

豌豆肌动蛋白基因在大肠杆菌中的表达

曹晓风

(北京大学蛋白质工程及植物基因遗传工程国家重点实验室)

赵武玲 吴玮 阎隆飞

(中国农业大学生物学院农业部植物生理生化开放实验室)

摘要 高等植物细胞内含有肌动蛋白,但含量较低,难于提取及进行进一步研究。我们用 PCR 的方法扩增肌动蛋白 cDNA,并克隆到表达质粒 pT_{rp}His,然后转化大肠杆菌 DH5 α 在 IPTG 诱导下,肌动蛋白表达在包涵体中,在没有 IPTG 诱导时,肌动蛋白表达在胞液中。

关键词 肌动蛋白; 基因表达; 包涵体

中图分类号 Q 786

Expression of Pea Actin Gene in Escherichia coli

Cao Xiaofeng

(Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Beijing University)

Zhao Wuling Wu Wei Yan Longfei

(Key Laboratory of Plant Biophysics and Biochemistry of Agricultural Ministry, College of Biological Science, CAU)

Abstract In higher plant, the concentration of actin is very low, therefore the purification and study of actin are rather difficult. We amplified actin gene cDNA clone PEAc I coding region by the method of PCR and constructed expression plasmid with plasmid pT_{rp}His A. Actin gene expressed in the inclusion bodies under the induce of IPTG, whereas in the cytosol under non-IPTG-induced condition.

Key words actin; gene expression; inclusion body

肌动蛋白普遍存在于真核生物中,是构成细胞骨架和肌肉肌小节的主要成分。在肌肉中肌动蛋白主要与肌细胞中的肌肉收缩有关;在非肌细胞中的细胞分裂、内吞作用、胞吐作用、染色体分离、胞质分裂、细胞形状变化以及颗粒运动等过程中起重要作用^[1]。60年代,阎隆飞等^[2]首次在高等植物中发现了肌动球蛋白,推动了高等植物中肌动蛋白的研究。经多年的研究,现在已经证明在植物中肌动蛋白参与细胞分裂、细胞的伸展和形态发生、细胞内颗粒运动、花粉管的伸长、顶端生长和延伸等过程。研究真核生物体内的肌动蛋白功能的一个前提条件是要有足够量的蛋白质,但高等植物中的肌动蛋白含量极低,提取足够量的蛋白质非常困难。利用基因工程技术将肌动蛋白基因在大肠杆菌中表达,由于大肠杆菌培养条件简单,容易得到大量菌体,可在体外获得大量的肌动蛋白,以供进一步研究。因为大肠杆菌中不存在肌动蛋白,在纯化

收稿日期: 2000-12-18

国家自然科学基金资助项目(39870077, 39770052)

赵武玲,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

表达的肌动蛋白时没有其他表达体系中的内源肌动蛋白的干扰,这使得它在肌动蛋白的体外表达中优于其他的表达体系。

我们以豌豆卷须为材料构建了cDNA文库^[3],筛选出23个豌豆肌动蛋白cDNA的克隆,并对其中一个克隆PEAc I做了全序列测定。用PCR方法扩增得到的编码区后,将完整的基因与载体连接,转化大肠杆菌,豌豆肌动蛋白基因在大肠杆菌中表达。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种 载体及DNA:

菌种 *Escherichia coli* DH5 α 载体 pTrcHis A (Invitrogen), 从本实验室构建的豌豆卷须cDNA文库中筛选出肌动蛋白的cDNA克隆PEAc I。

酶、化学试剂:

各种限制性内切酶、连接酶 ATP、DTT、T7引物购自华美、经科公司,兔抗肌动蛋白抗体、碱性磷酸酯酶羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司, NBT/BCIP 购自 Promega 公司,硝酸纤维素膜购自 Bio-Rad 公司,琼脂糖购自 Serva 公司,其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 聚合酶链式反应(PCR) PCR 参照[4]。模板为克隆(PEAc I/pBS SK⁺)中的PEAc I 编码区;人工合成的引物:

