

羊抑制素 α 亚基 N 端 1-33 序列肽段多聚体的构建及其表达纯化 Construction, Expression and Purification of Repeat Fragment Polymer of α -Inhibin α -Subunit N Terminal 1-33 Fragment

黄运茂, 施振旦*, 于迎春, 邵西兵

HUANG Yun-Mao, SHI Zhen-Dan*, YU Ying-Chun and SHAO Xi-Bing

华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

摘 要 为了提高短肽的免疫原性以制备短肽基因工程疫苗, 将羊抑制素 α 亚基 N 端 1-33 氨基酸残基片段的基因序列插入表达质粒 pRSET-A 的 *Bam*H I \ *Sac* I 位点之间构建重组质粒 pR-INH, 然后利用质粒中的一对同尾酶位点 *Bam*H I \ *Bgl* II 和下游的另一酶切位点 *Hind* III, 经过简单的酶切后, 将产物按各种组合连接, 构建了抑制素串联 2 至 6 聚体基因。含 3 至 6 聚体基因的重组质粒 pR-3INH, pR-4INH, pR-5INH 和 pR-6INH 经 IPTG 诱导均能在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 中表达目的蛋白, 分别占菌体蛋白的 6%、6%、7% 和 8%, 且都以包涵体形式存在。结果说明, 利用同尾酶切技术可以快速正确地构建短肽片段的串联多聚体重组质粒, 为构建短肽半抗原的高免疫原性基因工程疫苗提供了新的思路。

关键词 抑制素, 同尾酶, 串联多聚体, 表达

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0311-04

Abstract A cDNA sequence coding for ovine inhibin N terminal 1-33 AA residue fragment (INH) was inserted between *Bam*H I \ *Sac* I sites in plasmid pRSET-A to generate plasmid pR-INH. By utilizing a pair of isocaudamer *Bam*H I and *Bgl* II sites and another downstream *Hind* III site, following simple double digestions and combination ligation of the resultant products, 2 to 6-repeat INH genes were constructed respectively. Each plasmids containing 3 to 6 repeated INH fragment genes, pR-3INH, pR-4INH, pR-5INH and pR-6INH, directed expression of the target proteins in *E. coli* BL21(DE3) under induction of IPTG, which respectively accounted for 6%, 6%, 7% and 8% of the total bacterial protein. The expressed target proteins were all in the form of inclusion bodies. The above results implied that utilization of isocaudamer restriction digestion sites in expression plasmid is capable of rapidly and correctly constructing repeat fragment polymer of short peptides, which may become a new method in construction of high immunogenic recombinant vaccines of short peptides.

Key words α -Inhibin, isocaudamer site, repeat fragment polymer, expression

抑制素是由性腺分泌的一种糖蛋白激素, 主要来源于辜丸的支持细胞或卵巢的颗粒细胞, 由 α 和 β 两亚基组成^[1]。

抑制素的主要生物学功能是抑制垂体 FSH 分泌^[2]。根据这一原理, 对畜禽免疫中和抑制素生物学活性可以促进 FSH

Received: July 12, 2004; Accepted: October 9, 2004.

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China (No.39700102) and Guangdong Provincial Bureau of Science and Technology Research Project (No.2003C20205).

* Corresponding author. E-mail: zdshi@scau.edu.cn

国家自然科学基金项目(No.39700102)和广东省科技攻关项目(No.2003C20205)。

分泌、卵泡发育和增加排卵数^[3-5]。早期的研究一般都采用化学合成的抑制素亚单位肽片段制备抗原用于免疫,如Wrathall等用化学合成的牛抑制素 α 亚基N端1-29肽免疫绵羊能提高排卵数^[6],Anderson等用化学合成的抑制素1-32肽免疫绵羊可提早初情期和增加排卵数^[7]。在抑制素的各部分肽片段中,以 α 亚基N端1-32、1-26、7-26和8-30肽段的免疫效果最好,在第一次加强免疫后能使排卵率提高2倍,在第二次加强免疫后排卵率能提高3~5倍^[8],这些结果提示抑制素 α 亚基成熟肽的N端33个氨基酸残基区域内存在免疫原性强的抗原决定簇。

