论著

文章编号:1000-5404(2010)19-2058-04

人钠泵 α2 亚基 M4～M5 区片段的克隆、原核表达与纯化

刘志文[1],连易水[2],张 玥[1],王永利[1,2],王 伟[1],赵兴茹[1],崔京霞[1] (050017 石家庄,河北医科大学:药学院药剂教研室[1],基础医学院药理教研室[2])

【摘要】 目的 构建钠泵 α2 亚基第4跨膜区与第5跨膜区之间的蛋白结构域 M4～M5 的原核表达载体,并在大肠杆菌中进行表达和纯化。方法 通过PCR反应和酶切技术,构建表达载体 pET28b(+)-M4-5,并于大肠杆菌 *E. coli* Rosetta 2 进行表达,用6 mol/L 盐酸胍对表达形成的不溶包涵体进行变性,梯度稀释复性后,用 Ni-NTA 亲和柱进行纯化,得到目的蛋白,用 Western blot 分析表达产物,并采用无机磷法测定其 ATP 酶活性。结果 重组表达载体 pET28b(+)-M4-5 经酶切与测序鉴定证实构建成功;导入大肠杆菌 Rosetta 2 进行表达,表达产物相对分子质量为 52×10^3 左右,与预期值相符,表达量占细胞全蛋白的30%左右;SDS-PAGE 分析表明,表达产物主要以包涵体形式存在,亲和柱纯化后,目的蛋白的纯度在95%以上;Western blot 分析表明表达产物与抗 His 抗体特异性结合;重组蛋白的 ATP 酶活性为(15.3±1.8) mmol·(g·h)$^{-1}$。结论 构建了原核表达载体 pET28b(+)-M4-5,并在大肠杆菌 Rosetta 2 中成功表达,亲和纯化获得较高纯度的 M4～M5 融合蛋白。

【关键词】 钠泵 α2 亚基;表达纯化;包涵体;复性

【中图法分类号】 R394-33;R394.3 【文献标志码】 A

Cloning, prokaryotic expression and purification of M4-M5 domain fragments in human Na^+, K^+-pump α2 isoform

Liu Zhiwen[1], Lian Yishui[2], Zhang Yue[1], Wang Yongli[1,2], Wang Wei[1], Zhao Xingru[1], Cui Jingxia[1] ([1]Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, [2]Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050017, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct the prokaryotic expression vector of M4-M5 between the fourth and fifth transmembrane domains of Na^+, K^+-pump α2 isoform, and express and purify it in *E. coli*. **Methods** PCR and enzyme digestion technology were used to construct a recombinant plasmid pET28b(+)-M4-5, which was transformed into *E. coli* Rosetta 2. The expression plasmid in soluble inclusion bodies was degenerated with 6 mol/L GuHCl, refolded through gradient dilution in a buffer system. The target protein was purified by Ni^{2+}-NTA affinity chromatography, and verified by Western blotting, and its ATPase activity was detected by inorganic phosphonium colourimetry. **Results** Restriction endonuclease digestion and recombinant plasmid sequencing demonstrated that the expression vector pET28b(+)-M4-5 was successfully constructed. After the target protein was induced into *E. coli* Rosetta 2, its relative molecular weight was about 52×10^3 as expected, accounting for about 30% of the total bacterial protein. SDS-PAGE analysis showed that the protein existed mostly in the form of inclusion bodies. After purification by affinity chromatography, the fusion protein had a purity of above 95%. Western blotting analysis showed that the expressed protein could specifically bind to anti-His antibody with an ATPase activity of (15.3±1.8) mmol·g^{-1}·h^{-1}. **Conclusion** The prokaryotic expression vector pET28b(+)-M4-5 can be correctly constructed. The M4-M5 fusion protein can be expressed in *E. coli* Rosetta 2 and purified by affinity chromatography with a high purity.

