

[文章编号] 1000-4718(2007)12-2304-05

神经营养肽 NP14 基因的合成及其在大肠杆菌中的高表达*

张之勇, 苑辉卿[△], 姜安丽, 蔡捷, 任凯, 胡晓燕, 孔峰, 张建业[△]
(山东大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 根据鞘脂激活蛋白原神经营养序列设计并构建短肽(neurotrophic peptide, NP)多拷贝串连表达载体, 利用基因工程的方法制备短肽 NP。方法: 根据大肠杆菌的偏爱密码子设计并合成 NP 的碱基片段, 通过 PCR 方法合成串联双拷贝 2NP 片段, 经平端连接克隆到载体 pUC18 中。利用 EcoT14I 酶切 pUC18-2NP 后可产生非镜相对称黏性末端, 与表达载体 pETEcoT 一次连接反应, 得到一系列含有不同片段拷贝数的表达载体 pETEcoT-multiNP, 经 PCR-array 方法进行阳性克隆筛选、测序鉴定后转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 进行原核表达。结果: 经 IPTG 诱导后, 在 BL21(DE3) 菌中高效表达了 2、4、8 拷贝融合蛋白, 并在每个单拷贝之间加入了溴化氢的切割位点, 使融合蛋白切割后能够得到单拷贝的短肽。结论: 短肽 NP 在大肠杆菌中获得高效表达, 为进一步研究其生物活性奠定了基础。

[关键词] 神经营养肽; 融合蛋白质类; 原核表达

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Synthesis of multiple copies of neurotrophic peptide and their high level expressions in *E. coli*

ZHANG Zhi-yong, YUAN Hui-qing, JIANG An-li, CAI jie, REN kai, HU Xiao-yan, KONG feng, ZHANG Jian-ye

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China. E-mail: lyuanhq@sdu.edu.cn; zhjy@sdu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To construct and express containing multiple tandem copies of a peptide (neurotrophic peptide, NP), which was designed according to the NP sequence of prosaposin. **METHODS:** DNA sequence of peptide NP was synthesized by the preferred codons of *E. coli*. Two copies of NP fragments were produced by PCR and inserted into pUC18 vector. The fragments from pUC18-2NP by EcoT 14I were ligated into tandem multi-NP fragments through self-ligation, and subcloned into pET-EcoT vector, which has a unique EcoT14I cloning site allowing unidirectional insertion of a desired sequence. Multi-NP clones were screened by PCR-array. **RESULTS:** The constructs with different repeats of NP were obtained and expressed as fused-proteins at high level in *E. coli* BL21 (DE3). In order to get monomer peptide, each copy of peptide was interspersed by a unique site where the fused-protein could be cleaved by cyanogens bromide. **CONCLUSION:** Peptide NP could be highly expressed in *E. coli*. This work builds a solid foundation for further study on its bioactivity.

[KEY WORDS] Neurotrophic peptide; Fusion proteins; Prokaryotic expression

1994年, O'Brien等^[1]发现鞘脂激活蛋白原(prosaposin)具有神经营养作用, 并确认它是一种新的神经营养因子。鞘脂激活蛋白原可以与神经细胞膜上的PT敏感的G受体结合^[2], 活化细胞外调节激酶, 刺激神经细胞中乙酰胆碱酯酶的活性, 促进神经细胞的生长和分化。鞘脂激活蛋白原具有神经营养活性的功能域是位于鞘脂激活蛋白C(saposin C)氨基

端的一段氨基酸(TKLDNKNKTEKEIL)序列。

除了其神经营养活性之外, 鞘脂激活蛋白原在外周组织的广泛分布, 提示鞘脂激活蛋白原可能还有其它生物活性^[3], 需要进一步探讨。由于鞘脂激活蛋白原具有神经营养活性的序列由14个氨基酸组成^[4], 我们以此序列为基础, 将苏氨酸改为丝氨酸, 改造后的短肽称为neurotrophic peptide(NP), 并

[收稿日期] 2006-02-22 [修回日期] 2006-06-11

* [基金项目] 教育部科学技术研究重点资助项目(No. 106101)

