DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.012
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1146 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)13-1146-03

核受体PPARγ-LBD在原核系统的最适表达及纯化

曹廷兵,叶治家,彭家和,巩 燕,江 渝 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探索诱导PPARγ-LBD的最适表达条件,提高可溶性PPARγ-LBD蛋白在大肠杆菌中的表达量,然后用Ni^{2+}-NTA离子交换树脂对表达蛋白进行分离纯化。方法 PPARγ-LBD在大肠杆菌BL21(DE3)中进行诱导表达时,以不同IPTG浓度、不同温度(37 ℃,30 ℃,20 ℃),确定可溶性PPARγ-LBD蛋白表达的最适条件;然后用Ni^{2+}-NTA离子交换树脂进行分离纯化,其产物进行SDS-PAGE纯度分析和Western blotting鉴定。结果 建立了重组蛋白PPARγ-LBD的最适诱导条件,即0.5 mmol/L IPTG浓度,20 ℃诱导14 h其可溶性表达蛋白的量最高;纯化产物经SDS-PAGE纯度分析大于90%以上;Western blotting检测,纯化产物为PPARγ-LBD目的蛋白,其分子质量约34×10^3。结论 重组蛋白PPARγ-LBD在*E. coli*中进行了成功表达和纯化,并且降低温度可提高可溶性蛋白PPARγ-LBD表达量达50%以上。

关键词:PPARγ;PPARγ-LBD;表达;纯化
中图法分类号:R392.11;R394-33 文献标识码:A

Expression and purification of the nuclear regulator PPARγ-LBD in *E. coli*

CAO Ting-bing, YE Zhi-jia, PENG Jia-he, GONG Yan, JIANG Yu (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To find out the best expression condition to induce the increased output of the soluble PPARγ-LBD protein in *E. coli* and to purify the expressed PPARγ-LBD protein. Methods PPARγ-LBD was induced to express in *E. coli* by means of different IPTG concentrations and different culture temperatures, then it was isolated and purified by Ni^{2+}-NTA ion exchange resin. The expressed PPARγ-LBD was analyzed by SDS-PAGE and identified by Western-blotting. Results The best expression condition for recombinant protein PPARγ-LBD was established: the maximum output of the soluble PPARγ-LBD protein could be induced by 0.5 mmol/L IPTG at 20 ℃ after culture for 14 h. SDS-PAGE revealed that the purity of the purified product was above 90%. Western blot analysis showed that the purified product was the objective protein of PPARγ-LBD and its molecular weight was about 34×10^3. Conclusion Recombinant protein PPARγ-LBD is expressed successfully in *E. coli* and the output of soluble PPARγ-LBD can be increased by 50% at temperature lower than that of normal induction.

Key words: PPARγ; PPARγ-LBD; expression; purification

过氧化物酶体增生物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是核受体超家族的成员。人的PPAR分α、β、γ 3种亚型[1~3],均属于配体激活的核转录因子。近几年研究表明核受体PPARγ参与了各种生物学途径的调节,比如促进脂肪细胞的分化、增强胰岛素的敏感性等。同时PPARγ与某些代谢性疾病,如2型糖尿病、动脉粥样硬化、肿瘤等的发生密切相关[4]。因此,利用核受体PPARγ的配体结合域(Ligand binding domain, LBD)作为靶分子,用于人工合成配体或噬菌体库等筛选其高特异性、高亲和力配体,对研制、开发2型糖尿病等相关疾病的新药具有广阔的应用前景。

目前,国内外尽管已有用重组技术对PPARγ-LBD进行了表达和纯化[5],但表达系统和纯化系统与本研究无相同之处。为了获得大量PPARγ-LBD,以便直接用于配体结合活性分析及新配体的筛选。我室把从人脂肪组织来源的PPARγ-LBD cDNA克隆在pET28a原核表达载体上,该表达系统表达的重组蛋白其N端带有6×His纯化标签,便于表达蛋白的纯化和配体的筛选。本研究在我室前期已构建好pET28a-PPARγ-LBD原核表达载体基础上,通过对重组菌进行最适诱导表达条件的优化,提高了可溶性重组蛋白PPARγ-LBD的表达量,并对重组蛋白进行了大量分离纯化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Ni^{2+}-NTA离子交换树脂,6×His抗体购自Qiagen公司;蛋

