DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.010
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2108 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2108-03

人内皮活化相关新基因 *eola*1 的原核表达及鉴定

蔡 震,梁自文,罗向东,杨宗城,孙荣距 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 获得内皮高表达脂多糖相关因子1(*eola*1)表达蛋白并对其进行分析鉴定。方法 采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法从人ECV-304细胞中扩增出*eola*1基因开放阅读框,构建重组质粒,测序鉴定后转化大肠杆菌,IPTG诱导表达,裂解细菌抽提蛋白,目的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western免疫印迹鉴定。结果 测序鉴定*eola*1开放阅读框成功插入PET-46-EK/LIC质粒;重组质粒在大肠杆菌中成功表达人*eola*1蛋白,主要以包涵体形式存在,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定其分子质量约20×10^3,Western blot验证出目的蛋白特异表达。结论 应用原核表达系统能够成功获得目的蛋白,为下一步制备*eola*1单克隆抗体及基因功能研究打下基础。

关键词:原核表达;重组质粒;包涵体
中图法分类号:R394-33;R394.3 文献标识码:A

Identification of prokaryotic expression of a human *eola*1 *gene in* E. coli

CAI Zhen, LIANG Zi-wen, LUO Xiang-dong, YANG Zong-cheng, SUN Rong-ju (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To obtain and identify the expression product of human *eola*1 *gene in* E. coli. **Methods** The open reading frame of human *eola*1 was obtained by RT-PCR from human ECV-304 cells, and then inserted into PET-46-EK/LIC vector. Recombinant plasmid was identified by colony PCR and transformed into BL21 (DE3) pLysS and induced by IPTG for expressing protein. The expression product was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The recombinant plasmid was successfully constructed and identified by sequencing. The expressed protein in *E. coli* mainly existed in the form of inclusion body. SDS-PAGE analysis and Western blotting revealed that the molecular weight of *eola*1 was about 20×10^3. **Conclusion** We have successfully obtained the *eola*1 protein by PET system, which lays the foundation for the preparation of monoclonal antibodies and for the functional studies of *eola*1.

Key words: prokaryotic expression; recombinant plasmid; inclusion body

人内皮高表达脂多糖相关因子1(endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1, *eola*1)基因是本研究室前期应用抑制消减杂交和cDNA末端扩增技术,从经脂多糖(LPS)刺激后的人脐静脉内皮细胞系中克隆到的一个人类新基因,它在2002年3月作为人类新基因被GenBank全长序列库所接受(No. AY074889),因其受到LPS刺激后在内皮细胞中上调表达,故暂命名为内皮细胞高表达脂多糖相关因子1(*eola*1)。经生物信息学分析提示,该基因长1 404个bp,定位于染色体Xq27.4,其编码蛋白由158个氨基酸组成,分子量17.89×10^3,等电点6.43[1]。目前此基因功能不明,本研究拟应用PET(plasmid for expression by T7 RNA polymerase)系统对*eola*1基因进行原核表达,将表达出的目的蛋白进行分析鉴定,为后期纯化制备抗*eola*1单克隆抗体做准备,进一步进行其功能研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人ECV-304细胞株为本实验室保存;TRIZOL提取试剂购自北京鼎国生物公司;Takara RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1和Pyrobest DNA polymerase购自Takara公司;E.Z.N.A. Gel Extraction Kit和E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit 1为Omega公司产品;PET-46 EK/LIC Vector Kit、Bugbuster蛋白抽提试剂、His.Tag Monoclonal

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371468)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371468)
作者简介:蔡 震(1976-),男,天津市宝坻区人,硕士研究生,医师,主要从事血管内皮细胞损伤机制方面的研究,电话:(023)65461987
通信作者:梁自文,电话:(023)68754138,E-mail:liangzw@mail.tmmu.com.cn.
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Antibody 及 Goat-Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate 购自 Novagen 公司; NBT/BCIP 显色剂购自上海华舜公司, 低分子量 Marker 购自上海生物化学研究所。

