

整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区的原核高效表达及纯化

王 刚, 张彦明, 郭抗抗, 王晶钰

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】构建整合素(Integrin) β_1 和 β_2 亚基胞内区原核表达载体, 高效表达整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区蛋白, 为进一步研究其在细胞迁移和信号传导中的定位及其多克隆抗体的制备奠定了基础。【方法】采用 PCR 技术, 从 cDNA 中扩增出整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区基因片段, 并将其克隆到 pGEX-4T₂ 原核表达载体上, 构建了 GST- β_1 和 GST- β_2 质粒, 然后将 GST- β_1 和 GST- β_2 质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌, 用 IPTG 诱导, 成功表达了整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区蛋白, 并利用 Glutathione Sepharose™4B 对表达产物进行纯化。【结果】利用 PCR 扩增得到了整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区基因片段, 并成功构建了 GST- β_1 和 GST- β_2 质粒; 对 GST- β_1 和 GST- β_2 诱导表达发现, 这 2 种融合蛋白均为可溶性蛋白, 具有良好的生物学活性。通过纯化得到了高纯度的 GST- β_1 和 GST- β_2 融合蛋白。【结论】整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区基因可以高效表达, 并具有良好的生物学活性。

【关键词】整合素; β_1 和 β_2 亚基; 基因克隆; 原核表达; 蛋白纯化

【中图分类号】Q786

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2009)07-0011-05

High procaryotic expression and purification of cell intracellular region of integrin β_1 and β_2 subunits

WANG Gang, ZHANG Yan-ming, GUO Kang-kang, WANG Jing-yu

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】High expression of intracellular region of integrin β_1 and β_2 subunits was presented by constructing the pronucleus expression vectors of intracellular region of integrin β_1 and β_2 subunits, which lays a solid foundation for the further study of the location of integrin during cell migration, signal transduction and preparation of polyclonal antibody. 【Method】Intracellular regions of integrin β_1 and β_2 subunits were amplified by PCR and subcloned into pGEX-4T₂ vector to construct GST- β_1 and GST- β_2 fusion protein express plasmids, then transferred to *E. coli* BL21(DE3) and induced with IPTG. Finally the expressed protein was purified by Glutathione Sepharose™4B. 【Result】Intracellular domains of integrin β_1 and β_2 protein were highly expressed, finally highly pure and soluble GST- β_1 and GST- β_2 fusion protein was obtained. 【Conclusion】The intracellular domain of integrin β_1 and β_2 protein can be highly expressed and have good biological activities.

Key words: integrin; β_1 and β_2 subunit; gene cloning; pronucleus expression; protein purification

整合素(Integrin)是一类细胞膜表面的糖蛋白受体家族分子, 其相对分子质量约为 110~130 ku, 几乎在所有的动植物细胞中表达。整合素由 α 和 β

2 个穿膜亚基组成, 目前已知的 α 亚基有 18 种, β 亚基有 8 种, α 亚基与 β 亚基通过非共价键相结合构成异二聚体, 至少可以组成 24 种不同的整合素分子。

* [收稿日期] 2008-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771677)

[作者简介] 王 刚(1982—), 男, 山东高唐人, 硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通信作者] 张彦明(1956—), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: zhangym@nwsuaf.edu.cn

整合素的 2 个亚基均属于 I 型跨膜蛋白,与其他跨膜蛋白一样, α 、 β 亚基均由长的胞外区、跨膜区和短的胞内区 3 部分组成^[1-2]。

整合素表达于所有白细胞表面,是一类重要黏附分子,同时也是细胞信号转导的受体分子,在介导细胞内外双向信息传递中起着重要的桥梁作用。其胞外端可与胞外基质或其他细胞相结合,将胞外信号转入细胞内,导致细胞骨架重排、基因表达和细胞分化等;胞内端可与细胞骨架、信号转导分子及其他一些蛋白结合,从而调节整合素的聚簇及其与配体的亲和力^[3-5]。

在机体的天然免疫中,中性粒细胞在不同趋化剂的诱导下,向入侵病原体 and 炎症部位聚集,而在此聚集过程中,整合素胞外区黏附活性的调节起着至关重要的作用。正常血液循环中的中性粒细胞维持其整合素处于低亲和力、非黏附状态,一旦受到外界刺激,中性粒细胞迅速活化,整合素的亲和力上升并与其配体相结合,进而介导中性粒细胞穿过血管内皮向炎症部位聚集^[6-11]。因此,整合素对中性粒细胞及机体天然免疫功能的发挥均具有重要作用,但其分子机制尚不完全清楚。本研究构建了中性粒细胞黏附因子整合素 β_1 和 β_2 亚基胞内区原核表达载体,并借助 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌进行原核诱导

