

平颏海蛇 PLA₂ 在大肠杆菌中的融合表达^{*}

杨文利¹ 叶兰汀¹ 邹 兰¹ 汪 枫² 徐安龙^{1**}

(¹ 中山大学生命科学学院生化系 海洋生物功能基因组开放实验室 广州 510275)

(² 中国科技大学生命科学院 合肥 230027)

摘 要 将编码平颏海蛇磷脂酶 A₂ 的基因(PLA₂-9)分别克隆于硫氧环蛋白基因融合表达载体 pThioHisC 和 pTRX 的 HP-trxA 和 trxA 基因的 3' 末端, 构建符合读码框的融合表达载体 pThioHisC-PLA₂ 和 pTRX-PLA₂。25℃ 下经 IPTG 诱导, PLA₂ 融合蛋白在两种原核系统中均能获得较高表达, 但 PLA₂ 在 pTRX 系统下的表达量和蛋白溶解性优于 pThioHisC 系统。将两种系统下的表达产物进行金属螯合亲和层析纯化, Trx-PLA₂ 融合蛋白的纯度可达 85% 以上, 而 HP-Trx-PLA₂ 不表现出对介质的亲和性, 难以得到纯化。由此, 将 pTRX-PLA₂ 载体系统确立为进一步大量表达和纯化的载体系统。

关键词 平颏海蛇磷脂酶 A₂, 融合表达, 亲和层析

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2002)04-0400-06

蛇毒磷脂酶 A₂(phospholipase A₂ EC3.1.1.4, PLA₂)广泛存在于各种蛇中, 属分泌型蛋白酶, 由一类结构相似、分子量在 14kD 左右的蛋白家族组成, 一般含有 6 至 7 对二硫键^[1]。与其它的 PLA₂ 相比, 蛇毒 PLA₂ 属较为特殊的一类, 即除了有催化功能外, 还显示出较为复杂的药理活性^[2,3]。蛇毒 PLA₂ 的结构多样性和功能复杂性使其在理论研究和药物开发两大领域均有极为广泛的应用^[4]。蛇毒 PLA₂ 的结构与功能关系研究更成为该领域的研究焦点。迄今, 已有 190 余种蛇毒 PLA₂ 及与其有同源关系的蛋白质或亚基的一级结构被测定, 并有多种陆地蛇 PLA₂ 的晶体结构和酶活性中心被解出和定位^[5,6]。20 世纪 90 年代, 蛇毒 PLA₂ 的研究逐步进入到基因水平, 人们希望借助重组 DNA 技术从分子水平来揭示 PLA₂ 功能多样性的原因和作用机理, 目前, 已有多种陆地蛇的 PLA₂ 基因被先后克隆或表达^[7-9]。相比之下, 海蛇 PLA₂ 基因的研究报道则较少。

平颏海蛇(*Lapemis hardwickii* Gray)是我国南海的特色物种之一, 有着较高的理论和应用研究价值, 在过去的研究中, 我们从平颏海蛇中分离到一组新的 PLA₂(-8, -9, -384)同功酶基因(GenBank 登录号分别为 AF144319, AF205378, AF144320), 它们均编码三种 I 类 PLA₂ 家族蛋白^[10]。为了进一步开展这组 PLA₂ 基因的功能研究, 我们以 PLA₂-9 为代表, 构建了 pThioHis-PLA₂ 和 pTRX-PLA₂ 两种原核表达载体, 并对其在大肠杆菌中的表达及表达产物的初步纯化进行了研究和比较。

^{*} 国家高新技术海洋 863 项目(2001AA626010) 国家自然科学基金重点项目(69935020)资助

^{**} 联系人, Tel 020-84113655 84113656 Fax 020-84038377 E-mail address jls36@zsu.edu.cn

作者简介 杨文利(1968 -) 女, 湖北武汉人, 博士, 讲师。参加工作还有姜孝玉。

收稿日期 2001-09-03, 修回日期 2001-11-05

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 :质粒 pThioHisC、pTRX 和宿主菌 *E. coli* DH5 α 、TOP10、BL21(DE3)由本室保存。

1.1.2 工具酶 :限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 DNA 连接酶为 NEB 公司产品。