【**Key words**】 Na^+-pump α2 isoform; expression and purification; inclusion body; refolding

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700324) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2008001070). Corresponding author: Cui Jingxia, E-mail: cjxlib@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30700324);河北省自然科学基金(C2008001070)

【通信作者】 崔京霞,E-mail:cjxlib@sina.com

钠泵(Na^+,K^+-ATPase)是哺乳动物细胞膜上普遍存在的一种离子泵,在维持细胞膜内外 Na^+ 和 K^+ 浓度梯度、渗透压平衡、静息电位水平以及可兴奋组织的兴奋性方面发挥重要作用[1]。钠泵由 α、β、γ 3 个亚单位组成,其中 α 亚基是催化亚基,具有酶的活性和许多钠泵调节因子的作用位点[2]。它贯穿嵌入膜中,有 10 个跨膜区(M1 ~ M10),其中 M4 ~ M5 区直接参与了 ATP 的催化水解,该区包含 2 个重要区域:A 区(核酸结合区)和 P 区(磷酸化区),A 区含保守序列 DKTG,可以与 ATP 结合,并在 P 区的作用下,使 Asp^{369} 位点发生磷酸化或去磷酸化,同时伴随 Na^+ 和 K^+ 的跨膜转运[3]。α 亚基主要存在 3 种亚型:α1、α2、α3,各亚型与 Na^+、K^+ 等离子以及强心苷类物质的亲和力不同,其表达有组织特异性和种属差异性。近期的研究表明,在心脏组织中,不同的 α 亚型分布于同一细胞的不同区域,这种分布很可能与其生理功能有重要关系[4-7]。DOCA-盐高血压鼠、自发性高血压鼠等多种高血压动物模型心脏组织中钠泵 α2 亚单位的 mRNA 表达明显降低,其蛋白表达亦明显受抑制[8];并且这些高血压鼠经降压治疗后,钠泵 α2 亚单位活性较降压前明显好转,提示钠泵 α2 亚单位功能活性在高血压病中具有重要的作用[9]。本研究构建钠泵 α2 亚基 M4 ~ M5 膜内区蛋白 M4 ~ M5 的原核表达体系,表达并纯化目的蛋白,为进一步探讨钠泵 α2 亚基的生物学功能及探讨钠泵在体内的作用机制及与疾病发生的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与试剂

大肠杆菌 Rosetta 2 和表达载体 pET-28b(+)为美国 Novagen 公司产品,质粒 pYhNa2(含人钠泵 α2 cDNA 基因序列)由美国 Robert Farley 教授惠赠,Pyrobest DNA 扩增酶、各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,Ni-NTA HisBind® Superflow™亲和层析柱购自 Novagen 公司,antiHis 抗体、羊抗小鼠 IgG-HRP 购自北京中山生物技术有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自 PIERCE 公司。

1.2 主要仪器

T-Gradient PCR 仪(德国 Biometra 公司),TFP-M/WL 凝胶成像分析仪(法国 VLLBER LOURMAT 公司),MIKRO 22 冷冻高速离心机(德国 Hettich 公司),VCX750 超声波细胞破碎仪(美国 Sonic 公司),HD-3 紫外检测仪(上海沪西分析仪器厂),CBS-A 程控全自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂)。

1.3 引物

由上海 Sangon 生物技术公司合成。引物 a(正义链):5′-CACTGTCACTGCTAGCCTGAC-3′(下划线为 *Nhe* Ⅰ 酶切位点),引物 b(反义链):5′-TGTTGCTGGTCGACGTGTA-3′(下划线为 *Sal* Ⅰ 酶切位点)。