表达,以期为进一步研究其在细胞迁移及信号转导中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

pGEX-4T₂ 原核表达载体、宿主菌 DH5 α 和 BL21(DE3)、早幼粒白血病细胞株 HL-60,均来源于中国科学院动物研究所细胞信号与干细胞研究组。TRIzol LS Reagent、逆转录体系,均购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 及 T4 DNA 连接酶等为 Fermentas 公司产品。质粒小量提取及 DNA 片段凝胶回收试剂盒购自博大泰克公司。Glutathione SepharoseTM 4B 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。IPTG、Agrose、DTT 等化学试剂均为 Promega 公司产品。

1.2 引物的设计和合成

根据 NCBI 数据库中整合素 β_1 (登录号:NM-213968)、整合素 β_2 (登录号:NM-001124435)胞内区基因序列,设计胞内区原核表达引物 GST- β_1 -Sense、GST- β_1 -Antisence, GST- β_2 -Sense、GST- β_2 -Antisence。相关引物信息、选用的酶切位点(*Bam*H I、*Eco*R I 下划线所标)及扩增片段长度,详见表 1。

表 1 引物名称、序列、相对位置及扩增产物长度
Table 1 Name, sequence, position and length of the primers

引物名称 Primer name	核苷酸序列 Nucleotide sequence	相对全长序列位置/bp Position	预期扩增片段长度/bp Length
GST- β_1 -Sense	5'-CGCGGATCCGCGAAGCTTTTAATGATAATTTC-3'	2 254~2 273	144
GST- β_1 -Antisence	5'-GGCGAATTCGTCATTTTCCCTCATACTTCTTC-3'	2 397~2 375	
GST- β_2 -Sense	5'-CGCGGATCCGCGTGGAAGGCTCTGATCCAC-3'	2 168~2 186	144
GST- β_2 -Antisence	5'-CCGGAATTCCTAACTCTCAGCAAACCTGGG-3'	2 307~2 289	

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

1.3.1 总 RNA 的提取 早幼粒白血病细胞株 HL-60 作为体外研究中性粒细胞的一种细胞模型,在特定条件下诱导 5~7 d 后,可以分化为与中性粒细胞形态和功能十分相似的中性粒细胞样细胞(dHL-60)。取 $(0.5 \sim 1) \times 10^7$ dHL-60 细胞,于 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,PBS 洗 1 遍后加入 1 mL TRIzol LS Reagen,于室温放置 6~7 min,然后加入 200 μ L 氯仿,温和颠倒离心管 15 s,室温下静置 2~3 min,于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心 15 min,转移上层无色水相至一新离心管中,再加入等体积的异丙醇,混匀后室温下放置 10~15 min,于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀的 RNA,

最后用 1 mL 体积分数 75%乙醇洗 1 次,洗涤完毕后于室温下晾干,20 μ L DEPC 水溶解备用。

1.3.2 cDNA 的反转录合成 取上述 DEPC 水溶解的总 RNA 5 μ L(约 5 μ g),加入 3 μ L Oligo(dT),补加 DEPC 水至总体积 11 μ L,70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,迅速置冰上冷却 5 min,然后加入 Reverse transcriptase buffer 4 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,RNase 抑制剂(20 U)2 μ L,37 $^{\circ}$ C 作用 5 min,再加 1 μ L Reverse transcriptase (200 U),42 $^{\circ}$ C 作用 60 min,最后于 70 $^{\circ}$ C 灭活 10 min,迅速置冰上冷却,分装,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 整合素 β_1 、 β_2 亚基胞内区基因的 PCR 扩增

以上述合成的 cDNA 为模板,对目的片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: cDNA 1 μ L, pfu

DNA polymerase buffer 2.5 μ L, pfu DNA polymerase 0.5 μ L, 上、下游引物(浓度为 10 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP(10 mmol/L) 1 μ L, 补超纯水至总体积 25 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 45 s(温度根据不同片段进行设定, β_1 胞内 56 $^{\circ}$ C, β_2 胞内 58 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳检测 PCR 产物。

