47 卷 1 期
2007 年 2 月 4 日

微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica

47(1):79 ~ 82
4 February 2007

在大肠杆菌中表达有活性的人 STK11 蛋白

侯 鑫[1],扈廷茂[1],刘俊娥[2]*

([1] 内蒙古大学生命科学学院 呼和浩特 010021)

([2] 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:STK11 蛋白(serine/threonine kinase 11)是近年来发现的具有多种重要功能的蛋白,可参与调控细胞周期、p53 介导的细胞凋亡、ras 诱导的细胞转化、细胞极化等多种生物学过程。利用大肠杆菌高效表达有活性的人 STK11 蛋白,可为其结构和功能的深入研究打下良好基础。利用本室克隆的人 STK11 cDNA 和原核表达载体 pET-44a(+)构建带有 Nus 融合标签的诱导型表达载体 pET-Nus-STK11,在不同的大肠杆菌宿主中诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测表明,在 BL21(DE3)宿主中表达的融合蛋白主要以包涵体形式存在,占菌体总蛋白的 8.9%;在 Rosetta-gami(DE3)pLysS 宿主中主要表达为可溶性蛋白,占菌体总蛋白的 16.7%。而经纯化和包涵体蛋白复性处理后,以 Chariot 介导重组融合蛋白进入人肝癌细胞 SMMC-7721 检测其对细胞生长和细胞周期的影响。与对照组相比,BL21(DE3)中表达的 Nus-STK11 蛋白几乎无抑制活性;而 Rosetta-gami(DE3)pLysS 中表达的 Nus-STK11 蛋白可以显著抑制 SMMC-7721 细胞的生长,抑制率达 47.05%,并导致细胞周期的 G_0/G_1 期阻滞,证实表达的重组融合蛋白具有明显的生物学活性。上述结果为在大肠杆菌中成功表达有活性的重组 STK11 蛋白的首次报道。

关键词:STK11 蛋白;原核表达;Rosetta-gami(DE3)pLysS

中图分类号:Q812 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2007)01-0079-04

STK11(serine/threonine kinase 11)是 1998 年由两个独立的研究小组同时发现的基因[1,2],该基因定位于人染色体 19p13.3 区域,编码一种新的 cAMP 依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,分子量为 60 kDa。近年来的研究显示:该蛋白可能参与调控细胞周期[3]、p53 介导的细胞凋亡[4]、Wnt 信号通路[5]、TGF-β 信号通路[6]、ras 诱导的细胞转化[7]、调控细胞极化[8]及细胞的能量代谢平衡[9]等过程,推测该蛋白具有多种重要的生物学功能。

利用大肠杆菌表达有活性的重组蛋白是深入研究蛋白功能和进行晶体结构解析的重要基础,比利用真核系统表达蛋白具有明显的优势。鉴于国外学者在大肠杆菌中表达的 STK11 融合蛋白没有检测到生物学活性[10],而目前国内的研究局限于检测该基因的突变情况[11,12],本研究利用本室克隆的 STK11 cDNA[13]在大肠杆菌中成功地表达了有活性的 STK11 蛋白,为该蛋白功能的深入研究和晶体结构解析打下了良好的基础。

本研究选用的大肠杆菌表达宿主 Rosetta-gami(DE3)pLysS 用于表达真核蛋白的优势尚未引起广泛重视,最近国外学者用该宿主获得了在其它多种表达宿主中无法获得的、有活性的重组真核蛋白[14],显示了该宿主在原核表达系统中的巨大应用潜力,本文的结果进一步证实了其应用价值,为类似的蛋白表达研究工作提供了有意义的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 BL21(DE3)(以下简写为 BL)、Rosetta-gami(DE3)pLysS(以下简写为 RG)及原核表达载体 pET-44a(+)购自 Novagen 公司,大肠杆菌 DH5α 由本室保存,人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 酶和试剂:常用工具酶、DNA 分子量标记和胶回收试剂盒购自大连宝生物公司,包涵体蛋白纯化及复性试剂盒、Nus 单克隆抗体、HRP 标记羊抗鼠二抗购自 Novagen 公司,6 × His 蛋白亲和层析试剂盒购自 Pierce 公司,Chariot 蛋白转运试剂盒购自 Active Motif 公司,硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司,其它试剂为分析纯。DNA 序列测定由上海生工

基金项目:内蒙古教育厅重点研究项目(NJ02005)