1.4 主要试剂的配制

细菌裂解液(pH 8.5):50 mmol/L Tris-base,2 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,0.5% Triton X-100;洗涤液 A(pH 8.0):50 mmol/L Tris-base,0.2 mmol/L EDTA,50 mmol/L NaCl,2 mmol/L 尿素,5 mmol/L β-巯基乙醇,0.5% Triton X-100;盐酸胍溶液(pH 8.0):6 mol/L 盐酸胍,50 mmol/L Tris-base,5 mmol/L β-巯基乙醇,5% 甘油;复性 TED 溶液(pH 7.6):10 mmol/L Tris-base,1 mmol/L EDTA,5 mmol/L β-巯基乙醇,0.15 mol/L NaCl;Binding buffer(pH 7.9):5 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-base;Washing buffer(pH 7.9):30 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-base;Elution buffer(pH 7.9):250 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-base;Strip buffer(pH 7.9):100 mmol/L EDTA,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-base;透析缓冲液(pH 8.0):20 mmol/L Tris-base。

1.5 方法

1.5.1 M4 ~ M5 克隆载体的构建 以质粒 pYhNa2(含人钠泵 α2 cDNA 基因序列)为模板,用引物 a、b 进行 PCR 反应扩增出 M4 ~ M5,并在两端分别引入 *Nhe* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切位点。将 PCR 产物用 *Nhe* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切,与同样双酶切的 pMD18-T 载体连接,得到的转化子即含有钠泵 α2 亚基膜内区蛋白 M4 ~ M5 序列。

PCR 采用 50 μl 反应体系:ddH_2O 32.7 μl,10 × PCR buffer 5 μl,BSA(0.1%) 5 μl,dNTP(25 mmol/L) 4 μl,模板 pYhNa2 质粒(约 100 ng/μl)1 μl,引物 a 和 b(20 μmol/μl)各 1 μl,pyrabest DNA 聚合酶 0.3 μl。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min→56.3 ℃ 1 min→72 ℃ 1.5 min,共 26 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃保温。

1.5.2 M4 ~ M5 表达体系的构建 将含有 M4 ~ M5 基因序列的质粒 pMD18T-M4-5 用 *Nhe* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切,酶切产物连到同样双酶切的大肠杆菌质粒 pET-28b(+),转化 *E. coli* DH5α。筛选带有 Amp 抗性的重组质粒,即为所要的表达质粒。提取表达质粒 pET-28b(+)-M4-5,转化 *E. coli* Rosetta 2,得到 M4 ~ M5 表达体系。

1.5.3 M4 ~ M5 蛋白的诱导表达 1% 接种 M4 ~ M5 基因重组菌于 LB 液体培养基,于 37 ℃,200 r/min 培养至光密度值[D(600)值]达 0.6,参考 pET 蛋白表达手册,分别加入终浓度为 0.4、1.0、2.0 mmol/L 的诱导剂 IPTG,于不同的诱导温度:25、30、37 ℃诱导表达,诱导后 0、1、3、5、7 h 取样,用 SDS-PAGE 检测蛋白的表达效率,优化出最佳诱导表达条件。

1.5.4 菌体的破碎和包涵体的变性复性 将发酵液于 4 ℃,5000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 PBS 缓冲液洗 2 遍,5000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀中加入 1/10 菌液体积的细菌裂解液,加溶菌酶至 1 mg/ml,4 ℃破碎 1 h,然后冰浴超声破碎 10 min。4 ℃,15 000 r/min 冷冻离心 30 min,弃去上清,沉淀用洗涤液 A(加入 0.5 mmol/L PMSF)洗 2 次,15 000 r/min 冷冻离心 30 min,弃去上清。向沉淀加入适量 6 mol/L 盐酸胍溶液(加入 0.5 mmol/L PMSF),4 ℃变性 1 h。将盐酸胍变性溶液于 4 ℃,15 000 r/min 冷冻离心 30 min,弃去沉淀;上清(加入 1% 的甘氨酸)转入透析袋,放进用含 4 mol/L 盐酸胍的 TED 溶

液中恒容梯度透析过夜至盐酸胍浓度在2 mol/L以下[10]。

1.5.5 亲和层析纯化重组蛋白M4～M5 将复性的蛋白溶液放入Binding buffer溶液中透析2 h,4 ℃,15 000 r/min离心30 min,上清液用0.22 μm的滤膜过滤,收集滤液,于Ni-NTA HisBind Superflow™亲和层析柱进行纯化,流速控制在0.2 ml/min,收集目的蛋白峰,于透析液中透析24 h除盐,即得到纯化的蛋白[11]。

