技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）09-1069-04

人 Api6 融合蛋白原核表达系统的构建

方 严[1]，练雪梅[2]

（1. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室脂质研究中心；2. 重庆医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：本研究拟采用蛋白原核表达的方法，诱导表达人 Api6（Apoptosis inhibitor 6）融合蛋白，为进一步研究 Api6 在凋亡抑制、脂质代谢和肿瘤发生中的作用奠定基础。方法：利用 PCR 技术扩增人 Api6 基因，将其克隆至原核表达载体 ppSUMO，构建重组质粒 ppSUMO-Api6；重组质粒转化原核表达宿主菌 *E.coli* Rosetta 感受态；采用蛋白原核表达的方法，不同诱导前菌液浓度，不同温度、不同异丙基硫化半乳糖苷（Isopropy1-β-D-thiogalaotopyrano-side，IPTG）浓度、不同诱导时间，筛选诱导表达 Api6 重组蛋白的最优条件；Western blot 鉴定其表达情况。结果：成功构建重组质粒 ppSUMO-Api6；成功诱导 Api6 重组蛋白的原核表达，表达的最优条件为：OD_{600}=0.5~0.8 的重组菌，16℃、0.5 mmol/L IPTG 诱导 16 h。结论：含有人 Api6 cDNA 全长序列的重组质粒 ppSUMO-Api6，经转化原核表达宿主菌 *E.coli* Rosetta 感受态细胞，在诱导前菌液 OD_{600}=0.5~0.8、16℃、0.5 mmol/L IPTG、诱导 16 h 这一优化的诱导条件下，重组菌 ppSUMO-Api6-Rosetta 可诱导重组蛋白 ppSUMO-Api6 的原核表达。

【关键词】凋亡抑制因子 6；原核表达；融合蛋白

【中国图书分类法分类号】R151.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-27

The construction of prokaryotic expression system for human Api6 fusion protein

FANG Yan[1], LIAN Xue-mei[2]

(1. Centre for Lipid Research, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Chongqing Medical University)

作者介绍：方 严（1981-），女，实验师，硕士，研究方向：脂质代谢与营养相关性疾病。现工作单位：重庆医科大学公共卫生学院实验室。

通信作者：练雪梅，女，副教授，Email: xuemeil@hotmail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30600660）。

【Abstract】*Objective*: To further study the pathophysiological function of human Api6 fusion protein expression using a prokaryotic expression system. *Methods*: Api6 cDNA was inserted into ppSUMO vector to form recombinant plasmid ppSUMO-Api6; recombinant plasmid ppSUMO-Api6 was trans-

参 考 文 献

[1] Kharatishvili I, Pitkänen A. Posttraumatic epilepsy[J]. Curr Opin Neurol, 2010, 23(2): 183-188.

[2] Moreels M, Vandenabeele F. Lambrichts alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) and nestin expression in reactive astrocytes in multiple sclerosis lesions: potential regulatory role of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008, 34(5): 532-546.

[3] Golden N, Darmadipura S. The difference in seizure incidences between young and adult rats related to lipid peroxidation after intracortical injection of ferric chloride[J]. Singapore Med J, 2010, 51(2): 105-109.

[4] Buniatian G H, Hartman H J. Acquisition of blood tissue barrier supporting features by hepatic stellate cells and astrocytes of myofibroblastic phenotype. Inverse dynamics of methallothionein and glial fibrillary acidic protein expression[J]. Neurochem Int, 2001, 38: 373-383.

[5] David Y, Cacheaux L P. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis[J]? Israel J Neurosci, 2009, 29(34): 10588-10599.

[6] Schachtrup C, Ryu J K, Akassoglou K. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage[J]. J Neurosci, 2010, 30(17): 5843-5854.

[7] Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H. Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain[J]. Cell Mol Neurobiol, 2010, 30(1): 101-111.

[8] Welser J V, Li L, Milner R. Microglial activation state exerts a biphasic influence on brain endothelial cell proliferation by regulating the balance of TNF and TGF-β_1[J]. J Neuroinflammation, 2010, 7: 89.

（责任编辑：关蕴良）

formed into prokaryotic expression host *E.coli* Rosetta; prokaryotic expression method was optimized to induce expression of recombinant protein Api6 in different conditions of *E.coli* density, temperature, IPTG concentration and induction time; recombinant protein Api6 was identified by Western blot. ***Results***: The recombinant plasmid ppSUMO-Api6 was successfully constructed; the recombinant protein Api6 was successfully induced, and the expression of recombinant protein ppSUMO-Api6 from the prokaryotic expression system was optimized in the condition of OD_{600}=0.5~0.8, 16℃, 0.5 mmol/L IPTG and 16 h induction. ***Conclusion***: Recombinant plasmid ppSUMO-Api6 was converted into the prokaryotic expression host *E.coli* Rosetta to get the recombinant strain ppSUMO-Api6-Rosetta. Recombinant protein ppSUMO-Api6 was expressed using a prokaryotic expression system at the optimal expression conditions.

