DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.021
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
54 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)01-0054-03

P-糖蛋白的融合表达研究

王祥卫[1],杨唐俊[1],张立新[2],李春海[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037;[2]军事医学科学院基础医学研究所肿瘤分子生物室,北京 100070)

提 要:目的 对P-糖蛋白胞外段基因进行表达研究。方法 根据P-糖蛋白抗原性分布曲线及mdr1基因结构,设计了一对引物,PCR扩增产物插入到pGEM-T中,经测序正确后,再克隆入表达载体pGEX-2T,构建高效表达载体pGEX-Pgp,转化大肠杆菌DH5α,进行表达、鉴定及纯化。结果 经IPTG诱导4 h,蛋白表达即达高峰,SDS-PAGE分析,表达出约30 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;表达载体
中图法分类号:R394.2;R915 文献标识码:A

Expression of fused P-glycoprotein in *E. coli* DH5α

WANG Xiang-wei, YANG Tang-jun, ZHANG Li-xin, LI Chun-hai (Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression of the extracellular fragment of P-glycoprotein in the bacteria. Methods According to the P-glycoprotein antigen analyses and mdr1 gene structure, a couple of primers were designed to amplify the extracellular DNA fragment of the protein with PCR. The product was inserted into pGEM-T vector followed by sequencing. The sequencing-verified vectors were cloned into pGEX-2T to get a highly expression recombinant vector pGEX-Pgp. The recombinant was transferred into *E. coli* DH5α, and its expression, identification and purification were studied. Results The highest level of recombinant expression was achieved at 4 h after IPTG induction. SDS-PAGE analysis indicated that the expressed protein was about 30×10^3. Conclusion The target gene fragment expression at high level is established for the preparation of its antibody and biospanning of its specific peptide by using random phage library, founding a basis for the targeting treatment of multidrug resistance.

Key words: multidrug-resistance; P-glycoprotein; expression

多药耐药(Multidrug-resistance, MDR)是指肿瘤细胞对多种结构、功能及在细胞内作用位点不同的化疗药物产生交叉耐药性。P-糖蛋白(P-glycoprotein)在肿瘤细胞中的高表达是导致MDR产生的主要原因[1]。我们曾建立了人膀胱癌多药耐药细胞模型,并对其多药耐药性产生机制进行了研究[2];在此研究基础上,我们通过对P-糖蛋白结构和功能的进一步分析,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。

1 材料与方法

1.1 试剂

菌种DH5α本室保存。含mdr1全长cDNA的质粒pHAMDR1/A由美国国家癌症研究所细胞生物室的Gottsman教授馈赠。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Boringer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柱购自法玛西亚公司。

1.2 P-糖蛋白胞外段DNA的扩增及鉴定

1.2.1 引物设计 根据mdr1 cDNA序列,用Primer Premier软件(Version5.0)设计一对P-糖蛋白胞外段DNA扩增引物:

上游引物P1:5′ CGC GGA TCC GCA GGA AAT TTA GAA GA 3′

下游引物P2:5′ CCG GAA TTC TTA GGC ATA CCT GGT CAT GTC TTC C 3′。

其中P1的5′端引入一*Bam* HⅠ酶切位点,P2的5′端引入一*Eco*RⅠ酶切位点,内含终止密码子TAA。

1.2.2 P-糖蛋白胞外段DNA的PCR扩增 以pHAMDR1/A为模板,用P1-P2引物PCR扩增DNA。反应体系:10 μl 10× Ex Taq缓冲液,0.5 μl Ex Taq(2.5 U),8 μl dNTP(2.5 mmol/L),5 μl P1-P2(10 μmol/L),1 μl pHAMDR1/A,75.5 μl双蒸水。反应条件:94 ℃,5 min;94 ℃,5 min;加入0.5 μl Ex Taq(2.5 U),(94 ℃,60 s→50 ℃,40 s→72 ℃,40 s)×30;72 ℃,10 min。

作者简介:王祥卫(1969-),男,山东省济南市人,博士,讲师,主要从事人膀胱癌多药耐药现象方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755114-74624,E-mail:wxw0324@email.com

