

微管相关蛋白2 微管结合区基因的克隆与表达^{*}

郭 燕¹, 张彦明¹, 高 晨², 韩 俊², 陈建明², 石 琦², 高永军², 周 伟², 董小平²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052)

[摘 要] 为了研究微管相关蛋白2(MAP2)在促进微管形成、维持微管稳定及促进轴突和树突细胞器转运等方面的作用, 试验克隆了MAP2 微管结合区基因, 构建了原核表达载体pET32aMAP2 并对其进行诱导表达, 利用亲和层析法对表达产物进行纯化, 研究了表达产物与微管蛋白之间的作用。结果表明, 融合表达的人MAP2 微管结合区蛋白约43 ku, 可与天然的微管蛋白发生分子间的结合作用, 为MAP2 生理功能的研究奠定了基础。

[关键词] MAP2; 表达纯化; 微管蛋白

[中图分类号] Q 785; Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)08-0007-05

微管相关蛋白2(Microtubule-associated protein 2, MAP2)为结构性微管相关蛋白家族的一员, 是一种热稳定的磷蛋白, 在脑组织中含量丰富。其能促进微管形成、保持微管稳定、诱导微管成束, 还可能参与神经元发育、突起的形成和生长、轴突和树突的细胞器运输, 并可稳定结构、传导信号^[1]。MAP2由单个基因编码, 通过选择性剪切形成多种转录子和亚型, 包括高分子质量的MAP2a(280 ku)和MAP2b(270 ku)及低分子质量的MAP2c(70 ku)和MAP2d(75 ku)。各亚型均含有位于N端的与PKA有高亲和性的区域, 含1 300多个氨基酸组成的中心区(MAP2c, MAP2d 缺乏), 有多种蛋白酶作用位点的铰链区及包括3或4个重复序列的微管结合区^[2]。精氨酸特异性的凝血酶可将MAP2分解为较稳定的2个片段, 即N端的延伸臂和C端的微管结合区(Microtubule-binding region, MTBR)。MTBR与完整的MAP2一样, 可以有效地促进微管束集, 并且可以置换与微管相结合的MAP2^[3]。本试验对MAP2的微管结合区基因进行了克隆与表达, 利用亲和层析法对表达产物进行了纯化, 并在体外检测了其微管的相互作用, 可为进一步研究MAP2在促进微管形成、维持微管稳定及轴突和树突细胞器转运等方面的作用奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌种及神经细胞 人SF126细胞

pET32a 质粒、大肠杆菌DH5 α 和BL 21(DE3)均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所朊病毒室保存提供; pMD18-T 载体购自TaKaRa公司。

1.1.2 试 剂 AMV 逆转录酶购自Promega公司, Taq DNA 聚合酶购自TaKaRa公司, 微管蛋白单克隆抗体购自Invitrogen公司, 辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔二抗购自Santa Cruz公司, Trizol 试剂购自Sigma公司。

1.1.3 引 物 根据GenBank收录的人MAP2基因序列(登录号为NM 031846)设计1对引物。上游引物: 5'-TAG GAT CCA CAC CAG GAA CCC CCA AG-3'; 下游引物: 5'-TAT AAG CTT TCA CAA GCC CTG CTT AGC G-3'。将上下游引物分别引入酶切位点BamH I和HindIII, 引物由上海生工公司合成。

1.2 人MAP2 微管结合区基因的扩增

1.2.1 人SF126细胞总RNA的提取 对人SF126细胞进行常规培养, 待其生长至70%~80%融合时, 用2.5 g/L 胰酶消化, 收集细胞, 加Trizol 试剂室温静置10 min后, 按V(氯仿): V(Trizol)=0.2:1加入氯仿, 再室温静置5 min, 12 000 r/min离心10 min。取上清, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 室温静置10 min; 12 000 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀以DEPC水配制的700 mL/L 乙醇洗2次, 12 000 r/min离心30 s, 弃去上清, 自然干燥后沉淀溶于DEPC处理的水中, -70℃保存待用。

