

坛紫菜别藻蓝蛋白 亚基因的原核表达与鉴定

左正宏 李博文 聂鑫怡 王重刚 陈奕欣

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要:通过 PCR 的方法从重组质粒 pMD-*apcAB* 中扩增坛紫菜别藻蓝蛋白 亚基因(*apcA*),并将其克隆到高效表达外源基因的原核表达质粒 pTO-T7。将构建好的质粒导入表达型大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达,并对表达产物进行 Western blot 和质谱鉴定。结果显示:*apcA* 全长 486bp,表达的 亚基(*apcA*)为带有原核表达载体 T7g10 的 12 个起始氨基酸的融合蛋白,其分子量约为 19.7KD。0.5mmol/L 的 IPTG 在 37 °C 诱导 6h 时,*apcA* 的表达量达到最大,达菌体总蛋白 50% 以上。Western blot 和质谱鉴定的结果表明获得的融合蛋白为重组坛紫菜别藻蓝蛋白 亚基。

关键词:坛紫菜;别藻蓝蛋白;原核表达;Western blot

中图分类号:S945.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2006)03-0323-04

藻胆蛋白(Phycobiliproteins, PBP)是存在于某些藻类藻胆体(Phycobilisomes, PBS)中的一类进行光合作用的捕光色素蛋白。根据藻胆蛋白结构和光谱特性,可分为3类:藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)、藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)。别藻蓝蛋白在藻体光合作用中起重要作用,其主要负责把来自藻胆体天线杆的光能传递到光合反应中心^[1]。别藻蓝蛋白除了在光合作用中起重要的作用外,还可以促进体外培养的人 R/ MIN18226 细胞的生长,而且效果比藻蓝蛋白更加明显。Shih 等人的研究结果显示,别藻蓝蛋白具有抗人类和非洲绿猴体内肠道病毒 71 的活性,能抑制该病毒引起的细胞病变^[2]。国内外的研究表明,别藻蓝蛋白具有清除自由基、抗氧化等生物学活性^[3-4]。Rimba 等的实验提示藻蓝蛋白的抗氧化活性可用于治疗由氧化胁迫诱导的神经损伤^[5]。

天然的别藻蓝蛋白单体一般由 2 个亚基组成,分别由来自质体基因组的 *apcA* 和 *apcB* 基因编码。目前,有关别藻蓝蛋白 亚基分别在光合作用中起什么作用,以及两个亚基的生物学活性等研究在国内外均未见报道,而且,有关大型藻类的别藻蓝蛋白的相关研究也鲜有报道。本研究拟构建能

够高效表达坛紫菜别藻蓝蛋白 亚基(APC)的原核表达载体,并优化表达条件,对表达的融合蛋白进行 Western blot 和质谱鉴定,以期为进一步研究别藻蓝蛋白的功能提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株 大肠杆菌 JM109, BL21 (DE3) 由本实验室保存,质粒 pMD-*apcAB* 由本实验室构建,质粒 pTO-T7 为厦门大学生命科学学院夏宁邵教授惠赠。

1.2 试剂 DNA/ *Hind* + *EcoR*、*Taq* 酶、RNase A、DNA Ligation Kit、限制性内切酶、胰蛋白酶购自大连宝生物公司。IPTG、蛋白 Marker、PVDF 膜、透析袋等其他试剂购自华美生物公司或国产分析纯。

1.3 引物设计与 PCR 扩增 用于扩增 *apcA* 基因的引物参照 GenBank (AY372218) 的相关序列设计,由上海生物工程公司合成,其核苷酸序列分别为:引物 1: 5'-TAGGATCCA TGA GTA TTG TTA CAA AG-3' (*Bam*H I);引物 2: 5'-TAGTCCACTTAACCTAGGCCA-GAAC-3' (*Sal*I)。PCR 扩增的模板为质粒 pMD-*apcAB*,反应参数为 95 °C, 4min; 然后 95 °C, 1min, 55 °C, 40s, 72 °C, 90s; 35 个循环,再 72 °C 延伸 7min。

收稿日期:2005-10-24;修订日期:2006-01-13

基金项目:福建省重大农业科技项目(2001Z017);国家海洋 863 项目(2002AA603023)资助

作者简介:左正宏(1973—),男,安徽池州人,讲师,博士研究生,从事分子生物学研究,E-mail: zuozhenghong @xmu.edu.cn

通讯作者:陈奕欣,E-mail: cheniyix @xmu.edu.cn

1.4 重组 APC 的表达 挑单菌落于 5mL 含 Kan (80 μ g/mL) 的培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 250r/min 振荡培养过夜; 按 1:100 接种, 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.8 之间时, 加入 IPTG (终浓度 0.5mmol/L) 诱导培养; 在诱导后的不同时间 (0h, 2h, 4h, 6h 和 8h) 各取 1mL 样品备用。SDS-PAGE 电泳检测, 电泳结果用英国 UVI 公司的凝胶成像仪扫描, 目的蛋白占全菌蛋白的百分比用 UVband 软件进行分析。