* 通讯作者。E-mail:liuje@im.ac.cn

作者简介:侯 鑫(1976 –),男,山东郓城人,讲师,博士研究生,研究方向为肿瘤基因治疗。Tel:86-471-4991483;Fax:86-471-4992442;E-mail:houxinliu@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-04-19;接受日期:2006-06-29;修回日期:2006-09-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

公司完成。

1.2 原核融合表达载体的构建

含有 STK11 基因 cDNA 的质粒 pMD-STK11 由本室构建和保存[12]，经 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后，与经相同酶切的 pET-44a(+)载体连接，构建重组表达载体 pET-Nus-STK11(以下简写为 pENS)。常规实验操作均参照文献[15]或试剂盒说明书进行。

1.3 重组融合蛋白的诱导表达及纯化

载体 pENS 分别转化大肠杆菌 BL 和 RG 感受态细胞，于 28℃分别诱导 4 h 和 8 h 后收集菌体，超声裂解，SDS-PAGE 检测细菌总蛋白、可溶性及包涵体组分，用 6×His 蛋白亲和层析试剂盒纯化可溶性重组融合蛋白，用包涵体蛋白纯化及复性试剂盒进行包涵体蛋白的粗提，经亲和层析进一步纯化后进行复性处理(透析法)。

1.4 重组融合蛋白的 Western blot 检测

将菌体总蛋白、可溶性及包涵体组分进行 15% SDS-PAGE 电泳，转膜后用 Nus 单克隆抗体(1∶1500 稀释)为一抗、羊抗鼠 IgG(1∶3000 稀释)为二抗进行 Western blot 检测。

1.5 MTT 法检测重组融合蛋白对 SMMC-7721 细胞生长的影响

SMMC-7721 细胞以 2×10^3/孔接种于 96 孔板，过夜培养后分 3 组，Chariot 组用 Chariot 处理，BL 组和 RG 组用 Chariot 分别转运来源于宿主 BL 和 RG 的融合蛋白，蛋白浓度梯度为 0.5～10.0μg/mL，分别于 24～96h 后用 MTT 测定法，按以下公式计算抑制率 细胞生长抑制率(IR%)=(1－实验组 A_{570}值/对照组 A_{570}值)×100%。

1.6 流式细胞仪检测重组融合蛋白对细胞周期的影响

SMMC-7721 细胞贴壁长至 40% 融合时分为 3 组 分组同 1.5，蛋白浓度为 10.0μg/mL。处理后 72h 用流式细胞仪测定 DNA 含量，分析细胞周期分布。

1.7 统计学分析

实验数据采用 *t* 检验，检验水准以 $P<0.05$ 为有显著性差异。用 SPSS 11.0 for Windows 软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 原核融合表达载体的构建

重组表达载体 pENS 的酶切和 PCR 鉴定结果见图 1。该载体用于表达带有 Nus 和 6×His 标签的 STK11 重组融合蛋白。

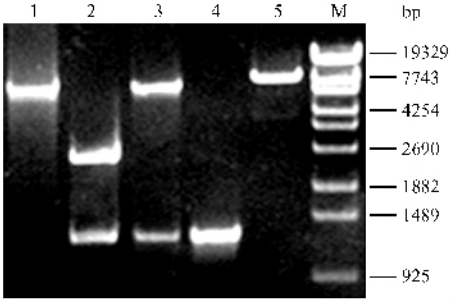

图 1 重组表达载体 pENS 的酶切及 PCR 鉴定

Fig.1 Restriction and PCR analysis of recombinant expression vector pENS. 1.Expression vector pET-44a(+)/*Eco*R Ⅰ + *Xho* Ⅰ; 2.Positive plasmid pMD-STK11/*Eco*R Ⅰ + *Xho* Ⅰ; 3.pENS/*Eco*R Ⅰ + *Xho* Ⅰ; 4.PCR product of pENS; 5.pENS/*Eco*R Ⅰ; M. λDNA/*Eco*T 14 Ⅰ Marker.

