

• 基础实验研究论著 •

重组金属硫蛋白 2A 质粒的构建与表达^{*}

刘振杰^{1,2,3}, 赵树勇¹, 周 静¹, 骆艳婷¹, 郑慧玲^{1,3}, 陈维春^{1,3}, 熊兴东^{1,3}, 徐 宁², 刘新光^{1,3△}

(1. 广东医学院衰老研究所, 广东东莞 523808; 2. 广东省中医院检验科, 广州 510370;

3. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808)

摘 要:目的 构建重组金属硫蛋白 2A(MT-2A)原核表达质粒,并在大肠埃希菌 BL21(DE3)中表达,为进一步研究 MT-2A 奠定基础。方法 从人骨骼肌细胞 cDNA 文库中 PCR 扩增 MT-2A 基因 DNA 序列,构建重组表达质粒 MT2A-pET32a,PCR 与 DNA 测序法鉴定插入序列;重组细菌用 IPTG 诱导表达,His-bind 亲和层析柱纯化 MT-2A 蛋白,Western blotting 鉴定蛋白特性。结果 扩增获得的 MT-2A 基因片段长 186 bp,DNA 测序证实 MT2A-pET32a 重组质粒构建正确;表达的融合蛋白相对分子质量约为 29×10^3 ,Western blotting 证实为目的蛋白。结论 成功构建了重组原核表达质粒 MT2A-pET32a,在大肠埃希菌内诱导表达并纯化获得 MT-2A。

关键词:基因表达; 金属硫蛋白 2A; 重组质粒; 大肠埃希菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)05-0513-02

Construction and expression of recombinant plasmid of metallothionein 2A^{*}

Liu Zhenjie^{1,2,3}, Zhao Shuyong¹, Zhou Jing¹, Luo Yanting¹, Zheng Huiling^{1,3},

Chen Weichun^{1,3}, Xiong Xingdong^{1,3}, Xu Ning², Liu Xin'guang^{1,3△}

(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan Guangdong 523808, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510370, China;

3. Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan Guangdong 523808, China)

Abstract: **Objective** To construct prokaryotic expression plasmid of metallothionein 2A (MT-2A) and induce the expression of constructed plasmid in E. coli BL21(DE3). **Methods** The MT-2A cDNA was amplified by PCR from skeletal muscle library and inserted into expression vector pET32a. The recombinant plasmid MT2A-pET32a, which could express the fusion protein of MT-2A, was then transferred into E. coli BL21 (DE3). The target protein was identified using SDS-PAGE. Affinity chromatography was used for protein purification. The immune reactivity of purified MT-2A was identified by Western blotting using anti-MT2A specific antibody. **Results** A gene fragment of 186 bp was acquired by PCR, and the constructed recombinant plasmid MT2A-Pet32a was confirmed by DNA sequencing. The expressed recombinant protein was with relative molecular weight of 29×10^3 , and was identified to be target protein by Western blotting. **Conclusion** The recombinant plasmid MT2A-pET32a was constructed successfully and the fusion protein could be expressed in E. coli.

Key words: gene expression; metallothionein 2A; recombinant; Escherichia coli

金属硫蛋白(metallothionein, MT)最早从马肾中分离而来,是一类低相对分子质量,富含半胱氨酸,无芳香族氨基酸,能与金属离子结合,普遍存在于生物界的独特的蛋白质^[1-2]。哺乳动物组织中主要含有 4 种 MT,即 MT-1、MT-2、MT-3 和 MT-4。MT-2A 是 MT-2 中惟一具有生物学功能的蛋白质^[3-4]。研究表明 MT-2A 不仅具有重金属解毒、清除自由基、抗辐射、修复组织损伤、抗衰老及调节微量元素等作用,也与细胞增殖、凋亡及多种肿瘤的发生、发展和耐药密切相关^[5-7]。本研究构建了 MT-2A 原核表达载体,并在大肠埃希菌中诱导表达,为进一步研究其功能奠定了基础。