1.2.2 人SF126细胞cDNA的合成 使用RT-

^{*} [收稿日期] 2006-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30070038)

[作者简介] 郭 燕(1980-), 女, 陕西柞水人, 在读硕士, 主要从事TSE发病机理和诊断方法的研究。

[通讯作者] 董小平(1961-), 男, 北京市人, 教授, 主要从事TSE发病机理和诊断方法的研究。E-mail: dongxp238@sina.com.cn

PCR 试剂盒,取总RNA 5 μL 加入1 μL Oligo (dT) 12-18, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, 置冰上3~5 min, 加入2 μL 缓冲液, 1 μL 逆转录酶AMV, 1 μL RNA 酶抑制剂, DEPC 水补足至20 μL , 混匀后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, 终止反应。

1.2.3 人MAP2 微管结合区基因的扩增 以cDNA 为模板进行PCR 扩增人MAP2 微管结合区基因。反应体系为: ddH₂O 40 μL , 10 $\times$ PCR 缓冲液5 μL , 10 mmol/L 4 $\times$ dNTP 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ MAP2 上游引物1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ MAP2 下游引物1 μL , Taq DNA 聚合酶(5U/ μL) 1 μL , 模板1 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

1.3 MAP2 微管结合区基因表达载体的构建

PCR 产物经10 g/L 琼脂糖电泳回收后与pMD18-T 载体4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 构建重组质粒pT-MAP2。连接产物经北京奥科生物公司测序, 鉴定正确的连接产物用BamH I 和HindIII 双酶切, 回收MAP2 微管结合区基因与硫氧还原蛋白(Thioredoxin, Trx) 融合表达载体pET32a, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接2 h, 构建原核表达载体pET32a-MAP2。连接产物加入200 μL 的感受态细胞BL 21 中, 轻轻混匀, 置冰上0.5 h, 42 $^{\circ}\text{C}$ 热休克90 s 后立即置于冰上, 并加入600 μL 不含抗生素的LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温和振荡45 min, 低速离心, 去掉大部分上清, 剩余200 μL 左右将菌体重悬, 涂布于含有氨苄青霉素和X-gal 及IPTG 的LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取阳性菌落经BamH I 和HindIII 酶切鉴定, 对鉴定结果正确的重组质粒进行诱导表达。

1.4 MAP2 微管结合区蛋白的表达与纯化

将转化了重组表达质粒的BL 21(DE3) 受体菌接种于LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至OD₆₀₀ = 0.5~0.7, 加IPTG 至终浓度为1 mmol/L, 诱导约3 h。120 g/L SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮兰染色, 检测蛋白的表达情况。参见QIAGEN 公司产品说明, 进行NiNTA Agarose 亲和层析柱的平衡, 及His 融合蛋白非变性状态下的纯化、洗脱。

1.5 MAP2 微管结合区蛋白的Western blot 鉴定

纯化蛋白的电泳、转膜按常规方法进行。一抗为MAP2 蛋白多克隆抗体, 二抗(按1:5 000 稀释)为辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔IgG。

1.6 MAP2 与微管蛋白相互作用的检测

1.6.1 兔微管蛋白(tubulin) 提取 微管蛋白具有在37 $^{\circ}\text{C}$ 聚合、在4 $^{\circ}\text{C}$ 解聚的特征。利用这一特点, 本

试验采用亲和层析、反复聚集解聚以及超速离心等方法, 提取纯化兔脑组织中天然状态的微管蛋白。提取方法参照文献[4]稍作修改: 取新鲜兔脑组织1 g, 加溶液I (1.0 mol/L 谷氨酸钠, 0.1 mmol/L GTP, 5 mmol/L MgCl₂) 匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下2 000 r/min 离心2 h, 上清与平衡后的DE52 cellulose 混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢振荡1 h; 自然沉降后弃去60%~70% 的液体; 10 mL 洗脱液洗脱5 次, 收集洗脱液, 将洗脱液与终浓度1 mmol/L GTP 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用45 min; 32 000 r/min 离心2 h, 沉淀用I 液重悬, 冰浴30 min, 32 000 r/min 离心40 min, 收集上清, SDS-PAGE 检测后进行Western blot 鉴定。

