重组蛋白 sHLA-G1 的原核表达与纯化

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] 为了进一步在蛋白质水平对人白细胞抗原 HLA-G 进行分析,利用已经构建好的克隆质粒 pGEM-T-HLA-G1,进一步构建了重组原核表达质粒 pET28a-sHLA-G1。SDS-PAGE 检测表明,重组蛋白 sHLA-G1 在大肠杆菌(*E. coli*)中得到稳定表达,原核表达的重组蛋白 sHLA-G1 主要以包涵体形式存在。包涵体蛋白经充分洗涤、尿素溶解后用钴离子树脂纯化,并用 SDS-PAGE 和 Western 印迹进行了分析,鉴定结果表明,该蛋白纯度达到 90 %以上,并能与 HLA-G 特异性抗体 87G 反应。该研究结果为进一步的复性工作奠定了基础。

[关键词] HLA-G;原核表达;重组蛋白;包涵体
[中图分类号] Q78 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)08-0180-05

Prokaryotic expression and purification of recombinant protein soluble HLA-G1

ZHANG Jin[1,2], GUO Ai-guang[1], FENG Mei-fu[2]
(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: In order to study human leukocyte antigen (HLA-G) protein, on the basis of a recombinant cloning plasmid pGEM-T-HLA-G1, prokaryotic expression plasmid pET28a-sHLA-G1 was constructed, which could express soluble recombinant protein HLA-G1 in *Escherichia coli* (*E. coli*). Most of His-sHLA-G1 existed in the inclusion body. The inclusion body was washed extensively and solubilized with urea, and then purified with Co^{2+} resin. Finally, the purified protein was analyzed by using SDS-PAGE and Western blot. The results indicated that the purity of His-sHLA-G1 could reach 90 %, and the recombinant protein could react with monoclonal antigen 87G. This research provided the basis for the further refolding study on HLA-G molecule.

Key words: HLA-G; prokaryotic expression; recombinant protein; inclusion body

人白细胞抗原(HLA-G)是一种非经典的主要组织相容性复合体(MHC) Ⅰ类分子,与人体免疫耐受相关,1987 年由 Geraghty 等[1]首次发现。虽然 HLA-G 的编码基因及分子结构与经典 HLA-I 类分子相似,但其还具有以下特点:①组织限定性分布。经典的 HLA-I 类分子几乎在所有的有核细胞中均有表达,而 HLA-G 在正常生理条件下表达于免疫赦免区,如母胎交界面、胸腺髓质间上皮细胞、眼球部分;在病理条件下,HLA-G 可出现在肿瘤、病毒侵染细胞中,或在皮肤炎症期间或器官移植物功能良好的情况下表达。②限制性多态性。到目前为止,只发现了 16 种 HLA-G 的等位基因,由于选择性剪切产生的 mRNA 可编码 7 种异构体,分别编码 4 种膜结合型(HLA-G1～G4 或 mHLA-G1～G4)及 3 种可溶性

*[收稿日期] 2006-07-14
[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。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HLA-G(HLA-G5～G7 或 sHLA-G1～G3)[2-4]。

目前对 mHLA-G 分子的研究比较透彻,对其结构与功能都有比较深入的了解,然而对 sHLA-G 分子的功能研究尚处于起步阶段。为进一步在蛋白质水平分析 HLA-G,本实验室从健康人外周血单个核细胞中,克隆了中国人 HLA-G1 的 cDNA 序列,构建了 pGEM-T-HLA-G1 载体。在此基础上,将编码 HLA-G1 的胞外区结构域(274 个氨基酸) cDNA 片段亚克隆到原核表达载体 pET28a 上,并诱导表达和纯化出 sHLA-G1 重组蛋白,以期为进一步探讨 HLA-G 蛋白结构与功能的关系,研究 HLA-G 与特异性受体结合及其信号转导过程奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材　料

克隆载体 pGEM-T-HLA-G1 由为本实验室构建;原核表达载体 pET28a(+)购自德国 Novagen 公司;宿主菌 *E. coli* DH5α 和 BL21(DE3)购自北京博大泰克公司;限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Hin*d Ⅲ等为美国 Gibco 公司产品;T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司;溶菌酶购自洛阳华美生物工程公司;抗 HLA-G 的特异性抗体 87G (IgG),由美国 Geraghty 博士惠赠;辣根过氧化物酶(HRP)交联的羊抗鼠 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;免疫印迹检测试剂盒 SuperSignal West Pico Trial Kit、BCA 蛋白质检测试剂盒均购自美国 Pierce 公司;质粒提取试剂盒购自上海博亚生物技术有限公司;Talon Metal Affinity Resins (钴金属离子亲和树脂)购自美国 BD(Clontech) 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2　方　法