目前所用的抑制素抗原主要是从卵泡液或精液中提取或由人工合成亚单位片段。为避免动物疫病和化学合成的成本问题,通过基因工程技术构建高免疫原性的重组抑制素融合蛋白将是今后开发提高动物繁殖性能疫苗的主要选择。因此本研究选择具有强免疫原性的羊抑制素 α 亚基N端1-33氨基酸残基片段,利用基因重组方法构建其串联多聚体重组融合蛋白,在增大抗原分子量的同时也使抗原决定簇的数目增多,以期产生良好的抑制素免疫原性。在构建工作中,我们利用了同尾酶技术,在同一质粒中通过简单的酶切割和片段连接,简单快速地构建出了羊抑制素 α 亚基片段的一系列多聚体基因,并表达了相应的重组融合蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

羊抑制素 α 亚基N端1-33氨基酸残基片段基因序列由上海博亚生物技术有限公司合成,为避免影响重组蛋白表达时的折叠和可溶性,将第10位的半胱氨酸密码子(TGT)突变为丝氨酸密码子(TCT)。重组质粒构建所用试剂分别购于大连宝生物工程公司和上海生工生物工程有限公司。表达鉴定所用试剂除兔抗羊抑制素抗体是由日本东京约科大学药学院的K.Taya教授经华中农业大学的杨利国教授转赠外,其它试剂均购于武汉博士德生物工程有限公司。重组蛋白纯化所用树脂50% Ni-NTA为Qiagen公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组多聚体质粒的构建(图1):根据抑制素片段的DNA序列,设计引物(5'-AAGGATTCGGTTCACGCCCCACT-3',含BamH I位点;5'-ATGAGCTCCTCCGGCTCTGTGG-3',含Sac I位点)扩增INH片段,经BamH I \ Sac I双酶切后插入表达质粒pRSET-A构建重组质粒pR-INH。在构建成功后,将重组质粒pR-INH经BamH I / Hind III双酶切所得的片段连入经Bgl II / Hind III双酶切的重组质粒pR-INH得到抑制素的串联二聚体重组质粒pR-2INH。在此基础上用同样的方法,利用BamH I、Bgl II、Hind III三个内切酶位点和BamH I及Bgl II属于同尾酶的特性,经过一系列酶切、连接和片段串联策略,分别构建成重组三、四、五和六聚体重组质粒pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH和pR-6INH,并分别转染BL21(DE3)和筛选出重组子。

1.2.2 多聚体蛋白的表达:分别挑取含重组子pR-INH、pR-

2INH、pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH、pR-6INH和空白载体的细菌单菌落于40mL液体LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/mL)中过夜培养(37 $^{\circ}$ C, 200r/min),在4 $^{\circ}$ C放置2~4h后回收细菌(4 $^{\circ}$ C、4000r/min离心10min),将所得细菌稀释到500mL液体LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/mL)中振荡培养(37 $^{\circ}$ C, 200r/min)至OD₆₀₀值为1.0,加IPTG(终浓度为0.5mmol/L)诱导5h后分离细菌(4 $^{\circ}$ C, 4000r/min离心10min)保存于-20 $^{\circ}$ C。以上表达条件均为筛选出的最佳表达条件。

1.2.3 重组蛋白的SDS-PAGE和Western印迹分析:含重组质粒的细菌表达产物经15% SDS-PAGE,用考马斯亮蓝染色后分析重组蛋白的分子大小和表达水平;另将经SDS-PAGE的重组蛋白转移至硝酸纤维素膜,然后依次用兔抗羊抑制素IgG、山羊抗兔IgG和链酶亲合素-辣根过氧化物酶(HRP)反应,经DAB显色后检测目的蛋白。

1.2.4 重组蛋白的纯化:将含重组质粒pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH和pR-6INH细菌的表达产物用8mol/L尿素在室温下裂解40~60min,12 000r/min离心20min后取上清液经50% Ni-NTA Agrose层析纯化,并收集蛋白样品作SDS-PAGE分析。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

将6种重组质粒的酶切产物在1.5%琼脂糖胶上电泳(图2),各重组质粒分别只切出一条与各自理论值相符的片段。结果表明,抑制素单体和各多聚体的重组质粒构建成功。将各多聚体重组质粒进行测序,结果进一步表明各多聚体基因维持了正确的阅读框架。表达质粒pRSET-A阅读框架内在目的基因克隆位点前有编码6个组氨酸的序列、编码10个氨基酸的T7 gene 10 leader、编码8个氨基酸的Anti-XpressTM Antibody Epitope和EK recognition sequence。单体pR-INH和多聚体pR-2INH、pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH、pR-6INH基因所编码的重组蛋白分别含85、125、165、205、245和285个氨基酸残基。

