DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.001
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0101-05

人酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶C端片段在大肠杆菌中的表达及其抗体的制备

叶治家[1],程天民[2],江智红[3],李伯良[3] (第三军医大学:[1]生物化学与分子生物学教研室;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;重庆 400038;[3]中国科学院生物化学研究所,上海 200031)

提 要 目的:为了表达人ACAT C端片段并制备其抗体。方法:将编码人ACAT羧基端包含第二跨膜(463-550氨基酸残基)的cDNA片断克隆至不同的大肠杆菌表达载体中,构建了系列表达质粒,并在多种大肠杆菌中进行了表达研究。结果:在详细探索表达条件的基础上,经温敏诱导,成功地在大肠杆菌AR68中表达了N端融合ProteinA BC domain的人ACAT羧基末端包含第二个跨膜区的片段,表达量约20mg/L菌液。通过优化纯化条件,经Sepharose 4B-IgG亲和层析柱分离纯化得到表达产物,并制备获得其阳性抗血清。结论:这些工作为进一步表达完整的ACAT蛋白、研究ACAT基因表达调控及其结构与功能的关系奠定了基础。

关键词 酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶;羧基端片段;融合表达;抗体
中图法分类号 R378.2+1:R394.3 文献标识码 A

Expression of human ACAT C-terminal fragment in *E. coli* and preparation of its antiserum

YE Zhi-jia, CHENG Tian-min, JIANG Zhi-hong, LI Bo-liang (Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To express ACAT C-terminal fragment containing the membrane anchoring region 2 (ACATc) and prepare its antiserum. Methods: The gene encoding ACATc was cloned into vector pBLPAV7. Then the plasmid pBLPAV7-ACATc was transferred into E. coli strain AR68. Results: The expressed product of ACARc fused with BC domains of protein A (PABC ACATc) was detected and purified by the affinity chromatography with Sepharose 4B-IgG column respectively. Conclusion: The antiserum against ACATc was prepared and can be used for the immunoassay of recombinant or natural ACAT.

Key words acyl-coA; cholesterol acyltransferase; C-terminal fragment; fusion expression; antibody

酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶(Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase, ACAT; EC 2.3.1.26)催化胆固醇与长链脂肪酸形成胆固醇酯。ACAT在体内胆固醇的吸收、运输、贮存等过程中发挥极其重要的作用,是调节体内胆固醇代谢平衡的关键酶之一[1]。遗传及细胞生物学实验表明,高胆固醇血症引起动脉管壁ACAT活性升高,导致巨噬细胞内胆固醇酯大量堆积,形成泡沫细胞,是动脉粥样硬化症发生的早期事件[2];ACAT突变可能导致智力低下。因此,对ACAT的研究越来越引起重视。ACAT的概念早在1958年就被提出来了,其在细胞内主要分布在粗面内质网膜上,且含量极低,遇去垢剂易失活,分离纯化极其困难[3]。使得对ACAT的研究,多年来停留在细胞水平。1993年美国Dartmouth医学院T.Y. Chang实验室,利用ACAT缺陷的突变CHO细胞株AC29克隆了人ACAT的cDNA[4],从而把ACAT的研究带入分子水平。Chang[1]用抗ACAT N端的抗体,经Western blotting分析,检测ACAT在体内的分

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39425005)
作者简介:叶治家(1962.12),男,湖北省黄岗市人,博士,讲师,主要从事真核基因表达调控的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752261
收稿日期:1999-05-20;修回日期:1999-07-15

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

布，结果出现分子量约 45× 10^3u 单一的条带[5]，明显小于理论分子量 65× 10^3u，这是否存在 C 端缺失还不得而知。有实验结果表明 ACAT knock out 小鼠，其成纤维细胞、巨噬细胞以及肾上腺组织中胆固醇酯的合成明显减少，提示在这些组织细胞中，ACAT 在其胆固醇酯合成过程中起重要作用。但在肝脏胆固醇酯的合成基本不受影响，并且体内糖皮质激素的水平也无明显变化。表明在小鼠体内存在具有 ACAT 样活性的其它酶蛋白分子。计算机分析得知，在已知的 cDNA 库中找到多种与 ACAT C 端具有同源结构的序列[6]。因此，重组表达 ACAT C 端片段并制备相应的抗体，对研究 ACAT 结构与功能的关系以及寻找 ACAT 的同工酶或类似物有十分重要的意义。目前，有关 ACAT 的 C 端表达及其抗体制备均未见有文献报道。我们在进行大量表达及纯化条件摸索的基础上，在大肠杆菌中成功表达了与葡萄球菌蛋白 A BC domain(ProteinA BC，PABC)融合、包含第二个跨膜区的 ACAT C 端片段(PABC-ACATc)，经亲和层析纯化得到表达产物。再用纯化的表达产物免疫大白兔制备了相应的抗血清。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种