1.6.2 MAP2 与微管蛋白相互作用的免疫共沉淀方法检测 将MAP2 微管结合区蛋白与提取的微管蛋白按物质的量之比1:1 (约200 ng) 加入TN 缓冲液, 反应总体积500 μL 。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h, 加入微管蛋白特异性单克隆抗体0.1 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h 后, 再加入protein G-Sepharose 介质。收集抗原抗体复合物, 用洗液(洗液含20 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) + 300 mmol/L NaCl) 多次洗涤后, 3 000 r/min 离心3 min, 去除上清。结合有复合物的介质在5 $\times$ loading buffer 中煮沸5 min, 3 000 r/min 离心3 min 取上清。以MAP2 多克隆抗体为检测抗体, 用Western blot 法检测沉淀物中的MAP2, 以等量的Trx 蛋白作为对照, 具体方法参照文献[5]。

1.6.3 MAP2 与微管蛋白相互作用的ELISA 方法检测 用100 ng 纯化的微管蛋白包被ELISA 反应板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用50 g/L 脱脂奶37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h。按微管蛋白与MAP2 微管结合区蛋白物质的量之比1:1 加入MAP2 微管结合区蛋白(即100 μL PBST 中含MAP2 微管结合区蛋白100 ng), 以Trx 作对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用2 h。常规洗板后, 加入1:2 000 稀释的His 单抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。1:5 000 辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗作用1 h 后, 常规显色在波长450 nm 处检测吸光度。

2 结果与分析

2.1 人MAP2 微管结合区基因片段的PCR 扩增

以人神经细胞SF126 mRNA 逆转录产物为模板进行PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳在710 bp 处出现一条PCR 产物条带(图1), 与预期的MAP2 微管结合区基因片段大小相符。

2.2 pT-MAP2 载体的鉴定

2.2.1 pT-MAP2 载体的酶切鉴定 pT-MAP2 载

体经 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切后, 切出 710 bp 的片段 (图2), 与 MAP2 微管结合区基因片段大小相符。

2.2.2 pT-MAP2 载体的测序鉴定 序列测定证实所扩增的片段为人 MAP2 微管结合区基因片段, 与 GenBank 收录的人 MAP2 序列 (NM 031846) 的

同源率为 100%。

2.3 pET32a-MAP2 表达载体的鉴定

pET32a-MAP2 载体经 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切后, 切出 710 bp 的片段 (图3), 与 MAP2 微管结合区基因片段大小相符。

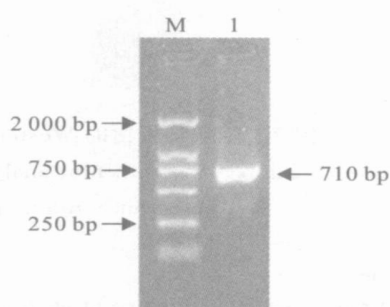


图1 人 MAP2 微管结合区基因片段的扩增

M. DNA 标准 DL2000; 1. PCR 扩增的 MAP2 基因片段

Fig 1 PCR amplification of MAP2 gene fragment

M. DNA Marker DL2000;

1. PCR products of MAP2 gene fragment

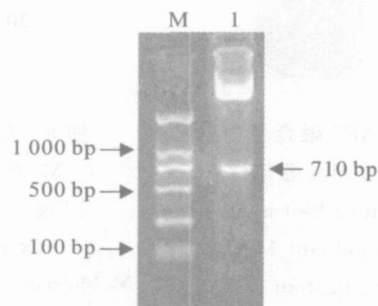


图2 重组质粒 pT-MAP2 的 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切鉴定结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. pT-MAP2 的 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切鉴定

