Amp 的新鲜 LB 中，37 ℃振荡培养至 *D*(600)为 0.8 ~ 1.0 时，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，37 ℃继续振荡培养 4 h，收集菌液于 4 ℃于 4 000 r/min 离心 10 min 后收集沉淀，用 10 ml 0.01 mol/L 冰 PBS 混悬沉淀，加入乙二胺四乙酸二钠(EDTA)至终浓度为 2 mmol/L，冰浴超声裂解。4 ℃孵育 1 h 后，4 000 r/min 离心 15 min，取上清加入 400 μl 谷胱甘肽琼脂糖小珠结合过夜。2 000 r/min离心 5 min 收集谷胱甘肽琼脂糖小珠，0.01 mol/L 冰 PBS 洗涤，1 ml/次，共 3 次。加入 300 μl 还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液(10 mmol/L 还原型谷胱甘肽，50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0)与谷胱甘肽琼脂糖小珠结合 1 h，2 000 r/min 离心5 min收集上清，再次加入 300 μl 洗脱液洗脱 1 h，收集两次洗脱液合为一管。取实验组和对照组各 10 μl 洗脱液加入 2 × SDS 上样缓冲液 10 μl，煮沸5 min，12 000 r/min 离心 3 min 后上样，按 1.2.4 步骤进行 Western blot 鉴定。

2 结果

2.1 人 P311 基因扩增结果

以 pCMV-Myc-P311 为模板，通过 PCR 反应扩增人 P311 基因，得到约 240 bp 左右的片段，与预期的结果相符(图 1)。



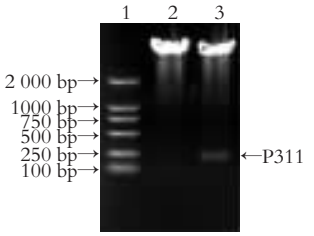
1：DNA 分子量标准 DL2000；2：P311 的 PCR 产物；3：阴性对照

图 1 P311 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 重组原核表达载体 pGEX-4T-P311 构建结果

pGEX-4T-P311 用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，可见 2 条

DNA 片段，1 条为载体片段，另 1 条约 240 bp 的片段为目的片段（图 2）。经测序证实结果正确，表明原核表达载体构建成功。

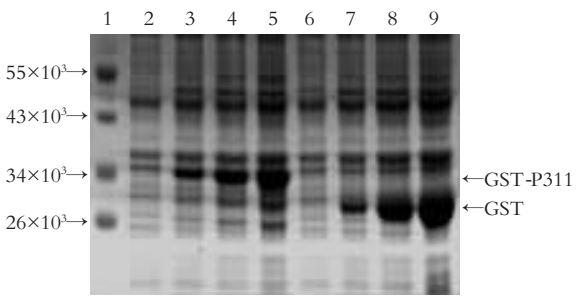


1：DNA 分子量标准 DL2000；2：pGEX-4T-1 双酶切；3：pGEX-4T-P311 双酶切

图 2　pGEX-4T-P311 双酶切琼脂糖凝胶电泳图

2.3　重组蛋白的诱导表达

分别用 IPTG 对 pGEX-4T-P311 重组载体和及 pGEX-4T-1 空载体进行诱导表达，12% SDS-PAGE 电泳，经快速考马斯亮蓝染色 5 min 后脱色，发现分别在 34×10^3 和 26×10^3 处得到与 GST-P311 融合蛋白和 GST 蛋白的相对分子质量相符的蛋白条带（图 3）。

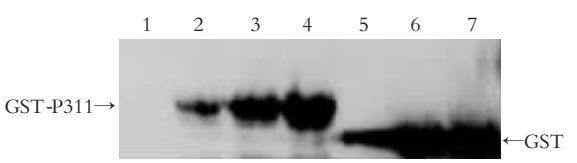


1：蛋白标准；2－5：IPTG（1mmol/L）诱导 pGEX-4T-P311 后 0，1，2，4 h；6－9：IPTG（1 mmol/L）诱导 pGEX-4T-1 后 0，1，2，4 h

图 3　不同诱导时相点 SDS-PAGE 电泳图

2.4　融合蛋白的 Western blot 鉴定

Western blot 化学发光分析显示，经诱导的菌体裂解物与兔抗 GST 多克隆抗体反应，GST-P311 融合蛋白组在相对分子质量约 34×10^3 处出现一条带，GST 蛋白组在相对分子质量约 26×10^3 处有单一条带。与预期理论值相符，说明所表达的融合有 P311 的蛋白是正确的（图 4）。

