

• 基础研究 •

GST/AEP 融合蛋白原核表达载体的构建、表达及鉴定^{*}

高碧峰 王宗仁 张德安

(第四军医大学西京医院中医科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:为进一步研究抗癫痫肽(Anti-epilepsy peptide, AEP)的抗痫机制及筛选其相关作用蛋白,进行 GST/AEP 融合蛋白原核表达载体的构建及融合蛋白的表达。方法:通过 PCR 基因扩增对 AEP 基因进行扩增,并将其克隆于谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白表达质粒 pGEX-4T-1 中,经酶切、序列鉴定分析后,用该重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导获得表达,并采用 Western Blot 进行检测。结果:成功构建了 AEP 原核表达载体,并在大肠杆菌 BL21 中获得表达。结论:成功构建了 GST/AEP 原核表达载体,并表达了 GST/AEP 融合蛋白。

关键词: 抗癫痫肽; GST-融合蛋白; 原核表达; 基因扩增

中图分类号: R742.1 文献标识码: A

Construction and expression of prokaryotic expression vector of GST/AEP fusion protein and identification

GAO Bi-feng, WANG Zong-ren, ZHANG De-an

(Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital,

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

ABSTRACT Objective: To express fusion protein of GST and Anti-epilepsy peptide (AEP) in E. coli. **Methods:** The core fragment of AEP was cloned into pGEX-4T-1 containing glutathione s-transferase (GST) fusion protein gene. Following the restriction enzyme digestion analysis and sequencing, pGEX-4T-1/AEP was transformed into E. coli BL21(DE3). GST/AEP fusion protein was expressed under IPTG induction and the AEP protein was identified by the Western blot. **Results:** The restriction endonuclease digestion analysis of recombinant plasmid demonstrated that the AEP gene had been exactly inserted in pGEX-4T-1, SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular mass of the fusion protein was about 34KD. The GST/AEP fusion protein was expressed in E. coli BL21(DE3) and identified by the Western blot. **Conclusion:** pGEX-4T-1/AEP vector was successfully constructed, and the GST/AEP fusion protein in E. coli BL21(DE3) was expressed.

Key Words: Anti-epilepsy peptide (AEP); GST/AEP fusion protein; Prokaryotic expression; Gene amplification

0 引言

全蝎是祖国医学用来治疗癫痫等神经系统疾病的良药。抗癫痫肽(anti-epilepsy peptide, AEP)是从东亚钳蝎蝎毒中分离出的一种具有生物活性的多肽。已证实 AEP 具有明确的抗癫痫及抗癫痫反复发作作用,而且不易产生依赖性,是一种理想的抗癫痫药物^[1-4]。周新华等测定并报告了 AEP 的氨基酸序列,指出 AEP 前体是由 85 个氨基酸残基组成的多肽,其中包括含 21 个氨基酸残基的信号肽和含 61 个氨基酸残基组成的成熟肽及位于 C-末端(羧基端)的甘氨酸-赖氨酸-赖氨酸 3 个氨基酸残基^[5]。为进一步探讨 AEP 的抗痫作用机制及筛选其相关作用蛋白,而构建 GST/AEP 融合蛋白原核表达载体。并通过 IPTG 诱导在大肠杆菌 BL21 中获得高效表达,经 Western Blot 检测证实成功表达了融合蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 E. coli DH-5 α 及 BL21(DE3)、质粒载体 pGEX-4T-1 及 PUC18-T 由第四军医大学基础部生物化学教研室提供。AEP cDNA 文库的构建由西安华广生物技术有限公司协助完成。TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 EcoRI、BamHI 及低分子量 DNAMarker 购自大连宝生物公司。低分子量蛋白 Marker、IPTG 和 HRP 标记的羊抗兔二抗、NBT/BCIP 显色试剂盒购自华美生物工程公司。质粒提取试剂盒及 DNA 电泳凝胶回收试剂盒购自安徽优晶生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 AEP 的 PCR 扩增: 采用逆转录 PCR 法从东亚钳蝎蝎腺

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671764)

