

人蛋白质二硫键异构酶 cDNA 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达*

高 音 杨志伟** 华振玲 高 虹 万 平 黎红晔

(首都师范大学生物系 北京 100037)

摘 要 从人胚胎肝组织中分离纯化出总 RNA, 在总 RNA 中提取 mRNA, 经逆转录得到 cDNA 第一条链, 并以之为模板和相应寡聚脱氧核苷酸为引物, 进行 PCR 合成人蛋白质二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase, PDI)cDNA 基因, 将所得 cDNA 克隆到质粒 pUC18 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 进行诱导表达筛选和活性筛选。将筛选的基因克隆到载体 pBV220 上, 在大肠杆菌细胞中表达, 产物以溶解形式在胞浆中表达。表达产物经硫酸铵分级沉淀和 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析分离, 产物的纯度与活性分别为 90%、1100u/g。

关键词 蛋白质二硫键异构酶, 基因克隆和表达

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0349-54

蛋白质二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase, PDI)是与肽链的折叠和成熟密切有关的多功能蛋白, 它催化蛋白质分子内天然二硫键的形成, 是已知的两个折叠酶中的一个^[1]。广泛存在于分泌蛋白质中的二硫键在维持蛋白质分子的稳定性和生物学活性中起重要作用。实验证实 PDI 分布于细胞内质网管腔内, 此处正是蛋白质进行翻译后加工的主要部位。由于它能有效地加速蛋白质肽链的正确折叠, 而应用在重组蛋白质的复性中^[2,3]。人体内 PDI 最初的多肽合成产物是 507 个氨基酸残基组成的酶原形式, 在分泌过程中切除 N 端 17 个氨基酸残基形成含 491 个氨基酸残基的成熟蛋白质。人 PDI 有两个二硫键异构酶的活性部位, 分别位于 36~39CGHC 氨基酸肽段和 380~383CGHC 氨基酸肽段, 定点突变结果说明 PDI 的两个二硫键异构酶的活性部位是相互独立的^[4]。此外有报道它同时具有分子伴侣的功能^[5]。有趣的是, 最近在体外发现 PDI 具有谷氨酰胺转移酶(Transglutaminase)活性^[9], 而实验已证实, PDI 的异构酶活性不是细胞生长所必需的^[10], 所以研究 PDI 的谷氨酰胺转移酶活性在体内的生理作用和分子结构基础, 例如分子的哪一个结构域, 哪一个氨基酸残基为谷氨酰胺转移酶活性所必需的, 将会是很有意义的。为进一步研究 PDI 的结构与功能关系以及应用 PDI 帮助重组蛋白质的复性, 建立高效体外表达体系是十分有意义的。国外 1991 年已有报道用 T7 RNA 聚合酶表达体系使鼠 PDI 以 30~80mg/L 在大肠杆菌中表达^[6], 国内 1997 年已有克隆酵母蛋白质二硫键异构酶基因的报道^[7], 我们利用 RT-PCR 方法合成了人 PDI cDNA 基因, 进行了人 PDI cDNA 基因的表达、产物分离纯化工作, 为 PDI 的研究与应用打下了基础。

* 北京市自然科学基金和北京市科技新星计划资助。

** 通讯联系人。

收稿日期:1998-03-03, 修回日期:1999-03-30。

1 材料和方法

1.1 胚肝组织、菌株及质粒

人胚肝组织是由北京妇产科医院提供的引产婴儿胚肝。

E. coli DH5 α 、质粒 pUC18 为本实验室保存。质粒 pBV220 为含有 P_RP_L 串联启动子的温度诱导表达载体。

1.2 工具酶与试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司,总 RNA 提取、mRNA 分离和 cDNA 合成试剂盒、T4 多核苷酸激酶、Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品, T7DNA 序列测定试剂盒为 Pharmacia 公司产品, α -³⁵S-dATP 为 Dupont 公司产品,其它试剂均为分析纯产品。

两个寡聚脱氧核苷酸:

P1(5'CGAATTCAAAAATGGACGCTCCCGAGGAGGAGGAC3')和

P2(5'CGGATCCTATTACAGTTCATCTTTCACAGCTTCTG3')

为中国科学院微生物研究技术室合成。

1.3 人胚肝总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

取 1g - 80℃ 冷冻的胚肝组织,冻融剪碎,采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取总 RNA。从总 RNA 中提取 mRNA 参照 Promega 公司产品 mRNA 分离试剂盒的说明书进行。

1.4 RT-PCR 法合成人蛋白质二硫键异构酶 cDNA 基因

在 oligo(dT)₁₅ 的引导下通过 mRNA 逆转录合成 cDNA 的第一条链,其反应体系为: 50mmol/L Tris-Cl (pH8.3), 50mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L DTT, 2 μ g mRNA, 4 种 dNTP(各 1mmol/L), 1 μ g oligo(dT)₁₅, 0.5mmol/L 亚精胺, 4mmol/L 焦磷酸钠, 40u RNase 抑制剂, 30 u AMV 逆转录酶, 总体积 25 μ L, 37℃ 反应 60min。取 5 μ L 反应产物作为模板进行 PCR 法合成 PDI cDNA, 反应体系为: 10mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L KCl, 2mmol/L MgCl₂, 10pmol 寡聚脱氧核苷酸 P1 和 P2, 4 种 dNTP(各 1mmol/L), 5u Taq 聚合酶, 总体积 100 μ L。反应条件为: 94℃ 变性 1min, 50℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 3min, 循环 25 次, 取 10 μ L 反应混合物进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 人蛋白质二硫键异构酶 cDNA 基因的克隆

克隆过程按图 1 所示进行。用 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收 PCR 产物中的约 1500bp 的 DNA 片段。纯化回收的 PCR 产物通过内切酶 *Eco*R I 与 *Bam*H I 双酶切再与质粒 pUC18 连接, 直接转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 在麦康凯培养基培养 20h。挑取白色单菌落进行 IPTG 诱导表达筛选、活性筛选和提取质粒鉴定。将筛选的基因克隆到载体 pBV220 上。

1.6 IPTG 诱导表达筛选及活性筛选

接种白色单菌落于 2mL LB 培养液(100 μ g/mL 氨苄青霉素), 30℃ 摇床培养过夜, 次日用新鲜的 LB 培养液稀释至 100 倍, 30℃ 剧烈摇菌培养至 OD_{600nm} 达 0.4~0.6, 然后升温到 37℃ 加入 IPTG(终浓度 0.4mmol/L)诱导表达 4h。取 100 μ L 进行 7000r/min 离心 4min, SDS-PAGE 进行表达水平定量。另取 1mL 菌 7000r/min 离心 4min, 菌体悬浮于