1.1.3 层析柱和层析填料 :层析柱及 Chelating Sepharose Fast Flow[®]、Sephadex G-25 等填料购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.1.4 抗体及相关试剂 :兔抗天然江浙蝮蛇磷脂酶 A₂ 多克隆抗体由上海生物化学研究所周元聪教授惠赠 ;羊抗兔 IgG-HRP、DAB 显色试剂盒购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 pThioHisC-PLA₂ 和 pTRX-PLA₂ 表达载体的构建 :以含有 PLA₂ 基因的 pcDNA3 文库质粒 DNA 为模板 ,设计引物(其中上游引物 5'端引入 EK 识别位点)扩增 PLA₂-9 基因 ,分别克隆于 pThioHisC 和 pTRX 融合表达质粒中。PCR、酶切、回收、连接、转化、质粒的抽提和纯化、电泳均按文献 [11] 方法进行^[11] ,DNA 测序由大连宝生物工程有限公司完成。

1.2.2 PLA₂ 蛋白在两种原核系统中的表达 :将表达质粒 pThioHisC-PLA₂ 和 pTRX-PLA₂ 分别转化大肠杆菌 TOP10 和 BL21(DE3)。挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的 50mL LB 培养基中 ,37℃ 过夜培养。取过夜培养物按 1/50 的比例接种于 2L LB 丰富培养基中 ,37℃ 培养至 A₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.6 ,加入 IPTG 终浓度为 0.2mmol/L ,于 25℃ 诱导表达 10h。取 1mL 细菌培养物用于 SDS-PAGE 分析 ,将其余菌体离心沉淀 ,超声破碎后取上清液 ,纯化备用。

1.2.3 HP-TRX-PLA₂ 和 TRX-PLA₂ 融合蛋白的亲纯化 :将新装好的 Ni²⁺-Chelating Sepharose 亲和层析柱(2.6cm × 6cm)用双蒸水过柱清洗至无乙醇 ,用 2 倍柱床体积的 0.2 mol/L NiSO₄ 平衡 ,再用 10 倍体积的双蒸水清洗柱床以除去游离的 NiSO₄ ,然后用超声缓冲液 50mmol/L PB(pH7.8)、500mmol/L NaCl 平衡至流出液 pH 为 7.8。将超声后的离心上清液以 5mL/min 流速上柱 ,收集穿流峰 ,然后用 50mmol/L PB(pH6.0)、500mmol/L NaCl 洗脱 ,再用此溶液与 50mmol/L PB(pH6.0)、500mmol/L NaCl、500mmol/L 咪唑进行阶梯式梯度混合洗脱 ,设 HD-97-1 型紫外检测仪的灵敏度为 0.1 ,记录仪走纸速度为 2cm/min ,收集各洗脱峰 ,并取样进行 SDS-PAGE 分析 ,根据蛋白分子量大小判断 PLA₂ 融合蛋白所在部分。

1.2.4 PLA₂ 融合蛋白的鉴定 :采用 Western 印迹法进行^[11]。一抗为兔抗天然蛇毒磷脂酶 A₂ 多克隆抗体 ,二抗为羊抗兔 IgG-HRP。亲和层析纯化后的 PLA₂ 融合蛋白经 SDS-PAGE 后转到 NC 膜上 ,剪下 Mark 所在的泳道用丽春红染色 ,将剩余的膜用脱脂奶粉封闭后 ,结合一抗、二抗 ,最后用 DAB 显色系统显色。

2 结果

2.1 两种硫氧还蛋白 PLA₂ 融合表达载体的构建

为了提高的 PLA₂ 的表达量和蛋白的可溶性 ,我们采用融合表达系统进行载体构建 ,并在融合伴侣和目的蛋白之间引入肠激酶 (EK) 识别位点 (gat-gac-gat-gae-taa) ,以便对融合

蛋白进行专一切割。以 pcDNA3-*PLA₂* 质粒 DNA 为模板,用相应的引物扩增 *PLA₂* 基因(图略),分别克隆到 pThioHisC 和 pTRX 表达质粒上(图 1)。小量制备法提取质粒 DNA,酶切后可得到与 PCR 产物相同大小的片段,DNA 测序结果正确,说明两种 *PLA₂* 融合表达载体构建准确无误。

