

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (12):1596-1600; 4 December 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

大肠杆菌表达的重组猪 β_2 微球蛋白二级结构的圆二色谱分析

高凤山¹, 夏春², 张强³, 李云岗⁴, 李新生², 许崇波¹, 白婧¹

(大连大学生物工程学院, 大连 116622)

(中国农业大学动物医学院, 农业部预防兽医学重点实验室, 北京 100094)

(中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

(山东省动物疫病预防与控制中心, 济南 250022)

摘要:【目的】研究巴马小型猪 β_2 微球蛋白 (β_2m) 的结构和功能。【方法】亚克隆巴马小型猪 β_2m 的成熟肽部分, 并构建与 pMAL-p2X 的重组质粒, 转化大肠杆菌 TB1 并诱导后, 融合表达蛋白分别经过 Western blot、纯化及 Factor Xa 切割, 分离纯化单体蛋白。圆二色谱 (circular dichroism spectrum, CD) 测定蛋白的二级结构。

【结果】重组表达的融合蛋白 MBP- β_2m 大小为 53.1 kDa。切割后去除 MBP 的单体蛋白大小为 10.6 kDa。圆二色谱分析单体蛋白 β_2m 二级结构元件 α -螺旋、 β -折叠、转角和随机卷曲所含有的氨基酸残基数目分别为 0、45、8 和 45。【结论】分析揭示表达的 β_2m 具有正确的二级结构, 可以用于体外多肽结合等研究。

关键词: 二级结构; 圆二色谱; β_2 微球蛋白

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 12-1596-06

β_2m 是一种免疫球蛋白超家族成员, 人的 β_2 微球蛋白最早由 Peterson 等于 1969 年从肾小管病变患者的蛋白尿中分离出来^[1]。Meziou 于 1983 年报道了猪的 β_2 微球蛋白在猪的胚胎细胞中的表达情况, 揭示 β_2 微球蛋白表达于胚胎滋养层细胞的表面^[1]。Milland 于 1993 年首次用 PCR 克隆了猪 β_2 微球蛋白的 cDNA, 并且测定了其序列。经序列分析发现猪的 β_2m 基因编码 118 个氨基酸的开放阅读框架, 其中含有 20 个氨基酸的信号肽和 98 个氨基酸的成熟肽。经过与人、鼠及牛的 β_2m 序列比较, 核苷酸的同源性分别达到了 72%、62% 和 81%^[1]。Rogel 等于 1997 年等通过荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 证实了猪的 β_2 微球蛋白位于第 1 号染色体的 q17 区, 与猪的 SLA (swine leukocyte antigen) I 类 (SLA-I) 重链基因位于不同的染色体

上^[1]。猪的 β_2m 与 SLA-I 重链以非共价键结合, 维持结合多肽的 SLA-I 分子的结构稳定^[6-6]。然而到目前为止, 关于猪 β_2m 的结构方面的研究未见报道。

为研究猪 β_2m 在抗原递呈方面的辅助功能及其结构, 本研究以巴马小型猪为研究材料, 克隆并表达 β_2m , 在蛋白表达和分离纯化的基础上测定 β_2m 的二级结构, 并分析其二级结构成分, 以判定目的蛋白的空间构象是否正确, 为今后进行体外多肽结合研究、 β_2m 进一步的空间结构研究及与人 β_2m 的结构和功能关系研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器及软件

AMV 反转录酶, Ex Taq PCR 试剂盒, IPTG 和 X-gal, T₄ DNA 连接酶, EcoR I 限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品 (宝生物工程大连有限公司); Trizol 试剂为

基金项目: 国家自然科学基金 (60972169), 大连大学博士启动项目 (0302173)

作者简介: 高凤山 (1971-) 男, 河北怀安人, 博士, 从事分子免疫学和分子病毒学研究。Tel: +86-411-87402718-612, E-mail: gfs0626@126.com