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070358);重庆市科技攻关项目(200126)

作者简介:曹廷兵(1968-)男,重庆市璧山县人,实验师,主要从事真核基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:2002-09-29;修回日期:2003-01-22

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

白胨和酵母提取物购自 Qxoid 公司; IPTG 购自上海 Sangon; PMSF 和β-巯基乙醇购自 BM 公司。

Bio-Rad 蛋白电泳和转印系统购自 Bio-Rad 公司, HZQ-Q 型控温式恒温振荡器购自哈尔滨市东联电子技术公司, HD-2 型核酸蛋白检测仪购自上海沪西分析仪器厂。

1.2　PPARγ-LBD 最适表达条件的建立

从人的面部脂肪组织提取总 RNA, 采用 RT-PCR, 然后把 cDNA 克隆到原核表达载体 pET28a, 并进行序列测定, 构建好的原核表达重组子命名为 pET28a-PPARγ-LBD。接种 pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3)菌种于 5 ml LB 液中(卡拉霉素 50 μg/ml LB), 37 ℃, 200 r/min, 过夜生长; 以相同条件按 2%的比例接种到 10 ml LB 液中, 6 管; 培养至 D_{600} = 0.8 时, 加入 IPTG 终浓度依次为 0.0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L, 继续培养; 分别于 3、4、5、6 h 取 1.5 ml 细菌液, 测 D_{600} 值, 离心收集细菌沉淀加入 TE 缓冲液, 超声破菌; 12 000× g, 4 ℃ 离心 20 min; 分别收集上清和沉淀; SDS-PAGE 电泳分析 PPARγ-LBD 蛋白的表达情况。以 37 ℃时可溶性重组蛋白的表达量最大时的 IPTG 浓度作为最适诱导表达浓度, 降低细菌的培养温度来分析 PPARγ-LBD 蛋白的表达情况。实验设置 30 ℃, 20 ℃两种温度, 30 ℃加入 IPTG 诱导后, 分别于 4、6、8、10、12 h 取 1.5 ml 细菌液; 20 ℃加入 IPTG 诱导后分别于 8、10、12、14、16 h 取 1.5 ml 细菌液; 后续实验步骤与37 ℃ 相同。

1.3　PPARγ-LBD 的大量纯化

按小量培养条件接种 pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3)菌种于 15 ml LB 中, 37 ℃振荡培养过夜; 然后按 2%比例扩大培养 1 000 ml 菌液, 诱导条件为 IPTG 终浓度 0.5 mmol/L, 20 ℃诱导培养 14 h; 离心收集细菌沉淀, 冰冷的 Lysis buffer 洗涤 1 次, 得到约 4 g 湿菌, 以每克细菌沉淀加入 4 ml Lysis buffer, 同时加入新配制的终浓度为 1 mmol/L PMSF 和 0.01% Tween-20; 冰上超声碎菌, 超声完毕加入终浓度为 5.0 mmol/L β-巯基乙醇; 4 ℃离心收集上清, 取上清上样于由 Lysis buffer 平衡的柱床体积为 2 ml 的 Ni^{2+}-NTA 亲合层析柱中(柱的结合能力是 5~10 mg/ml); 柱的流速为 0.5 ml/min; 30 倍柱床体积 Wash buffer 洗柱, 5 倍柱床体积 Elution buffer 洗脱目的蛋白, 收集洗脱峰蛋白。详细的实验步骤见试剂盒说明书。

1.4　纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳

以洗脱液为样品, 15%SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕考马斯亮蓝染色, 然后用凝胶成像系统分析蛋白的纯度。

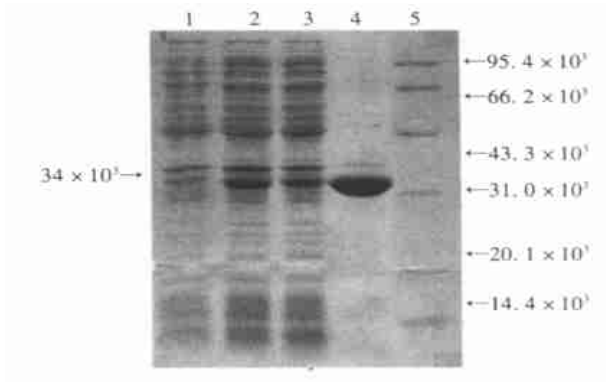
1.5　纯化蛋白的 Western blotting 分析

取纯化蛋白 0.5 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转印到 NC 膜上, 5%脱脂奶粉(1× PBS 配制)封闭, 再以抗 6× His 单体 37 ℃孵育 30 min, 洗膜后用 HRP 标记的第二抗室温孵育 1 h, 洗膜后加 DAB 显色。