2.2 目的蛋白的 Western blot 检测

BL/pENS 诱导 4h、RG/pENS 诱导 8h 后裂解菌体，经 SDS-PAGE 检测到约 122.5 kDa 大小的特异蛋白条带，与 Nus(62.5 kDa)和 STK11(60 kDa)融合蛋白的预期大小一致。在 BL 宿主中表达的融合蛋白约占菌体总蛋白的 8.9%，主要以包涵体形式存在；而在 RG 宿主中融合蛋白占菌体总蛋白的 16.7%，主要表达为可溶性蛋白(图 2)。将 BL 中的包涵体蛋白和 RG 中的可溶性重组蛋白亲和层析纯化后，可得到电泳均一的目的蛋白(图 3)。

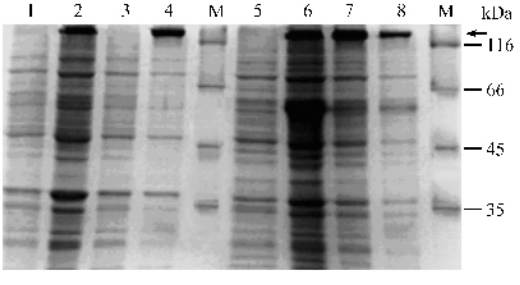

图 2 宿主 BL/pENS、RG/pENS 诱导表达后各组分的 SDS-PAGE 检测

Fig.2 SDS-PAGE analysis of different fractions from host BL/pENS & RG/pENS after induction. 1.Total protein in BL/pENS before induction; 2.Total protein in BL/pENS induced 4h; 3.Soluble fraction in BL/pENS induced 4h; 4.Inclusion body in BL/pENS induced 4h; 5.Total protein in RG/pENS before induction; 6.Total protein in RG/pENS induced 8h; 7.Soluble fraction in RG/pENS induced 8h; 8.Inclusion body in RG/pENS induced 8h; M. Protein molecular weight marker. Arrow indicates the position of specific protein band.

经 Western blot 检测，在 BL 和 RG 宿主菌中诱导表达的融合蛋白均可与 Nus 单克隆抗体特异结合，且特异条带的大小与预期一致，证实检测到的特异蛋白条带为 Nus-STK11 融合蛋白(图 4)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

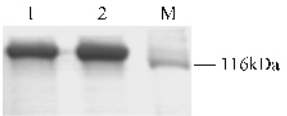

图 3　重组蛋白纯化后的 SDS-PAGE 检测

Fig.3　SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein. 1.Purified inclusion body in BL/pENS induced 4h; 2.Purified soluble fraction in RG/pENS induced 8h; M. Protein molecular weight marker.

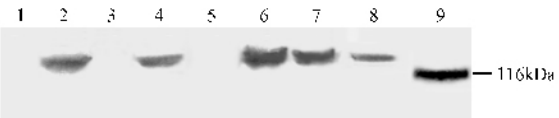

图 4　BL/pENS 和 RG/pENS 诱导产物的 Western blot 检测

Fig.4　Western blot analysis of recombinant protein expressed in BL/pENS & RG/pENS. 1.Total protein in BL/pENS before induction; 2.Total protein in BL/pENS induced 4h; 3.Soluble fraction in BL/pENS induced 4h; 4.Inclusion body in BL/pENS induced 4h; 5.Total protein in RG/pENS before induction; 6.Total protein in RG/pENS induced 8h; 7.Soluble fraction in RG/pENS induced 8h; 8.Inclusion body in RG/pENS induced 8h; M. Protein molecular weight marker.

2.3　重组 Nus-STK11 融合蛋白对细胞生长的影响

来源于 BL 的 Nus-STK11 融合蛋白复性后,在蛋白浓度为 0.5 ~ 10.0μg/mL 时,对 SMMC-7721 细胞生长抑制率仅为 0.72% ~ 2.68%;而来源于 RG 的可溶性 Nus-STK11 随蛋白浓度由 0.5μg/mL 增至 10.0μg/mL,细胞生长抑制率逐渐增加,最高达 47.05%,表现出明显的浓度依赖关系;其中蛋白浓度高于 1.0μg/mL 时,对细胞生长产生显著抑制,抑制率高于 14.66%。在 72h 内,细胞生长抑制率随时间的延长而增加(表 1)。

2.4　重组 Nus-STK11 融合蛋白对细胞周期的影响

与 Chariot 组相比,经来源于 BL 的重组 Nus-STK11 蛋白处理后,SMMC-7721 细胞 G_0/G_1 期百分数没有明显增加,而经来源于 RG 的重组融合蛋白处理的细胞出现明显的 G_0/G_1 期阻滞,S 期细胞显著减少($P < 0.05$)。不同组之间 G_2/M 时相所占百分比没有显著差异,结果见表 2。

表 1　Nus-STK11 重组融合蛋白对 SMMC-7721 细胞的生长抑制率(%)