收稿日期: 2009-06-22; 修回日期: 2009-09-14

Invitrogen 公司产品;玻璃奶回收试剂盒为博大泰克公司产品;pGEM-T easy 载体为 Promega 公司产品。p2X 载体, TB1 *E. coli*, Factor Xa 因子及淀粉树酯纯化柱均为 New England BioLabs (NEB) 公司产品。DEAE 葡聚糖凝胶为欣经科公司产品。PCR 扩增仪为 Hybaid 公司产品,电泳系统为 Bio-RAD 公司产品。

β_2 m01/pGEM-T easy (本实验室保存)。日本 Jasco 公司的 J-715 型圆二色谱仪。

1.2 构建 pMAL-p2X/ β_2 m 融合表达载体

以 β_2 m01/pGEM-T easy 为模板,以引物 Q3 5'-TCAGAATTCGTCGCGCTCCCCGAAGGTTCA-3', P4 5'-AGTAAAGCTTTTACTGCTCTCGATCCCCTTAACT-3' 扩增 β_2 m 成熟肽区,PCR 程序:94°C, 3 min; 94°C, 1 min; 64°C, 30 s; 72°C, 45 s; 共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物 (mature peptide of β_2 m) 经电泳后回收纯化,再经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切回收纯化,与 p2X 载体连接,并转化 TB1 感受态细胞。

1.3 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blot

转化后的重组菌按照文献进行^[5]诱导表达,即 37°C, 180 r/min 摇菌直至 OD_{600} 达到 0.4~0.6,按照终浓度为 0.3 mmol/L 加入 IPTG (Sigma),继续培养 6 h 后,取培养物 1 mL 经 2×SDS 变性后,进行 SDS-PAGE 及 Coomassie Brilliant Blue 法染色脱色。融合表达产物命名为 MBP- β_2 m。按照文献^[5]进行 Western blot,一抗为鼠抗 MBP (maltose binding protein),二抗为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠抗抗体 (goat anti-rabbit immunoglobulin IgG antibody),四氯乙萘酚 (4-Chloro-1-Naphthol/Hydrogen Peroxide) 进行底物显色。

1.4 纯化、Factor 因子切割、分离单体蛋白

表达产物的纯化参照文献^[5]方法进行。菌体经 5 000×g 20 min 离心去沉淀,上清加入过柱 buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA),混悬,然后冻入 -80°C 冰箱。冻存物融化后,在超声仪上超声裂解,然后 9 000×g 20 min 离心取上清,经淀粉树酯柱 (amylose affinity resin column) 和 DEAE 葡聚糖凝胶离子交换层析柱 (DEAE-Sepharose ion exchange chromatography) (GL-6B) 纯化,得到纯化蛋白。SDS-PAGE 分析其纯化效果。

融合蛋白带有大约 42.5 kDa 的 MBP (maltose binding protein) 标签,通过 Factor Xa 因子可以将 MBP (maltose binding protein) 与单体蛋白切割分离。取纯化蛋白 1 mg,在含有 20 U 的 Factor Xa 因子的 1 mL

缓冲液体系中,4°C 切割 48 h,然后先后过 DEAE-葡聚糖凝胶层析柱和淀粉树酯柱分离纯化目的蛋白,SDS-PAGE 鉴定蛋白的纯度。

1.5 β_2 m 蛋白二级结构测定

纯化蛋白经 Bradford^[7]法测定其浓度,然后以 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 稀释至 0.4 mg/mL。取样品 600 μ L,应用 Jasco-715 光谱仪在 25°C 条件下对分离纯化蛋白 β_2 m 进行二级结构测定,比色杯光径为 0.1 nm,光谱值范围为 190~250 nm,扫描速度 200 nm/min,带宽 2 nm,反应时间 1 s。读数 4 次,取信号平均值并基线校正,将所测定的 CD 值转换成摩尔椭圆度 (molar ellipticity) $[\theta]$ ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$);用计算机专用软件 (J-700 for Windows Secondary Structure Estimation, Version 1.10.00) 分析各蛋白二级结构的组成,Excel 2003 作图,纵轴数值为原数据除以 100 后显示的数值。

