

人 β_2 微球蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化^{*}

张 劲^{1,2}, 郭霭光¹, 丰美福²

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国科学院 动物研究所 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

[摘 要] β_2 微球蛋白(β_2m)是主要组织相容性复合体(MHC)-I类分子的轻链部分, 该蛋白的原核表达与纯化是制备MHC-I类分子的首要条件。利用已经构建好的 β_2m 原核表达载体 pET23a+ β_2m , 在大肠杆菌(*E. coli*)中获得稳定表达。原核表达的 β_2m 大部分在包涵体中, 包涵体蛋白经充分洗涤、变性(尿素溶解)和复性, 并以强阴离子交换柱层析(Q-Sepharose)纯化, 获得 SDS-PAGE 纯的人重组 β_2m 。Western 印迹法分析表明, 该蛋白具有与抗人天然 β_2m 抗体反应的特性。

[关键词] β_2 微球蛋白; 重组蛋白; 包涵体; 复性

[中图分类号] Q 78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0087-04

人 β_2 微球蛋白(β_2m icroglobulin, β_2m)由99个氨基酸组成, 相对分子质量约为12 ku, 是构成主要组织相容性复合体(MHC)-I类分子的亚单位。MHC-I类分子在免疫系统中有极其重要的地位, 由1条分子质量为45 ku的重链(α 链)和1条分子质量为12 ku的轻链(β 链)经非共价键结合而成, 其中重链由多个基因位点和多种等位基因编码, 共显性表达, 具高度多态性; 而轻链则为不变的 β_2m ^[1]。有研究^[2-3]表明, β_2m 对维持I类分子天然构型的稳定性及其表达起关键作用。因此, 在制备MHC-I类分子四聚体和共复性的研究^[1, 4-6]中, 常常需要原核表达纯化的 β_2m 。为此, 本试验利用已经构建好的 β_2m 的原核表达载体, 在大肠杆菌(*E. coli*)中获得了稳定表达, 并对表达产物进行了复性纯化和鉴定, 以为进一步用基因工程方法制备MHC-I类分子, 及研究MHC-I类分子的结构与功能间的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

E. coli DH5 α 和BL 21(DE3)感受态细胞购自北京博大泰克公司; 重组质粒 pET23a+ β_2m 由美国 Kathryn 博士赠送; 鼠抗人 β_2m 多抗 B2 62 2 由法国 Lemonnier 博士赠送; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 为北京中山公司产品; 免疫印迹检测试剂盒 SuperSignal West Pico Trial Kit 购自美国

Pierce 公司; Q-Sepharose (Fast Flow) 购自瑞典 Amersam 公司; DNA Marker 购自北京天为时代科技有限公司; Protein Molecular Weight Marker 购自美国 Fementas 生物公司; SDS-PAGE 低分子质量标准蛋白购自上海生工公司; 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Not* I 购自深圳晶美公司。

1.2 方 法

1.2.1 含 β_2m 的重组质粒鉴定 用重组质粒 pET23a+ β_2m 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 用博大泰克质粒提取试剂盒提取质粒, 经 *Nde* I + *Not* I 双酶切, 并进行琼脂糖电泳鉴定。同法转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选转化子, 从阳性克隆中提取质粒进行测序鉴定, 测序由上海博亚生物技术公司完成。

1.2.2 β_2m 在 *E. coli* 中的表达 以测序验证的重组质粒 pET23a+ β_2m 转化 *E. coli* BL 21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基, 于 37 条件下振荡培养过夜, 然后按 1:50 的接种量转移到含 50 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 液体培养基中, 于 37 条件下振荡培养至 OD_{600 nm} 约为 0.6 时, 加入 IPTG 进行诱导表达, 于 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。比较不同诱导剂(IPTG)浓度(0.5, 1.0, 1.5 mmol/L)、不同诱导温度(30 和 37)及不同诱导时间(1, 3, 5 h)的蛋白表达量, 以选择蛋白表达的最适条件。用 Quantity One 分析软件对蛋白含量进行分析。

* [收稿日期] 2006-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30370383)

[作者简介] 张 劲(1978-), 女, 河南开封人, 讲师, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

