

重组人亲环素 A 的表达、纯化及活性测定*

李芳秋** 赵 权 武建国

(南京军区南京总医院全军医学检验中心 南京 210002)

单 祥 年

(南京师范大学生物系 南京 210097)

摘 要 将 RT-PCR 扩增得到的亲环素 A (CyPA) 基因片段插入原核表达载体 pET11c 中, 得到重组质粒 pET11 / CyPA, 转入大肠杆菌获得高效表达。SDS-PAGE 分析表明, 重组 CyPA 表达量占菌体可溶性蛋白的 40% 以上。经 50% 硫酸铵沉淀和 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析可纯化重组 CyPA。用糜蛋白酶偶联法测定显示重组 CyPA 具有肽基脯氨酸顺 / 反异构酶活性。

关键词 亲环素 A, 基因表达, 肽基脯氨酸顺 / 反异构酶

分类号 Q51

亲环素 A (Cyclophilin A, CyPA) 最初是从哺乳动物组织中分离纯化的一种分子量为 18kD 的胞质蛋白, 具有肽基脯氨酸顺 / 反异构酶 (PPIase) 活性和结合免疫抑制剂环孢素 A 的能力^[1,2]。后来发现 CyP 是一个在进化上相当保守、功能相关的蛋白质家族, CyPA 是这个家族中最主要的成员。对 CyP 参与信号传导、介导免疫抑制、以及对其 PPIase 活性的研究一直是一个热门课题^[3,4]。近年还发现全身性红斑狼疮等自身免疫病人体内存在抗 CyP 自身抗体, 检测 CyP 抗体有助于了解自身免疫病的发病机制和进行临床诊断^[5]。这些工作都需要大量纯化的人 CyPA。用大肠杆菌体外表达人 CyPA, 能满足这些工作需要, 避免了从人组织提取纯化的麻烦。此外, 利用基因克隆表达技术还能进行定点突变, 作为其结构、动力学和作用机制研究的辅助手段。本研究在对 CyPA 基因进行了克隆和序列测定的基础上, 构建了表达载体, 在大肠杆菌中获得高水平表达。

1 材料和方法

1.1 质粒及菌株

pET11c 载体及宿主菌 BL21 (DE3) 由南京大学马忠博士惠赠。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和 IPTG 购自 Promega 公司。质粒和 PCR 产物纯化试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品。N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide、糜蛋白酶购自 Sigma 公司, DEAE Sepharose CL-6B 购自 Pharmacia 公司, CyPA 标准品购自

* 江苏省自然科学基金资助项目 (BK97174)。

** 南京师范大学生物系博士研究生。

收稿日期: 1997-10-09

Boehringer Mannheim 公司。其他试剂均为分析纯。

1.3 PCR 引物

PRI-A1 5' CGGGAATTCATATGGTAAACCCACCGTGTTCCTTCGAC, 含 EcoRI 和 NdeI 位点, 下游引物 PRI-A2 5' ATGCAAGCTTGGATCCTTATTCGAGTTGTCCACAGT CAGC, 含 Hind III 和 BamH I 位点。

1.4 CyPA 基因的克隆与重组

CyPA 基因片段由本实验室用 RT-PCR 技术从 MT₄ 淋巴细胞系克隆^[6]。重组 DNA 操作按文献 [7] 方法进行。

1.5 诱导 CyPA 基因表达

pET11 / CyPA 质粒转化大肠杆菌 B21 (DE3), 接种于 LB / Ap 培养液, 37°C 振荡培养 3~4 h 至 A_{600} 为 0.5~0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol / L 诱导表达, 继续培养 12 h, 定时取样测 A_{600} , 离心收集菌体, 按不同细菌浓度加入相应量的 SDS-PAGE 载样缓冲液, 煮沸 5 min, 取 15 μ l 上样, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析不同时间的表达量。

1.6 蛋白质凝胶电泳 (SDS-PAGE)

12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用考马斯亮蓝染色。用双波长飞点扫描仪 (岛津 CS-9000) 对凝胶进行扫描, 计算蛋白表达量。

