

苦荞过敏原 TBa 和 TBb 基因的共表达及其包涵体复性的研究

贺东亮, 张政, 任晓霞, 崔晓东, 李玉英, 王转花

(化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

摘要:【研究目的】利用大肠杆菌共表达苦荞过敏蛋白的两个亚基, 并对表达产物进行包涵体复性研究和免疫学活性分析;【方法】用已构建的表达质粒 pET-28a-TBa 和 pET-32m-TBb, 共转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态, 利用双抗生素筛选法, 获得稳定遗传的双质粒转化子, 经 IPTG 诱导, 两个基因在同一宿主菌中共表达, 在共表达产物复性过程中, 两个亚基互为分子伴侣, 相互促进了蛋白质的重新正确折叠;【结果】表达蛋白以包涵体的形式存在, ELISA 检测表明: 复性后的蛋白免疫学活性得到了提高;【结论】由此获得了有活性的蛋白质, 并且建立了不相容双质粒共表达外源基因和包涵体复性的方法。

关键词: 苦荞; 过敏蛋白; 共表达; 包涵体; 复性

中图分类号: Q78 文献标识码: A

Coexpression of Tartary Buckwheat Allergen TBa and TBb and Renaturation of the Inclusion Body

He Dongliang, Zhang Zheng, Ren Xiaoxia, Cui Xiaodong, Li Yuying, Wang Zhuanhua

(Key laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: 【OBJECTIVE】To co-express the two subunits of Tartary Buckwheat Allergen in *E.coli* and made researchs on renaturation of inclusion body and check the immunologic characters of the production expressed, respectively; 【METHOD】The two resultling plasmids pET-28a-Tba and pET-32m-TBb were used to cotransform *E.coli* BL21(DE3) cell. After both ampicillin and kanamycin were presented in the selective medium and induction with IPTG, both TBa and TBb genes were coexpressed in *E.coli*. In the process of renaturation of coexpressed product, two subunits acted as molecular chaperones with each other, which promoted the refolding of protein TBa and TBb; 【RESULT】Production expressed presentsed as inclusion body, and ELISA indicated that the renatured protein had the improvement on the immunological activity and gained the activated protein; 【CONCLUSION】A new method for coexpression of proteins in *E.coli* containing two incompatible plasmids in which two different antibiotic resistant markers were included and inclusion body renaturation were also established.

Key words: tartary buckwheat, allergenic protein, coexpression, inclusion body, renaturation

0 引言

荞麦过敏蛋白是荞麦种子中一种重要的贮藏蛋白, 该蛋白能够使一些食用或接触苦荞产品的人产生

过敏反应。1909年 Smith^[1]首次报道了关于因摄取少量荞麦粉而引起的过敏症状, 自此以后, 欧洲、北美洲、日本、朝鲜的研究者进行了荞麦过敏原在敏感人群中

基金项目: 国家自然科学基金(30870525, 30671084); 山西省自然科学基金(2007011077)。

第一作者简介: 贺东亮, 男, 1977年出生, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。通信地址: 030006 山西省太原市坞城路92号山西大学生物技术研究所, Tel: 0351-7019371, E-mail: he_dl@163.com。

通讯作者: 王转花, 女, 1956年出生, 教授, 博士生导师, 研究方向: 蛋白质化学与工程。通信地址: 030006 山西省太原市坞城路92号山西大学生物技术研究所, Tel: 0351-7019371, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn。

收稿日期: 2009-01-13, 修回日期: 2009-01-25。

流行病学的研究。研究表明,该过敏症是B细胞介导的I型变态反应^[2-3]。目前中国关于荞麦过敏蛋白及其过敏症的研究较少。张昕等学者以产于中国山西寿阳的苦荞种子为材料,分离纯化出纯度均一的天然蛋白,并通过基因克隆获得编码该蛋白的基因序列,Genbank 登录号为DQ849083。免疫检测证明该蛋白为苦荞中的主要过敏蛋白,将其命名为TBt^[4-5]。

根据TBt的基因序列,作者先前分别克隆、表达了该蛋白的N端结构域(TBb)和C端结构域(TBa)。但是这两个蛋白都以包涵体的形式存在,且很难复性。为了判断这两个过敏原片段是否具有免疫学活性,作者利用两种不同抗性的质粒,分别构建了表达载体,用两种抗生素同时筛选,使具有不同抗性的不相容质粒进行共转化,实现了基因TBa和TBb在大肠杆菌中的共表达。表达产物在复性过程中,两个亚基互为分子伴侣,相互促进了蛋白质的正确折叠,获得了有活性的蛋白质。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验研究于2008年在山西大学生物技术研究所实验室内进行。

