

重组人类抗砷相关基因在大肠埃希菌的表达^{*}

何玲¹, 潘泽民¹, 谭晓华¹, 袁红琳¹, 刘仁海², 杨磊¹

摘要: 目的 构建含重组人类抗砷相关基因(human arsenic resistance related gene, hARRG)的表达载体,诱导其在转化菌表达,分离纯化表达蛋白,研究该蛋白质的理化性质、抗砷功能和免疫活性,深入研究人类对砷化物的抵抗作用。方法 将 hARRG cDNA 开放阅读框亚克隆到原核表达载体 Pet11C 中,用异丙基 - D - 硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达蛋白质,利用阴离子交换柱 Sepharose 纯化蛋白质,SDS - PAGE 胶电泳观察结果。结果 将 hARRG cDNA 成功亚克隆到原核表达载体 Pet11C 中,并成功在大肠杆菌中表达,表达的 hARRG 蛋白占菌体蛋白的 5% 左右,该蛋白质被分离纯化。结论 原核表达载体 Pet11C 可以在大肠杆菌中表达 hARRG cDNA,可用阴离子交换柱 Sepharose 纯化抗砷相关蛋白质。

关键词: 人类抗砷相关基因 cDNA;重组 DNA;原核表达;蛋白纯化

Expression of recombinant hARRG cDNA in E. coli and purification of hARRG protein HE Ling, PAN Ze-min TAN Xiaohua, et al. Laboratory of Molecular Medicine, Medical School of Shihezi University(Shihezi 832002, China)

Abstract: Objective To construct expression vector of the recombinant human arsenic resistance related gene (hARRG), induce its expression in DE₃ and isolate and purify expression product, for studying the physiochemistry characteristic, function and immune activity of the protein, and further researching the arsenic resistant effects of human. **Methods** hARRG cDNA was subcloned into prokaryotic expression vector Pet11C. The recombinant protein expression was induced by IPTG, then, the protein was purified by anions Ion - exchange column Sepharose and examined by SDS - PAGE gel. **Results** hARRG cDNA was successfully subcloned into prokaryotic expression vector Pet11C and expressed in E. coli and the protein was purified by anions Ion - exchange column successfully. **Conclusion** Pet11C expression vector containing hARRG cDNA was successfully constructed, the cell DE₃ transformed with expression vector capable of expression the gene and a hARRG protein could be purified by anions Ion - exchange column Sepharose.

Key words: hARRG cDNA; recombinant DNA; prokaryotic expression; protein purification

砷化物广泛分布于自然界,生物体接触砷化物后,可使许多基因表达发生变化。研究表明,原核生物和真核生物都具有通过抗砷相关基因的作用,来抵抗砷化物^[1,2],而人类对砷化物抵抗的分子生物学研究目前尚处于初始阶段。本文在克隆了人类抗砷相关基因(human arsenic resistance related gene, hARRG)的全长 cDNA,并在大肠埃希菌中表达^[3]的基础上,为进一步研究其表达产物的理化性质和功能,将 hARRG cDNA 的阅读框亚克隆到原核表达载体,分离并纯化表达产物。现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 限制性内切酶 Nde I 和 BamH I (Boehring Mannheim 公司产品);原核表达载体:Pet11C(Biolab 公司产品);菌株 E. coli DE3(由复旦大学生命科学院提供);异丙基 - D - 硫代半乳糖苷(IPTG),Sepharose 阴离子交换柱(法玛西亚公司产品)。

1.2 方 法

1.2.1 克隆与诱导表达 将 hARRG cDNA 阅读框亚克隆于

原核表达载体 Pet11C,诱导表达蛋白质:(1)以克隆载体为模板,PCR 扩增 hARRG cDNA 的 ORF 目的片段(正向引物 NF2:5' - cgcgcatatgagcacagctctgacc - 3' 含 NdeI 酶切位点,反向引物 BF2:5' - cgcgatcccgcgctcaaaagaatacaacatc - 3' 含 BamHI 酶切位点)。将目的片段和表达载体用 NdeI 和 BamHI 双酶切,16 连接过夜 16 h,转化到大肠埃希菌 Dh5 中。(2)筛选重组子,提取质粒,NdeI 和 BamHI 双酶切,按 Big - Dye Primer 和 Big - Dye Terminator 测序试剂盒说明书,使用 PE ABI 377 测序仪由联合基因有限公司进行 DNA 序列测定。(3)将测序正确的重组质粒转化到表达宿主菌 DE3 中。用 IPTG 诱导表达,观察蛋白质表达。

