

# 树鼯载脂蛋白 AV 基因的克隆、表达和纯化

王艳<sup>1</sup>, 李国平<sup>2</sup>, 满永<sup>2</sup>, 王抒<sup>2</sup>, 涂萍<sup>1</sup>, 黎健<sup>2</sup>

(1. 南昌市第三医院内分泌代谢科, 江西省南昌市 330009;

2. 卫生部北京医院 卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室, 北京市 100730)

[关键词] 树鼯; 载脂蛋白 AV; 原核表达; 蛋白纯化; His 标签

[摘要] **目的** 构建树鼯载脂蛋白 AV 原核表达载体并利用 His 标签纯化该蛋白。**方法** 从树鼯肝细胞中提取总 RNA, 经逆转录合成 cDNA 第一链, 以 cDNA 第一链为模板, 扩增载脂蛋白 AV 基因。PCR 扩增产物和 pET32a 原核表达载体经过双酶切, 将纯化回收的酶切产物按适当的摩尔比通过 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 Top10, 挑克隆测序。将克隆成功的载脂蛋白 AV 重组质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 利用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达, 并优化诱导条件。表达的载脂蛋白 AV 经镍离子螯合树脂纯化, 采用 BCA 法分析蛋白浓度, 纯度测定采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合薄膜凝胶扫描分析获得。**结果** 挑选的克隆经测序证实载脂蛋白 AV 基因已经成功连接入 pET32a 原核表达载体中。在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达, 有分子量大小约 60 kDa 的特异性蛋白产生, 与预期大小一致。重组蛋白诱导的最佳表达时间为 5 h 左右, 最佳浓度约在 20 μmol/L。镍离子螯合树脂柱亲和层析获得的纯化蛋白, 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳后薄膜凝胶扫描分析显示目的蛋白的纯度在 95% 以上。**结论** 成功构建了载脂蛋白 AV 的原核表达载体, 该蛋白在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实现了高效表达, 纯化后的载脂蛋白 AV 纯度约 95%, 为进一步研究其结构与功能奠定了基础。

[中图分类号] Q71

[文献标识码] A

## Cloning, Expression and Purification of Tree Shrew Apolipoprotein AV

WANG Yan<sup>1</sup>, LI Guo-Ping<sup>2</sup>, MAN Yong<sup>2</sup>, WANG Shu<sup>2</sup>, TU Ping<sup>1</sup>, and LI Jian<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, The third Hospital of Nanchang, Nanchang, Jiangxi 330009, China;

2. Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics Ministry of Health & Key Laboratory of Geriatrics Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Tree Shrew; Apolipoprotein AV; Prokaryotic Expression; Protein Purification; His Tag

[ABSTRACT] **Aim** To construct recombinant plasmid pET32a-apolipoprotein AV and purify the protein with His tag. **Methods** The total RNA was extracted from tree shrew liver tissues, cDNA was then obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction. Apolipoprotein AV gene fragment was amplified by PCR. The amplified products and pET32a plasmid were digested by restriction enzymes *Xho* I and *Eco* RI, and then the purified products were ligated by T4 DNA ligase. The recombinants were transformed into *E. coli* Top10 and BL21 (DE3). The apolipoprotein AV was induced with isopropyl-β-D-thiogalactoside. The expressed conditions were optimized and purified by Nickel ion chelating resin. Purity analysis of the apolipoprotein AV was obtained by SDS-PAGE. **Results** Recombinant plasmid pET32a-apolipoprotein AV was successfully constructed and expressed in BL21 (DE3). Isopropyl-β-D-thiogalactoside-induced target protein (about 60 kDa) was detected. The purity of recombinant tree shrew apolipoprotein AV was greater than 95%. **Conclusions** Recombinant plasmid is successfully constructed, with efficient expression of apolipoprotein AV in *E. coli* BL21 (DE3), and has laid down the foundation for further investigation on its structure and functions.