1.2　方法

1.2.1　人 ECV304 细胞总 RNA 的提取　　收集培养的人 ECV-304 细胞约 5×10^7 个, 经 PBS 漂洗 2 次, 按照 TRIZOL 提取试剂说明操作, 获得细胞总 RNA 样品后测 A_{260}/A_{280} 比值分析纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2　引物的设计与合成　　根据 *eola*1 基因开放阅读框 (ORF) 序列设计一对上游引物: 5′-GACGACGACAAGAT-GAAGTTTGGCTGCC -3′, 下游引物: 5′-GAGGAGAAGCCCG-GTTCACACTTC ATG-3′, 交由上海博亚生物公司合成。

1.2.3　细胞总 RNA 的反转录 PCR　　根据 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1 试剂盒说明配制 20 μl 的反转录反应体系, 反转录条件: 50 ℃, 30 min; 99 ℃, 5 min; 4 ℃, 5 min。将所得结果加入 80 μl 的 PCR 反应体系(应用高保真的 Pyrobest DNA 聚合酶); PCR 条件: 94 ℃预变性 2 min; (94 ℃变性 30 s; 59 ℃退火 30 s; 72 ℃延伸 1 5 min) 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分析后目的片断凝胶回收纯化。

1.2.4　重组质粒的构建及转化细菌　　目的片段经 T4 DNA polymerase 和 dATP 处理成粘性末端, 且与 PET-46EK/LIC 空质粒粘端互补, 两者退火连接构建成重组质粒; 将后者用热休克方法转化到非宿主表达菌(NovaBlue GigaSingles 感受态细菌), 涂布于 LB 培养板(Amp 50 μg/ml) 上过夜生长, 应用菌落 PCR 的方法筛选出阳性单菌落, 菌液标本送上海博亚生物公司测序鉴定。

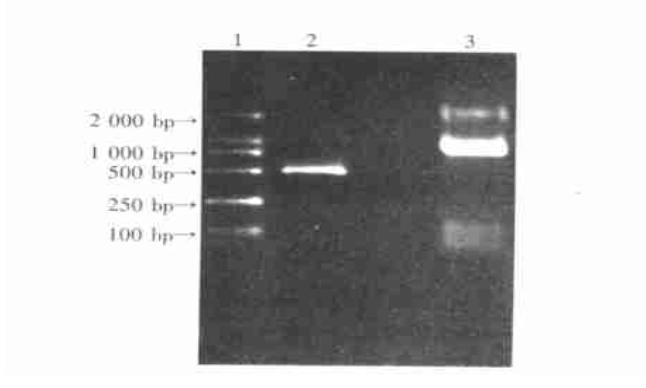
1.2.5　重组质粒转化宿主表达菌　　将测序正确的菌株接种至 LB 培养板(Amp 50 μg/ml) 上生长 12 h, 挑取单菌落, 37 ℃恒温摇菌过夜, 按质粒提取试剂盒说明操作提取重组质粒; 将后者用热休克方法转化到宿主表达菌 BL21(λDE3) pLysS, PCR 筛选阳性菌落, −70 ℃保存。

1.2.6　*eola*1 在大肠杆菌中的表达及目的蛋白分析　　挑取单菌落接种至 LB 培养液(含 Amp 50 μg/ml), 37 ℃摇菌培养 12 h, 将菌液以 1∶100 接种于新鲜 LB 培养基(含 Amp 50 μg/ml), 振荡摇菌 2 5 h 后至 $D_{600}\approx 0.6$, 分成两组, 一组加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导摇菌培养 3 h, 另一组不加 IPTG, 摇菌培养 3 h, 分别取菌液 1 ml, 离心收集菌体, PBS 重悬后加 2× SDS 上样缓冲液, 超声波处理后 85℃加热 3 min 变性获 10 倍浓缩体积的细菌总蛋白; 分别另取菌液 10 ml, 离心收集菌体, BugBuster 液 1 ml 裂解后离心, 取上清加 2× SDS 上样缓冲液混合 85 ℃加热 3 min 变性获得细菌胞质可溶性组分; 将沉淀用 20 mmol/L Tris-Hcl (pH 7.5) 重复洗涤沉淀后重悬于 1 ml 的 1%SDS, 加 2× SDS 上样缓冲液混合 85 ℃加热 3 min 变性获 10 倍浓缩体积的细菌胞质不溶性组分; 将上述样品进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析目的蛋白表达。