2.2 重组蛋白的表达鉴定与纯化

各表达产物的电泳结果(图3)表明:各重组质粒所表达的蛋白分子量大小比理论预计值稍大,并且各重组蛋白均以包涵体的形式存在。重组质粒pR-INH、pR-2INH、pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH和pR-6INH所表达重组蛋白的分子量理论值分别为9.36、13.67、17.97、22.28、26.60和30.91kD。电泳结果中,在20.1kD之前没有观察到单体和二聚体的特异性表达条带;而表达的三聚体、四聚体、五聚体和六聚体融合蛋白在所显示的分子量大小分别约为20、26、32和38kD。SDS-PAGE分析所得各重组蛋白的分子量大小均比理论值大,且随着重复片段数多增加一次,分子量即相应额外增加约2kD。电泳图谱分析表明,重组质粒pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH和pR-6INH所表达的重组蛋白分别占菌体蛋白的6%、6%、7%和8%。

Western印迹分析显示,各重组菌的表达产物均能与兔抗羊抑制素IgG产生特异性反应,在印迹膜(图4)上产生一

条特异性条带,且分子量的大小分别与在 SDS-PAGE 分析中所得的分子量大小一致;这进一步表明,各多聚体重组蛋白在各重组菌中均得到表达。

纯化所得重组蛋白的 15% SDS-PAGE 结果(图 5)表明,含重组质粒 pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH 和 pR-6INH 细菌的表达产物都能洗脱出一条纯化带,且分子量与以上结果相一致。

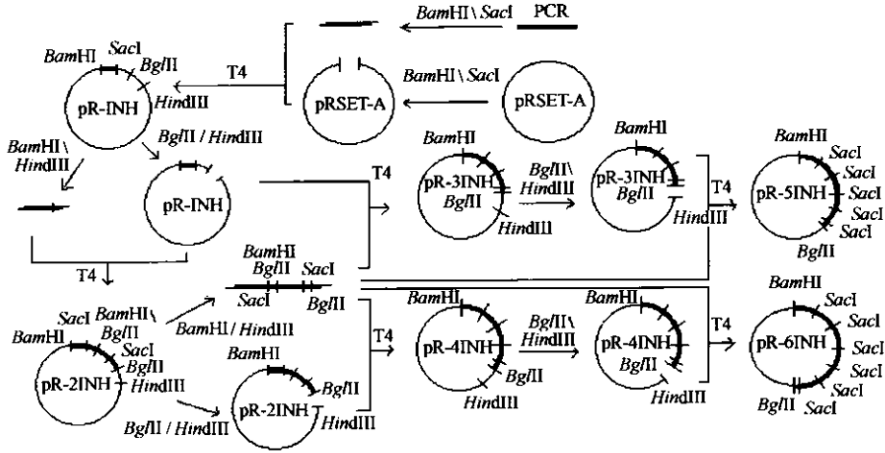


图 1 抑制素片段多聚体重组质粒构建流程图

Fig. 1 Flow chart of constructing inhibin repeat polymer containing plasmids

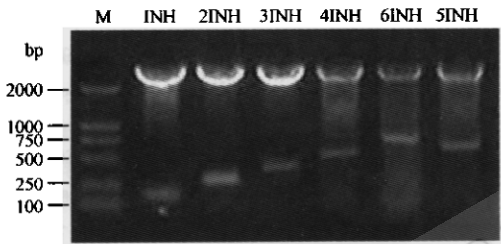


图 2 重组表达质粒酶切产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis graph of restriction enzyme digested recombinant expression plasmids

