基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1469-03

# 基于抗原表位分析的 P- 糖蛋白表达研究

王祥卫,张远宁,周 锋,叶 钢
(第三军医大学第二附属医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:对 P- 糖蛋白抗原表位进行分析和表达研究。方法:联合运用多种方法对 P- 糖蛋白的二级结构和表面特性进行分析,运用化学和酶法相结合的技术合成 P- 糖蛋白基因,再克隆入表达载体 pGEX-2T 进行表达、鉴定及纯化。结果:位于 P- 糖蛋白胞外段的抗原表位位点仅见于氨基酸残基 82aa~115aa(Ⅰ)、741aa~760aa(Ⅳ)及 800aa~816aa(Ⅴ)。SDS-PAGE 分析,表达出约 29 kD 大小的蛋白。结论:该基因片段的高效表达为进一步制备其抗体或筛选其特异性结合肽,进行靶向治疗等工作奠定了基础。

【关键词】多药耐药;P- 糖蛋白;抗原表位
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-28

# Expression of P-glycoprotein based on antigenic epitopes analyses

*WANG Xiang-wei, et al*
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To analyze antigenic epitopes and express P-glycoprotein. *Methods*: The target gene was synthesized by the combined use of chemical synthesis and Klenow polymerase extension. The synthesized gene was cloned into expression vector pGEX-2T and expressed, identified and purified it. *Results*: Antigenic epitopes in extracellular fragment of P-glycoprotein were identified to amino acid residues 82aa~115aa(Ⅰ)、741aa~760aa(Ⅳ), and 800aa~816aa(Ⅴ). SDS-PAGE analysis indicated that the expressed protein was about 29 kD. *Conclusion*: High level expression of the target gene fragment was established for preparation of its antibody and biospanning its specific peptide using random phage library, which establishes basis for the targeting treatment of MDR.

【Key words】Multidrug-resistance; P-glycoprotein; Antigenic epitopes

作者介绍:王祥卫(1969- ),男,副教授,
研究方向:人膀胱肿瘤基因治疗。

基金项目:重庆市自然科学基金资助(2006BB5084)。

床的其它相关调节因子的相互作用尚不明了,需对其进行进一步的研究。

## 参 考 文 献

[1] Moss M L, Jin S L, Milla M E, et al. cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor-alpha[J]. Nature, 1997, 385: 733-736.

[2] Kumar V, Bustin S A, M ckay L A. Transforming growth factor alpha [J]. Cell Bio Int, 1995, 19 (5): 373-388.

[3] Tamada H, Das S K, Dey S K, et al. Cell2type2specific expression of transforming growth factor alpha in the mouse uterus during the peri-imp lantation period [J]. Bio Rep rod, 1991, 45 (2): 365-372.

[4] Bonvissuto A C, L ala P K, Dennedy T G, et al. Induction of transforming growth factor alpha gene expression inrat deciduas is independent of the concep tus [J]. Bio Reprod, 1992, 46 (4): 607-616.

[5] Borrell-Pags M, Rojo F, Albanell J, et al. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-α in tumors[J]. EMBO J, 2003, 22(12): 1114-1124.

[6] Daniel D, Indrani B, Sudhandsu K, et al. Embryo Implantation [J]. Developmental Biology, 2000, 223(2): 217-237.

[7] W ells A. EGF receptor[J]. Int J Biochem Cell Bio, 1999, 31(6): 637-643.

[8] Paria B C, Das S K, Dey S K, et al. Distribution of transforming growth factor precursors in the mouete Tus during the perlimplantation period and after steroid hormone treatments[J]. Bio Reprod, 1994, 50(3): 481-491.

[9] Bush M R, Mele J M, Walmer D K, et al. Evidence of Juxtacrine signaling for transforming growth factor alpha in human endometrium[J]. Bio Reprod, 1998, 59 (6): 1522-1529.

[10] Hart S, Fischer O M, Prenzel N, et al. GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways [J]. Biol Chem, 2005, 386 (9): 845-855.

[11] Black R A, Rauch C T, Kozlosky C J, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature, 1997, 385(6618): 729-733.

(责任编辑:冉明会)

P-糖蛋白在肿瘤细胞中的高表达与多药耐药(Multi-drug resistance,MDR)的产生密切相关。本研究在方法学比较的基础上,联合运用多种方法对 P-糖蛋白的二级结构和表面特性,如:亲水性、可塑性、溶剂可及性及免疫原性等方面进行分析和预测,设计和构建了 P-糖蛋白胞外段基因表达载体,并在大肠杆菌中进行了表达及纯化。报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

菌种 DH5α 由本室保存。GST 融合表达载体 pGEX-2T 为 Pharmacia 产品;pGEM-T 载体试剂盒为 Promega 产品。DNA 片断由北京赛百盛公司合成。DNA 重组所用各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Klenow 片段, 购自 Borringer 公司, 纯化质粒 DNA 所用的 Kit,DNA 回收 kit,IPTG,X-gal 购自 Promega 公司。GST-Trap 柱购自 Pharmacie 公司。

