小鼠热休克蛋白 gp96 羧基端片段的克隆、表达及纯化

韩金乐[1,2] 李宏涛[1] 李集林[2] 田 波[1*]

[1](中国科学院微生物研究所,北京 100080)

[2](哈尔滨师范大学,哈尔滨 150080)

摘 要 热休克蛋白(Heat shock protein)gp96(Grp94)是近年来新发现的一类糖蛋白,除了分子伴侣的功能外,现有越来越多的文献报道了它在先天性免疫和获得性免疫中的重要作用。gp96 可以促进抗原呈递细胞的成熟以及细胞因子的分泌。热休克蛋白抗原肽复合体可以引起特异性的细胞毒 T 淋巴细胞效应,应用这个特点可以设计抗病毒及抗肿瘤药物[1]。但是 gp96 全长分子量大,蛋白在大肠杆菌中表达量低,不稳定,难纯化。组织提取的 gp96 又受组织来源和样品量的限制。对 gp96 的结构和功能的研究带来困难。克隆并表达了小鼠热休克蛋白 gp96 的羧基端 560-751aa 约四分之一长的功能片段,该段包含 gp96 的一个肽结合区和二聚化位点[2]。将该功能片段在大肠杆菌中进行融合表达,纯化后将融合的片段切掉,并对目的片段进行了分析,结果表明该段可能是形成二聚体密切相关的片段,为进一步研究其结构和功能打下基础。

关键词 热休克蛋白,gp96,融合表达

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)04-0619-04

在热休克蛋白家族中,gp96 被发现能结合抗原肽,具有抗原呈递功能,为肿瘤和病毒性感染疾病的治疗提供了新的思路。肿瘤细胞表面表达的 gp96 可以活化树突状细胞(DC),导致 DC 细胞分泌前炎症因子、趋化因子,促进 MHC Ⅰ类和 MHC Ⅱ类分子以及共刺激因子的表达。从而沟通了天然性和获得性免疫系统[3]。从肿瘤细胞或病毒感染的细胞中提取的 gp96 已经被证明能够引发肿瘤特异性或病毒特异性免疫反应[4-7]。gp96 携带抗原肽表位参与 MHC-Ⅰ类抗原呈递途径。这种结合的肽段可以是自身的组分,也可以是突变了的蛋白或者感染的病毒等合成的蛋白[8]。Blachere 等报道,gp96-多肽复合物也可以进行体外组装,而且它所引发的免疫反应的机制同体内产生的复合物在免疫原性上是一致的,因此体外组装合成新型的治疗肿瘤和病毒感染疾病的疫苗成为可能。这类新型疫苗可避免将传染性或其他病毒性分子带给生物体的潜在危险,而且又避免了因多种未知肽混合物注入体内引起的自身免疫性疾病的可能性。这就需要大量的 gp96 为原料。

组织提取的 gp96 受组织来源和样品量的限制,而在大肠杆菌中表达,由于 gp96 全长分子量大,蛋白表达量低,不稳定,难纯化。不利于对其进行深入的研究和应用。gp96 由于分子较大,结构解析至今也没有得到。而有研究表明 gp96 的不同的结构域与其功能密切相关[2],所以对其进行片段的表达成为近年来学者们的焦点。本实验研究利用 GST 纯化系统表达并纯化了小鼠热休克蛋白 gp96 的羧基端 560-751aa 约四分之一长的功能片段,Linderoth NA[2] 等证明了我们克隆的片段包含有蛋白的肽结合结构域。但对于该段的结构解析和免疫功能还没有报道。我们得到的蛋白片段分子量小,利于结构的解析,而且又包含肽结合结构域,可以对该片段进行进一步的免疫功能的研究,可以考虑用片段代替难获得的全长蛋白发挥作用。我们得到高纯度的重组蛋白,并对目的片段能否形成聚体结构进行了分析,为进一步研究其结构和功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:GST 融合表达载体 pGEX-6p-1 由牛津大学高福博士惠赠。大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)本室保存。GST 融合的鼻病毒 3C 蛋白酶(以下简称 GST-3C,与 PreScission™蛋白酶识别相同的氨基酸序列)由 Hudson K 和 Heath J 博士惠赠。鼠的 gp96 全长基因是由 Srivastava 教授惠赠。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司。诱导剂 IPTG 购自 Promega 公

