

囊尾蚴膜联蛋白 32 在大肠杆菌中的表达及纯化

郭瀛军 吴 丹 颜宏利 孙树汉*

(第二军医大学医学遗传学教研室 上海 200433)

摘 要 在已获得的囊尾蚴膜联蛋白(Annexin)32 cDNA 的基础上,以 PCR 的方法在 cDNA 两端加上酶切位点,插入原核表达载体 pJLA-503,热诱导表达后,外源蛋白大部分以可溶形式表达,表达量占菌体总蛋白的 35%。经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、DEAE 阴离子交换层析及 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析得到电泳单一条带,Western blot 及抗凝血实验证明表达产物是有生物活性的。

关键词 膜联蛋白,基因表达,分离纯化,大肠杆菌

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0553-04

膜联蛋白(Annexins)家族是 70 年代末被发现的一类新的钙结合蛋白。这一类蛋白广泛存在于各种动物细胞内,常常与质膜或内膜系统相联系。此家族包括多种成员,在结构和功能上具有相似性^[1]。Annexin32 是第二军医大学孙树汉教授从猪囊尾蚴 cDNA 文库中首次克隆到的一个囊尾蚴新基因^[2],其表达产物具有高效的免疫原性,作为疫苗免疫实验动物有较高的保护率^[3]。此外,Annexin32 蛋白疫苗还有诱导囊尾蚴细胞凋亡的作用^[4]。目前,其序列已在 GenBank 登录(BankIt 267326 AF147955)。分析表明,此 cDNA 序列具有 4 个膜联蛋白家族典型的保守序列,编码的蛋白质有很强的抗凝血活性。根据膜联蛋白亚家族的命名规律将其命名为 Annexin32,这是迄今为止在寄生虫中发现的少数几个膜联蛋白家族成员之一。为了深入研究 Annexin32 的结构和功能,我们将其 cDNA 插入原核表达载体,在大肠杆菌中进行表达研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌种: *E. coli* XL1-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lacF'* [*proA*⁺ *B*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15 Tn10(Tet^r)].

载体:pJLA-503^[5]为本实验室保存。

KPTT 凝血活酶试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 Annexin32 cDNA 片段的克隆:根据 Annexin32 cDNA 序列,设计了两条 PCR 引物。5' 引物: 5' CCATATG GCCTACTGTCGCTCCCTGGTTC3'; 3' 引物: 5' GCGGATCCTATTATGCAGGGCCGATGAGTTTCAAG3'。前者在编码 Annexin32 成熟蛋白基因的第一个密码子之前加入了一个 *Nde* I 酶切位点及 ATG 起始码。后者与 cDNA3' 端互补,并设计了一个 *Bam*HI 酶切位点。以目的基因质粒 pUC-Annexin32 为模板,进行 PCR 扩增。反应产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。回收和纯化 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接,命名为 pGEM-32。

1.2.2 测序及质粒构建:少量制备 pGEM-32 质粒,测序工作在全自动测序仪上进行。重组质粒的构建,大肠杆菌转化及克隆筛选:按 Sambrook^[6] 的方法进行。

1.2.3 菌株的诱导表达:菌株在含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,次日以 10% 量接种扩大培养,28 $^{\circ}$ C 继续培养 3~4h,当 A_{600} 约等于 0.6 时,快速变温至 42 $^{\circ}$ C,诱导表达 5h。

1.2.4 裂菌和硫酸铵分级沉淀:将 1L 诱导表达菌液离心收集菌体,用 STE(25% 蔗糖,10mmol/L Tris·HCl pH8.0,1mmol/L EDTA)洗涤 1 次。菌体重悬于 100mL STE 中,冰浴超声破菌,每次超声 30s 静置 30s,反复共 20 次。10 000r/min 离心 15min,取上清待用。在重组蛋白包含体超声后的上清液中逐步加

收稿日期:2001-03-06,修回日期:2001-06-25。

基金项目:国家高科技研究发展项目基金资助(101-06-05-04)。

* 通讯作者。Tel:86-21-25070241;Fax:86-21-25070296;E-mail:guo-yingjun@263.net

入所需体积的饱和硫酸铵至特定饱和度,并缓慢搅拌,控制在 2h 以内。10000r/min 离心后取上清重新定容后,再次加入饱和硫酸铵至更高的饱和度。如此,逐步将超声上清中的可溶性蛋白逐级沉淀。分级沉淀的蛋白产物经 SDS-PAGE 后确定最佳(目的蛋白纯度高且损失少)的沉淀盐浓度。实验过程中的蛋白定量参照 Bradford^[7]的方法进行。