Fig 2 Identification of the recombinant

plasmid pT-MAP2 with *Bam* H I and *Hind* III

M. DNA marker DL2000; 1. Fragments of

pT-MAP2 with *Bam* H I and *Hind* III

2.4 MAP2 微管结合区蛋白的表达与纯化

由图4可知, MAP2 微管结合区存在外源蛋白的表达, 分子质量约为 43 ku, 与预期的分子质量大小相符。超声裂解菌体后表达蛋白存在于上清部分,

提示为可溶性表达。用 Ni-NTA Agarose 亲和层析柱对表达蛋白进行纯化, 结果显示在分子质量 43 ku 处出现纯化蛋白条带。

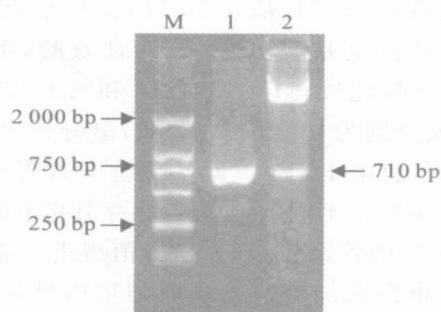


图3 pET32a-MAP2 载体的酶切鉴定

M. DNA 标准 DL2000; 1. PCR 扩增的 MAP2 基因片段;

2. pET32a-MAP2 经 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切的产物

Fig 3 PCR amplification of MAP2 gene fragment

and identification of the recombinant plasmid

M. DNA Marker DL2000; 1. PCR products of MAP2 gene

fragment; 2. pET32a-MAP2 digested with *Bam* H I + *Hind* III

2.5 MAP2 微管结合区蛋白的 Western blot 鉴定

图5显示, 纯化的蛋白可以与 MAP2 多抗发生特异性反应。

2.6 兔微管蛋白的检测

纯化的兔微管蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示, 在

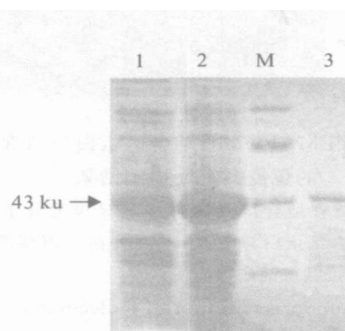


图4 MAP2 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

1. 诱导前菌体; 2. 诱导后菌体;

M. 蛋白分子质量标准; 3. 纯化后蛋白

Fig 4 SDS-PAGE of the recombinant MAP2 protein

1. Lysates of the bacteria transformed with pET32a-MAP2 before

inducement; 2. Lysates of the bacteria transformed with pET32a-

MAP2 after inducement; M. Molecular weight marker; 3. Purified

MAP2 fusion protein

分子质量 50 ku 的位置有 1 条蛋白带 (图6), 与微管蛋白预期大小相符。Western blot 检测结果显示, 微管蛋白单克隆抗体可特异性地识别此 50 ku 的纯化蛋白 (图7)。