Table 1　Growth inhibitory ratio (%) of recombinant Nus-STK11 fusion protein on SMMC-7721 cells

Time of treatment	Chariot	BL(Nus-STK11 from BL, μg/mL)					RG(Nus-STK11 from RG, μg/mL)				
		0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
24h	0.65	0.72	1.61	1.87	2.12	2.41	3.07	14.66	16.96	19.00	25.16
48h	0.76	1.03	1.83	1.96	2.20	2.49	3.44	19.29	20.68	23.89	32.03
72h	0.74	1.16	1.80	2.03	2.33	2.69	3.53	25.41	28.13	37.07	46.98
96h	0.76	1.15	1.82	2.03	2.35	2.68	3.84	25.58	28.20	37.29	47.05

表 2　Nus-STK11 对 SMMC-7721 细胞周期的影响

Table 2　Influence of Nus-STK11 on cell cycle of SMMC-7721 cells

Groups	G_0/G_1(%)	G_2/M(%)	S(%)
Blank control	52.51 ± 5.35	19.14 ± 2.48	28.35 ± 3.02
Chariot	52.10 ± 5.69	18.61 ± 2.32	29.29 ± 3.83
BL (Chariot/Nus-STK11)	53.96 ± 5.44	18.90 ± 2.08	27.14 ± 3.03
RG (Chariot/Nus-STK11)	63.12 ± 6.56*	18.65 ± 1.68	18.23 ± 2.32*

* $P < 0.05$

3　讨论

STK11 蛋白在诱导细胞周期停滞、调控细胞代谢平衡和细胞重新极化过程中的作用使其成为一个重要的抑癌基因,国际上对该蛋白生物学功能的研究已经成为热点并不断有新的发现。在哺乳动物细胞中表达的 GST-STK11 融合蛋白的表达量低、成本高[16]在昆虫细胞中,STK11 只有和两种伴侣分子同时表达时才能获得有活性的 GST-STK11 融合蛋白且表达量较低[10]。目前利用大肠杆菌表达系统高效表达有活性的重组蛋白仍是蛋白结构和功能研究的重要基础,该系统的低成本和高表达量使其成为应用最广泛的表达系统,新的、经过优化的表达宿主的应用为真核蛋白在原核系统中的表达创造了有利的条件,因此本研究尝试用 BL 和 RG 两种大肠杆菌表达宿主表达有活性的人源 STK11 蛋白。

研究中选用的表达载体 pET-44a(+)中带有 Nus 融合标签,该基因是原核基因,Nus 在 STK11 N 端的融合有利于翻译的有效起始和核糖体的稳定结合,可增加目的蛋白的表达量和稳定性。本研究表明:Nus-STK11 融合蛋白在宿主 BL 和 RG 中都能表达且可稳定存在,未检测到目的蛋白的降解。

Rosetta-gami (DE3) pLysS(文中简写为 RG)是高度严谨的表达宿主菌,该菌含有 6 个大肠杆菌稀有密码子的 tRNA 基因,可增加含相关稀有密码子的真核基因的表达量和忠实性。在 STK11 基因中,这些密码子出现的频率为:CCC (1.84%)、AGG (1.61%)、GGA(0.46%)、CUA(0.23%),在 STK11 基因前 105 个密码子中,上述密码子共出现了 7 次,Nus-STK11 在 RG 中的表达量(16.7%)比在 BL 中的表达量(8.9%)有明显提高,可能与该宿主对 tRNA 基因的优化有关。本研究中来自 BL 的包涵体蛋白

© 中国科学院微生物研究所期刊编辑部 http://journals.im.ac.cn

经复性后仍未显著影响细胞生长和细胞周期;而来自 RG 的可溶性重组蛋白对 SMMC-7721 细胞生长有明显的抑制效果,并可使其产生明显的 G_0/G_1 期阻滞,与文献报道[3,5]一致。其可能的原因如下:虽然 STK11 蛋白的晶体结构尚未解析,但该蛋白中含有 10 个非串联的 Cys 密码子,很可能会形成二硫键,且二硫键的正确形成与其生物学活性有关;RG 宿主同时带有硫氧还蛋白基因(*Trx B*)和谷胱甘肽还原酶基因(*gor*)双突变,有利于重组蛋白在胞质中形成二硫键并正确折叠同时提高目的蛋白的可溶性;因此在 RG 宿主中获得的可溶性表达的 Nus-STK11 蛋白具有明显生物学活性,这可能与该宿主的上述特性有关。

参 考 文 献

[1] Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, *et al*. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 1998, **391**(6663): 184 – 187.