1.5 别藻蓝蛋白抗血清的制备 参照分子克隆上的方法^[6], 以纯化的坛紫菜天然别藻蓝蛋白为抗原皮下多点注射免疫新西兰兔, 每次免疫抗原量为 500 μ g。

1.6 重组 APC 的 Western-blot 参照分子克隆的方法^[6]。经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 将凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上 (160mA 稳压转移 2.5h)。取下 PVDF 膜, 用 PBST 漂洗后用封闭液封闭 1—2h。用 PBST 漂洗后置别藻蓝蛋白阳性血清中温育 1.5h, 再次漂洗后加入 HRP 标记的羊抗兔酶标二抗温育 1h 后漂洗, 加入底物联苯二胺显色。以未经诱导的细菌裂解液和用空载体转化的细菌诱导物作对照。

1.7 电洗脱回收 APC 样品经 SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色、脱色后, 用锋利的刀片切取含目的条带 APC 的蛋白凝胶后, 将它们放入透析袋中, 加入适量的洗脱液 (即电泳缓冲液), 在水平电泳槽中恒流 80mA 进行电洗脱, 直到凝胶无色为止; 在洗脱液中按 1:6 的体积比加入冷冻的甲醇/酸化丙酮沉淀剂, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 静置过夜; 在 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min, 离心 30min, 沉淀在室温下放置挥发掉丙酮后加入适量的 1 \times SDS 上样缓冲液制备样品, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.8 质谱样品制备及检测 蛋白质胶内酶解参照 Bergman 等方法进行参照^[7], 切下含有目的蛋白的胶块, 经洗脱、还原和烷基化后, 进行胶内胰蛋白酶酶解, 酶解结束后加入 5% 的 TFA 120 μ L, 漩涡震荡 30s, 室温静置 1h; 12000r/min 离心 30s, 取上清, 转移至新的离心管中; 加入适量提取液 (50% ACN, 1% TFA) 至胶块中, 超声或震荡 10min; 收集上清, 真空干燥; 加入 5 μ L 提取液和 0.5% TFA 溶解, 混匀; 取 0.5 μ L 与 0.5 μ L HCCA 混合, 内标 842.5 和 2211.1 Da 校准质谱检测。ESI-MS/MS Q-TOF 氨基酸序列匹配采用 NCBI 数据库 Mascot <http://www.matrix-science.com> 进行搜索。

2 结果

2.1 表达载体的构建

pTO-T7 是大肠杆菌高效融合表达载体^[8], 该载体的多克隆位点上有 *Bam*H 和 *Sal*I 两个酶切位点, 设计用于扩增 *apcA* 的一对引物的两端也分别加上该酶切位点, 这样对 PCR 产物及质粒进行双酶切再回收酶切产物连接, 就可以筛选出所需要的重组质粒 pTO-T7-*apcA* (图 1)。重组质粒 DNA 的 PCR 和双酶切鉴定结果及测序结果与预期一致 (测序反应由上海生物工程公司完成), 说明已成功构建成目的质粒。

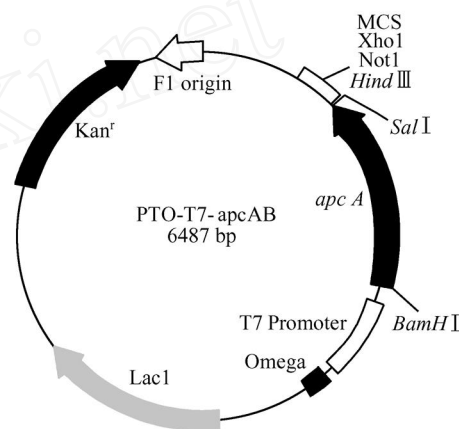


Fig. 1 The plasmid map of pTO-T7-*apcA*

2.2 重组 APC 的表达

将构建好的质粒 pTO-T7-*apcA* 转化到表达型大肠杆菌 BL21 (DE3), 用 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 的电泳结果见图 2。从图 2 中可以看到 APC 的分子量约为 19.7KD。随着诱导时间的增加, 目的蛋白的表达量也随之增高, 在诱导 6h 时达到最高值, 扫描分析的结果表明, 目的蛋白占菌体总蛋白的 50% 以上。而含质粒 pTO-T7 和不含质粒的空白菌 IPTG 诱导 8h 均未见目的蛋白条带。