收稿日期:2003-12-30,修回日期:2004-04-12。

基金项目:国家 973 计划免疫项目基金资助(No.2001CB510001)。

* 通讯作者。Tel:86-10-62622758;Fax:86-10-62622101;E-mail:TienPo@sun.im.ac.cn

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

司。羊抗兔 GST 单克隆抗体由武汉大学现代病毒研究中心惠赠。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建：根据 GenBank(gi:6755862)中鼠 GP96 全长基因序列，设计引物，PCR 扩增 C 末端 560-751aa 的肽段，引物设计中两端分别加入酶切位点 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ待克隆之用。以鼠的 gp96 全长基因为模板扩增目的片段。PCR 产物用凝胶回收试剂盒回收。分别将 PCR 回收产物与 PGEX-6P-1 载体用 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切，将酶切后的目的基因和载体按 4:1 比例用 T4 连接酶 16℃连接过夜。连接产物转化 DH5α 菌株，用菌落快速鉴定法和双酶切法初步鉴定阳性克隆。所得阳性克隆最后经 DNA 测序，序列完全正确，重组质粒命名为 PGEX-M96q。根据 DNAstar 软件设计引物：上游引物 GGC GGA TCC AAG GGC TAT GAA GTC ATT；下游引物 CGC CTC GAG TCA CAA TGT TTA AAC TGA GGC。

1.2.2 融合蛋白的表达，纯化：将 DNA 测序正确的重组质粒 pGEX-M96q 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，从平板上挑取单菌落接入含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 2×YT(胰蛋白胨 16 g，酵母提取物 10 g，氯化钠 5 g，水 1000 mL)培养基活化。将适量活化液接入 2×YT 培养基进行大规模培养，在 37℃条件下培养至 OD_{600} 值 0.6～1.0 时加入 0.1 mmol/L 的 IPTG，由于表达产物容易形成包涵体，所以进行了低温诱导，20℃诱导 8h 后收集菌体。

菌体用适量 PBS 缓冲液(140 mmol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，10 mmol/L Na_2HPO_4，1.8 mmol/L KH_2PO_4，pH 7.3)重悬，在冰浴条件下超声破碎 200W 功率下超声 4s，停 6s，99 次 3 个循环后，4℃下离心(12 000 r/min)，20 min。收集离心后的上清在 4℃恒温下流经平衡过的 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱，挂在柱上的融合蛋白用还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液(10 mmol/L reduced glutathione，50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0)洗脱。

1.2.3 融合蛋白的酶切：洗脱液用超滤浓缩法更换成酶切缓冲体系(50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.0；150 mmol/L NaCl；1 mmol/L DTT；1 mmol/L EDTA，pH 8.0)加入过量 GST-3C 蛋白酶 4℃酶切 16 h；酶切产物再换成 PBS 缓冲液体系，再用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱除去酶切下的 GST 和 GST-3C 蛋白酶，收集穿透液得到的为 PGEX-M96q 蛋白。

1.2.4 酶切后目的蛋白进一步纯化和分子量的确定：将穿透液浓缩，用 AKTA explorer 过 Super200 分子筛进一步分离纯化。从出峰的位置来初步确定分子量的大小。

1.2.5 融合蛋白质 Western 鉴定：目的蛋白与 GST 的融合蛋白、酶切后的目的蛋白、GST 对照经 SDS-PAGE 电泳后，用电转仪转 2h 转至醋酸纤维素膜上，移后的膜用 5%的脱脂牛奶封闭 3h 后用一抗(羊抗 GST 单克隆抗体，体积比 1:2000)室温反应 2h 后，洗膜 3 次，二抗(兔抗羊 IgG，体积比 1:5000)室温反应 1h 后，洗膜 3 次，加碱性磷酸酶作用 1h，用 BCLP/NBT 显色体系显色。

2 结果

2.1 PGEX-M96q 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

将测序正确的重组质粒 PGEX-M96q 转化大肠杆菌 BL21(DE3)中表达，分别将诱导前，诱导后，超声破碎后上清，沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明，融合蛋白的表达量很大，约占总菌蛋白的 35%。虽然表达的蛋白多数以包涵体的形式存在，约占总蛋白的 90%，但上清中也有一定量的蛋白，约占总蛋白的 10%(图 1)。可对上清蛋白进一步纯化。

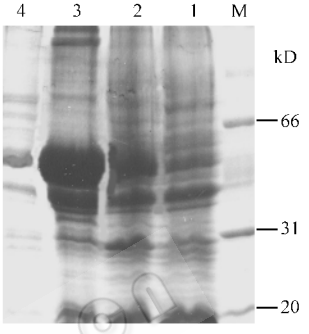

图 1 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

Fig.1 Expression of PGEX-M96q fusion protein in *E. coli* BL21(DE3)

1: the whole bacterial proteins before induction; 2: the whole bacterial proteins after induction; 3: precipitate after ultrasonication; 4: supernatant after ultrasonication