1.2.1　原核表达载体的构建　用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ分别对克隆载体 pGEM-T-HLA-G1 和表达载体 pET28a 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收目的片段 sHLA-G1。按照常规方法[5]与双酶切后的载体 pET28a 进行连接反应,构建原核表达质粒 pET28a-sHLA-G1,转化宿主菌 *E. coli* DH5α,挑取阳性克隆,进行酶切鉴定并测序。

1.2.2　转化及诱导表达　(1)转化与蛋白质表达条件的优化。鉴定无误后,提取 pET28a-sHLA-G1 质粒转化表达菌 *E. coli* BL 21(DE3),挑取阳性克隆于 LB(含 Kna 30 μg/mL)液体培养基,37 ℃摇菌过夜,按体积比 1∶50 的接种量转移到含相应抗生素的新鲜 LB 液体培养基中,继续扩增至 $OD_{600\ nm}$ 约为 0.6 时,分别在不同诱导剂(IPTG)浓度(0.5,1.0,1.5 mmo1/L)、不同诱导温度(30,37 ℃)及不同诱导时间(1,3,5 h)下进行蛋白表达。根据蛋白表达量来选择蛋白表达的最适条件,SDS-PAGE 检测表达情况,以 Quanity One 分析软件对蛋白含量进行分析。(2)最适条件下诱导表达蛋白。在预先确定的最佳 IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)浓度、最佳温度和最佳诱导时间下诱导表达蛋白,离心收集菌体,并进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.3　包涵体的重悬、洗涤与溶解　培养物 5 000 ×*g* 离心 15 min,收集菌体。以体积比 1∶4(菌液)加入重悬缓冲液(50 mmol/L Na_3PO_4,500 mmol/L NaCl,pH 7.0,体积分数 0.5% Triton-X-100,1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟)) + 200 μg/mL 的溶菌酶重悬菌体,室温下放置 30 min。超声破碎(冰上 20 min) 10 s/次,脉冲 10 s,功率 400 W。4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,保留沉淀(包涵体)。包涵体中加入 20～30 mL 洗涤缓冲液(50 mmol/L Na_3PO_4,500 mmol/L NaCl,pH 7.0,体积分数 1% Triton-X-100,1 mol/L 脲),室温下放置 30 min。4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min,重复 1～2 次。包涵体中加入 20 mL 溶解缓冲液(50 mmol/L Na_3PO_4,500 mmol/L NaCl,pH 7.0,6 mol/L 脲),室温下搅动 1～2 h。4 ℃、16 000 r/min 离心 30 min。收集上清液,即得变性溶解蛋白。

1.2.4　蛋白质的纯化与鉴定　采用钴柱纯化(离心法)法。取 10 个灭菌的 2 mL Eppendorf 管,各加 200 μL 体积分数 50% Co-resin,700 ×*g* 离心 2 min,移去上清液;加 1 mL 平衡/洗涤缓冲液(pH 7.0,50 mmol/L Na_3PO_4,4 mol/L 盐酸胍,300 mmol/L NaCl),立即混匀预平衡,700 ×*g* 离心 2 min,移去上清液;重复以上步骤 1～2 次,取 1 mL 样品加入树脂于室温结合 30 min;700 ×*g* 离心 5 min,小心移去尽可能多的上清液(注意勿搅动树脂沉淀);2 mL 平衡/洗涤缓冲液,室温下冲洗,700 ×*g* 离心 5 min;2 mL 平衡/洗涤缓冲液 + 10 mmol/L 咪唑,室温下洗涤,700 ×*g* 离心 5 min,移去上清液;50 μL 平衡/洗涤缓冲液 + 200 mmol/L 咪唑,混匀,700 ×*g* 离心 2 min,收集上清液,50 μL/管,共 10 次。

用 BCA 法测定纯化蛋白的浓度,同时对上述收集的上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测,并对目的蛋白含量进行灰度扫描分析。重组蛋白的 Western 印迹检测按照文献[6]的方法进行。一抗为 HLA-G1 和 HLA-G5 的特异性单克隆抗体 87G[7]。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建和鉴定