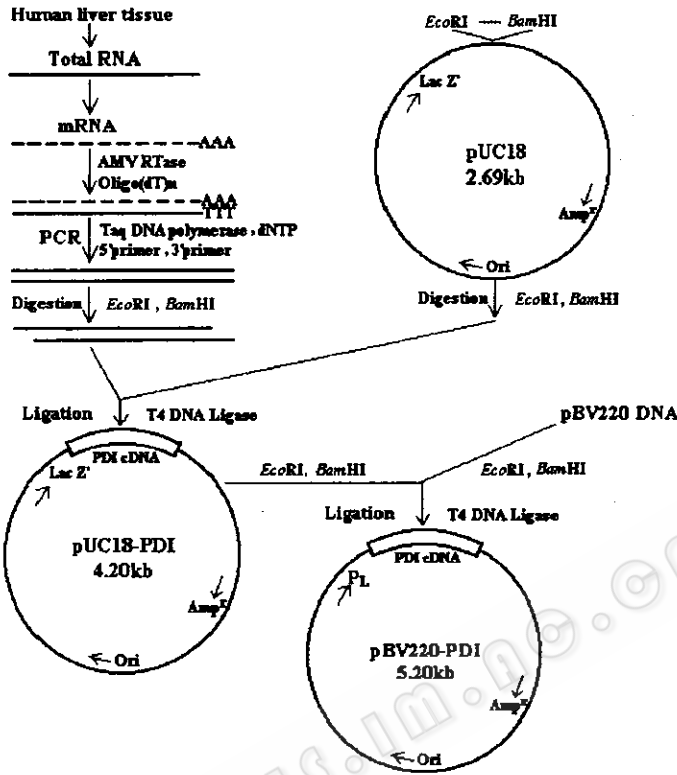


图 1 HPDI cDNA 基因的克隆

Fig. 1 Schematic illustration of hPDI cDNA cloning

100 μ L 裂解液(溶菌酶 100 μ g/mL; Tris-HCl pH8.0 50mmol/L; EDTA 2mmol/L) 混匀, 30 $^{\circ}$ C 裂解 15min, 取上清测定异构酶活力, 同时用含 pUC18 的 DH5 α 菌体作对照, 进行活力比较测定。

1.7 DNA 序列分析

采用 Sanger 双脱氧链终止法及正向和反向引物 分别从基因 5'端和 3'端测序。

1.8 异构酶活力测定

异构酶活力依据 PDI 催化二硫键错接的核糖核酸 酶(sRNase)成为含天然二硫键并恢复酶活性的核糖核 酸酶(RNase)。在体积为 3mL 的体系中(250 μ g RNA, 10 μ g sRNase, 2 μ mol/L DTT, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L Tris-HCl pH7.5)加入 PDI (以加入同量 BSA 为对照)后测定 A₂₆₀ 变化, 异构酶活力单位采用 Ibbetson^[8]定义。

1.9 温度诱导表达及 PDI 的纯化

挑取新鲜平板上单菌落接种于 50mL LB 培养基

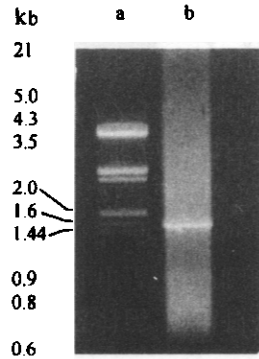


图 2 hPDI cDNA PCR 产物 的 0.7% 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 2 0.7% agarose gel electrophoresis of hPDI cDNA PCR product
a: Lambda DNA + EcoRI + HindIII
b: PCR product of hPDI cDNA

(含氨基青霉素 $100\mu\text{g}/\text{mL}$) 中 30°C 振荡培养过夜。次日用新鲜的 LB 培养液稀释至 100 倍, 30°C 培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 达 $0.4\sim 0.6$, 升温至 42°C , 诱导 $3.5\sim 4\text{h}$, 收获菌体。用 1/10 培养液体积的 TE ($1\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, $50\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl pH7.5) 混匀菌体进行超声破碎后, $7000\text{r}/\text{min}$ 离心 20min , 收集上清液。上清液用 55% 和 85% 饱和度硫酸铵分级分离, 85% 饱和度分离后的沉淀用 $30\text{mmol}/\text{L}$ pH6.0 的柠檬酸缓冲液溶解并透析。透析后的溶液上柱, 采用同种缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱 (26×40)。用含 $0\sim 0.7\text{mol}/\text{L}$ NaCl 的同种缓冲液线性洗脱, 收集具有异构酶活力的梯度洗脱峰, 对 PBS 缓冲液透析后得人蛋白质二硫键异构酶。

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR 法合成 hPDI cDNA 基因

PCR 反应终止后, 取 $10\mu\text{L}$ 反应混合物在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 可见一个大约 1.5kb 的特异性片段 (图 2), 与已报道的 hPDI cDNA 基因大小相同。