1 材料与与方法

1.1 试剂 pET32a 质粒和 JM109、BL21 菌种均由本室保存。人骨骼肌细胞 cDNA 文库 AD 质粒由本课题组构建^[8];Taq 酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、Xho I 和 DNA 分子标记物购自 TAKARA 公司;蛋白分子标记物、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工公司;His6 多克隆抗体购自 Tiangen 公司;His·Tag

融合蛋白纯化试剂盒和 BugBuster 裂解液购自 Novagen 公司;抗 MT 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 MT-2A 序列(NM_005953.2)采用 OLIGO 软件设计引物。上游引物 MT2A1 为:5'-CCG GAA TTC ATG GAT CCC AAC TGC TCC T-3',其 5'端包含 EcoR I 酶切位点;下游引物 MT2A2 为:5'-CCG CTC GAG TCA GGC GCA GCA GCT GCA C-3',其 5'端包含 Xho I 酶切位点。引物由上海生工公司合成。

1.2.2 MT-2A 的扩增与表达质粒 MT2A-pET32a 的构建 用所设计引物,从人骨骼肌细胞 cDNA 文库 AD 质粒中扩增 MT-2A DNA 片段,反应体系总体积为 50 μ L,其中引物 MT2A1、MT2A2 各 25 pmol、 $10 \times$ PCR 缓冲液 5 μ L、Taq 酶 1 U、dNTP 混合物(10 mmol/L)4 μ L、AD 质粒 1 μ L。反应参数为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 10 min。取 1 μ L PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电

^{*} 基金项目:国家自然科学基金(30672205,30871440,30971620,81170327);广东省自然科学基金(9252402301000002,7301506);广东省高校自然科学研究重点项目(06Z015);广东省医学科研基金项目(B2009191);湛江市科技局招标项目(ZZ0605)和东莞市科技计划项目(2008108101045)。△ 通讯作者,E-mail:xgliu64@126.com。

泳,扩增良好的 PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒将扩增片段全部进行回收纯化。PCR 产物与 pET32a 载体分别进行双酶切,酶切产物经纯化后在 T4 DNA 连接酶的作用下,16 ℃ 连接过夜。

1.2.3 重组质粒的鉴定 以连接产物转化大肠埃希菌 JM109;挑取单克隆菌落于 5 mL 含氨苄西林的 LB 培养液,37 ℃ 培养过夜,抽提质粒;按上述条件进行重组质粒 PCR 鉴定;将 PCR 结果与预期相符的质粒送上海生工公司进行测序鉴定。

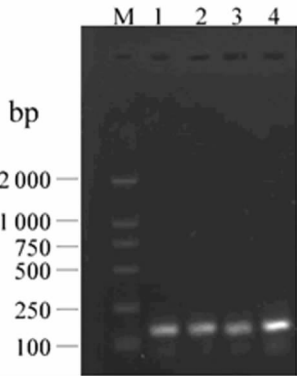
1.2.4 目的蛋白在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达及鉴定 以鉴定正确的质粒 MT2A-pET32a 转化大肠埃希菌 BL21(DE3);挑取单克隆菌落于 10 mL 含氨苄西林的 LB 培养液,37 ℃ 培养过夜;按体积比 1 : 20 接种于新鲜的 10 mL 含氨苄西林的 LB 培养液,当 A₅₉₅ 到 0.5 时加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 ℃ 诱导表达 4 h;收集细菌,将菌沉淀用 BugBuster 裂解液重悬,以水平摇床低速混合,室温孵育 10~20 min,分离上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。

1.2.5 目的蛋白的纯化 大量制备和诱导 200 mL 阳性克隆菌,按上述方法进行细菌裂解,将裂解液用含 Ni²⁺ 的 His-bind 树脂亲和层析柱进行纯化,纯化的目的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。

2 结 果

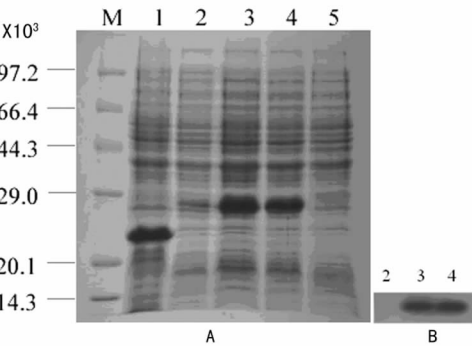
2.1 MT-2A 基因的克隆 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 100~250 bp 有一清晰条带,与预期(186 bp)一致(见图 1)。