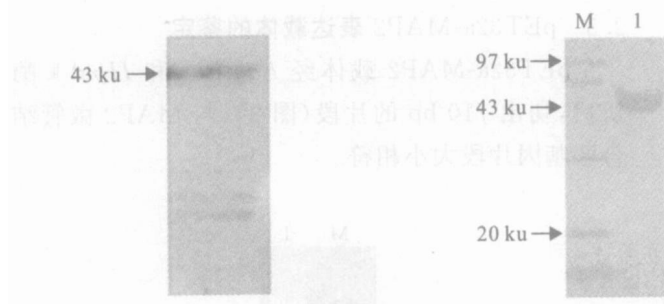


图5 人MAP2融合蛋白的
Western blot 鉴定

Fig 5 Western blot analysis
of the recombinant MAP2

fusion protein

图6 兔微管蛋白的SDS-PAGE 分析

M. 蛋白分子质量标准; 1. 兔微管蛋白

Fig 6 SDS-PAGE analysis of the
extracted microtubule protein

M. Molecular weight marker; 1. Microtubule protein

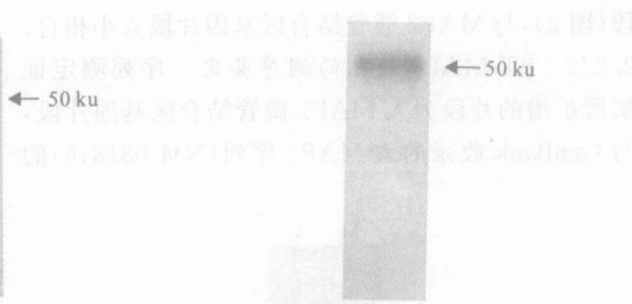


图7 兔微管蛋白的Western-blot 鉴定

Fig 7 Western-blot analysis of the
extracted microtubule protein

2.7 MAP2 微管结合区蛋白与微管蛋白在体外相互作用结果的检测

2.7.1 免疫共沉淀方法检测结果 图8显示, MAP2 在本研究体系中可与微管蛋白特异性形成蛋白复合物, 而相同浓度的硫氧还原蛋白不能与微管蛋白形成复合物。同时, 仅有MAP2 不能被微管蛋白特异性单克隆抗体所捕获(结果未显)。

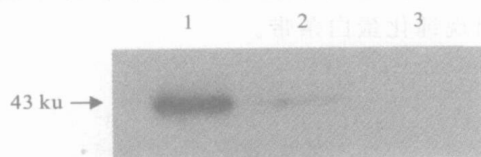


图8 重组MAP2 微管结合区蛋白与微管蛋白
的免疫共沉淀检测结果

1 重组MAP2 微管结合区蛋白直接上样作为分子质量对照;
2 MAP2微管结合区蛋白与微管蛋白的免疫共沉淀产物; 3 微管
蛋白与Trx 的免疫共沉淀产物

Fig 8 Immunoprecipitation of molecular interaction
between recombinant MAP2 and tubulin

1 Recombinant MAP2 directly loaded as molecular weight
control; 2 Precipitation of tubulin with MAP2; 3 Precipitation of
tubulin with Trx

2.7.2 ELISA 方法检测结果 试验结果显示, MAP2 可与包被的微管蛋白结合, OD 值约为3, 而硫氧还原蛋白与包被的微管蛋白OD 值约为0.5, P/N > 2.1。这些结果证明, 原核表达的MAP2 微管结合区蛋白保留了与微管结合的特性, 能够在体外直接与微管蛋白作用。

3 讨论

用原核细胞表达外源基因, 尤其以大肠埃希菌为宿主菌高效表达外源基因时, 表达蛋白往往在细

胞内形成包涵体。包涵体的形成虽然有利于防止蛋白酶对表达蛋白的降解, 但所表达的蛋白常有部分会完全丧失其生物学活性。为了解决这一问题, 本试验利用pET32a 载体对MAP2 微管结合区蛋白进行表达, 目的蛋白与Trx 蛋白融合表达时, Trx 蛋白能很好地介导蛋白在表达后很快进入胞质, 不仅减少了外源蛋白本身对宿主菌的毒性作用, 同时使得外源蛋白不易被宿主菌的保护作用降解^[6]。

本研究结果显示, 人MAP2 可与微管蛋白特异性结合。MAP2 是一种高度保守的蛋白, 人与牛MAP2 微管结合区氨基酸序列的比较结果表明, 只有第1716 位氨基酸不同(人为甘氨酸, 牛为精氨酸); 人与小鼠比较, 只有第1716 和第1775 位氨基酸不同(人分别为甘氨酸、甘氨酸, 鼠分别为精氨酸、丝氨酸)^[7], 而第1716 位氨基酸位于微管结合区第二个重复序列。不同的氨基酸是否引起不同种属动物MAP2 与微管亲和力的差别, 值得进一步探索。