2　结果

2.1　PPARγ-LBD 在 *E. coli* 中诱导表达

pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3)重组菌在不同 IPTG 浓度, 不同温度条件下诱导表达, 表达产物进行 10% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色后, 用凝胶成像系统分析, 结果显示 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 20 ℃诱导 14 h, 其可溶性重组蛋白的含量比在常规诱导条件下(IPTG 浓度为 1.0 mmol/L, 37 ℃诱导 4 h)提高 50%以上, 见图 1。



1: pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3) before induction; 2: Ultrasonic supernatant of pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3) induction with 0.5 mmol/L IPTG at 20℃ after 14 h; 3: Ultrasonic supernatant of pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3) induction with 1.0 mmol/L IPTG at 37℃ after 4 h; 4: Ultrasonic deposit of pET28a-PPARγ-LBD/BL21(DE3) with 1.0 mmol/L IPTG at 37℃ after 4 h; 5: Protein molecular marker

图 1　重组 PPARγ-LBD 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

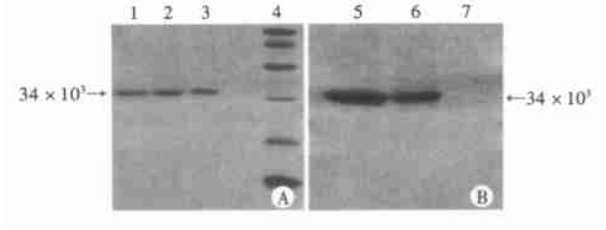
Fig 1　SDS-PAGE analysis of recombinant protein PPARγ-LBD

2.2　PPARγ-LBD 重组蛋白的纯化

1 000 ml 诱导表达的菌液, 经 Ni^{2+}-NTA 离子交换树脂亲和纯化, 洗脱液进行 15% SDS-PAGE 电泳, 凝胶成像系统分析结果显示纯化的重组蛋白的纯度大于 90%以上, 见图 2A。

2.3　纯化蛋白的 Western blotting 分析

用抗 6× His 单抗对纯化产物进行 Western blotting 分析; 结果显示, 纯化后的重组蛋白和诱导后的全菌中均有与抗体特异性结合的蛋白带, 其分子质量约为 34× 10^3, 与理论计算相吻合, 而诱导前全菌的相应位置则没有抗原抗体复合物条带出现, 见图 2B。



1~3: The collected fraction of eluate; 4: Protein molecule marker; 5: Purified protein of recombinant PPAR γ-LBD; 6: Total protein of pET28a-PPAR γ-LBD/BL21(DE3) after induction; 7: Total protein of pET28a-PPAR γ-LBD/BL21(DE3) befor induction

图 2　亲和纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱(A)和 Western blotting 分析(B)

Fig 2　SDS-PAGE(A) and Western blot analysis(B) for purified recombinant proteins

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

3 讨论

近年大量有关 PPARγ 的研究，揭示PPARγ 核受体在生物学过程中有多种功能，参与了细胞的分化、新陈代谢的调节、细胞的增生和维持胰岛素的敏感性等[6]。同时 PPARγ 与某些代谢性疾病，如动脉粥样硬化的形成和2型糖尿病的发生等有关，由于 PPARγ 属于配体激活调节因子，因此如果能寻找到新的高亲和力、高特异性配体，对于防治其相关疾病具有十分重要的意义。因此以 PPARγ-LBD 作为靶分子筛选新的高特异性、高亲和力的配体，用于 2 型糖尿病等相关疾病的治疗成了研究的热点。