作者简介: 高碧峰(1977-),女,硕士生。

Tel. (029) 84775351 Email. yyfish@fmmu.edu.cn

通讯作者: 王宗仁,教授,博士生导师 Tel. (029) 84775347 Email. zongren@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2006-04-13 接受日期: 2006-05-10)

组织中扩增 AEPcDNA 编码区(由西安华广生物技术有限公司完成并测序验证),根据 Genbank 中提供的基因序列(序列号: AF160868),与其进行同源性比较,并设计如下引物,以去除信号肽序列。PCR 扩增的上游引物为: 5' - GCGGATCCATG-GATGGATATATAAGAGGAAGTAA - 3' (含 BamH I 酶切位点及起始密码子 ATG),下游引物为: 5' - GCGAATTCT-TACTTTTTTCCACCGCATGT - 3' (含 EcoR I 酶切位点及终止密码子 TAA,引物由北京三博远志生物技术有限公司合成),PCR 反应体积为 50 μ l,引物终浓度为 10pmol/ μ l,扩增参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 60s,50 $^{\circ}$ C 退火 60s,72 $^{\circ}$ C 复性 60s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。然后用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收并纯化。1.2.2 pGEX- 4T- 1/AEP 重组表达质粒的构建:回收并纯化 PCR 产物后,用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,表达载体 pGEX- 4T- 1 及测序载体 PUC18- T 也用同样的酶进行双酶切,37 $^{\circ}$ C 酶切过夜后,1.2% 琼脂糖凝胶电泳对酶切结果进行鉴定,并再次对载体片段及 AEP 片段进行回收、纯化;分别取回收后的 AEP 片段及载体片段,适当比例混合,在 T4DNA 连接酶的作用下于 16 $^{\circ}$ C 保温壶中连接过夜,构建重组表达载体。将 2 组连接产物同时转化 E. coli DH- 5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜后,分别挑取单克隆 5 个,接种于含 Amp 的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

1.2.3 阳性重组克隆的筛选:分别取过夜菌 1ml,重新小剂量制备质粒,并用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,37 $^{\circ}$ C 消化 5 小时后,进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,获得大约 200bp 的基因片段和 2900、4900bp 的载体片段。挑取阳性克隆保留菌种,将 PUC18- T/AEP 重组载体送测序。DNA 序列测定由北京三博远志生物有限公司完成。

1.2.4 GST/AEP 融合蛋白的诱导表达及可溶性分析:挑选正确的阳性克隆后,重新转化 BL21(DE3) 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 培养过夜后,挑取 1 个单克隆菌落接种于 3ml 含 Amp 的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜;取上述过夜菌 50 μ l 转接入 5ml 含 Amp 的 LB 中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.3mmol/L,30 $^{\circ}$ C 诱导表达 4h,收取诱导表达后的菌液 4ml,4 $^{\circ}$ C 高速离心 15min,沉淀重悬于 5ml 1 $\times$ PBS 中,并加入 0.1mol/

LPMSF10 μ l,充分混匀后,进行超声裂解(输出频率为 60Hz,冰浴中,每次 15s,共 8 次);再次离心(4 $^{\circ}$ C,12000rpm,10min),分别取适量上清和沉淀及未裂解的总蛋白进行 12% SDS- PAGE 电泳,分析目的蛋白的表达及分布情况。同时对含 GST 蛋白的 pGEX- 4T- 1 空载体进行诱导表达(IPTG 终浓度 0.1mmol/L),设为对照。

1.2.5 融合蛋白的检测:将融合蛋白 GST/AEP 样品经 SDS- PAGE 分离后再电转移至硝酸纤维素膜上,以 5g/L 脱脂奶粉封闭 1h,然后加已制备的兔抗 GST/AEP 多克隆抗体血清(效价 1:2000),封膜,室温下缓摇 1h 后,TBS+T 洗膜,10min 3 次,最后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(效价 1:2000),室温下缓摇 30 分钟,TBS+T 洗膜,5min 3 次,最后加底物 NBT/BCI 显色,并拍照。

