

[文章编号] 1007-3949(2002)10-05-0389-03

• 实验研究 •

人重组载脂蛋白 E 在大肠杆菌中的表达和纯化

国汉邦, 董军, 王抒

(卫生部北京医院老年医学研究所, 北京市 100730)

[关键词] 载脂蛋白 E; 重组蛋白; 表达; 纯化

[摘要] 用含有载脂蛋白 E cDNA 的 PET32a 原核表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3), 使之高效表达载脂蛋白 E-thioredoxin 融合蛋白。利用融合蛋白上的一段组氨酸序列, 用镍离子亲和层析柱进行分离纯化。由于在载脂蛋白 E 和 thioredoxin 之间存在凝血酶的识别位点, 用凝血酶消化后, 经 Sephacryl S-300 凝胶过滤得到人重组载脂蛋白 E。用此方法可以从 1 L 大肠杆菌培养液中纯化 20~30 mg 高纯度的各种载脂蛋白 E 异构体和非自然存在的突变体, 方法简便, 产量高, 纯度达 95% 以上。

[中图分类号] Q512

[文献标识码] A

Expression and Purification of Human Recombinant Apolipoprotein E from *Escherichia coli*

GUO Han Bang, DONG Jun, and WANG Shu

(Institute of Geriatrics, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[MeSH] Apolipoprotein E; Recombinant Protein; Expression; Purification

[ABSTRACT] **Aim** To separate and purify human recombinant apolipoprotein E (Apo E) from *Escherichia coli* strain BL21(DE3). **Methods** PET32a Apo E constructs were transformed into BL21 and protein expression was induced. Apo E-thioredoxin fusion protein was separated by Ni²⁺ affinity column. After digestion of thioredoxin by thrombin, Apo E was purified by Sephacryl S-300 gel filtration column. **Results** Apo E2, Apo E3 and Apo E4 were produced by this method, with high yield and high purity. **Conclusions** A new system for separation and purification of human recombinant Apo E was successfully established.

载脂蛋白 E 含有 299 个氨基酸(分子质量 34 kDa), 位于人体第 19 号染色体上。载脂蛋白 E 在脂代谢及动脉粥样硬化和老年痴呆中起着十分重要的作用^[1]。3 种主要异构体载脂蛋白 E2、E3 和 E4 之间的区别在于第 112 和 158 位上氨基酸的不同, 其中最常见异构体载脂蛋白 E3 在这两个位置上分别为半胱氨酸和精氨酸, 而载脂蛋白 E4 在这两个位置均为精氨酸, 载脂蛋白 E2 均为半胱氨酸^[2]。尽管 3 种异构体相互之间只有一个氨基酸的区别, 但它们却具有不同的生物学功能。载脂蛋白 E3 功能“正常”, E4 是动脉粥样硬化和老年痴呆的危险因素, E2 由于与低密度脂蛋白受体 (Low density lipoprotein receptor, LDL-R) 的结合能力低, 其纯合子携带者易于诱发 III 型高脂蛋白血症^[3]。载脂蛋白 E 各种异构体的分离纯化在其抗体制备、测定方法的建立以及结构功能研究等方面起着决定性的作用。由于载脂蛋白 E 的亲脂性强, 血清中含量低, 从血

清中分离纯化比较困难, 国内一直没有方便可靠的纯化方法; 另外要想得到单一的载脂蛋白 E2、E3 和 E4, 必须有纯合子的供血者, 而且无法得到结构和功能研究所需要的人类非自然存在的突变体, 所以重组载脂蛋白 E 的制备非常必要。我们用含 T7 强启动子的 PET32a 原核表达载体, 表达载脂蛋白 E-Trx (thioredoxin, Trx), 得到较高的产量。纯化后载脂蛋白 E 的氨基端增加了两个氨基酸残基(甘氨酸-丝氨酸), 但不影响载脂蛋白的结构和功能^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

