

人热休克蛋白 gp96 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达与纯化

阿丽娅^{1,2} 李宏涛¹ 周明海¹ 哈 斯² 田 波^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 内蒙古大学生命科学院 内蒙古 010021)

摘 要 热休克蛋白 gp96 是热休克蛋白 90 家族成员,能够引起非特异性和特异性免疫反应。得到大量高纯度的蛋白质是研究开发 gp96 的关键。然而重组的 gp96 容易在 *E. coli* 中降解,并在一定条件下形成多聚体。实验先将人 gp96 基因克隆到 pET-30a 载体上并在 *E. coli* Blstar 中表达,再经过亲和层析、阴离子交换、分子筛分别纯化 gp96。最终去掉了大部分的降解片段和多聚体,得到一定量的可溶性 gp96,为进一步研究其结构和功能打下一定的基础。

关键词 热休克蛋白, gp96, 克隆, 表达, 纯化

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)06-0834-03

热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)是一类高度保守且广泛存在于原核及真核生物中的蛋白质^[1]。根据其分子量大小和结构主要分成 HSP90、HSP70 等近似 10 个家族。Gp96 是 HSP90 家族中的重要成员,在正常组织和肿瘤中均有广泛表达,主要定位于内质网腔(Endoplasmic reticulum, ER)。正常情况下 gp96 在细胞中呈低水平表达,但热休克、葡萄糖缺乏、细菌和病毒感染等均可诱导其表达增加。IFN- α 和 IFN- γ 也可在转录水平上调 gp96 的表达^[2]。Gp96 作为分子伴侣,可阻止蛋白质聚集,协助蛋白质折叠、伸展、组装和转运,抑制错折叠蛋白质的分泌^[3]。Gp96 的肿瘤免疫原性是 Srivastava 于 1986 年在小鼠肿瘤移植实验中寻找不同个体特异性肿瘤抗原时,偶然发现的^[4]。近年来的研究发现, HSP 本身没有抗原性,抗原性由结合的短肽所决定, HSP 将结合的短肽呈递给 I 类 MHC 分子,激活特异性和记忆性 T 细胞,引发机体细胞免疫反应^[5]。Gp96 还可以活化树突细胞(Dendritic cell, DC)促进 MHC I 类和 MHC II 类分子以及共刺激因子的表达,从而提高天然免疫反应^[6]。

目前 gp96 主要作为自体疫苗应用于恶性肿瘤治疗,即从患者的肿瘤组织或病毒感染的组织中提取 gp96 作为疫苗注射给患者本人。然而提取的 gp96 往往不能满足临床需求,对于大多数传染性疾病因无法得到患者病变组织而不能进行治疗。并且由于给每个患者使用的疫苗不一样,所以难以形成通用的产品。若要在体外重组 gp96 和抗原肽复合物并研究其功能,必须首先得到大量高纯度的 gp96 蛋白。文献报道在大肠杆菌中表达的重组 gp96 不稳定且易聚合沉淀^[7,8]。为提高蛋白纯度,本实验在大肠杆菌中表达纯化人的全长 gp96,尝试应用亲和层析、阴离子交换、分子筛对蛋白进行纯化,得到一定量的可溶性目的蛋白。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

已从中国肝癌患者细胞中克隆了人热休克蛋白(hsp) gp96(Glycoprotein 96) cDNA, GenBank 收录号为 AY040226,采用 Novagen 公司的 pET-30a 质粒与 gp96 构建重组子。大肠杆菌(*Escherichia coli*)克隆菌株 DH5 α 和表达菌株 Blstar 均由中国科学院微生物研究所分子病毒室保存。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 连接试剂盒、PCR 所需试剂及各种酶均购自 TaKaRa 公司, Ni-NTA His-Bind Resins 购自 Novagen 公司, Bio-RAD 公司的转膜仪, Pharmacia 公司的 Superdex200 层析柱和 AKTA 操作系统。

1.3 重组子的克隆

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 提供序列得到人热休克蛋白 gp96 基因全序列,设计上游引物: 5'-TAGGATCCGACGATGAAGTTGATGTG-3'(含 BamH I 酶切位点);下游引物: 5'-GGCTCGAGTTACAATTCATCTTTTC-3'(含 Xho I 酶切位点)。

1.3.2 全长 gp96 基因的克隆 同时用 BamH I 和 Xho I 两种酶酶切 PCR 产物和 pET-30a 质粒,然后胶上回收 pET-30a 质粒大片段与胶上回收纯化的全长 gp96 基因连接过夜,转化到 *E. coli* DH5 α 中,在 LB 固体培养皿上涂平板,挑单菌落,酶切鉴定后,选出阳性克隆,测序结果正确。