1.5 整合素 β_1 、 β_2 亚基胞内区原核表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对 PCR 产物和 pGEX-4T₂ 原核表达载体分别进行双酶切, 用琼脂糖凝胶电泳回收产物, 以 T4 DNA 连接酶于 22 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 然后将连接产物转化宿主菌 DH5 α , 挑取单克隆, 酶切鉴定并测序。测序由北京奥科生物技术公司完成, 测序正确的质粒分别命名为 GST- β_1 和 GST- β_2 , 预计表达的融合蛋白相对分子质量均为 31 ku。

1.6 原核重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达及融合蛋白的可溶性分析

1.6.1 融合蛋白的诱导表达 将上述构建的 GST- β_1 和 GST- β_2 质粒经鉴定无误后转化表达菌 BL21(DE3), 挑取单克隆接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇菌过夜, 第 2 天按体积比 1 : 100 接种于新鲜 LB 培养基, 继续培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~1.0, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h, 离心收集菌体, 1 $\times$ SDS 上样缓冲液重悬沉淀, 样品于 95~100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 然后 SDS-PAGE 检测表达情况, 同时以空载体 pGEX-4T₂(GST) 为阴性对照。

1.6.2 融合蛋白的可溶性分析 取 5 mL 诱导表

达产物, 用 1 mL 预冷的 PBS 重悬, 加入 0.1~1 mmol/L PMSF 和 1 mg/mL 溶菌酶, 冰置 15 min 后, 超声裂解(功率 200 W, 破碎 5 s)停 5 s, 超声 5 min, 冰上放置 10 min, 然后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

1.7 目的蛋白的提取及纯化

1.7.1 原核表达蛋白的提取 取诱导表达的菌液 200 mL, 于 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, PBS 洗涤 1 次, 然后用 10 mL 冰预冷的 PBS 重悬, 加入 0.1~1 mmol/L PMSF 和 1 mg/mL 溶菌酶, 于冰上放置 15 min 后, 超声破碎, 功率 300 W, 破碎 5 s, 停 5 s, 超声 20 min, 冰上放置 10 min, 然后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 备用。

1.7.2 原核表达蛋白的纯化 取上步离心后的上清液, 按每 200 mL 菌液加 133 μ L 的比例加入 Glutathione-SepharoseTM 4B 珠子, 于室温慢摇混匀 40 min, 待目的蛋白充分吸附后, 于 4 $^{\circ}$ C、500 r/min 离心 5 min, 收集 Glutathione-SepharoseTM 4B 珠子, 10 倍体积冰预冷的 PBS 洗涤 3 次, 最后用 PBS 重悬沉淀, 即得到纯化的 β_1 、 β_2 胞内区 GST 融合蛋白。随后对纯化产物进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 整合素 β_1 、 β_2 亚基胞内区基因的 PCR 扩增

从 dHL-60 细胞反转录来的 cDNA 中成功扩增出整合素 β_1 、 β_2 亚基胞内区基因序列, 其相对分子质量均为 144 bp(图 1), 与预期结果一致。

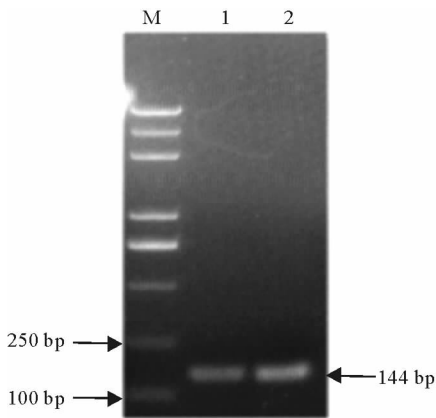


图 1 整合素 β_1 、 β_2 亚基胞内区基因 PCR 扩增结果
M. DL2000 plus 分子量标准; 1. β_1 胞内区基因片段;
2. β_2 胞内区基因片段

Fig. 1 PCR amplification results of intracellular region genes of integrin β_1 、 β_2
M, DL2000 plus Marker; 1. β_1 intracellular gene; 2. β_2 intracellular gene

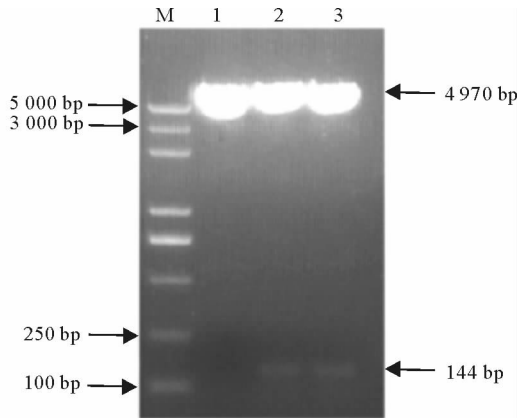


图 2 重组表达质粒 GST- β_1 和 GST- β_2 的 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定结果
M. DL2000 plus 分子量标准; 1. pGEX-4T₂ 载体;
2. GST- β_1 ; 3. GST- β_2