[收稿日期] 2013-03-22

[基金项目] 国家自然科学基金(81270948;81070634;81170381)和北京医院青年启动基金(BJ-2011-30)资助

[作者简介] 王艳, 硕士, 主治医师, 主要从事脂代谢的基础与临床研究, E-mail 为 wangyan\_0202@163.com。李国平, 博士, 助理研究员, 主要从事脂代谢紊乱与胰岛素抵抗机制研究, E-mail 为 guoping\_li@yahoo.com。通讯作者涂萍, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病和代谢综合征基础与临床研究, E-mail 为 tuping8877@126.com。

研究表明,载脂蛋白 AV (apolipoprotein AV, Apo AV) 与脂代谢紊乱密切相关,尤其是与高甘油三酯血症的关系非常密切<sup>[1-4]</sup>。基因工程小鼠的研究表明,过表达 ApoAV 基因,小鼠血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平降低约 70%,而敲除该基因血浆中 TG 水平比对照组升高了 4 倍<sup>[1]</sup>。树鼩作为不易感动脉粥样硬化动物模型其特殊脂质代谢的机制从 80 年代以来受到广泛关注,但其机制尚不了解,推测与其载脂蛋白的特殊结构有关<sup>[5-8]</sup>。我们在前期工作中已经获得树鼩 ApoAV 基因两个转录本的全长序列 (HQ913636.1 和 HQ913637.1),本研究旨在通过基因工程方法构建树鼩 ApoAV 原核表达质粒,并在大肠杆菌中诱导表达,为进一步研究其特殊的结构特点与功能的关系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

树鼩购自云南昆明动物研究所;pET32a 载体、*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞、His bind kits 试剂盒购自 Novagen 公司;*E. coli* Top10 感受态细胞系实验室自制;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 购自 Promega 公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco* RI、PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。

### 1.2 引物设计及 PCR 扩增树鼩 Apo AV 基因 cDNA

用 Trizol 提取肝组织总 RNA,逆转录合成 cDNA 第一链。参照 GenBank 中的 mRNA 序列设计引物,上游引物引入 *Eco* RI 位点,pET-TSA5F 为 GGG AAT TCC ATA TGC AGA AAG GCT TCT GGG ACT ACT TCA;下游引物引入 *Xho* I 位点,pET-TSA5R 为 CCG CCG CTC GAG CGG ATC ACC CAG ATG ATG GCT GTG GCC,引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。PCR 反应体系 50  $\mu$ L:5 $\times$ 工作缓冲液 10  $\mu$ L, primer STAR 0.5  $\mu$ L, cDNA 第一链 0.5  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L,上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L,加去离子水补至总体积 50  $\mu$ L。反应条件:98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 28 个循环,末次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 重组质粒 pET32a-ApoAV 的构建

PCR 产物纯化后与 pET32a 同时进行 *Xho* I 和 *Eco* RI 双酶切,酶切产物经琼脂糖电泳纯化回收后进行连接反应,按 10  $\mu$ L 反应体系:10 $\times$ 连接缓冲液 1  $\mu$ L,

pET32a 载体 1.5  $\mu$ L, ApoAV 的 PCR 产物 2  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ L,去离子水补至 10  $\mu$ L。混匀后瞬时离心,16 $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s,全部转化 *E. coli* Top10 感受态菌株,重组子经小提电泳鉴定,并送北京博迈德科技发展有限公司测序。

### 1.4 重组原核表达质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达

将重组成功的质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,用 LB (Amp + ,50 mg/L) 平板筛选阳性克隆。挑取阳性克隆菌株于 LB (Amp + ,50 mg/L) 培养基中过夜培养 (37 $^{\circ}$ C,180 r/min),次日以 1:100 接种于 LB (Amp + ,50 mg/L) 培养基中继续培养,至 OD<sub>600</sub> 约 0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h (37 $^{\circ}$ C,230 r/min) 收集菌液进行 SDS-PAGE 鉴定。分别用终浓度 1 mmol/L 和 20  $\mu$ mol/L IPTG 对重组质粒诱导 5 h (37 $^{\circ}$ C,230 r/min),收集菌液离心,菌体经反复冻融处理后,分别取沉淀和上清进行 SDS-PAGE 鉴定。转化 pET32a-ApoAV 重组质粒的 BL21 (DE3) 菌种,用终浓度 1 mmol/L IPTG 分别诱导 0、1、2、3、4、5、6 及 7 h 和分别用终浓度为 0、1、2、4、8、10、20、40、80 及 100  $\mu$ mol/L IPTG 诱导 5 h,SDS-PAGE 观察蛋白表达量的变化。

