

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0277-04

• 实验研究 •

小鼠瘦素基因的原核表达及产物纯化

李宏睿¹, 张文波², Lennart Zabeau³, Jan Tavemier³

(江西农业大学 1. 食品科学与工程学院, 2. 动物科学技术学院, 江西省南昌市 330045)

3. 比利时 Ghent大学医学系医用蛋白研究室佛兰得斯校际生物技术研究所)

[关键词] 小鼠瘦素; 包涵体; Western Blotting 亲和纯化

[摘要] 目的 应用大肠杆菌表达系统进行小鼠瘦素基因的克隆、表达、产物纯化与鉴定。方法 应用聚合酶链扩增技术,以含有小鼠瘦素 cDNA 序列的质粒 pMET mouse leptin 为模板,扩增后克隆至载体 pET-28a(+)构建重组表达载体 pET-28a-lep 酶切、测序正确后,转化大肠杆菌 *E. coli* BL21,构建工程菌株 BL21-pET-lep。使用 0.1 mmol/L 异丙基 硫代半乳糖苷,在不同的时间段诱导蛋白表达,利用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳和 Western Blotting 检测瘦素蛋白的分子质量以及最佳表达时间。使用 0.5% 十二烷基肌氨酸钠溶解包涵体后通过 N^{i+} 亲和层析柱纯化。结果 正确构建了表达载体 pET-28a-lep。0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷诱导 BL21-pET-lep 6 h 具有最高蛋白表达量,含量占菌体总蛋白的 39.2%。SDS-PAGE 以及 Western Blotting 检测显示所表达的小鼠瘦素为携带组氨酸标签的融合蛋白,分子质量约为 22.5 kDa。使用 N^{i+} 层析柱纯化后的蛋白纯度为 1.086 g/L。结论 应用大肠杆菌原核表达系统成功进行了小鼠瘦素基因的克隆、表达、产物纯化与鉴定。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Prokaryotic Expression and Purification of Mouse Leptin

LI Hong-Rui¹, ZHANG Wen-bo², Lennart Zabeau³, Jan Tavemier³

(1. College of Food Science and Engineering, 2. College of Animal Science and Technique, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045 China; 3. VIB Dept Medical Protein Research, Ghent University, Belgium)

[KEY WORDS] Leptin; Inclusion Body; Western Blotting; Affinity Purification

[ABSTRACT] **Aim** To prokaryotic express mouse obese gene in *E. coli* expression system and purify the fused mouse leptin. **Methods** Mouse obesity gene leptin was amplified from pMET mouse leptin and subcloned in pET-28a(+) to construct recombinant vector pET-28a-lep. The sequence of pET-28a-lep was checked by sequencing and restriction analysis. Expression of BL21-pET-lep transformed with pET-28a-lep was induced with 0.1 mmol/L isopropylthiogalactoside and analyzed with Sodium dodecylsulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blotting to identify the mouse leptin molecular weight and optimum time for purpose protein expression. The maximum amount of the fused protein expressed was examined with thin layer chromatography. Mouse leptin dissolved with 0.5% Sarkosyl was purified by N^{i+} affinity chromatography column. **Results** Sequencing and restriction analysis confirmed the right sequence of pET-28a-lep. Sodium dodecylsulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blotting indicated a 22.5 kDa fused mouse leptin, in the form of inclusion body, was expressed with high efficiency in BL21-pET-lep. The maximum amount of the fused protein produced was 39.2% of the total cellular protein. The concentration of purified protein is 1.086 g/L.

Conclusion BL21-pET-lep could highly express recombinant mouse leptin. This provides a basis for further researches on biological activity of mouse leptin and its role on the developing process of atherosclerosis.

瘦素 (leptin) 是肥胖基因 (obese gene, ob gene) 编码、由脂肪组织分泌的多肽类激素。瘦素除对能量平衡和体重维持具有调节作用外^[1], 还具有调节生长发育^[2]、炎症反应、免疫功能^[3] 及与血管生成因子协同作用促进血管生长^[4], 调节神经内分泌^[5], 维持正常的血脂代谢以及骨形成^[6] 等多种生