2.2 IPTG 诱导表达筛选及活性筛选克隆 hPDI cDNA 基因

在寡聚脱氧核苷酸引物 P1 设计中, 已使其中起始密码 ATG 和质粒 pUC18 中的 *LacZ'* 基因的读码框一致, 所以 PCR 产物通过内切酶 *EcoR* I 与 *Bam* H I 双酶切与质粒 pUC18 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 挑取白色单菌落培养, IPTG 诱导表达诱导 $3.5\sim 4\text{h}$ 。收获菌体分成 3 份; 第一份进行 SDS-PAGE 分析, 第二份按方法 1.6 和 1.8 进行异构酶活力分析, 第三份提取质粒鉴定。经过这三种分析数据综合, 我们选出 3 个克隆, 它们的蛋白产物分子量约为 57kD, 菌体裂解上清液的异构酶活力比以含质粒 pUC18 的 DH5 α 菌体裂解上清液作对照的上清液高 20 倍以上, 用内切酶 *EcoR* I 与 *Bam* H I 双酶切得到 1.5kb 的 DNA 片段。SDS-PAGE 如图 3, 琼脂糖电泳如图 4。

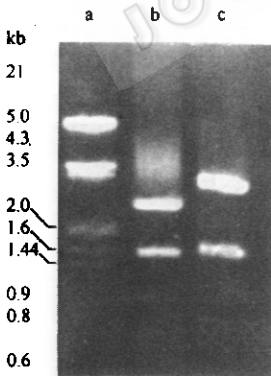


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmids

- a: Lambda DNA + *EcoR* I + *Hind* III
 b: Plasmid pUC18-PDI + *EcoR* I + *Bam* H I
 c: Plasmid pBV220-PDI + *EcoR* I + *Bam* H I

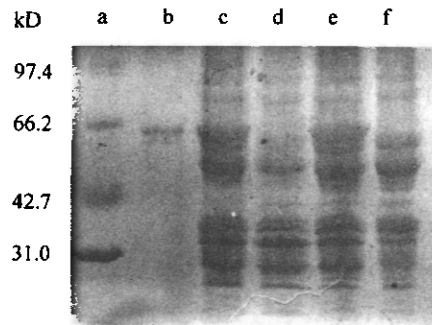


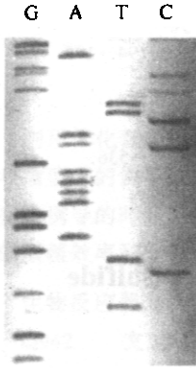
图 4 hPDI 表达和纯化产物的 15% SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 15% SDS-PAGE analysis of hPDI

- a: Low molecular weight markers for protein; b: Purified hPDI;
 c: Total cell proteins of DH5 α with plasmid pBV220-PDI;
 d: Total cell proteins of DH5 α with plasmid pBV220;
 e: Total cell proteins of DH5 α with plasmid pBV18-PDI;
 f: Total cell proteins of DH5 α with plasmid pBV18

2.3 hPDI cDNA 基因的序列分析

用 Sanger 双脱氧链终止法直接在重组质粒 pUC18-PDI 上分别用正向和反向引物从基因 5'端和 3'端两端进行各约 0.5kb 测序。利用 hPDI cDNA 中间的 *Pst* I 和 *Xho* I 内切酶位点,把 hPDI cDNA 中的 *Pst* I 至 *Xho* I 约 0.5kb 的 DNA 片段插入质粒 pUC18 中进行测序。所得的全部 hPDI cDNA 基因序列与文献报道一致,说明此基因比较保守,部分序列分析结果见图 5。



5'GGTGCTGAGGAAAAGC-
AACTTCGCGGAGG3'