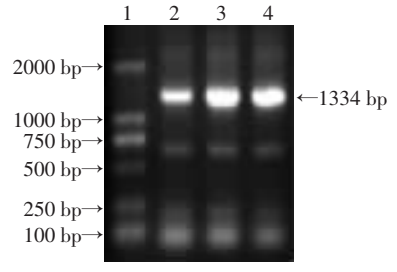
1.5.6 重组蛋白的Western blot鉴定 将Ni^{2+}亲和层析纯化后的融合蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳后,电转移到硝酸纤维素膜上,50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h,将用5%脱脂奶粉稀释的抗His抗体滴在膜的蛋白质面上,4 ℃静置过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入辣根过氧化酶标记的羊抗小鼠IgG二抗,37 ℃温育1 h,TBST洗膜3次,DAB显色试剂盒进行显色,凝胶成像仪照相。

1.5.7 重组蛋白的ATP酶活性测定 采用无机磷法测定Na^+、k^+-ATP酶活性:取纯化后的蛋白液(溶于20 mmol/L Tris-HCl缓冲液)0.1 ml(约50 μg蛋白),加入反应液($MgCl_2$ 3.6 mmol/L,NaCl 80 mmol/L, KCl 33 mmol/L, L-组氨酸80 mmol/L,EDTA 0.5 mmol/L,ATP 2.5 mmol/L)0.9 ml,混匀后置37 ℃恒温水浴中反应1 h,然后以冷的20%三氯乙酸0.2 ml终止反应。离心后取上清液,加显色剂显色,于紫外可见分光光度计测定释放的Pi量[12]。

2 结果

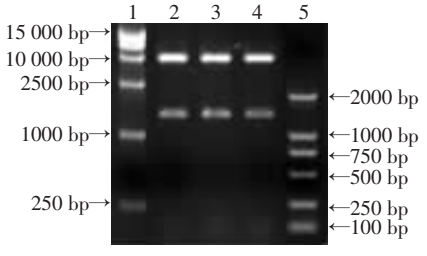
2.1 M4～M5表达体系的构建

以质粒pYhNa2为模板,PCR扩增得到长度为1334 bp的扩增产物M4～M5(图1)。用*Nhe* Ⅰ和*Sal* Ⅰ双酶切表达质粒pET28b(+)-M4-5,琼脂糖电泳后在相应约1300 bp处得到1条DNA片段,符合预期结果(图2)。测序报告显示,核苷酸的序列、插入方向以及表达框无误,表明M4～M5的蛋白表达载体pET28b(+)-M4-5构建成功。



1:DNA标准(DL 2000) 2～4:M4～M5的PCR扩增产物

图1 琼脂糖凝胶电泳检测钠泵α2亚基M4～M5区的PCR扩增产物

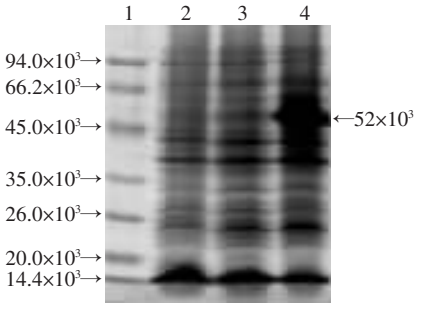


1:DNA标准(DL 15 000) 2～4:*Nhe* Ⅰ和*Sal* Ⅰ双酶切pET28b(+)-M4-5 5:DNA标准(DL 2000)

