

[文章编号] 1000-1182(2008)01-0027-04

人釉原蛋白基因在大肠杆菌中的融合表达

张雪洋, 赵 华, 赵红宇, 王春先, 章锦才
(广东省口腔医院 种植中心, 广东 广州 510280)

[摘要] 目的 建立人釉原蛋白(AMG)成熟肽基因在大肠杆菌中融合表达和纯化的技术路线。方法 利用已构建并经鉴定的重组质粒pGEX-4T-1/AMG转化大肠杆菌BL21, 分别对诱导时间、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)浓度和诱导温度进行优化, 在最佳诱导表达条件下, 分别对菌液上清、周质、胞质和包涵体中的目的蛋白表达进行分析, 在可溶性蛋白中发现大量目的蛋白, 随后利用GSTrapFF亲和层析柱进行人AMG融合蛋白的过柱纯化。结果 pGEX-4T-1/AMG重组质粒的双酶切凝胶电泳鉴定结果和测序鉴定结果和预期一致。最佳诱导时间为14.5 h、最佳诱导剂浓度为1.0 mmol/L、最佳诱导温度为20℃, 在此条件下目的蛋白的表达量达到峰值。在最佳诱导条件下, 胞质蛋白和包涵体中都有大量的目的蛋白。提取大量胞质蛋白, 经GSTrapFF亲和层析柱纯化, 收集纯化液, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 显示成功纯化了AMG融合蛋白, 在提取液洗涤2次后, 可获得高纯度的融合蛋白。结论 利用pGEX-4T-1/AMG原核表达体系成功获得纯化的人AMG融合蛋白。

[关键词] 人釉原蛋白; 融合蛋白; 纯化

[中图分类号] Q781 [文献标识码] A

Expression and purification of human amelogenin in *Escherichia coli* ZHANG Xue-yang, ZHAO Hua, ZHAO Hong-yu, WANG Chun-xian, ZHANG Jin-cai. (Center of Implantology, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China)

[Abstract] Objective To establish the expression and purification route for the gene encoding human amelogenin(AMG) mature peptide in *Escherichia coli*(*E.coli*). Methods Recombined plasmid pGEX-4T-1/AMG was identified by double endonuclease digestion electrophoretogram and DNA sequence analysis. The recombined plasmid was transformed to *E.coli* BL21. The inducing time, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG) concentration and inducing temperature were optimized for the express system. Under the optimized condition, the target fusing protein in supernatant, periplasm, plasm and inclusion body was analyzed separately. A great amount of target fusing protein was found in the dissoluble protein. AMG fusing protein was purified by the GSTrapFF affinity column. Results Double endonuclease digestion electrophoretogram and DNA sequence analysis were done to identify the recombined vector pGEX-4T-1/AMG. The results were consistent with the anticipation. The optimum inducing time was 14.5 hours. The optimum IPTG concentration was 1.0 mmol/L. The optimum inducing temperature was 20℃. Under this condition, the target protein was expressed to a maximum. Plentiful target protein was expressed in plasm and inclusion body under the optimized condition. A mount of plasm protein was obtained and purified by the GSTrapFF affinity column. The purified liquid was collected and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE). The protein electrophoresis map showed that AMG fusing protein was purified successfully. After twice elution, high pure fusing protein was obtained. Conclusion pGEX-4T-1/AMG system is used successfully to express human AMG fusing protein.

[Key words] human amelogenin; fusing protein; purification

大量研究都肯定了釉原蛋白(amelogenin, AMG)

是釉基质蛋白诱导牙周再生的主要成分^[1-3]。目前运用生物工程技术生产人AMG是学者们努力的方向。本研究通过将pGEX-4T-1/AMG的原核表达质粒转化大肠杆菌BL21, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导, 表达和纯化AMG融合蛋白, 为进一步研究人AMG基

[收稿日期] 2007-09-13; [修回日期] 2007-12-25

[基金项目] 广东省名医工程研究基金资助项目(2004-29); 广东省医学科研基金资助项目(A2006113); 河南省杰出青年科学基金资助项目(0512001000)

[作者简介] 张雪洋(1976-), 女, 云南人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 章锦才, Tel: 020-84408890

因的功能和分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 表达载体的鉴定

将本课题组已构建并保存的pGEX-4T-1/AMG原核表达质粒进行扩增^[4],作双酶切鉴定和测序鉴定。pGEX-4T-1质粒携带有谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S transferase, GST)标签,和AMG基因可产生融合蛋白,有助于下一步的纯化。

