

SD 大鼠 B₂ - 晶体蛋白的克隆、表达与纯化*

刘梦蕾,李闻捷,蔡刚,张燕,张军

(第二军医大学长海医院中心实验室 上海 200433)

【摘要】目的 得到大量纯的 B₂ - 晶体蛋白,为研究其生物学特性及潜在的生理功能打下基础。方法 从 SD 大鼠晶状体中抽提总 RNA,用 RT-PCR 法克隆 B₂ - 晶体蛋白的 cDNA,装入原核表达载体 pGEX - 4T - 1 后用萘啶酮酸 (IPTG) 诱导表达;用 GST 纯化系统纯化并用蛋白水解酶对融合蛋白进行酶切。结果 B₂ - pGEX 重组质粒经测序及限制性内切酶分析等鉴定,与预期结果一致;IPTG 诱导后,蛋白质在大肠杆菌 BL21 中得到高效表达。纯化酶切后,经 Western blot 方法验证,得到了高纯度的 B₂ - 晶体蛋白。结论 成功构建了 B₂ - pGEX 原核表达载体,高效表达了 B₂ - GST 融合蛋白,经纯化和酶切得到了高纯度的 B₂ - 晶体蛋白,为进一步研究其生物学特性及潜在的生理功能打下基础。

【关键词】 B₂ - 晶体蛋白;克隆;表达;纯化;大肠杆菌

[中图分类号] Q 51

[文献标识码] A

[文章编号] 1008 - 634X(2005)01 - 0001 - 03

Clone, Expression and Purification of SD rat B₂ - Crystallin LIU Meng-lei, LI Wen-jie, CAI Gang, et al.

(Central laboratory, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To obtain lots of pure B₂ - crystallin for the base of studying it's biologic characteristic and potential physical functions. **Methods** The cDNA of Rat lens was obtained by PR - PCR using the total RNA got from rat lens as moulding board, then cloned into pGEX - 4T - 1 vector and induced by IPTG. Purification and cutting by protease was done refer to the specification of the GST purification system. **Results** The constructed recombinant B₂ - pGEX plasmid had been identified by restriction endonuclease cutting and sequencing. The expression of the recombinant plasmid was identified by Western blot. **Conclusions** The recombinant B₂ - pGEX plasmid had been constructed and expressed correctly, and the purification was successful. The obtaining of pure B₂ - crystallin lays the further study of it's biologic characteristic and potential physical functions.

【Key Words】 B₂ - crystallin; Clone; Expression; Purification; Escherichia coli

晶体蛋白的三种主要组份:、及在老化过程中发挥不同的作用。目前,对于 - 晶体蛋白的特性及生物作用机理已有较深入了解,并确认了 - 晶体蛋白最重要的生物功能——伴侣蛋白(chaperone)作用^[1,2];但对晶体的另一个重要结构蛋白 - 族的生物学特性及潜在的生理功能,所知较少。族晶体蛋白含有多种晶体蛋白,包括 B₁、B₂、B₃、A₁、A₂、A₃、A₄ 晶体蛋白。其中 B₂ 是族中含量最高的一种晶体蛋白,在大鼠的老化过程中,该水溶性蛋白的相对含量随老化呈“反常”年龄依赖性升高,与通常的概念(老化使水溶性蛋白成份下降)相反^[3]。为了探讨族的主要晶体蛋白成分 B₂ 含量的时相变化对眼晶体老化的影响,以及其它潜在的生物学功能,得到大量纯的 B₂ - 晶体蛋白是要解决的关键问题之一。

本研究成功构建 B₂ - pGEX 原核表达载体,在大肠杆菌 BL21 中高效表达了 B₂ - GST 融合蛋白,并经

纯化、酶切,去掉了 GST,得到了大量高纯度的 B₂ - 晶体蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 工具酶及试剂盒 柱离心式 DNA 抽提试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司;Trizol 购自 Gbco 公司;RT-PCR 试剂盒、核酸内切酶 BamH I、Sal I 及 DL2000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司;高保真 Taq DNA 聚合酶购自上海生物工程有限公司;胶回收试剂盒购自维特杰公司;引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成;测序由 Genecore 公司完成;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天;B₂ - 晶体蛋白的一抗(羊抗鼠)、二抗(辣根过氧化物酶标记并纯化过的兔抗羊的多克隆抗体)均购自 Santa cruz 公司。

1.1.2 菌株及质粒 pMD18 - T 载体购自 TaKaRa 公

* 基金项目:国家自然科学基金(30470681)。
作者简介:刘梦蕾,女,硕士,从事白内障大鼠晶体蛋白的研究。

司, pGEX-4T-1 原核表达载体、大肠杆菌菌株 BL21 及 GST 蛋白纯化试剂盒均购自 Pharmacia 公司。

1.1.3 实验动物 1 周龄 SD 大鼠购自本校实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 β_2 - 晶体蛋白 cDNA 的克隆 以 1 周 SD 大鼠晶状体为材料, 常规方法抽提总 RNA; 按参考文献^[4]设计引物, 上游引物为: 5' - ACCTCGACACCA-GAGAGTCC - 3', 下游引物为: 5' - TTAGCTG-GAGGGGTGGAAG - 3'; PCR 扩增后克隆入 pMD18-T 载体, 用 EcoR I 和 Hind III 双酶切的方法鉴定。

1.2.2 原核表达载体的构建 参照大鼠 β_2 - 晶体蛋白 cDNA 的序列^[4]设计引物如下: Pb: 5' ATAGGATC-CGCCTCAGACCACCAGA - 3', Ps: 5' ATTGICGACT-TAGCTGGAGGGGTGGA - 3', 用高保真 Taq 酶进行 PCR 反应, 反应产物和 pGEX-4T-1 质粒均用 BamH I、Sal I 双酶切, 然后于 16 连接过夜, 转化入感受态宿主菌 BL21, 次日挑选阳性克隆, 双酶切鉴定。

1.2.3 GST- β_2 融合蛋白的表达 将含有 β_2 - 晶体蛋白 cDNA 质粒的转化菌在 5ml 氨苄抗性的 2 × YTA 培养基中培养过夜, 次日转移入 500ml 相同的培养液中, 用 0.3mM ZPTG 于 30 诱导 3~4h。

1.2.4 纯化的 β_2 - 晶体蛋白获得 将诱导后的细

菌沉淀按 0.5ml/g 加入 1 × PBS 缓冲液重悬后超声裂解, 将裂解上清与 Glutathione Sepharose 4B 室温结合 30min~1h 后, 上柱。弃去流下的液体, 再用缓冲液反复清洗, 彻底清除未与结合的杂蛋白。然后按操作说明加入 Thrombin Protease, 20 轻微振摇 16h。回收流下的液体。

1.2.5 SDS-PAGE SDS-PAGE 用常规方法, 分离胶浓度为 10%。用图像分析仪对凝胶中的 GST- β_2 融合蛋白进行分析对比。

1.2.6 β_2 - 晶体蛋白的鉴定 用 Western 印记鉴定重组蛋白。

2 结果

2.1 大鼠 β_2 - 晶体蛋白 cDNA 的克隆

以上游引物和下游引物进行 PCR, 扩增产物的大小为 640 bp。克隆入 T 载体后, 在载体自带的 EcoR I 和 Hind III 位点处行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳显示克隆的目的基因条带位于 500bp~750bp 之间, 同预期的结果一致(图 1)。测序结果(略)与文献^[4]相同。

2.2 原核表达载体的构建

抗性筛选后挑阳性菌落, 并少量制备的质粒 DNA, 经 BamH I、Sal I 双酶切证实了目的基因的插入(图 2)。测序结果与文献^[4]相同。

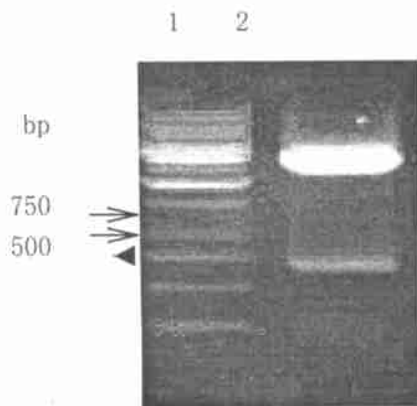


图 1 大鼠 β_2 - 晶体蛋白基因克隆入 pMD18-T 载体后的 EcoR I、Hind III 双酶切结果

Fig.1 EcoR I and Hind III double restriction endonuclease digestion analysis of the cDNA of rat β_2 -cristallin cloned into pMD18-T vector

1. DNA Marker; 2. 阳性克隆的酶切结果

1. DNA Marker; 2. The result of endonuclease digestion analysis of a positive clone

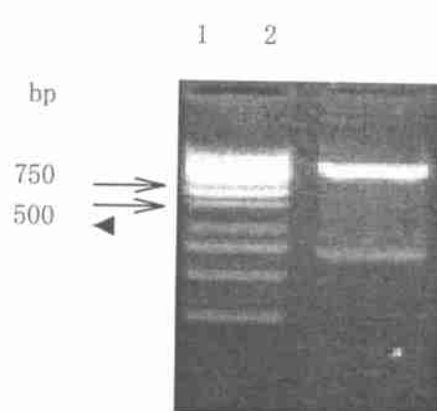


图 2 大鼠 β_2 - 晶体蛋白基因克隆入 pGEX-4T-1 原核表达载体后的 BamH I、Sal I 双酶切结果

Fig.2 BamH I and Sal I double restriction endonuclease digestion analysis of the cDNA of rat β_2 -cristallin cloned into pMD18-T vector

1. DNA Marker; 2. 酶切结果

1. DNA Marker; 2. The result of endonuclease digestion analysis of a positive clone

2.3 GST- β_2 融合蛋白表达

转化菌经 IPTG 诱导后在大约 50KD 的位置出现

一明显条带。文献报道的大鼠 B_2 -晶体蛋白的分子量约 24KD,加上 GST 自身的 29KD,融合蛋白的大小应为 53KD,与本实验结果相符(图 3)。细菌经超声裂解后离心,沉淀和上清分别做 SDS-PAGE 分析,结果显示 GST- B_2 融合蛋白主要存在于上清中(图 4)。

2.4 纯化的 B_2 -晶体蛋白获得

将纯化酶切后收集的液体进行 SDS-PAGE,结果显示,在约 24KD 位置处有一很纯的蛋白条带,而在 GST 相应的 29KD 处无条带(图 4)。

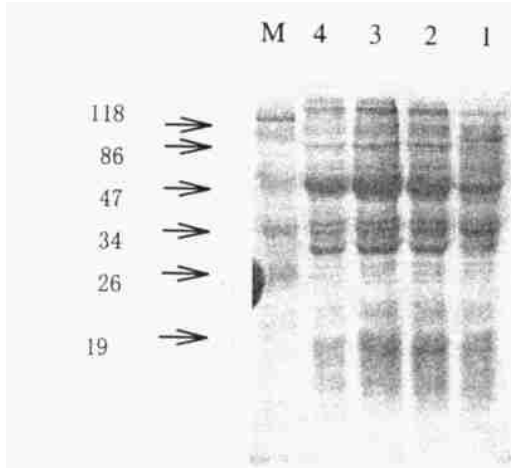


图 3 βB_2 -GST 融合蛋白的表达

M: MBI 预染蛋白分子量标准; 1: 未诱导的空白对照; 2: 诱导 1h; 3: 诱导 2h; 4: 诱导 4h

Fig. 3 Expression of GST- βB_2

M: prestain protein maker; 1: uninduced; 2: induced 1h; 3: induced 2h; 4: induced 4h

2.5 B_2 -晶体蛋白的鉴定

免疫印记结果显示, B_2 -晶体蛋白的抗血清能识别用大肠杆菌表达的蛋白质(图 5), 结合之前的 cDNA 序列分析, 可以确定该蛋白为 B_2 -晶体蛋白。

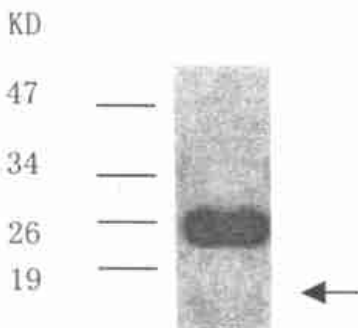


图 5 B_2 -晶体蛋白的 Western blot 分析结果

Fig. 5 Analysis of B_2 -crystallin by Western blot

3 讨论

α -晶体蛋白是广泛存在于脊柱动物晶状体中的一类主要结构蛋白。它由分子量为 23~24kD 的至少 7 种亚基组成 (B_1 、 B_2 、 B_3 、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4), 在不

图 4 表达后细菌的超声裂解与 βB_2 -GST 融合蛋白的纯化

M: MBI 预染蛋白分子量标准; 1: 纯化后的 βB_2 -晶体蛋白; 2: 裂解上清; 3: 裂解沉淀

Fig. 4 sonicate of the Escherichia coli and purification of βB_2 -GST

M: prestain protein maker; 1: pure βB_2 -crystallin; 2: the supernatant after sonicate 3: the insoluble material after sonicate

同条件下可形成二聚体至八聚体。无疑它们在保证晶状体结构的完整性方面起重要作用。 B_2 -晶体蛋白是 α -晶体蛋白中含量最多的一种^[5], 由于各种 α -晶体蛋白之间的物理化学性质相近, 故分离纯化较困难。克隆 B_2 -晶体蛋白的 cDNA 并表达、纯化、酶切融合蛋白, 可获得大量纯化的 B_2 -晶体蛋白。

为了排除 GST 对后期 B_2 -晶体蛋白功能研究的影响, 我们在大肠杆菌中高效表达 GST- B_2 融合蛋白后, 用纯化及酶切合并进行的方法, 简便、快速、有效地切除了 GST, 获得了高纯度的目的蛋白, 为进一步研究其功能打下了基础。

在大肠杆菌中高效表达外源基因时, 表达的蛋白质常在胞质内形成包涵体。本文结果显示 B_2 -晶体蛋白在大肠杆菌中表达量占细菌总蛋白的 30%, 但未形成包涵体。但按常规条件 1mM IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 4h 时, 表达的蛋白质在胞质中形成了包涵体, 可见诱导条件适合与否对包涵体的形成有很大的影响。

参 考 文 献

[1] Horwitz J. Alpha-crystallin[J]. Exp Eye Res, 2003, 76(2): 145.
 [2] Horwitz J. The function of alpha-crystallin in vision[J]. Semin Cell Dev Biol, 2000, 11(1): 53.

- [3] 李闻捷, Joseph - Fu S. - C. 晶体蛋白 B₂ 对眼晶体老化的影响[J]. 中国病理生理杂志 2004, 20(10):1905.
- [4] Aarts HJ, Lubsen NH, Schoenmakers JG. Crystallin gene expression during rat lens development[J]. Eur J Biochem, 1989, 183(1):31.
- [5] 赵惠仁, 胡书群, 裴冬升, 等. 大鼠 B₂ - 晶体蛋白的克隆、高效表达及纯化[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(1):21.

(收稿:2004 - 09 - 20)

·课题综述·

晶体蛋白与白内障学研究进展

Advances in Crystallin and Cataractogenesis

刘梦蕾 综述, 李闻捷 审校*

(第二军医大学长海医院中心实验室 上海 200433)

【提 要】 白内障是严重影响人类健康的常见病、多发病。研究白内障的病因学及影响因素, 是控制和防治该病的有力措施。白内障的发生是由晶体的透光性改变所引发的, 晶体的透光性是由晶体的有序结构所决定的。本文综述近年来有关晶体蛋白的组成与结构、翻译后修饰特别是氧化损伤与白内障发病机制的关系。

【关键词】 晶体蛋白; 结构; 翻译后修饰; 白内障

[中图分类号] Q 51

[文献标识码] A

[文章编号] 1008 - 634X(2005)01 - 0004 - 04

1 晶体蛋白(Crystallin) 组成及结构

晶体蛋白是人类晶状体细胞浆中主要的结构蛋白, 在晶状体水溶性蛋白中约占 90%。它与周围的细胞骨架蛋白相互结合, 整齐排列, 保持晶状体的透明性。根据其在电场中的迁移能力, 主要分为 α 、 β 、 γ 三类晶体蛋白。

1.1 α - 晶体蛋白

α - 晶体蛋白是三类晶体蛋白中含量最高的一种 (>50%), 它分为 A - 晶体蛋白和 B - 晶体蛋白(分子量都在 20kD 左右)。在人类, A 基因位于第 21 号染色体, 编码 173 个氨基酸残基的多肽; B 基因位于第 11 号染色体, 编码 175 个氨基酸残基的多肽, 并且 A 和 B - 晶体蛋白之间有 57% 的氨基酸序列同源性^[1]。A - 晶体蛋白仅局限于晶状体内表达, 其它组织仅有痕量被发现^[2], 因此, 可以说 A - 晶体蛋白是晶体特异性蛋白。B - 晶体蛋白的表达广泛, 在晶体外组织中亦有存在, 特别是在脑、心和肌肉组织中含量比较丰富。此外, 在某些神经系统疾病状况下, 可在外周血中查及。

α - 晶状体蛋白质的二级结构以 β - 片层为主, α - 螺旋仅占不到 20%^[3]。其三级、四级结构目前仍不清楚, 不同学者提出不同的模型假设, 如“三层球状模型”^[4]、“蛋白 - 胶粒”样结构^[5], 立方形和菱形十二

面体^[6]、GroEL 样模型^[7]等。对重组 B - 晶体蛋白的四级结构的研究发现: B - 晶体蛋白形成了一个直径在 8~18nm 的球形多聚体, 中间有一很大的中央空洞, 且呈不对称型^[8]。研究表明, α - 晶体蛋白的四级结构是很多变的, 这可能与其 C - 端结构域暴露有关。

α - 晶体蛋白的分子伴侣功能已得到广泛认同, 可阻止蛋白热变性及非特异性聚集, 保证了晶体的正常透光性。但随着老化或某些疾病的发生发展, α - 晶体蛋白易发生翻译后修饰等改变, 分子伴侣功能逐渐减低, 导致晶状体蛋白质有序结构遭受破坏以及有关酶类的失活, 加剧光线散射, 形成晶状体混浊。

1.2 β - 和 γ - 晶体蛋白

β 和 γ 晶体蛋白的序列约有 30% 的同源性^[3]。

β - 晶体蛋白有若干种多肽, 其中约有 6 种多肽 (A1/3、A2、A4 及 B1、B2、B3) 是基因产物, 其它则是翻译后修饰衍生物或是高分子量聚合物(HMW)。这 6 种 β - 晶体蛋白被分为两大类: 酸性蛋白, 包括 A1/3、A2、A4 - 晶体蛋白; 碱性蛋白, 包括 B1、B2、B3 - 晶体蛋白。其中 A1/3 - 晶体蛋白被定位于 17q11.2 - 12.1, A2 - 晶体蛋白基因位于 2q34 - 36, A4 与 B1、B2、B3 - 晶体蛋白基因同时被定位在 22q11.2 - 12.1。B2 - 晶体蛋白在该族蛋白中相对含量最高^[9], 抗修饰变异能力强。大部分该族晶体蛋

* 作者简介: 刘梦蕾, 女, 硕士, 从事白内障大鼠晶体蛋白的研究。