1.2.2 大量诱导表达目的蛋白 将表达菌接种于 3 个 3 ml 的 LB 液体培养基中,37 摇菌过夜,次日早晨将 8 ml 的菌液转接到 800 ml 的 LB 液体培养基中,摇菌 3 h,加 1 mol/L IPTG 800 μl 诱导表达 3 h,将菌液冰浴 20 min,

1.2.3 破菌收集蛋白 6 000 r/min,4 离心 5 min,收集沉淀菌,加 15 ml 的 50 mmol/L Tris - HCl 和 5 mmol/L EDTA 破菌液(pH7.8),室温 30 min,超声破菌,12 000 r/min,4 离心 10 min,收集上清液。

1.2.4 纯化蛋白质 离子交换层析 Sepharose 阴离子交换柱用 25 mmol/L Tris - HCl 和 1 mmol/L EDTA (pH7.5) 进样,5 mmol/L Tris - HCl 和 1 mmol/L EDTA 及 1 mol/L NaCl (pH7.5) 洗脱。

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(30060074)

作者单位:1. 石河子大学医学院分子生物学实验室,新疆石河子 832002;

2. 厦门大学生命科学学院

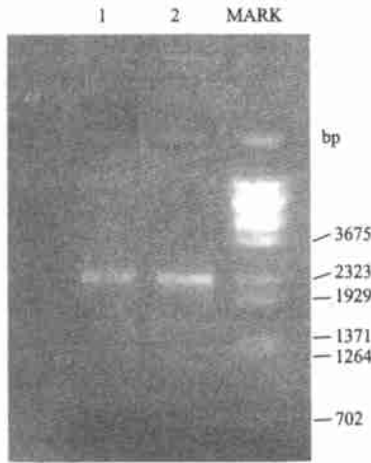
作者简介:何玲(1957 -),女,新疆石河子人,实验师,本科,主要从事生物化学与分子生物学研究。

通讯作者:杨磊

1.2.5 观察结果 用 8% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 观察结果。

2 结果

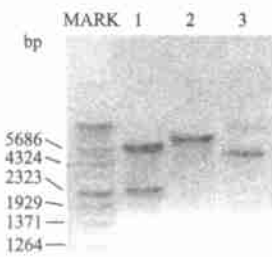
2.1 PCR 扩增目的片段 PCR 扩增 hARRG cDNA 目的基因, 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 可见 1 条 2 366 bp 的特异扩增带, 片段大小与理论预期一致 (图 1)。



1、2:hARRG cDNA ORF PCR 扩增产物

图 1 hARRG cDNA ORF 目的片段 PCR 扩增产物琼脂糖电泳分析

2.2 重组质粒的构建及鉴定 将目的基因 PCR 扩增带和表达载体 Pet11C 用 Nde I 和 BamH I 双酶切。T4 连接酶连接目的片段和原核表达载体, 转化后, 提取重组质粒, 并将其用 Nde I 和 BamH I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 重组质粒由 Pet11C 质粒 (5675 bp) 和 hARRG 目的片段 (2 366 bp) 组成 (图 2)。



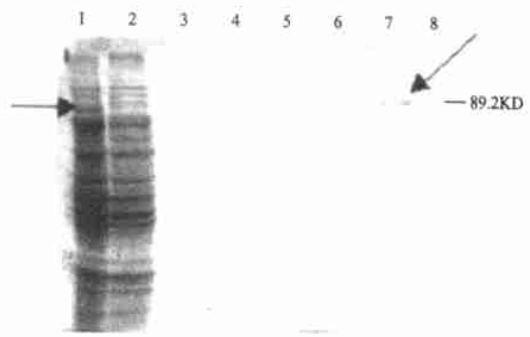
MARK: Lambda DNA - BstE ; 1: 重组质粒双酶切; 2: Pet11C 质粒