1.4 全长 gp96 的表达

把构建好的重组子转化到大肠杆菌 Blstar 中, LB 固体培养皿上挑单菌落,接种到 LB 液体培养基中摇菌 12 ~ 16h (50 μ g/mL 的 Kan) 37 $^{\circ}$ C 以 0.1% 接菌量扩大培养 3 ~ 4h, 0.5mmol/L IPTG 诱导,继续摇菌,至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.8,取少

基金项目: 国家 973 项目(2001CB510001)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62554247; E-mail: potien@sun.com.cn

作者简介: 阿丽娅(1977-),女(蒙古族)呼和浩特市人,硕士研究生,研究方向为分子病毒学。E-mail: aliya-mongolia@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-03-03, 修回日期: 2004-08-18

量样品离心收集菌体,10%的 SDS-PAGE 检测目的片段。

1.5 gp96 的纯化

1.5.1 菌体裂解 将 IPTG 诱导后的菌液离心,收集菌体,溶于缓冲液 I (20mmol/L 磷酸钠 pH7.8,50mmol/L NaCl,1mmol/L 苯咪唑啉,100 μ g/mL 溶菌酶)中,4 $^{\circ}$ C 搅拌 1h,反复冻融几次,超声破碎 2~3 次,再次离心后上清加 60% 硫酸氨沉淀目的蛋白,过夜 20000g 离心 20min,沉淀溶于缓冲液 II (20mmol/L 磷酸钠 pH7.8,500mmol/L NaCl,20mmol/L 咪唑,1mmol/L 苯咪唑啉)中,再次离心,取上清用金属螯和层析纯化 His-tag 融合的 gp96,初步洗脱部分杂蛋白^[9]。

1.5.2 gp96 的离子交换亲和和层析 用 4 倍柱体积的缓冲液 A (20mmol/L Tris-HCl pH7.4,200mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,0.01% NaN₃) 冲洗 ConA-Sepharose 柱,平衡后将上步得到的 gp96 样品上样,再用 3 倍柱体积的缓冲液 A 洗脱 Superdex G50 柱中的蛋白,收集产物,缓冲液 A 平衡 POROS 20QE 柱,收集物上样直至 280nm 的吸收值稳定,以 200~1000mmol/L NaCl 梯度洗脱,分步收集,10%的 SDS-PAGE 鉴定^[10]。

1.5.3 gp96 的分子筛层析 用 3 倍柱体积的缓冲液 B (20mmol/L Tris-HCl pH7.4,100mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,0.01% NaN₃) 平衡柱子,将离子交换后的 gp96 进行 Superdex 200 分子筛层析,收集目的蛋白峰,用截流量为 30kD 的超滤管浓缩至适当浓度,10%的 SDS-PAGE 分析。

1.6 Western blot 检测 gp96

纯化后的 gp96,用大鼠 gp96 单克隆抗体 Western blot 鉴定目的蛋白。目的蛋白经过 SDS-PAGE,用电转仪转 2h 至醋酸纤维素膜上,移后的膜用 5% 脱脂牛奶封闭 3h,一抗(大鼠抗 gp96 的单克隆抗体,体积比 1:2000)室温反应 2h 后,洗膜 3 次,二抗(兔抗大鼠 IgG,体积比 1:5000)室温反应 1h 后,洗膜 3 次,加碱性磷酸酶作用 1h,用 BCLP/NBT 显色体系显色。

2 结果和分析

2.1 gp96 基因的表达

将 IPTG 诱导前后收集到的菌体充分裂解,离心,分别取上清 10 μ L 点样,低分子量 Marker 做对照,10%的 SDS-PAGE 检测。结果(图 1-A)证实 gp96 基因在 B1star 菌株中可以表达,诱导前后表达量不同,约 96kD 的 gp96 诱导后表达量提高。

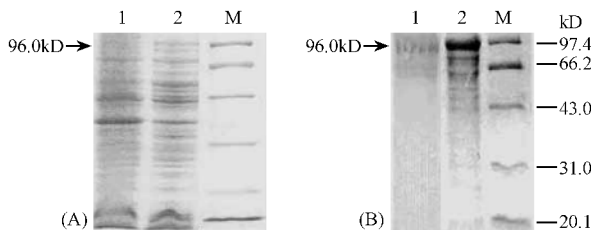


图 1 (A) gp96 在大肠杆菌 B1star 中诱导表达的 SDS-PAGE (B) 纯化后 gp96 的 Western blot 和 SDS-PAGE

Fig.1 (A) Expressed gp96 in *E. coli* B1star was analyzed by SDS-PAGE (B) Western blot of purified gp96 and SDS-PAGE

(A) 1. Before induction 2. After induction ;M. Molecular weight markers. (B) 1. Western blot of purified gp96 2. SDS-PAGE of gp96 ;M. Molecular weight markers.