2.2 重组质粒的构建 重组质粒 MT2A-pET32a PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 100~250 bp 有一清晰条带,与插入片段大小一致(见图 1)。测序结果表明,重组质粒插入序列与 GenBank 中 MT-2A 基因 cDNA(NM_005953.2)序列一致。



M: DNA 分子标记物;1~2: AD 质粒 PCR 产物;3~4: MT2A-pET32a 质粒 PCR 产物。

图 1 不同质粒 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳



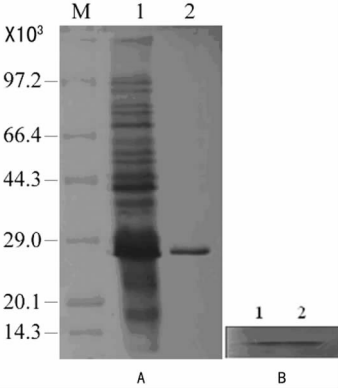
M: 蛋白分子标记物;1: PET-32a 空载体 IPTG 诱导;2: 未经 IPTG 诱导;3: 融合蛋白诱导粗提物;4: 裂解液上清液;5: 裂解液沉淀物。

图 2 融合蛋白 SDS-PAGE(A)、Western blotting(B)分析

2.3 IPTG 诱导融合蛋白表达 根据推算,融合蛋白相对分

子质量约为 29×10³。重组质粒转化细菌经 IPTG 诱导后,其培养液电泳显示新出现的蛋白质相对分子质量符合计算结果,且特异性表达水平最高(见图 2A)。以抗 MT 抗体进行 Western blotting 检测,在目的蛋白大小位置可见 1 条蛋白条带(见图 2B),表明所表达蛋白含有 MT-2A。

2.4 目的蛋白的纯化及鉴定 大量诱导细菌,裂解所收集细菌,进行小量蛋白批量纯化,获得 1.5 mL 洗脱液。进一步进行 SDS-PAGE 分析并用抗 MT 抗体进行 Western blotting 鉴定。结果显示,在相对分子质量 29×10³ 处有 1 条蛋白条带(见图 3),且纯化蛋白中所含杂质较少,纯化效果理想。



M: 蛋白分子标记物;1: 融合蛋白诱导粗提物;2: 纯化蛋白。

图 3 纯化蛋白 SDS-PAGE(A)、Western blotting(B)分析

3 讨 论

自 1954 年 Harman 提出衰老自由基理论以来,越来越多的研究从分子水平证实了自由基引起衰老的生理变化。衰老过程分为正常生理过程与病理病变过程两类,但二者又难以严格区别。生理性衰老最终以疾病形式表现出来,而许多疾病又会加速衰老进程,所以老年性疾病和衰老互为因果,而预防老年性疾病则取决于减慢衰老速率^[9]。在人体新陈代谢过程中,组织、细胞不断产生自由基,而自由基对细胞具有毒害作用,其不断产生是引起衰老的主要原因,并决定了人的寿命。因此,抗氧化剂也就是自由基清除剂,是哺乳动物寿命决定因子。

人体内有一套抗氧化系统,MT 就是其中的一种。MT 清除自由基的能力非常强,其调节作用主要体现为发育过程中的组织定位以及含量变化。Woo 等^[10]报道在胎鼠和新生鼠的肝细胞核中 MT 含量比较高,随后逐渐降低,出生 2 周后 MT 则主要集中在胞质中。Cherian 和 Apostolova^[11]认为细胞核中 MT 含量升高与转录因子对锌的需求相关,核 MT 可能具有保护细胞 DNA 和防止细胞凋亡的作用。MT 表达量升高能诱导细胞抗凋亡,而缺乏 MT 表达的细胞(如 MT 基因敲除)对细胞凋亡敏感,其作用机制是通过阻止氧化性细胞损伤达到抑制细胞凋亡的作用。研究发现,MT 含量较低的肝癌细胞中,其凋亡细胞的数目较多^[11]。MT 在细胞核与细胞质之间的转运还受到细胞周期的控制,在乳腺癌和结肠癌细胞中,都只能在 S 期而不是 G1 期细胞核中检测到 MT^[11]。MT 分子上并不存在定位信号,而 MT 向核转移主要受细胞能量驱动,但具体机制仍不明确^[6,8]。MT-2A 是 MT-2 中惟一具有生物学功能的蛋白质^[3],但它在衰老的发生过程中究竟具有什么作用还不明确。最近 Kayaalti 等^[12]报道,MT-2A-5 A/G 核心启动子区域的多态性与土耳其人的寿命相关。