收稿日期:2001-09-05;修回日期:2001-12-10

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

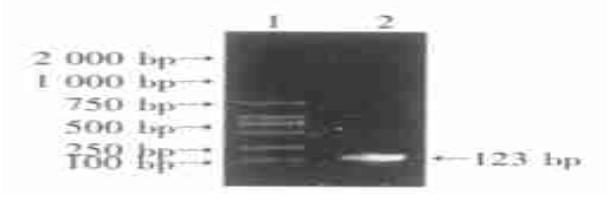
1.2.3　PCR 扩增片段的回收　　按 Promega PCR 片段回收试剂盒操作说明进行回收: 将扩增产物行 1%琼脂糖电泳, 切下扩增条带, 放入一 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml resin, 65 ℃水浴使融化(约 3~5 min), 混匀后立即移入一 5 ml 注射器中, 将液体注入纯化柱中, 2 ml 洗液洗 1 次, 10 000 r/min, 30 s, 加入 50 μl 灭菌水, 室温放置 1 min, 10 000 r/min, 30 s, 收集洗脱液, −20 ℃保存。

1.2.4　PCR 扩增片段的克隆及鉴定　　将扩增的纯化产物按操作说明连入 pGEM-T 载体: 1 μl 10× 连接缓冲液, 1 μl pGEM-T(50 ng), 2 μl PCR 产物(20 ng), 1 μl T4 连接酶(3 U), 5 μl 灭菌水, 混匀, 4 ℃过夜。含 P-糖蛋白胞外段 DNA 的质粒命名为 pGEM-Pgp。取 2 μl 连接产物进一步转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 用 α 互补作用进行重组克隆的筛选, 所选克隆经 LB 培养基(100 μg/ml Amp), 37 ℃振荡过夜, 提取质粒, *Bam* HⅠ、*Eco* RⅠ双酶切鉴定: 2 μl 10× buffer K, 5 μl 纯化质粒, 1 μl *Bam* HⅠ(10 U), 1 μl *Eco* RⅠ(12 U), 11 μl 灭菌水, 37 ℃水浴 3 h。2%琼脂糖电泳鉴定。

1.3　P-糖蛋白原核表达载体的构建和鉴定

1.3.1　pGEM-Pgp 及 pGEX-2T 的酶切及回收　　pGEM-Pgp 质粒用 *Bam* HⅠ、*Eco* RⅠ进行双酶切: 5 μl 10× buffer K, 20 μl pGEM-Pgp, 2 μl *Bam* HⅠ(20 U), 2 μl *Eco* RⅠ(24 U), 21 μl 灭菌水, 37 ℃水浴, 4 h。所得片段用 PCR 片段回收试剂盒回收。取约 4 μg pGEX-2T 用 *Bam* HⅠ、*Eco* RⅠ进行双酶切及回收, 方法同上。

1.3.2　融合表达载体 pGEX-Pgp 的构建和鉴定　　1 μl 10× 连接缓冲液, 0.25 μl 酶切后 pGEX-2T(50 ng), 1 μl 酶切后 P-gp(20 ng) DNA 片段, 1 μl T4 连接酶(3U), 6.75 μl 灭菌水, 4 ℃过夜。融合表达载体命名为 pGEX-Pgp, 见图 1, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态, LB 板上用氨苄青霉素(100 μg/ml)筛选。提取质粒, *Bam* HⅠ、*Eco* RⅠ进行双酶切初步鉴定(方法同上)。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: DL2000 DNA marker; 2: PCR product

图 1　PCR 产物分析

Fig 1　Analyses of PCR product

1.4　P-糖蛋白胞外段融合蛋白(GST-Pgp)的初步诱导表达

各挑取单个经 pGEX-Pgp 和 pGEX-2T 转化的 DH5α 菌, 接种 3 ml LB 培养基(100 μg/ml 氨苄青霉素), 37 ℃活化过夜, 按 1∶10 的比例接种新鲜 LB 培养基(100 μg/ml 氨苄青霉素), 37 ℃培养至 A_{600} 约为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.1~1.0 mmol/L, 继续诱导 1~4 h, 取 100 μl 菌液加入 20 μl 5× 样品缓冲液, 煮沸 10 min, 15%SDS-PAGE[1] 鉴定。