△通讯作者 Tel: 0531-88382092; E-mail: lyuanhq@sdu.edu.cn; zhjy@sdu.edu.cn

根据大肠杆菌密码子的偏好性,构建原核表达载体,利用基因工程技术进行原核表达,以期获得天然构象的短肽用于生物活性研究。由于短肽产物在原核细胞内表达易被降解,可以通过增加蛋白分子量等方式来提高其稳定性^[5]。因此,我们尝试将 NP 序列串联成多拷贝片段,并与硫氧还蛋白融合表达,以期增加表达蛋白的分子量,增加 NP 在大肠杆菌中的稳定性。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 质粒与菌株 菌株 JM109、BL21 (DE3) 以及克隆质粒 pUC18 由本实验室保存,表达质粒 pETEcoT 由大连理工大学胡学军等^[6]构建。pETEcoT 的物理图谱如图 1 所示。

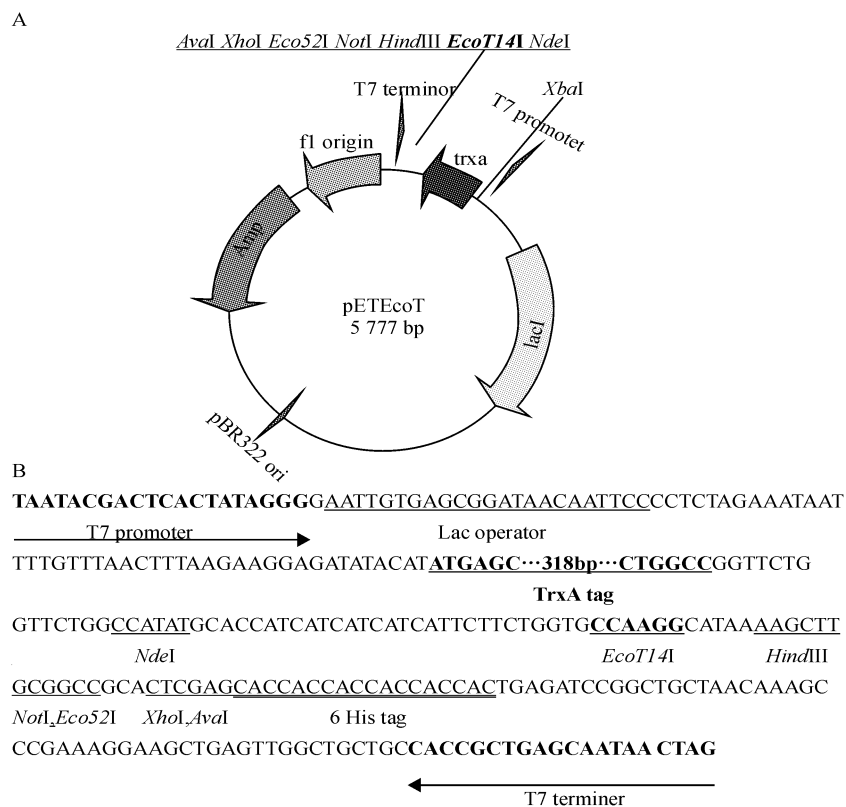


Fig 1 pETEcoT vector. A: map of pETEcoT vector; B: the PCR sequence between the T7 primer and terminor, the *EcoT14 I* recognized site is between the T7 primer and T7 terminor. TrxA is thioredoxin.

图 1 质粒 pETEcoT 的物理图谱

1.2 酶及化学试剂 Taq 酶、dNTP 等 PCR 反应系统购自申能博彩公司; T4 磷酸激酶、连接试剂盒 DNA ligation kit ver 2.0、限制性内切酶 *EcoT14 I*、*Xba I*、*Hind III*、*Hind II*、T4 DNA ligase、100 bp DNA Ladder Marker、高保真 DNA 聚合酶 Pyrobest 购自大连 TaKaRa 公司; GeneRuler™ DNA Ladder Mix 购自 Fermentas 公司; 胶回收试剂盒: E. Z. N. A Gel Extraction Kit 购自 Omega Bio - Tek 公司; Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 购于 Bio - Rad 公司。

1.3 主要仪器 Beckman allegro 64r centrifuge 和 Minispin eppendorf 离心机; Eppendorf Mastercycler personal PCR 仪; RiOs Millipore millipark40 纯水系统。

2 方法

2.1 NP 的 2 拷贝 DNA 片段的合成 根据鞘脂激活蛋白 C 具有神经营养作用的氨基酸序列, 使用大肠杆菌偏好的密码子设计并合成了 NP 的基因片段, 在片段 2 端各引入一个 *EcoT14 I* 的酶切序列

(CCAAGG), 在酶切位点的 2 端增加几个碱基以保证酶切效率。每个 NP 片段 2 端引入编码氨基酸的密码子 ATG 作为溴化氰的切割位点, 以期获得单拷贝的 NP 短肽, 通过改变 NP 片段中的密码子, 使 2 相邻 NP 的基因序列 3' 端互补的同时, 防止分子内产生互补序列, 并保持 NP 片段的氨基酸序列不变。