目前发现的 PPARγ 的配体均存在亲和力低或特异性不高的问题[7]，均是 PPARγ 的部分激动剂，只能在较高的浓度范围内与 PPARγ 结合，部分活化 PPARγ；如人工合成的 TZD（Thiazolidinedione，TZD）是 PPARγ 的高亲和力配体（目前是2型糖尿病的首选药物），但特异性较差，并且部分2型糖尿病患者在使用这类药物时，发现对肝脏有一定的毒副作用，因此限制了这类药物的广泛使用。所以以 PPARγ-LBD 作为靶分子筛选新一类 PPARγ 高特异性、高亲和力的配体仍然是开发2型糖尿病药物的有效途径。

本研究对 PPARγ-LBD 蛋白在大肠杆菌 BL21（DE3）中进行 IPTG 常规诱导表达时，发现可溶性重组蛋白的量较少，不利于天然构象 PPARγ-LBD 蛋白的大量制备，因此我们通过设置不同 IPTG 浓度和降低大肠杆菌培养温度[8]，使可溶性 PPARγ-LBD 蛋白的量比在常规培养条件 37 ℃，1.0 mmol/L IPTG 浓度下提高50%以上。这可能是因为进行低温诱导时减弱了蛋白表面疏水基的相互作用，降低了目的蛋白的表达速度，有利于蛋白的正确折叠，而形成可溶性的具有天然构象的蛋白。由于构建的表达载体在目的蛋白的 N 端融合了 6×His 的纯化标签，并且此纯化标签据文献报道和我室以前表达的蛋白来看，一般对表达蛋白的活性无太大的影响，根据 6×His 与过渡态金属离子 Ni^{2+} 能高亲和力结合的特点，利用 Ni^{2+}-NTA 亲和树脂可对表达蛋白进行直接纯化，免去了用包涵体来纯化目的蛋白的繁琐以及避免了复性时蛋白不易形成正确折叠的缺点。目前，我室正在用纯化的 PPARγ-LBD 蛋白进行噬菌体呈现肽库的配体筛选实验。因此这一工作对进一步研究 PPARγ-LBD 的功能和进行体外新配体的筛选奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism[J]. Endocr Rev, 1999, 20(5): 649－688.

[2] Kliewer S A, Forman B M, Blumberg B, *et al*. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(15): 7355－7359.

[3] Tontonoz P, Hu E, Graves R A, *et al*. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer[J]. Genes Dev, 1994, 8(10): 1224－1234.

[4] Evan D R, Bruce M S. PPARγ: A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 37731－37734.

[5] 王小行，周 建，向 珑，等. PPARγ 配体结合域的表达纯化和鉴定[J]. 四川大学学报，2001，38(6)：919－923.

[6] Juge A C, Pernin A, Favez T, *et al*. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5′-flanking region[J]. J Biol Chem, 1997, 272(40): 25252－25259.

[7] Reginato M J, Krakow S L, Bailey S T, *et al*. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. J Biol Chem, 1998, 273(4): 1855－1858.

[8] F 奥斯伯，R E 金斯顿，J G 塞得曼，等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，2001. 639－640.

（编辑 刘洪娥）

（上接 1145 页）

酸转运，引起神经细胞发生病理及电生理方面的改变。

在相关因素的研究中，病程的长短一直被认为是最重要的。本研究表明，随着病程的延长，糖尿病周围神经病变的发生率明显增加，各组间有显著差异。与文献[4]报道结果相符。而在糖尿病患者的神经电生理检查中，以 SCV 最为敏感，特异性则是肌电图最好。

神经电生理检查，尤其是 SCV，是早期发现糖尿病周围神经病变的一个敏感性较高的指标。因此不管有无神经症状，行神经电生理检查是十分必要的，这有助于糖尿病周围神经病变的早期诊断与治疗。

关键词：2型糖尿病；周围神经病变
中图法分类号：R587.106 文献标识码：B

参考文献：

[1] 毛微波，郭晓蕙. 糖尿病周围神经病变的分类、鉴别诊断与分期[J]. 中国糖尿病杂志，1998，6(3)：190－192

[2] 张 红，廖二元. 糖尿病自主神经病变的临床表现及其识别与评价[J]. 实用糖尿病杂志，1998，6(3)：5－7.

[3] Said G. Diabetic neuropathy: an update[J]. J Neurol, 1996, 243(6): 431－440.

（编辑 陈聪连）

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