2 结果

2.1 pMAL-p2X/ β_2 m 融合表达载体的构建

经过 PCR 扩增得到了 1 条大约 300 bp 的条带,经过序列测定, β_2 m 成熟肽区的序列与 β_2 m01 的序列完全一致,未发生变异。 β_2 m 成熟肽区经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切回收后,插入到 p2X 载体,并再次经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。整个载体的构建示意图见图 1。

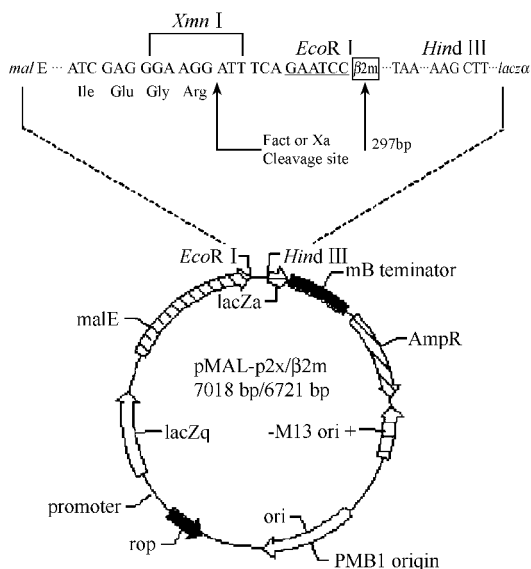


Fig. 1 pMAL-p2x/ β_2 m 表达载体的构建

Fig. 1 Construction of the expressed vector as pMAL-p2x/ β_2 m. The left arrow denotes the cleavage site of the Factor Xa next to *EcoR* I, and the right arrow denoted the inserted fragment with length.

2.2 融合蛋白表达、SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

pMAL-p2x/ β_2 m 重组子经过诱导,其菌体蛋白在 SDS-PAGE 上电泳显示 1 条大约 53 kDa 的条带,与

计算值 53.1 kDa 一致,并且主要以上清中所存在的可溶性蛋白为主,见图 2-A。Western blot 结果显示,抗体杂交条带大小为 53.1 kDa 左右,与表达条带大小一致,见图 2-B。

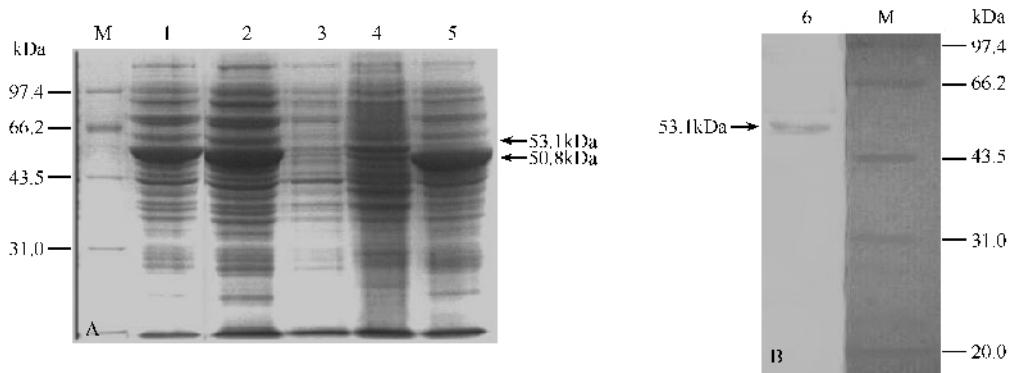


图 2 MBP- β_2 m 的表达及鉴定

Fig.2 Expression and identification of the MBP- β_2 m. A : SDS-PAGE analysis of MBP- β_2 m protein expression. B : Western blot analysis of MBP- β_2 m protein. 1 , expression of recombinant protein MBP- β_2 m in supernatant after sonication ; 2 , expression of total protein of the MBP- β_2 m in recombinant TBI ; 3 , TBI bacteria induced as a control ; 4 , expression of recombinant protein MBP- β_2 m in deposition after sonication ; 5 , expression of the pMAL-p2X plasmid bacteria as a control , 50.8 kDa ; 6 , the hybridized band for the fusion protein MBP- β_2 m by Western blot ; M , low molecular protein marker (97.4 kDa , 66.2 kDa , 43.5 kDa , 31.0 kDa , 21 kDa , 14 kDa).