5 端为 5' ACCA TGGCTGAA (TC)GC (A G)TA G3 ,

3 端为 T7 引物 3' GA TA TCACTCA GCA TAA 5'。

反应中的 4 \times dNTP 浓度为 250 μ mol \cdot L⁻¹; 5 及 3 端引物为 25 pmol/反应; 模板为 50 ng/反应; Taq DNA 聚合酶 3 U/反应。预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 1 min; 退火 45 $^{\circ}$ C 1 min; 延伸 72 $^{\circ}$ C 3 min; 共循环 32 轮,最后 1 轮延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

DNA 片段的回收参照[4]。

1.2.2 表达质粒的构建 DNA 的连接反应参照文献[4],得到表达质粒 pTrcAct I。pTrcAct I 序列测定由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 370A 型全自动序列分析仪测定。

载体和扩增的目的片段用 Nco I/Xho I 双酶切后连接,重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 及筛选的方法参照[5]。

1.2.3 肌动蛋白基因 PEAc I 的表达 转化菌在含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,挑单菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,培养基分为 2 种,1 种加 IPTG 1 mmol \cdot L⁻¹,另一种不加 IPTG,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,离心收集菌体。

1.2.4 表达产物的免疫印迹分析 将表达菌的菌体用化学法裂解后离心,沉淀中包涵体的溶解方法参照[4]。SDS 电泳方法参照[6],标准蛋白为:磷酸化酶 b 94.7 kD;牛血清白蛋白 66.2 kD;兔肌动蛋白 43.0 kD;碳酸酐酶 31.0 kD;胰蛋白酶抑制剂 20.1 kD;鸡蛋清溶菌酶 14.4 kD。免疫印迹方法参照[7]。将电泳胶中的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上,用 4% 牛血清白蛋白(BSA)封闭膜上杂蛋白的结合位点,一抗(兔抗肌动蛋白抗体)用 0.1% 的封闭缓冲液稀释 3 000 倍,反应 2 h 后,用 1% 封闭缓冲液洗 4 次,每次 20 min。二抗(碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG)用 4% 牛血清白蛋白稀释 30 000 倍,反应 2 h 后用 TBS (TBS: Tris

20 mmol·L⁻¹, NaCl 150 mmol·L⁻¹, pH 7.5) 溶液洗 4 次, 每次 20 min, 加入底物 NBT/BCIP 显色。

1.2.5 表达产物的电镜观察 用切片观察表达菌中的包涵体。

2 结果

2.1 表达质粒的构建

肌动蛋白基因 PEA c I 的 5 端序列为 5 A G A T G G C 3 , 与酶切位点 5 C C A T G G 3 相似, 合成的引物在起始密码子上游构建了 1 个 N c o I 的酶切位点 5 A C C A T G G C 3 , P E A c I 经 PCR 扩增后, 回收的片段用 N c o I 和 X h o I 双酶切, 连接于表达载体 p T r c H i s A 的 N c o I / X h o I 位点上, 构建表达载体 p T r c A c t I , 经测序确认 P E A c I 的片段联接正确, 且表达产物的 N - 端不含融合的氨基酸残基 (图 1)。