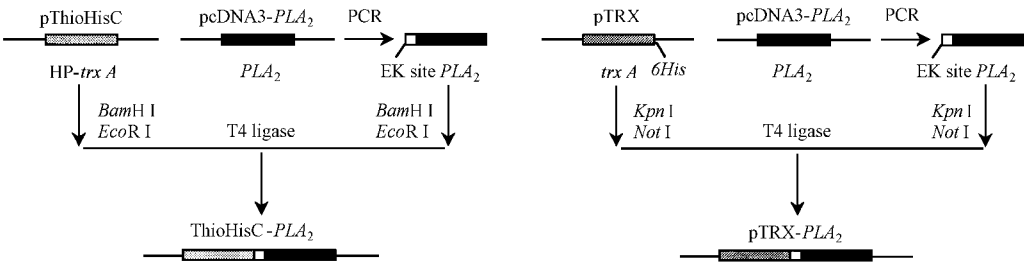


图 1 pThioHis C-*PLA₂* and pTRX-*PLA₂* 表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pThioHisC-*PLA₂* and pTRX-*PLA₂*

2.2 重组 *PLA₂* 蛋白在两种原核表达系统中的融合表达比较

SDS-PAGE 分析表明,经 IPTG 诱导,pThioHisC-*PLA₂* 和 pTRX-*PLA₂* 转化菌的总蛋白样品中都出现约 30kD 的特异蛋白带(图 2),与平颞海蛇 *PLA₂* 分子量(约 14kD)及 Trx(含 Ek 识别位点及 6His)分子量(约 15kD)总和相符,凝胶扫描显示,两种 *PLA₂* 融合蛋白的表达量分别为总菌体的 20%和 30%,说明 *PLA₂* 基因均能在 pThioHisC 和 pTRX 两种表达系统中得到成功表达。将表达后的细菌培养物进行超声破碎处理并对超声上清液进行 SDS-PAGE 分析,结果显示 *PLA₂* 融合蛋白在 pThioHisC 和 pTRX 两种系统中分别占菌体裂解物的 12%和 16%(图 3),说明 *PLA₂* 融合蛋白在 pTRX 系统中的可溶性较 pThioHisC 中更好。

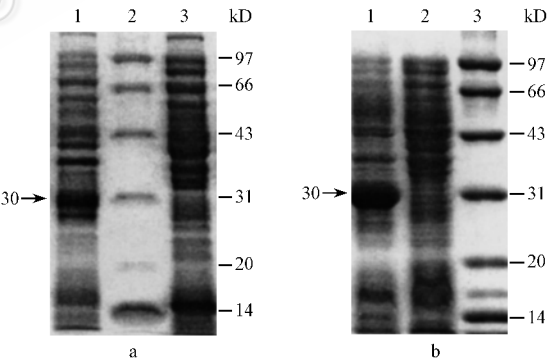


图 2 pThioHisC-*PLA₂* 和 pTRX-*PLA₂* 在大肠杆菌中的融合表达

Fig. 2 The fusion expression of pThioHisC-*PLA₂* and pTRX-*PLA₂* in *E. coli*

(a) SDS-PAGE of pThioHisC-*PLA₂* in strain TOP10 on 12% gel. 1. Total proteins of TOP10 with plasmid pThioHisC-*PLA₂* induced by IPTG. 2. Molecular weight standard. 3. Total proteins of TOP10 with plasmid pThioHisC induced by IPTG.
(b) SDS-PAGE of pTRX-*PLA₂* in strain BL21(DE3) on 12% gel. 1. Total proteins of BL21(DE3) with plasmid pTRX-*PLA₂* induced by IPTG. 2. Total proteins of BL21(DE3) with plasmid pTRX-*PLA₂* not induced by IPTG. 3. Molecular weight standard.