### 1.2 二级结构预测

P- 糖蛋白序列检索自瑞士生物信息研究所提供的 Swiss-Prot 蛋白质数据库。应用 DNAStar Protean 软件提供的模块进行,采用 Chou & Fasman[1] 提出的预测方案和 Garnier[2] 法。

### 1.3 亲水性参数

应用 DNAStar Protean 软件进行,采用 Hopp & Woods[3]方案。

### 1.4 可及性参数及可塑性预测

采用 AntheProt 软件提供的蛋白质溶剂可及性方案。应用 DNAStar Protean 软件进行可塑性预测, 采用 Karplus and Schultz [4]方案。

### 1.5 抗原性指数分析

采用 DNAStar Protean 软件提供的抗原指数分析模块,对 P- 糖蛋白的抗原表位进行预测。该模块采用 Jameson-Wolf[5]方法,为 4 参数联立的综合预测方法包括:亲水性、表面特性、可塑性、二级结构预测方案。

### 1.6 编码 P-糖蛋白胞外段 90aa~115aa 基因的设计及合成

根据 P- 糖蛋白抗原性分布曲线,选择 P- 糖蛋白胞外段 90aa~115aa,氨基酸序列为:SNITNRSDINDTGFFMNLEEDMTRYA(90aa~115aa),同时,根据大肠杆菌偏性密码子原则,人工合成两条 DNA 单链(A57 和 B59),并分别加入酶切位点 *BamH* Ⅰ及 *EcoR* Ⅰ。

### 1.7 双链 DNA 的获得、T 载体的克隆及融合表达载体的构建

按 pGEM-T 试剂盒说明进行 T 载体的克隆。pGEM-Pgp 质粒用 *BamH* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ进行双酶切后,克隆到融合表达载体 pGEX-2T/*BamH* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ中,命名为 pGEX-Pgp;转化大肠杆菌 DH5α,提取质粒,进行双酶切鉴定。所得菌落培养物送 TaKaRa 公司(大连)测序,鉴定胞外段序列及构建载体的读码框架。

### 1.8 融合蛋白的表达、鉴定与纯化

取 100 μl 0.2 mmol/l IPTG 诱导 4 h 的菌液,15%SDS-PAGE 鉴定,拍照记录。诱导后的菌体超声破碎,加入 Triton X-100 至终浓度 1%,离心收集菌体,取上清,直接用 GST-Trap 柱进行蛋白纯化。融合蛋白定量,脱盐处理。

## 2 结 果

### 2.1 P-糖蛋白的二级结构预测

P-糖蛋白属于一种混合型蛋白,其中,α-螺旋占 41%,β-片层占 27%,Turn(转角)占 14%, Coil(无规则卷曲)占 19%。

### 2.2 P-糖蛋白的亲水性

P-糖蛋白亲水性区域的分布不均匀,中部分布较为密集,6 个胞外段中,第Ⅰ胞外段(82aa~115aa)、第Ⅳ胞外段(743aa~757aa)和第Ⅴ胞外段(800aa~816aa)亲水性较高。

### 2.3 P-糖蛋白的溶剂可及性及可塑性预测结果

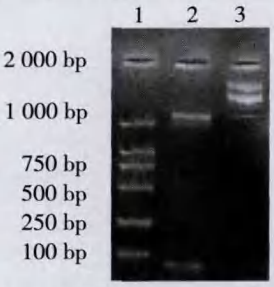
P-糖蛋白 6 个胞外段中,第Ⅰ胞外段(80aa~122aa)、第Ⅳ胞外段(743aa~757aa)和第Ⅴ胞外段(800aa~816aa)可及性较高。可及性较低区域,即埋藏于分子内部的区域。胞外段中可塑性较高区域仅见于:76aa~115aa(Ⅰ),741aa~757aa(Ⅳ),784aa~790aa(Ⅴ),797aa~818 aa(Ⅴ)。这些区域可能具有一定的柔韧性,形成表位的可能性较大,容易与抗体进行嵌合。

### 2.4 P-糖蛋白抗原表位预测结果

P-糖蛋白存在有多个潜在的抗原表位位点;结合跨膜区预测结果进行分析,位于胞外段的抗原表位位点仅见于氨基酸残基 82aa~115aa(Ⅰ)、741aa~760aa(Ⅳ)及 800aa~816aa(Ⅴ)。

### 2.5 表达质粒的鉴定

构建的表达质粒 pGEX-Pgp, 经 *EcoR*Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切,获得约 87 bp 的酶切片断(图 1),与设计相一致。测序结果表明:克隆片段长 78 bp,序列内部含终止码,编码 26 个氨基酸,所推导的氨基酸序列与文献序列相一致[6]。

