维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1009-04

人 S100A6-GST 融合蛋白的原核表达和纯化

苗静琨[1],赖天霞[1],左国伟[1],李星星[1],王 嫣[1],蒋 薇[2],何通川[2],周 兰[1]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016;2. 美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室,美国 Chicago IL 60637)

【摘 要】目的:制备人 S100A6-GST 融合蛋白,为研究人 S100A6((hS100A6)蛋白的功能奠定基础。方法:从 pHAHA-hS100A6 中双酶切获取 hS100A6 基因,亚克隆至原核表达载体 pGST-moluc,构建 pGST-moluc-hS100A6,转化 BL21 后,IPTG 诱导重组菌表达 hS100A6 蛋白,SDS-PAGE 及 Western Blot 鉴定表达产物,Glutathion-Sepharose 4B 球珠分离纯化。结果:重组菌株表达出与理论预测值相符的一个约 36ku 的 hS100A6 融合蛋白,纯化后的融合蛋白的产量为 3mg/L 菌液,纯度约 92%。结论:成功构建了 hS100A6-GST 原核表达质粒,在大肠杆菌中表达纯化后得到较高浓度的 hS100A6-GST 融合蛋白,为 hS100A6 蛋白功能的研究打下了基础。

【关键词】人 S100A6 基因;融合蛋白;原核表达;蛋白纯化

【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-09

Expression and purification of human S100A6-GST fusion protein

MIAO Jingkun, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain human S100A6-GST fusion protein as material of the study of function of hS100A6. *Methods*: The hS100A6 gene from pHAHA-hS100A6 was subcloned into the prokaryotic GST fusion protein expression plasmid, pGST-moluc, to form pGST-moluc-hS100A6. The recombinant plasmid was transformed to E. coli BL2l and the expression of hS100A6-GST fusion protein was induced with IPTG. The protein was detected by SDS-PAGE and purified with Glutathion-Sepharose 4B beads, then identified by western blot assays. *Results*: A 36 000 Dalton protein, as expected, was obtained evidently. The concentration of the purified fusion protein was 3mg/L bacterial culture, and the purity was about 92%. *Conclusion*: A prokaryotic system expressing hS100A6-GST fusion protein was successfully constructed. hS100A6-GST fusion protein with high purity could be obtained after it was efficiently expressed in E. coli BL21 and purified with Glutathion-Sepharose 4B beads. This will facilitate our study of the function of hS100A6.

【Key words】 hS100A6 gene; Fusion protein; Prokaryotic expression; Protein purification

S100 蛋白家族是一类 EF-手型钙结合蛋白,有 23 个家族成员,与肿瘤相关的有 S100A2、S100A4、S100A6、S100A7 和 S100B[1]。其中 S100A6 又称为钙周期蛋白(Calcyclin, Cacy),在多数上皮肿瘤如黑色素瘤、肝癌、结直肠肿瘤、胰腺癌、胆管癌,多数骨肉瘤、卵巢癌等许多肿瘤中高表达[2],但其与肿瘤的关系尚不甚明确。由于 S100A6 的细胞定位随细胞周期改变,所以推测可能与细胞周期有关[3];S100A6 对不同肿瘤细胞的作用也不尽一致:流行病学调查发现它在黑色素瘤中的表达高于痣,且其在裸鼠体内移植的高转移黑色素瘤中的表达高于低转移黑色素瘤[4];细胞核中 S100A6 的高表达与胰腺癌的预后呈负相关[5];然而 S100A6 在骨肉瘤中表达增加却与其转移减少有关[6]。体外实验表明它可以促进胰腺癌细胞株 CFPAC-1 和肺成纤维细胞的增殖[7,8]。因而,S100A6 在肿瘤发生发展过程中的作用及其机理值得深入探讨。

本研究将人 S100A6 基因插入融合表达载体 pGST-moluc 中,在大肠杆菌中诱导表达,并用 Glutathion-Sepharose 4B 球珠亲和层析出高浓度的 hS100A6-GST 蛋白,为我们研究 hS100A6 蛋白的功

