DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.002

人酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 N端片段在大肠杆菌中的表达

叶治家* 程天民 江智红** 李伯良* (第三军医大学预防医学系防原医学教研室,全军复合伤研究所)重庆,400038

提 要 目的:重组表达人 ACAT的 N端片段。方法:将编码 ACAT氨基末端包含第一个跨膜区(1~196 aa)的 cDNA片段克隆至不同的大肠杆菌表达载体中,构建了多种大肠杆菌表达质粒,再转化至大肠杆菌中进行表达研究。结果和结论:在详细摸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氨基末端包含第一个跨膜区的片段,表达量约 20 mg/L菌液。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:胆固醇乙酰基转移酶;氨基端片段;基因表达
中图法分类号 R345

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶(Acyl-coenzyme A: cholesterolacyltransferase, ACAT; EC2.3.1.26)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,动脉粥样硬化发生与体内 ACAT活性过高密切相关。ACAT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[2],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 Chang实验室利用 ACAT缺陷的 CHO突变细胞株 AC29克隆了人 ACAT的 cDNA[3],从而把 ACAT的研究带入分子水平。从 ACAT cDNA编码的氨基酸序列分析得知,人 ACAT含 550氨基酸残基,其中 60%以上为疏水氨基酸,包含两个跨膜区,疏水性极强,这类蛋白质极不稳定,重组表达也十分困难。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的 BC domain(Protein A BC, PABC)融合、包含第一跨膜区的 ACAT氨基端片段(PABC-ACATn)。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种

质粒 pACAT15L、pMFLV3、pBLPAV7、pBLSPV3;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、T4DNA连接酶购自 Biolabs,丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)为 Fluka产品,PMSF购自 Boehringer Mannhein,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

均按文献[4]进行。

1.4 蛋白质分析 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳

按 Laemmli[5]方法进行。

1.5 外源基因的表达

重组表达质粒转化大肠杆菌,随机接种 3个单克隆菌落于 LB/AP(AR68菌用 2 LB/AP)培养液,32℃培养过夜,取过夜菌按 2%(AR68菌按 20%)接种量接种于新鲜 LB/AP(AR68菌用 2 LB/AP)培养液,32℃培养 2~3 h,再在 42℃继续培养 32 h进行温敏诱导表达。

1.6 表达产物的鉴定分析

全菌蛋白样品的制备:取表达菌液测 D_{600}值,离心收集菌体,按每 0.1 D_{600}菌加 10 μl水及等体积的 2× Laemmli上样缓冲液悬浮菌体,煮沸 5 min,取 20 μl进行 SDS-PAGE电泳分析,鉴定有无表达。分泌至培养基中蛋白样品的制备:诱导后,将 1.2 ml表达菌液 7 500 r/min离心 10 min,上清中加入三氯醋酸至终浓度 10%,混匀,15 000 r/min离心 10 min,沉淀用 0.5 ml丙酮洗涤,15 000 r/min离心 10 min,去丙酮,加入适量的水和等体积的 2× Laemmli上样缓冲液,煮沸 5 min,取 20 μl进行 SDS-PAGE电泳分析,鉴定有无表达。

1.7 表达时相分析

接种转化有表达质粒 pBLPAV7-ACATn的 AR68单克隆

* 叶治家,男,34岁,讲师,博士
** 中国科学院生物化学研究所,上海,200031

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

菌落于 2 LB/AP培养液, 32℃培养过夜,取过夜菌按 20% 接种量接种于新鲜 2 LB/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 D_{600}值,离心收集菌体,按每 0.1 D_{λ} 菌加 10μl水及等体积的 2X Laemmli上样缓冲液悬浮菌体,煮沸 5 min,取 20μl进行 SDS-PAGE电泳分析,鉴定有无表达.

2 结果

2.1 表达质粒的构建

pBLPAV系列(包括分泌、非分泌)表达质粒是在 P_L Promoter控制下的高效表达载体,表达产物 N-端融合 protein A BC domain,便于用 IgG固相柱亲和纯化. 根据 ACAT cDNA K1序列的酶切图谱,将其编码 ACATn的 ACAT cDNA片段克隆至该系列载体这中,经过一系列的酶切、补平、连接等重组操作,分别获得了其 N端融合有 PABC的 ACATn包括非分泌、分泌表达质粒 pBLPAV7-ACATn,见图 1 pLSPA12-ACATn(未显示).