NP - F: 5' - GGCCAAGGCTATGAGCAAACCTGATCGATAACAACAAAACCGAAAAAGAAATTCTG - ATGTCTAAGTTA - 3'; NP - R: 5' - GGCCTTGGCCATCAAGATCTCCTTCTCCGCTTATTATTGTCAATTAACCTAGACATCAGAATTTCTTT - 3'。

将 2 个片段退火后通过 PCR 反应补齐生成串连 2 拷贝片段 (2NP)。PCR 反应体系为 50 μ L, 含 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP 200 μ mol/L, NP - F (50 μ mol/L) 5 μ L, NP - R (50 μ mol/L) 5 μ L, pyrobest 酶 1 μ L。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 92 $^{\circ}$ C 30 s, 90 $^{\circ}$ C 30 s, 最后一个循环 55 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后取 1 μ L 上样电泳。

2.2 克隆质粒 pUC18 - 2 NP 的构建 经 *Hind* II 酶切线性化并脱磷酸的克隆质粒 pUC18 与含有 5' - 磷酸的 2NP 片段用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接 10 h 后, 转入感受态菌 JM109。在通过 X - gal 和 IPTG 溶液预处理的含有氨苄青霉素的平板上 37 °C 培养 16 h, 蓝白斑筛选法筛选阳性重组质粒 pUC18 - 2NP, 酶切

和测序鉴定白色阳性克隆。

2.3 pETEcoT - multi NP (多拷贝体) 重组质粒的构建 pUC18 - 2NP 经 *Eco*T14 I 酶切后, 用 EZNA Gel Extraction Kit 试剂盒回收纯化 2NP 片段, 用连接试剂盒 DNA ligation kit ver 2.0 进行 2NP 的自身连接反应和多拷贝表达载体的构建, 如图 2 所示。

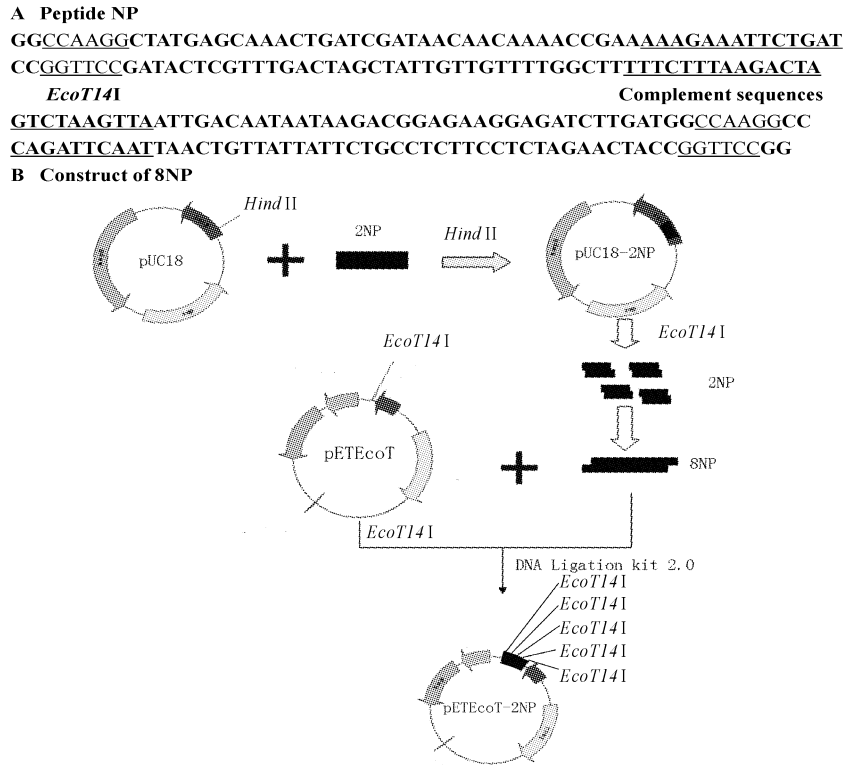


Fig 2 The sequence of 2NP blunted by PCR and the construction of pETEcoT - 8NP. A: The sequence of 2NP blunted by PCR, the complement sequence and *Eco*T14 I recognized sites are underlined; B: The amplifasive vector (pUC18 - 2NP) was constructed through blunt ligation and get 2NP digested by *Eco*T14 I and get expressive vector (pETEcoT + 8NP) through self - ligation and PCR - array.

