

• 论 著 •

X-连锁肾上腺-脑白质营养不良蛋白 3 个突变体的制备及其鉴定^{*}谢海花, 王志红, 柯龙凤, 黄梁浒, 兰风华[△]

(南京军区福州总医院遗传病分子诊断中心, 福州 350025)

摘要:目的 构建 R617C、P508L 和 G512S 突变型表达载体并对其进行鉴定。方法 以野生型 pGEX-4T-2-NBD 原核表达载体为模板, 通过体外诱导突变构建突变型表达载体, 序列分析鉴定 R617C、P508L 和 G512S 突变重组子。结果 突变型重组载体测序结果与患者的突变位点完全符合; 表达产物的 12% SDS-PAGE 和蛋白质印迹也显示, 约 40.5×10^3 的特异性区带能被特异性单克隆抗体所识别, 与预期的结果相符; 通过 GST 蛋白纯化试剂盒获得较高纯度的目的蛋白。结论 3 个 ALDP 突变体的成功构建为进一步研究突变对 ALDP 结构和功能的影响奠定了基础, 为了解 X-ALD 的分子发病机制创造了条件。

关键词: 体外研究; 突变; 核苷酸结合结构域; 原核表达载体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0014-02

Prokaryotic construction and identification of three ALDP mutants

Xie Haihua, Wang Zhihong, Ke Longfeng, et al.

(Research Center For Molecular Diagnosis Of Genetic Diseases, Fuzhou Clinical

College Of Fujian Medical University, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Objective To construct prokaryotic expression vectors for three ALDP mutants. Methods Site-directed mutagenesis was applied to wild-type ABCD1 gene cloned in the pGEX-4T-2 vector. Three mutant recombinant plasmids (pGEX-4T-2-R617C, pGEX-4T-2-P508L and pGEX-4T-2-G512S) were constructed and identified by sequencing. The expression of these mutants was detected by SDS-PAGE and western blotting. Results DNA sequencing confirmed the successful construction of three mutants. SDS-PAGE and western blotting analysis showed the expression of fusion protein (NBD-GST) with 40.5×10^3 molecular weight. Conclusion The successful construction of the three ALDP mutants would lay the foundation for further study on X-ALD molecular pathogenesis and effects of ABCD1 gene mutation on the structure and function of ALDP.

Key words: in vitro; matation; nucleotide binding domain; site-directed mutagenesis; prokaryotic expression vector

X-连锁肾上腺-脑白质营养不良 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 是最常见的过氧化物酶体病, 主要侵犯肾上腺和脑白质等器官。X-ALD 发病由 ABCD1 基因突变引发, 该基因定位于染色体 Xq28, 其成熟 mRNA 长约 3.7 kb, 编码 1 个含 745 个氨基酸残基的蛋白质, 称为 ALDP, 又称为 ABCD1 蛋白。ALDP 是 1 种半转运蛋白, 具备两种核心结构域: 1 个位于 N 端的跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD), 形成配体结合位点并具有配体特异性; 1 个位于 C 端的核苷酸结合结构域 (nucleotide binding domain, NBD), 通过结合和水解 ATP 为转运 VLCFA 提供能量, 也是 ABCD1 基因突变比较集中的区域之一^[1]。曾有报道, X-ALD 3 个家系的 ABCD1 基因 C 端的 NBD 区域存在突变^[2-3]。为了研究 NBD 区域的突变对 ALDP 功能的影响, 将野生型 ALDP 原核表达载体进行体外定点突变, 构建了 3 个 ALDP 突变型原核表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料 Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA polymerase (Cat: 600670) 为 Stratagen 公司产品。限制性内切酶 Dpn I (Cat: R0176) 为 NEB 公司产品; GST 原核融合表达载体 pGEX-4T-2、E. coli BL-21 和 XL1-blue 为本室保存; 质粒提取纯化试剂盒 (plasmid Mini Kit Cat: D6943) 为 Omega 公司产品; Western blotting luminal reagent (Cat: sc-2048) 购自 Santa cruz 公司。鼠抗人 ALDP 单克隆抗体 (mouse anti-adrenoleukodystrophy protein monoclonal antibody, Cat: MAB2162) 购自 Chemicon 公司; 羊抗鼠 IgG (H+L) [Peroxidase-Conjugated Affinipure goat anti-mouse IgG (H+L), Cat: zb-2305] 为 Data sheet 公司产品;

医用 X 射线胶片为柯达 X-OMAT; BT 蛋白纯化试剂盒 (Mag-neGST™ Protein Purification System Cat: TM240) 为 Promega 公司产品。