2.2 表达质粒 pBLPAV7-ACATn的酶切鉴定

重组质粒 pBLPAV7-ACATn经合适限制性内切酶(NcoI和 XbaI)切,未切出相应的 DNA片段,表明 pBLPAV7-ACATn1中 NcoI切点经酶切、补平、连接等操作被消除,未消除 NcoI切点的质粒切出大小约 700 bp片段,与理论值相符,见图 2

2.3 融合 proteinA BC domain的 ACAT N端片段在 *E.coli* AR68中的表达

将构建的非分泌表达质粒转化到不同的表达菌(包括 AR68、RR1、MC1061、BL21)中,分泌表达质粒转化至 BL21(DE3)中,进行表达研究,仅观察到 $pBLPAV_7$-ACATn表达质粒转在 AR68菌株中有相应的表达条带,分子量分别约 41×10^3u(与理论推算值相符),表达量约占全菌蛋白的 2%,3个克隆菌表达量没有明显差别,见图 3 其余表达菌中均未观察到相应的表达条带.

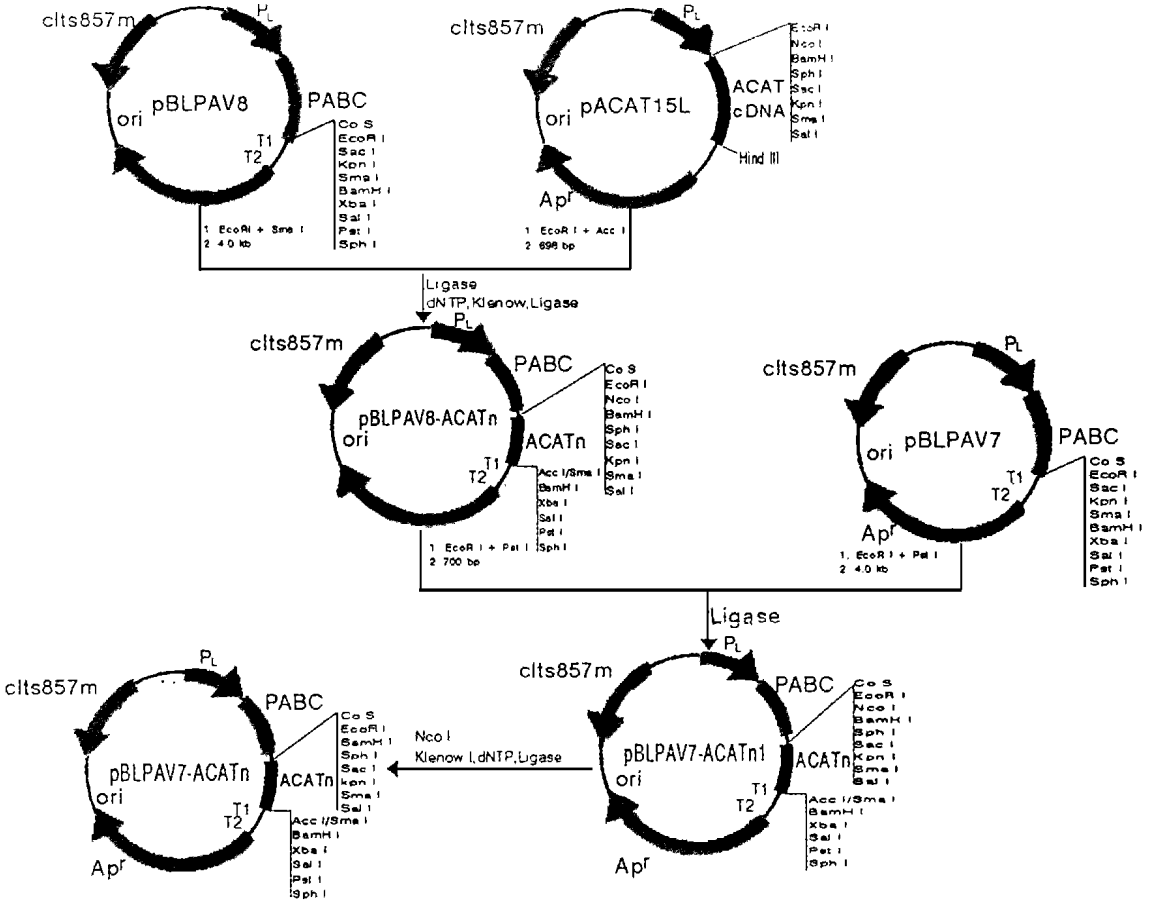


图 1 表达质粒的构建流程

Fig 1 Construction of expression plasmid pBLPAV7-ACATn

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

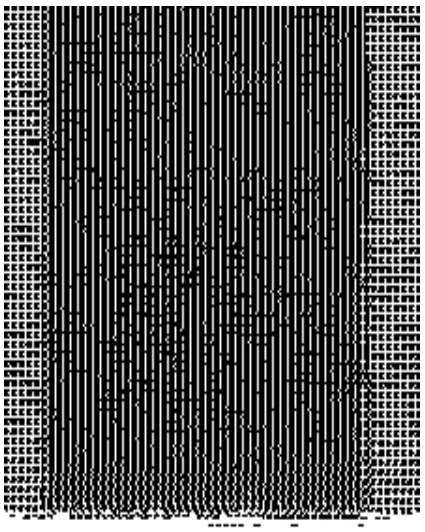


图 2 表达质粒的酶切鉴定

Fig 2 Identification of the expression plasmids

pBLPAV7-ACATn(NcoⅠ+ XbaⅠ); Lane 1, 2, 4, 6 positive clones; M: marker(λ DNA/HindⅢ and φX174/HaeⅢ)

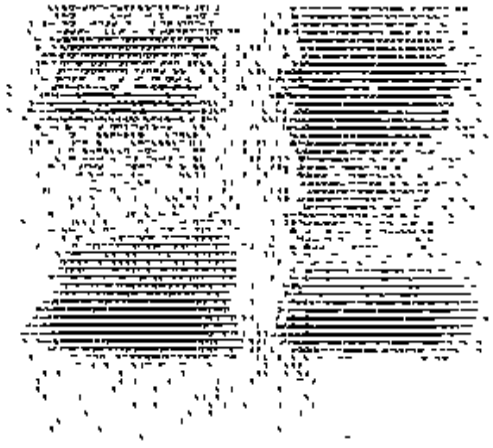


图 3 表达产物的 SDS-PAGE电泳分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of the expression products from AR68 harboring the plasmid pBLPAV7-A-CATn

