His-AMPKα1^{312} 截短缺失融合蛋白原核表达载体的构建与纯化

颜 洪,张 琼,吴 丹,宋华培 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 构建 His-AMPKα1^{312}截短缺失融合蛋白原核表达载体,表达重组 AMPKα1^{312}为深入研究各种病理生理条件对 AMPK 活化的影响奠定基础。**方法** 经 RT-PCR 获得 AMPKα1 截短基因片段,定向插入原核表达载体 PET28a(+),构建重组表达质粒 YH2/PET28a(+),转化 DH5α*E. coli*,经 IPTG 诱导表达及镍琼脂糖凝胶亲和层析纯化后 SDS-PAGE 分析及 Western blot 检测。**结果** 经测序和 PCR 证实重组表达质粒 YH2/PET28a(+)构建正确。表达的截短缺失蛋白相对分子量约为 38 kD,Western blot 分析表明,表达蛋白具有良好的抗原性。**结论** 已成功构建并纯化了具有生物学活性的 AMPKα1^{312}截短缺失蛋白,为深入研究 AMPK 奠定了基础。

[关键词] 腺苷酸活化蛋白激酶;原核表达;蛋白纯化
[中图分类号] Q78 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)04-0349-04

Prokaryotic expression and purification of rat c-terminal truncation mutant of the AMPK fusion protein

YAN Hong, ZHANG Qiong, WU Dan, SONG Hua-pei (Burn Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express rattus His-AMPKα1^{312} truncated fusion protein in E. coli, the expressed product for its bioactivity were purified and analyzed. **Methods** The truncated AMPKα1 gene was amplified by RT-PCR and inserted into prokaryotic expression vector PET28a(+). The constructed recombinant plasmid YH2/PET28a(+) was transformed to DH5α *E. coli* for expression under induction of IPTG. The expressed His-AMPKα1^{312} fusion protein was purified by Ni^{2+}-NTA Agarose affinity chromatography and identified for reactogenicity. **Results** The DNA sequence of amplified truncated AMPKα1 gene was consistent with that reported in GenBank. Recombinant plasmid YH2/PET28a(+) was constructed correctly. The expressed recombinant protein, with a relative molecular mass of about 38kd, showed good reactogenicity. **Conclusion** The His-AMPKα1^{312} truncated fusion protein was successfully constructed and purified with bioactivity, which laid a foundation of further study on the function of AMPK.

Keywords: AMP-activated protein kinase(AMPK); prokaryotic expression; protein purification

能量代谢障碍是缺氧导致细胞和组织器官损害的根本原因,因此缺氧条件下,细胞及时有效地启动内源性能量保护机制对保护细胞功能,提高细胞抗缺氧能力至关重要。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)作为细胞能量状态的感受器和调节器在维持细胞能量稳态和适应性反应中扮演关键角色[1]。AMPK 属于一组进化保守的丝/苏氨酸蛋白激酶家族,由一个催化亚基(α)和两个调节亚基(β 和 γ)3 个亚单位组成[2]。AMPKα 亚基 Thr172 位点被其上游激酶(AMPKK)磷酸化是 AMPK 充分活化的主要标志和必要条件。本研究拟利用基因重组技术构建 His-AMPKα312 截短缺失融合蛋白,将其作为 AMPK 磷酸化激活的检测底物,为深入研究各种病理生理条件对 AMPK 活化的影响奠定基础。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304002
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30600649);军队十二五重点项目(BWS11J039)
[收稿日期] 2013-03-10 [修回日期] 2013-03-28

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠乳鼠原代心肌细胞;Tripure isolation reagent (TIR);Trizol RNA; ReverTra Ace-α-TM-RT-PCR Kit (TOYOBO); DNA Marker DL2000 (TaKara); Taq DNA 聚合酶(MBI Fermentas); DNA 回收试剂盒(TIANGEN);质粒小提试剂盒(Axygen); AMPK-αpan 抗体,磷酸化 AMPK-α 抗体(Upstate);PCR 仪(ABI PCR System 2700);高速低温离心机(Beckman);凝胶成像分析系统(BioRad)。Anti-His Antibody 购自天根生化科技(北京)有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG) 及二硫苏糖醇(DDT) 购自 BBI 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建和蛋白表达检测 AMPKα1 基因扩增:取新生 Wistar 大鼠心室肌, 0.125% 胰蛋白酶消化分离, 置入含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基的培养皿中, 利用差速贴壁法除去非心肌细胞并加入 5-溴脱氧尿嘧啶 0.11 mmol/L 以抑制非心肌细胞增殖。培养 48 h 后收获细胞, Trizol 试剂提取细胞总 RNA,以其为模板,按 ReverTra Ace-α-TM-RT-PCR Kit 试剂盒说明书操作,经逆转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,

cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增获得 1 011 bp 的 prkaa1(即 AMPKα1 基因)大片段基因。引物是根据 prkaa1 大片段基因序列自行设计,引物序列见表 1。反应条件为:94 ℃变性 5 min,然后开始 PCR 循环:94 ℃ 60 s→55 ℃ 60 s→72 ℃ 60 s,共 35 个循环, 72 ℃延长 10 min ,4 ℃保存。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 引物序列

基因	基因库序列号	序列(5-3)	产物长度
prkaa1 (AMPKα1)	NM_019142	F:5'-ATGGCCGAGAAGCAGAAG-3' R:5'-GGCTTCGTTCATTATTCTCC-3'	1 011
GAPDH	NM_017008	f:5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' r:5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'	1 011
截短 prkaa1 (AMPKα1)	NM_019142	F2:5' GGG GGATCCATGGCCGAGAAGCAGAAG-3' (下划线为 BamH Ⅰ酶切位点) R2:5'-A GAATTCTTAGTACAGGCAGCTGAGG-3' (下划线为 HindⅢ酶切位点)	936

目的基因的克隆:①prkaa1-936 目的基因片段的扩增。PCR 扩增 prkaa1-936 目的基因的引物是根据 prkaa1-936 基因序列自行设计,并在片段末端加有终止密码子,片段左右两端分别加上 BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ酶切位点,引物序列见表 1。扩增片段大小为 936 bp。反应条件为:94 ℃变性 5 min,然后开始 PCR 循环:94 ℃ 60 s→55 ℃ 60 s→72 ℃ 60 s,共 35 个循环, 72 ℃延长 10 min ,4 ℃保存。DNA 电泳观察鉴定。②扩增所得片段连接 T 载体并测序。切胶,用回收试剂盒回收扩增片断。并连接 T-vector,回收产物 4.5 μl,T-vector 0.5 μl,Solution Ⅰ 5 μl,4 ℃过夜。连接产物转化 DH5α*E. coli*,涂 LB(Kan 抗性)平板,37 ℃过夜。挑取单个菌落,接于 3 mL LB(Kan 抗性)液体培养基中,37 ℃摇床过夜。用小提质粒试剂盒提取质粒,分别用 HindⅢ和 Xba Ⅰ双酶切和 BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切,1% 琼脂糖电泳检测,所提质粒正确。编号 YH2。

重组表达质粒的构建:将 YH2 质粒和 PET28a(+)分别用 BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切,分别回收酶切片断,反应体系:YH2 回收产物 4.5 μl,PET28a(+)回收产物 0.5 μl,Solution Ⅰ 5 μl,4 ℃过夜。连接产物转化 DH5α*E. coli*,涂 LB(Kan 抗性)平板,37 ℃过夜。挑取单个菌落,接于 3 mL LB(Kan 抗性)液体培养基中,37 ℃摇床过夜。用小提质粒试剂盒提取质粒,分别用 HindⅢ和 Xba Ⅰ双酶切和 BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切,1% 琼脂糖电泳检测,所提质粒正确。编号 YH2/PET28a(+)。

目的基因的诱导表达与检测:取 100 μl YH2/PET28a(+)菌液接于 4 mL LB(Kan 抗性)液体培养基中,37 ℃摇床培养至 OD600 在 0.6~0.8,加入 IPTG 诱导 3 h,分别取诱导前和诱导后的菌液作 SDS-PAGE 检验。