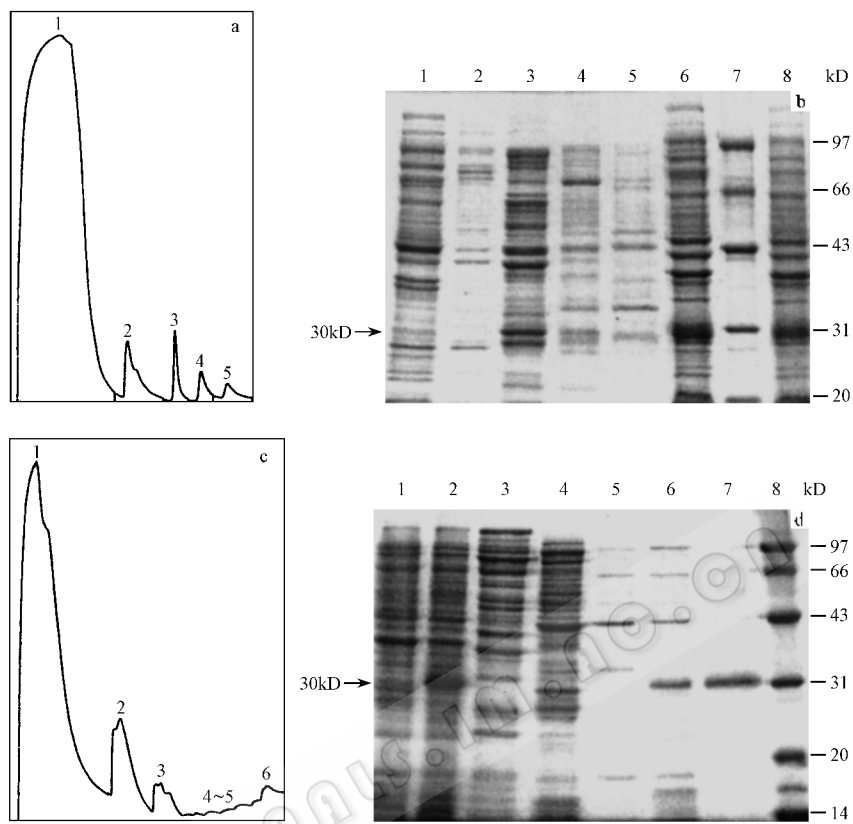


图 3 HP-Trx-PLA₂(a b)和 Trx-PLA₂(c d)融合蛋白的金属螯和亲和层析纯化

Fig.3 Purification of HP-Trx-PLA₂(a b) and Trx-PLA₂(c d) fusion protein by metal-chelating affinity chromatography

(a)Chromatogram of soluble proteins from transformed TOP10 cells on Ni²⁺ chelating sepharose in PBS buffer system .Peak 1. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH7.8) ,500mmol/L NaCl ;Peak 2. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ; Peak 3. Proteins eluted with 50mmol/L PB (pH6.0) ,500mmol/L NaCl ,1.5mmol/L imidazole ;Peak 4. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ,50mmol/L imidazole ;Peak 5. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ,200mmol/L imidazole .(b)SDS-PAGE analysis of the proteins from Ni²⁺ chelating sepharose ;1 ~ 5. Proteins from Peak 1 ~ 5 ;6. Total bacterial proteins ;7. Molecular weight standards ;8. Total soluble proteins .(c)Chromatogram of soluble proteins from transformed BL21(DE3) cells on Ni²⁺ chelating sepharose in PBS buffer system .Peak 1. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH7.8) ,500mmol/L NaCl ;Peak 2. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ;Peak 3. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ,150mmol/L imidazole ;Peak 4 and 5. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ,200 and 400mmol/L imidazole ;Peak 6. Proteins eluted with 50mmol/L PB(pH6.0) ,500mmol/L NaCl ,500mmol/L imidazole .(d)SDS-PAGE analysis of the proteins from Ni²⁺ chelating sepharose ;1. Proteins from peak 1 ;2. Total soluble proteins ;3 ~ 7. Proteins from peak 2 ~ 6 ;8. Molecular weight standards .