1.2 优化pGEX-4T-1/AMG原核表达体系表达条件

取保存转化有重组质粒pGEX-4T-1/AMG的大肠杆菌BL21及相应含空质粒菌种各5 μL分别接种于3 mL含质量浓度为80 μg/mL氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的乳糖肉汤(lactose broth, LB)液体培养基中,37 °C时250 r/min振摇过夜。次日以1:100将过夜菌液转接于含Amp的LB液体培养基中,37 °C时250 r/min培养2 h,取1 mL在分光光度计中测A值。当A值为0.4~0.6时,取1 mL作诱导前对照,剩余的菌在不同的IPTG诱导剂浓度(0.5、1.0、2.0 mmol/L)、不同的诱导温度(20、37 °C)、不同的诱导时间(4、5.5、7、8.5、10、11.5、13、14.5、16 h)条件下进行诱导表达,收集菌体,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析,确定诱导表达的最佳条件。

1.3 pGEX-4T-1/AMG原核表达产物的可溶性分析

收集最佳诱导条件下表达的菌液3 mL,4 °C时12 000 r/min离心1 min,收集上清和菌体沉淀,将菌体悬于150 μL新配制的细胞裂解液中,冰浴30 min。4 °C时12 000 r/min离心1 min,上清为周质部分。将沉淀重悬于150 μL浓度为0.1 mol/L三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH为8.0)中,-70、37 °C反复冻融3次。4 °C时12 000 r/min离心5 min,上清为胞质蛋白,沉淀为膜和包涵体。将上述收集的样品加入上样缓冲液,-20 °C下保存,备用。将上述样品煮沸5~10 min,12%分离胶、5%浓缩胶行SDS-PAGE分析表达产物的可溶性。在最佳诱导条件下可获得大量的可溶性蛋白,取收集的胞质蛋白上清15 μL行SDS-PAGE检测可溶性蛋白中目的蛋白。

1.4 人AMG融合蛋白的纯化

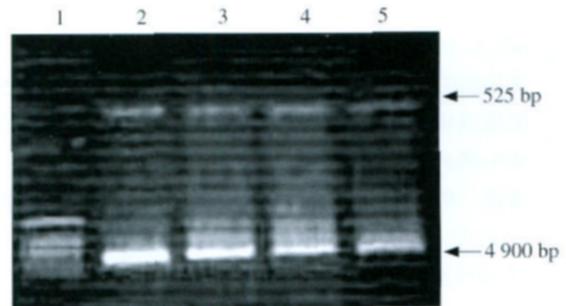
连接好GSTrapFF亲和层析柱的接头,将柱子置于收集管管口,用注射器吸取结合缓冲液平衡纯化柱,每次1 mL,共5次(一次吸5 mL),先在连接处注满结合缓冲液,再连接注射器,避免气泡进入柱内。流速控制为1~2 mL/min(即每分钟20~40滴),用力不可过大,流速不可太快。吸取样品注入柱内,先一次注满,然后控制流速为0.2~1 mL/min(每分钟

4~12滴),把所有样品均过柱。用10 mL洗脱缓冲液提取样品,用1~2 mL/min(每分钟20~40滴)流速,收集流出液,此时得到的是GST和目的蛋白的融合物。

2 结果

2.1 表达载体的鉴定结果

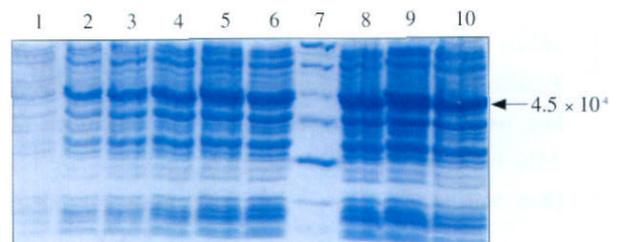
pGEX-4T-1/AMG重组质粒的双酶切凝胶电泳鉴定结果见图1。由图1可见525 bp的AMG和4 900 bp的pGEX-4T-1电泳条带。重组质粒的测序鉴定结果也和Genebank数据库中人釉原蛋白编码区基因序列gi|4502072的成熟肽基因完全吻合。



1: 标记物; 2-5: pGEX-4T-1/AMG
图1 pGEX-4T-1/AMG的双酶切鉴定图
Fig 1 Double endonuclease digestion electrophoretogram of pGEX-4T-1/AMG