大肠埃希菌表达系统是较为常用的蛋白表达系统,其优点是遗传背景比较清楚,表达水平较稳定,易操作,有许多菌株突变体和含强启动子的载体可供选择,且成本(下转第 516 页)

表 2 各组小鼠血清 IL-6、IL-8 检测结果(±s)		
组别	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)
对照组	37.50±3.50	62.50±5.43
模型组	108.75±6.35 [△]	250.00±6.78 [△]
黄芪组	67.56±7.80 [#]	85.00±7.86 [#]
赤芍组	71.25±5.63 ^{#*}	86.00±9.65 ^{#*}
合剂组	56.25±8.13 ^{#*▽}	68.00±1.23 ^{#*▽}

△:与对照组比较, $P<0.05$;#:与模型组比较, $P<0.05$;*:与黄芪组比较, $P<0.05$;▽:与赤芍组比较, $P<0.05$ 。

3 讨 论

IL-8 水平升高与肝脏炎性损害密切相关,在一定程度上反映了肝损伤程度^[5]。BCG 联合 LPS 诱导的小鼠免疫性肝损伤模型类似于人病毒性肝炎的急性或亚急性损伤过程,是研究病毒性肝炎的理想模型^[6]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组血清 ALT、AST 水平升高($P<0.05$),表明造模成功。黄芪中的黄芪多糖是黄芪主要有效成分,对细胞、体液及非特异性免疫和细胞因子活性均有调节作用^[7]。有研究显示,赤芍可抑制抑制性 T 细胞的功能,对体液和细胞免疫有较强抑制作用,可作为免疫抑制剂用于肝脏移植术或治疗自身免疫性肝病等^[8-12]。3 个给药组小鼠血清 IL-6、IL-8 水平低于模型组($P<0.05$),说明黄芪、赤芍及黄芪赤芍合剂均能有效降低免疫性肝损伤模型小鼠血清 IL-6、IL-8 水平。与黄芪、赤芍组比较,黄芪赤芍合剂组血清 IL-6、IL-8 水平更低($P<0.05$),说明黄芪赤芍合剂比黄芪或赤芍单一用药更能显著降低模型小鼠血清 IL-6、IL-8 水平。

综上所述,黄芪、赤芍、黄芪赤芍合剂均能降低免疫性肝损伤模型小鼠血清 IL-6 和 IL-8 水平,黄芪赤芍合剂优于黄芪、赤芍单独用药;监测接受黄芪或赤芍治疗的肝脏疾病患者血清 IL-6、IL-8 水平有助于合理用药、疗效观察及预后判断。

(上接第 514 页)

低、蛋白表达量高、容易纯化^[13]。本试验以酵母双杂交筛选获得的包含 MT-2A 序列的 AD 质粒为模板,成功扩增 MT-2A 的 DNA 片段,并构建重组表达质粒 MT2A-pET32a。在诱导表达中,最主要的是诱导剂 IPTG 的浓度和菌液的细菌浓度。当大肠埃希菌 BL21(DE3)菌液 $A_{595}=0.5$ 时,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导 4 h,可获得高表达量的重组蛋白。细菌裂解后分别取其上清液和沉淀物进行 SDS-PAGE 电泳,发现重组蛋白以可溶形式存在,这在很大程度上提高了下一步蛋白纯化的效率。His-bind 树脂亲和层析柱纯化步骤简单快捷,回收率高,特异性较高,通过纯化后获得纯度很高的重组蛋白(见图 3),为进一步研究其在细胞衰老发生中的作用奠定了基础。