2.2 20QE 阴离子交换柱纯化 gp96 蛋白

经过亲和和层析得到的蛋白产物仍含有较多的杂质蛋白,所以应用离子交换柱进一步纯化。经过 NaCl 梯度洗脱,洗脱时每管收集 1mL,依次收集 8 管洗脱物。每管各取 10 μ L 点样,10%的 SDS-PAGE 鉴定,低分子量 Marker 做对照。结果(图 2)表明,收集得到的产物在低盐洗脱时多为降解片段,在 450~600mmol/L NaCl 洗脱时大部分蛋白是 gp96。当大于 600mmol/L NaCl 洗脱时随着盐浓度的增加,多聚体也增加。所以选用 450~600mmol/L NaCl 洗脱得到的产物进一步纯化。

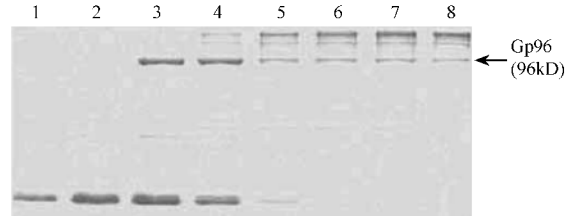


图 2 gp96 过 POROS 20QE 离子交换亲和和层析柱的电泳图
Fig.2 SDS-PAGE of gp96 POROS 20QE column chromatography
1~8. Collected fractions after elution per milliliter.

2.3 分子筛纯化后的 gp96

选收集纯度较高的 gp96 用 30kD 截留浓缩管浓缩,使样品体积控制在 250 μ L 并去除部分低分子量片段,过分子筛。收集完整洗脱峰,再次应用 30kD 截留浓缩管浓缩。

2.4 纯化后 gp96 的 Western 杂交和 SDS-PAGE

从 gp96 浓缩液中取样做 Western 检测,每点样孔上样 10 μ L,10% SDS-PAGE 对照,低分子量 Marker 做参考。重组人 gp96 与特异性抗体反应能力较弱,且 gp96 易降解,在 Western 检测中仍可不同程度检测到降解片段(图 1-B)。经过几步纯化后,最终纯化产物约为菌体总蛋白含量 2%~5%。

3 讨论

作为 HSP 家族一员, gp96 可以调节免疫反应。适量肿瘤来源的 gp96 免疫小鼠可产生肿瘤免疫力,自身并不产生免疫反应^[11]。而 5~10 倍的剂量则降低抗肿瘤的免疫反应,这种调节作用依赖于 CD4+ T 细胞。它们可能是 NK1(自然杀伤 T 细胞)或其他调节细胞, gp96 也可通过诱导 DC 产生细胞因子如 IL-1、IFN- γ 等来调节免疫反应^[12]。以上结果为应用 gp96 多肽复合物疫苗治疗肿瘤和传染性疾病预防提供了理论基础。Antigenics 公司开发的黑色素瘤治疗性疫苗已做完 III 期临床^[13]。然而自体疫苗不能广泛应用于不同个体,而且往往携带多价抗原,不利于进行有针对性的免疫治疗^[14,15]。最近在体外重组 HSP 和抗原肽的免疫效应研究得到广泛的开展^[16,17]。大量高纯度的可溶性蛋白是研究 gp96 多肽复合物疫苗免疫效果的前提和关键。本实验证实有些分子量较大的蛋白如 gp96 在大肠杆菌中的表达量并不高。且在纯化重组蛋白时, gp96 可能污染了氨肽酶而使自身降解。gp96 分子的 C-端区域包含一个二聚化位点(氨基酸残基 692-709),它使 gp96 形成二聚物甚至分子量高达几百 kD 的更高级别的寡聚物^[18]。此外,当 gp96 浓缩超过一定浓度时,即使储存于

-70℃, 1 周后 gp96 分子也会因低聚反应而粘着。冷冻保存还会导致 gp96 不可逆转的不溶。由于 gp96 以上种种特性, 可能影响本实验中 gp96 与特异性抗体的结合能力, 需要进一步研究证实。本实验经过镍柱、离子交换柱、分子筛 3 个步骤最终可以除去杂蛋白、大部分降解片段和多聚体, 对外表达人全长 gp96 进行了有益探索。当前获得的产品在一定程度上可满足实验室研究的需要, 然而最终应用于疫苗还需提高其产量和纯度, 有待继续探索。