2.3 融合蛋白的纯化、切割和分离

菌体蛋白经过淀粉树酯柱和 DEAE-葡聚糖凝胶层析柱纯化,得到了纯化蛋白,纯度经过薄层扫描,显示纯度大约为 90%,见图 3-A。Factor Xa 因子切割后,显示 42.5 kDa 和 10.0 kDa 左右的两条带,与

理论计算值 MBP 为 42.5 kDa 和 β_2 m 为 10.6 kDa 的大小一致,见图 3-B。 β_2 m 与 MBP 的混合物经过 DEAE-葡聚糖凝胶层析柱纯化,淀粉树酯柱分离后,得到分离的 β_2 m 和 MBP,经过薄层扫描,分离纯化的 β_2 m 蛋白纯度达到 95%,见图 3-C。

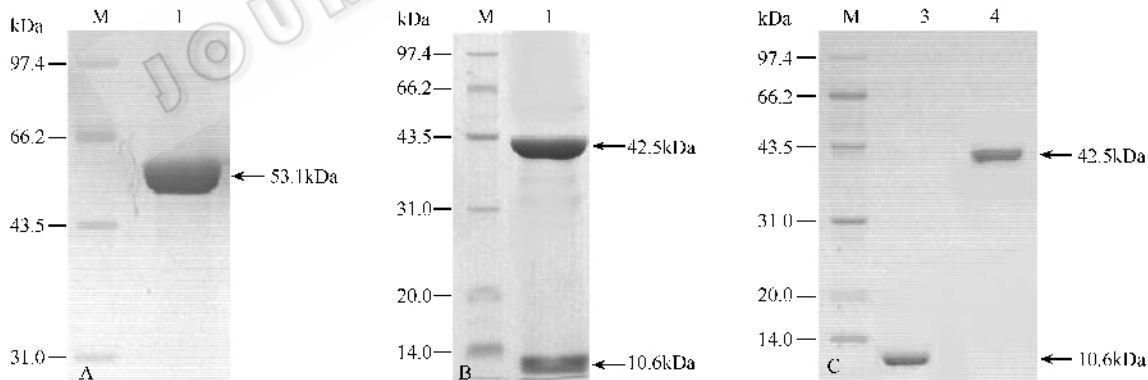


图 3 融合蛋白 MBP- β_2 m 的纯化、切割和分离

Fig.3 The purification , cleavage and separation of the MBP- β_2 m fusion protein. A : Purification of MBP- β_2 m protein. B : Cleavage of β_2 m protein by Factor Xa. C : Purification and separation of β_2 m protein from MBP by DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and amylose affinity chromatograph column. 1 , The purified MBP- β_2 m protein ; 2 , The mixture of β_2 m and MBP proteins after cleavage by Factor Xa ; 3 , The purified β_2 m ; 4 , The purified MBP ; M , Low molecular weight standards.

2.4 β_2 m 蛋白二级结构测定和分析

对纯化的单体蛋白 β_2 m 进行圆二色谱测定,结果只在 214 nm 显示一个凹峰,最低值 $[\theta] = -9.1 \times 10^3 \text{ deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$,符合 β -折叠的蛋白结构

(图 4)。用 CONTIN 程序及 Yang-chen 公式^[8]计算其各二级结构成分: α -螺旋, β -折叠,转角及随机卷曲的含量,分别为 0.45.9% ,82%和 45.9% ,结果见表 1。该 β_2 m 蛋白共 98 个氨基酸,其中 α -螺旋, β -折