1.2 引物设计 野生型 ALDP 原核表达载体 pGEX-4T-2-NBD 由本研究中心构建。采用 OMIGA 软件, 自行设计针对 NBD 的 3 个突变 R617C、P508L 和 G512S 两端的引物, 并委托上海超世技术公司合成。其引物序列为: O1, 5'-GAG AAT CGG CAT GGC CTG CAT GTT CTA CCA CAG-3'; O2, 5'-CTG TGG TAG AAC ATG CAG GCC ATG CCG ATT CTC-3'。P1, 5'-CTG CTC ATC ACA GGC CTC AAT GGC TGC GGC AAG-3'; P2, 5'-CTT GCC GCA GCC ATT GAG GCC TGT GAT GAG CAG-3'。G1, 5'-AGG CCC CAA TGG CTG CAG CAA GAG CTC CCT GTT-3'; G2, 5'-AAC AGG GAG CTC TTG CTG CAG CCA TTG GGG CCT-3'。划线处为碱基突变的位点, 经 PAGE 纯化后用于诱导突变的 PCR 扩增, 预期扩增片段大小为 5 435 bp。

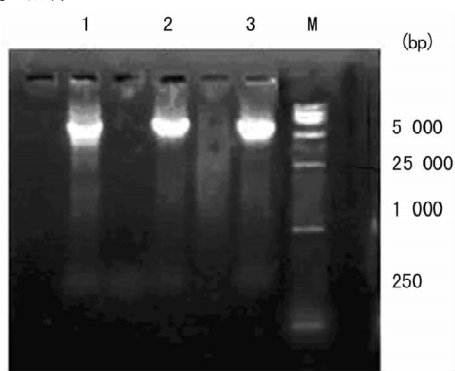
1.3 突变型 ALDP 原核表达载体的构建 (1) R617C、P508L 和 G512S 突变体的 PCR 扩增: 以野生型的 pGEX-4T-2-NBD 为模板, 进行 R617C、P508L 和 G512S 突变型模板的扩增。在总反应体积 50 μ L 中, 含 dsDNA 模板 5 μ g, 引物 (O1、O2; P1、P2; G1、G2) 各 125 ng, dNTP 混合物各 0.25 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 5 U, Mg^{2+} 1.5 mmol/L。95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s 后, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 10 min, 共 25 个循环。2) PCR 产物的消化: 取 10 μ L PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳以确认目的条带, 再用 Dpn I 对 PCR 产物进行 37 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 以除去野生

型的重组质粒模板。3)重组载体的转化和鉴定:将 3 个酶切后的 PCR 产物转化大肠杆菌 XL1-blue,将转化菌接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板,37℃ 孵育过夜,挑取白色菌落,转种 LB 液体(含 Amp)培养增菌后,提取突变体的重组质粒,用 pGEX 载体通用引物和末端终止法测序鉴定 R617C、P508L 和 G512S 突变体序列。4)突变体的融合表达:将野生型的 pGEX-4T-2-NBD 和 3 个 R617C-、P508L-、G512S-pGEX-4T-2-NBD 突变体质粒分别转化 E. coli, BL21,在含氨苄青霉素的 LB 培养液中培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~1.0,按 1:10 的比例转接到新鲜的培养液中,37℃ 时,以离心半径 8 cm,250 r/min 振摇至 OD_{600 nm} 为 0.6,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 继续培养,分别取诱导表达 1、2、3、4、5、6、7 h 后培养物,离心收集菌体,行 12% SDS-PAGE,观察表达的时相变化。

1.4 ALDP 突变体 GST 融合蛋白的分离纯化 按照 GST 融合蛋白纯化试剂盒使用说明,对野生型的 pGEX-4T-2-NBD、3 个 R617C-、P508L-、G512S-pGEX-4T-2-NBD 突变体的 GST 融合蛋白进行纯化。

2 结 果

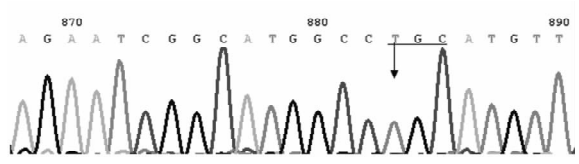
2.1 R617C、P508L 和 G512S 突变体目的序列的 PCR 扩增 PCR 产物经琼脂糖电泳,出现 1 条特异性区带,均位于相对分子质量标准 5 000 bp 附近(图 1),与预期的目的片段大小(5 435 bp)相符。



注:M 为 DNA 相对分子质量标准;1、2、3 分别为 R617C、P508L 和 G512S 目的序列的 PCR 产物。

图 1 目的 DNA 的 PCR 产物电泳图

2.2 R617C、P508L 和 G512S 突变体重组质粒的测序 人工诱导突变的 3 种突变体重组质粒送往上海生物工程技术公司测序。人工诱导突变的序列和参考文献报道的突变基因序列(R617C、P508L 和 G512S)一致,且读框正确(仅显示 R617C,图 2)。



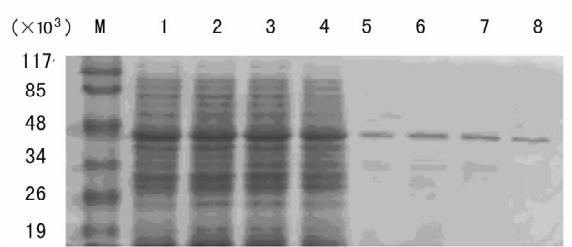
注:R617C 突变体部分序列划线处表示突变密码子所在的位置,箭头所指为突变的碱基。