Forma Scientific 公司细菌摇床, dr. Hielscher UP200s 超声仪, 日立公司 Himac CR 22 离心机, Edwards 冷冻干燥机, LKB 公司层析系统和聚丙烯酰胺凝胶电泳系统; 色谱填料 Chelating SepharoseTM 和 Sephacryl S-300 为 Amersham Pharmacia 产品; 磷脂 (dimyristoyl phosphatidylcholine, DMPC)、Isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG)、凝血酶等为 Sigma 公司产品。抗 LDL-R 的单克隆抗体 C7 为 Amersham

[收稿日期] 2002-05-27 [修回日期] 2002-09-28

[基金项目] 国家重点项目研究发展规划(G2000057007)资助。

[作者简介] 国汉邦, 男, 1961 年出生, 北京人, 主管技师。董军, 女, 1965 年出生, 副研究员。王抒, 女, 1961 年出生, 研究员。

产品;含载脂蛋白 E2、E3 和 E4 cDNA 的 PET32a 表达载体及与低密度脂蛋白结合的 LDL-R 活性片段为美国加州大学旧金山分校 Gladstone 研究所 Karl H. Weisgraber 教授惠赠。

1.2 重组载脂蛋白 E 的表达

将含载脂蛋白 E cDNA 的 PET32a 表达载体转化 T7 表达菌株 BL21(DE3), 取阳性克隆, 接种于 100 mL LB 培养基(含氨苄青霉素 100 mg/L)中, 37℃ 培养过夜。将细菌培养液 20 mL 加入到 2 L LB 培养基中, 37℃ 培养到 550 nm 吸光度为 0.5~0.6。在培养基中加入终浓度为 100 mg/L 的 IPTG 诱导蛋白表达, 培养物继续生长 2 h 后, 培养液于 4℃ 3 500 r/min 离心 20 min 回收细菌。

1.3 镍离子亲和层析柱纯化含组氨酸序列的载脂蛋白 E-Trx 融合蛋白

沉淀的细菌用结合缓冲液(5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 混悬后, 超声裂解细菌并离心去除不溶物。上清液通过镍离子亲和层析柱(直径 2 cm, 高 10 cm)并用结合缓冲液洗至基线平稳后, 用洗脱缓冲液(0.3 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱结合在柱子上的载脂蛋白 E-Trx 融合蛋白, 280 nm 检测。收集合并融合蛋白, 溶液对 20 mmol/L NH_4HCO_3 透析去除高浓度的咪唑。

1.4 磷脂脂质体的制备及载脂蛋白 E-Trx 融合蛋白的消化

将 DMPC 用 10 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 7.6) 混悬至浓度约 10~20 g/L, 超声处理 30 min 至溶液呈透明状, 离心去除不溶物。DMPC 与融合蛋白以 3.75:1 (DMPC/蛋白, W/W) 的比例混合并形成复合物。按 100:1 (蛋白/凝血酶, W/W) 的比例加入凝血酶, 室温反应 20 min 以消化除去 Trx, 释放载脂蛋白 E。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 鉴定反应完全后, 加入 β -巯基乙醇终止反应, 冻干蛋白溶液。冻干后的蛋白用冷的氯仿/甲醇(2:1, V/V) 充分混悬, 冰浴中放置 30 min 进行脱脂, 4℃ 2 000 r/min 离心 20 min, 弃上清。

1.5 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析柱分离纯化载脂蛋白 E

脱脂后的蛋白用 6 mol/L 盐酸胍溶液[含 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 0.01% 乙二胺四乙酸(EDTA), 1% β -巯基乙醇, pH 7.4] 复溶, 以 4 mol/L 盐酸胍溶液(含 0.1 mol/L Tris, 0.01% EDTA, 0.1% β -巯基乙醇, pH 7.4) 为流动相, Sephacryl S-300 凝胶过滤层析柱(直径 4.8 cm, 高 120 cm) 分离纯化

载脂蛋白 E。收集合并含有载脂蛋白 E 的组份并对 5 mmol/L NH_4HCO_3 透析。纯化的载脂蛋白 E 冻干后用 100 mmol/L NH_4HCO_3 复溶并储存于 -20℃。