2.2 融合蛋白亲和层析纯化及酶切

收集大肠杆菌超声破碎后上清，通过 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱，得到较纯的融合蛋白。将得到的融合蛋白经 GST-3C 酶切后，切下一段约 23kD 目的蛋白和 GST 蛋白(分子量约 26kD)。酶切后混合液反复过 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱去掉 GST 蛋白。得到较纯的目的蛋白(图 2)。

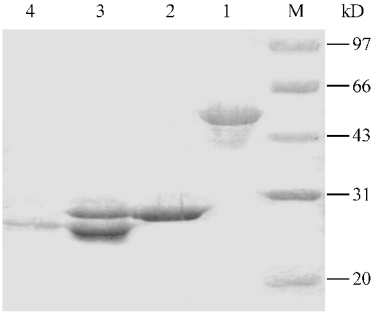

图 2 融合蛋白亲和层析纯化

Fig.2 Fractions collected from affinity chromatography

1: PGEX-M96q fusion protein; 2: GST; 3: protein after enzyme-cutting; 4: purified target protein

2.3 分子筛分离纯化蛋白

由于该蛋白片段含有 gp96 二聚化位点，而且根据文献报道 GP96 可以形成二聚体甚至更高的结构[15]，所以选用分离范围较高的分子筛 Superdex 200 确定其蛋白自然状态下的分子量，同时进一步纯化目的蛋白。目的蛋白分子筛的出峰

©中国科学院微生物研究所 版权所有 http://journals.im.ac.cn

位置和 2 个已知分子量的蛋白(66kD 和 14.2kD)的出峰位置比较,可得出目的蛋白的分子量为 50kD 左右,可能多数是以二聚体的形式存在(图 3)。

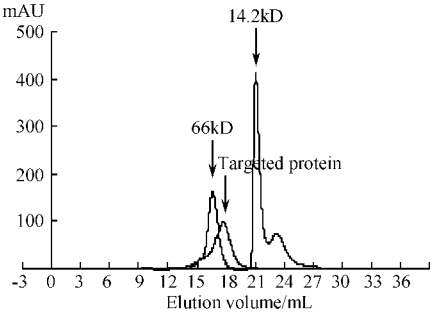

图 3　分子筛 superdex200 分离纯化目的蛋白

Fig.3　Gel filtration analysis of protein

The elution volume of targeted protein locals in between 16mL and 22mL corresponding to the proteins molecular weight are 66kD and 14.2kD respectively suggested the target protein existed in polymeric formation

2.4　融合蛋白的 Western 鉴定

用 GST 单克隆抗体 Western 的方法检测融合 GST 的目的蛋白,用羊抗兔 GST 单克隆抗体 Western 杂交显色后,融合 GST 的目的蛋白和单独的 GST 都有明显印记,而切下的目的蛋白没有,说明融合 GST 目的蛋白在大肠杆菌中表达,酶切后的目的蛋白不显色,说明已经切除 GST(图 4)。在 SDS-PAGE 电泳分析中,由于 2 个蛋白只差 3kD,而且是 10% 的小浓度胶,所以带的大小没有明显的差异,但是 Western 分析鉴定了两个蛋白。同时从 Western 结果可以看出表达的融合蛋白有降解。

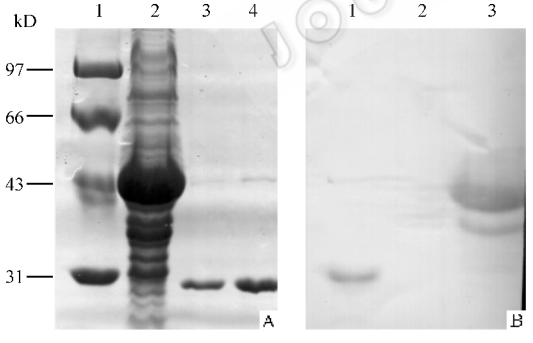

图 4　A SDS-PAGE 电泳 ;B 融合 GST 的目的蛋白的 Western 鉴定

Fig.4　A. SDS-PAGE Analysis

1 :marker ;2 :GST fused target protein ;

3 :GST ;4 :GST cleaved target protein

B. Identification of the GST fused target protein by Western blot

1 :GST ;

2 :GST cleaved target protein ;

3 :GST fused target protein

3　讨论

1986 年,Srivastava 在寻找肿瘤特异抗原的时候,发现并鉴定热休克蛋白 gp96[8]。在真核细胞的内质网中存在大量 gp96,同其他热休克蛋白一样在热激、糖饥饿、感染、癌变等情况下表达量明显提高。近年来 gp96 结构和功能得到了广泛的研究。其中引人注目的是 gp96 在天然免疫和特异免疫中的作用。GP96 可以结合抗原肽,并通过受体介导的细胞内吞作用参与抗原呈递。GP96 可以形成二聚体甚至更高的结构[9-11],疏水作用能够加速二聚化,并且导致两个 GP96 分子尾尾相连的结构。氧化情况下,GP96 通过两个单体 117 位的 CYS 形成一个二硫键桥从而更加稳定。