理功能。1994年 Zhang等^[1]克隆了小鼠和人的肥胖基因,其翻译产物均由 167个氨基酸组成,两者间具有 84%的同源性,分子质量为 18 kDa。比较、分析人与小鼠瘦素功能的差异,对于阐明人的遗传性肥胖、饮食性肥胖的发生、发展机制,探索人类肥胖以及肥胖相关疾病的预防、治疗等工作,具有一定的意义。本文应用原核表达系统,构建并筛选表达载体 pET-28a-lep 以及工程菌株 BL21-pET-lep 表达了带有组氨酸标签的小鼠瘦素融合蛋白,并进行了表达产物的纯化。本文工作为进行瘦素融合蛋白的高效纯化,进而研究瘦素对于导致动脉粥样硬化的肥

[收稿日期] 2009-02-17 [修回日期] 2009-04-15

[基金项目] 江西农业大学校青年基金项目 (1889)

[作者简介] 李宏睿, 硕士, 讲师, 研究方向为微生物学与食品生物技术, Email为 hongrui_hangzhou@163.com。张文波, 博士, 副教授, 研究方向为动物医学与病毒分子生物学。Jan Tavemier 教授, 从事医用蛋白、细胞因子与相关受体蛋白结构与功能的研究。

胖等前期诸多不良症状发展进程的影响^[7],打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有小鼠瘦素 cDNA 序列的质粒 pMET mouse leptin 由比利时 Gent 大学的 Jan Tavemier 教授惠赠。*E. coli* BL21, TG1, pET-28a(+) 由浙江大学生物化学研究所提供。小鼠抗 His 单克隆抗体购自 Novagen 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体为上海生物工程公司产品。PVDF 膜为 Roche 公司产品。其余所用试剂均为国产分析纯。

1.2 表达载体的构建

根据小鼠瘦素 cDNA 序列设计如下引物,由上海申友生物工程公司合成。上游引物为 5'-CCG GAT CCA TGT GCT GGA GAC CC-3', 下游引物为 5'-CCC TCG AGG CAT TCA GGG CTA ACA TCC A-3', 划线部分分别为引入的 BamHiv 和 Xhoiv 位点。以质粒 pMET mouse leptin 为模板进行 PCR 扩增反应, 条件为 92℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环。产物经纯化、BamHiv 和 Xhoiv 双酶切后, 与经过同样双酶切的 pET-28a(+) 连接, 构建重组表达载体 pET-28a-lep。筛选阳性克隆, PCR、酶切鉴定以及测序无误后, 转化 *E. coli* BL21, 构建工程菌株 BL21-pET-lep。具体步骤参照操作手册进行^[8]。

1.3 小鼠瘦素融合蛋白的诱导表达

BL21-pET-lep 于 37℃ 摇床振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6, 加入 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达。分别取诱导后 2、3、4、5、6、7 和 8 h 的菌液, 以大肠杆菌 BL21 菌体蛋白为阴性对照, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 鉴定并确定融合蛋白的分子质量、最佳表达时间以及分泌方式、存在形式。采用薄层色谱法确定目的蛋白的最高表达量。

1.4 包涵体的溶解处理

取诱导 6 h 的菌液, 8 000 r/min 离心 5 min, 用 1 × STE 缓冲液悬浮菌体沉淀, 1 200 r/min 离心 10 min, 沉淀重悬于 1 × STE 缓冲液, 加入 100 mg/L 溶菌酶于冰上消化 15 min。加入 5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 放置 15 min 后, 加入 0.5% 十二烷基肌氨酸钠 (sarkosyl), 置于冰上超声波破碎细胞, 12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清, 沉淀悬浮于 1 × STE 缓冲液。SDS-PAGE 检测包涵体溶解程度。

1.5 小鼠瘦素蛋白 Western Blotting 鉴定

SDS-PAGE 结束后, 取出凝胶, 进行湿式电转移。电转仪置于冰上, 电转移条件为 25 mA, 12 h。转膜结束后, 将 PVDF 膜置于洗涤液 (含有 1% Tween-20 的 1 × PBS) 中洗涤, 再将膜转入封闭液 (含有 3% 小牛血清白蛋白的 1 × PBS 溶液) 中, 室温缓慢摇动 2 h。弃封闭液, 加入洗涤液清洗。将膜放入装有 5 mL 鼠抗组氨酸 (His) 单克隆 IgG 抗体的封口袋中, 室温缓慢振荡反应 2 h。取出膜用洗涤液清洗。将膜转入装有 5 mL 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体的封口袋中, 室温缓慢振荡反应 2 h。取出膜用洗涤液清洗, 再用 1 × PBS 溶液清洗。膜转入 10 mL 二氨基联苯胺 (DAB) 显色液中, 避光摇至显色清晰后, 迅速将膜转入双蒸水终止反应。具体操作参照有关文献^[8]。