2 结果

2.1 AEP 基因的扩增

以 pGEM- T(easy)/AEP(由西安华广生物技术有限公司构建,并测序验证)为模板,用设计好的引物进行 PCR 反应,得到 200bp 左右的片段,与预期的结果相符。如图 1 所示。

2.2 重组质粒 pGEX- 4T- 1/AEP 及 PUC18- T/AEP 的酶切鉴定

挑取转化连接产物的阳性大肠杆菌菌落,提取质粒,用 BamH I 和 EcoR I 双酶切进行鉴定,得到如图 2 所示结果,两条 DNA 片段,一条为载体片段,另一条约 200bp 左右的片段为目的基因片段。重组质粒经测序分析证实为 PUC18- T/AEP。

2.3 GST 及 GST/AEP 融合蛋白的表达、鉴定及可溶性分析

分别用 IPTG 对 pGEX- 4T- 1/AEP 重组载体及含有 GST 蛋白的 pGEX- 4T- 1 空载体进行诱导表达,对收集的细胞行超声裂解,并行 12% SDS- PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色 4h 后脱色,发现分别在 34KD 和 26KD 处得到与 GST/AEP 融合蛋白和 GST 蛋白的分子量相符的蛋白条带;同时在经超声裂解后的沉淀中也发现上述条带,而上清中未发现上述条带,表明该融合蛋白主要以包涵体形式存在(结果如图 3 示)。以兔抗 GST/AEP 多克隆抗体血清(实验中制备)进行 Western blot 鉴定证明其为融合蛋白(图 4)。

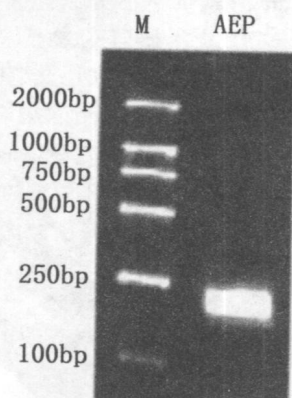


图1 AEP PCR 扩增产物鉴定

Fig 1 PCR amplification of AEP gene

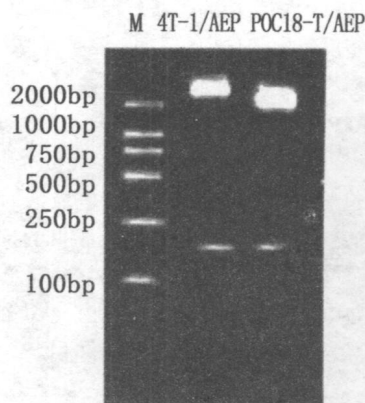


图2 重组载体的构建和鉴定

Fig 2 Construction and identification of pGEX- 4T- 1/AEP and PUC18- T/AEP recombinant vector

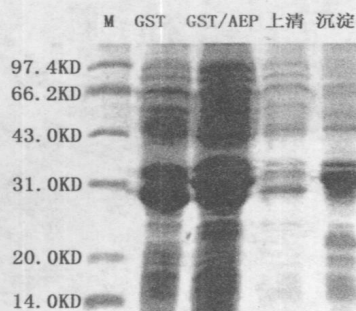


图3 融合蛋白的表达鉴定及分面情况

Fig 3 GST/AEP fusion protein expression and identification

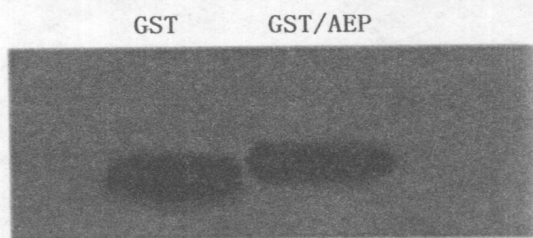


图4 融合蛋白的检测

Fig 4 GST/AEP fusion protein identification by Western-blot

3 讨论

AEP是从东亚钳蝎中分离出来的,由61个氨基酸残基组成,含4对二硫键,分子量为8.3KD的一种多肽,属于抑制性长链神经毒素^[6,7]。已有的试验研究证实,AEP发挥抗癫痫作用可能与直接作用于兴奋性钠离子通道、增加中枢神经儿茶酚胺及单胺类神经抑制的释放等有关^[8,9]。但对其是在体内与何种分子结合,受体与配体结合产生的信号是通过何种通路引发各种分子的表达异常等并未阐明。对于这些问题的解决必须通过对AEP的功能研究,才能进一步阐明其抗病作用机制。目前抗癫痫肽的获取主要依靠色谱分离技术^[10],其代价较高,不适于研究应用,通过构建AEP原核表达载体而获得相应蛋白,是一种比较经济可行的方法。