作者介绍:苗静琨(1979-)女,硕士,主要研究方向:分子肿瘤学。

基金项目:国家自然科学基金(30340039),2003 年教育部"春晖计划"科研启动经费资助项目,2004 年重庆市留学回国人员启动基金。

维普资讯 http://www.cqvip.com

能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

pGST-moluc、pHAHA-hS100A6 质粒为美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室馈赠[6];DMEM购自 Microbix Biosystems (Canada), 限制性核酸内切酶、DNA 连接试剂盒购自 Takara 公司。IPTG、Bradford 蛋白定量试剂盒、细菌蛋白提取试剂盒购自 Bio Basic Inc.; 预染的蛋白质分子量标准购自 Fermertans; 丙烯酰胺、还原型谷胱甘肽购自 Amresco;Glutathion-Sepharose 4B 球珠购自 Amersharm Biosciences。

1.2 pGST-moluc-hS100A6 表达质粒的构建

质粒提取参照文献[6]进行。用 Nhe Ⅰ和 Bgl Ⅱ酶切质粒 pHAHA-hS100A6 和 pGST-moluc,10g/L 琼脂糖凝胶电泳, DNA 回收试剂盒回收 hS100A6 基因片段和 pGST-moluc 质粒片段。用 DNA 连接试剂盒快速连接, 构建 pGST-moluc-hS100A6 重组质粒。

1.3 大肠杆菌的转化及重组质粒的酶切鉴定

制备感受态的大肠杆菌 BL21, 加重组质粒置冰浴 30 min,42℃热休克 90s, 再放冰上 1min; 转入 LB 培养基中, 37℃ 水浴温浴 45min,间歇轻摇。培养后,将菌液铺于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37℃过夜, 次日观察菌落, 并挑取 12 个菌落分别培养后,提取质粒经 EcoR Ⅰ单酶切和 Xho Ⅰ、EcoR Ⅰ双酶切,通过限制性内切酶图谱分析,鉴定宿主细菌质粒.

1.4 hS100A6-GST 融合蛋白的表达

1.4.1 诱导表达条件的优化 在氨苄青霉素抗性平板上挑取含构建正确的 pGST-Moluc-hS100A6 质粒的 BL21 重组菌, 接入 2ml 含氨苄青霉素 (200μg/ml) 的 LB 培养基中, 37℃,180r/min 振荡培养过夜。次日按 1:100 稀释培养过夜的菌液转种,培养 2.5h,菌液 OD600=0.4～0.6 时,分别吸出 1 ml 未经诱导的培养物在 7 个小瓶中, 分别加入终浓度为 0、0.01、0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8mmol/L 的 IPTG,继续培养 3h。离心收集菌体。菌体中分别加入 100μl 1×SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸离心,SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色法观察表达产物条带, 凝胶成像仪采集图像,Quantity One 软件分析表达效率。

1.4.2 表达产物的溶解性分析 按细菌蛋白提取试剂盒说明裂解 1ml 诱导表达的细菌培养物沉淀,离心后将上清和沉淀分开, 各加入等体积 2×SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸后取 10μl 上样,SDS-PAGE,考马斯亮兰染色。

1.5 hS100A6-GST 融合蛋白的分离纯化

大规模诱导表达 hS100A6-GST 融合蛋白,1×PBS 重悬菌体,冰上超声裂解,0.1%Triton-X100 处理,离心所得上清液用 Glutathion-Sepharose 4B 球珠亲合纯化。再用适量还原型谷胱甘肽(0.154g of reduced glutathione dissolved in 50ml of 50mmol/L Tris-CL,pH 8.0) 重复洗脱 3 次, 取洗脱液 10μl 进行 SDS-PAGE,考马司亮蓝染色、凝胶成像仪采集图像,并用 Quantity One 软件分析纯化效果,其余的分装后保存于 -80℃。