### 1.5 目的蛋白的纯化

对 pET32a-ApoAV 重组蛋白的纯化参照 His bind kits 试剂盒说明书操作,简述步骤如下:按重组质粒蛋白表达量最高的条件进行诱导后于 4 $^{\circ}$ C、10000 g 离心 10 min,收获菌体沉淀充分重悬于无变性剂的结合缓冲液,冰浴下超声破碎细菌,用含 6 mol/L 盐酸胍的结合缓冲液溶解包涵体。镍离子螯合树脂纯化蛋白,用含 6 mol/L 盐酸胍洗脱缓冲液收集目的蛋白,加入透析袋中,先后用 50 倍体积含盐酸胍浓度分别为 4、2、1 及 0 mol/L 透析缓冲液于 4 $^{\circ}$ C 下共透析 24 h,2 h 换液一次,按上述浓度梯度逐渐递减。产物采用 BCA 法定量分析蛋白浓度,纯度分析采用 SDS-PAGE 结合薄膜凝胶扫描获得。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pET32a-ApoAV 的鉴定

按照质粒小量提取试剂盒操作,获得的产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见预期大小约 5.9 kb 的质粒 (图 1A)。PCR 反应扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见约 1.1 kb 的 PCR 片段 (图 1B)。将 PCR 产物和 pET32a 质粒经核酸内切酶双酶切后连接,连接产物全部转化 Top10 感受态细胞。挑克

隆后小提电泳鉴定,在图 1C 中,泳道 3 和 4 重组子条带要比 1 和 2 泳道条带滞后,初步说明该质粒为

阳性重组子,重组子经测序后证实序列正确,没有突变、移位等情况的发生。

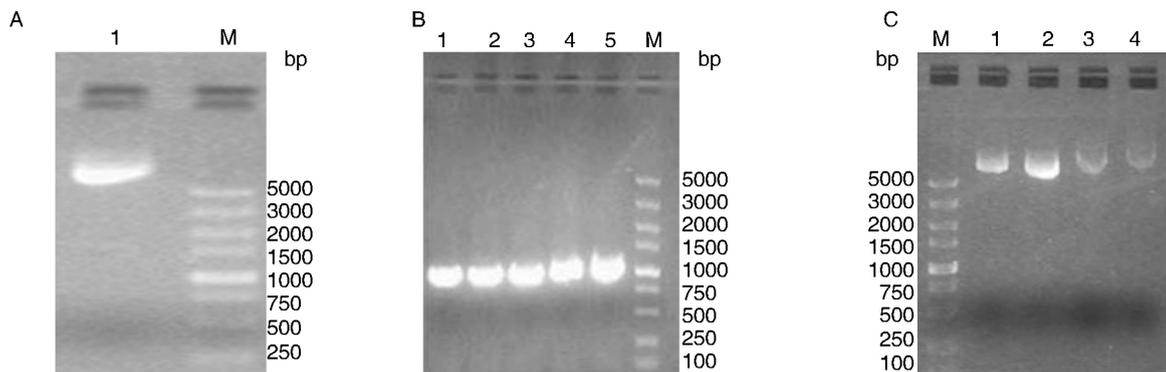


图 1. 载脂蛋白 AV 重组质粒的构建 A 图中 1 为 pET32a, M 为 Marker; B 图中 1-5 为 ApoAV, M 为 Marker; C 图中 M 为 Marker, 1、2 为 pET32a, 3、4 为 pET32a-ApoAV。

Figure 1. The construction of recombinant plasmid pET32a-ApoAV

## 2.2 重组树鼯 pET32a-ApoAV 的诱导表达

原核表达质粒 pET32a-ApoAV 在终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导后,经 SDS-PAGE 分析可见在 55~72 kDa 之间有目的蛋白表达,与预期大小一致(60 kDa 左右;图 2A)。用终浓度分别为 1 mmol/L、