1.2.3 包涵体的纯化复性 菌体以重悬缓冲液[10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 5 mL/L Triton-X-100, 200 μg/mL 的溶菌酶, 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PM SF]重悬, 在冰浴中以超声波破碎菌体, 离心后分别收集上清液和沉淀, 其中沉淀部分(包涵体)以 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 10 mL/L Triton-X-100 和 1 mol/L Urea 重悬并经超声处理洗涤 3 次, 然后再以不含 Triton X-100 的同一缓冲液洗涤 3 次, 得到的包涵体 β_m 以 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 6 mol/L Urea 溶解, 离心去不溶物后, 置于 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 中于室温条件下透析 24 h 使 β_m 复性。复性产物上 Q-Sepharose 柱, 以 0~100 mmol/L NaCl 线性梯度洗脱 (Pharmacia GradiFrac System), 合并含 β_m 的样品, 透析后以 Amicon Ultra4 (MWCO 10 000) 进行离心超滤浓缩。所有样品以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳进行分析。

1.2.4 SDS-PAGE 检测 参照 Laemmli 的方法^[7]进行 SDS-PAGE 检测, 浓缩胶浓度为 50 g/L, 分离胶浓度为 120 g/L, 以考马斯亮蓝 R250 染色显示蛋白条带。

1.2.5 Western 印迹法鉴定 蛋白样品以 120 g/L SDS-PAGE 进行电泳, 电泳完后采用湿转法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 一般于 100 V 转移 1.5 h。转移后用丽春红染液对滤膜进行染色, 用铅笔标出蛋白 marker 条带, 用 TTBS 漂洗脱色, 再用封闭液室温封闭膜 1~2 h。4 下在封闭袋内用封闭液稀释的特异性抗体过夜孵育膜, TTBS 漂洗 3 次, 每次 5~15 min, 再加入适当的封闭液稀释的 HRP 标记二抗, 室温下孵育 1~2 h, TTBS 漂洗后, 于暗室中用 ECL 发光试剂盒压片检测。

2 结果与分析

2.1 含 β_m 的重组质粒的鉴定

由图 1 可知, 琼脂糖电泳鉴定重组质粒的双酶切结果与预期结果相符, 质粒被切割为大小不等

2 个片段, 其中小片段与 β_m 的基因大小一致, 测序结果也与原目的基因序列一致。



图 1 成熟 β_m 表达载体的酶切
1 重组质粒的双酶切; 2 DNA 分子质量标准
Fig. 1 Enzyme-cut of recombinant expression vector for mature β_m
1 Recombinant plasmid containing β_m gene digested by *Nde*I + *Not*I; 2 200 bp DNA ladder

2.2 β_m 在 *E. coli* 中的表达

用重组质粒转化 *E. coli* BL 21 (DE3), 得到了含重组质粒的基因工程菌。分析 β_m 在 *E. coli* 中的表达条件优化试验结果(表 1 和图 2)可知, 从诱导温度来看, 37 ℃ 时 β_m 在 *E. coli* 中的蛋白表达量总体要比 30 ℃ 时高, 这可能与表达菌在最适宜温度 37 ℃ 时生长速度较快有关; 从诱导浓度来看, 各组试验均表明在 IPTG 浓度为 1 mmol/L 时, β_m 在 *E. coli* 中的蛋白表达量最高; 从诱导时间来看, 表现为随诱导时间增加, β_m 在 *E. coli* 中的蛋白表达总量均呈增大的趋势, 但在诱导 3 h 后, 目的蛋白表达量增速减缓。因此选定优化表达条件为: 在 37 ℃ 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h。

菌体经破碎后分为上清液和沉淀 2 部分, 大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分。SDS-PAGE 分析进一步表明, 原核表达的目的蛋白 β_m 的表达量约占总蛋白含量的 30% (质量分数); 包涵体中目的蛋白约占总蛋白含量的 50% (质量分数)。

表 1 不同条件下 β_m 在 *E. coli* 中的表达量比较

Table 1 Expression quantity of β _m in <i>E. coli</i> under different conditions						
诱导时间/h Induction time	30 下诱导剂(IPTG)浓度/(mmol·L ⁻¹) Revsulant concentration at 30			37 下诱导剂(IPTG)浓度/(mmol·L ⁻¹) Revsulant concentration at 37		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
0	20.0	20.0	20.0	20.5	20.5	20.5
1	23.2	23.4	23.0	24.2	24.2	24.0
3	26.3	26.5	26.6	28.3	28.5	28.0
5	27.6	27.5	27.2	30.2	30.3	30.2