Fig. 2 Restriction analysis of recombination plasmid of GST- β_1 and GST- β_2 by *Eco*R I and *Bam*H I
M, DL2000 plus Marker; 1. pGEX-4T₂ vector; 2. GST- β_1 ; 3. GST- β_2

2.2 重组表达质粒 GST-β₁ 和 GST-β₂ 的鉴定

pGEX-4T₂ 空载体及重组表达质粒 GST-β₁ 和 GST-β₂ 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,空载体 pGEX-4T₂ 只在 4 970 bp 处有 1 条带,而 GST-β₁ 和 GST-β₂ 除在 4 970 bp 处有 1 条带外,在 144 bp 处还有 1 条带(图 2),说明原核重组表达质粒 GST-β₁ 和 GST-β₂ 构建成功。

β₁ 亚基胞内区测序结果:CGC GGA TCC GCG AAG CTT TTA ATG ATA ATT CAT GAC AGA AGG GAG TTT GCT AAA TTT GAA AAG GAG AAA ATG AAT GCC AAA TGG GAC GGT AAT CCT ATT TAT AAG AGT GCC GTA ACA ACT GTG AAT CCG AAG TAT GAG GGA AAA TGA C CTT AAG GCC;

β₂ 亚基胞内区测序结果:CGC GGA TCC GCG

TGG AAG GCT CTG ATC CAC CTG AGC GAC CTC CGG GAG TAC AGG CGC TTT GAG AAG GAG AAG CTC AAG TCC CAG TGG AAC AAT GAT AAT CCC CTT TTC AAG AGC GCC ACC ACG ACG GTC ATG AAC CCC AAG TTT GCT GAG AGT TAG G GAA TTC CGG(下划线处为基因编码序列,斜体部分为所选用酶切位点)

2.3 融合蛋白的表达及可溶性分析

2.3.1 融合蛋白的诱导表达 重组表达质粒 GST-β₁ 和 GST-β₂ 转化表达菌种 *E. coli* BL21(DE3),经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h,收集菌体,1×SDS 上样缓冲液重悬,SDS-PAGE 分析表明,GST-β₁ 和 GST-β₂ 均在 31 ku 处有表达(图 3),与预期大小一致。