2.2 不同诱导时间、诱导剂浓度和诱导温度下的融合蛋白表达结果

取保存转化有重组质粒pGEX-4T-1/AMG的大肠杆菌BL21及相应含空质粒菌种,在不同的诱导时间(4、5.5、7、8.5、10、11.5、13、14.5、16 h)条件下进行诱导表达,收集菌体,进行SDS-PAGE分析。可见在诱导剂浓度为1.0 mmol/L、诱导温度为20 °C、不同诱导时间的条件下,相对分子质量为 4.5×10^4 处都有大量融合蛋白的表达。融合蛋白的表达量在14.5 h处达到峰值(图2)。

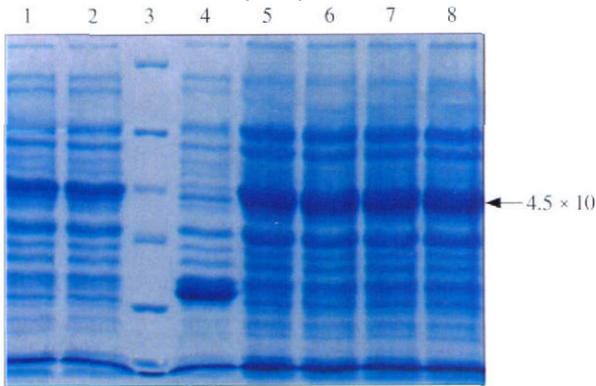


1: 4 h; 2: 5.5 h; 3: 7 h; 4: 8.5 h; 5: 10 h; 6: 11.5 h; 7: 标记物; 8: 13 h; 9: 14.5 h; 10: 16 h

图2 不同诱导时间下的融合蛋白表达电泳图
Fig 2 Protein electrophoresis map under different inducing time

取保存转化有重组质粒pGEX-4T-1/AMG的大肠杆菌BL21及相应含空质粒菌种,在不同的IPTG诱导剂浓度(0.5、1.0、2.0 mmol/L)条件下进行诱导表

达, 收集菌体, 进行SDS-PAGE分析。可见在诱导时间为14.5 h, 诱导温度为20℃, 不同诱导剂浓度的条件下, 相对分子质量为 4.5×10^4 处都有大量融合蛋白的表达。融合蛋白的表达量在诱导剂浓度为1.0 mmol/L时达到峰值(图3)。

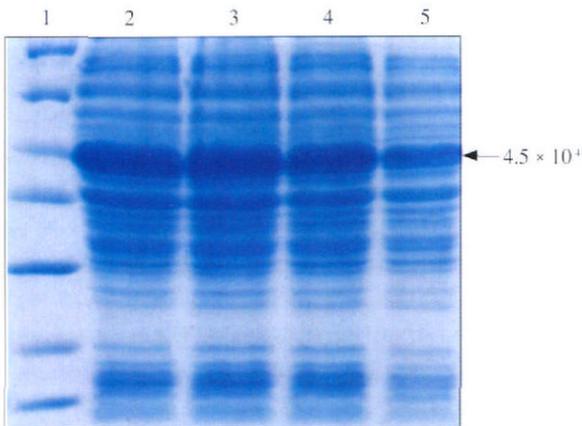


1、2: 诱导剂浓度为0.5 mmol/L; 3: 标记物; 4: 空质粒; 5、6: 诱导剂浓度为1.0 mmol/L; 7、8: 诱导剂浓度为2.0 mmol/L

图3 不同诱导剂浓度下的融合蛋白表达电泳图

Fig 3 Protein electrophoresis map under different IPTG concentration

取保存转化有重组质粒pGEX-4T-1/AMG的大肠杆菌BL21及相应含空质粒菌种, 在不同的诱导温度(20、37℃)进行诱导表达, 收集菌体, 进行SDS-PAGE分析。可见在诱导时间为14.5 h, 诱导剂浓度为1.0 mmol/L, 不同诱导温度的条件下, 相对分子质量为 4.5×10^4 处都有大量融合蛋白的表达。融合蛋白的表达量在诱导温度为20℃时达到峰值(图4)。