1.5　重组融合蛋白(GST-Pgp)及 GST 的纯化、鉴定

诱导后的菌体用 PBS 洗 2 次, 重悬后超声破碎菌体, 加入 Triton X-100 至终浓度 1%, 35 000× *g*, 4 ℃, 40 min, 取上清, 用 GST-Trap 柱分别纯化重组融合蛋白 GST-Pgp 和 GST; 取 8 ml 超声上清, 用 2 ml PBS-T 稀释, 上柱(1 ml/min), 6~10 个柱床体积的 PBS-T 洗柱, 3 柱床体积的洗脱液洗脱融合蛋白。融合蛋白定量, 脱盐处理。15%SDS-PAGE 鉴定。

2　结果

2.1　P-糖蛋白胞外段表达载体的构建与鉴定

以 P-糖蛋白全长 cDNA 为模板, 以 P1-P2 引物扩增得到 123 bp P-糖蛋白胞外段 cDNA, 见图 1。连入 pGEM-T 载体, 用 *Bam* HⅠ和 *Eco* RⅠ酶切, 片段经纯化后连入用同样酶切的 pGEX-2T, 获得融合表达载体 pGEX-Pgp, 见图 2, 用 *Bam* HⅠ和 *Eco* RⅠ初步酶切鉴定, 切出片段大小与设计一致, 见图 3, 进一步 DNA 测序表明, pGEX-Pgp 中的插入序列及读码框架正确, 与文献[3]报道一致。

2.2　GST-Pgp 蛋白的诱导表达、纯化与鉴定

将 pGEX-2T 和 pGEX-Pgp 分别转化大肠杆菌 DH5α, 用 0.2 mmol/L 的 IPTG 37 ℃诱导 2, 3, 4, 5 h, 分别取菌液进行 15%SDS-PAGE, 结果表明, pGEX-Pgp 转化的菌株在约 30×10^3 处出现一条蛋白条带, 与预期融合蛋白大小一致, 见图 4; 而 pGEX-2T 转化的菌株在 26×10^3 处有一条带。取超声破碎处理后的 37 ℃诱导菌液上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 表明上清中可溶性融合蛋白占大多数。

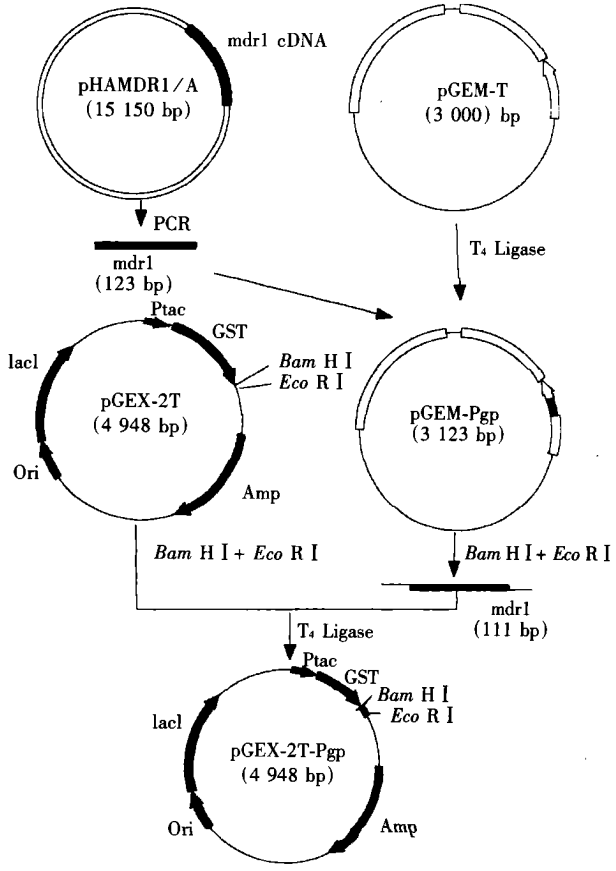
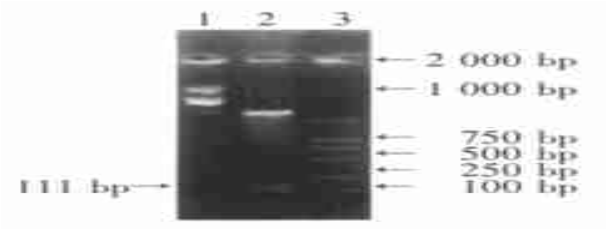