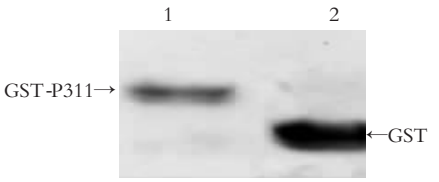


1－4：IPTG（1 mmol/L）诱导 pGEX-4T-P311 后 0，1，2，4 h；5－7：IPTG（1 mmol/L）诱导 pGEX-4T-1 后 1，2，4 h

图 4　pGEX-4T-P311 的 Western blot 鉴定

2.5　融合蛋白纯化后的 Western blot 鉴定

谷胱甘肽-琼脂糖小珠亲和纯化蛋白后，经 Western blot 检测结果显示与上述结果相同，即 GST-P311 融合蛋白组在相对分子质量约 34×10^3 处出现单一条带，GST 蛋白组在 26×10^3 出现单一条带（图 5），与预期目标一致。



1：纯化后的 GST-P311；2：纯化后的 GST

图 5　纯化后蛋白的 Western blot 鉴定

3　讨论

P311（又名 PTZ17，pentylenetrazol 17）基因由 Studler 等[9] 于 1993 年首先在胚胎晚期小鼠的脑组织中发现，该基因全长 472 bp，编码表达含 68 个氨基酸的蛋白，相对分子质量为 8×10^3。P311 蛋白表达于细胞质和细胞核中，它不属于任何已知蛋白家族，所以其功能尚不完全清楚[10]。目前对于 P311 蛋白结构的研究文献报道也很少。Taylor 等[8] 研究证实：由于 P311 基因的 N 末端存在易被泛素-蛋白酶降解的 PEST 结构域，P311 蛋白能被 MeT-HGF-SF（MeT-heptocyte growth factor/scatter factor）、泛素-蛋白酶系统和目前未知的金属蛋白酶等多条通路的作用而降解，从而导致 P311 蛋白的半衰期极短。本实验室在前期对 P311 原核表达的预实验中，利用带有连续 6 个组氨酸残基序列（6×His Tag）的 pET20b（+）和 pET30a（+）为载体表达该蛋白，但未获得成功。因此，在本次实验中我们选用了 pGEX-4T-1 原核表达载体，该载体与 pET20b（+）和 pET30a（+）载体相比，不同之处在于：①pGEX-4T-1 载体是表达 GST 融合蛋白的高效表达载体，其所表达的蛋白产物在 N 端带有 GST 序列，融合蛋白产物可通过 GST 层析柱快速、简便的纯化，也可以通过凝血酶、X 因子等切割后快速释放；②表达标签蛋白 GST 的相对分子质量较大，为 26×10^3；③GST 标签蛋白本身溶解性高，可以增加融合表达蛋白的溶解性。④GST 标签蛋白在大肠杆菌 BL21（DE3）中不易被蛋白水解酶降解[11]。本实验中我们通过 Western blot 检测表达的融合蛋白相对分子质量为 34×10^3，正好为 GST 和 P311 基因相对分子质量之和，结果表明 pGEX-4T-P311 重组载体成功表达了 GST-P311 融合蛋白，并且还对 GST-P311 融合蛋白进行了初步纯化，为我们下一步继续探讨 P311 的生物学功能提供了必要条件。同时本实验还提示：对于构建表达相对分子质量较小且容易降解蛋白的原核表达载体，选用带有较大相对分子质量标签蛋白的载体成功率较高。

参考文献：

[1] Roseborough I E, Grevious M A, Lee R C. Prevention and treatment of excessive dermal scarring[J]. J Natl Med Assoc, 2004, 96 (1): 108－116.