叠,转角及随机卷曲分别为 0,45,8 和 45。

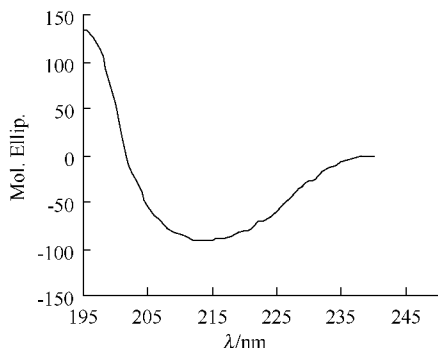


图4 圆二色谱测定 β_2 m 蛋白的二级结构

Fig.4 Determination of the secondary structure of the β_2 m protein by circular dichroism.

表1 β_2 m 二级结构测定结果

Table 1 The result of the secondary structure of β_2 m estimated by CD

| elements of secondary structure | The CD estimation of β_2 m (98aa) | |
|---------------------------------|---|----|
| | percentage (%) | aa |
| a-Helix | 0 | 0 |
| β -sheet | 45.9 | 45 |
| turn | 8.2 | 8 |
| random coil | 45.9 | 45 |

3 讨论

本实验采用的巴马近交 9 代猪种是我国具有地方特色优质品种,原产于广西,十分稀有而珍贵,加之肉质鲜美,遗传基因稳定,因而又具有广阔的经济开发前景和重要的科学研究价值。研究表明,巴马小型猪是一种保留原始基因特征、低等进化的品种,其 SLA-2 基因与人的 HLA-A2 基因和小鼠 H-2K1 的 cDNA 序列同源性分别达到了 79.23% 和 69.98%^[9]。本研究中巴马小型猪 β_2 m 与 GenBank 上仅有的 β_2 m 序列完全一致,说明 β_2 m 是一个非常保守的基因,不具有多态性,可以在今后的多肽结合及四聚体研究中共用一个 β_2 m。另据分析,巴马小型猪 β_2 m 与人的 β_2 m 的同源性达到了 72%,而与鼠的同源性只有 62%,揭示猪与人的进化关系要比鼠更接近。因此,研究猪 β_2 m 对于人今后相关研究具有一定的参考意义。

pMAL-p2X 系统含有 Ptac 强启动子,表达编码 MBP 的 *malE* 基因。外源基因插入到 *malE* 的下游,和 MBP 以融合蛋白的形式表达,大小为 50.8 kDa。在 MBP 前的信号肽介导融合蛋白到细胞周质中表达,这样便于形成二硫键和蛋白的正确折叠,而且融合蛋白以可溶性的形式存在,与其它带有 His₆ 或

GST 标签的表达系相比,pMAL 系统更易于实现外源蛋白的可溶性表达^[10]。融合蛋白通过对 MBP 具有亲和性的淀粉树酯柱进行纯化,操作方便。在 *malE* 和多克隆位点之间,有一个被蛋白酶 Factor Xa 因子识别的氨基酸序列 (Ile-Glu-Gly-Arg),可以把 MBP 和单体蛋白切割分离,切割分离后的 MBP 大小为 42.5 kDa^[5]。本实验中,融合蛋白 MBP- β_2 m 以可溶性形式表达,大小为 53.1 kDa,与理论值相符,Western blot 显示杂交带大小与表达带大小一致。融合蛋白经过纯化,Factor Xa 因子切割,再分离纯化,得到了单体蛋白 β_2 m,SDS-PAGE 证明,该单体蛋白仍然具有良好的可溶性,便于进行今后的构象和功能分析。

目前,猪的 β_2 m 蛋白的结构还没有成功解析,其相应的二级结构也未知。本实验通过圆二色谱 (Circular dichroism spectrum) 首次测定了蛋白 β_2 m 的二级结构, α 螺旋、 β 折叠、转角和随机卷曲所含有的氨基酸残基分别达到了 0,45,8 和 45,结果说明猪 β_2 m 蛋白是一个典型的具有 β 折叠结构的蛋白。 β 折叠是蛋白二级结构的主要成分,在很大程度上决定着蛋白是否能够正确折叠。本研究中测定的猪 β 折叠所含有的氨基酸残基数目与已解析的人的 β_2 m 相应的氨基酸残基数目 (47) 非常接近^[11],说明猪和人 β_2 m 蛋白在结构上具有相似性,为以后研究二者功能方面的交叉性提供了数据。