2.3 两种 PLA₂ 融合蛋白的亲和纯化比较与鉴定

利用 His-Patch 和 6His 亲和标记 ,将两种系统下表达的菌体超声上清进行 Ni²⁺ -Chelating Sepharose 亲和层析 ,结果(图 3)表明 ,在 pTRX 系统下表达的 Trx-PLA₂ 融合蛋白具有对 Ni²⁺ -Chelating Sepharose 的高亲和性 ,需要 400mmol/L 以上浓度的咪唑才能被完全洗脱下来 ,并具有 85% 以上的纯度 ;而 pThi-His-C 系统中表达的 HP-Trx-PLA₂ 融合蛋白与 Ni²⁺ -

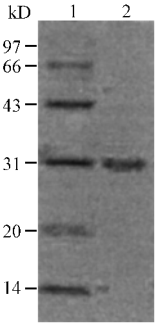


图 4 纯化后 PLA₂ 融合蛋白的 Western blot 检测

Fig.4 Western blot of the purified PLA₂ fusion protein
1. protein marker 2. purified PLA₂ fusion protein.

Chelating Sepharose 的亲和力相对低得多 , 仅用 15mmol/L 咪唑洗脱时就有部分融合蛋白流出 , 逐步提高咪唑浓度 , 均不能洗下具有一定纯度的融合蛋白 , 呈现出明显的拖尾现象 , 当咪唑浓度为 200mmol/L 时 , 可将几乎所有的菌体蛋白洗下 , HP-Trx-PLA₂ 融合蛋白在各洗脱峰中均有分布 , 当咪唑浓度继续升至 500mmol/L , 不再有蛋白洗出 , 说明此系统下的融合蛋白基本不具备与 Ni²⁺ - Chelating Sepharose 的特异性亲和力 , 因而很难与大肠杆菌的其他胞内可溶性蛋白有效分开 , pTRX 表达系统更适合用于 PLA₂ 的大量表达和表达产物的纯化。免疫印迹结果表明(图 4) , 兔抗天然江浙蝥蛇磷脂酶 A₂ 的多抗能识别我们用大肠杆菌表达的 PLA₂ 融合蛋白 , 这主要由于平颏海蛇与江浙蝥蛇 PLA₂ 具有相似的功能结构域所致。结合 PLA₂ 重组子的 DNA 测序结果 , 证明该蛋白是重组平颏海蛇 PLA₂ 融合蛋白。

3 讨论

蛇毒 PLA₂ 的重组表达研究是目前开展 PLA₂ 结构与功能关系研究的有效手段之一。融合表达系统是近几年来发展较快的一种重组蛋白表达技术 , 就原核系统而言 , 采用融合表达方式对防止包含体产生、增加表达量、提高折叠率、限制蛋白酶水解和优化纯化方案等均有着独特的优越性^[12]。平颏海蛇 PLA₂ 的主要结构特点是 , 分子内含有 7 对二硫键 , 它们的正确配对直接关系到 PLA₂ 的酶活性和其他生理活性 , 然而 , 如此多的二硫键对于蛋白的重组表达无疑会增加难度。在迄今为止不多的报道中 , 人们对蛇毒 PLA₂ 的重组表达普遍采用包含体变复性的方式进行^[13]。为了得到具有较高生物活性的重组海蛇 PLA₂ 蛋白 , 我们构建了以肠激酶(EK) 识别序列作为连接区的 pThioHisC-PLA₂ 和 pTRX-PLA₂ 融合表达载体 , 其目的是希望获得较高表达量和较好溶解性的融合 PLA₂ , 并在融合蛋白的酶解后 , 得到具有天然 N 端的重组 PLA₂ 以便进行功能研究。