参 考 文 献

- [1] Qu D , Mazzarella R A , Green M. Analysis of the structure and synthesis of GRP94 , an abundant stress protein of the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol* , 1994 , **13** :117 - 124.
- [2] 岳培彬 , 黄常治. 热休克蛋白 gp96 抗肿瘤免疫的研究进展. *中国肿瘤生物治疗杂志* , 2001 , **8** (3) :225 - 227.
- [3] Wang X Y , Kaneko Y , Repasky E , et al. Heat shock proteins and cancer immunotherapy. *Immunol Invest* , 2000 , **29** (2) :131 - 137.
- [4] Blachere N E , Udono H , Janetzki S , et al. Heat shock protein vaccines against cancer. *Immunother* , 1993 , **14** :352 - 356.
- [5] 孟颂东 , 高福 , 田波. 热休克蛋白-多肽复合物在肿瘤和传染性疾病预防中的作用. *生物工程学报* , 2000 , **16** (4) :425 - 427.
- [6] Baker-LePain , Reed R C , Nicchitta C V. ISO : a critical evaluation of the role of peptides in heat shock/chaperone protein-mediated tumor rejection. *Curr Opin Immunol* , 2003 , **15** :89 - 94.
- [7] Srivastava P K. Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods* , 1997 , **12** :165 - 171.
- [8] Srivastava P K , Jaikaria N S. Methods of purification of heat shock protein-peptide complexes for use as vaccines against cancers and infectious diseases. *Methods Mol Biol* , 2001 , **156** :175 - 186.
- [9] Srin S , Nora L. Molecular mechanisms of peptide Loading by the tumor rejection antigen /heat shock chaperone gp96 (GRP94). *Biological Chemistry* , 1999 , **274** (17) :12023 - 12035.
- [10] Meng S D , Song J , Rao Z H , et al. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *Immunological Methods* , 2002 , **264** :29 - 35.
- [11] 李晓鲁 , 彭毅志. 热休克蛋白与抗感染免疫. *免疫学杂志* , 2001 , **17** (3) :139 - 141.
- [12] 张士猛 , 刘志敏. 热休克蛋白 gp96 作为抗原载体的研究进展. *中国生物工程杂志* , 2003 , **23** (5) :12 - 16.
- [13] Filiberto B , Alessandro T , Licia R. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes : clinical and immunologic findings. *J Clinical Oncology* , 2002 , **20** :4169 - 4180.
- [14] Castelli C , Rivoltini L , Rini F , et al. Heat shock proteins : biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* , 2004 , **53** :227 - 233.
- [15] Fleischer K , Schmidt B , Kastenmuller W , et al. Melanoma-reactive class I-restricted cytotoxic T cell clones are stimulated by dendritic cells loaded with synthetic peptides , but fail to respond to dendritic cells pulsed with melanoma-derived heat shock proteins *in vitro*. *Immunol* , 2004 , **172** :162 - 169.
- [16] Rapp U K , Kaufmann S H. DNA vaccination with gp96-peptide fusion proteins induces protein against an intracellular bacterial pathogen. *Int Immunol* , 2004 , **16** :597 - 605.
- [17] Peng M L , Ren H , Xu H M , et al. Heat shock protein 70-HBsAg complex inducing antigen-specific cytotoxic T lymphocyte immune response. *Chinese Journal of Hepatology* , 2003 , **11** :271 - 274.
- [18] Wearsch P A , Nicchitta C V. Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain. *Biochemistry* , 1996 , **35** (51) :16760 - 16769.

Cloning , Expression and Purification of Human Heat Shock Protein GP96 Gene in *Escherichia coli*

A Li-Ya^{1 2} LI Hong-Tao¹ ZHOU Ming-Hai¹ HA Si² TIEN Po^{1*}

(¹ Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Inner Mongolia University , Inner Mongolia 010021 , China)

Abstract : Heat shock protein gp96 is a member of HSP90 families. It can elicits both innate and adaptive immune responses. Generally it is essential to obtain enough amounts of pure gp96 to meet the needs of study and application. But the recombinant gp96 in *E. coli* is easy to degrade and form aggregates in certain conditions. In the experiment , first cloned human gp96 gene into pET-30a vector and expressed the recombinant in *E. coli* Blstar. Then purified gp96 by Ni-affinity column , anion exchange column and Gel-filtration in turn. In the end , removes most degraded fragments , aggregates and obtains certain amount of soluble gp96 , which make an foundation for further investigations of the protein.

Key words : Heat shock protein , gp96 , Cloning , Expression , Purification

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2001CB510001)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62554247 ; E-mail : potien@sun.com.cn

Received date : 03-03-2004