图 2 补齐后的 2NP 序列及表达载体 pETEcoT - 8NP 的构建过程

连接反应条件: 2NP 片段 50 ng, 连接 Buffer II 7 μL, 连接 Buffer I 14 μL。反应条件: 16 °C, 连接 30 min 后, 加入 1 μL 线性化脱磷酸的 pETEcoT (50 ng), 继续 16 °C 连接 3 h 后转入感受态菌 BL21 (DE3) 中, 铺板, 次日观察板上菌落数。

2.4 PCR - array 法鉴定阳性重组质粒

- ①从菌板上直接挑取单菌落, 接种于 96 孔板 (每孔 200 μL 含氨苄青霉素的 LB 培养液) 中, 37 °C, 缓慢振荡 16 h。
- ②从 A 行的 12 个孔中分别取 100 μL 菌液, 混匀, 作为管 a = (A1 + A2 + A3... + A12), 共 1.2 mL, 同样的, 从 B、C、D...H 行的 12 个孔中分别取 100 μL 菌液, 混匀, 分别作为管 b、管 c、管 d...管 h, 即管 b = (B1 + B2 + B3... + B12).....管 h = (H1 + H2 + H3... + H12)。
- ③从第 1 列的 8 个孔中分别取 100 μL 菌液, 混匀, 作为管 1 = (A1 + B1 + C1... + H1), 共 0.8 mL, 同样的,

从 2 - 12 列的 8 个孔中分别取 100 μL 菌液, 混匀, 作为管 2、管 3、管 4...管 12, 即管 2 = (A2 + B2 + C2... + H2).....管 12 = (A12 + B12 + C12... + H12)。

④碱裂解法分别提取各行列混合管中的质粒, 20 μL TE 溶解质粒。

⑤PCR - array 法鉴定目的片段, 分别设立 2NP 的阳性对照组和阴性对照组, 从各行列管中各取 1 μL 作为模板, 以 T7 启动子、终止子作为引物, PCR 反应体系为 50 μL, 含 10 × Buffer 5 μL、dNTP 200 μmol/L、T7 启动子 1 μmol/L、终止子 1 μmol/L、模板 1 μL、Taq 酶 0.5 μL。循环参数为: 94 °C 1 min, 37 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 10 μL 上样电泳。根据行列间 PCR 结果的交叉定位, 鉴定多拷贝片段的拷贝数。

2.5 多拷贝融合肽的原核表达 取含有 0、2、4、8 拷贝的神经营养肽片段的表达载体分别转化 BL21 (DE3), 空载体 pETEcoT 作为对照同时进行转化。

转化菌振摇至对数生长中期培养液吸光度 $A_{600\text{ nm}}$ 为 0.4–0.6 时,加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,37 °C 继续振摇培养 2 h,取少量菌液,检测 $A_{600\text{ nm}}$ 吸光度,估计每管细菌的数量约 0.8×10^9 ,以 12 000 r/min 的转速离心 2 min,收集菌体沉淀,用 PBS 液 20 μL 重新悬浮细菌,离心后每管加入 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液 20 μL ,95 °C 加热裂解 5 min,裂解液进行 SDS – PAGE 电泳。

结 果

1 PCR 法合成神经营养肽 2NP 的 DNA 片段

经过 Pyrobest DNA 聚合酶的 PCR 反应,2 个 NP 片段被串联成 2 拷贝片段(2NP)。2NP 片段含 112 bp,其电泳结果与预期大小相符(图 3)。

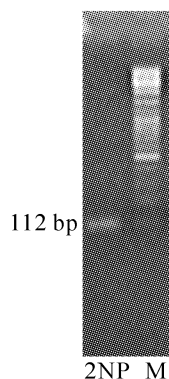


Fig 3 Identification of 2NP.

图 3 2NP 片段的鉴定

2 克隆质粒 pUC18 – 2NP 的构建

上述 PCR 合成产物,与 pUC18 平端连接后,转

入感受态 JM109 中,挑取阳性菌落扩增并提取质粒,用 *Eco*TI4I 酶切鉴定重组质粒,得到大小约为 100 bp DNA 片断,片段大小与预期结果相符(图 4),经进一步的测序鉴定说明 2NP 片段已正确插入质粒 pUC18 中。

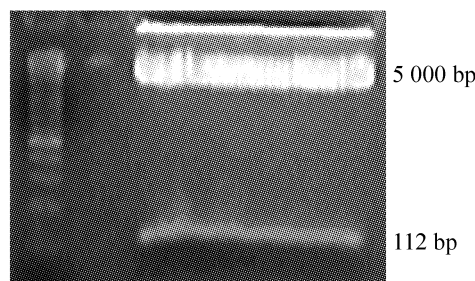


Fig 4 2NP digested by *Eco*TI4I.