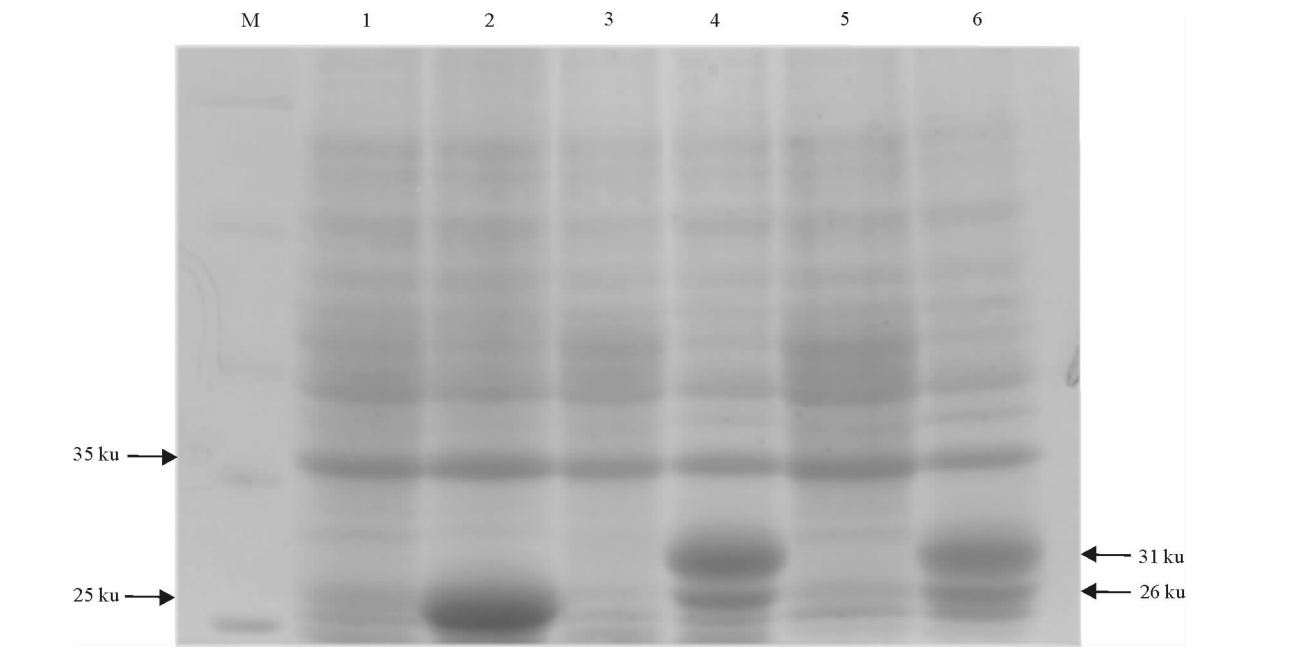


图 3 GST(pGEX-4T₂ 空载体)和融合蛋白 GST-β₁、GST-β₂ 在宿主菌 BL21 中的表达

M. 低分子量蛋白标准;1,3,5. 分别为诱导表达前 GST、GST-β₁ 和 GST-β₂ 菌体总蛋白;

2,4,6. 分别为诱导表达后 GST、GST-β₁ 和 GST-β₂ 菌体总蛋白

Fig. 3 Expression of GST(pGEX-4T₂ vector) and fusion protein GST-β₁ and GST-β₂ in *E. coli* BL21

M. Low molecular weight protein Marker;1,3,5. Total bacterial cell protein of GST,GST-β₁

and GST-β₂ before induction;2,4,6. Total bacterial cell protein of GST,GST-β₁ and GST-β₂ after induction

2.3.2 融合蛋白的可溶性分析 5 mL 诱导表达产物超声裂解后,离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 4 所示,诱导表达的融合蛋白均存在于上清中,说明其为可溶性蛋白,具有良好的生物学活性。

2.3.3 融合蛋白的纯化 200 mL 诱导表达产物离

心后收集菌体,超声裂解,上清中加入 Glutathione-Sepharose™ 4B,于室温慢摇混匀 40 min,离心收集沉淀,SDS-PAGE 电泳分析,结果见图 5。纯化之后,GST、GST-β₁、GST-β₂ 均只有单条带,说明纯化效果较好。