对构建好的原核表达质粒 pET28a-sHLA-G1 进行酶切鉴定并测序。琼脂糖凝胶电泳显示其中的目的基因 His-sHLA-G1 片段为 837 bp,与理论值相符(图 1)。

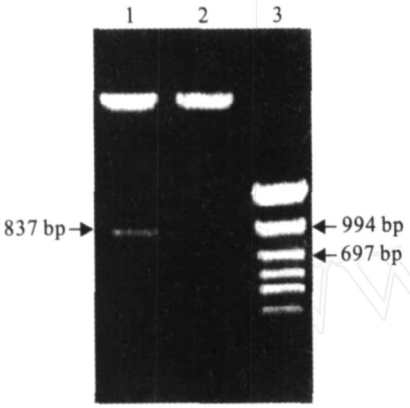

图 1 重组表达质粒 pET28a-sHLA-G1 的酶切鉴定

1. *Bam*H Ⅰ/ *Hin*d Ⅲ双酶切重组质粒 pET28a-sHLA-G1;
2. *Bam*H Ⅰ/ *Hin*d Ⅲ双酶切空质粒 pET28a;3. DNA Marker

Fig. 1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pET28a-sHLA-G1

1. *Bam*H Ⅰ/ *Hin*d Ⅲ digestion of recombinant plasmid pET28a-sHLA-G1;2. *Bam*H Ⅰ/ *Hin*d Ⅲ digestion of pET28a;3. DNA Marker

DNA 测序结果证实,重组质粒中的目的基因片段(不包括载体序列)与 GenBank 中收录的 HLA-G1 胞外区(即 sHLA-G1)cDNA 序列一致。

2.2 sHLA-G1 的氨基酸序列

对重组质粒 pET28a-sHLA-G1 进行测序鉴定,结果(不包括载体序列)表明其为 sHLA-G1 的 cDNA 序列,用 Vector NTI Suite 6.0 软件翻译得到的蛋白序列如图 2 所示。sHLA-G1 的氨基酸序列包括α1、α2 和α3 链,共 274 个氨基酸(不包括载体氨基酸);而整个重组蛋白 His-sHLA-G1 的分子质量大小约为 36 ku。

2.3 重组蛋白的诱导表达

以重组质粒转化 BL21(DE3) 宿主菌,经 IPTG 诱导表达后的 SDS-PAGE 分析结果见图 3。由图 3 可知,过量表达的 His-sHLA-G1 蛋白分子质量与理论预测的大小(36 ku) 一致。

灰度扫描分析显示,目的蛋白的表达量达菌体总蛋白含量的 35 %。

比较不同诱导剂(IPTG) 浓度(0.5,1.0,1.5 mmo1/L)、不同诱导温度(30,37 ℃)及不同诱导时间(1,3,5 h)的蛋白表达量,筛选蛋白表达的最适条件,并以 Quanity One 分析软件对蛋白含量进行分析,其结果见表 1。由表 1 可知,蛋白优化表达的最适条件为:1 mmol/L 的 IPTG 在 37 ℃下诱导 5 h。

表 1 不同条件下重组蛋白 sHLA-G1 在 *E. coli* 中的表达

Table 1 Expression quantity of sHLA-G1 recombinant protein in *E. coli* under the different conditions

诱导时间/ h Induction time	30 ℃下的诱导剂(IPTG) 浓度/ (mmol ·L⁻¹) Revulsant concentration at 30 ℃	重组蛋白表达量/ % Expression quantity of the recombinant protein	诱导时间/ h Induction time	37 ℃下的诱导剂(IPTG) 浓度/ (mmol ·L⁻¹) Revulsant concentration at 37 ℃	重组蛋白表达量/ % Expression quantity of the recombinant protein
0	0.5	0	0	0.5	0
	1.0	0		1.0	0
	1.5	0		1.5	0
1	0.5	11.2	1	0.5	23.0
	1.0	11.5		1.0	22.9
	1.5	10.8		1.5	22.0
3	0.5	18.3	3	0.5	25.8
	1.0	19.5		1.0	26.2
	1.5	16.5		1.5	28.0
5	0.5	19.6	5	0.5	30.2
	1.0	20.5		1.0	34.8
	1.5	18.6		1.5	33.2