包含人 ACAT cDNA K1 的质粒 pACAT15L 由美国 Dartmouth 医学院 T. Y. Chang 实验室惠赠；表达载体 pMFLV3、pBLPAV7、pBLSPV3 及大肠杆菌 BL21(DE3)、MC1061、AR68、RR1 等均由中国科学院生物化学研究所 220 组保存。

1.2 酶、化学试剂

DNA 限制性内切酶、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶购自 Biolabs，丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)为 Fluka 产品，PMSF 购自 Boehringer Mannhein，Sephrose 4B-IgG 本实验室自制，新西兰大耳兔购自中科院实验动物中心，其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 细菌培养、质粒抽提、酶切反应、DNA 电泳鉴定及回收、连接反应、质粒转化

按文献[7]进行。

1.4 蛋白质分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmli[8]方法进行。

1.5 Western blotting 分析

按本实验室常规方法进行。

1.6 外源基因的表达

重组表达质粒转化大肠杆菌 AR68，接种单个菌落于 2LB/AP 培养液，32 ℃培养过夜，取过夜菌按 20%接种量接种于新鲜 2LB/AP 培养液，32 ℃培养 2～3 h，再在 42 ℃继续培养 1、2、3、4、5 h，进行温敏诱导表达，取样测 OD_{600} 值，离心收集菌体，按每 0.1 OD 菌加 10 μl 水及等体积的 SDS-PAGE 上样缓冲液(2 倍母液)悬浮菌体，煮沸 5 min，取 20 μl 进行 SDS-PAGE 电泳分析，鉴定有无表达。

1.7 表达产物溶解性分析

收集表达菌，按每 0.1 OD 菌加 5 μl 缓冲液 A(20 mmol/L Tris·HCl pH 7.8，2 mmol/L EDTA，1 mmol/L PMSF)悬浮细菌，超声波破菌，15 000 r/min，4℃，离心 15 min，严格分离上清和沉淀，上清中加入等体积的 SDS－PAGE 上样缓冲液(2 倍母液)，沉淀悬浮在与上清等体积的水及 SDS-PAGE 上样缓冲液(2 倍母液)中，煮沸 5 min，分别取 20 μl 样品上样进行 SDS-PAGE 分析，确定表达产物的溶解性。

1.8 表达产物的纯化

收集 50 ml 表达菌，将其悬浮于 2 ml 缓冲液 A 中，超声破菌，用等体积的缓冲液 A 稀释，18 000 r/min (4℃)离心 20 min，保留上清。取约 150 μl Sepharose 4B-IgG 树脂，预先用缓冲液 A(buffer A)平衡，将破菌上清与树脂混旋(4 ℃)2 h，按生化所 220 组常规方法进行亲和层析，以 buffer A 代替 PBS，收集最后一步洗脱液，－80 ℃冻结，冷冻干燥，取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 抗体制备

取冷冻干燥样品 2 mg 溶解在 buffer A 中，进行 SDS-PAGE 电泳，挖胶取表达产物条带，置－80 ℃ 30 min，低温下磨碎，用 buffer A(不含 PMSF)悬浮，与等体积的佛氏完全佐剂乳化。按常规方法免疫新西兰大耳兔，初次免疫后 1、2 个月各加强免疫 1 次。

1.10 抗体特异性分析

取全菌蛋白电泳样品，用 SDS-PAGE 上样缓冲液稀释 20 倍，取 20 μl 样品进行 SDS-PAGE，用制备的抗体按常规方法进行 Western blotting 分析。