pThioHisC 和 pTRX 是以硫氧还蛋白(Trx) 为融合伴侣的两种原核表达载体 , 分别含有 Trc 和 T7 强启动子 , lac I 调节基因及其他转录、翻译元件 , 可以在大肠杆菌 TOP 10 和 BL21 (DE3) 中通过 IPTG 诱导插入其中的外源基因表达 , 都含有能和二价金属离子(Ni²⁺) 形成配位键的多组氨酸亲和标签 , 不同的是 , 前者是在 Trx 上存在一个“ His patch ”结构 , 形成 HP-Trx , 而后者是在天然 Trx 羧基端存在 6His 区。我们的研究表明 , PLA₂ 在这两种系统中均能得到表达 , 但在 pTRX 系统中的表达量及融合蛋白溶解性明显高于 pThioHisC 系统 , 这说明 PLA₂ 基因的表达主要取决于启动子的种类、融合伴侣与目的基因间 linker 的长度等调控因子。另外 , 本实验结果显示 , pTRX 中的“ 6His ”比 pThioHisC 中的“ His patch ”结构具有更强的与 Ni²⁺ -sepharose 结合的能力 , 有利于融合蛋白的纯化 , 表明选择合适的表达载体 , 对于提高基因的表达量及融合蛋白的纯化效率至关重要。pTRX-PLA₂ 高效表达及亲和纯化系统的建立 , 为 PLA₂ 的基因工程下游工程研究特别是重组 PLA₂ 的功能研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Dennis E A. The Enzymes. 3rd ed. New York :Academic Press ,1983 ,307 ~ 353.
- [2] Ami R K ,Ward R J. *Toxicon* ,1996 ,**34**(8) :827 ~ 841.
- [3] 覃公平主编. 中国毒蛇学. 第 2 版. 南宁 :广西科学技术出版社 ,1998. 603.
- [4] Costa L A ,Miles H A ,Diez R A ,et al. *Anticancer Drugs* ,1997 ,**8**(9) :829 ~ 834.
- [5] Renetseder R ,Brunie S ,Dijkstra B W ,et al. *J Biol Chem* .1985 ,**260**(21) :11627 ~ 11634.
- [6] Verheij H M ,Volwerk J J ,Jansen E H ,et al. *Biochemistry* ,1980 ,**19**(4) :743 ~ 750.
- [7] Pan F M ,Chao S C ,Wu S H ,et al. *Biochem Biophys Res Commun* ,1998 ,**250**(1) :154 ~ 160.
- [8] Pan H ,Liu X L ,Ou-Yang L L ,et al. *Toxicon* ,1998 ,**36**(8) :1155 ~ 1163.
- [9] Singh S B ,Armugam A ,Kini R M ,et al. *Arch Biochem Biophys* ,2000 ,**375**(2) :289 ~ 303.
- [10] 杨文利,卫剑文,钟肖芬,等. 生物化学与生物物理学报, 2001 ,**33**(3) :345 ~ 350.
- [11] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989. 9.
- [12] LaVallie E R ,McCoy J M. *Curr Opin Biotechnol* ,1995 ,**6**(5) :501 ~ 506.
- [13] Chang L S ,Wu P F ,Chang C C. *Biochem Biophys Res Commun* ,1996 ,**221**(2) :328 ~ 332.

Fusion Expression of PLA_2 Gene From *Lapemis hardwickii* in *E. coli* *

Yang Wenli¹ Ye Lanting¹ Zou Lan¹ Wang Feng² Xu Anlong^{1**}

(¹ The National Opening Laboratory for Marine Functional Genomics Research ,School of Life Science ,
Zhongshan University ,Guangzhou 510275 ,China)

(² School of Life Science ,University of Science & Technology of China ,Hefei 230027 ,China)

Abstract : The gene encoding PLA_2 (PLA_2 -9) from *Lapemis hardwickii* Gray venom was cloned to the 3' end of the thioredoxin gene (HP-trxA and trxA) in plasmid pThioHisC and pTRX to construct the pThioHisC- PLA_2 and pTRX- PLA_2 fusion expression vector. The fusion protein of PLA_2 can be expressed in the two different systems induced by IPTG at 25°C ,but the expression level and the solubility of the fusion protein in pTRX were better than that in pThioHisC. The expressed product in the two systems were purified by immobilized metal-chelate affinity chromatography. The Trx- PLA_2 fusion protein with over 85% purity was obtained and HP-Trx- PLA_2 fusion protein can not be purified since it does not exhibit affinity to the medium. So ,the pTRX- PLA_2 vector system was established for the large-scale expression and purification.

Key words : PLA_2 from *Lapemis hardwickii* , Fusion expression , Affinity chromatography

* Supported by State 863 High Technology R&D Project of China in Marine Field (2001AA626010)

** Corresponding author .Tel 86-20-84113655 84113656 Fax 86-20-84038377 E-mail :ls36@zsu.edu.cn