1.2.5 重组蛋白的柱层析分离纯化:

(1)DEAE Sepharose FF 离子交换层析:经透析法除盐的分级沉淀样品以 20mmol/L pH8.0 的 Tris·HCl,0~1mol/L NaCl 梯度洗脱。

(2)Sephadex G-25 柱层析:以 20mmol/L Tris·HCl pH8.0 溶液平衡洗脱除盐,收集蛋白峰。

(3)Sephacryl S-200 HR:以 pH7.4 的 PBS 溶液平衡洗脱, A_{280} 检测,收集主峰。

1.2.6 Western 蛋白印迹检测 Annexin32: Annexin32 表达菌体的总蛋白经 8% SDS-PAGE 电泳后电转移至硝酸纤维素滤膜上,封闭后以 1:20 比例加入囊虫病病猪血清 37℃ 杂交 1h。再以 1:1000 的比例加入 HRP-鼠抗猪 IgG,37℃ 30min。最后加入显色液(9mL 的 0.01mol/L Tris·Cl pH7.6 溶液中溶解 6mg 的二氨基联苯胺,临用时加入 10 μ L30% H₂O₂),待显色后加入蒸馏水终止反应(避光)。

1.2.7 Annexin32 的抗凝血活性检测:采用白陶土激活的凝血酶原时间(Kaolin partial thromboplastin time, KPTT)法检测。取 100 μ L 的 KPTT 凝血活酶试剂,加入 100 μ L 不同浓度的 Annexin32 重组蛋白待测样品(将蛋白以 PBS 稀释,配制成 0mg/L, 30mg/L, 50mg/L 及 70mg/L),37℃ 温育 10min,加入 100 μ L 的参比血浆,37℃ 温育 3min。再加入 100 μ L 25mol/L 的 CaCl₂ 溶液,测反应物凝固时间。

2 结 果

2.1 Annexin32 表达质粒的构建

取 pGEM-32 单克隆测序后,用 *Nde*I/*Bam*HI 双酶切 pGEM-32 质粒回收小片段,将之与同样酶切的原核表达载体 pJLA-503 载体大片段相连接,转化 XL1-Blue 菌株,获得阳性重组子 pJLA-32。此重组子以 *Nde*I/*Bam*HI 酶切后,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离可见约 1kb 的小片段和 5kb 的大片段,表明 pJLA-32 重组子构建正确(见图 1)。

2.2 表达质粒 pJLA-32 在大肠杆菌中的高效表达

pJLA-32 表达质粒的启动子为温度敏感的 P_R、

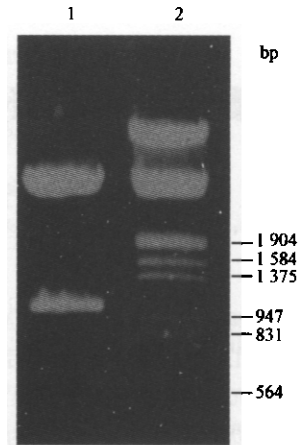


图 1 重组子 pJLA-32 的酶切分析

Fig.1 Restriction analysis of pJLA-32

1. pJLA-32 restricted with *Nde*I and *Bam*HI;
2. Markers(λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III)

P_L 启动子,以 42℃ 热诱导表达 5h。诱导表达后的产物进行 SDS-PAGE 分析,在电泳图谱上出现一条约 32kD 新带(见图 2)。光密度扫描结果显示,32kD 带占菌体总蛋白的 35%。

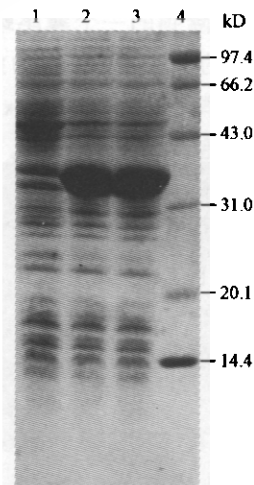


图 2 重组质粒 pJLA-32 表达产物的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of recombinant pJLA-32 expressed in *E. coli*

1. Induced total cell lysate of XL1-Blue/pJLA-503;
2,3. Induced total cell lysate of XL1-Blue/pJLA-32;
4. Protein molecular weight markers