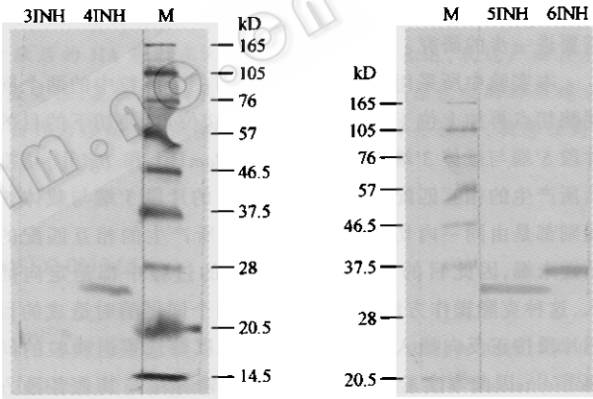


图 4 重组菌所表达融合蛋白的免疫印迹斑点

Fig. 4 Western blot of fusion proteins from recombinant bacteria

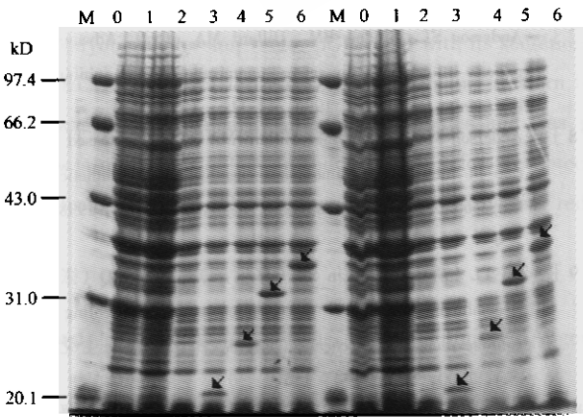


图 3 重组菌表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of expression products of recombinant bacteria
1 ~ 6 (left): whole bacterial lysate of pR-INH, pR-2INH, pR-3INH, 4INH, pR-5INH and pR-6INH; 1 ~ 6 (right): pellet of pR-INH, pR-2INH, pR-3INH, pR-4INH, pR-5INH and pR-6INH;
M: protein marker; 0: control; Arrows: recombinant protein.

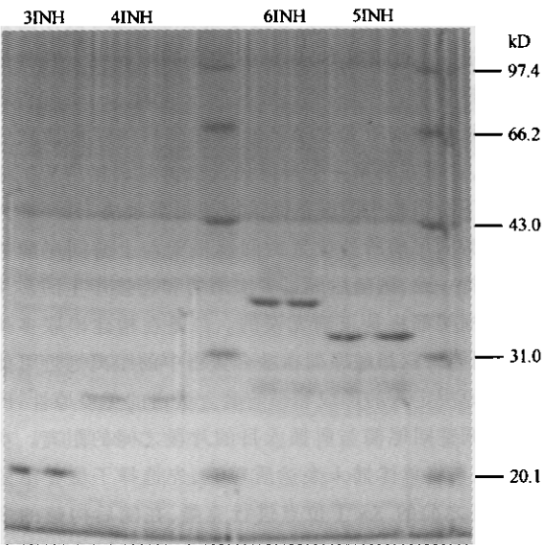


图 5 纯化所得重组蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE of purified recombinant proteins
3INH: pR-3INH; 4INH: pR-4INH; 5INH: pR-5INH; 6INH: pR-6INH; M: protein marker.

3 讨论

实验结果表明,目的基因 INH 已成功插入表达载体 pRSET-A 的 *Bam*H I \ *Sac* I 克隆位点构建出重组质粒 pR-INH,并在此基础上成功构建出二至六聚体重组质粒,且各基因的阅读框架都维持正确。重组质粒 pR-2INH、pR-3INH、pR-4INH、pR-5INH 和 pR-6INH 经 IPTG 诱导后都能在大肠杆菌中表达特异性蛋白。Western 印迹分析证明这些特异性表达的蛋白就是所期望的抑制素多聚体重组蛋白。

然而 SDS-PAGE、Western 印迹分析和层析纯化的分析结果均表明所表达的各特异性蛋白的分子量都大于理论值,而且分子量的增加是与片段的重复数目成正比,即每增加一个抑制素片段,重组蛋白的分子量除了按所插入的氨基酸残基数(约 4.3kD)增加外还额外增加 2kD 左右。虽然天然抑制素是糖蛋白激素,但本实验所构建的 4 种抑制素多聚体重组蛋白并不含有糖基化位点(序列 Asn-X-Ser/Thr, X 为除开脯氨酸和天冬氨酸外的其他氨基酸)^[9]。至于所使用的宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3)株是否会对其他氨基酸残基序列进行糖基化并导致所表达的重组蛋白的电泳迁移率发生改变,则还需要进一步的研究。