1.6 融合蛋白的纯化

向经过包涵体溶解处理、离心后的上清液中加入 1% Triton X-100 静置 15 min。所有过柱试剂及样品、双蒸水均用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。用磷酸缓冲液 (0.05 mol/L K₃PO₄, 0.5 mol/L NaCl pH 7.8) 清洗 Ni²⁺ 柱后, 上样 (体积 ≤ 20 mL); 上样结束后, 用同上的磷酸缓冲液洗柱; 分别用洗脱液 iv (0.05 mol/L K₃PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 0.01 mol/L imidazole, pH 7.8)、洗脱液 ② (0.05 mol/L K₃PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 0.05 mol/L imidazole, pH 7.8)、洗脱液 ③ (0.05 mol/L K₃PO₄, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L imidazole, pH 7.8) 洗脱样品, 收集不同的洗脱组分。洗脱后进行柱子的再生处理。纯化过程中保持流速恒定, 液体流速 ≤ 10 mL/h。

1.7 蛋白含量测定

检测 260 nm 与 280 nm 紫外光吸收值。根据公式: 蛋白浓度 = 1.5 × A₂₈₀ - 0.75 × A₂₆₀ 测定纯化的瘦素蛋白浓度。A₂₈₀、A₂₆₀ 分别代表 280 nm、260 nm 处的吸光度值。

2 结果

2.1 重组载体 pET-28a-lep 的鉴定

重组质粒 pET-28a-lep 经 BamHiv 和 Xhoiv 双酶切后的产物包括约 500 bp 的片段 (图 1 泳道 4), 与预期的瘦素基因 (501 bp) 大小一致。以 pET-28a-lep 为模板的 PCR 实验也扩增出约 500 bp 的片段 (图 1 泳道 5), 表明小鼠瘦素基因已克隆到 pET-28a(+) 载体中。DNA 测序结果显示, pET-28a-lep 中的瘦素 cDNA 序列与 Genbank 中登录的该序列 (序

列登录号为 NM_166357)相同,证明表达载体 pET-28a-lep 以及工程菌株 BL21-pET-lep 构建正确。

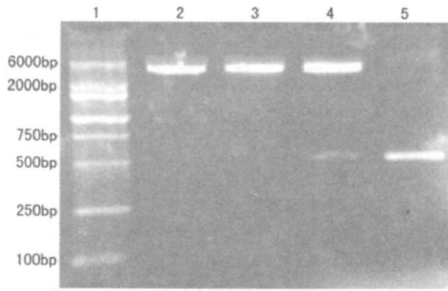


图 1 重组载体 pET-28a-lep 的鉴定 1 为脱氧核糖核酸分子标准, 2 为 *BanH* *iv* 单酶切产物, 3 为 *Xho* *iv* 单酶切产物, 4 为 *BanH* *iv* + *Xho* *iv* 双酶切产物, 5 为聚合酶链式反应扩增产物。

2.2 瘦素基因的表达

37°C, 使用 IPTG 诱导工程菌株 BL21-pET28a-lep 表达目的蛋白。分别收取不同诱导时间的菌株, 离心处理后进行 SDS-PAGE 检测。结果发现, 诱导后的工程菌株与空质粒对照相比有明显的特异性蛋白表达条带, 分子质量约为 22 kDa 大小与瘦素融合蛋白理论值一致。而离心后的上清液中不含有特异性的蛋白条带, 表明所表达蛋白不能分泌至胞外 (图 2 泳道 1)。IPTG 诱导 2~ 6 h 瘦素表达量随时间的增加而升高 (图 3 泳道 2~ 6), 之后, 表达量显著下降 (图 2 泳道 7~ 8)。薄层色谱 (TLC) 分析结果 (图 3) 表明, 诱导 6 h 具有最高表达水平, 最高表达量可达菌体蛋白的 39.2%。