Lane 1: total bacterial proteins from cells incubated at 32℃; Lane 2-4: total bacterial proteins from cells incubated at 42℃; Lane 5: protein molecular weight marker.

2.4 表达时相分析

在观察到有表达后,再分析不同的诱导时间对表达量的影响,结果表明 42℃诱导 1 h就能观察到表达条带,且表达量最高,其后表达量减少,见图 4

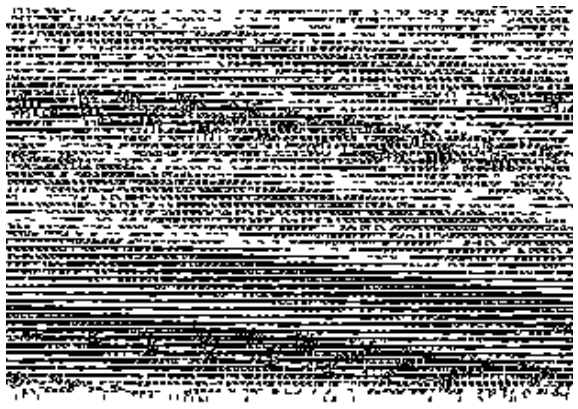


图 4 不同时相表达产物的 SDS-PAGE电泳分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the expression products from AR68 harboring the plasmid pBLPAV7-A-CATn induced different time

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 h; Lane 7: protein molecular weight marker.

3 讨论

胆固醇在生物体内起着重要的作用,是哺乳动物细胞维持生命过程所必需的。正常动物体内胆固醇代谢保持动态平衡,体内胆固醇的含量过高或过低都会引起病变。ACAT的主要生理功能是将体内多余的胆固醇转化成胆固醇酯,在调节胆固醇代谢平衡过程中起重要作用。实验证据表明,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[6]。ACAT的纯化极其困难,至今这一问题还未得到解决[1]。重组表达是纯化 ACAT的最有效的手段,但由于 ACAT分子疏水极强,表达产物不易形成正确的折叠,极易被水解,因此,ACAT的重组表达也很困难,亦未见有成功的报道。