图 2 重组质粒双酶切 1% 琼脂糖电泳分析

2.3 诱导表达目的蛋白 重组表达载体转化入大肠埃希菌 DE3 中, 经 1 mol/L IPTG 诱导表达得到可溶性表达 hARRG 蛋白, 纯化蛋白质经 Sepharose 阴离子交换层析, 得到初步纯化的分子量为 89.2 KD 的 hARRG 蛋白 (图 3)。

3 讨论

自然界生物在进化过程中, 为了适应环境的变化, 产生了抵御环境中污染物的能力。目前对生物体抵抗砷毒性分子水平的研究表明^[4-6], 人类细胞抗砷作用较复杂, 参与的基因有多个。分析这些基因表达变化, 研究表达产物的性质及功能, 对于从分子水平阐明抗砷作用意义重大。



1 为 IPTG 诱导表达蛋白质, 2 为未用 IPTG 诱导表达蛋白质, 箭头所指为 hARRG cDNA 基因 ORF 表达蛋白, 3、4、5、6、7、8 为纯化蛋白的电泳图

图 3 蛋白纯化后 8% SDS - PAGE 胶电泳结果

本研究将 hARRG cDNA 的 ORF PCR 扩增, 并用 Nde I 和 BamH I 双酶切目的片段和表达载体 Pet11C。将目的片段和表达载体连接, 经转化、筛选后, 成功的将 hARRG cDNA ORF 亚克隆到原核表达载体。将重组表达质粒转化入大肠埃希菌 DE3 中, 用 IPTG 诱导表达出 hARRG 抗砷相关蛋白质, hARRG 蛋白占菌体蛋白的 5% 左右。说明可用亚克隆法构建含 hARRG cDNA 的原核表达载体 Pet11C, 使其在大肠埃希菌 DE3 中表达。虽然是可溶性表达, 但由于表达载体 Pet11C 是非融合表达载体, 目的蛋白纯化较困难。对 hARRG 蛋白进行生物信息学分析, 发现该蛋白质等电点为 5.61, 分子量是 89.2 kD, 据此, 本研究选择 Sepharose 阴离子交换柱进行层析。得到纯化的分子量为 89.2 kD 的 hARRG 蛋白。我们将继续研究该蛋白质的理化特征、抗砷功能和免疫活性, 以便更深入研究人类对砷化物的抵抗作用。

参考文献:

- [1] 潘泽民, 刘开泰, 杨磊. 砷对细胞和生物作用的研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2003, 20(3): 184 - 186.
- [2] Rossman TG, Wang Z. Expression cloning for arsenite - resistance resultd in isolation of tumor - suppressor fau cDNA: possible involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 1999, 20(2): 311 - 316.
- [3] 潘泽民, 杨磊, 黄瑾, 等. 人类抗砷相关基因 hARRG 全长 cDNA 的克隆和在 E. coli 中表达 [J]. 复旦学报 (自然科学版), 2000, 39(6): 623 - 627.
- [4] Rosen BP, Bhattacharjee H, Shi W. Mechanisms of metalloregulation of an Anion - translocating ATPase [J]. Jounral Bioenergetics Biomembranes, 1995, 27(1): 85 - 91.
- [5] Saltikov CW, Olson BH. Homology of Escherichia coli R733 arsA, arsB, and arsc genes in arsenic - resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic - enriched creek waters [J]. Appl Envir Microbiol, 2000, 68(1): 280 - 288.
- [6] Kobayashi I, Fujiwara S, Shimogawara K, et al. Insertional mutagenesis in a homologue of a Pi transporter gene confers arsenate resistance on the chlamydomonas [J]. Plant Cell Physiol, 2003, 44(6): 597 - 606.

收稿日期: 2003-12-17

(孔繁学编校)