1.6 固相吸附法测定载脂蛋白 E 与低密度脂蛋白受体的结合活性

将重组载脂蛋白 E2、E3、E4 和人血清中纯化的载脂蛋白 E3 用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(含 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4) 稀释后, 分别取 100 ng 加入到 96 孔板中, 4℃ 放置过夜。在以下的每一步骤之后, 都用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 清洗反应板。加入含 4% 牛血清白蛋白的 PBS 并室温放置 1 h 以封闭非特异性结合。将 LDL-R 活性片段用 PBS 稀释到约 10 $\mu\text{g/L}$, 加入到 96 孔板中与包被的载脂蛋白 E 在室温温育 2 h。加入抗 LDL-R 的单克隆抗体 C7 及辣根过氧化物标记的抗鼠 IgG, 邻苯二胺显色。测定共进行 8 次, 每次测 4 个平行孔。将血清载脂蛋白 E3 的 LDL-R 结合活性作为 100%, 计算重组载脂蛋白 E 的受体结合活性。

2 结果

2.1 Sephacryl S-300 凝胶过滤分离纯化载脂蛋白 E

与 DMPC 结合的载脂蛋白 E-Trx 融合蛋白用凝血酶消化并脱脂后, 溶于 6 mol/L 盐酸胍溶液, 加样在 Sephacryl S-300 凝胶层析柱上, 以 4 mol/L 盐酸胍溶液作为流动相进行洗脱, 流速 2 mL/min, 收集各组份, 见图 1(Figure 1)。

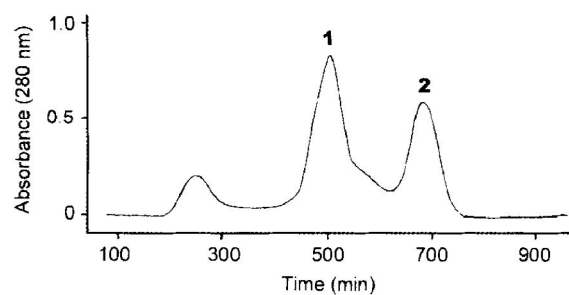


图 1. Sephacryl S-300 凝胶过滤色谱柱分离纯化载脂蛋白 E。

Figure 1. Purification of Apo E by Sephacryl S-300 gel filtration column. Peak 1: Apo E; Peak 2: Trx.

2.2 载脂蛋白 E 的表达和纯化

在载脂蛋白 E 表达和纯化的每一过程, 用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离鉴定总蛋白, 由图 2(Figure 2) 所示, 经过镍离子亲和层析柱和 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析柱分离纯化后, 得到高纯度的载脂蛋白 E。

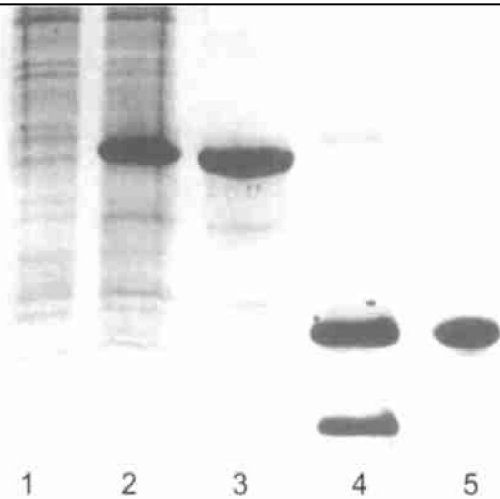


图 2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定重组载脂蛋白 E 分离纯化过程中的总蛋白。

Figure 2. SDS-PAGE analysis of total proteins at various steps during purification procedure. Lanes: 1: -IPTG; 2: + IPTG; 3: After Ni^{2+} affinity column; 4: Thrombin digestion; 5: Purified Apo E from Sephacryl S-300 column.