根据 ACAT cDNA的酶切图谱,我们将编码包含第一个跨膜区的 ACAT氨基端(ACATn)的 ACAT cDNA片段克隆至不同的高效表达载体中进行表达研究,以期表达纯化得到相应的表达产物,进一步进行活性分析并制备相应的抗体。在进行大量表达条件摸索的基础上,在大肠杆菌中成功表达了与 PABC融合包含第一个跨膜区的 ACAT氨基片段(PABC-ACATn),表达量分别占全菌蛋白的 2%。ACATn与亲水性较强的 proteinA BC domain融合,既增强表达

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

产物的稳定性,提高表达量,又便于利用亲和层析纯化表达产物[7]。即使这样,表达产物 PABC-ACATn还不稳定,仅在蛋白酶较缺乏的 AR68菌株中获得表达。从诱导时间分析,温敏诱导 1 h后,就能观察到表达条带,但随着时间的延长,表达产物的量逐渐减少,表明表达产物不稳定,易降解。

ACATn的成功表达为进一步纯化 ACATn及重组表达完整的 ACAT蛋白分子积累了条件和经验,为进一步在蛋白水平研究 ACAT结构与功能的关系以及筛选 ACAT有效的抑制剂打下基础。

参考文献

1 Chang C Y, Catherine C Y C, Dong C. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. Anna Rev Biochem, 1997, 66(6): 613

2 Doolittle G M, Chang T Y. Solubilization, partial purification and reconstitution in phosphatidylcoline-cholesterol liposomes of acyl-coA: chrosterol acyltransferase. Biochemistry, 1982, 21(2): 674

3 Catherine C Y C, Cheng J, Chang T Y. Molecular cloning and functional expresion of human acyl-coenzyme A: chrosterol acyltransferaseacyl cDNA in mutant Chinese hamster overy cells. J Biol Chem, 1993, 2688(11): 20747

4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989. 59~73

5 Laemmli U K. Cleavege of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 1970, 227(2): 680

6 Brown M S, Goldstein J L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Ann Review Biochem, 1983, 52(5): 223

7 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.生物工程学报, 1994, 10(2): 206

(收稿: 1998-07-30;修回: 1999-01-26)

(编辑 仇玉福)

Expression of human ACAT N-terminal fragment in *E. coli*

Ye Zhijia, Cheng Tianmin, Jiang Zhihong, Li Boliang (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To express acyl-coenzyme A: cholesterolacyl-transferase (ACAT) N-terminal containing the membrane anchoring region 1 (ACATn). Methods: The gene encoding the ACATn was cloned into the expression vector and transferred into *E. coli*. Results and Conclusion: The expressed product of ACATn fused with protein ABC domain and was detected in *E. coli* AR68.

Key words acyl-coA; cholesterolacyltransferase; N-terminal fragment; gene expression

纤维支气管镜检查对肺霉菌病 8例的诊断

个案与短篇

Examination of 8 case pneumonomycosis by fiberoptic bronchoscopy

沈渝菊* 张蔚东 沈寒放 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科) 重庆, 400038

许多肺霉菌病无典型特征,常易误诊。我院近 10年经纤维支气管镜(简称纤支镜)活检确诊的肺曲霉菌、肺毛霉菌病共 8例。

1 一般资料

8例患者均为男性,4例门诊病人,4例住院病人;年龄 29~69岁,平均年龄 44.3岁。5例患者在纤支镜检查前疑为肺癌,2例诊断为肺结核,1例诊断为肺炎。

临床表现及既往病史:主要表现为痰中带血(6例),咳嗽咯痰(5例),胸痛(3例),气促乏力(2例),发热 1例。病程最短 3月,最长 6年。8例中 6例有吸烟史,2例有粉尘接触史,1例放射线接触史;3例有肺结核病史,1例有糖尿病史,1例有白血病。

胸部 X线及 CT:5例 X线胸片诊断为肺癌,其中 2例伴有阻塞性肺不张;2例诊断为肺结核;1例诊断为肺炎。3例行胸部 CT检查诊断为肺癌 1例,炎性病变 1例,肺结核 1例。

病变部位及纤支镜下观察:右上叶前段、左下叶背段各 2例,左上叶、左舌叶、隆突及左主支气管开口处各 1例。纤支镜下观察:病变区域都有不同程度的粘膜充血、肿胀、糜烂;6例见有白色坏死物将开口阻塞,其中 2例白色坏死物可随呼吸稍移

(下转 163页)

* 沈渝菊,女,34岁,主管技师。

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