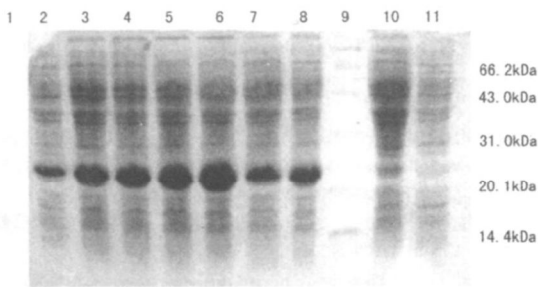


图 2 BL21-pET28a-lep 不同时间的诱导表达 1 为培养菌液离心后的上清, 2~ 8 分别为 IPTG 诱导 2、3、4、5、6、7、8 h 的 BL21-pET28a-lep 菌体蛋白, 9 为低分子量蛋白 Marker 10 为未诱导的 BL21-pET28a-lep 菌体蛋白, 11 为含有 pET28a 的 BL21 菌体蛋白。

2.3 包涵体的溶解

诱导后的 BL21-pET28a-lep 菌株经超声波破碎、离心处理后, 上清中未见特异性条带出现 (图 4 泳道 4), 目的蛋白存在于不可溶的沉淀部分 (图 4 泳道 5), 表明所表达的瘦素以包涵体形式存在。对包涵体进行溶解处理, 显示融合蛋白大部分存在于

溶解处理后的上清液中 (图 4 泳道 3), 少量存在于溶解处理后的沉淀中 (图 4 泳道 2)。

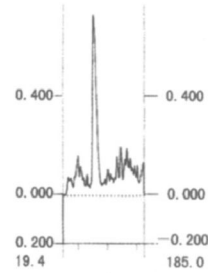


图 3 IPTG 诱导 6 h 薄层色谱分析结果

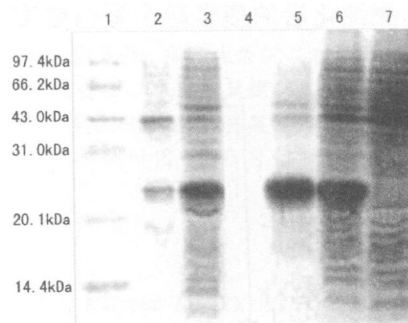


图 4 进行包涵体溶解处理的瘦素融合蛋白以及菌体总蛋白

1 为低分子量 Marker 2 为包涵体处理后的沉淀, 3 为包涵体处理后的上清, 4 为未进行包涵体处理超声波破碎后的上清, 5 为未进行包涵体处理超声波破碎后的沉淀, 6 为异丙基硫代半乳糖苷诱导的 BL21-pET28a-lep 菌体总蛋白, 7 为 *E. coli* BL21 菌体总蛋白。

2.4 Western Blotting

Western Blotting 结果表明, 无论是以包涵体形式存在的瘦素蛋白 (图 5 泳道 2), 还是经过包涵体变性与复性处理后, 以可溶形式存在的瘦素蛋白 (图 5 泳道 3), 均具有特异的抗原性 (图 5 泳道 4 和 5)。融合瘦素蛋白的 His 标签结合鼠抗 His 单克隆抗体, 与 HRP 标记的兔抗鼠二抗反应后, 在 DAB 显色液作用下产生杂交条带, 显示工程菌株 BL21-pET28a-lep 正确表达了 His 标签融合瘦素蛋白。

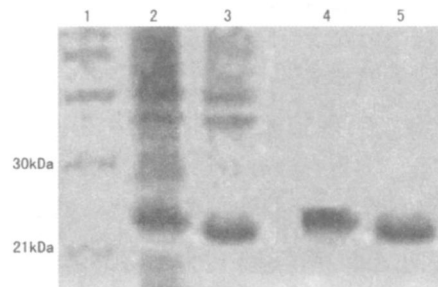


图 5 融合蛋白的 Western Blotting 鉴定 1 为低分子量蛋白标准, 2 为 BL21-pET28a-lep 超声波破碎离心后的沉淀, 3 为包涵体处理后的上清, 4 为 2 的杂交结果, 5 为 3 的杂交结果。

2.5 瘦素蛋白的纯化

对溶解后的融合蛋白进行 Ni^{2+} 柱亲和纯化。采用三种浓度的咪唑溶液洗脱结合有 His 标签的融合蛋白, 取不同的洗脱组分进行 SDS-PAGE 检测。结果表明, 含 0.05% 咪唑的洗脱液 ③洗脱的组分 (图 6 箭头所示; 图 7, 泳道 3) 中含有瘦素蛋白。而洗脱液 iv、洗脱液 ④洗脱后的样品 (图 7, 泳道 2 和 4) 均未见特异性条带出现。原因可能在于洗脱液 iv 只洗脱了盐类及其它小分子等杂质, 而洗脱液 ③中的咪唑则与结合在 Ni^{2+} 上的 His 融合蛋白发生充分的交换吸附, 被置换的蛋白分子随流动相充分洗脱下来。检测纯化后的瘦素融合蛋白浓度为 1.086 g/L。