1.2.2 AMPKα1^{312}蛋白纯化 将构建成功的 prkaa1 表达菌株 200 μl 接种 LB 培养基 800 mL,37 ℃,250 r/min 离心,过夜培养,加诱导剂 IPTG 至浓度 1 mmol/L,继续培养 4 h。5 000 r/min离心 15 min,离心收集菌体,15 mL PBS 缓冲液重悬菌体,于冰浴超声破碎菌体后,12 000 r/min 离心 15 min,分别收集上清和沉淀。取上一步骤收集的沉淀,分别用 2 、4 、8 mol/L 尿素溶解,12 000 r/min 离心 15 min,取其上清制备电泳样品。另外,第一步的菌液(记为大样)和第二步的上清(记为上清)也分别制备电泳样品。电泳样品行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。将沉淀用 3 mL 8 mol/L 尿素溶解后,过镍琼脂糖凝胶柱,50 mmol/L 咪唑溶液洗涤,300 mmol/L 咪唑溶液洗脱并收集纯化蛋白 prkaa1,行 10% SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

1.2.3 重组蛋白的 Western blot 鉴定 将纯化的重组蛋白行 10% SDS-PAGE 后,采用半干转膜法转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。以 AMPK-pan α 抗体(1∶1 500 稀释),37 ℃ 孵育 2 h。以 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1∶10 000 稀释)为二抗,孵育 1 h。洗膜后于凝胶成像仪显影。

2 结果

2.1 目的基因的获得

在 prkaa1 大片段基因 RT-PCR 扩增的基础上调取 prkaa1-936 目的片段。DNA 电泳观察鉴定:取 10 μl PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,用 DL2000 Marker 作为 DNA 分子量标准带,溴乙锭染色,紫外透射仪上观察并照相。结果见 936 bp 出现特异扩增条带(图 1),与所需目的基因大小吻合。

2.2 重组质粒的双酶切鉴定及基因测序分析

将 PCR 产物和表达载体 PET28a(+)分别用 BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切,连接过夜,连接产物转化 DH5α*E. coli*。挑取单个菌落,用小提质粒试剂盒提取质粒,转化分别回收酶切片断,分别用 HindⅢ和 Xba Ⅰ双酶切和 BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切,1% 琼脂糖电泳检测,所提质粒正确(图 2)。阳性克隆送 Invitrogen 生物技术有限公司(上海)测序,结果证实所扩增的 prkaa1 基因序列完全正确,与 GenBank 数据库收录序列完全一致,并准确插入表达载体。将该重组质粒命名为 YH2/PET28a(+)。

2.3 目的蛋白的诱导表达及纯化

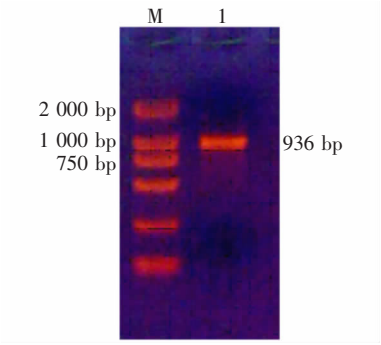
将构建成功的 prkaa1 表达菌株通过摇菌、破菌。取 100 μl YH2/PET28a(+)菌液接于 4 mL LB(Kan 抗性)液体培养基中,37 ℃摇床培养至 OD600 在 0.6~0.8,加入 IPTG 诱导 3 h,收集的沉淀,分别用 2、4、8 mol/L 尿素溶解做 SDS-PAGE 检测。结果见 prkaa1 是以包含体形式表达,并且大部分溶解于 8 mol/L尿素(图 3a)。将沉淀用 3 mL 8 mol/L 尿素溶解后,过镍琼脂糖凝胶柱,50 mmol/L 咪唑溶液洗涤,300 mmol/L 咪唑溶液洗脱并收集纯化蛋白 prkaa1,行 10% SDS-PAGE 检测蛋白纯度,结果显示如图 3b。

2.4 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Western blot 分析显示,纯化的重组蛋白可与兔抗大鼠 AMPK-αpan 抗体特异结合,在相对分子质量约 38 kD 处可见明显反应条带,见图 4。表明纯化的重组蛋白具有良好的反应原性。

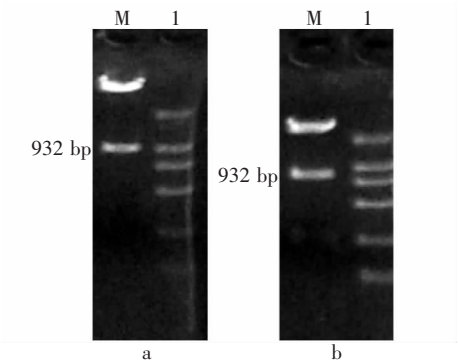
3 讨论

近年来的研究证明,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)