pGEX系列载体是广泛用于融合蛋白构建和表达的载体,pGEX-4T-1是表达GST融合蛋白的原核高效表达载体,带有IPTG诱导启动子,其所表达的蛋白产物在N端带有GST序列,融合蛋白产物可通过GST层析柱快速、简便的纯化,而且在运载序列后含有蛋白酶切割位点,其表达的融合蛋白可以通过凝血酶、X因子等切割后快速释放^[11]。BL21(DE3)为其表达的常用宿主菌。在构建的原核表达质粒中,pGEX-4T-1的多克隆酶切位点位于GST基因之后;目的基因采用PCR法去处信号肽序列后插入,使其表达更接近于天然蛋白,为进一步研究AEP的功能奠定了基础;同时将目的基因克隆于常用的测序基因PUC18-T中,通过相应的重组质粒DNA序列测定结果证实含有目的基因;当基因进行表达时,表达产物为GST和目的基因表达蛋白的融合体,目的基因预期表达蛋白相对分子质量为8.3KD,GST相对分子质量为26KD,融合蛋白相对分子质量为34.3KD(26 000+ 83 00),蛋白表达结果表明,与我们预期的结果和文献报道的相对分子质量相符。

致谢:本实验在进行中得到我校生化教研室全体师生的热情帮助,特别感谢刘新平教授、张健博士及马小燕技师等的精心指导和无私帮助。在此给予特别感谢。

参考文献

- [1] 于家琨,张景海,王起振,等.东亚钳蝎抗癫痫肽作用机制研究[J].沈阳药学院学报,1993,10(1):55-59
- [2] 周华,柴慧霞,谢扬高,等.蝎毒对马桑内酯所致癫痫大鼠的作用[J].临床神经电生理学杂志,2002,11(1):31-32,40
- [3] 马飞煜,王淑英,高德红.蝎毒抗海人酸诱导大鼠癫痫的作用[J].黑龙江医药科学,2002,25(6):17-18
- [4] 姜春玲,张万琴.蝎毒抗癫痫反复发作的GFAP基因调控机制[J].中国应用生理学杂志,2002,18(4):406-407
- [5] Xin-Hua Zhou, Duan Yang, Jing-Hai Zhang, et al. Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. Biochem, 1989, 257: 509-517
- [6] Chun-Guang Wang, Xiao-Lin He, Feng Shao, et al. Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. Biochem, 2001, 268: 2480-2485
- [7] Ji-Qun Sheng, Zhi-Jian Cao, Wan-Hong Liu, et al. Molecular Cloning and Analysis of BmKBT Genomic Sequence from Scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 20(4): 491-496
- [8] H. Dieter Delmann, Jeanne-Andree Boudier, Francois Couraud, et al. Voltage-sensitive Na⁺ channels in the neurohypophysis of the rat as demonstrated by 125I-labeled scorpion toxin. Neuroscience Letters, 1983, 35(1): 71-77
- [9] 刘崇铭,高殿振,于佩玉,等.东亚钳蝎毒及其成分抗癫痫肽的抗癫痫作用[J].沈阳药学院学报,1989,6(2):95-97
- [10] 边六交,杨晓燕,王辉,等.德钳蝎毒中抗癫痫肽、镇痛肽和抗肿瘤肽的快速同时分离和鉴定[J].分析化学,2005,33(5):619-622
- [11] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔 著,黄培堂 等译,分子克隆试验指南[M].北京:科学出版社,2002:1217-1231