图 2　重组表达载体 pGEX-Pgp 的构建

Fig 2　Construction of recombined expression vector pGEX-Pgp

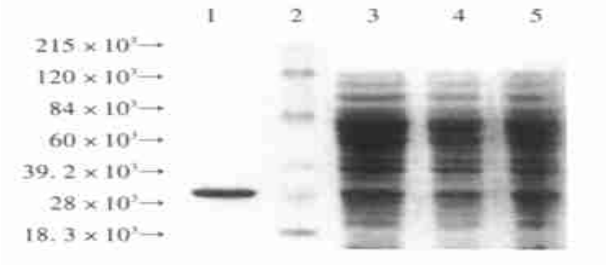
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: pGEX-Pgp; 2: pGEX-Pgp/*Bam* HⅠ + *Eco* RⅠ; 3: DL2 000 DNA marker

图 3 重组载体 **pGEX-Pgp** 的酶切电泳分析

Fig 3 Electrophoresis of pGEX-Pgp with restrictive digestion



1: Purified pGEX-Pgp fused protein; 2: Protein marker; 3 ~ 5: pGEX-Pgp/DH5α supernatant induced by IPTG

图 4 重组蛋白的 **SDS-PAGE** 分析

Fig 4 SDS-PAGE analyses of recombined protein

37 ℃, 0.2 mmol/L IPTG 诱导不同时间, 在诱导 4 h 后, GST-Pgp 表达量达到峰值, 经 Kodak 成像系统进行扫描, 此条件下融合蛋白 GST-Pgp 表达量最高可占菌体总蛋白的 28%。超声破碎处理后的菌液上清首先用 GST-Trap 柱纯化, 取洗脱液行 15% SDS-PAGE, 经 Kodak 成像系统进行扫描, 所得 GST-Pgp 蛋白纯度约为 90%, 见图 4。

3 讨论

P-糖蛋白是由 1 280 个氨基酸残基组成的一种糖蛋白, 该糖蛋白分子形成 12 个跨膜结构区, 含有 2 个 ATP 结合位点, 当细胞内的药物与细胞膜接触时, 其跨膜疏水区会发生构象改变, 形成多个孔状, 将药物排出细胞膜外[4]。对其结构的进一步研究表明: 该糖蛋白分成对称的两段, 中间有连接区, 各含 6 个跨膜结构区, 共有两个糖基化位点[5]。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据文献报道, 该区存在 P-gp 特异性单抗 MRK-16 的抗原性结合位点[6]。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 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。

本研究所要表达的 P-糖蛋白胞外段蛋白, 分子量大约为 30×10^3, 选择 pGEX-2T 原核表达系统进行表达。这样, 通过与 GST 进行融合表达, 可增加 P-糖蛋白的稳定性, 并实现其可溶性表达, 且纯化方便。我们将 P-糖蛋白胞外段的 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-Pgp 的高效表达, 表达量占菌体总蛋白的 28%。进一步的实验表明, 温度和 IPTG 浓度对 GST-Pgp 的产量无显著影响。进一步从超声破碎后的菌体上清中直接用亲和层析进行纯化, 获得了较纯的 GST-Pgp, 纯度≥90%。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-糖蛋白的融合蛋白(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] Noonan K E, Beck D, Holzmayer T A, *et al*. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18): 7160—7164.

[2] 杨唐俊, 范立新, 杨清浩. 人膀胱癌 BIU-87 细胞系多重抗药性的形成[J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17(9): 527—530.

[3] Chen C J, Chin J E, Ueda K, *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.

[4] Dong M, Perrin F, Baggetto L G. Efficient purification and reconstitution of P-glycoprotein for functional and structural studies[J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 28875—28883.

[5] Dayan G, Baubichon-Cortay H, Jault J M, *et al*. Recombinant N-terminal nucleotide-binding domain from mouse P-glycoprotein[J]. J Biol Chem, 1996, 271(20): 11652—11658.

[6] Tang Y, Beuerlein G, Pecht G, *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.

(编辑 郭建秀)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期, 减少编排错误, 请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后, 将修改稿以纯文本格式存入软盘, 并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号, 连同修改稿一并送交本刊编辑部(校外稿件请邮寄)。

(本刊编辑部)

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