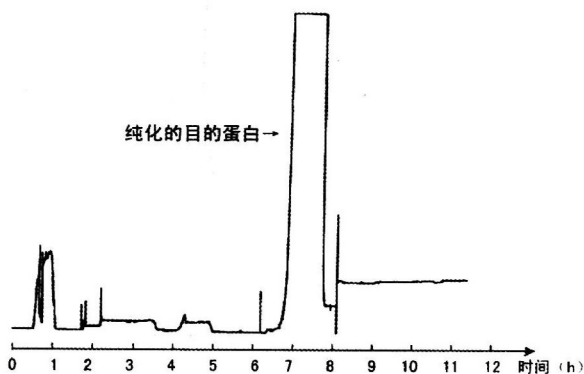


图 6 融合蛋白的纯化

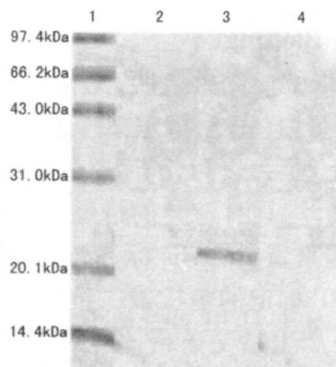


图 7 不同洗脱液洗脱组分对比 1 为低分子量蛋白标准, 2 为洗脱液 iv 洗脱获得的收集物, 3 为洗脱液 ③洗脱获得的收集物, 4 为洗脱液 ④洗脱获得的收集物。

3 讨论

本研究使用大肠杆菌表达系统, 在 *E. coli* BL21 菌株中表达了小鼠瘦素蛋白, 为不溶的包涵体形式。

Sarkosyl 是一种较为温和的阴离子表面活性剂, 一般使用量为 0.3%。作者使用 0.5% Sarkosyl 对瘦素融合蛋白包涵体进行溶解, 具有较好的效果。但尚有部分包涵体没有溶解, 可能是由于操作过程中溶液 pH 调解不适当所致。总的来讲, 该法简便易行, 溶解包涵体的效率较高, 简化了体外表达所形成蛋白质包涵体的溶解、复性操作。

Triton X-100 是一种非离子型表面活性剂, 向经过包涵体溶解处理、离心后的上清液中加入 1% Triton X-100 具有溶解脂质成分的作用, 有利于亲和交换纯化目标蛋白操作的顺利进行。

本文应用 pET-28a 系列表达载体以及 *E. coli* BL21 菌株组成的原核表达系统, 进行了小鼠瘦素基因的克隆、测序与表达, 省略了通常使用克隆载体进行目的片段扩增的步骤, 从而简化了实验设计与操作。质粒 pET-28a(+) 是具有组氨酸标签的融合表达载体, 应用该载体可以很方便地进行所表达融合蛋白的分离与纯化。

以上所完成的工作, 为进一步分离、纯化小鼠瘦素蛋白, 检测其生物活性以及与其它相关蛋白的相互作用对于动脉粥样硬化发生、发展过程的影响等, 提供了基本的方法。

[参考文献]

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature* 1994; **372**: 425-432.
- [2] Smith JT, Waddell BJ. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: periparturient changes and the emergence of sex differences [J]. *J Endocrinol* 2003; **176** (3): 313-319.
- [3] Landman RE, Puder J, Xiao E, et al. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88** (3): 1285-291.
- [4] Renhai Cao, Ebba Brakenhielm, Cleas Wahlestedt et al. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF [J]. *PNAS* 2001; **98** (11): 6390-395.
- [5] 李宏睿, 孙文夏, 潘杰. 瘦素功能研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; **12** (1): 108-112.
- [6] Shu Takeda, Florent Eleftherios, Regis Levasseur, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system [J]. *Cell* 2002; **111**: 305-317.
- [7] 吕青山, 谢秀梅, 方立. 冠状动脉粥样硬化患者血浆瘦素与脂联素关系分析 [J]. *医学临床研究*, 2008; **25** (10): 1880-881.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed) [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989: 34-57.

(此文编辑 许雪梅)