1.2 材料

含有苦荞过敏蛋白结构基因的质粒pET-28a-TBa和pET-32m-TBb,以及大肠杆菌BL21(DE3)感受态为山西大学生物技术研究所保存;荞麦过敏病人的血清由山西省太原市红十字会提供;辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgE以及实验所用的酶均为大连宝生物工程有限公司产品;其余试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒共转化 质粒的提取采用博大泰克的B型质粒小量快速提取试剂盒进行;感受态的制备、SDS-PAGE分析均参照文献[6]进行。用等量的表达质粒pET-28a-TBa和pET-32m-TBb转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,在同时含有100 mg/L氨苄青霉素和60 mg/L卡那霉素的双抗性LB培养基的平板上筛选单菌落。

1.3.2 重组质粒在大肠杆菌BL21(DE3)中共表达 在平板上挑取单菌落,接种于含有氨苄青霉素和卡那霉素抗性的5 ml LB培养基中,37 °C过夜培养,然后转接到100 ml LB培养基中,37 °C培养至A600为0.4~0.6时,加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L诱导3.5 h。8000 r/min离心5 min收集菌体,加入10 ml 50 mmol/L Tris-HCl,冰浴下超声波破碎后12000 r/min离心30 min收集沉淀。目的蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中,然后用10 ml 8 mol/L尿素溶解沉淀。

1.3.3 包涵体蛋白的复性 将8 mol/L尿素溶解后的样品装入透析袋,密封置于复性液I(0.2 mol/L Tris-HCl; 0.5 mol/L NaCl; 5%甘油; 5 μmol/L EDTA; pH8.5),4 °C透析12 h后再转入复性液II(0.2 mol/L Tris-HCl; 0.5 mol/L NaCl;) 4 °C透析12 h,12000 r/min离心30 min,收集上清进行蛋白浓度及活性测定。

1.3.4 共表达蛋白的免疫学活性分析 采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)^[6],分别用复性前和复性后的共表达产物(0.1 mg/mL)包被ELISA板,4 °C过夜;用50 mg/mL的脱脂奶粉37 °C封闭1 h;然后加一抗(稀释20倍的荞麦过敏病人血清)37 °C温育1 h;再加入二抗(辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgE)37 °C温育1 h;最后加入过氧化氢和邻苯二胺反应显色,用酶标仪测定其490 nm的光密度值,光密度值与微孔中共表达蛋白和一抗的结合能力成正比。复性蛋白免疫学活性的变化率按以下公式计算: $I=(W-X)/X \times 100\%$,式中W表示复性后蛋白的免疫学活性值,X表示复性前蛋白的免疫学活性值,I为变化率。

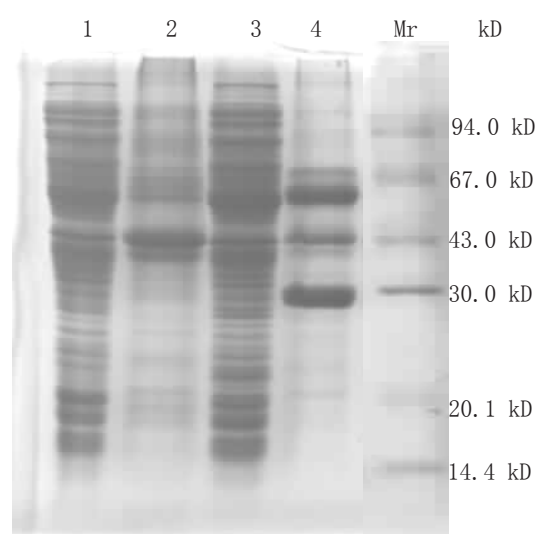


图1 *E.coli* BL21(DE3)中共表达重组蛋白SDS-PAGE分析

Mr: 小分子量蛋白Marker

1: BL21/pET-28a and pET-32m 表达上清

2: BL21/pET-28a and pET-32m 表达沉淀

3: BL21/pET-28a-TBa and pET-32m-TBb 表达上清

4: BL21/pET-28a-TBa and pET-32m-TBb 表达沉淀

2 结果

2.1 重组蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)共表达的电泳检测

结果显示(图1),与对照条带相比,双质粒转化子在相对分子质量大约29 kD处出现了蛋白条带,与单质粒转化子pET-28a-TBa的表达条带位置相同;在55 kD处出现的蛋白条带,与单质粒转化子pET-32m-TBb表达条带位置相同,说明实现了共表达。共表达产物

以包涵体的形式存在于表达沉淀中,且表达量与单质粒转化子分别表达时相同。

2.2 共表达蛋白包涵体复性结果检测

图2为共表达产物复性后的SDS-PAGE分析。结果显示目的蛋白 TBa 和 TBb 分别在复性液上清中以可溶形式存在,且复性后的 TBa 和 TBb 的分子量与复性前一致,说明在复性过程中蛋白质的一级结构没有被破坏。从图2泳道2可以看出:复性液上清中所含的杂蛋白很少,可见,复性蛋白的纯度也略有提高。