2 结果

2.1 表达质粒的构建

表达质粒 pBLPAV7 和 pBLPAV8 是在 PL Promoter 控制下的系列高效融合表达载体，表达产物 N-端融合 Protein A BC domain，便于用 IgG 固相柱亲和纯化。为了校正阅读框架，先用 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ从包含全长 ACAT cDNA 的质粒中切出表达 ACAT 第二跨膜及 C 端 cDNA 的片段(266 bp)，补平后与经 *Sma*I 酶切的表达载体 pBLPAV8 连接，筛选获得重组质粒 pBLPAV8-ACATC；再用 *EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ从 pBLPAV8-ACAT C 切出约 266 bp 的 DNA 片段，与用 *EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ酶切的表达载体 pBLPAV7 连接，获得 ACAT C 融合表达质粒 pBLPAV7-ACAT C。构建流程见图 1。

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

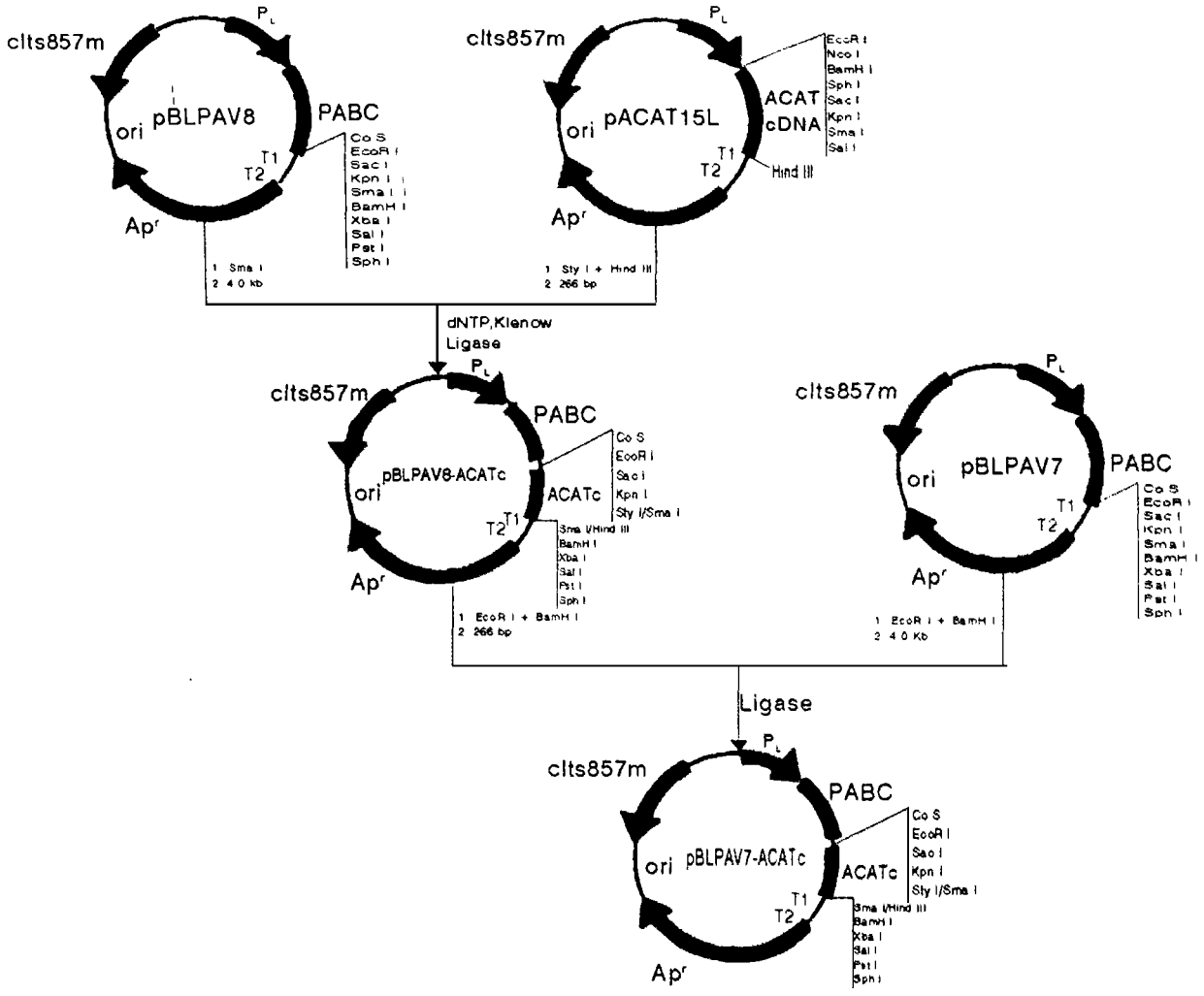


图 1　ACATc 表达质粒的构建

Fig 1　Construction of expression plasmid pBLPAV7-ACATc

2.2　融合 ProteinA BC domain 的 ACAT C 端片段在 *E.coli* AR68 中的表达

将构建的表达质粒转化到不同的表达菌中,进行表达研究,仅观察到 pBLPAV7-ACAT C 表达质粒转化在 AR68 菌株中有相应的表达条带,分子量约 27× 10^3u(与理论推算值相符)。从诱导时间看, 42℃ 诱导 1 h 就能观察到表达条带,且表达量最高,表达量约占全菌蛋白的 1%(20 mg/L)。其后表达量减少见图 2。

2.3　表达产物的可溶性分析及其纯化

可溶性分析表明,表达产物约 20%为可溶性蛋白。根据表达产物 N 端融合有 ProteinA BC domain 的特点,用 Sepharose 4B-IgG 亲和层析纯化表达产物。表达产物极不稳定,纯化的样品中有明显的降解条带。按常规的方法纯化,几乎得不到表达产物,纯化样品主要为降解产物(结果未列出)。为了抑制表达产物的降解,诱导表达结束后,立即在菌液中加入蛋白酶抑制剂 PMSF,终浓度为 2 mmol/L,并置冰浴 30 min。在其后的操作过程中,以缓冲溶液 A 代替 PBS 缓冲溶液。这样,表达产物降解的现象被明显抑制。经亲和层析,可得到纯度达 50%的表达产物见图 3。