图 5 hPDI cDNA 的部分序列分析结果
Fig.5 Partial sequences of hPDI cDNA

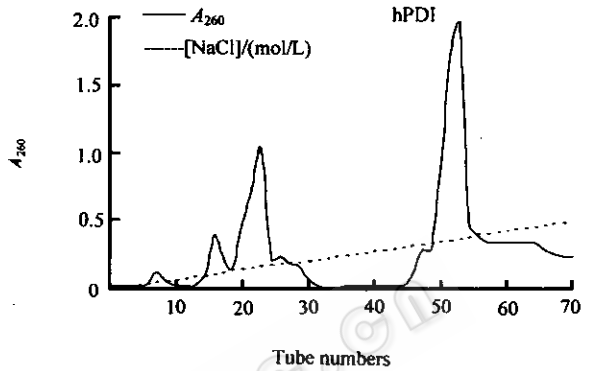


图 6 hPDI 的 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析图
Fig.6 DEAE-Sepharose Fast Flow chromatogram of hPDI

2.4 温度诱导表达及 PDI 的纯化

将筛选的基因克隆到载体 pBV220 上,在大肠杆菌细胞中进行温度诱导表达,实验发现产物以溶解形式在胞浆中表达,和国外报道用 T7 RNA 聚合酶表达体系,用 IPTG 诱导使鼠 PDI 以 30~80mg/L 在大肠杆菌胞浆中以溶解形式表达^[6]一致。摇瓶大量培养后收集菌体,5L 培养液得到湿菌 15g,按方法 1.9 进行超声破碎、硫酸铵分级分离和 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析,PDI 纯化各步骤中蛋白量、PDI 活性和收率见表 1。

表 1 PDI 纯化各步骤中蛋白量、PDI 活性和收率

Table 1 Summary of The amount and yield in steps used for the purification of recombinant protein disulfide isomerase

Step	Total protein/mg	PDI Total activity/u	Yield/%
Superlysate	2350	270	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	1660	240	89
DEAE-Sepharose Fast Flow Chromatography	170	190	70

收集活性峰,层析图谱如图 6,最后得 0.170g 纯度为 90% 的重组人 PDI,产物 SDS-PAGE 如图 3,异构酶活力为 1100u/g。

参 考 文 献

- [1] R. Noiva, W. J. Lennarz. *J. Biol. Chem*, 1992, **267**: 3553~3556.
- [2] J. Bunchner, U. Brinkmann, I. Pastan. *Bio/ Technology*, 1992, **10**: 682~685.
- [3] B. Tang, S. Zhang, K. Yang. *Biochem J.*, 1994, **301**: 17~20.
- [4] K. Vuori, R. Myllyla, T. Pihlajaniemi *et al.* *J. Biol. Chem*, 1992, **267**: 7211~7214.
- [5] C. Wang, C. Tsou. *FASEB J.*, 1993, **7**: 1515~1517.
- [6] H. F. Gilbert, M. L. Kruzel, M. M. Lyles *et al.* *Protein Expression Purif.*, 1991, **2**: 194~198.
- [7] 薛 扬, 唐南筠, 王琼庆等. 生物化学与生物物理学报, 1997, **29**: 69~75.
- [8] A. L. Ibbetson, R. B. Freedman. *Biochem J.*, 1976, **159**: 377~384.
- [9] R. Chandrashekar, N. Tsuji, T. Morales *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, **95**: 531~536.
- [10] M. Lamantia, W. J. Lannarz, *Cell*, 1993, **74**: 899~908.

Cloning and Expression of Human Protein Disulfide Isomerase cDNA in *Escherichia coli**

Gao Yin Yang Zhiwei Hua Zhenling Gao Hong Wan Ping Li Hongye
(*Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037*)

Abstract The mRNAs, isolated from the total RNAs of a Chinese fetal liver tissue, were reverse transcribed to the first strands of cDNA. The human protein disulfide isomerase (PDI) gene was amplified from the first strands of cDNA by PCR, and was inserted into plasmid pUC18 for screening and DNA sequencing. The PDI cDNA gene was subcloned into the expression vector pBV220, the expression product in *E. coli* DH5 α was a cytoplasmic soluble protein. Through ammonium fractional precipitation and DEAE-Sephrose Fast Flow Chromatography, the recombinant PDI was 90% purity and the isomerase activity was 1100u/g.

Key words Protein disulfide isomerase, gene cloning and expression

* Supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 5962006).