1.6 Western Blot 鉴定融合蛋白

取适量纯化所得的融合蛋白, 以 pGST-Moluc-BL21 诱导表达产物 GST 蛋白为阴性对照,加入等体积 2×SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸后取 10μl 上样,SDS-PAGE,Western Blot 进行鉴定。

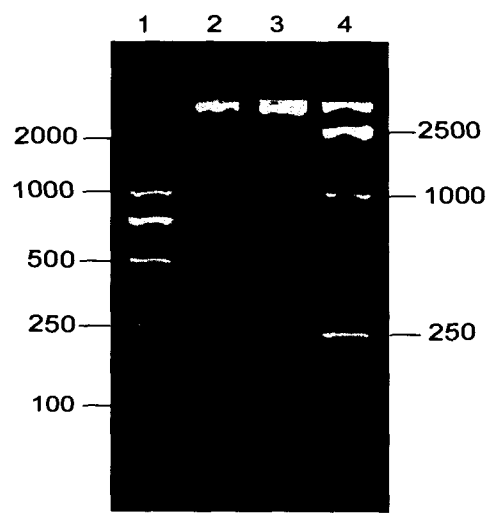
1.7 融合蛋白的定量(Bradford 法)

按 Bio-Rad Protein Assay 说明书操作,在 751 分光光度计的 595 nm 处读取吸光度值 A595, 以 A595 为纵坐标、浓度为横坐标绘制牛血清白蛋白(BSA)标准曲线,并据之计算出所制备的融合蛋白的浓度和产量。

2 结 果

2.1 pGST-moluc-hS100A6 表达质粒的鉴定

pGST-moluc-hS100A6 中 hS100A6 的两侧分别有 Xho Ⅰ和 EcoR Ⅰ的酶切位点, 用 Xho Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切后产生 300bp 和 5kb 左右的两个片段。



1: marker1;2:Xho Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切该质粒;3:EcoR Ⅰ单酶切质粒 4:marker2

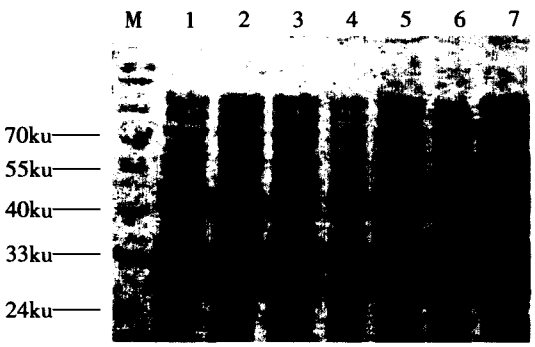
图 1 pGST-moluc-hS100A6 的酶切鉴定

2.2 hS100A6-GST 融合蛋白的表达

2.2.1 IPTG 终浓度的筛选 在小规模培养条件下, 经 SDS-PAGE 分析和比较了 0.01、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mmol/L 6 个 IPTG 终浓度的诱导表达效果,见图 2。各实验浓度 IPTG 诱导的重组菌(GST-hS100A6-BL21) 都在分子量约 36ku 处有一明显增粗的蛋白条带,该分子量与 S100A6-GST 融合蛋白的分子量

维普资讯 http://www.cqvip.com

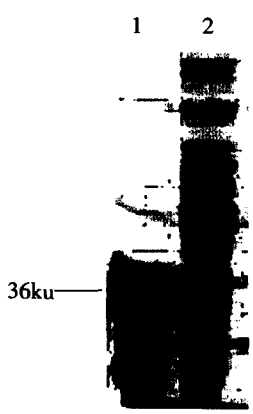
相符；而未用 IPTG 诱导的重组菌则未出现该条带的增粗。用 Quantity One 软件分析发现，0.1、0.2 和 0.6mmol/L IPTG 诱导组的蛋白表达效率为 25%，0.01 和 0.8mmol/L IPTG 诱导组只有 10%。因此，在后续实验中将采用 0.1mmol/L IPTG 诱导融合蛋白的表达。