2.4 Western Blot 检测

对 87G 特异性单克隆抗体的 Western Blot 检测发现,经 IPTG 诱导的菌体蛋白泳道在 36 ku 处出现明显的杂交条带,而未经 IPTG 诱导的全菌蛋白泳道中无杂交条带(图 4)。说明转有质粒 pET28a-sHLA-G1 的表达菌,在经 IPTG 诱导后有重组蛋白 sHLA-G1 的表达。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAP
WVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMI
GCDLGSDGRLIRGYERYAYDGLDYLALNEDLRSWTAADTAAQISLRLCEA
ANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGLEMLQRADPPLTHVTHHPVFDYE
ATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQLWAAV
VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRW

图 2　sHLA-G1 的氨基酸序列

Fig. 2　Amino acid sequence of sHLA-G1

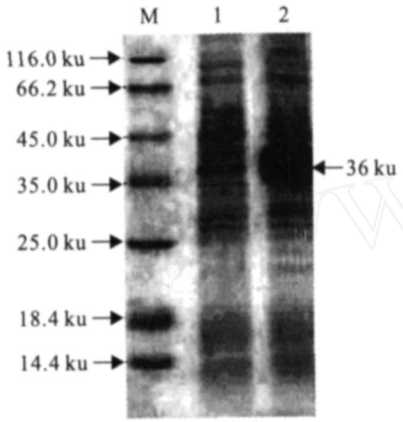

图 3　重组蛋白 sHLA-G1 原核表达的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 Marker;1. 诱导表达前的菌体总蛋白;
2. 经 IPTG 诱导表达后的总蛋白

Fig. 3　Prokaryotic expression of soluble HLA-G1 recombinant protein

M. Protein Marker;1. Total cell protein before induction;
2. Total cell protein induced by IPTG

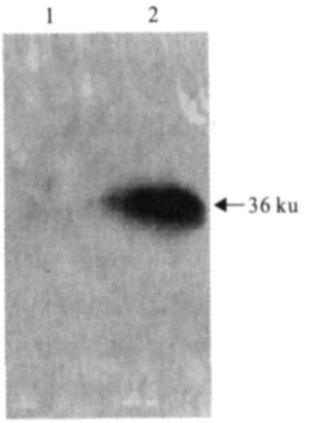

图 4　重组蛋白 sHLA-G1 的 Western blot 分析

1. 诱导前的菌体总蛋白;2. 诱导后的总蛋白

Fig. 4　Western blot analysis of sHLA-G1 recombinant protein

1. Total cell protein before induction;2. Total cell protein after induction

2.5　重组蛋白的纯化

重组蛋白在宿主菌中形成包涵体,因此将诱导菌超声裂解,提取包涵体并洗涤、溶解后,用钴柱进行纯化,经 SDS-PAGE 检测的结果见图 5。

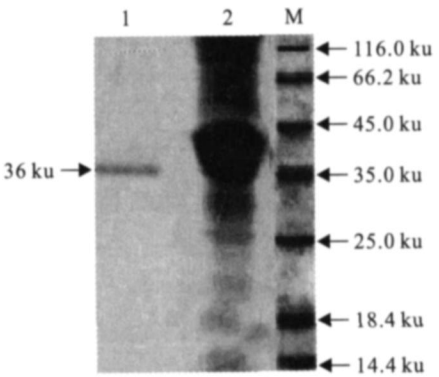

图 5　重组蛋白 sHLA-G1 的纯化

1. 纯化蛋白;2. 包涵体蛋白;M. 蛋白 Marker

Fig. 5　Purification of sHLA-G1 recombinant protein

1. Purified recombinant protein;2. Inclusion body of the recombinant protein;M. Protein Marker

由图 5 可知,纯化后的重组蛋白在分子质量为 36 ku 处显示单个特异条带,几乎无杂带(电泳纯)产生。灰度扫描分析显示,包涵体中的目的蛋白占包涵体总蛋白含量的 50 %,纯化后的目的蛋白占总蛋白含量的 90 %。BCA 法测定纯化后的目的蛋白,其质量浓度为 1.5 mg/mL。

3　讨　论

HLA-G1 的全长基因由 6 个外显子组成,外显子 1 编码前导肽,外显子 2、3、4 分别编码 α1、α2 和 α3 结构域,外显子 5 和 6 分别编码跨膜区和胞浆区域[8]。若 HLA-G 全长基因的内含子 4 中出现终止密码子,则会导致跨膜区和胞浆区的缺失,只有胞外区(α1、α2 和 α3 结构域)的表达,即翻译成了可溶性 HLA-G1 (sHLA-G1)。