2.4　ACATc 抗体的制备及特异性分析

通过 SDS-PAGE 纯化得到表达产物 PABC-ACATc,免疫大白兔,制备获得阳性抗血清,抗体稀释滴定为 1:2 650。利用该抗血清,经 Westem blotting 方法检测全菌蛋白样品,发现仅温敏诱导的、表达 ACATc 的细菌中存在相应的表达产物条带及其降解产物条带,且 42℃ 诱导 1 h 表达量最高,其后表达量减少,见图 4。这些结果与全菌蛋白的 SDS-PAGE 结果相一致。说明所获得的抗血清有很强的专一性。用该抗血清检测 ACAT 在哺乳细胞分布的结果将另文报道。

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

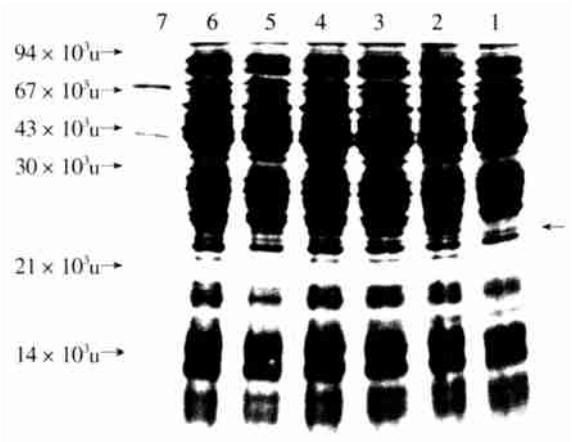


图 2 ACATc 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis of the expression products from AR68 harboring the plasmid pBLPAV7-ACATc

Lane 1: Total bacterial proteins from cells incubated at 32℃;

Lane 2~6: Total bacterial proteins from cells incubated at 42℃ for 1, 2, 3, 4, 5 hours;

Lane 7: Protein molecular weight marker

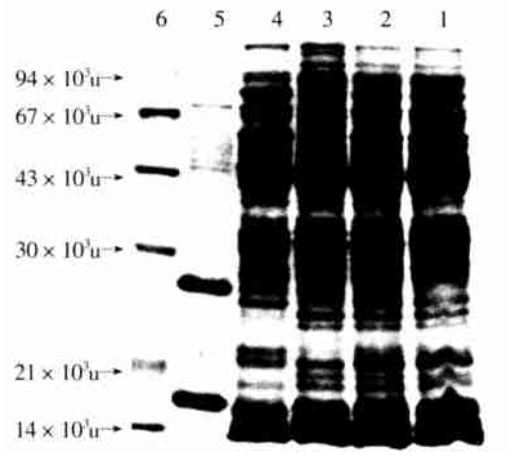


图 3 ACATc 表达产物经 Sepharose 4B-IgG 亲合层析后纯化样品的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of the expression products purified by Affinity Chromatography with Sepharose 4B-IgG column