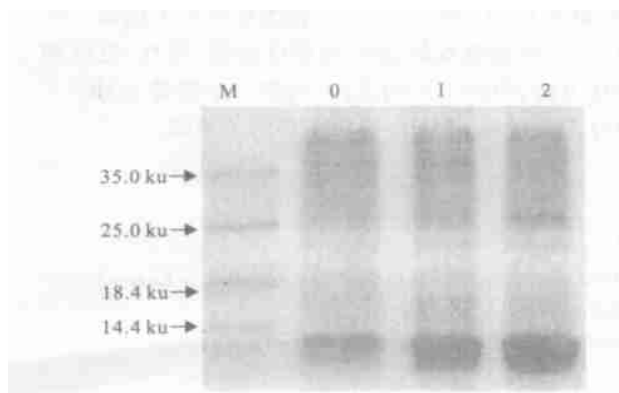


图2 β_2 m 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 鉴定
M. 蛋白分子质量标准; 0 诱导前; 1~2 IPTG 分别诱导 1, 3 h

Fig 2 SDS-PAGE analysis of mature β_2 m expressed in *E. coli* BL 21(DE3) strain

M. Protein molecular weight marker; 0 BL 21 (pET- β_2 m) before IPTG induction; 1- 2 BL 21 (pET- β_2 m) induced with IPTG for 1, 3 h

2.3 包涵体的复性与纯化

β_2 m 的包涵体蛋白经洗涤、尿素溶解变性后, 可以通过透析的方法复性, SDS-PAGE 结果显示, 目的蛋白占总蛋白的含量大于 80%, 以考马斯亮蓝 (CBB)-G250 法测定蛋白浓度小于 0.5 mg/mL。再以 Q-Sepharose 离子交换柱层析对样品进行纯化, 合并含目的蛋白的各管并经超滤浓缩, 以 CBB-G250 法测定蛋白浓度为 5.4 mg/mL, SDS-PAGE 分析表明该峰为纯的重组蛋白(图3)。

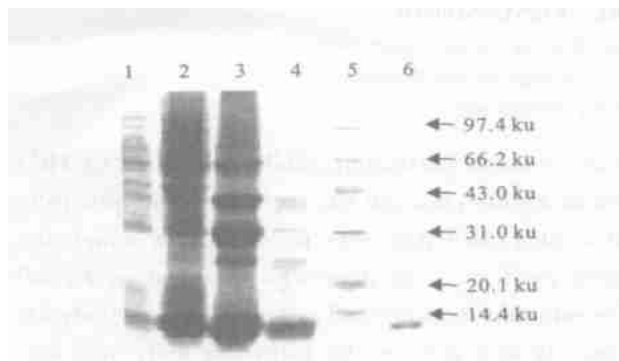


图3 β_2 m 原核表达、纯化和复性的 SDS-PAGE 鉴定

1 诱导前; 2 诱导后; 3 包涵体(沉淀); 4 复性后;
5 SDS-PAGE 低分子质量标准蛋白; 6 纯化后

Fig 3 SDS-PAGE analysis of mature β_2 m prokaryotic expression, purification and refolding

1 BL 21 (pET- β_2 m) before IPTG induction;
2 BL 21 (pET- β_2 m) after IPTG induction;
3 Pellet of BL 21 (pET- β_2 m) bacterial lysate;
4 Inclusion body after refolding;
5 SDS-PAGE Protein Low Molecular Weight Marker;
6 Purified protein (β_2 m)

2.4 重组 β_2 m 的 Western 印迹分析

Western 印迹分析(图4)显示, 含 pET23a+ β_2 m 的工程菌表达产物(IPTG 诱导后)在分子质量为 12 ku 处的重组蛋白与抗人 β_2 m 抗体有特异性反应; 而阴性对照(即转入 pET23a 空载体的同一菌株经诱导后)无特异性反应条带。纯化后的 β_2 m 仅显示 1 条分子质量为 12 ku 的特异性条带, 说明纯化获得的重组 β_2 m 达到抗原性纯。



图4 β_2 m 在大肠杆菌中表达的 Western 印迹鉴定
+ . 纯化蛋白(β_2 m); - . 阴性对照

Fig 4 Western blotting analysis of mature β_2 m expressed in *E. coli* BL 21(DE3) strain
+ . Purified protein (β_2 m); - . Negative comparison

3 讨论

β_2 m 是组成 MHC-I 类分子复合体的轻链分子, 对于 MHC-I 类分子在细胞表面的稳定表达和有效提呈抗原肽必不可少^[3,8], 并且 β_2 m 能促进抗原肽与 B 细胞表面 MHC-I 类分子的结合^[9], 其也是制备 MHC-I 类分子的必要成分。

β_2 m 与 MHC-I 类分子重链及抗原肽复性可形成与天然相似的肽 MHC 复合体(pMHC), 这需要天然的 β_2 m。如在末端连接其他外源氨基酸序列, 可能影响 β_2 m 的整体构象, 进而对 pMHC 的构象造成影响, 使其特异性发生改变, 不同于天然 pMHC-I 类分子。