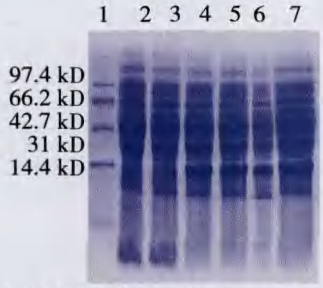



1. DL2000 DNA marker;2. pGEX-Pgp/*BamH* Ⅰ + *EcoR* Ⅰ;3. pGEX-Pgp

**图 1 重组载体 pGEX-Pgp 的酶切电泳分析**

2.6 P-gp 胞外段基因的 GST 融合表达

插入表达载体 pGEX-2T 中的 P-gp 胞外段基因，经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopy ranoside，IPTG)诱导得到稳定表达。未诱导的重组载体无明显目的蛋白表达，经诱导后可见分子量约为 29 kD 的新生蛋白带，与预期的蛋白分子大小相一致(图 2)。表达产物带随诱导时间延长而逐渐加深，到 4 h 最深，薄层扫描分析，表达率占细胞总蛋白的 38%；表达组分结果表明：表达产物主要存在于细菌上清中。




1. 低分子量蛋白标记物；2. 诱导的 pGEX-2T/DH5α；3. 未诱导的 pGEX-Pgp/DH5α 4～7.诱导的 pGEX-Pgp/DH5α

**图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析**

## 3 讨 论

蛋白质抗原表位的抗原指数分析最常采用的方案为 Jamson-Wolf 方案。该方案综合了亲水性分析值(H)、表面特性分析值(S)、可塑性分析值 (F)和二级结构预测分析值。预测蛋白抗原表位尤以可及性方案、可塑性方案、二级结构预测及抗原性方案为重要。

本研究以 DNAstar Protean 和 AntheProt 软件为蛋白质分析工具，应用 Jameson-Wolf 方法对 P-糖蛋白的抗原表位进行预测，可看出 P-糖蛋白存在有多个潜在的抗原表位位点。综合本文二级结构、跨膜区、亲水性、溶剂可及性、可塑性和抗原指数预测结果，发现：位于胞外段的抗原表位位点仅见于氨基酸残基 82aa~115aa(Ⅰ)、741aa~760aa(Ⅳ)及 800aa~816aa(Ⅴ)。表位作图法证实：在第 I 胞外段内含有单抗 MRK-16 抗原识别表位(108aa~114aa)，其序列为 EEDMTRYA[7]，亲水性方案预测显示该胞外段亲水性好，能实现可溶性表达，易于纯化；而且该区胞外段无糖基化位点(因原核表达系统中无糖基化酶，糖基化位点的非糖基化可能影响蛋白功能)。选择该胞外段蛋白进行表达，用于免疫动物或筛选文库，有可能获得其识别抗体或特异性结合肽。因此，我们选择该胞外段为靶点，在 PCR 引物设计时，加入了终止密码子及酶切位点，以有利于后续的表达载体的定点克隆。

我们根据其结构及抗原性模拟结果，选择第一胞外段为靶点，用基因工程方法进行表达研究。依据如下：(1)该区胞外段蛋白有较高的亲水性和抗原性，在原核表达系统中倾向于水溶性，易于纯化，同时有较高的抗原指数；(2)该区胞外段无糖基化位点；因原核表达系统中无糖基化酶，糖基化位点的非糖基化可能影响蛋白功能；(3)该区存在 P-gp 特异性单抗 MRK-16 的抗原性结合位点[7]。(4)该区位于胞外段，单抗或特异性结合肽易于与 P-gp 结合。在基因设计时选用大肠杆菌偏爱的密码子，这将有助于真核基因在大肠杆菌中的高效表达。在基因合成中采用了化学和酶法相结合的技术，降低了基因化学合成的成本，首先制备 57 bp 和 59 bp 的寡核苷酸链，通过 Klenow 酶的补平，获得了双链 DNA。

我们将 P-gp 胞外段的 DNA 插入 pGEX-2T 载体中，热休克转化 DH5α 宿主菌，阳性菌落活化后，经 IPTG 诱导获得了重组融合蛋白 GST-Yex 的高效表达，表达量占菌体总蛋白的 38%。对表达获得的融合蛋白的鉴定结果表明，本实验获得了含 P-gp 蛋白的融合蛋白(GST-Pgp)，所表达的蛋白可用于抗体的制备，为下一步噬菌体随机肽库的筛选及其他相关工作创造了条件。

## 参 考 文 献

[1] Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. Adv.Enzymol., 1978, 47(1): 45-148.

[2] J.Garnier.Protein structure prediction[J]. Biochimie, 1990, 72(8): 513-524.

[3] Thomas P Hopp. Protein surface analysis: Methods for identifying antigenic eterminants and other interaction sites[J]. J.Immunol.Methods, 1986, 88(1): 1-18.

[4] Karplus P A, Schultz G E.Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Naturwissenschaften, 1985, 72(2): 212-213.

[5] Jameson B A, Wolf H.The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J].CABIOS, 1988, 4(2): 181-186.

[6] Chang-jie Chen, Janice E.Chin, Kazumitsu Ueda, et al.internal Duplication and homology with bacterial transport protein in the mdr1(P-glycoprotein)gene from multidrug-resistant human cells[J]. cell, 1986, 47(3): 381-389.

[7] Ying Tang, Greg Beuerlein, Gerlinde Pecht, et al. Use of a peptide mimotope to guide the humanization of MRK-16, an anti-P-glycoprotein Monoclonal antibody[J]. J Biol Chem, 1999, 274(39): 27371-27378.

(责任编辑：关蕴良)