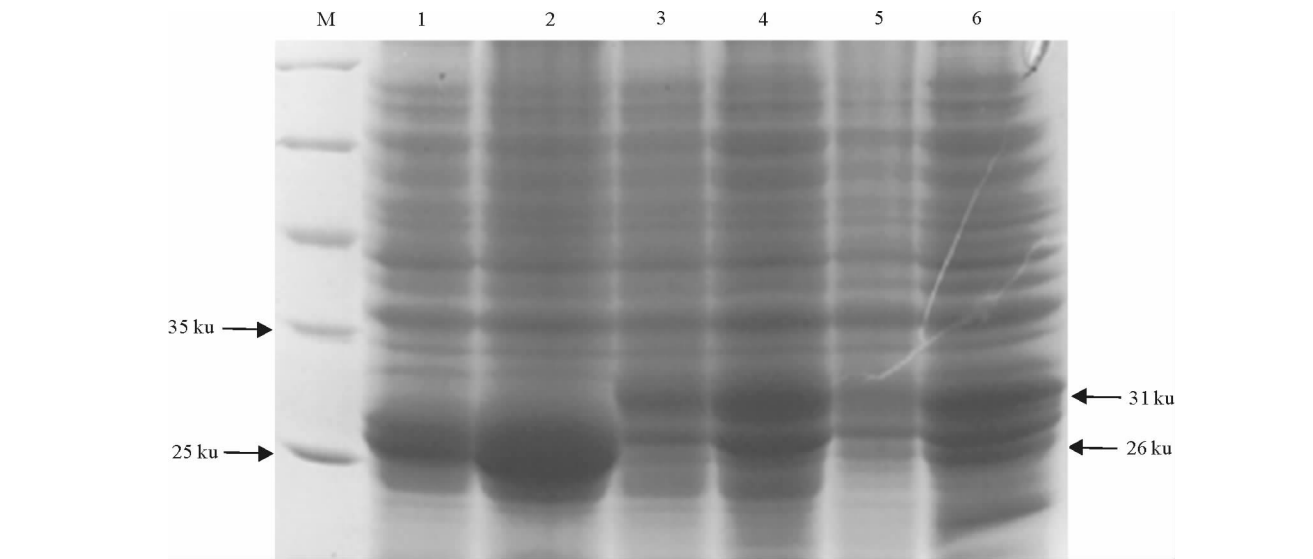


图 4 诱导表达蛋白的可溶性分析

M. 低分子量蛋白标准;1,3,5. 超声裂解后 GST、GST- β_1 和 GST- β_2 沉淀;2,4,6. 超声裂解后 GST、GST- β_1 和 GST- β_2 上清

Fig. 4 Soluble assay of induced protein

M. Low molecular weight protein Marker;1,3,5. Sediment of GST,GST- β_1 and GST- β_2 after supersonic-lysis;
2,4,6. Supernatant of GST,GST- β_1 and GST- β_2 after supersonic-lysis

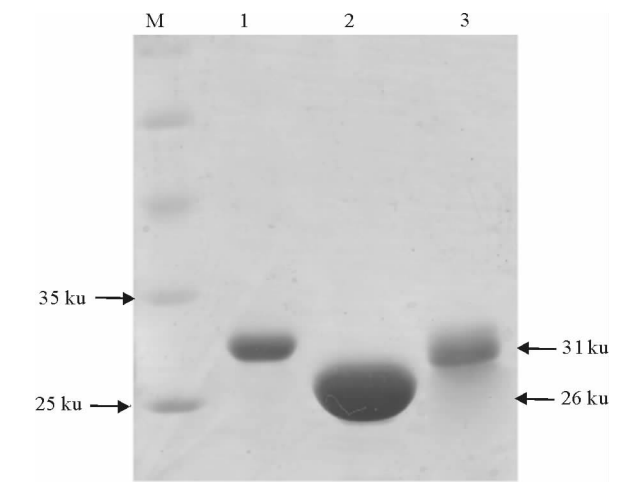


图 5 GST 及融合蛋白 GST- β_1 、GST- β_2 的纯化

M. 低分子量蛋白标准;1. GST- β_1 ;2. GST;3. GST- β_2

Fig. 5 Purification of GST and fusion proteins GST- β_1 and GST- β_2 after induction by IPTG

M. Low molecular weight protein Marker;
1. GST- β_1 ;2. GST;3. GST- β_2

3 讨 论

pGEX-4T₂ 是一种高效的原核表达载体,其表达的融合蛋白带有 GST 标签,可以采用 Glutathione-Sepharose™ 4B 亲和层析法进行纯化。本研究主要构建了整合素 β_1 、 β_2 胞内区原核表达质粒,并借助于 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌成功诱导表达出 GST- β_1 和 GST- β_2 融合蛋白,SDS-PAGE 结果表

明,这 2 种融合蛋白均以可溶性形式存在,说明其具有良好的生物学活性。

中性粒细胞在机体的细胞免疫中起着十分重要的作用,处于机体抵御微生物病原体入侵的第一线。当机体内有病原微生物侵入时,在其代谢产物 fMLP 等的刺激下,中性粒细胞会穿出血管内皮向病原微生物的方向发生定向迁移,进而将病原微生物杀死,而中性粒细胞的黏附及其迁移过程都离不开整合素的作用^[11-12]。一方面,作为细胞黏附分子大家族的一部分,整合素在介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质的黏附中发挥着重要作用,另一方面,其作为细胞表面的受体分子,在介导细胞内外的信号传递中也起着不可或缺的作用^[10,13-15]。因此,对整合素的研究有利于进一步了解细胞的迁移机制。

此外,由于整合素是一种跨膜蛋白,只有胞内部分可以与细胞内的其他信号分子相结合。为了避免原核表达蛋白过大而形成包涵体,所以本研究只选择性地表达了其胞内区,作为进一步检测蛋白相互作用的诱饵蛋白及其多克隆抗体制备的抗原成分。本研究通过整合素 β_1 、 β_2 胞内区原核表达载体的构建,实现了对整合素 β_1 、 β_2 亚基胞内区蛋白的高效表达,并通过纯化得到了高纯度的 GST- β_1 和 GST- β_2 胞内区融合蛋白,为下一步研究整合素在细胞迁移和信号转导中的定位,及其多克隆抗体的制备奠定了坚实的基础。

(下转第 22 页)