图 2 R617C 突变体的载体测序结果

2.3 R617C、P508L 和 G512S 突变体融合蛋白的 SDS-PAGE 鉴定和纯化后的鉴定 与 IPTG 诱导前相比,诱导后含 R617C、P508L 和 G512S 突变体质粒的重组菌在 48×10³ 与 34×10³ 之间出现 1 条较浓的蛋白区带,其相对分子质量与预期相符,并得到了较高程度的纯化(图 3)。

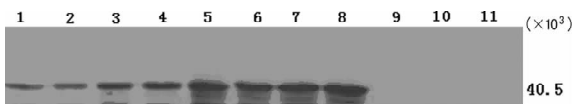
2.4 NBD-GST 融合蛋白的免疫印迹鉴定 IPTG 诱导前含重组质粒和诱导后含 pGEX-4T-2 空质粒菌体其蛋白质均未出

现显色反应,IPTG 诱导后含重组质粒菌体其蛋白质以及其纯化产物均能与鼠抗人 ALDP 单克隆抗体结合,进行特异性反应。与蛋白质相对分子质量标准进行比较,该条带位于 48×10³ 与 34×10³ 之间,约 40.5×10³(图 4)。



注:1、2、3、4 分别为野生型 NBD、R617C 突变体、P508L 突变体和 G512S 突变体融合蛋白(纯化前);5、6、7、8 分别为野生型 NBD、R617C 突变体、P508L 突变体和 G512S 突变体融合蛋白(纯化后);M 为蛋白相对分子质量标准。

图 3 NBD-GST 融合蛋白纯化前后的 12% SDS-PAGE



注:1、2、3、4 分别为纯化的野生型 NBD、G512S 突变体、P508L 突变体、R617C 突变体;5、6、7、8 分别为含 G512S 突变体、P508L 突变体、R617C 突变体重组质粒、野生型 NBD 重组质粒的菌体(IPTG 诱导后);9 为含野生型 NBD 重组质粒的菌体(IPTG 诱导前);10 为含 pGEX-4T-2 质粒的菌体(IPTG 诱导前);11 为含 pGEX-4T-2 质粒的菌体(IPTG 诱导后)。

图 4 免疫印迹

3 讨 论

作为 ALDP 结构域之一的 ATP 结合区(NBD),在 VL-CFA 的转运过程中起着重要作用。该结构域位于过氧化物酶体的细胞浆面,具有 ATP 酶的活性,通过结合和水解 ATP 为转运提供能量,从而发挥作用。如果 ATP 结合区的重要氨基酸发生改变,尤其是保守氨基酸发生突变,将引起其 ATP 酶活性的降低或消失,严重的则导致 X-ALD^[4-5]。利用大鼠肝细胞的过氧化物酶体,Tanaka 等^[6]研究各种因素对 ALDP 结合和水解 ATP 的影响,结果显示,当缺少 Mg²⁺ 时,ATP 和 ALDP 紧密结合;当 Mg²⁺ 存在时,结合的 ATP 就水解为 ADP,且 ADP 离开 ALDP,促进下一个 ATP 和 ALDP 的结合。

本研究利用 pGEX-4T-2 原核表达载体,成功构建了 ALDP 蛋白 NBD 部分的原核表达载体,其中包括通过人工诱导突变获得的 3 个突变体的原核表达载体,并在 E. coli BL21 进行表达。野生型的重组载体测序结果与 GenBank 的参考序列完全相同,突变型的重组载体测序结果与相应家系先证者的突变位点完全符合。表达产物的蛋白质印迹也显示,大小约为 40.5×10³ 的蛋白质区带能被特异性单克隆抗体所识别,并通过 GST 蛋白纯化试剂盒获得较高纯度的目的蛋白。3 个 ALDP 突变体的成功构建为进一步研究基因突变对 ALDP 功能和结构的影响奠定了基础,为了解 X-ALD 的分子发病机制创造了条件。

参考文献

[1] Kenneth J, Linton. Structure and function of ABC transporters[J]. Physiology, 2007, 22(9): 122-124.
[2] 黄梁滨, 王志红, 杨渤生, 等. 7 个肾上腺脑白质营养不良家系的基因突变分析[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(6): 540.
(下转第 17 页)

(上接第 15 页)

- [3] 兰风华,杨渤生,吴一波,等. 肾上腺脑白质营养不良的分子诊断(附 2 例报告)[J]. 福建医药杂志,2003,25(3):39.
- [4] Gartner J,Dehmel T,Klusmann A,et al. Functional characterization of the adrenoleukodystrophy protein (ALDP) and disease pathogenesis[J]. Endocr Res,2002,28(4):741.
- [5] Roerig P,Mayerhofer P,Holzinger A,et al. Characterization and functional analysis of the nucleotide binding fold in human peroxisomal ATP binding cassette transporters

[J]. FEBS Lett,2001,492(1-2):66.

- [6] Tanaka AR,Tanabe K,Morita M,et al. ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and a adrenoleukodystrophy protein(ABCD1)[J]. J Biol Chem,2002,277(42):4012.

(收稿日期:2010-01-12)