20  $\mu\text{mol/L}$  IPTG 于 37 $^{\circ}\text{C}$  对重组质粒进行诱导 5 h,蛋白均主要表达在菌液沉淀部分(即以包涵体表达为主;图 2B)。低温条件下(16 $^{\circ}\text{C}$  和 22 $^{\circ}\text{C}$ )以上述浓度 IPTG 对重组质粒进行过夜诱导表达,重组蛋白仍以包涵体表达为主(结果未显示)。

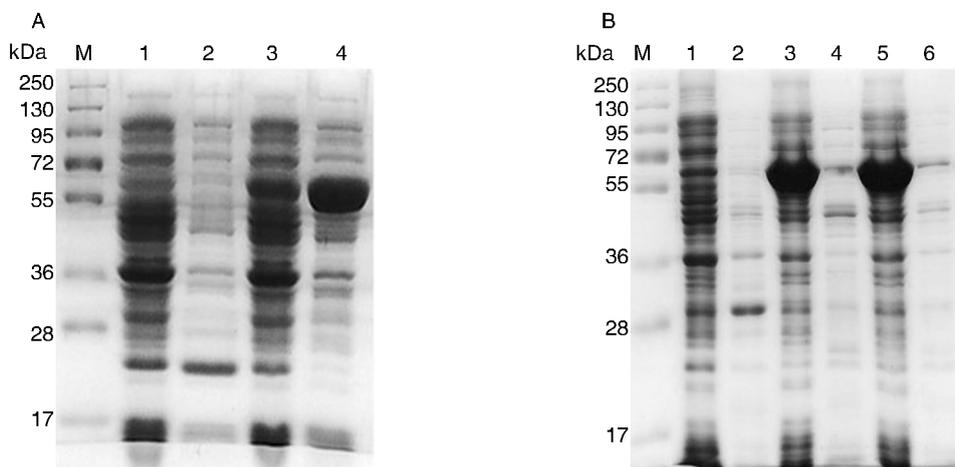


图 2. 重组树鼯 pET32a-ApoAV 的诱导表达 A 图中 M 为 Marker, 1、2 分别为 pET32a 未诱导、诱导, 3、4 分别为 pET32a-ApoAV 未诱导、诱导; B 图中 M 为 Marker, 1、2 分别为 pET32a-ApoAV(未诱导)沉淀、上清, 3、4 分别为 pET32a-ApoAV(IPTG 1 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ )沉淀、上清, 5、6 分别为 pET32a-ApoAV(IPTG 20  $\mu\text{mol/L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$ )沉淀、上清。

Figure 2. Induction and expression of recombinant plasmid pET32a-ApoAV

## 2.3 重组质粒诱导表达条件的优化

重组质粒用终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 0、1、2、3、4、5、6 及 7 h, 以 5 h 时表达蛋白量最大, 因此浓度梯度优化时均以 5 h 为诱导时间(图 3A)。初筛时 IPTG 诱导终浓度为 1 mmol/L, 经过 0、10、100 及 1000  $\mu\text{mol/L}$  指数级别浓度梯度的初筛, 发现 0~100  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内呈现明显梯度变化, 因此将重组质粒以 IPTG 终浓度分别为 0、1、2、4、8、10、20、

40、80 及 100  $\mu\text{mol/L}$  诱导 5 h, SDS-PAGE 显示蛋白表达量在 20  $\mu\text{mol/L}$  时最大(图 3B)。

## 2.4 重组 ApoAV 蛋白的纯化

超声裂解细菌, 按 His bind kit 融合蛋白纯化操作, 用含变性剂(6 mol/L 盐酸胍)的结合缓冲液溶解包涵体, 经镍离子螯合柱吸附, 用含变性剂(6 mol/L 盐酸胍)的洗脱缓冲液洗脱, 并经透析后得到纯化的目的蛋白, 经薄膜凝胶扫描分析, 纯化的蛋