M：蛋白质分子量标准；1~6：不同浓度 IPTG 诱导表达的 pGST-Moluc-hS100A6-BL21 重组菌总蛋白 (IPTG 终浓度依次为：0.01，0.1，0.2，0.4，0.6，0.8mmol/L)；7：未用 IPTG 诱导表达的 pGST-Moluc-hS100A6-BL21 重组菌总蛋白

图 2　不同浓度 IPTG 诱导融合蛋白的表达

2.2.2　融合蛋白表达形式　用 0.1mmol/L IPTG 诱导表达的重组菌经超声裂解、高速离心后，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 3。来自上清的样品于 36ku 处有一明显增粗的蛋白条，来自沉淀的样品中在该位置则无类似的条带。提示本实验中目的蛋白主要以可溶性形式表达。

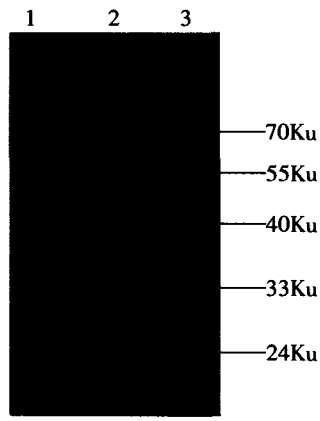


1：重组菌裂解液上清 2：重组菌裂解液沉淀

图 3　SDS-PAGE 分析融合蛋白表达形式

2.3　融合蛋白分离纯化

利用与琼脂糖偶联的谷胱甘肽与 GST 之间的特异结合能力，将 GST 融合蛋白从细菌总蛋白溶液中分离出来，并通过还原型谷胱甘肽洗脱，使融合蛋白与球珠分离，离心得到的上清中即含有分离纯化的融合蛋白。取 10μg 上样，通过 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色后，可见位于大约 36ku 处的 hS100A6-GST 条带，以及位于 26ku 处的 GST 条带，参见图 4。用 Quantity One 软件分析，其纯度接近 92%。

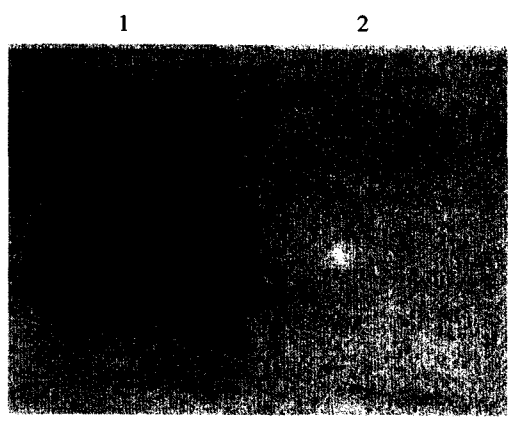


1.纯化后的 GST-S100A6；2.纯化后的 GST；3.markert

图 4　重组蛋白纯度分析

2.4　Western Blot 鉴定融合蛋白

纯化后的 hS100A6-GST 融合蛋白经 SDS-PAGE，Western Blot 后出现阳性杂交条带，而 pGST-Moluc-BL21 诱导表达产物 GST 蛋白组则没有(图 5)。



1：GST-S100A6 融合蛋白；2：GST

图 5　Western Blot 鉴定 GST-S100A6 融合蛋白

2.5　融合蛋白的定量测定

采用 Bradford 法绘制的牛血清白蛋白(BSA)标准曲线如图 6 所示，测得 3 次洗脱液的浓度分别为 0.9、0.9 和 0.2mg/ml，每次洗脱液为 300μl，故每 200ml 诱导表达培养菌可获得 0.6mg 融合蛋白，即融合蛋白的产量为 3mg/L 菌液。