【Key words】Api6; prokaryotic expression; fusion protein

凋亡抑制因子 6（Apoptosis inhibitor 6, Api6），又常被称作 AIM（Apoptosis inhibitor expressed on macrophage），Spα（Secreted protein alpha）或 CD5L（CD5 antigen like），是清道夫受体富含半胱氨酸残基超家族（Scavenger receptor, systeine rich-superfamily, SRCR-SF）B 组成员[1]。早期研究发现 Api6/AIM/Spα 主要由淋巴组织的巨噬细胞产生，具有抑制 $CD4^+/CD8^+$ 双阳性胸腺细胞凋亡的作用，从而支持其在胸腺选择之前的存活[2]；之后开展的更多相关研究则相继揭示了 Api6 在细菌感染[3]、炎症反应[4]和肿瘤发生[5]中均起到了重要作用；由于 Api6 是核受体 LXR 的靶基因[6]，近年来 Api6 在脂质代谢中的作用开始受到人们的关注。作为凋亡抑制因子，Api6 对多种免疫细胞的凋亡抑制作用已经得到了人们的初步认识[2,4,7]，但其抑制凋亡的具体机制还需要得到更深入的研究。

本研究拟采用原核表达系统，表达人 Api6 融合蛋白，为进一步深入研究 Api6 在凋亡抑制、脂质代谢和肿瘤发生中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

E.coli DH5α 由重庆医科大学脂质中心实验室保存；*E.coli* Rosetta 及原核表达载体 ppSUMO vector 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室惠赠。

1.2 主要试剂

LB/Kan 液（固）体培养基，Prime Star 高保真酶试剂盒（TakaRa，日本），限制性内切酶（NEB，美国），胶回收试剂盒（Omega，日本），T4 DNA 连接酶（NEB，美国），质粒小抽试剂盒（Omega，日本），异丙基硫化半乳糖苷（Isopropy1-β-D-thiogalaotopyrano-side, IPTG）（Merck，德国），Prestained Protein Ladder（Fermentas SM0671, MBI，加拿大），anti human CD5L antibody（R&D systems，美国）。

1.3 重组质粒 ppSUMO-Api6 的构建

根据 Pubmed 基因序列数据库中提供的人 Api6（Gene ID：BC_033586）基因序列设计一对特异性引物，引物序列如下：f-primer：5'-CGGGATCCGATGGCTCTGCTATTCTCCT-3'（下划线部分为 *BamH* Ⅰ 酶切位点），r-primer：5'-GCGAAGCTTTTATCATCCTGAGCAGATGAC-3'（下划线部分为 *Hind*Ⅲ 酶切位点），引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 体外扩增人 Api6 cDNA 全长，产物回收纯化，经 T4 DNA 连接酶 16℃连接构建入原核表达载体 ppSUMO，连接产物转化 *E.coli* DH5α 感受态，卡拉抗性筛选单克隆菌株，质粒小抽并鉴定。

1.4 ppSUMO-Api6 融合蛋白的表达与鉴定

重组质粒 ppSUMO-Api6 转化蛋白原核表达宿主菌 *E.coli* Rosetta感受态，挑取重组菌单克隆，接种于 5 ml LB/Kan培养基中，37℃，180 r/min 培养过夜，过夜培养物按 2%接种到 100 ml LB/Kan，37℃培养至 OD_{600}=0.5~0.8，加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L，37℃，3 h 诱导融合蛋白的表达，并以空菌、空载体和未加 IPTG 诱导的培养物作为对照。离心收集菌体，在磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline，PBS）pH 8.0 的缓冲条件下冰水浴超声破菌，裂解液离心分别收集上清和沉淀，用于 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析，鉴定目的蛋白的表达情况。即诱导产物裂解液上清和用 pH 8.0 PBS 重悬的沉淀经 8% SDS-PAGE 分离后电转移至硝酸纤维素膜，5%脱脂奶粉封闭后 TBST（Tris buffer solution+Tween）洗涤 4~6 次，以抗人 CD5L 抗体做一抗（1:1 000 稀释），4℃孵育过夜后再用 TBST 洗涤 4~6 次，分别加 5%脱脂奶粉稀释的 HRP 标记小鼠抗山羊 IgG（1:5 000 稀释）二抗，37℃孵育 2 h，TBST 洗涤 6 次后 ECL 显影。

1.5 融合蛋白表达条件的优化

根据影响蛋白原核表达的各个因素水平，分析不同条件下，重组融合蛋白 ppSUMO-Api6 的表达量，得到最佳表达条件。

上述实验方法中涉及的酶切反应、连接反应、感受态细胞的制备、质粒转化、琼脂糖凝胶电泳、SDS-PAGE 等常规分子生物学操作参考《分子克隆实验指南》[8]。

2 结 果

2.1 Api6 基因的体外扩增

1.2%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物得到约 1.1 kb 的 DNA 片段，大小与预期相符（图 1）。

