

Ad5-knob 蛋白在大肠杆菌中可溶性表达及其活性检测

赵颜忠^{**}, 陈玉祥, 文路, 刘霆, 朱晒红

(中南大学湘雅三医院医学实验中心 湖南长沙 410013)

Soluble Expression, Purification and Characterization of Ad5-knob Protein

ZHAO Yan-zhong^{**}, CHEN Yu-xiang, WEN Lu, LIU Tin, ZHU Xi-hong

(Medical Experimental Center of 3rd Xiang-ya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract : Ad5-knob gene from AdEasy plasmid DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into an *E. coli* expression vector pQE30 digested with *Bam*H I and *Hind* III. After induction with IPTG, the transformed *E. coli* strain M15 expressed Ad5-knob gene efficiently. Moreover, the recombinant Ad5-knob protein mainly existed as a soluble protein. After one step purification with Ni²⁺-NTA affinity chromatography, the protein was purified to nearly homogeneity. N-terminal amino acid sequencing indicated N-terminus of purified Ad5-knob. When FITC-labeled Ad5-knob transfers Hela cells, it can specially bind to the receptor to the surface of Hela cells and enter the cytosol. It suggests that the recombinant Ad5-knob protein identified and purified is to be suitable for nonviral gene carriers as a target protein in future studies.

Key words : Adenovirus; Prokaryotic expression; Knob protein; Determination of activity

摘要 :采用 PCR 技术,从 AdEasy-1 质粒 DNA 中获得 knob 全长序列,克隆入 pGEM-T vector 中。DNA 测序鉴定后,构建 pQE-30/knob 重组表达载体,转化大肠杆菌 M15 pREP4),IPTG 诱导表达腺病毒 5 型纤维蛋白的 knob 功能域(Ad5-knob),SDS-PAGE 分析,表达产物主要以可溶性蛋白的形式存在于细菌裂解液上清之中。经 Ni²⁺-NTA 亲和层析一步分离纯化后,洗脱产物中 Ad5-knob 蛋白纯度超过 95%。N-端氨基酸测序证实了纯化产物为 Ad5-knob 蛋白,细胞受体结合实验检测到所得蛋白能够与 Hela 细胞上的相应受体特异性结合。上述结果表明在大肠杆菌中已经高效表达了可溶性 Ad5-knob 蛋白,一步即纯化该蛋白,并具有良好的生物活性,为其下阶段的深入研究提供了重要的实验材料。

关键词 :腺病毒;原核表达;knob 蛋白;活性检测

中图分类号:S 852.65 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)02-0193-04

目前专家认为限制基因治疗的关键技术是基因治疗的载体和转移基因的受控表达^[1],其中基因治疗新载体的研究和发现是研究基因治疗的核心问题^[2]。但目前绝大多数研究者仍然使用病毒来源的元件构建基因治疗载体。为了克服病毒型载体治疗的缺陷^[3],一系列的非病毒型载体(如阳离子脂质体^[4],硅纳米^[5]等)正被人们认识和利用,表现出低毒、大容量、易操作、易修饰等多种优越性,使设计和研制新的更理想的基因治疗载体成为可能。然而到目前为止,非病毒载体要想在临床上广泛应用,还面

临着许多挑战。由此可见,病毒型载体和非病毒型载体虽各有优势,但各自均存在着一定的弊端。如果能利用二者的优势,即将非病毒型载体与病毒载体的外壳糖蛋白(细胞膜受体结合蛋白)结合进行 DNA 目的基因共转染,将是一条新的研究方法。近几年来,按此思路进行基因转染的研究也取得了一定的进展^[6]。本文研究通过大肠杆菌对腺病毒衣壳蛋白的 Ad5-knob(腺病毒侵染细胞时的关键蛋白^[7])功能域基因的原核表达,经一步纯化就得到该蛋白纯品,为我们下一步与非病毒纳米载体连接进