2　结果

2.1　ECV304 细胞总 RNA 及 RT-PCR 产物

人 ECV304 细胞中抽提的总 RNA 进行紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 比值为 1.973 6, 表明样品纯度较高, 符合提取标准; 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示有 28、18 s 和 5 s 明显条带, RT-PCR 产物电泳可以得到约 500 bp 的目的基因片断, 与 *eola*1 基因开放阅读框大小一致, 见图 1。



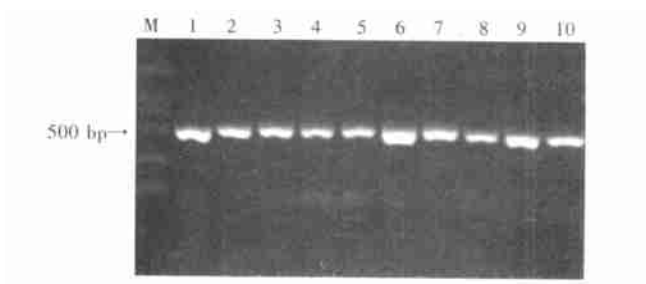
1: DL2000 PCR marker; 2: RT-PCR product; 3: Total RNA of ECV-304 cells

图 1　1% 琼脂糖凝胶电泳分析人 ECV304 细胞总 RNA 及其 RT-PCR 产物

Fig 1　Electrophoresis of total RNA extracted from human ECV304 cell and RT-PCR product on 1% agarose gel

2.2　重组质粒转化结果鉴定

应用 PET-46-EK/LIC 空质粒和 RT-PCR 产物构建的重组质粒转化到非宿主表达菌后, 随机挑选 10 个单克隆菌落进行 PCR 筛选, 结果显示 10 个样品均能扩增出 500 bp 大小碱基的片断, 随机挑选两个样品进行测序鉴定证实质粒构建成功, 见图 2。



M: DL2000 marker; 1− 10: Colony PCR products

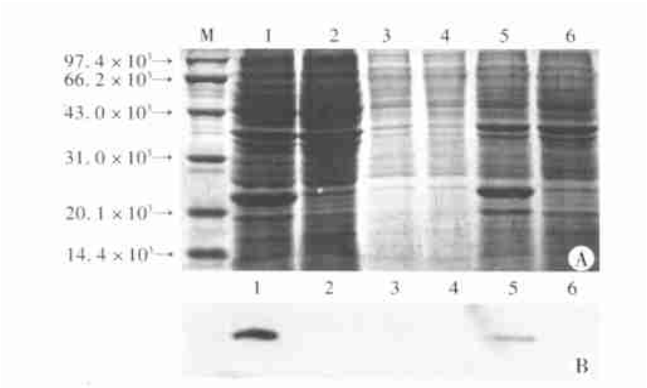
图 2　1% 琼脂糖凝胶电泳分析重组质粒的菌落 PCR 筛选

Fig 2　Electrophoresis of colony screening of recombinant plasmids on 1% agarose gel

2.3　表达蛋白产物分析鉴定

构建的重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中诱导表达出明显的目的蛋白, 主要以包涵体形式在胞质不溶性表达, 少量为胞质可溶性表达, 分子量约 20×10^3, 与预测基本一致, 用带 His 标签的鼠单抗作为一抗进行 Western blot 能够检测出的特异表达的蛋白条带, 见图 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Coomassaie brilliant blue staining of the same gel; B: Immunoblotting with membrane probed using His. Tag monoclonal antibody; M: Marker; 1: Lysate of *E. coli* after induction by IPTG; 2: Lysate of *E. coli* non-induction by IPTG; 3: Soluble fractions of induced lysate; 4: Soluble fractions of non-induced lysate; 5: Insoluble fractions of induced lysate; 6: Insoluble fractions of non-induced lysate

图 3 12%SDS-PAGE 和 Western Blot 分析重组质粒在大肠杆菌中的表达

Fig 3 The induced expression of recombinant plasmid PET46-EK/LIC-*eola*1 in *E. coli* by SDS-PAGE and Western blotting