图2 pET28b(+)-M4-5的双酶切琼脂糖凝胶电泳分析

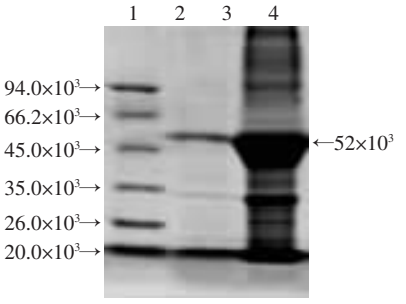
2.2 表达产物M4～M5的SDS-PAGE分析

用1 mmol/L IPTG于37 ℃诱导5 h时,紫外凝胶成像扫描系统显示此表达蛋白占菌体总蛋白的30%左右,相对分子质量约52×10^3(图3),目的蛋白90%以上以不溶性的包涵体形式存在,细菌的裂解上清中(可溶性表达部分)仅存在微量目的蛋白(图4)。



1:低分子量蛋白标准 2:诱导的Rosetta-2/pET-28b(+)空对照菌; 3:未诱导的Rosetta-2/pET-28b(+)-M4-5菌 4:诱导的Rosetta-2/pET-28b(+)-M4-5菌

图3 重组表达蛋白M4～M5的SDS-PAGE电泳分析

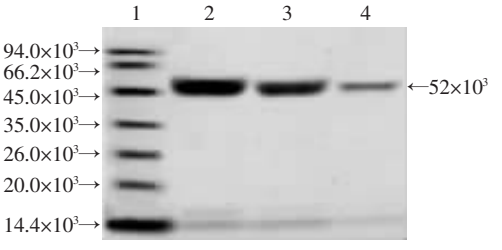


1:低分子量蛋白标准 2:超声上清中的M4～M5重组蛋白 3:包涵体中的M4～M5重组蛋白

图4 SDS-PAGE电泳分析重组蛋白M4～M5在细胞内的分布

2.3 M4～M5蛋白的分离纯化

表达蛋白经变性和复性处理,Ni^{2+}-NTA亲和层析纯化后,在相对分子质量约为52×10^3处有1条蛋白富集带,与理论计算的一致(图5)。SDS-PAGE分析表明,纯化后目的蛋白的纯度在95%以上。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度为398.7 μg/ml。



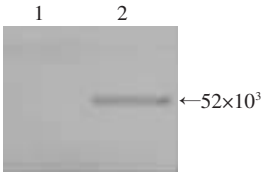
1:低分子量蛋白标准 2～4:Ni-NTA亲和层析收集的M4～M5重组蛋白样品

图5 Ni^{2+}-NTA亲和柱纯化M4～M5重组蛋白的SDS-PAGE电泳分析

2.4 表达产物M4～M5的Western blot分析

诱导后的菌体蛋白在相对分子质量52×10^3处出现明显的

显色印迹,表明诱导后菌体表达出大量的 M4 ~ M5 蛋白,可与抗 His 抗体特异性结合(图 6)。



1:诱导后的 Rosetta-2/pET-28b(+)空对照菌;2:Ni^{2+}-NTA 亲和层析纯化的 M4 ~ M5 重组蛋白

图 6 重组蛋白 M4 ~ M5 的 Western blot 分析

2.5 重组蛋白的 ATP 酶活性测定

重组蛋白具有一定的 ATP 酶活性,其大小为(15.3 ± 1.8) mmol·(g·h)$^{-1}$。

3 讨论

钠泵的异常与许多疾病相关,如原发性高血压,患者细胞膜的离子转运系统发生结构和功能的异常变化。钠泵 α2 亚基可能在其中发挥着不可替代的作用。有研究表明,纯合子 α2 亚基缺陷型小鼠出生后不久就会死亡,而杂合子 α2 亚基缺陷型小鼠会患迟发性肥胖症[13]。虽然钠泵 α 亚单位各亚型的功能及其生物学意义尚未可知,但其表达的改变很可能具有重要的病理意义。

由于真核细胞偏爱的密码子和原核系统不同,在用原核系统表达真核基因的时候,真核基因中的一些密码子对于原核细胞来说可能是稀有密码子,从而导致表达效率和表达水平很低,为此,我们选择宿主菌 Rosetta 2 来进行表达,该宿主菌本身携带有 pRARE2 质粒,可补充大肠杆菌缺乏的 7 种稀有密码子(AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA 和 CGG)所对应的 tRNA,从而提高外源的真核基因在原核系统中的表达水平。在本研究中目的蛋白在原核表达系统 Rosetta 2-pET28b 中得到了大量表达,并且 90% 以上以不溶性的包涵体形式存在。