收稿日期:2004-10-25,修回日期:2004-12-14

^{**} 通讯作者:赵颜忠(1973-),男,土家族,湖南石门籍人,助研,研究方向为基因治疗新载体。
Corresponding author. Tel: 13574892317, E-mail: yanzhongzhao@163.com

行基因靶向转移的研究提供了可靠保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 M15 (pREP4)、克隆载体 pGEM-T 和表达载体质粒 pQE-30 由本室保存;模板 pAdEasy-1 由 J. Liu 博士惠赠;限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为 Takara 公司产品;IPTG 购自 Promega 公司;Ni-NTA 亲和层析柱购自 Qiagen 公司;Hela 细胞由本室保存和培养。

1.2 目的 DNA 的制备

PCR 法制备: knob DNA 的引物设计:应用 Oligo 5.0 引物分析软件 (Oligo Primer Analysis Software) 分析已报道的 Ad5-knob 基因和 pQE-30 原核表达载体的多克隆位点并设计一对在 5 端分别加有限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的引物: knob-up 为 5'-GGATCCGGTGCCATTACA GTA GGAAA-3', knob-dn 为 5'-AAGCTTATTCTTGGGCAATGTATGA-3'。该对引物由上海生物技术公司合成。knob DNA 片段的准备:以 pAdEasy-1 为模板,采用 Taq DNA 聚合酶和上述引物进行 PCR 扩增: 94 变性 30s, 55 退火 30s, 72 延伸 1min, 重复 25 个循环。取扩增产物 10 μ L 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。用柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化并回收。回收产物用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 低熔点琼脂糖法回收 0.6 kb 的 knob DNA 片段备用。

基因克隆与鉴定:采用 pGEM-T 载体 (Promega 公司产品) 按说明书方法对纯化后 PCR 产物直接进行连接, 并转化 JM109 感受态大肠杆菌。挑取阳性克隆碱裂解法制备质粒, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。选取的重组质粒经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后电泳分析, 以及用上述引物并以所选重组质粒为模板作 PCR 分析, 进一步选出部分克隆送本室测定其插入片段的核苷酸序列, 并采用 DNStar 软件分析其与 Ad5-knob 基因的同源性。

1.3 重组表达质粒 pQE-30/knob 的构建

将含有 Ad5-knob 基因插入片段的 T 载体重组质粒经扩增培养后, 采用 Promega 公司质粒纯化试剂盒抽提和纯化质粒。重组质粒 pGEM-T/knob 和 pQE-30 的 DNA 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 于 37 水浴 2 h, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, Promega 公司酶切产物纯化试剂盒

(Wizard DNA Clean Up System) 分别纯化目的片段和质粒。纯化的目的片段和 pQE-30 载体酶切片段参照文献方法^[8]进行连接, 连接产物转化 JM109 感受态大肠杆菌, 倒皿用铺菌器铺于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 倒置于 37 培养过夜。碱裂解法制备质粒, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳筛选, 抽提筛选的重组质粒 pQE-30/knob 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进一步筛选。筛选的阳性重组克隆最后经核苷酸序列测定鉴定。根据 pQE-30 插入部位设计的测序引物, 正向测序引物为 5'-TGTGA GCGGATAACAA TTTTC-3', 反向测序引物为 5'-CTTCCTTAGCTC CTGAAAAT-3', DNA 测序鉴定。

1.4 Ad5-knob 蛋白在大肠杆菌中的表达与可溶性分析

取鉴定出的重组表达质粒 pQE-30/knob 转化 M15 大肠杆菌, 并接种于 3 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 氯霉素的 LB 培养基中, 37 过夜培养。取 10 mL LB 培养基, 加入 0.1 mL 过夜菌 37 剧烈振荡至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 时, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5h, 离心收集菌体后用裂解缓冲液 (50mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 0.5% Triton-X 100, 5% 甘油和 5mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0) 重悬, 超声破菌后, 10,000g 离心 30min, 分别取上清和沉淀的作 SDS-PAGE 检测。

1.5 重组可溶蛋白的分离与纯化

准备 1mL Ni-NAT 柱, 加 10mL 裂解缓冲液 (同上) 平衡 Ni-NAT 柱, 流速为 1mL/min, 加入含蛋白的裂解缓冲液, 流速为 0.5mL/min, 加 10ml 洗涤缓冲液 (50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl, 200mmol/L 咪唑, 0.5% Triton-X 100, 5% 甘油和 5mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0) 冲除去杂蛋白, 加入 10mL 洗脱缓冲液 (50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl, 250mmol/L 咪唑, 0.5% Triton-X 100, 5% 甘油和 5mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0) 洗脱目的蛋白。各管收集作 SDS-PAGE 检测。

1.6 重组表达 Ad5-knob 蛋白的确定

1.6.1 N-端氨基酸序列分析: 纯化的 Ad5-knob 蛋白上样进行 SDS-PAGE, 1 μ g/孔, 转移于 PVDF 膜上, 考马斯亮蓝 (Commassi Blue) 染色、脱色后, 干膜。用多肽氨基酸序列测定仪对电泳条带进行 N-端氨基酸顺序分析^[9]。

1.6.2 重组蛋白的荧光标记及其细胞受体结合实验: 蛋白的荧光标记和纯化方法按 FITC 荧光标记

试剂盒(Sigma)操作方法进行。将生长状态良好的 HeLa 细胞传代至 24 孔板(5×10^4 细胞/孔), 37°C 5% CO_2 培养 12~24h,使细胞达到 50%~70% 覆盖率。将标记异硫氰酸荧光素的 knob (FITC-knob) (1mg/mL) 与适量培养液混合,其体积刚好能覆盖细胞表面为佳(约 0.3~0.5mL)。为了观察 knob 同步进入细胞的过程,可将上述混合液加入 Hank's 液洗过的培养细胞后,先在 4°C 孵育 1~2h,再放到 37°C 5% CO_2 中孵育 10~30min。用培养液洗两遍,去除未吸附的 knob 蛋白。同时另设一系列对照组:空白组、FITC 组、阴性 FITC-BSA(白蛋白)组、knob 组、knob + FITC-knob 组和 FITC-knob 组。激光共聚焦扫描显微镜下于 0.5~2h 内观察 FITC-knob 在细胞内的动态过程并照相。

2 结果

2.1 Ad5-knob 基因的克隆

用 Ad5-knob 引物 knob-up 和 knob-dn 从质粒 pAdEasy-1 上扩增 knob 基因序列,电泳检测表明:该扩增产物仅含一条带,长约 0.6 kb,与文献报道的大小一致。

2.2 重组表达质粒 pQE-30/knob 的构建

重组质粒酶切鉴定结果见图 1, pGEM-T/knob 和 pQE-30/knob 阳性重组克隆通过 *Bam*H I 和 *Hin*dIII 双酶切,有约 0.6 kb 的 Ad5-knob 片段;两次序列测定的结果通过 DNStar 核酸蛋白分析软件比较分析,其序列与文献报道^[12]的序列完全一致。

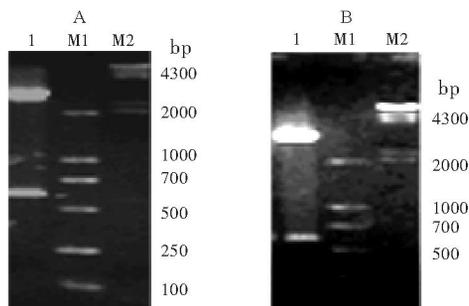


图 1 Ad5-knob 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Analysis of recombinant plasmid

A: M, DNA markers; Lane 1, pGEM-T/knob digested by *Bam*H I + *Hin*dIII. B: M, DNA markers; Lane 1, pQE-30/knob digested by *Bam*H I + *Hin*dIII.

2.3 Ad5-knob 基因的表达及重组蛋白的可溶性分析

取上述克隆 pQE-30/knob,以 1:100 接种到 3mL 含双抗的 LB 培养基中, 37°C 培养 4h,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,继续培养 4h,离心后弃上清,加入 100 μL 蛋白载液,95 $^\circ\text{C}$ 水浴 5min,

取 10 μL 进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明:与含空载体 pQE-30 的细菌相比,含 knob 基因的转化菌在相对分子质量 22 kDa 处有一条极浓的目的蛋白带。取克隆 pQE-30/knob 进行放大培养,收集细菌,超声破碎,离心分离上清和沉淀,分别进行 SDS-PAGE 分析。结果表明:重组蛋白主要以可溶的形式存在于细菌裂解液上清之中,沉淀中也有一定量的目的蛋白带(图 2A)。

2.4 重组 Ad5-Knob 蛋白的分离纯化

根据上述结果,我们采取了可溶性蛋白的纯化策略,用 Ni-NTA 亲和层析柱对重组蛋白进行了分离纯化,分步收集洗脱成分,每管 1.5mL,然后对各管进行 SDS-PAGE 分析。结果显示:在分子量约 22 kDa 的位置上有单一条带,仅前 2 管含有蛋白成分,重组蛋白绝大部分分布在第 2 管,且其纯度超过 95%(图 2)。

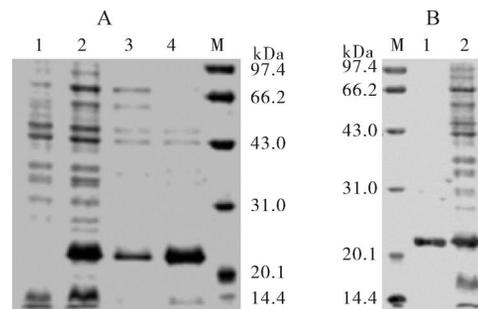


图 2 重组的 Ad5-knob 蛋白表达与纯化后的分析

Fig. 2 Electrophoretic analysis of expressed and purified Ad5-knob protein

A: lane 1, uninduced *E. coli* M15 cells by IPTG; lane 2, induced *E. coli* M15 cells by IPTG; lane 3, inclusion bodies of *E. coli* M15 cells lysate; lane 4, soluble part of *E. coli* M15 cells lysate; lane M, protein molecular weight marker; B: lane M, protein molecular weight marker; lane 1, the recombinant knob protein purified by affinity chromatography; lane 2, soluble part of *E. coli* M15 cells cell lysate.

2.5 重组 Ad5-knob 蛋白的鉴定

2.5.1 N-端氨基酸序列分析:N-端氨基酸序列分析测定 15 个氨基酸,结果为 6 \times His-GS-GAITVGN。6 \times His(组氨酸残基)为序列标签,后 2 个氨基酸残基甘氨酸丝氨酸(GS)则由 pQE-30/knob 载体上 *Bam*H I 位点(5'-GGA TCC-3')所带来的,自 GS 开始则为 Ad5-knob 的氨基酸残基,与预测值完全一致。

2.5.2 重组 Ad5-knob 蛋白的活性检测:由于在 HeLa 细胞表面存在 Ad5-knob 蛋白膜受体^[10,11],所以可以用细胞受体结合实验检测 Ad5-knob 蛋白的活性。结果表明:FITC-knob 组转染的细胞在显微镜下显示荧光,荧光首先在细胞膜周围聚集并逐渐增加,随后在胞质中及胞核(见图 3)。用未标记的

Ad5-knob 事先封闭的 knob-FITC 组或 FITC-BSA 组及其他对照组转染细胞后在显微镜下未见任何荧光,说明 Ad5-knob 蛋白能与细胞受体特异性的结合,表现出良好的生物活性。

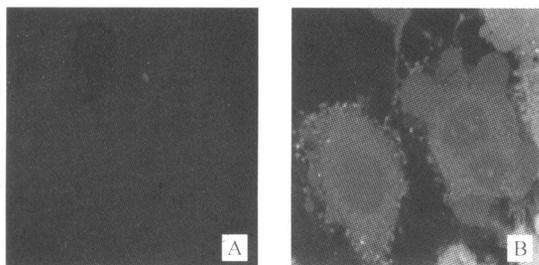


图3 细胞受体结合实验

Fig.3 Cell Receptor binding assay

A: Control Groups; B: FITC-labeled group, Ad5-knob protein can be seen clearly on the HeLa cellular surface and entering into the cytosol.