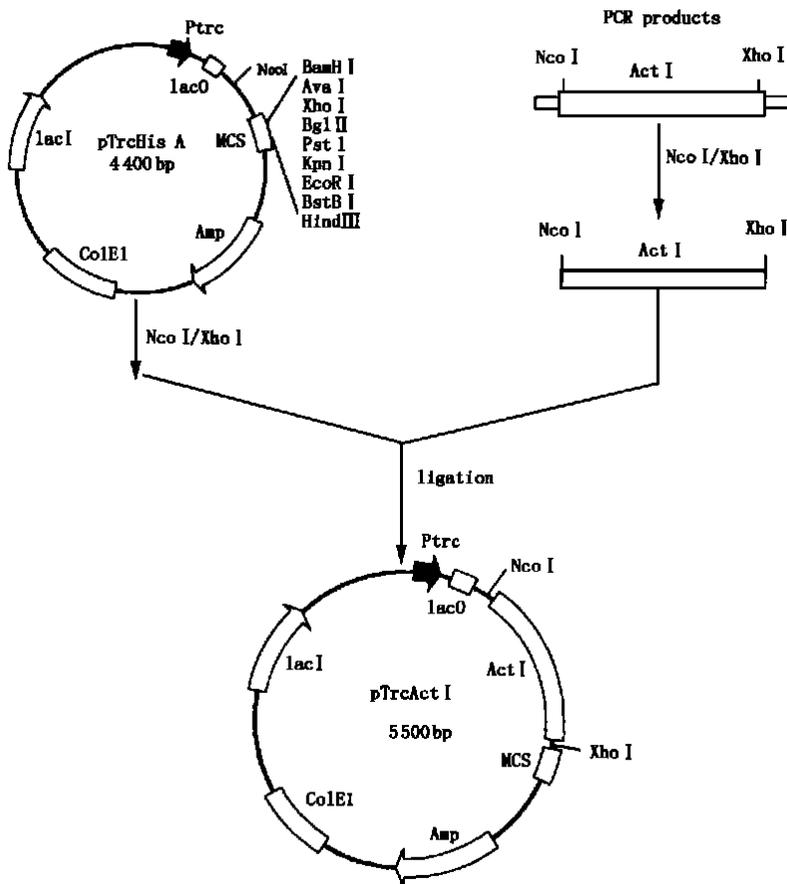


图 1 表达质粒的构建

2.2 PEA c I 基因表达产物的免疫印迹法鉴定

重组质粒中含有 lac 启动子, 转化菌在 LB 液体培养基中培养时用 IPTG 1 mmol·L⁻¹ 诱导或不用 IPTG 诱导。

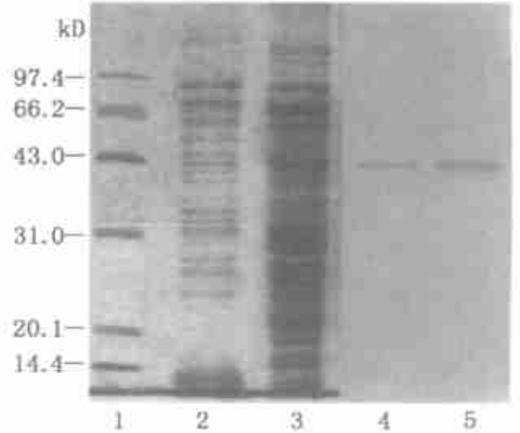
为了解肌动蛋白基因在大肠杆菌中是否表达,裂解细菌同时收集裂解上清液与沉淀,沉淀的部分用溶解包涵体的方法处理,裂解上清液和包涵体溶解产物经 SDS 电泳后,用免疫印迹法鉴定。用 IPTG 诱导的菌中,能够与抗体反应显色的带约 43 kD,与标准蛋白中的肌动蛋白分子量相同,表明在 IPTG 的诱导下,肌动蛋白基因在大肠杆菌中表达并形成包涵体。不经 IPTG 诱导的菌,可与抗体反应而显色的带存在于细胞裂解的上清液中,说明转化菌虽然不经 IPTG 诱导,肌动蛋白也能表达,但没有形成包涵体。

2.3 表达菌的电镜观察

用电镜观察表达菌,可见在 IPTG 诱导的细菌中基因大量表达并形成包涵体,不经 IPTG 诱导的细菌中则没有观察到包涵体的存在。此结果印证了免疫印迹法的结果。

3 讨论

将质粒经 PCR 扩增,得到了肌动蛋白基因,这个基因的编码区是完整的,但改造了起始密码子上游的 2 个碱基,在基因编码区的上游构建了一个 Nco I 的位点。扩增的基因经 Nco I/Xho I 双酶切后,插入载体的 Nco I/Xho I 位点,得到了表达质粒 pTrcAt I,表达质粒上的起始密码子和该基因上的起始密码子重合。因此,在 lac 启动子的控制下,转导子能够翻译,翻译后的蛋白质 N-端氨基酸序列正确,为完整的肌动蛋白。免疫印迹法(图 2)和电镜观察(图 3)证明了 pTrcAt I 上的肌动蛋白基因确实在大肠杆菌中得到表达,但可能形成也可能不形成包涵体。不经 IPTG 诱导,肌动蛋白基因也能表达,并且是在细胞质中表达,其机制尚需进一步探讨。