3 讨论

脂多糖(LPS)是革兰阴性细菌内毒素的主要毒性成分,在严重烧创伤感染时大量内毒素入血可以诱发加重为脓毒症、多脏器功能不全(MODS),是导致严重烧创伤患者死亡的主要原因之一,这与 LPS 刺激血管内皮细胞进而诱发并加重全身炎症反应密切相关[2]。其发生机制主要涉及两个方面,即 LPS 的直接损害血管内皮细胞作用和 LPS 刺激其释放 IL-6、IL-8、TNF-α 等炎性介质的间接损害作用[3]。本实验室梁自文博士前期在对人脐静脉内皮细胞受到 LPS 刺激后基因表达谱改变的研究中发现了人 *eola*1 基因,且该基因受到 LPS 刺激后有明显上调表达;生物信息学提示,因其所编码的蛋白结构存在蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶 2 磷酸化位点及一个螺旋-转角-螺旋(HTH)基序,故推测其可能为细胞转录因子,参与细胞内的信号转导[4]。目前由于该基因发现时间较短,国内外对其研究较少,功能尚不明确。

本研究应用 RT-PCR 的方法从人 ECV-304 细胞中能够扩增出人 *eola*1 基因的开放阅读框序列。*eola*1 蛋白分子量预测值为 17.89×10^3,因本实验所表达目的蛋白 N 端引入 6 个组氨酸序列标签和肠激酶酶切位点,故电泳条带出现在 20×10^3 大小位置,与预测值基本相符;抗组氨酸序列标签免疫印迹可以在相应位置检测出特异的蛋白条带。

*eola*1 蛋白为可溶性蛋白,经原核表达获得的目的蛋白主要以胞质不溶性组分的包涵体形式存在;包涵体是多肽错误折叠的高密度多聚体,它在细胞内形成的原因被认为是细胞内加工表达多肽正确折叠的能力丧失。当外源基因在原核细胞中表达时,尤其在大肠杆菌中高效表达时,由于形成蛋白的速度快产量高,蛋白不能及时正确折叠而大量堆积形成[5]。包涵体主要成分是表达产物,还含有宿主菌的外膜蛋白、RNA 聚合酶、RNA、DNA、脂类及糖类等物质,此外,包涵体的形成还被认为与宿主菌的培养条件,如培养基成分、温度、pH 值、离子强度等因素有关[6]。包涵体内的蛋白不具有生物学活性,因此要获得具有生物学活性的蛋白质必须将包涵体溶解,释放出其中的蛋白质,并进行蛋白质的复性[7]。

胞质表达的可溶性蛋白具有天然构象与活性,但表达产量低,后期纯化困难;胞质包涵体形式表达的蛋白表达量高,但天然结构被破坏,纯化之前或之后要复性恢复其天然结构,操作相对复杂。适当对蛋白表达条件进行调整可以达到预期实验目的,如目的蛋白表达总量可以根据诱导时间、诱导温度、IPTG 浓度,抗菌素浓度等条件调整;增加目的蛋白可溶性表达量有时可以通过降低诱导温度和延长诱导时间达到。我们将根据蛋白表达条件的优化情况来确定后期纯化方案,目前本实验正在进行之中。

参考文献:

[1] 梁自文,杨宗城,罗向东. 人类新基因 *eola*1 全长 cDNA 序列的克隆[J]. 第三军医大学学报,2002,24(3):封 2.

[2] 黎 鳌,杨宗城. 黎鳌烧伤学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001. 67-69.

[3] 罗向东,石富胜,王晓军,等. LPS 对血管内皮细胞损伤的直接损伤作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2003,25(18):1609-1612.

[4] 梁自文,杨宗城,罗向东,等. 人类内皮活化相关新基因 *eola*1 的发现及初步研究[J]. 解放军医学杂志,2003,28(5):422-424.

[5] Middelberg A P. Preparative protein refolding[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(10): 437-443.

[6] Strandberg L, Enfors S O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(6): 1669-1674.

[7] Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, *et al*. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies[J]. Protein Exp Purif, 2003, 28(1): 1-8.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net