白量约达 20.2 mg/L,纯度为 95% (图 4)。

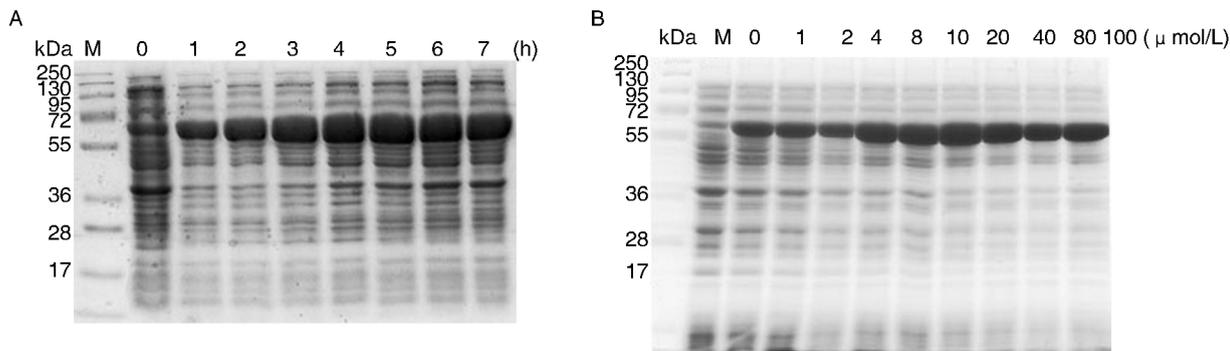


图 3. IPTG 诱导重组 pET32a-ApoAV 蛋白表达条件的优化

Figure 3. Optimization expression conditions of pET32a-ApoAV

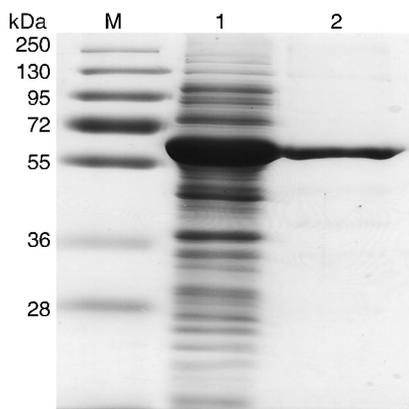


图 4. 重组 pET32a-ApoAV 蛋白的纯化 M 为 Marker,1 为纯化前,2 为纯化后。

Figure 4. The purification of recombinant pET32a-ApoAV fused protein

### 3 讨论

高甘油三酯血症是动脉粥样硬化和冠心病的独立风险因素<sup>[9]</sup>,对于高甘油三酯血症的研究也因此尤为必要。人类染色体 11q23 的载脂蛋白的基因簇 (ApoA1/CIII/AIV) 对血脂代谢有着重要的影响, ApoAV 与 ApoA1/CIII/AIV 基因簇相距约 30 kb,与 ApoAIV 编码的蛋白质同源性达到 49%,故命名为 ApoAV<sup>[1]</sup>。基因工程小鼠,无论是转基因还是基因敲除动物都证实 ApoAV 基因对 TG 的调节作用<sup>[1,2]</sup>。最近有研究人员在 ApoAV 基因敲除小鼠静脉注射 ApoAV 重组的高密度脂蛋白,结果显示可以显著降低血浆 TG 水平<sup>[3]</sup>。在 ApoAV 基因敲除小鼠或者 ApoE 敲除小鼠中通过慢病毒或者腺病毒过表达 ApoAV 基因,也可以显著降低血浆 TG 水平,这为基因治疗高甘油三酯血症提供了重要的实验数据支持<sup>[4,10]</sup>。ApoAV 调节血浆 TG 的机制可能

和影响极低密度脂蛋白的组装和分泌,激活脂蛋白脂肪酶活性有关<sup>[11-13]</sup>。然而临床研究中却有些相反的结果,研究者发现急性冠状动脉综合征患者 ApoAV 浓度明显升高,与血浆 TG 水平呈正相关<sup>[14]</sup>;在 2 型糖尿病患者中检测 ApoAV 与脂质谱的关系,发现 ApoAV 与血浆 TG 也呈正相关<sup>[15]</sup>,可能是特殊疾病的病理过程影响了体内 ApoAV 的正常代谢。树鼯作为不易感动脉粥样硬化的动物模型,其特殊的脂质代谢机制可能与载脂蛋白的结构密切相关。然而关于树鼯载脂蛋白的研究目前并不多见,因其种属特异性以及脂质代谢机制的特殊性,推测其载脂蛋白结构和功能与人类可能存在差异。ApoAV 是单一在肝脏中表达的蛋白,血浆中的浓度极低 (24 ~ 406 μg/L)<sup>[16]</sup>。因而,获得 ApoAV 蛋白的高效表达,对其功能研究也显得十分重要。