参考文献

[1] Margoshes M,Vallee BL. A Cd protein from equine kidney cortex [J]. J Am Chem Soc,1957,79(23):4813-4814.
[2] Guo X,Chan HM,Guevremont R,et al. Analysis of metallothioneins by means of capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry with sheathless interfacing[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,1999,13(6):500-507.
[3] Coyle P,Philcox JC,Carey LC,et al. Metallothionein: the multipurpose protein[J]. Cell Mol Life Sci,2002,59(4):627-647.
[4] William RS. Metallothionein and the biology of aging[J]. Ageing Res Rev,2011,10(1):132-145.
[5] 姚朝阳,朱文文,牛敬媛,等. 金属硫蛋白医学研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2007,24(3):53-55.

参考文献

[1] 邢杰,陈英利,陶淑华,等. 免疫性肝损伤相关细胞因子研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(1):71-72.
[2] Kanzler S,Galle PR. Apoptosis and the liver[J]. Semin Cancer Biol,2000,10(1):173-184.
[3] 吕跃山,邢杰,陈英利,等. 黄芪赤芍对小鼠免疫性肝损伤抗氧化作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(2):302-303.
[4] 陈英利,邢杰,吕跃山,等. 黄芪、赤芍对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 贵阳医学院学报,2008,33(4):357-359.
[5] 吴戊年. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 含量与 IL-8、IL-10 水平检测及临床意义[J]. 兰州大学学报:医学版,2005,31(1):30-32.
[6] 赵骥,郑敏,鲍翠玉,等. 大蒜多糖 C 对免疫性肝损伤小鼠血清及肝组织 ALT、AST 的影响[J]. 咸宁学院学报:医学版,2005,19(1):24.
[7] 陈蔚,李益明,俞茂华,等. 黄芪多糖对糖尿病鼠 T 细胞亚群的免疫调节作用[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(1):28-31.
[8] 张永艳,赵文霞. 赤芍防治肝病的作用及机理研究[J]. 陕西中医,2003,24(7):655-656.
[9] 许惠玉,华东,于晓红,等. 赤芍总苷对荷瘤鼠体内 IL-10、IL-12、TGF-β1 分泌及细胞免疫功能的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2009,30(22):2737-2739.
[10] 张瑞宣. 加味黄芪赤芍饮对 RRI 的远期免疫作用研究[J]. 实用中西医结合杂志,1998,11(1):53.
[11] 许惠玉,官杰,吴艳敏,等. 赤芍总苷对环磷酰胺免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(20):3193-3195.
[12] 华东,吴明媛,于晓红,等. 赤芍总苷对荷瘤鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中医药学报,2004,32(1):47-48.

(收稿日期:2011-11-09)

[6] Reinecke F,Levanets O,Olivier Y,et al. Metallothionein isoform 2A expression is inducible and protects against ROS-mediated cell death in rotenone-treated HeLa cells[J]. Biochem J,2006,395(2):405-415.
[7] Talbourdet S,Sadick NS,Lazou K,et al. Modulation of gene expression as a new skin anti-ageing strategy[J]. J Drugs Dermatol,2007,6(Suppl):25-33.
[8] 陈维春,宋杰,刘振杰,等. 环指蛋白 RING1 与 A 型核纤层蛋白的细胞内相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展,2011,38(1):55-59.
[9] 童坦君,张宗玉. 衰老机制及其学说生理科学进展[J]. 生理科学进展,2007,38(1):14-18.
[10] Woo ES,Dellapiazza D,Wang AS,et al. Energy-dependent nuclear binding dictates metallothionein localization[J]. J Cell Physiol,2000,182(1):69-76.
[11] Cherian MG,Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),2000,46(2):347-356.
[12] Kayaalti Z,Sahiner L,Durakolugil ME,et al. Distributions of interleukin-6 (IL-6) promoter and metallothionein 2A (MT2A) core promoter region gene polymorphisms and their associations with aging in Turkish population[J]. Arch Gerontol Geriatr,2011,53(3):354-358.
[13] 徐宁,张战锋,黄宪章,等. PET32a-IL-1RI 重组质粒的构建及表达[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):964-966.

(收稿日期:2011-11-20)