[2] Jenne DE, Reimann H, Nezu J, *et al*. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*, 1998, **18**(1): 38 – 44.

[3] Tiainen M, Ylikorkala A, Makela TP. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G_1 cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96** (16): 9248 – 9251.

[4] Karuman P, Gozani O, Odze RD, *et al*. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol Cell*, 2001, **7**(6): 1307 – 1319.

[5] Spicer J, Rayter S, Young N, *et al*. Regulation of the Wnt signalling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Oncogene*, 2003, **22**(30): 4752 – 4756.

[6] Smith DP, Rayter SI, Niederlander C, *et al*. LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Hum Mol Genet*, 2001, **10**(25): 2869 – 2877.

[7] Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, *et al*. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*, 2002, **419**(6903): 162 – 167.

[8] Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, *et al*. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell*, 2004, **116**(3): 457 – 466.

[9] Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, *et al*. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(10): 3329 – 3335.

[10] Martinez-Torrecuadrada JL, Romero S, Nunez A, *et al*. An efficient expression system for the production of functionally active human LKB1. *J Biotechnol*, 2005, **115**(1): 23 – 34.

[11] 李宜雄, 吕新生, 夏家辉, 等. 中国人 Peutz-Jeghers 综合征 STK11 基因突变的研究. 中华医学杂志, 1999, **79**(6): 425 – 427.

[12] 王振军, 严仲瑜, 毕郭龙, 等. 国人黑斑息肉病 LKB1 基因胚系突变的检测. 中华外科杂志, 2000, **38**(2): 104 – 105.

[13] 侯 鑫, 刘俊娥, 扈庭茂. PJ 综合症相关抑癌基因 LKB1/STK11 的逆转录 PCR 法克隆及序列分析. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2005, **36**(5): 541 – 545.

[14] Rizzi C, Frazzon J, Ely F, *et al*. DAHP synthase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme. *Protein Expr and Purif*, 2005, **40** (1): 23 – 30.

[15] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.

[16] Baas AF, Boudeau J, Sapkota GP, *et al*. Activation of the tumor suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J*, 2003, **22**(12): 3062 – 3072.

Expression of functional human STK11 protein in *Escherichia coli*

HOU Xin[1], HU Ting-mao[1], LIU Jun-e[2]*

([1] *College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot* 010021, *China*)

([2] *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 10080, *China*)

Abstract: STK11 (serine/threonine kinase 11), a multi-functional protein reported recently, possibly participates in a broad range of cellular processes, including regulation of cell cycle, p53-mediated apoptosis, ras-induced cell transformation and cell polarization. An efficient expression of functional STK11 in *Escherichia coli* will promote the study on its structure and function. Inducible prokaryotic expression vector pET-Nus-STK11 (with Nus fusion tag) was constructed with pET-44a(+) and the cDNA of STK11 gene cloned in our lab. pET-Nus-STK11 was then expressed in both BL21(DE3) and Rosetta-gami (DE3)pLysS on the induction of IPTG. SDS-PAGE and Western blot indicated that recombinant Nus-STK11 obtained in BL21(DE3) was in the form of inclusion body, whereas that from Rosetta-gami (DE3)pLysS was mainly in soluble fraction, and accounted for 8.9% and 16.7% of the total protein, respectively. After purification and refolding, the obtained recombinant protein was carried into SMMC-7721 cells by Chariot to observe its influence on cell growth and cell cycle. Nus-STK11 from BL21(DE3) was proved to be lack of any tumor-suppression activity, while a growth inhibitory ratio of 47.05% on SMMC-7721 cell was observed, and cell cycle progression of SMMC-7721 cells was also arrested from G_0/G_1 to S phase, with the Nus-STK11 from Rosetta-gami (DE3) pLysS, indicating that the above recombinant fusion protein from Rosetta-gami (DE3)pLysS had significant biological activity. This is the first report on functional recombinant STK11 protein expressed in *Escherichia coli*.

Keywords: STK11 protein; Prokaryotic expression; Rosetta-gami (DE3)pLysS

Foundation item: Key Project of Inner Mongolia Bureau of education (NJ02005)

* Corresponding author. Tel: 86-471-4991483; Fax: 86-471-4992442; E-mail: houxinliu@yahoo.com.cn, liuje@im.ac.cn

Received: 19 April 2006/Accepted: 29 June 2006/Revised: 18 September 2006

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn