

技术方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.017

人 $\alpha 1$ 微球蛋白质的克隆、表达、纯化及生物学活性鉴定

张阳丽, 汪德强

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

【摘要】目的: 构建人 $\alpha 1$ 微球蛋白质($\alpha 1$ -microglobulin, $\alpha 1M$)基因的原核表达质粒, 在大肠杆菌中表达 $\alpha 1M$ 蛋白质, 纯化并初步鉴定其生物学活性。方法: PCR 扩增 $\alpha 1M$ 基因序列, 然后转化入大肠杆菌 B834 中进行表达, 利用镍离子亲和层析、离子交换层析及分子筛纯化, ABTS 法鉴定其生物学活性。结果: 正确构建了 $\alpha 1M$ 的表达质粒, $\alpha 1M$ 在大肠杆菌 B834 中为可溶性上清表达, 纯化获得了纯度高达 95% 的 $\alpha 1M$ 蛋白质, 分子筛结果显示其在溶液中呈现单体和二聚体 2 种聚集状态, ABTS 法结果显示了重组获得的 $\alpha 1M$ 具有抗氧化活性。结论: $\alpha 1M$ 能在大肠杆菌 B834 菌中大量上清表达, 且易于纯化, 初步鉴定具有抗氧化活性, 为下一步进行 $\alpha 1M$ 蛋白质的晶体结构解析和相关功能研究奠定了基础。

【关键词】人 $\alpha 1$ 微球蛋白质; 表达; 纯化; 活性鉴定**【中国图书分类法分类号】**R34**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-11-16

Clone, expression and purification of human $\alpha 1$ -microglobulin as well as its bioactivity identification

ZHANG Yangli, WANG Deqiang

(College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To construct the expression vector of human $\alpha 1$ -microglobulin ($\alpha 1M$) gene, express $\alpha 1M$ protein in Escherichia coli (*E. coli*), purify recombinant $\alpha 1M$ protein and to verify its bioactivity. *Methods:* The $\alpha 1M$ gene sequence was amplified by PCR and $\alpha 1M$ protein was expressed in *E. coli* B834. The recombinant protein was purified by nickel column chromatography, ion-exchange column chromatography and size exclusion chromatography and its bioactivity was verified by ABTS method. *Results:* The expression vector of the $\alpha 1M$ was successfully constructed by PCR and $\alpha 1M$ protein was expressed by *E. coli* B834 in a soluble supernatant way. The $\alpha 1M$ protein with 95% purity was acquired successfully by purification. The result of the size exclusion chromatography indicated that $\alpha 1M$ protein exhibited as both monomer and dimer in the solution. Additionally, the recombinant protein exerted anti-oxidant activity by ABTS method. *Conclusion:* $\alpha 1M$ could be highly expressed in supernatant solution in *E. coli* B834 strain and it can be easily purified. The recombinant protein exhibits anti-oxidant activity, laying a solid basis for further structural and functional study of the human protein.

【Key words】human $\alpha 1$ -microglobulin; expression; purification; bioactivity identification

$\alpha 1$ 微球蛋白质($\alpha 1$ -microglobulin, $\alpha 1M$)属于脂质运载蛋白超家族, 是一个分子量为 26 kD 的糖蛋蛋白质, 在哺乳动物、鱼类、鸟类及两栖动物等动物体内均有表达^[1]。 $\alpha 1M$ 由肝细胞特异性合成, 分泌后经血液运输分配到肺、肠、肾、胎盘等器官的细胞外液、结缔组织及基底膜等部位^[2]。有研究报道 $\alpha 1M$ 可能具有还原酶活性, 能还原和清除血红素和色氨

酸代谢产物等生物性过氧化物, 可能参与了机体内抗氧化反应^[3]。ABTS 法是使用广泛的间接检测方法, 可用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定^[4]。目前有关 $\alpha 1M$ 功能研究虽然取得许多进展, 但是其确切功能的认识疑点颇多。例如目前对于 $\alpha 1M$ 执行还原酶活性的活性位点和分子机制及其在生物体内的生理作用等都缺乏认识。

本研究应用基因工程技术, 并经过生物信息学分析, 构建了人 $\alpha 1M$ 的截短表达质粒, 使其在大肠杆菌中获得高效上清表达, 并利用 ABTS 法对其抗氧化性质进行了初步鉴定, 为今后解析 $\alpha 1M$ 的三维结构和酶活性的分子机制提供重要的研究基础。

作者介绍:张阳丽(1986-), 女, 硕士,**研究方向:**蛋白质结构与功能研究。**通信作者:**汪德强, 男, 教授, Email: wangdl@ustc.edu.cn。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号:30970563)。

1 材料和方法

1.1 工具酶及试剂

限制性内切酶 EcoR I、Xho I, T4DNA 连接酶, LA Taq DNA 聚合酶, DNA 纯化试剂盒(TakaRa 公司), 质粒抽提试剂盒(OMEGA 公司); Ni²⁺-His 亲和层析柱, Hitrap Q 阴离子交换层析柱, 分子筛 Superdex 75, 光谱仪 Ultrospec 2100 pro 及其分析软件 swift II(GE 公司)。试剂 IPTG、ABTS[2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐]等试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株、质粒和模板(肝脏 cDNA)来源

载体 PW28(为 pET28a 改造而来)、*E. coli* 菌株 DH5α、B834 为本实验室保存, 人肝脏细胞 HepG2 细胞系 cDNA 为重庆医科大学感染病实验室黄爱龙教授惠赠。

1.3 方法

1.3.1 引物合成及 DNA 序列分析 经生物信息学分析截去 α1M 蛋白质序列中属于跨膜结构域的氨基酸, 引物设计后送上海生工生物工程公司合成。扩增 α1M 基因片段的上下游引物。上游引物序列 P1 为: ATGAAATTCG ACAACATC-CAGTGCAGG; (斜体为 EcoR I 酶切位点) 下游引物序列 P2 为: GACTCCGACTCATAAGATGGCTCTGGTTCC (斜体为 Xho I 酶切位点)。

1.3.2 α1M 基因片段的扩增及载体 DNA 的酶切与回收 以 P1 和 P2 为引物, 人肝脏细胞 HepG2 细胞系 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色法检测 519 bp 的扩增片段。用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的基因片段。用限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 对目的基因片段和载体 PW28 进行双酶切, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果, 并用 DNA 纯化试剂盒回收。

1.3.3 α1M 表达质粒的构建与鉴定 将经过双酶切的 α1M 基因片段和载体 PW28 DNA 片段通过 T4 DNA 连接酶在 16 ℃连接 16 h 后, 转入克隆宿主菌 *E. coli* DH5α 大量繁殖后, 应用菌液 PCR 及酶切初筛鉴定和质粒双酶切鉴定后, 送本实验室测序仪进行 DNA 序列测定, 保存测序正确 PW28-α1M 重组质粒。

1.3.4 α1M 基因的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定 将 PW28-α1M 重组质粒转入表达宿主菌 *E. coli* B834, 将此工程菌接种于含卡那霉素 50 μg/ml 的 LB 液体培养基中, 37 ℃培养至 A_{600 nm} 约 0.4 h, 加 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L 于 20 ℃低温诱导表达, 培养 18~20 h 后离心收集菌体。15% SDS-PAGE 电泳鉴定 α1M 表达水平。

1.3.5 α1M 重组蛋白质的纯化及鉴定 冰浴环境中进行超声破碎, 4 ℃离心收集上清, 上清液先后经镍离子亲和层析柱纯化后, 以 NaCl 溶液梯度洗脱用阴离子交换层析(Hitrap Q), 收集目的蛋白洗, 超滤浓缩后经分子筛 Superdex 75 进一步纯化, 最后收集洗脱峰样品超滤浓缩脱盐至 50 mmol/L 左右后置 -80 ℃冻存。各步均吸取 50 μl 样品经 SDS-PAGE

电泳鉴定纯度, NanoD2 000 微量紫外吸收仪检测样品浓度。

1.3.6 α1M 重组蛋白质活性检测 参考 Bo Åkerström 等^[5]的方法并经适当修改, 应用 ABTS 法检测 α1M 重组蛋白质抗氧化活性。配制 ABTS⁺ 母液, 将过硫酸钾加到 7 mmol/L 的 ABTS 水溶液中, 使过硫酸钾终浓度为 2.8 mmol/L, 室温避光过夜。配制 ABTS⁺ 测定液: 将储备液用 PBS (pH 7.4) 稀释 125 倍。测量: 加入待测样品 α1M 蛋白质至 ABTS⁺ 测定液中, 使其浓度为 2 μmol/L, 用光谱仪 Ultrospec 2100 pro 分别于 1、5、10 min 和 20 min 检测该反应体系的吸收光谱, 每次检测 3 次, 取平均值。对照体系为没有加入待测样品的 ABTS⁺ 测定液。

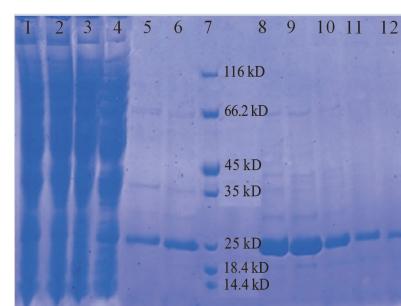
2 结果

2.1 α1M 基因 PCR 扩增和表达质粒构建

PCR 扩增的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 500 bp 以上的位置出现一条特异性条带, 与目的片段相符。重组质粒经 EcoR I 和 Xho I 酶切电泳鉴定, 结果显示插入片段约为 520 bp, 与预期结果相符。重组表达质粒送往本实验室测序, 结果显示插入序列完全正确。

2.2 α1M 蛋白质表达及纯化结果分析

经 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达的重组菌经超声破碎、4 ℃离心收集上清, 全菌破碎液与上清液分别经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果显示 24 kD 处二者均有一明显增粗的蛋白质条带(图 1), 表明经诱导后, 目的蛋白质 α1M 在 *E. coli* B834 中大量可溶表达。由于所选 PW28 载体包含 His 标签, 因此 α1M 重组蛋白质可用镍离子亲和层析柱纯化, 先后采用 10、20 mmol/L 及 40 mmol/L 浓度咪唑洗脱非特异结合蛋白质, 300 mmol/L 高浓度咪唑洗脱目的蛋白质, 经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果显示穿透液未见目的蛋白质条带, 提示 α1M 与 Ni²⁺ 亲和层析柱结合良好, 目的蛋白质在 300 mmol/L 咪唑时被大量洗脱, 但亦可见少量杂蛋白质条带(图 1), 以上结果表明镍离子亲和层析纯化效果良好, 但仍需进一步纯化。

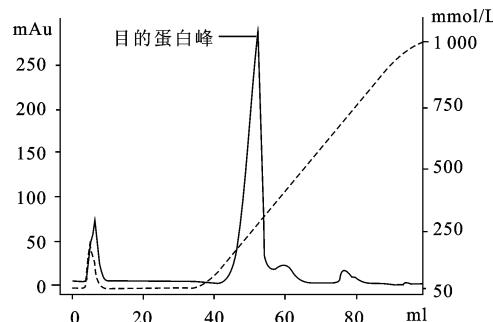


注: 1 池道为全菌破碎液; 2 池道为上清液; 3 池道为镍柱上样后的穿透液; 4、5、6 池道分别为 20、40、100 mmol/L 浓度咪唑洗脱液; 7 池道为蛋白 Marker; 8、9 池道均为 300 mmol/L 浓度咪唑洗脱液; 10 池道为 HitrapQ 柱纯化样品; 11、12 池道为经分子筛纯化后样品

图 1 α1M 蛋白质纯化结果分析

Fig. 1 SDS-PAGE of α1M after purification

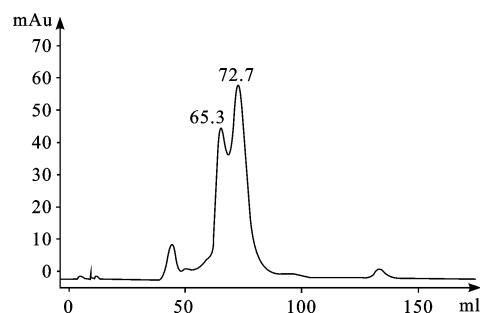
通过 ExPASy 对 $\alpha 1M$ 进行等电点预测约为 5.84, 故选择阴离子交换层析 Hitrap Q 进行纯化。将上述 300 mmol/L 高浓度咪唑洗脱的样品在 50 mmol/L NaCl 低盐条件下与阴离子交换层析柱结合, 采用 0~1 000 mmol/L NaCl 盐梯度洗脱, 分管收集洗脱峰, SDS-PAGE 电泳鉴定。结果显示在目的蛋白质约在 250~300 mmol/L 盐浓度下洗脱(图 2), 电泳结果显示目的蛋白质 $\alpha 1M$ 的纯度得到进一步提高, 但是虽然有可见的杂蛋白质(图 1), 尚需要进一步纯化。



注: 目的蛋白峰对应 NaCl 浓度约为 150~300 mmol/L

图 2 样品经 Hitrap Q 柱纯化图
Fig. 2 Purification after Hitrap Q column

收集经过 Hitrap Q 纯化的 $\alpha 1M$ 洗脱峰样品, 超滤浓缩至 1 ml 后至分子筛 Superdex 75 进一步纯化, 结果显示, 在 65.3 和 72.7 ml 处有 2 个洗脱峰(图 3), 经 SDS-PAGE 电泳鉴定均为 $\alpha 1M$ 条带(图 1)。计算其对应的分子量为 38.1 和 29.3 kD(Superdex 75 标定结果: $\text{Log MW} = -0.0154V_e + 5.586$, $R^2 = 0.895$), 约为其理论分子量(24 kD)的 1.5 和 1 倍, 表明 $\alpha 1M$ 在溶液可能以单体和二聚体 2 种聚集状态存在。收集两个洗脱峰对应的样品合并后用低盐缓冲液倍比稀释脱盐, 最终浓缩至约 1 ml, Bradford 测蛋白浓度约为 9.0 mg/ml。

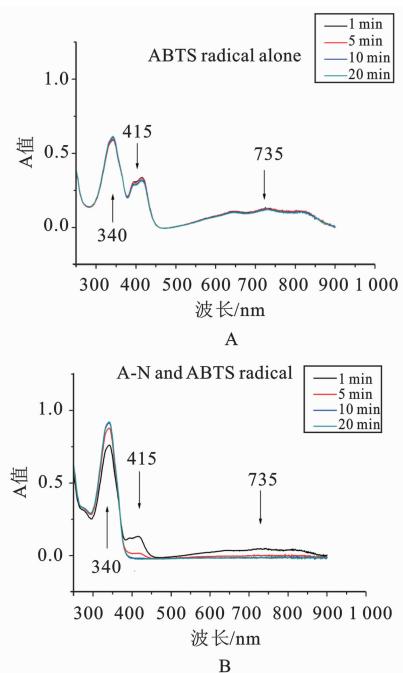


注: 目的蛋白峰为并肩双峰, 对应洗脱体积分别为 65.3、72.7 ml

图 3 样品经分子筛纯化图
Fig. 3 Purification after size exclusion chromatography

2.3 ABTS 法检测 $\alpha 1M$ 蛋白质活性结果分析

由图 4 结果可看出: 对照实验显示 ABTS⁺ 测定液在各时间点检测的吸收光谱均未发生明显变化(图 4A), 而待测样品 $\alpha 1M$ 蛋白质与 ABTS⁺ 测定液的混合液则随着时间的递进, 在 ABTS 特征吸收峰波长 340 nm 处吸收值不断升高, 而在 ABTS⁺ 特征吸收峰波长 415 nm 及 735 nm 处吸收值不断下降, 尤其在 5 min 内下降明显(图 4B)。



注: A 图为未加待测样品 ABTS⁺ 测定液分别在 1、5、10 min 和 20 min 时的吸收光谱; B 图为 $\alpha 1M$ (2 $\mu\text{mol/L}$)与 ABTS⁺ 测定液混合液分别在 1、5、10 min 和 20 min 时的吸收光谱

图 4 ABTS 法检测样品活性结果图
Fig. 4 Reaction between $\alpha 1M$ and ABTS radical

3 讨 论

$\alpha 1M$ 是由 AMBP 基因编码, 该基因同时还编码一种蛋白酶抑制剂—Bikunin, 它和 $\alpha 1M$ 是目前在动物中唯一发现以融合形式进行共翻译、表达的两种蛋白质^[6], 而且这种翻译表达方式与 AMBP 基因的在鱼类、哺乳动物等中具有高度的保守性^[7]。 $\alpha 1M$ 进化上高度保守性与体内分布的广泛性^[2]提示该蛋白质具有重要生理作用。经过多年的研究, 发现 $\alpha 1M$ 可能具有还原酶活性, 能还原细胞色素 C, 高铁血红蛋白, 硝基蓝四唑, 参与血红素的降解和自由基的清除, 具有保护机体免受氧化性损伤的功能^[8], 但具体的反应底物和反应机制仍然不清楚。重组表达获得大量有活性的 $\alpha 1M$ 蛋白质以解析其三维结构, 并应用定点突变等方法研究其结构和功能间关系, 并为其生理功能的破译提供重要研究基础。