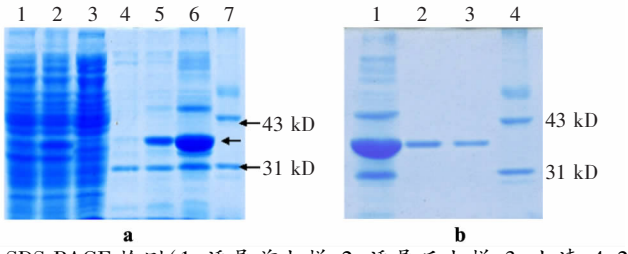
M:DL2000 Marker;1:RT-PCR 产物

图 1 prkaa1-936 PCR 产物电泳



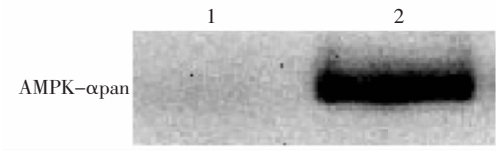
a:BamH Ⅰ 和 EcoR Ⅰ 双酶切;b:Hind Ⅲ 和 Xba Ⅰ 双酶切;M:DL2000 Marker;1:YH2/PET28a(+)

图 2 重组质粒的酶切鉴定



a:SDS-PAGE 检测(1:诱导前大样;2:诱导后大样;3:上清;4:2 mol/L 尿素;5:4 mol/L 尿素;6:8 mol/L 尿素;7:Marker);b:过柱、洗涤收集纯化后 SDS-PAGE 检测(1:8 mol/L 尿素;2、3:prkaa1 纯化蛋白;4:Marker)

图 3 His-AMPKα1^{312}截短缺失融合蛋白的表达与纯化



1:空白对照;2:纯化蛋白

图 4 AMPKα1^{312}纯化蛋白的 Western blot 检测

作为细胞能量中心感受器和效应器在维持细胞能量稳态和缺氧适应性反应中扮演关键角色。当各种营养或环境应激如:运动[3],饥饿[4],氧化应激[5],以及缺血缺氧[6]等应激导致细胞内 ATP 下降,细胞能荷降低时(即 ATP:AMP 比值降低),AMPK 即被 AMP 变构激活。除了被 AMP 变构激活外,AMPK 还可被其上游激酶 AMPKK 磷酸化激活[7],AMPKK 使 AMPKα 亚基 Thr172 位点磷酸化从而导致 AMPK 显著激活(超过 50 倍),该激活程度显著高于 AMP 变构激活[8]。更重要的是,AMPK 也可被一种或多种上游激酶(AMPKK)磷酸化激活,其关键的磷酸化位点是位于 α 亚基激活环中的 Thr172 残基,该位点的磷酸化对于 AMPK 活化是必须的,如果该位点缺失或没有被磷酸化则 AMPK 将不具有任何可检测的活性[9-10]。

截短的 AMPKα1^{312}虽然不能再与 β 和 γ 亚基结合形成异三聚体,但其不仅含有 AMPK 的关键磷酸化位点,同时也保留了大部分的激酶活性,是深入研究不同病理生理条件下细胞内 AMPK 以及其上游激酶 AMPKK 活性的重要手段。

本研究利用原核表达系统成功表达并纯化了具有生物活性的 AMPKα1^{312}蛋白,本实验中获得的重组 AMPKα1^{312}截短缺失蛋白主要以包含体形式存在,需要进行蛋白复性,我们利用梯度稀释透析的方法使包含体蛋白重新折叠复性,经体外实验证明,其保持了较好的生物活性。本实验采用的是相对小分子质量的 His 作为标签,便于 Ni-NTA 柱亲和层析纯化,对重组蛋白的空间构象和蛋白活性影响相对较小,不需要后期酶切,实验操作更加简单、方便。经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明,该蛋白为大鼠 AMPKα1 截短缺失融合蛋白反应原性正确。深入研究各种病理生理条件对 AMPK 活化的影响奠定基础。

[参考文献]

[1] Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31 (Pt 1):162 - 168.

[2] Hardie DG, Scott JW, Pan DA, et al. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system[J]. FEBS Lett, 2003, 546 (1):113 - 120.

[3] Bergeron R, Russell RR 3rd, Young LH, et al. Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats[J]. Am J Physiol, 1999, 276(5 Pt 1):E938 - E944.