抗性基因，重组蛋白含有 6×His 的融合标签和 SUMO 分子伴侣。ppSUMO 具有 SUMO 载体本身的优点，如能够降低融合蛋白降解、显著增加重组蛋白的表达量、促进靶蛋白正确折叠、提高可溶解性等[9,10]。同时，改造后的 ppSUMO 引入了 *Bam*HI/*Hind*Ⅲ核酸酶切位点和 tev 蛋白酶酶切位点，后者能特异性地切割分离融合蛋白和亲和标签，从而获得纯化的目标蛋白。

3.2 重组蛋白原核表达条件的优化

重组质粒 ppSUMO-Api6 转化表达宿主菌后菌液浓度培养至 OD_{600}=0.5~0.8，经 0.5 mmol/L IPTG，37℃诱导 3 h，所诱导的蛋白大量在沉淀中以包涵体形式表达，如图 4A 所示。故根据影响蛋白原核表达的各个因素，逐一优化表达条件，包括诱导温度、诱导前菌液 OD_{600} 值、诱导时间和 IPTG 浓度（图 3）。

在条件优化过程中发现，温度是对该目标蛋白诱导表达影响最大的因素。常规诱导温度为 37℃，本课题表达的 pp-SUMO-Api6 经试验发现，16℃的低温诱导为最佳诱导温度，37℃条件下主要为包涵体表达，16℃则表现为上清表达为主。分析原因为低温下细菌生长缓慢，使得蛋白合成速度减慢，从而最大限度的提高了蛋白正确折叠的几率，提高了蛋白可溶性表达，增强了活性蛋白的表达比率。

诱导前菌液 OD_{600} 值根据常规经验选择 OD_{600}=0.5~0.8，并控制在 0.6 左右，同时以 OD_{600}=0.2 及 $OD_{600}\geq$1.0 作对照，确定最佳 OD_{600}=0.5~0.8，与常规经验值相同，无特殊性。

IPTG 浓度对则主要影响蛋白表达的量。本课题中选择的 3 个 IPTG 浓度，0.5 mmol/L 为常规经验值，另设 0.2 mmol/L 和 1.0 mmol/L 两个浓度，发现 0.2 mmol/L IPTG 也能诱导目标蛋白的表达，但表达量比 0.5 mmol/L 的表达量低，而 1.0 mmol/L 则仅有极低量的表达，且菌液裂解后的总蛋白量均较低，考虑为 IPTG 量过高，导致对表达宿主菌毒性过重所致。

因为是低温表达，所以表达时间也有较大影响，常规37℃诱导时间多为 3 h 即可，考虑低温诱导下细菌生长缓慢，蛋白合成速度也减慢，所以应延长诱导时间，故另设 8、16 h 两个诱导时间，比较发现，16 h 的过夜诱导表达的蛋白量为最高。

4 结 论

人 Api6 蛋白是糖基化分泌蛋白，糖基化后相对分子质量应是 50 kD[11]，在原核表达系统中诱导表达的是没有糖基化的蛋白，相对分子质量 38 kD，与 ppSUMO 分子伴侣形成融合蛋白的大小预计应为 54 kD，我们所表达的融合蛋白约 55 kD（图 5），与预计理论值基本相符。优化条件后的蛋白表达大量存在于重组菌裂解液上清中，因此大量诱导破菌后分离上清，通过 Ni-NTA sepharose 金属 Ni 螯合层析介质纯化，蛋白酶切去除 ppSUMO 分子伴侣，即可大量得到纯化的人 Api6 目的蛋白，从而为进一步研究 Api6 在凋亡抑制、脂质代谢和肿瘤发生中的作用奠定基础。

参 考 文 献

[1] Gebe J A, Kiener P A, Ring H Z, et al. Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins[J]. J Biol Chem, 1997, 272(10): 6151-6158.

[2] Miyazaki T, Hirokami Y, Matsuhashi N, et al. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily[J]. J Exp Med, 1999, 189(2): 413-422.

[3] Kuwata K, Watanabe H, Jiang S Y, et al. AIM inhibits apoptosis of T Cells and NKT Cells in corynebacterium-induced granuloma formation in mice[J]. Am J Pathol, 2003, 162(3): 837-847.

[4] Haruta I, Kato Y, Hashimoto E, et al. Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22910-22914.

[5] Qu P, Du H, Li Y, et al. Myeloid-specific expression of Api6/AIM/Spα induces systemic inflammation and adenocarcinoma in the lung[J]. J Immunology, 2009, 182(3): 1648-1659.

[6] Arai S, Shelton J M, Chen M, et al. A role of the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development[J]. Cell Metab, 2005, 1(3): 201-213.

[7] Valledor A F, Li-Chung Hsu, Sumito O, et al. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis[J]. PNAS, 2004, 101(51): 17813-17818.

[8] 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.

[9] Butt T R, Edavettal S C, Hall J P, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43(1): 1-9.

[10] Li J F, Zhang J, Zhang Z, et al. SUMO mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from two joined genes in Escherichia coli [J]. Curr Microbiol, 2011, 62(1): 296-300.

[11] Sarrias M R, Padilla O, Monreal Y, et al. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spα[J]. J Tissue Antigens, 2004, 63: 335-344.

（责任编辑：关蕴良）