2.3 人重组载脂蛋白 E 与低密度脂蛋白受体的结合活性

用固相吸附的方法,直接测定和对比人重组载脂蛋白 E 与血清载脂蛋白 E3 的 LDL-R 结合活性。将载脂蛋白 E3 的受体结合活性作为 100%,从 8 次实验结果得出重组载脂蛋白 E2 的受体结合活性为 $25.0\% \pm 4.2\%$,载脂蛋白 E3 为 $104.0\% \pm 7.7\%$,载脂蛋白 E4 为 $98.0\% \pm 8.4\%$ 。说明重组载脂蛋白 E3 和 E4 具有正常的受体结合活性,而 E2 则具有受体结合缺陷。与血清中载脂蛋白 E2、E3 和 E4 的 LDL-R 结合活性一致。

3 讨论

载脂蛋白 E 是一种多功能的蛋白质,在脂质代谢和神经生物学中都起着重要的作用。细胞和分子水平的实验研究和结构功能研究需要高纯度的各种载脂蛋白 E 异构体^[5]。从血清中分离提取载脂蛋白 E 不但过程繁琐,蛋白得率低,难以找到 E2、E4 和稀有突变体的纯合子供血者,更无法得到结构和功能研究所需要的非自然存在的载脂蛋白 E 突变体。所以重组载脂蛋白 E 的表达和纯化非常重要。

细菌中表达纯化载脂蛋白 E 简便、快速并可得到各种不同的突变体。GST 和 pelB 融合蛋白体系曾用于在大肠杆菌中表达载脂蛋白 E,但每升产量仅 0.5~2.0 mg,表达的蛋白在其氨基端增加了较多

的氨基酸残基,从而影响载脂蛋白 E 的功能^[6,7]。PET32a 原核表达载体含有强的 T7 启动子和融合相伴蛋白 Trx, T7 启动子使融合蛋白得到高表达,融合蛋白连接部位含有一段组氨酸序列,使得融合蛋白可以有效的用镍离子亲和层析柱进行分离纯化。Trx 不但使载脂蛋白 E 得到高效表达而且还使之以可溶形式保留在细菌裂解液中。在载脂蛋白 E 和 Trx 之间存在凝血酶的识别位点,Trx 被消化除去后,用 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析分离得到纯化的载脂蛋白 E。用此方法表达和纯化载脂蛋白 E,不但简便、快速、产量高,而且可以得到各种不同载脂蛋白 E 的异构体和突变体。

我们检测了重组蛋白的 LDL-R 结合活性以保证其与血清中纯化的载脂蛋白 E 具有相同的生物学功能。载脂蛋白 E 最主要的功能是可以与 LDL-R 结合并在脂蛋白代谢中起重要的作用。载脂蛋白 E3 和 E4 与 LDL-R 的结合活性基本一致,而载脂蛋白 E2 的受体结合活性只有 E3 和 E4 的 2%。实验表明,用本方法得到的重组载脂蛋白 E3 和 E4 与血清中纯化的载脂蛋白 E3 具有相同的受体结合活性,而 E2 则具有受体结合缺陷,与血清载脂蛋白 E2 的受体结合活性一致。所以用此方法表达和纯化的人重组载脂蛋白 E 与人血清中纯化的载脂蛋白 E 具有相同的 LDL-R 结合功能。

我们建立了人重组载脂蛋白 E 在大肠杆菌中的表达和纯化体系。利用本体系可以快速高效的纯化载脂蛋白 E 的各种异构体和突变体。为载脂蛋白 E 的抗体制备、方法学研究和结构功能研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Rall SC Jr, Weisgraber KH, and Mahley RW. Human apolipoprotein E: The complete amino acid sequence. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 4 171-178
- [2] Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, **240**: 622-630
- [3] Weisgraber KH. Apolipoprotein E: Structure-function relationships. *Adv Protein Chem*, 1994, **45**: 249-302
- [4] Morrow JA, Arnold KS, and Weisgraber KH. Functional characterization of apolipoprotein E isoforms overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1999, **16**: 224-230
- [5] Dong J, Balestra ME, Newhouse YM. Human apolipoprotein E7: lysine mutations in the carboxy-terminal domain are directly responsible for preferential binding to very low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 2000, **41**: 1 783-789
- [6] Dong LM, Wilson C, and Wardell MR. Human apolipoprotein E: Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preference of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 22 358-365
- [7] Chan W, Formwald J, and Brawner M. Native complex formation between apolipoprotein E isoforms and the Alzheimer's disease peptide A β . *Biochem*, 1996, **35**: 7 123-130

(此文编辑 曾学清)