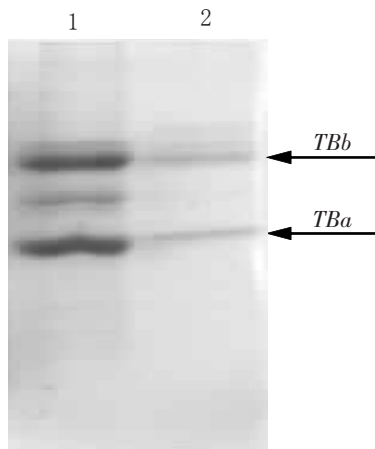


图2 共表达蛋白包涵体复性
SDS-PAGE分析
1:共表达蛋白包涵体
2:共表达蛋白复性液上清

2.3 共表达蛋白免疫学活性鉴定结果

采用ELISA分别检测共表达包涵体蛋白和复性蛋白的免疫学活性,结果显示(表1):与空白对照相比,共表达蛋白与荞麦病人血清中的IgE抗体有特异性的结合活性,而且复性后的蛋白比包涵体蛋白免疫学活性提高了33%,说明共表达产物中 TBa 和 TBb 互为分子伴侣的特性在复性过程中起了主要作用,能有效地促进复性。

表1 共表达蛋白的ELISA检测结果

待测样品	$A_{490nm}(n=3, X \pm S)$
空白对照	0.177 ± 0.026
共表达包涵体蛋白	0.540 ± 0.024
共表达复性蛋白	0.719 ± 0.017

注: n :样本容量, X :样本均值, S :样本标准差

3 讨论

目前多基因在大肠杆菌中的表达系统主要分为两类,一类是多顺反子表达系统,另一类是双质粒表达系统^[7]。一般认为,大肠杆菌中具有相同复制子的两种不相容质粒使用宿主菌中相同的复制系统,在复制及随后的子细胞分配过程中彼此竞争,最终导致一种质粒的丢失而无法共存^[8-9]。但这一对质粒不相容性是以

没有外界选择压力为前提的,如果有抗生素选择压力存在,则两种不相容质粒可能共存。当培养基中存在两种抗生素时,丢失任何一种抗性的质粒都将导致细菌被杀死,正是由于这种选择压力,迫使两种不相容质粒在同一细菌中共存。对于双质粒共表达系统,是将两个基因分别构建到不同的载体中去,然后通过两个载体在同一个大肠杆菌中实现两个外源基因的表达。

包涵体复性一直被称为一个世界性的难题,学者们对包涵体的形成机制、复性机制以及复性时的影响因素进行了研究,吉清等学者^[10]对分子伴侣辅助蛋白质复性进行了阐述。笔者在已经对复性时pH值、温度、时间、金属离子浓度以及尿素浓度梯度等因子研究的基础上,对分子伴侣在复性过程中的作用作了初步的探索。将已构建的两个不同表达质粒pET-28a- TBa 和pET-32m- TBb 同时转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,在双抗性LB培养基上通过IPTG诱导表达,获得了较满意的结果,实现了共表达。共表达产物经复性后,与 TBa 和 TBb 分别单独表达、复性相比,共表达产物复性过程中不需要添加金属离子和尿素,从而简化了复性条件。对于复性过程中二硫键的生成有待做进一步的研究,以期使 TBa 和 TBb 相互嵌合形成的复合物,更加接近天然苦荞过敏蛋白的结构。

参考文献

- [1] Smith H L. Buckwheat poisoning with report of a case in man[J]. Arch Intern Med, 1909, 3:350-359.
- [2] Fabjan N, Wang Z H, Zhang Z, et al. Tartary buckwheat as a source of dietary rutin and quercitrin[J]. J Agric food Chem, 2003, 51: 6452-6455.
- [3] 李玉英,张政,王转花.荞麦BTI全长基因的克隆及表达分析[J].中国农学通报,2007,23(3):53-57.
- [4] Zhang X, Yuan J M, Cui X D, et al. Molecular cloning recombinant expression and immunological characterization of a novel allergen from tartary buckwheat[J]. J agric food chemistry, 2008, 56(22): 10947-10953.
- [5] Zhang X, Cui X D, Li Y Y, et al. Purification and biochemical characterization of a novel allergenic protein from tartary buckwheat seeds[J]. Planta Medica, 2008, 74(15):1837-1841.
- [6] 王重庆.分子免疫学基础[M].北京:北京大学出版社,2003:231-236.
- [7] 耿凤廷,赵晓瑜,高珊.多基因在大肠杆菌中的共表达策略[J].生物技术通报,2007,18(2):339-341.
- [8] Davison J. Mechanism of control of DNA replication and in compatibility in ColE1-type plasmids. Gene, 1984, 28(3):1-15.
- [9] Novick R P. Plasmid incompatibility[J]. Microbiol Rev, 1987, 51(4): 381-395.
- [10] 吉清,何风田.包涵体复性的研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2004,25(6):516-518.