1.7 表达产物的纯化

参照 Liu^[8] 的方法加以简化。pET11 / CyPA 质粒转化菌加 IPTG 诱导后继续在 37°C 培养 10 h, 离心收集菌体, 用 20 mmol / L pH7.8 Tris-HCl 洗一次, 加适量同样缓冲液将细菌悬起, 超声波破碎细胞, 离心去除菌体碎片, 用 50% 饱和硫酸铵沉淀蛋白, 对上述缓冲液透析, 去除铵离子, 透析过的细菌粗提物进行 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析。洗脱液仍为 20 mmol / L 的 pH 7.8 Tris-HCl, 收集流穿蛋白组分, 冷冻干燥法浓缩。纯化蛋白经高效液相色谱 (HPLC) 测定纯度。

1.8 PPIase 活性测定

采用 Fischer 等人建立的糜蛋白酶偶联法^[1], 略有改进。反应体积 2 ml, 含 35 mmol / L HEPES (pH8.0)、100 μ mol / L N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (溶于 66% DMSO 水溶液中)、10 μ mol / L 糜蛋白酶、CyPA 的浓度为 30 nmol / L。除糜蛋白酶外的所有成分混合后预置在 15°C, 糜蛋白酶加入后迅速混匀并起始反应, 在 UV-260 分光光度计上连续测定 A_{390} , 直到反应终止。

2 结果和讨论

2.1 CyPA 表达载体的构建

测序证实无误的 CyPA cDNA 片段用 NdeI、BamHI 双酶切, 经纯化 (按 QIAquick Nucleotide Removal Kit 说明书进行) 后连接到载体 pET11c 中, 构建表达载体 pET11 / CyPA (图 1), 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。选择培养得到的阳性菌提取质粒作为模板, 再用 PRI-A1 和 PRI-A2 引物进行 PCR 扩增, 得到 525 bp 特异性 DNA 扩增带。为了确证外源基因的存在, 用 NdeI、BamHI 对重组质粒 pET11 / CyPA 进行双酶切鉴定, 得到预期的 DNA 片段。

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达

pET11 / CyPA 质粒转化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后作 SDS-PAGE 分析, 在 18kD 处出现一浓染的蛋白质条带, 与 Boehringer Mannheim 公司 CyPA 标准品分子量相同 (图 2-A)。诱导后 3~4 h 表达量达峰值, 经扫描计算 CyPA 的含量占菌体可溶性蛋白的 41%, 且持续到 10 h 表达量不变 (图 2-B)。

2.3 重组 CyPA 的纯化

用简化的方法纯化重组蛋白获得满意结果。重组菌体用超声破碎代替佛氏细胞压碎器, 省去硫酸鱼精蛋白沉淀核酸的步骤而直接用 50% 饱和硫酸铵沉淀蛋白, 去除部分杂蛋白及核酸, 再经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析, 便得到电泳纯的 CyPA (图 2), 经 HPLC 分析, 纯度达到 90% 以上 (图 3)。

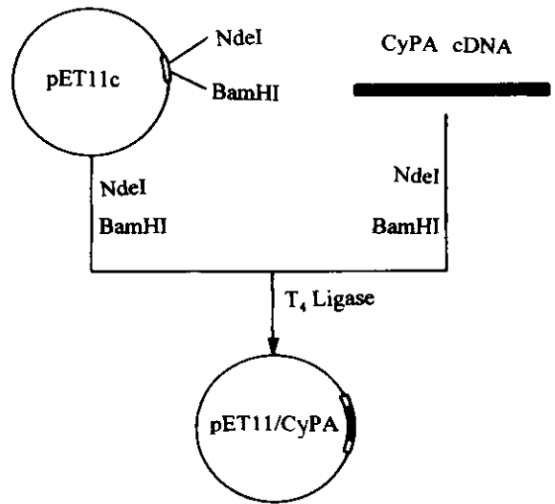


图 1 表达载体 pET11/CyPA 的构建
Fig.1 The construction map of expression vector pET11/CyPA