1: 标记物; 2、3: 20℃; 4、5: 37℃

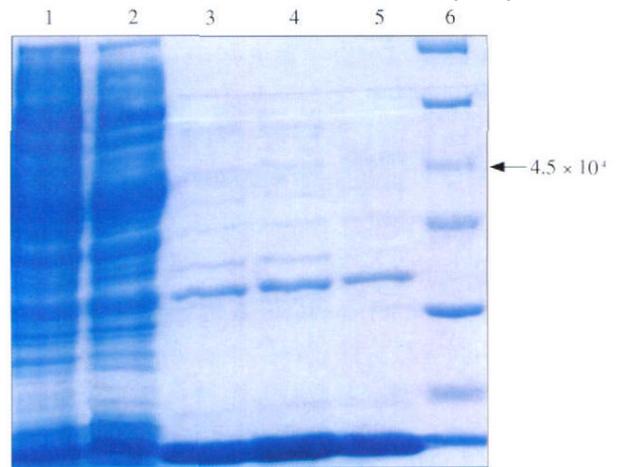
图4 不同诱导温度下的融合蛋白表达电泳图

Fig 4 Protein electrophoresis map under different inducing temperature

2.3 pGEX-4T-1/AMG原核表达产物分析和纯化

收集最佳诱导条件下表达的菌液, 分别提取菌液上清、胞质、周质和包涵体, 行SDS-PAGE分析表达产物的可溶性(图5、6)。可见在最佳诱导条件(诱导时间为14.5 h, 诱导剂浓度为1.0 mmol/L, 诱导温度为20℃)下, 胞质蛋白和包涵体中都有大量

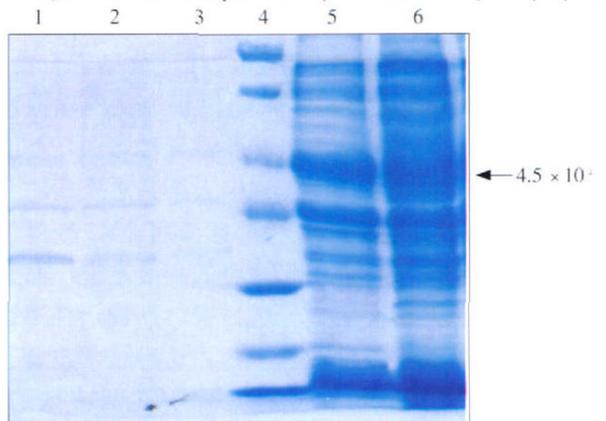
的目的蛋白, 由于胞质蛋白是可溶性蛋白, 纯化时不需经过复性的烦琐过程。提取大量胞质蛋白, 经GSTrapFF亲和层析柱纯化, 收集纯化液, 进行SDS-PAGE分析, 可成功纯化AMG融合蛋白, 在提取液洗涤2次后, 可获得高纯度的融合蛋白(图7)。



1、2: 包涵体; 3-5: 周质; 6: 标记物

图5 包涵体和周质的蛋白电泳图

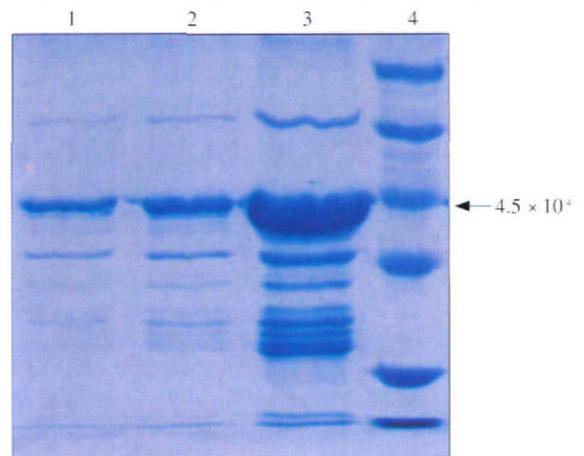
Fig 5 Protein electrophoresis map of inclusion body and periplasm



1-3: 菌液上清; 4: 标记物; 5、6: 胞质

图6 胞质和菌液上清的蛋白电泳图

Fig 6 Protein electrophoresis map of plasma and supernatant



1: 提取液洗涤第3次; 2: 提取液洗涤第2次; 3: 提取液洗涤第1次; 4: 标记物

图7 融合蛋白纯化后电泳图

Fig 7 Protein electrophoresis map of purified fusing protein

3 讨论

牙周炎治疗的最终目的是牙周组织的再生和重建^[5]。1975年, Slavkin^[1-2]首次提出上皮根鞘内层细胞分泌的釉基质蛋白可能与诱导外胚间充质细胞向成牙骨质细胞分化并生成无细胞牙骨质有关。随后,大量的研究都肯定了釉基质蛋白对牙周再生,特别是无细胞牙骨质再生的重要作用^[6-8]。不论内源性或外源性的釉质基质蛋白均可能诱导牙骨质生成,从而在牙周再生方面发挥作用。还进一步指出:使包括无细胞性牙骨质、牙周膜和牙槽骨在内的牙周组织达到完全再生,且使之类似于胚胎发育过程是可行的^[9-11]。Hammarstrom^[3]通过动物实验进一步检验了不同提取方法获得的釉基质蛋白的牙周组织再生活性,发现主要成分为釉原蛋白的釉基质酸性提取物(乙酸法提取)能够介导牙周组织再生,特别是无细胞牙骨质几乎完全再生;而应用不含釉原蛋白的提取物(EDTA法提取)的部位,新生牙骨质非常少,牙槽骨的形成也很少。目前的研究均支持釉原蛋白是釉基质蛋白诱导牙周再生的主要成分。