因此, 本研究选择构建好的 pET23a 原核表达载体, 该载体全长 3 592 bp, 携带有 Amp 抗性基因和 LacI 基因, 重组体可通过 IPTG 诱导重组基因的表达。在目的基因片段前带有起始密码子, 而在基因片段后则带有终止密码子, 表达时只表达完整的 β_2 m 蛋白。而国内的相关研究报道^[10-12]常在 β_2 m 末端加上融合标签以便于纯化。

由于 β_2 m 为只有 99 个氨基酸组成的小分子蛋白, 因而易于在原核系统表达。表达的 β_2 m 大部分都在包涵体内, 使用反复洗涤的方法就能得到初步纯化, 并且变性和复性也比较简单。由于 β_2 m 的等电点为 5.7, 进一步以强阴离子交换层析法进行纯化, 可获得 SDS-PAGE 和 Western 印迹纯的 β_2 m

重组蛋白。

总之,本试验利用已经构建好的 β_2m 原核表达载体,在大肠杆菌中获得了稳定表达。目的蛋白在未加 IPTG 诱导前在 *E. coli* 就有一定水平的渗漏表

达;加入 IPTG 诱导后, β_2m 表达水平大大提高。同时,运用简便有效的 β_2m 包涵体洗涤、变性、复性和纯化方法,得到了目的蛋白,为进一步制备 MHC-I 类分子及研究 pMHC 的功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Garboczi D N, Hung D T, Wiley D C. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3429-3433
- [2] Vitiello A, Potthar T A, Seman L A. The role of β_2m micro-globulin in peptide binding by class I MHC molecules[J]. *Science*, 1990, 250: 1423-1426
- [3] Kozlowski S, Takesita T, Boencke H, et al. Excess β_2m micro-globulin promoting functional peptide association with purified soluble class I molecules[J]. *Nature*, 1991, 349: 74-77.
- [4] Altman J D, Moss P H, Goulder P R, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes[J]. *Science*, 1996, 274: 94-96
- [5] Parker K C, Silver M L, Wiley D C, et al. An HLA-A2/ β_2m /peptide complex assembled from subunits expressed separately in *E. coli*[J]. *Mol Immunol*, 1992, 29(3): 371-378
- [6] 王晓花, 孙成刚. 抗原特异性 CTL 检测新技术——可溶性 MHC-肽四聚复合物法的功能和应用[J]. *生命的化学*, 2004, 24(6): 477-479
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685
- [8] Otten G R, Bikoff E, Ribaud R K, et al. Peptide and β_2m microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression[J]. *J Immunol*, 1992, 148: 3723-3732
- [9] Shields M J, Asefi N, Hodgson W, et al. Characterization of the interactions between MHC class I subunits: a systematic approach for the engineering of higher affinity variants of β_2m microglobulin[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 2297-2307.
- [10] 钱 丽, 钱书兵, 钱关祥. 人 β_2m 基因的克隆及表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 17(4): 384-385
- [11] 周最明, 郭亚兵, 王战会, 等. 人 β_2 微球蛋白基因在大肠杆菌中的稳定高效表达[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(11): 986-991
- [12] 钱 丽, 钱关祥. Induction of *in vivo* CTL immunity by OVA 257-264- β_2m fusion protein[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18: 439-441.

Human β_2m microglobulin expression and purification in *Escherichia coli*

ZHANG Jin^{1,2}, GUO Aiguang¹, FENG Meifu²

(1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 The Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology,

The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Human β_2m microglobulin (β_2m) is a light chain of major histocompatibility complex (MHC) class-I molecule. Expression and purification of this protein in *Escherichia coli* (*E. coli*) is a prerequisite to the preparation of MHC-I molecule. The expression vector pET23a+ β_2m was presented, in which the complete sequence of β_2m gene was inserted. Constant-yield expression of β_2m was achieved in *E. coli* transformed with the expression vector, and most of the recombinant β_2m existed in the inclusion body after IPTG induction. The inclusion body was washed extensively and β_2m in the inclusion body was solubilized with 6M urea. The β_2m was refolded by dialysis and purified by ion-exchange chromatography (Q-Sepharose). Western blotting assay indicated that the polyclonal antibody against human native β_2m could react specifically with the recombinant protein. The purified protein appeared as a single band on both SDS-PAGE and Western blotting, indicating that it was chemical and antigenic pure. This work provides the basis for the further study of MHC-I molecule.

Key words: β_2m microglobulin; recombinant protein; inclusion body; refolding