Lane 1: Total bacterial proteins from cells incubated at 32℃;

Lane 2: Total bacterial proteins from cells incubated at 42℃;

Lane 3: Pellet of expressed bacteria;

Lane 4: Supernatant of expressed bacteria;

Lane 5: Purified protein;

Lane 6: Protein molecular weight marker

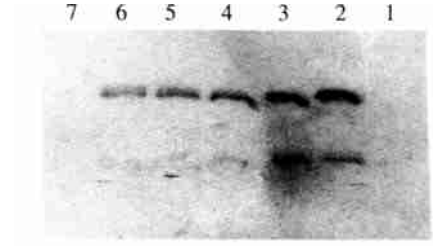


图 4 Western blotting 分析

Fig 4 Western blotting of expression products from AR68 harboring the plasmid pBLPAV7-ACATc

Notes as in Fig 1

3 讨论

ACAT cDNA 编码 550 氨基酸残基，其中 60%以上为疏水氨基酸，疏水性极强，表达产物不易形成正确的折叠，极易被水解。我们在表达完整 ACAT 分子未得结果的情况下，将 ACAT C 端包含第二个跨膜区的 ACAT C 端片段与亲水性较强的 ProteinA BC domain 进行融合表达，目的是增强表达产物的稳定性，提高表达量。结果在蛋白酶缺陷的 AR68 菌株中获得成功表达了 PABC-ACATc。从诱导时间看，温敏诱导 1 h 就能观察到表达条带，且表达量最高，表达量约占全菌蛋白的 1%，其后表达量减少。从 Western blotting 结果分析，温敏诱导后，在表达菌中表达产物的表达与降解并存。通常情况下，诱导表达后 3~5 h 表达量最高。而表达产物 PABC-ACATc 温敏诱导 1 h，表达量最高。这可能是因为温敏诱导后，随着时间的延长，细菌中受 HSP 调节的蛋白酶被诱导，表达产物 PABC-ACATc 不稳定，易受蛋白酶攻击，被降解。因此，随着时间的延长，表达产物的量逐渐减少。曾试图用蛋白酶抑制剂抑制表达过程中的降解，但加入蛋白酶抑制剂后表达亦被抑制（结果未列出）。根据表达产物 N 端融合有 ProteinA BC domain 的特点，用 Sepharose 4B-IgG 亲和层析纯化表达产物[9]。按常规的方法纯化，几乎得不到表达产物，纯化样品主要为降解产物(结果未列出)。经过一系列纯化条件的摸索后，在纯化过程中加入高浓度广谱的蛋白酶抑制剂 PMSF、EDTA 可有效防止表达产物的降解，纯化获得表达产物 PABC-ACATc，并制备了相应的抗体。这些工作为进一步重组表达完整的 ACAT 蛋白分子积累了经验，为进一步在蛋白水平研究 ACAT 的表达调控、结构与功能的关系以及寻找 ACAT 的同工酶或类似物打下基础。

参考文献

[1] Chang T Y, Chang Catherine C Y, Cheng D. Acyl-coenzyme A:

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

Cholesterol acyltransferase[J]. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 613—625.

[2] Vardiella L, Michael S B, Goslden M. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis[J]. Annu Rev Biochem, 1983, 52: 223—245.

[3] Doolittle G M, Chang T Y. Solubilization, partial purification and reconstitution in phosphatidylcoline-cholesterol liposomes of acyl-coA: chrosterol acyltransferase[J]. Biochmistry, 1982, 21(1): 674—681.

[4] Chang Catherine C Y, Chen J, Chnag T Y. Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster overy cells[J]. J Biol Chem, 1993, 268(28): 20 747—20 755.

[5] Chang Catherine C Y, Chen J, Thomas M. Regulation and immunolocalization of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies[J]. J Biol Chem, 1995, 270(1): 1—7.

[6] Meiner V L, Cases S, Myers H M, *et al*. Disruption of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase gene in mouse[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(23): 14 041—14 046.

[7] Sambrook J, Fritsch E F, Mariatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 58—249.

[8] Leammli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature (London), 1970, 227(2): 680—686.