釉基质蛋白是釉质蛋白酸性提取物的混合物,即使使用HPLC纯化技术也不能得到纯化的釉原蛋白,而且传统的提取方法只能获得异种蛋白,不能获得人源的同种蛋白。由于许多人畜共患疾病的全球流行(疯牛病、禽流感、猪链球菌病等),使得生物制品的生物安全性已引起社会的高度重视,而且传统提取方法产量受限、价格昂贵、产物活性不稳定,不能进行蛋白质的改建工程。这种技术改变了传统的直接从生物体内提取多肽物质的许多缺陷,带来了难以估量的社会效益和经济效益。首先,重组蛋白技术可以获得人源的同种蛋白,生物制品安全性得到保证;其次,重组蛋白可以被纯化并且不会存在其他生长因子的污染;另外,基于同一技术路线提取的重组蛋白性能稳定、成本低、产量大,在基础研究中,可获得大量的纯化蛋白,以进一步研究其作用机制;基因工程也为天然蛋白的改建工作提供平台,以降低蛋白的副反应,提高蛋白的活性作用^[12]。

本研究将pGEX-4T-1/AMG的原核表达质粒转化大肠杆菌BL21,通过在不同条件下的诱导表达,确定最佳IPTG诱导剂浓度为1.0 mmol/L,最适诱导温度为20℃,最适诱导时间为14.5 h。在此条件下可诱导产生大量的可溶性融合蛋白,避免了从包涵体中提取重组蛋白的烦琐程序。由于目前市场上没有人釉原蛋白的单克隆抗体,为了获得纯化的重组

人釉原蛋白,使用的pGEX-4T-1/AMG原核表达质粒携带有GST表达标签,使融合蛋白的纯化过程简化,利用与载体配套的亲和层析柱与融合蛋白发生的特异性亲和反应,可以直接从细菌裂解物中将融合蛋白纯化出来。本研究成功进行人釉原蛋白的融合表达和纯化,为下一步表达纯化AMG和天然蛋白的改建工作提供了平台,为进一步研究釉原蛋白的功能和分子机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Slavkin HC. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics: Cementogenesis revisited[J]. J Periodontol, 1976, 47(5): 249-255.
- [2] Slavkin HC. What is the role of the host in periodontal disease[J]. Periodontol Abstr, 1975, 23(3): 101-103.
- [3] Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration[J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(9 Pt 2): 658-668.
- [4] 张雪洋, 赵华, 胡飞, 等. 人釉原蛋白编码区基因原核表达载体的构建[J]. 上海口腔医学, 2007, 16(1): 81-84. ZHANG Xue-yang, ZHAO Hua, HU Fei, et al. Construction of the prokaryotic expression vector for human amelogenin gene[J]. Shanghai J Stomatol, 2007, 16(1): 81-84.
- [5] 曹采方. 牙周病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1-28. CAO Cai-fang. Periodontology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 1-28.
- [6] Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report[J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(9 Pt 2): 693-696.
- [7] Heijl L, Heden G, Svardstrom G, et al. Enamel matrix derivative(EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects[J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(9 Pt 2): 705-714.
- [8] Sculean A, Donos N, Blaes A, et al. Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects: A split-mouth study[J]. J Periodontol, 1999, 70(3): 255-262.
- [9] Lindskog S. Formation of intermediate cementum. I: Early mineralization of aprismatic enamel and intermediate cementum in monkey[J]. J Craniofac Genet Dev Biol, 1982, 2(2): 147-160.
- [10] Hammarstrom L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins[J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(9 Pt 2): 669-677.
- [11] Araujo MG, Lindhe J. GTR treatment of degree furcation defects following application of enamel matrix proteins. An experimental study in dogs[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(6): 524-530.
- [12] 卢圣栋. 现代分子生物学试验技术[M]. 2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 6-26. LU Sheng-dong. Modern molecular biologic technology[M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Peking Union Medical College Publishing Corporation, 2004: 6-26.

(本文编辑 王 晴)