- 1 标准分子量
- 2 经 IPTG 诱导后提取的包涵体裂解液(SDS-PAGE)
- 3 不经 IPTG 诱导的细胞裂解液(SDS-PAGE)
- 4 经 IPTG 诱导后提取的包涵体裂解液(免疫印迹)
- 5 不经 IPTG 诱导的细胞裂解液(免疫印迹)

图 2 PEAc I 基因表达产物的鉴定

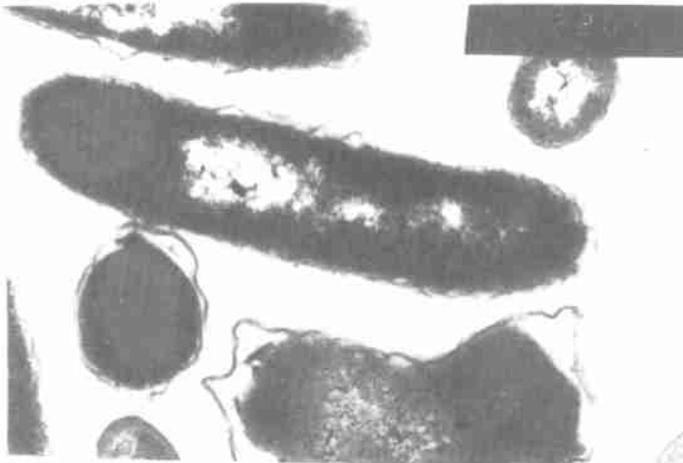


图 3 经 IPTG 诱导后的大肠杆菌产生了包涵体

肌动蛋白在高等植物中含量极低, 提取十分困难, 如从豌豆提取时需要大量的卷须。将肌动蛋白基因在大肠杆菌中表达, 由于大肠杆菌培养条件简单, 菌体容易得到, 使大量获得肌动蛋白成为可能, 也为进一步研究肌动蛋白的结构与性质打下基础。目前, 许多实验室都在从事肌动蛋白的原核表达的研究^[8]。但遇到一个共同的问题, 即在大肠杆菌中表达的肌动蛋白都是以不溶的包涵体形式存在, 而将其变性、复性后只能从中获得极少量可溶性的、有活性的肌动蛋白。其包涵体形成的机理尚不清楚, 可能是由作为外源蛋白的肌动蛋白与大肠杆菌的外周膜组分形成共聚集而发生不可逆变性所造成的^[8], 也可能是由于蛋白质分子间的离子、疏水或共价反应而发生共聚集^[5]。Gao 等人^[9]从兔网织红细胞中分离出一种胞质伴侣蛋白, 可催化在大肠杆菌中表达的变性肌动蛋白的折叠, 使其恢复活性, 但催化的机理还不清楚。

由于目前除免疫印迹法可对肌动蛋白进行定性鉴定以外, 尚无其他有效的方法对肌动蛋白做定量分析, 对表达产物的定量分析造成困难, 这个问题有待于进一步研究。

本试验得到的结论是, 不经 IPTG 诱导的肌动蛋白基因在大肠杆菌细胞质中以可溶的形式表达, 为进一步研究肌动蛋白的功能创造了有利条件。

参 考 文 献

- 1 Sheterline P, Sparrow J C. Protein Profile 1994, 1(1): 63~ 121
- 2 阎隆飞, 石德权. 高等植物中的收缩蛋白. 生物化学与生物物理学报, 1963, (3): 490~ 495
- 3 曹晓风, 王荣臣, 阎隆飞, 鲁治滨, 潘乃遂, 陈章良. 豌豆卷须 cDNA 文库构建及肌动蛋白基因序列分析. 科学通报, 1993, 39(1): 1805~ 1808
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 5 Marston F A O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem J, 1986, 240: 1~ 12
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~ 685
- 7 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350~ 4354
- 8 Gordon J B, Boyer J L, Korn E D. Comparative biochemistry of nonmuscle actins. J Biol Chem, 1977, 252: 8300~ 8309
- 9 Gao Y, Thomas J O, Chow R L, Lee G H, Cowan N J. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes β -actin folding. Cell, 1992, 69: 1043~ 1050