[2] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 7-12.
[3] Wu J, Ma B, Yi S, *et al*. Gene expression of early hypertrophic scar tissue screened by means of cDNA microarrays[J]. J Trauma, 2004, 57(6): 1276-1286.
[4] 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.
[5] 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.
[6] 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.
[7] Shi J, Badri K R, Choudhury R, *et al*. P311-induced myofibroblasts exhibit ameboid-like migration through RalA activation[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(17): 3432-3442.
[8] Taylor G A, Hudson E, Resau J H, *et al*. Regulation of P311 expression by MeT-hepatocyte growth factor/scatter factor and the ubiquitin/proteasome system[J]. J Biol Chem, 2000, 275(6): 4215-4219.
[9] 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.
[10] 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.
[11] Harris M. Use of GST-fusion and related constructs for the identification of interacting proteins[J]. Methods Mol Biol, 1998, 88: 87-99.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)01-0022-02

脑胶质细胞瘤患者血清 IGF-1 表达的生物学意义

杨福兵,刘剑波,陈礼刚,董劲虎,黄云华,王新志,胡殿峰 (泸州医学院附属医院神经外科,四川 泸州 646000)

脑胶质细胞瘤的诊断主要依靠影像学检查,但病变早期影像学表现往往不明显。脑胶质细胞瘤的预后与其生物学行为特性密切相关,早期诊断、早期治疗对于改善患者预后有重要意义。临床上亟需某种指标用于早期诊断及预后评估,这对于脑胶质细胞瘤的防治有重要意义。研究表明,胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)在体内许多肿瘤,如肺癌、结肠癌、乳癌、前列腺癌组织中高表达[1],其在外周循环中表达水平也升高。而脑胶质细胞瘤患者外周循环中 IGF-1 的相关性研究,国内外少见文献报道。我们探讨 IGF 与脑胶质细胞瘤发生的关系及其机制,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料与仪器

选取 2003 年 12 月至 2004 年 9 月在本院神经外科住院治疗的脑胶质细胞瘤患者 30 例为试验组,平均年龄 39.1 岁,其中男性 17 例,女性 13 例。均行手术治疗,术后病理证实为脑胶质细胞瘤。根据 WHO 分类标准,低级别组共 16 例:星形细胞瘤 6 例,少枝胶质细胞瘤 4 例,室管膜瘤 4 例,脉络丛乳突状瘤 2 例;高级别组共 14 例:胶质母细胞瘤 6 例,极性胶质母细胞瘤 5 例,髓母细胞瘤 3 例。30 例脑胶质细胞瘤患者均排除高血压、糖尿病等内科疾病及其他合并症。抽取同期门诊体检的 20 例正常人作对照组。实验组与对照组之间年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。

无菌抽取晨空腹非抗凝血 3 ml,脑胶质细胞瘤患者手术后 7~10 d 采血,离心提取血清,放置低温冰箱 -34 ℃保存。DSL-2800 IGF-1-IRMA 试剂盒、DSL-7100 IGFBP-II-RIA 试剂盒(美国 DSL 公司)。低温水平离心机;γ-免疫计数仪;Sanyo 低温冰箱;西门子恒温冰箱;磁力振荡仪;微量进样器。

1.2 实验方法

对实验组和对照组分别采用免疫放射量度分析(IRMA)测定血清中 IGF-1 的表达水平。

1.3 统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,多组间比较采用单因素方差分析,成组配对资料采用 t 检验。

2 结果

低级别组、高级别组血清 IGF-1 的表达水平分别与对照组比较[分别为(387.77±90.93)、(797.49±205.62)、(273.17±87.25) ng/ml]有显著性差异($P<0.01$);高级别组与低级别组比较有显著性差异($P<0.01$);试验组手术血清 IGF-1 的表达水平差异显著($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 IGF-1 的生物学特性

IGF-1 是 IGF 家族中的一员,是由 70 个氨基酸残基组成具有内分泌、自分泌和旁分泌特性的单链多肽,相对分子质量为 7 649,有 B、C、A、D 4 个结构域,通过 3 个二硫键交叉连接而成,基因位于 12 号染色体 q22~24,1 区。因其与胰岛素结构具有高度同源性,且有胰岛素样代谢效应而得名[2]。

IGF-1 通过其受体(IGF-1R)发挥促进细胞分化增殖、抑制凋亡及类胰岛素代谢作用。IGF-1 大多与胰岛素样生长因子结

(下转 26 页)

作者简介:杨福兵,男,四川省安岳县人,主任医师,教授,主要从事颅底神经外科、脊柱脊髓神经外科方面的研究。电话:13508036711,E-mail:fubingyang1@hotmail.com

收稿日期:2006-12-04;修回日期:2007-06-17