2.3 可溶性 Annexin32 蛋白的初步纯化

Annexin32 表达菌体的超声上清,分两组以 (NH₄)₂SO₄ 浓度梯度进行分级沉淀。第一组梯度为:0~40%;40%~60%;60%~80%,第二组梯度为 0~45%;45%~70%。结果显示(图 3),第二组 45%~70% 梯度情况下,Annexin32 蛋白纯度及得率都较高。

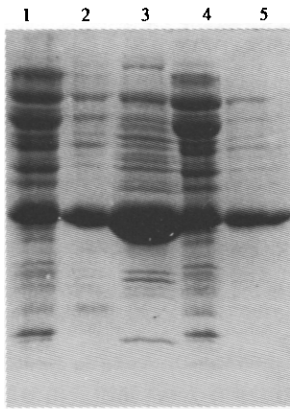


图3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of the products from $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stepwise precipitation

1.0 ~ 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2.40% ~ 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3.60% ~ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4.0 ~ 45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5.45% ~ 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2.4 Annexin32 重组蛋白的柱纯化

溶解 45% ~ 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后,以 DEAE Sepharose FF 梯度洗脱,收集主峰即为目的蛋白峰。将目的蛋白峰透析除盐并浓缩后用 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析进一步纯化,主峰经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示为一约 32kD 的单一一条带,蛋白浓度测定表明 Annexin32 最终得率约为 25mg/L。扫描结果显示其纯度 > 90% (SDS 电泳结果见图 4)。

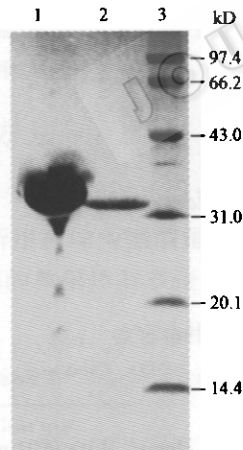


图4 Annexin32 层析产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the Annexin32 during chromatography

1 ~ 2. Protein fraction separated with DEAE-Sepharose and Sephacryl S-200 respectively; 3. Molecular weight standards

2.5 Western 印迹检测

Annexin32 表达菌体的总蛋白经囊尾蚴病病猪血清检测后于 32kD 相应位置处出现免疫印迹条带,表明重组的 Annexin32 保留了天然 Annexin32 分子的抗原性。结果见图 5。

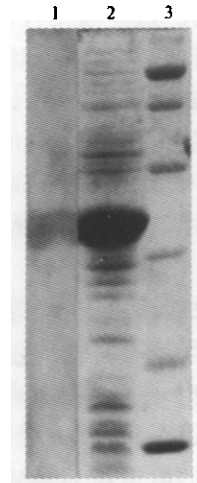


图5 重组 Annexin32 的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of the expressed recombinant Annexin32

1. The result of Western blotting; 2. Induced total cell lysate of XL1-Blue/pJLA-32; 3. Molecular weight standards

2.6 重组 Annexin32 的抗凝血活性检测

活性检测结果显示,当待测样品中 Annexin32 的浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,凝血时间分别为 41s、62s、120s 及 140s (见图 6)。这表明大肠杆菌表达的膜联蛋白 Annexin32 能显著延长血浆凝固时间,具有明显的抗凝血活性。

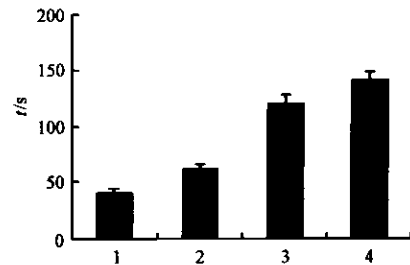


图6 重组 Annexin32 的抗凝血活性

Fig.6 Anticoagulant activity of expressed recombinant Annexin32

1. PBS control; 2 ~ 4. 30mg/L, 50mg/L and 70mg/L recombinant Annexin32 respectively

3 讨论

综述以上结果,我们实现了 Annexin32 在大肠杆菌中的高效表达并纯化了具有免疫及生物学活性的 Annexin32。国外学者已从不同的动物组织细胞中分离纯化了 Annexin 家族的多种成员,大多数成员在分子量和等电点方面有相似性:单链分子量 30 ~ 40kD,等电点为酸性^[1]。本研究中原核表达的 Annexin32 分子量约为 32kD,且能在低离子强度、微碱性的 pH 缓冲体系中与阴离子交换介质结合,表明