维普资讯 http://www.cqvip.com

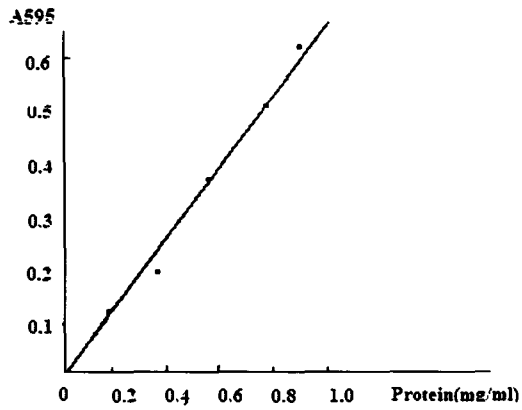


图 6 BSA 标准曲线

3 讨 论

GST(Glutathione-S-transferanse)融合蛋白是通过将外源基因插入 pGEX 载体的多克隆位点，经 IPTG 诱导，在 tac 启动子的控制下得到表达的。pGEX 载体内含有一个乳糖操纵子结构，其中 I 基因的表达产物是一个阻遏蛋白，可以结合到 tac 启动子的操纵序列，阻遏下游蛋白的表达。IPTG 作为人工合成的半乳糖类似物，是该阻遏蛋白的结合物。加入 IPTG 后，融合蛋白得以诱导表达，且可达全菌可溶蛋白总量的 30%以上[10,11]。这样的融合蛋白既能保持外源蛋白的生物学活性，又可利用融合伴侣 GST 对谷胱甘肽偶联球珠的高亲和性可分离出融合蛋白；特异结合在球珠上的融合蛋白再经含有还原型谷胱甘肽的洗脱缓冲液洗脱，即可得到纯化的融合蛋白。通常，一步法亲和层析分离纯化的蛋白纯度可达 90%以上。

利用 pGEX 系列表达载体表达的 GST 融合蛋白可以用来研究蛋白与蛋白间的相互作用，GST pull-down、免疫共沉淀等技术都已经应用于蛋白间相互作用的研究中。本研究利 pGST-moluc 表达载体正确构建了 pGST-moluc-hS100A6，并在转化菌 BL21 中诱导表达，经 Glutathion-Sepharose 4B 球珠亲和层析得到高浓度的 hS100A6-GST 融合蛋白，为研究 hS100A6 蛋白的功能奠定了基础。

（致谢：感谢美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室全体研究人员；感谢重庆医科大学生物医学工程系相关技术人员。）

参 考 文 献

[1] Ethan DE, Leigh CM, Peter HW. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer[J]. Int Biochem Cell Biol, 2004;82:508-515.

[2] Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors[J]. Int J Cancer, 1996;68(3):325-332.

[3] Alejandra T, Stephen EM. Calcium-and cell cycle-dependent association of annexin11 with the nuclear envelope[J]. J Biol Chem, 2003;278(22):20210-20216.

[4] Weterman MA, Stoopen GM, van Muijen GN, et al. Expressio of calcyclin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice[J]. Cancer Res, 1992;52(5):1291-1296.

[5] Vimalachandran D, Greenhalf W, Thompson C, et al. High nuclear S100A6 (Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients[J]. Cancer Res, 2005;65(8):3218-3225.

[6] Luu H H, Zhou L, Haydon R C, et al. Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma[J]. Cancer Lett, 2005;229(1):135-148.

[7] Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Nami Ishikawa, et al. The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinlic implication as a diagnostic marker and therapeutic target[J]. Clin Cancer Res, 2005;11(21):7785-7793.

[8] Breen EC, Tang K. Calcyclin (S100A6) regulates pulmonary fibroblast proliferation, morphology, and cytoskeletal organization in vitro [J]. J Cell Biochem, 2003;88:848-854.

[9] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版, 北京：科学出版社, 2002.1713-1720.

[10] Liu Y, Xu ZK, Yan Y, et al. prokaryotic expression, purification and analysis of Hantaan virus Sterminal 311 bp fragment[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2002;23(5):419-422.

[11] 别良峰，于文彬，程晓东，等. 人高迁移率族蛋白 I 基因的克隆和表达[J]. 第四军医大学学报, 2003;24(3):232-234.

注：

本刊 2007 年第 6 期第 606 页和 632 页论文通讯作者均为管小琴，联系方式为：023-68485789，e-mail:Guanxiaoqin2003@yahoo.com.cn。