[9] 李伯良, 杨新颖, 江智红, 等. 易于基因产物加工和快速纯化的融合表达载体[J]. 生物工程学报, 1994, 10(1): 206—208.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)02-0105-01

巨大后颅底沟通性脑膜瘤切除术的护理

Nursing after excision of giant meningeoma in posterior cranial fossa

张 燕, 杜淑兰, 罗晓娟, 李 青 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉-头颈外科, 重庆 400042)

我科与神经外科协作, 成功地切除了 1 例累及左颅底下区的咽旁隙、颞下窝、颅底区的颈静脉孔、颅底上区的左侧、桥小脑角斜坡和枕骨大孔缘的颅底沟通性巨大脑膜瘤术后病情危重、复杂, 曾出现多种致死性并发症, 经过 15 d 抢救, 62 d 精心治疗和护理, 患者顺利出院。现将护理工作总结如下。

1 病例简介

患者女, 23 岁, 因左耳鸣伴听力下降 5 年, 吞咽呛咳 1 年入院。起因不明, 渐进发展, 伴高调耳鸣和咽部不适, 无头痛、呕吐等颅脑症状。查体见 BP、P、R 正常, 伸舌偏左, 左咽反射减低, 鼻咽左侧壁向中线球形隆起, 同侧鼓膜内陷, 动度差。头颅 MRI 和 DSA 检查: 左咽旁隙肿块约 3 cm×4.5 cm×6 cm 大小, 颈动脉被包绕于肿块内, 左桥小脑角岩尖、斜坡区肿块 2.5 cm×3 cm×4 cm, 枕骨大孔缘有 0.5 cm×0.4 cm×0.3 cm 肿块, 并累及少许中颅底硬脑膜。初步诊断为巨大后颅底沟通性脑膜瘤。DSA 显示: 肿块血供不丰富, 左颈内动脉狭窄, 左颈外动脉明显外移, 左颈内静脉上颈段完全为肿瘤侵蚀闭塞。1996 年 12 月 4 日在插管全麻下采用颅内外联合径路手术: ①先行经颞下窝联合迷路后径路做咽旁隙、颈静脉孔区肿瘤切除术。术中见舌下神经、颈内静脉完全为肿瘤侵蚀成为一体。将其仔细分离保留, 其余侵蚀组织同肿瘤一块被完整切除。②继行后颅窝区脑膜瘤切除术。将内听道区、岩尖、斜坡及枕大孔区肿瘤逐一切除。最后在进行枕骨大孔区肿瘤切除中呼吸降至 7 次/min, 心率降至 54 次/min, 故仅做了部分切除。术毕予预防性气管切开。手术历时 17.5 h。术毕予监护, 4 h 后因颅内血肿呼吸停止, 经抢救复苏。术后第 6 天反复出现消化道大出血, 持续 5 d, 多次发生出血性休克, 经多科室抢救出血停止。62 d 痊愈出院。

2 护理

2.1 术前护理

2.1.1 术前准备 本例肿瘤侵犯颈部血管和神经多, 术中术后随时可发生生命危险。为防止意外, 除常规术前准备外, 每天进行压迫患侧颈总动脉训练 2 次, 5~30 min/次, 共 15 d。以防术中结扎颈内动脉, 造成脑组织急性缺血。

2.1.2 心理护理 此手术历时时间长, 手术创面大, 涉及的区域重要结构多, 术后反应重。病人及家属心理负担重, 除做好病人心理护理外, 同时做好家属工作。让家属参加术前讨论, 了解有关治疗护理概况, 积极配合治疗和护理。

2.2 术后观察和护理

2.2.1 全脑征的观察和护理 由于手术区涉及颅脑, 术后应严密观察和处理全脑征情况, 此病人术后 3 h 开始出现脉搏逐渐减慢 (2 h 内脉搏 120 次/min 降至 88 次/min), 血压逐渐升高 (2 h 内由 16/8 kPa 增至 20/12 kPa), 并伴有烦躁等症状。及时报告医生予 20%甘露醇 250 ml 静滴, 备好简易开颅包, 并持续

(下转 108 页)

作者简介: 张 燕 (1965. 1), 女, 四川省眉山市人, 主管护师, 发表论文 2 篇。电话: (023) 68757240

收稿日期: 1999-04-06; 修回日期: 1999-12-29

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