图 4 *Eco*TI4I 酶切鉴定 pUC18 – 2NP 的结果

3 多拷贝表达质粒 pETEcoT – multiNP 的构建与阳性克隆的筛选

经过酶切反应,从克隆载体 pUC18 – 2NP 中得到 2NP 片段,经纯化后进行自身串联多拷贝连接,自身连接产物与线性化的 pETEcoT 进行连接。由于连接试剂盒的高效性,板上出现 500 多个的菌落。将菌落分别接种到 96 孔板内,分别将 8 行、12 列的混合克隆进行鉴定,可以看出,除第 1、10 列、H 行的克隆未见到扩增条带外,其余各筛选组的 PCR 扩增产物均有明显的多拷贝条带,说明各组内均含有阳性克隆。根据行列的交叉定位,筛选并鉴定出了阳性克隆 pETEcoT – 2NP、pETEcoT – 4NP、pETEcoT – 6NP、pETEcoT – 8NP(图 5、6)。

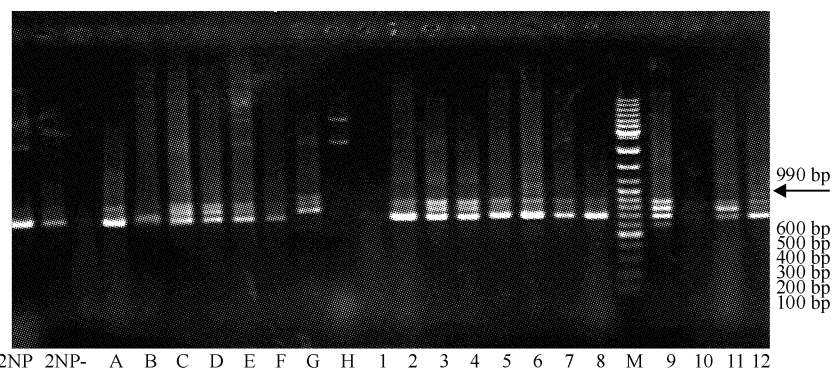


Fig 5 Screening of multiple copies of NP gene by PCR – array. Lane 1 – 12: column screen; Lane A – H: lane screen; Lane – 2NP: negative control; Lane 2NP: positive control. The PCR products were found in each column and lane except column1, column10, and lane H. Each PCR product was separated by 112 bp according to the expected length of 2NP, 4NP, 6NP, 8NP. The 8NP located in column 7 and lane B, which contains PCR product of 990 bp.

图 5 PCR – array 法对多拷贝阳性克隆的筛选

4 原核表达的 SDS – PAGE 结果

取 0、2、4、8 拷贝数的表达载体转入原核表达菌 BL21(DE3),并以空载体为对照,转化菌经 IPTG 诱导表达,热裂解,其蛋白表达水平经 SDS – PAGE 电

泳分析,结果如图 7 所示。泳道 1、3、5、7 为未经 IPTG 诱导的总蛋白提取物,泳道 2、4、6、8 为经 IPTG 诱导后的蛋白总提取物。结果显示经 IPTG 诱导后,未插入片段的载体和 2、4、8 拷贝的融合蛋白得到高表

达。出现特异性条带所在位置与预期结果相符。

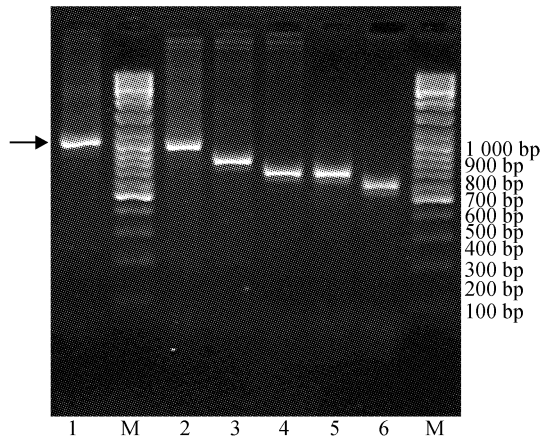
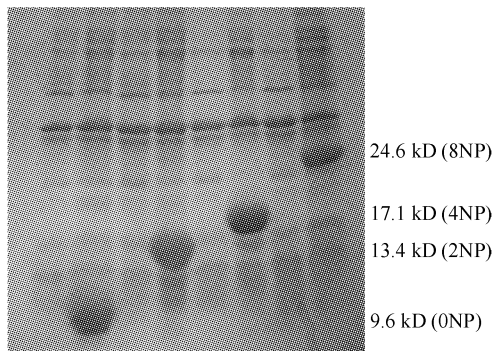