为了能够实现 ApoAV 蛋白的高效表达,使 ApoAV 和硫氧还蛋白融合表达,并且在融合蛋白的 N 端和 C 端均含有 His-tag 标签,以利于蛋白纯化时更易与镍离子柱螯合,提高蛋白产量并减少非特异性蛋白的产生,最终通过 SDS-PAGE 软件分析目的蛋白的纯度达到 95% 以上。ApoAV 蛋白有极强的疏水性,研究采用硫氧还蛋白的融合表达,通过低温培养 (16℃ 和 22℃)、降低 IPTG 的诱导浓度 (分别用 1 mmol/L 和 20 μmol/L 进行诱导) 等手段, ApoAV 蛋白仍大部分以包涵体形式存在,产量较前也没有增加。按照 His bind kit 包涵体制备的说明,加入变性剂溶解包涵体获得目的蛋白,再采用梯度降低透析液的变性剂浓度使复性的条件变化更温和,使重组蛋白能够恢复正确的折叠结构。经过纯化复性后的目的蛋白仅有极少杂带,为接下来制备抗血清抗体提供了可能。但如果要进行蛋白结构

及功能的分析,还需要进一步改进蛋白复性条件,提高蛋白纯度,并去除蛋白融合标签等。

树鼩 ApoAV 原核表达载体的成功构建以及高效表达,为进一步研究制备抗体,研究其结构特点提供了可能。

#### [参考文献]

- [1] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing[J]. *Science*, 2001, 294 (5540): 169-173.
- [2] Van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (48): 44 512-520.
- [3] Shu X, Nelbach L, Weinstein MM, et al. Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in ApoAV<sup>-/-</sup> mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (12): 2 504-509.
- [4] Sharma V, Beckstead JA, Simonsen JB, et al. Gene transfer of apolipoprotein A-V improves the hypertriglyceridemic phenotype of ApoA5<sup>-/-</sup> mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (3): 474-480.
- [5] Zeng W, Zhang J, Chen B, et al. Cloning and characterization of cholesteryl ester transfer protein isolated from the tree shrew[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116 (6): 928-931.
- [6] Wang KQ, Chen BS, Li ZG, et al. Are tree shrews and Beijing ducks good models for the study of antiatherogenicity of serum HDL[M]? Woodford FP, Davignon J, Sniderman A (eds), *Atherosclerosis X*. Elsevier Press, Amsterdam, 1995, 126-131.
- [7] Lu X, Chen B, Wang K. Clone and tissue expression of tree shrew apolipoprotein AI cDNA[J]. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 1999, 79 (5): 373-376.
- [8] Zeng WW, Zhou B, Liu HR, et al. Identification of the tree shrew ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and its expression in tissues: cDNA sequence and expression of tree shrew ABCA1 [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36 (3): 443-448.
- [9] Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor[J]. *Am J Cardiol*, 2000, 86 (9): 943-949.
- [10] Huang W, Bi N, Zhang X, et al. Overexpression of apolipoprotein AV in the liver reduces plasma triglyceride and cholesterol but not HDL in ApoE deficient mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346 (1): 14-18.
- [11] Schaap FG., Rensen PC, Voshol PJ, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (27): 27 941-947.
- [12] Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (22): 21 553-560.
- [13] Lookene A, Beckstead JA, Nilsson S, et al. Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (27): 25 383-387.
- [14] 黄贤圣, 赵水平, 张 骞, 等. 急性冠状动脉综合征患者载脂蛋白 A5 检测及其意义[J]. *中华心血管病杂志*, 2009, 37 (10): 896-899.
- [15] Talmud, PJ, Cooper, JA, Hattori H, et al. The Apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Northwick Park Heart Study II [J]. *Diabetologia*, 2006, 49 (10): 2 337-340.
- [16] O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins[J]. *Clin Chem*, 2005, 51 (2): 351-359.

(此文编辑 文玉珊)