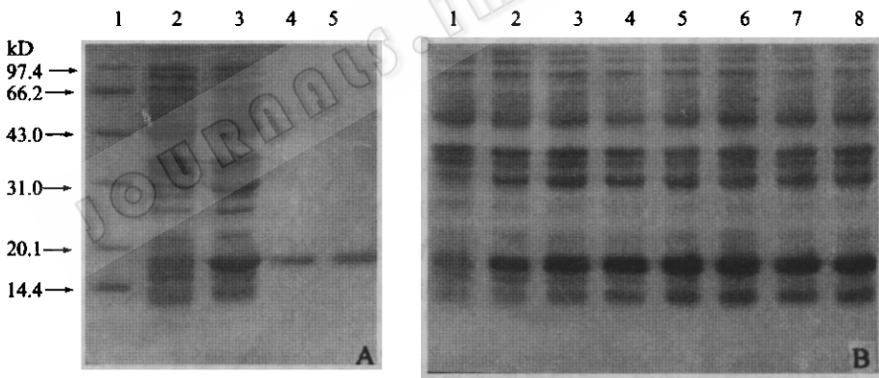


图 2 pET11/ CyPA 转化大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the proteins expressed in *E. coli* transformed with pET11/ CyPA

A: 1. Protein molecular weight markers; 2. Uninduced culture; 3. Induced culture (Induced for 2h); 4. Purified expression product; 5. rhCyPA standard. B: 1. Uninduced culture; 2~8. Induced for 1,2,3,4,6,8,10h respectively.

2.4 PPIase 活性测定

活性测定的寡肽底物 (通式 N-succinyl-Xaa-Pro-Phe-p-nitroanilide) 中的 Xaa-Pro 键在顺式和反式结构间取得动态平衡。当 Xaa-Pro 键为反式时, α -糜蛋白酶将寡肽 C 末端的封闭基团瞬间裂解, 释放出显色基团。PPIase 能催化加速 Xaa-Pro 键的顺 / 反异构速度, 缩短封闭基团被裂解所需时间。以时间为函数测定 A_{390} 即得知 PPIase 活性 (图 4)。



图3 rhCyPA的HPLC分析

Fig.3 Determination of purity of rhCyPA

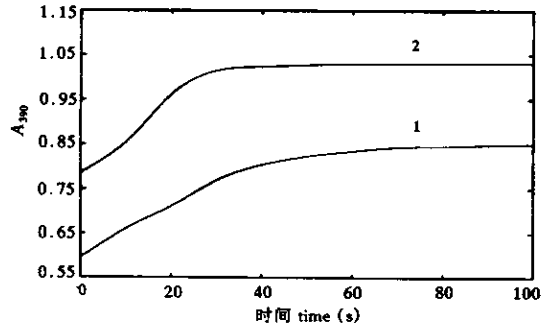


图4 糜蛋白酶偶联的重组人CyPA的PPIase活性

Fig.4 PPIase activity test of rhCyPA with chymotrypsin-coupled assay

1. No rhCyPA; 2. 30 nmol/L rhCyPA.

参 考 文 献

- [1] Fischer G, Bang H, Mech C. *Biomed Biochim Acta*, 1984, **43**: 1101.
- [2] Handschumacher R E, Harding M W, Rice J *et al. Science*, 1984, **226**: 544.
- [3] Galat A, Metcalfe S M. *Prog Biophys Molec Biol*, 1995, **63**: 67
- [4] Heitman J, Movva N R, Hall M N. *The New Biologist*, 1992, **4**: 448.
- [5] Kratz A, Harding M W, Craft J *et al. Clin Exp Immunol*, 1992, **90**: 422.
- [6] 李芳秋, 赵 权, 武建国. *南京大学学报(自然科学·医学专辑)*, 1996, **32**: 23.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [8] Liu J, Albers M W, Chen C M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 2304.

EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN CYCLOPHILIN A

Li Fangqiu Zhao Quan Wu Jianguo

(Center of Medical Laboratory Sciences of PLA, Jinling Hospital, Nanjing 210002)

Shan Xiangnian

(Dept. of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract Plasmid-derived expression of the human CyPA in *E. coli* would make it possible to obtain ample protein quantities and to avoid difficult task of obtaining human tissues for protein purification. The cDNA encoding human CyPA from MT₄ lymph cell line has been cloned and an expression vector (pET11 / CyPA) has been constructed under control of the T7 promoter for efficient expression in *E. coli*. The recombinant CyPA is produced at 41% of total soluble cell protein, and showed the peptidyl-prodyl *cis-trans* isomerase activity.

Key words Cyclophilin A, Gene expression, Peptidyl-prodyl *cis-trans* isomerase