重组蛋白在大肠杆菌中的高表达往往形成不可溶、无生物活性的包涵体,包涵体的复性已经成为生物制药的瓶颈。本研究首先用 Triton X-100 洗涤包涵体,去除其上粘附的杂质后采用 6 mol/L 的盐酸胍溶解包涵体,采用盐酸胍主要有 2 个原因:一是因为盐酸胍是一种相对更强的变性剂,它能使尿素不能溶解的包涵体溶解;二是因为尿素分解的异氰酸盐能导致多肽链的自由氨甲酰化;复性时采用梯度透析复性法,以助于减少蛋白质在复性过程中产生沉淀,提高活性蛋白收率。复性的蛋白液经 Ni^{2+} 亲和色谱纯化后,得到纯度在 95% 以上的目的蛋白 M4 ~ M5,该蛋白的获得,为进一步阐明钠泵的作用机制及与相关临床疾病的关系奠定了基础。

参考文献:

[1] Aperia A. New roles for an old enzyme:Na, K-ATPase emerges as an interesting drug target[J]. J Intern Med, 2007, 261(1):44 - 52.

[2] Dempski R E, Friedrich T, Bamberg E. Voltage clamp fluorometry: combining fluorescence and electrophysiological methods to examine the structure-function of the Na(+)/K(+)-ATPase[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(6):714 - 720.

[3] Grycova L, Sklenovsky P, Lansky Z, *et al*. ATP and magnesium drive conformational changes of the Na^+/K^+-ATPase cytoplasmic headpiece [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(5):1081 - 1091.

[4] Lecuona E, Trejo H E, Sznajder J I. Regulation of Na, K-ATPase during acute lung injury[J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(5/6): 391 - 395.

[5] Richards K S, Bommert K, Szabo G, *et al*. Differential expression of Na^+/K^+-ATPase alpha-subunits in mouse hippocampal interneurones and pyramidal cells[J]. J Physiol, 2007, 585(Pt 2):491 - 505.

[6] Viola M S, Rodriguez-de Lores-Arnaiz G. Brain Na^+, K^+-ATPase isoforms:different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment[J]. Life Sci, 2007, 81(3):228 - 233.

[7] Desai-Shanti N, Desai P V. The study of Na^+, K(+)-ATPase activity of rat brain during Crush syndrome[J]. Neurochem Res, 2007, 32 (11):1843 - 1848.

[8] Kent M A, Huang B S, Van-Huysse J W, *et al*. Brain Na^+, K^+-ATPase isozyme activity and protein expression in ouabain-induced hypertension[J]. Brain Res, 2004, 1018(2):171 - 180.

[9] Liu X, Songu-Mize E. Alterations in alpha subunit expression of cardiac Na^+, K^+-ATPase in spontaneously hypertensive rats:effect of antihypertensive therapy [J]. Eur J Pharmacol, 1997, 327 (2/3): 151 - 156.

[10] 邹佳, 葛晓冬, 杨艳丽, 等. 抗人氨基末端脂多糖结合蛋白二硫键稳定性 Fv 抗体的制备及生物学活性的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(14):1308 - 1311.

[11] 崔京霞, 纪剑飞, 倪剑锋, 等. 重组铜绿假单胞菌外毒素 PE38KDEL 的克隆、表达与活性检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12):985 - 990.

[12] 徐彬. 人红细胞 Na^+, K^+-ATP 酶活性测定法及临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(5):67 - 69.

[13] Kawakami K, Ikeda K. Modulation of neural activities by Na, K-ATPase alpha 2 subunit through functional coupling with transporters [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2006, 52(8):92 - 96.

(收稿:2010-04-12 修回:2010-05-27)

(编辑 张 维)