[4] Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, et al. AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release[J]. Biochem J, 1998, 335 (Pt 3):533 - 539.

[5] Choi SL, Kim SJ, Lee KT, et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by H_2O_2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(1):92 - 97.

[6] Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, et al. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 30778 – 30783.

[7] Hawley SA, Davison M, Woods A, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(44): 27879 – 27887.

[8] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 23): 5479 – 5487.

[9] Stein SC, Woods A, Jones NA, et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation[J]. Biochem J, 2000, 345: 437 – 443.

[10] 张剑凯,杨聚荣,李雪鹏, 等. hNaDC1 基因 5 侧翼区转录调控序列系列载体构建与鉴定[J]. 局解手术学杂志, 2012, 21(1): 226 – 228.

(编辑:左艳芳)

· 教学研究 ·

简图教学在动脉解剖学教学中的运用

Diagram of artery anatomy in teaching

戈 果[1],谢骐骥[2],余资江[1],余 彦[1] (1. 贵阳医学院人体解剖学教研室,贵州 贵阳 550004;2. 贵阳市第四人民医院功能科,贵州 贵阳 550002)

[关键词] 动脉;解剖学;简图;教学
[中图分类号] R322.12;G642 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2013)04-0352-01

解剖学是一门重要的医学基础课程,医学名词多,变化少,需要学习记忆的东西多,所以学员学习起来常感觉枯燥无味。尤其在心血管的学习中,血管分支多,内容繁杂,更难以记忆和掌握。现今的多媒体教学早已在解剖学的教学中占有非常重要的地位,而解剖学老师能熟练的在黑板上绘制简图来进行形态学教学的越来越少。但是,多媒体课件的应用在解剖学教学中也有很多不足,如信息量大,留给学生思考时间少,与学生交流也少。传统板图教学方式可以化抽象为具体,边讲边画,在单位时间内减少了对学员的信息冲击量,使其逐渐接受所学内容,方便学生理解和记忆[1]。在多年的解剖学教学探索中,笔者深深地体会到对于心血管系统动脉这一章节,单纯用多媒体教学效果并不理想,而传统的板书结合简图教学却使老师更易于教,学员更易于学。参考《解剖组织胚胎学简图及画法》[2],我们利用简图教学学习动脉内容。

1 动脉主干

以体循环的血管为例,体循环的动脉主干是主动脉,其起始段为升主动脉,至右侧第二胸肋关节高度移行为主动脉弓,主动脉弓上自右向左分别发出头臂干、左颈总动脉和左锁骨下动脉。其中头臂干又分为右颈总动脉和右锁骨下动脉。主动脉弓向下至第四胸椎体下缘移行为降主动脉,降主动脉又分为胸主动脉和腹主动脉。以上体循环的动脉主干,可以用简图表示,见图 1a。

2 局部血管分支

主动脉发出的各级分支运送动脉血到全身各处。以局部来学习主动脉在全身的各级分支,局部划分为头颈部、上肢、胸部、腹部、盆部、下肢的动脉血管。头颈部的动脉主干是颈总动脉,其在头颈部的分支见图 1b。上肢的动脉主干是锁骨下动脉,其分支见图 1c。胸部的动脉主干是胸主动脉,其分支见图 1d。腹部的动脉主干是腹主动脉,其主要分支见图 1e。盆部的动脉主干是髂内动脉,其分支见图 1f(女性盆腔矢切)。下肢的动脉主干是髂外动脉,其分支如图 1g(大腿前面)、图 1h(小腿后面)。以上是各局部主要的动脉分支情况。

3 全身动脉分布总结

学习完各局部动脉分支之后,我们带领学员对全身的动脉进行总结和复习。首先在黑板上画出一个完整的人体简图,然后对各局部动脉分支复习,同时在完整人体上逐一绘出,最后完成整堂课的教学。课后可以给学生布置绘制全身动脉分布简图的作业。

在以上学习中,我们可以看出,主动脉的分支复杂而繁琐,用文字讲解其分支、行程和分布显得枯燥而死板,而传统的板图教学在动脉教学中可以化繁为简,血管线条图简明生动,能直观地表明动脉血管的并行和所属关系。老师边讲边画,能深

(下转第 356 页)

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304003
[基金项目] 贵阳医学院重点教改项目(0212002-27)
[收稿日期] 2013-03-28 [修回日期] 2013-04-25