近年来,国内外学者对 HLA-G 都给予了极大的关注,尤其是在其结构与功能的关系方面。常见的蛋白表达体系有真核和原核两大类,但真核表达难以达到需要的量,阻碍了对其功能的认识,而原核

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表达则可弥补此不足。原核表达可采用的表达载体有很多种,其中常用的有pET系列和pUR系列等,但其都具有各自不同的特点。本研究采用pET系列,即选择pET28a(+)原核表达载体,全长5 369 bp,携带有卡那霉素抗性基因(Kna)和*Lac* I基因,重组体可通过IPTG诱导重组基因的表达,在T7启动子后还带有His Tag,可用于重组蛋白的亲和层析纯化。

目的蛋白的表达及其表达量不仅与目的片段的基因序列有关,同时也与所选择的表达系统、表达菌、诱导物浓度、诱导温度和诱导时间等都有关。本试验在设计时即确定了基因序列、原核表达载体和菌株,因此在实际的蛋白表达优化时仅选择了诱导物浓度、诱导温度和诱导时间3个影响因素。结果表明,重组蛋白His-sHLA-G1在37 ℃时的蛋白表达量总体要较30 ℃时高,这可能与表达菌在最适宜温度37 ℃时生长速度最快有关;相对于温度而言,IPTG浓度对His-sHLA-G1表达的影响不大,但总体上显示IPTG浓度为1 mmol/L时蛋白的表达量相对最高;随诱导时间的增加,蛋白表达量呈增大的趋势。在试验条件下,1 mmol/L IPTG在37 ℃下诱导5 h时,重组蛋白的表达量及表达增量均最大。

重组蛋白在宿主菌中形成包涵体,因此采用溶菌酶裂解和超声破碎(冰上)相结合的方法充分破碎细菌时,不必担心包涵体蛋白的失活问题。在细菌破碎后,获得的包涵体沉淀中除主要含有重组蛋白以外,还含有核酸、膜脂和杂蛋白等杂质,这将对后续工作带来麻烦,还会影响复性效率等[9]。因此,一般在复性前需对这些杂质进行清除。

试验中先将包涵体用含有体积分数1%Triton-100和1 mol/L脲的洗涤缓冲液反复洗涤,除去部分杂质,获得初步分离纯化的包涵体,再进一步用6 mol/L脲或4 mol/L盐酸胍来溶解。实验室常用的溶解包涵体的条件是8 mol/L的脲或6 mol/L的盐酸胍,在本试验中用浓度略低的脲在室温下充分搅拌约1 h后也获得较为理想的溶解效果,而浓度相对较低的变性剂有利于随后的复性[10-11]。由于原核表达的重组蛋白为His-sHLA-G1,可采用钴离子金属螯和层析法进一步对重组蛋白进行亲和层析,以获得纯度较高的目的蛋白,从而为进一步的复性工作做好准备。

[参考文献]

[1] Geraghty D E, Koller B H, Orr H T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(24): 9145-9149.

[2] Carosella E D, Paul P, Moreau P, et al. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects[J]. Immunology Today, 2000, 21(11): 532-534.

[3] Carosella E D, Dausset J, Rouas F N. Immunotolerant functions of HLA-G[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55(3): 327-333.

[4] Le Bouteiller P, Solier C. Is antigen presentation the primary function of HLA-G? [J]. Microbes Infect, 2001, 3(4): 323-332.

[5] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 4版. 马学军, 舒跃龙, 颜子颖, 等译. 北京: 科学出版社, 2005: 104-106.

[6] 张 劲, 郭霭光, 丰美福. 人β2微球蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(7): 87-90.

[7] Moretta L, Ciccone E, Mingari M C, et al. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors[J]. Adv Immunol, 1994, 55: 341-380.

[8] Solier C, Mallet V, Lenfant F, et al. HLA-G unique promoter region: functional implications[J]. Immunogenetics, 2001, 53(8): 617-625.

[9] Middelberg A P. Preparative protein refolding[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(10): 437-443.

[10] Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, et al. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312: 1383-1386.

[11] Umetsu M, Tsumoto K, Ashish K, et al. Structural characteristics and refolding of in vivo aggregated hyperthermophilic archaeon proteins[J]. FEBS Lett, 2004, (557): 49-56.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net