鉴于 $\alpha 1M$ 在动物体内的重要作用, 国内外众多课题组均希望获得大量的 $\alpha 1M$ 蛋白质。以往研究者们都是从肾小管疾病或肾衰竭病人尿中提取 $\alpha 1M$ 蛋白质, 此法步骤多, 产率低, 且容易造成目的蛋白质降解。后来陆续有学者应用原核表达系统和真核

表达系统来获得 $\alpha 1M$ 重组蛋白质, 文献报道均为产率低且为包涵体, 进而导致其纯化与复性步骤复杂及低活性等问题^[9]。本文通过生物信息学分析, 发现 $\alpha 1M$ 氨基酸序列的 N 端为跨膜结构, 而跨膜结构域的存在是导致重组蛋白质的包涵体表达的重要原因。为此本研究截去 $\alpha 1M$ 的 N 端跨膜结构域的多个氨基酸, 成功构建了 PW28- $\alpha 1M$ 重组质粒, 并在大肠杆菌系统中获得了上清表达。应用镍离子亲和层析纯化、阴离子交换层析和分子筛等高效的蛋白质纯化手段, 获得高纯度的 $\alpha 1M$ 蛋白质(纯度大于 95%), 为后续的体外生物学活性检测及蛋白质三维结构的解析提供了重要的研究基础。

本文选用 ABTS 法对 $\alpha 1M$ 进行了初步的生物学活性鉴定。从本文结果可以看出, $\alpha 1M$ 加入 ABTS⁺ 测定液后, 在 5 min 内与 ABTS⁺ 迅速发生反应, 使其含量明显降低, 而还原性 ABTS 含量增高, 提示本研究获得的重组 $\alpha 1M$ 为具有生物活性的蛋白质, 具有一定的抗氧化能力。

本文利用生物信息学分析, 成功构建了能够在大肠杆菌系统中上清表达的 PW28- $\alpha 1M$ 的质粒, 并应用镍离子亲和层析纯化、阴离子交换层析和分子筛等纯化获得了纯度大于 95% 的 $\alpha 1M$ 样品, 应用 ABTS 法检测发现该重组蛋白质具有一定的抗氧化活性。下一步本研究将通过蛋白质晶体学方法获得 $\alpha 1M$ 蛋白质三维结构, 并基于结构研究其执行还原酶活性的分子机制, 同时研究其不同聚集形式对其功能的影响。

参 考 文 献

- [1] Åkerström B, Lögdberg L. An intriguing member of the lipocalin protein family: $\alpha 1$ -microglobulin [J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15 (16): 240-243.
- [2] Lögdberg L E, Åkerstrom B, Badve S. Tissue distribution of the lipocalin alpha-1 microglobulin in the developing human fetus [J]. Histochem Cytochem, 2000, 48 (11): 1545.
- [3] Maria Allhorn, Tord Berggård. Processing of the lipocalin $\alpha 1$ -microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties [J]. Blood, 2002, 99 (6): 1894-1901.
- [4] Miller N J, Rice-Evans C A . A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [J]. Clinical Science, 1993, 84 (4): 407-412.
- [5] Bo Åkerström, Ghassan J, Maghzal. The lipocalin $\alpha 1$ -microglobulin has radical scavenging activity [J]. JBC, 2007, 282 (43): 31493-31503.
- [6] Yoshida K, Suzuki Y, Yamamoto K, et al. Guinea pig alpha 1-microglobulin/bikunin: cDNA sequencing, tissue expression And expression during acute phase [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1999, 122 (2): 165-172.
- [7] 苏建明, 章怀云, 陈 钜, 等. 草鱼 AMBP 基因 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33 (2): 183-188.
- Su J M , Zhang H Y, Chen T, et al. Cloning and genetics analysis of AMBP gene cDNA in grass carp [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33 (2): 183-188.
- [8] Olsson M G, Olofsson T, Tapper H, et al. The lipocalin $\alpha 1$ -microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species [J]. Free Radic Res, 2008, 42 (8): 725-736.
- [9] Calero M, Mendez E, Garcia E. Expression of the human complex-forming glycoprotein HC ($\alpha 1$ -microglobulin) in Escherichina Coli [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1249 (1): 9.

(责任编辑:唐秋姗)

欢迎订阅,敬请赐稿!