大肠杆菌表达蛋白,表达量高,周期短,操作方便,容易获得,是表达蛋白首选的生物学工具。我们要表达的蛋白是糖蛋白,大肠杆菌表达的蛋白不糖基化,所以对其功能的影响我们还在进一步的研究中。

本研究构建了含 gp96 的羧基端 560aa-751aa 的 GST 融合表达质粒,该质粒在大肠杆菌 BL21 中获得了高表达,但表达的蛋白多数以包涵体形式存在,在低温诱导下蛋白在上清中表达有一定的提高。应用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析纯化了该片段,经反复应用亲和层析柱可去掉污染的少量 GST 蛋白。由于本实验表达的片段不包含有抗体结合位点,所以我们用 GST 的单克隆抗体来鉴定融合蛋白的表达。分子筛结果表明了该片段可能是以二聚体的形式存在,它可能与 gp96 的二聚化有关,具体的聚体结构及其在功能上与全长的差异还在继续研究中。

gp96 羧基端是蛋白二聚化位点,天然的 gp96 是以聚体的形式存在的。该段又是抗原结合的重要部位,对该片段的进一步研究有助于更多的了解 gp96 的结构和功能特性。如果该段的免疫功能可以取代全长,将会是对 gp96 研究的一大突破。

REFERENCES(参考文献)

[1] Meng SD(孟颂东), Gao F(高福), Tien P (田波). Role of heat shock protein-peptide complex on tumor and infections diseases immunity. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(4): 425 - 428

[2] Linderoth NA, Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J Biol Chem*, 2000, **275**(8): 5472 - 5477

[3] Dai J, Liu B, Caudill MM *et al*. Cell surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory. *Cancer Immun*, 2003, **3**: 1

[4] Srivastava PK, Udono H, Blachere NE *et al*. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processingand CTL priming. *Immunogenetics*, 1994, **39**(2): 93 - 98

[5] Roman E, Moreno C. Synthetic peptides non-covalently bound to bacterial hsp 70 elicit peptide-specific T-cell responses *in vivo*. *Immunology*, 1996, **88**(4): 487 - 492

[6] Ciupitu AM, Petersson M, O'Donnell CL *et al*. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1998, **187**(5): 685 - 691

[7] Tamura Y, Peng P, Liu K *et al*. Immunotherapy of tumors with auto-

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

logous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 1997, **278**(5335): 117 – 120

[8] Ullrich SJ, Robinson EA, Law LW *et al*. A mouse tumor specific transplantation antigen is a heat shock regulated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 3121 – 3131

[9] Wearsch PA, Nicchitta CV. Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain. *Biochemistry*, 1996, **35**(51): 16760 – 167699

[10] Wearsch PA, Nicchitta CV. Purification and partial molecular characterization of GRP94, an ER residentchaperone. *Protein Expr Purif*, 1996, **7**(1): 114 – 121

[11] Yue PB(岳培彬). The research progress in anti cancer effects of heat shock protein gp96. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy* (**中国肿瘤生物治疗杂志**), 2001, **8** (3): 225 – 227

Cloning, Expression and Purification of the C-terminal Section of Murine Heat Shock Protein gp96

HAN Jin-Le[2] LI Hong-Tao[1] LI Ji-Lin[2] TIEN Po[1]*

[1] (*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

[2] (*Harbin normal university, Harbin* 150080, *China*)

Abstract Heat shock protein gp96 is a glycoprotein which was found several years ago. Besides its function as a molecular chaperone, it is also reported to play important roles both in innate immunity and adaptive immunity. Gp96 can stimulate the maturation of antigen presenting cells (especially dendritic cells) and the secretion of cytokines. Gp96 and its associated peptides could stimulate peptide specific cytotoxic T lymphocyte reaction (CTL), which was very promising in the designing of anti-virus and anti-tumor vaccines. However the expression level of whole length gp96 was relatively low in *E. coli* and the purity of gp96 are not very suitable for further study. We successfully cloned the carboxy terminal fragment (560aa-751aa) of murine gp96 into the pGEX-6p-1 vector and expressed in BL21 strain. This fragment contains the peptide binding domain and the dimerization domain. After purification, the recombinant fusion protein was cleaved with the PreScission Protease and analyzed by Gelfiltration. The results show that this fragment may be related to the dimerization of gp96 and make an foundation for further investigations of the protein.

Key words Heat shock protein, gp96, fusion expression

Received: 12-30-2003

This work was supported by Grant from Reseach and Development Programme of China(973)(No.2001CB510001).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62622758; Fax: 86-10-62622101; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

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