本实验中所采用的克隆技术,利用一个质粒中的两个同尾酶切点再加上位于下游的第三个酶切位点,使切下的目的片段 5'端与载体 3'端都具有同尾酶(*Bam*H I 和 *Bgl* II)切割后所产生的相互匹配的粘性末端,而目的片段 3'端与载体 5'端则都是由同一内切酶(*Hind* III)切割所产生的相互匹配的粘性末端,因此目的片段在插入载体的过程中都是定向插入,这种克隆操作方法克服了仅使用两个同尾酶时造成的目的片段按正反向插入载体而用 PCR 难以筛选重组质粒的问题^[10-11],因此本实验所用的多聚体构建方法与其他各种方法相比具有简单、快速和准确的优势。在本构建方法中,只需保证单体定向克隆成功,随后的多聚体的构建就非常简单,并且可以同时进行多个不同多聚体的构建,这样简化了步骤,节约了时间和成本,保证了构建的准确性。在具体的基因克隆操作中,另外还需注意的两个问题。一是在构建重组质粒和设计引物时要注意防止构建多聚体时可能发生的移码问题,这可在将第一个单体插入载体时调整用于扩增插入片段的下游引物中的碱基阅读框架得到解决,只要插入单体后的下游同尾酶所处位置的阅读框架与上游同尾酶的阅读框架保持一致,则随后经过多次酶切和连接产生的多聚体内的阅读框架都将是正确无误的。二是在构建串联多聚体时,考虑到同一氨基酸序列在融合蛋白中的距离远近可能会影响到抗原决定簇的形成和影响融合蛋白的免疫原性,因此可以考虑调整同尾酶与所插入目的片段之间的距离。本构建策略中,在将单体插入表达质粒时,先选择了位于下游同尾酶 *Bgl* II 之前的 *Sac* I 位点进行克隆,在随后构建的多聚体基因中,每插入一个片段都含有一 *Sac* I 位点,加上质粒中位于 *Sac* I 和 *Bgl* II 之间的碱基,将在所表达的融合蛋白中增加两个以上氨基酸,拉大了重复片段之间的距离。如果希

望缩小重复片段之间的距离,则合成下游引物时在下游同尾酶切位点序列之后再加一个质粒本来有的紧靠在下同尾酶切位点之后的另一个酶切位点,利用该酶切位点和上游同尾酶切位点将目的片段单体定向克隆入质粒,然后再利用上、下游用同尾酶构建多聚体,这样每一目的基因片段或所表达的氨基酸残基序列都能够紧密连接。另外可以通过分析各种多聚体融合蛋白的空间构象来估计所插入目的小肽的抗原性或免疫原性的强弱,并且依此调整目的片段之间的距离、氨基酸种类而最终确定引物设计和克隆操作的策略。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Burger H, Igarashi M. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *Endocrinol*, 1988, **122**:1701 - 1702
- [2] Ying SY. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinol Rev*, 1988, **9**:267 - 293
- [3] Wrathall JH, McLeod BJ, Glencross RG *et al.* Effects of active immunization against a synthetic peptide sequence of the inhibin α -subunit on plasma gonadotrophin concentrations, ovulation rate and lambing rate in ewes. *J Reprod Fert*, 1992, **95**:175 - 182
- [4] McLeod BJ, Hunter M G, Bleach EC *et al.* Preovulatory follicle development and luteal function in ewes immunized against a synthetic peptide sequence of the α subunit of bovine inhibin. *Journal of Endocrinology*, 1992, **133**:413 - 419
- [5] Bleach EC, Muttukrishna S, Cunningham FJ *et al.* Effect of inhibin immunization using different synthetic peptide fragments of the bovine α -subunit on plasma anti-inhibin titres, plasma FSH concentrations and the incidence of multiple ovulation in heifers. *Animal Reproduction Science*, 1996, **41**:1 - 12
- [6] Austin EJ, Mihum M, Evans AC *et al.* Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle1. *Biol Reprod*, 2001, **64**(3):839 - 848
- [7] Anderson ST, Bindon BM, Hillard MA *et al.* Advancement of puberty in ewe lambs by active immunization against inhibin early in life. *Anim Reprod Sci*, 1996, **44**:111 - 125
- [8] Anderson ST, Bindon BM, Hillard MA *et al.* Increased ovulation rate in Merino ewes immunized against small synthetic peptide fragments of the inhibin α -subunit. *Reprod Fertil Dev*, 1998, **10**:421 - 433
- [9] Hu YL (胡云龙), Lin SK (林世康), Zhang SQ (张双全). Recombinant protein in glycosylation and its effecting factors. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics* (中国生化药物杂志), 2000, **21**(3):154 - 156
- [10] Wang J (王健), Shen WY (沈卫英), Zhou QP (周清平) *et al.* Expression of the gene encoding the tetraploid of carboxyl-termina 137 peptides of β -hCG in *E. coli*. *Reproduction & Contraception* (生殖与避孕), 2000, **20**(3):137 - 141
- [11] Lin CT (林澄涛), Jiang YF (姜燕芳), Yin B (阴彬) *et al.* Construction of Malaria multivalent recombinant DNA vaccine with isocaudamer technique. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 1999, **15**(6):974 - 977