这是一种酸性蛋白。这些理化特性是与 Annexin 家族成员相符的。目前,文献报道膜联蛋白家族中以 Annexin V 的抗凝血活性较强^[8,9],极有可能作为一种新型溶栓药物应用于临床。Annexin32 则是从猪囊尾蚴 cDNA 文库中首次克隆到的一个膜联蛋白亚家族成员,我们在体外实验中发现 Annexin32 也具有抗凝血活性。

通常在原核表达系统中,外源蛋白的表达水平较高时,往往容易形成不溶性的包涵体。尤其是在 42℃ 热诱导的条件下情况更是如此。体外表达所用的原核表达载体 pJLA-503 含 λ 噬菌体 P_RP_L 启动子(受控于温度敏感的阻遏物 cIts857),就是属于热诱导型原核表达载体^[7]。而本实验中外源蛋白的表达量虽然占细菌总蛋白的 35%,大部分却以可溶形式表达,这可能与 Annexin 家族共有的蛋白质性质有关。

天然 Annexin 分子具有多种生物学功能^[10],本研究结果表明,大肠杆菌表达的重组 Annexin32 分子仍具有免疫学活性及抗凝血活性。同时,由于已有的研究表明 Annexin32 蛋白也是一种有效的猪囊虫病保护性抗原^[3],作为疫苗接种实验动物后能起到很好的免疫保护作用。本工作也为进一步进行囊虫病疫苗的研究创造了条件。

REFERENCES(参考文献)

[1] Morgan R O, Pilar Fernandez M. Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common

ancestor. *J Mol Evol*, 1997, 44: (2): 178 ~ 188

- [2] SUN S H(孙树汉), WANG J X(王俊霞), CHEN R W(陈蕊雯) *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding immunodiagnostic antigens of cysticercosis. *Chinese Journal of parasitology and parasitic diseases* (中国寄生虫与寄生虫病杂志), 1997, 15(1): 15 ~ 20
- [3] WU D(吴丹), GUO Y J(郭瀛军), LIN Y(林懿) *et al.* Protective immunity induced by DNA vaccine of *Cysticercus cellulosae* antigen. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2000, 21(6): 508 ~ 510
- [4] SUN S H(孙树汉), GUO Y J(郭瀛军), CHEN R W(陈蕊雯). Apoptosis of *Cysticercus cellulosae* induced by immunotherapy with DNA vaccine pcDNA3- γ c1. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2000, 21(7): 1046 ~ 1047
- [5] Schauder B, Blöcker H, Frank R *et al.* Inducible Expression Vectors Incorporating the *Escherichia coli* aptE Translational Initiation Region. *Gene*, 1987, 52: 279 ~ 283
- [6] Sambrook J, Fritsch e F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 ~ 254
- [8] Iwasaki A, Suda M, Nakao H *et al.* Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: a new lipocortin-like protein. *J Biochem*, 1987, 102: 1261 ~ 1673
- [9] SUN J X(孙建新), SHEN X C(沈小川), WU X F(吴祥甫). Cloning and expression of annexin V cDNA in *E. coli*. *Acta Biochimica et biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1999, 31(2): 163 ~ 166
- [10] Raynal P, Poilard H B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1197: 63 ~ 93

High Level Expression and Purification of *Cysticercosis* cellulose Annexin32 in *Escherichia coli*

GUO Ying-Jun WU Dan YAN Hong-Li SUN Shu-Han

(Department of Medical Genetics, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract In previous work, the cDNA encoding *Cysticercus cellulosae* annexin32 has been cloned. With PCR method, two different restriction Sites were added to each end of the cDNA respectively. Then, the cDNA was inserted into prokaryotic expression vector pJLA-503. After inducing, most foreign protein was expressed in soluble form, which was up to 35% of the total protein of the bacteria. Subsequently, the recombinant Annexin32 was purified with (NH₄)₂SO₄ stepwise precipitation, DEAE-Sepharose FF and Sephacryl S-200 HR chromatography. The final pure protein can be shown as a single band in SDS-PAGE, and the biological activity was verified by Western blot and anticoagulation activity assay.

Key words Annexin, gene expression, isolation and purification, *E. coli*

Received: March 10, 2001

This work was supported by Grant from Hi-Tech Research and Development Program of China(101-06-05-05).

* Corresponding author. Tel: 86-21-25070241; Fax: 86-21-25070296; E-mail: guo-yingjun@263.net