微管蛋白在细胞浆内形成细胞内骨架, 参与细胞分裂、小泡运输及细胞形态的维持等^[8]。根据MAP2 与微管作用模型, MAP2 分子的每一个重复序列在微管壁内与相邻的微管蛋白单体作用, 增加了微管的刚性, 通过改变微管的动力学行为如降低崩解发生的频率和时间来稳定微管^[9]。许多中枢神经系统疾病的病变与细胞骨架成分的异常有关, 与微管相关的运输障碍导致许多与细胞外排和神经递质传递有关的蛋白聚集^[10], 可以解释很多神经退行性病中出现的功能变化, 如帕金森病(Parkinson's Disease)、Lewy 小体病(Diffuse Lewy Body Disease)和阿茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)。早期研究^[11-12]发现, 识别MAP2 特殊表位的抗体能够与AD 病人脑组织中的神经元纤维缠结

(NFTs)结合,MAP2 的单克隆抗体能够明显标记AD 病人脑组织中大多数感染区域的NFTs,而且MAP2 的多克隆抗体能够标记老年斑周围的异常神经元,提示MAP2 可能参与神经退行性病变的发生。在某些神经退行性疾病发生过程中,是否存在某

种作用机制可能干扰MAP2 对微管的稳定,使细胞骨架改变,神经元死亡;是否存在某些因素通过对MAP2 的作用影响细胞器的运输,从而引起与微管相关的运输障碍,都需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function[J]. Prog Neurobiol, 2000, 61(2): 133-168
- [2] Olesen O. F. Expression of low molecular weight isoforms of microtubule-associated protein 2[J]. J Biol Chem, 1994, 269(52): 32904-32908
- [3] Coffey R L, Purich D L. Non-cooperative binding of the MAP-2 microtubule-binding region to microtubules[J]. J Biol Chem, 1995, 270(3): 1035-1040
- [4] Weingarten M D, Lockwood A H, Hwo S Y, et al A protein factor essential for microtubule assembly[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72(5): 1858-1862
- [5] 高 晨, 韩 俊, 石 琦, 等. 载脂蛋白ApoE 的原核表达及与PrP 蛋白相互作用的初步研究[J]. 病毒学报, 2005, 21(6): 443-447.
- [6] La Vallie E R, D Blasio E A, Kovacic S, et al A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. Biotechnology, 1993, 1(2): 187-193
- [7] Coffey R L, Joly J C, Cain B D, et al Exploring the microtubule-binding region of bovine microtubule-associated protein-2 (MAP-2): cDNA sequencing, bacterial expression, and site-directed mutagenesis[J]. Biochemistry, 1994, 33(45): 13199-13207.
- [8] Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins[J]. Genome Biol, 2004, 6(1): 204
- [9] Al-Bassam J, Ozer R S, Safer D, et al MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments[J]. J Cell Biol, 2002, 157(7): 1187-1196
- [10] Spittaels K, Bruynseels K, Vandezande K, et al Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein[J]. Am J Pathol, 1999, 155(6): 2153-2165
- [11] Kosik K S, Duffy L K, Dowling M M, et al Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(24): 7941-7945
- [12] Dammann M, Yen S H, Shafit-Zagardo B. Sequence of a human MAP-2 region sharing epitopes with Alzheimer neurofibrillary tangles[J]. J Neurosci Res, 1989, 24(4): 487-495

Expression and purification of human MAP2 microtubule binding peptide

GUO Yan¹, ZHANG Yan-ming¹, GAO Chen², HAN Jun², CHEN Jian-ming²,
SHI Qi², GAO Yong-jun², ZHOU Wei², DONG Xiao-ping²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Chinese Center for Viral Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

Abstract: In order to study the effects of MAP2 on the formation and stabilization of microtubule as well as the potential transportation functions in axon and synapse, the gene encoding microtubule binding region of MAP2 was cloned and expressed. Verified by sequence analysis and enzyme digested, a recombinant vector pET32a-MAP2 was constructed. A 43 ku soluble MAP2-fusion protein was expressed in *E. coli* BL21 and purified by affinity chromatography. The interaction of the proteins was studied and it was suggested that MAP2 microtubule binding peptide could interact with each other *in vitro*. It can provide a good basis for further research on the biological functions of MAP2.

Key words: MAP2; expression and purification; tubulin