3 讨论

在本研究中,我们根据 GenBank 中的 Ad5-knob 基因序列,自行设计了一对引物,成功地从 pAdEASY-1 克隆了 Ad5-knob 全长基因,并构建表达载体。得到的基因序列经测序分析与 GeneBank 所报道的完全一致。

pQE-30 表达载体属于 PDS 质粒家族。这种低拷贝质粒具有许多优点,例如,它含有噬菌体 T5 启动子和两个乳糖操纵序列构成的最适启动子-操纵子成分,有合成的核糖体结合位点以确保高转录效率;有 -内酰胺酶基因以有利于氨苄青霉素的抗性筛选;有转录终止密码以保证转录的及时终止。另外,它还含有 6 个组氨酸的编码序列,克隆基因可插入其 6 × His 标签下游,形成 N 末端融合蛋白,融合蛋白表达系统可克服转录和转录后水平对外源基因表达可能带来的不利影响。由于其包含了 6 × His 标签可方便采用 Ni²⁺-NTA 系统进行分离与纯化。在本研究中,我们成功地将 Ad5-knob 基因克隆到 pQE-30 表达载体中,经 IPTG 诱导成功地表达了分子量约为 22 kDa 的目的蛋白。通过 Ni²⁺-

NTA 系统的一步纯化,纯度可达到 95% 以上,而且通过荧光标记对其活性的检测,有着较高的活性和特异性。本研究建立了 Ad5-knob 原核表达系统,并得到了高效表达,为 Ad5-knob 与非病毒载体连接进行有效基因转染准备了材料,也为进行 Ad5-knob 的进一步深入研究提供了一定条件。

参考文献

- [1] 顾建人,基因治疗的现状与对策[J]. 中华医学杂志,1997,77:723-724.
- [2] Mashall E. Gene therapy. NIH picks three gene vector centers[J]. Science. 1995,269(5225):751-752
- [3] Barnett B G, Crews C J, Douglas J T. Targeted adenoviral vectors[J]. Biochim Biophys Acta. 2002,1575(1-3):1-14.
- [4] 张阳德,阳离子脂质体及其在基因转移和基因治疗中的应用[J]. 中国现代医学杂志,2001,11:28-30.
- [5] Chen Y, Xue Z, Zhao Y, et al. Sodium chloride modified silica nanoparticles as a non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cells[J]. Curr Gene Ther, 2003,3(3):273-279.
- [6] Navarro J, Oudrhiri N, Fabrega S, et al. Gene delivery systems: Bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors[J]. Adv Drug Deliv Rev,1998,30(1-3):5-11.
- [7] Molinier F V, Prevost BA, Hong S S, et al. The maturation of murine dendritic cells induced by human adenovirus is mediated by the fiber knob domain[J]. J Biol Chem, 2003,278(39):37175-37182.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Kennedy TE, wager-Smith K, Barzilai A, et al. Sequencing proteins from acrylamide gels[J]. Nature, 1988,336:499.
- [10] Hong S S, Galaup A, Peytavi R, et al. Enhancement of adenovirus-mediated gene delivery by use of an oligopeptide with dual binding specificity[J]. Hum Gene Ther, 1999,10(16):2577-2586.
- [11] Bergelson J M, Cunningham J A, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5[J]. Science, 1997,275:1320-1323.
- [12] Chroboczek J, Jacrot B. The sequence of adenovirus fiber: similarities and differences between serotypes 2 and 5[J]. Virology, 1987,161(2):549-554.