参考文献

- [1] Peterson PA, Evrin PE, Berggard I. Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of beta-2-microglobulin, albumin, and total protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 1969, 48 (7): 1189 - 1198.
- [2] Meziou W, Chardon P, Flechon JE, et al. Expression of beta 2-microglobulin on preimplantation pig embryos. *Journal of Reproductive Immunology*, 1983, 5 (2): 73 - 80.
- [3] Milland J, Loveland BE, Mckenzie IF. Isolation of a clone for pig beta 2-microglobulin cDNA. *Immunogenetics*, 1993, 38 (6): 464.
- [4] Rogel-Gaillard C, Vaiman M, Renard C, et al. Localization of the beta 2-microglobulin gene to pig chromosome 1q17. *Mammalian Genome*, 1997, 8 (12): 948.
- [5] Gao FS, Fang QM, Li YG, et al. Reconstruction of a swine SLA-I protein complex and determination of binding nonameric peptides derived from the foot-and-mouth disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 113 (3-4): 328 - 338.

- [6] Oleksiewicz MB, Kristensen B, Ladekjaer-Mikkelsen AS, et al. Development of a rapid in vitro protein refolding assay which discriminates between peptide-bound and peptide-free forms of recombinant porcine major histocompatibility class I complex (SLA-I). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, 86 (1-2) 55-77.
- [7] Elkordy AA, Forbes RT, Barry BW. Study of protein conformational stability and integrity using calorimetry and FT-Raman spectroscopy correlated with enzymatic activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 33 (2):177-190.
- [8] Mingxiao M, Ningyi J, Juan LH, et al. Immunogenicity of plasmids encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Antiviral Research*, 2007, 76 (1) 59-67.
- [9] 高凤山, 姜平, 李新生, 等. 我国巴马小型猪 SLA-2 基因克隆及分子特征. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34 (4) 686-690.
- [10] Kapust RB, Waugh DS. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*, 1999, 8 (8):1668-1674.
- [11] Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *The Journal of Immunology*, 2005, 174 (1) 6-19.

Analyzing secondary structure of β_2 microglobulin in *Escherichia coli* with circular dichroism spectrum

Fengshan Gao^{1*}, Chun Xia², Qiang Zhang³, Yungang Li⁴, Xinsheng Li², Chongbo Xu¹, Jing Bai¹

(¹ Dalian University, Bioengineering College, Dalian 116622, China)

(² Key Laboratory for Preventive Veterinary Medicine, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(³ Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

(⁴ Shandong Provincial Center for Animal Disease Prevention and Control, Jinan 250022, China)

Abstract: [Objective] In order to study the structure and function of β_2 microglobulin (β_2m). [Methods] We sub-cloned the mature peptide of β_2m into the p2X plasmid and transformed them to *Escherichia coli* TB1. The recombinant bacterium was induced to be expressed and the expressed fusion protein was detected by SDS-PAGE and western blot. After purifying and cleaving with Factor Xa, we separated the monomer protein β_2m from MBP. Finally, we determined the secondary structure of the β_2m protein by circular dichroism (CD) spectrum. [Results] MBP- β_2m was 52.1 kDa, and the monomer protein β_2m was 10.6 kDa. The α -helix, β -sheet, turn, and random coil of the fusion protein showed 0, 45, 8 and 45 amino acids, respectively, detected by CD estimation. [Conclusion] The β_2m protein had correct secondary structure and could be used for further research of peptide binding in vitro.

Keywords: secondary structure; circular dichroism spectrum; β_2 microglobulin

(本文责编 张晓丽)