Fig 6 Identification of the numbers of NP gene contained by series vectors via PCR amplification. Lane 1,2:pET-EcoT-8NP; Lane 3:pET-EcoT-6NP; Lane 4,5:PET-EcoT-4NP; Lane 6: pET-EcoT-2NP.

图 6 鉴定 NP 片段的拷贝数



pET-EcoT	+	+	-	-	-	-	-	-
pET-EcoT-NP	-	-	2	2	4	4	8	8
Induced by IPTG	-	+	-	+	-	+	-	+
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8

Fig 7 SDS-PAGE analysis of a series of fusion proteins expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

图 7 多拷贝神经营养肽在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE 电泳图

讨 论

鞘脂激活蛋白原被确认具有神经营养活性,根据其发挥神经营养作用的序列改造出的短肽仍具有生物活性,NP 片段就是源于这段有神经营养活性的短肽。我们设计并合成了 NP 片段,并将其串联成多拷贝,与大肠杆菌源性的硫氧还原蛋白(TrxA)基因融合在一起,在大肠杆菌中表达了含有多拷贝 NP 片段的融合蛋白。结果表明,通过此方法构建的多拷贝 NP 片段的表达载体能够在大肠杆菌中高效表达,而且稳定性提高。

在多拷贝表达质粒的构建过程中,适当地增加插入片段与载体分子的比率,延长插入片段自身连接的时间能增加多拷贝插入片段的形成^[7]。我们的

实验结果表明,这样可以提高连接效率,增加重组多拷贝阳性克隆的比例。

在筛选多拷贝质粒的过程中,得到的菌落数很多(多于 500 个),为了提高阳性克隆筛选的效率,我们尝试用 PCR-array 法进行筛选,通过组合,使单克隆筛选变为克隆组筛选,再利用 PCR 方法对克隆组进行片段大小鉴定,根据各组 PCR 产物行列间的交叉定位确定阳性克隆的位置,这种方法大大提高了筛选效率,同时引物的特异性保证了筛选阳性克隆的特异性,最终能在较短的时间内获得阳性克隆。

Shen^[5]首次报道了串联多拷贝蛋白能降低外源蛋白的异源性,增加外源蛋白在大肠杆菌中的稳定性,我们的实验结果表明将神经营养肽 NP 串联成多拷贝,再与硫氧还原蛋白融合能在大肠杆菌中高效表达,说明用基因工程的方法制备神经营养肽 NP 是可行的,为神经营养肽 NP 的大量制备奠定了基础。进一步优化表达的条件,提高产率,将有利于下游过程中融合蛋白的纯化、单拷贝神经营养肽的裂解和纯化及其生物学活性的研究,有关工作正在进行中。

(致谢:感谢胡学军博士提供了真核表达载体 pET-EcoT,并在此实验中提出了宝贵意见)

[参 考 文 献]

- [1] O'Brien JS, Carson GS, Seo HC, et al. Identification of prosaposin as a neurotrophic factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(20):9593-9596.
- [2] Hiraiwa, M, Campana WM, Martin BM, et al. Prosaposin receptor: evidence for a G-protein-associated receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 240(2):415-418.
- [3] Koochekpour S, NPrtor O, Lee TJ, et al. Prosaptide TX14A stimulates growth, migration, and invasion and activates the Raf-MEK-ERK-RSK-Elk-1 signaling pathway in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2004, 61(2):114-123.
- [4] Taylor EM, Otero DA, Banks WA, et al. Designing stable blood-brain barrier-permeable prosaptide peptides for treatment of central nervous system neurodegeneration[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(2):403-409.
- [5] Shen SH. Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(15):4627-4631.
- [6] 胡学军,张志超,包永明,等. 小肽多拷贝基因表达载体的构建及其高效表达[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 2002, 18(3):287-292.
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999. 112-115.