2.3 重组菌裂解物的 Western-blot

含有 pTO-T7-*apcA* 质粒的重组菌的经 IPTG 诱导后, 菌体裂解物进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳后的凝胶经转膜, 与天然的坛紫菜别藻蓝蛋白免疫新西兰兔获得的多克隆抗体的 Western-blot 的结果显示: 在重组菌的电泳条带中有 1 条分子量约为 19.7KD 的蛋白条带, 为融合了 12 个氨基酸的重组 APC 蛋白 (图 3)

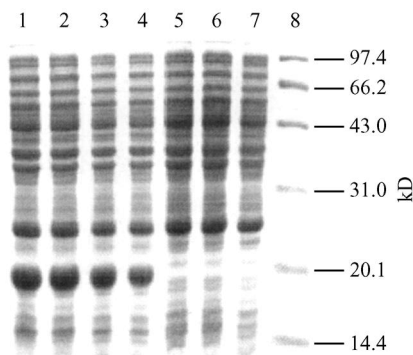


图2 重组 APC 在大肠杆菌中诱导表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressions of recombinant APC in *E. coli* BL21 (DE3)

1. 诱导 8h; 2. 诱导 6h; 3. 诱导 4h; 4. 诱导 2h; 5. 含质粒 pTO-T7 诱导 8h; 6. 不含质粒诱导 8h; 7. 诱导 0h; 8. LMW-SDS Marker
1. Inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7-*apcA* induced for 8h; 2. Inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7-*apcA* induced for 6h; 3. Inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7-*apcA* induced for 4h; 4. Inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7-*apcA* induced for 2h; 5. Inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7 induced for 8h; 6. Inclusion of *E. coli* induced for 8h; 7. Inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7-*apcA* induced for 0h; 8. LMW-SDS Marker

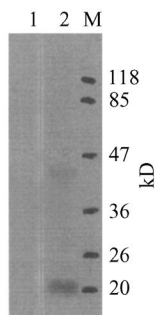


图3 重组蛋白 APC 的蛋白印迹实验

Fig. 3 The Western blotting analysis of recombinant APC protein

1. 不含质粒对照组; 2. 含 pTO-T7-*apcA* 质粒实验组; M: Protein Marker
1. Control; 2. Test carrying pTO-T7-*apcA*; M: Protein Marker

2.4 重组 APC 的质谱鉴定

为了鉴定获得的目的蛋白的确为别藻蓝蛋白,进行了质谱鉴定,首先通过电洗脱的方法从 PAGE 胶中回收表达的坛紫菜重组别藻蓝蛋白 APC,经过电洗脱回收的蛋白样品再进行 SDS-PAGE 电泳检测的结果显示,通过电洗脱可获得较纯的目的蛋白,为质谱的鉴定提供了可靠的保障。对重组 APC 的质谱鉴定的结果表明,肽段质量数与理论值匹配率为 60%,可认为坛紫菜重组 APC 的氨基酸序列与预期一致(图 4)。

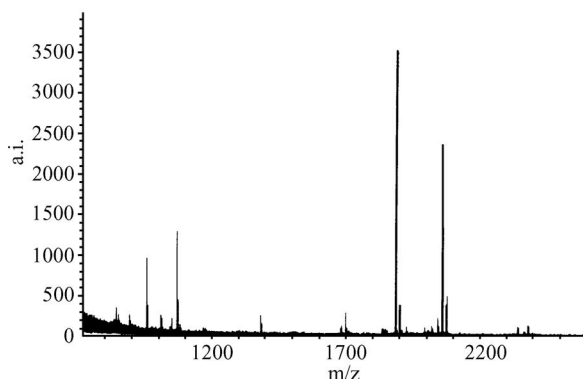


图4 重组蛋白 APC 的肽指纹图谱

Fig. 4 Peptides mass fingerprint of the recombinant APC protein

3 讨论

大肠杆菌表达系统具有真核表达系统所不具备的优势,如:培养周期短,表达量高,成本低廉,和易于分离纯化等,是目前为此应用最广泛的基因表达系统。pTO-T7 是大肠杆菌高效融合表达载体,调控序列中有一个 序列和一个 T7 启动子串连,可进行融合表达和非融合表达,融合蛋白 N 端为 T7g10 的 12 个起始氨基酸,C 端为 His 标签。为了获得高水平的基因表达产物,并综合考虑控制转录、翻译、蛋白质稳定性及向胞外分泌等诸多方面的因素,pTO-T7 表达质粒是较为理想的原核表达载体。作者构建的质粒 pTO-T7-*apcA* 在 T7 启动子下游为别藻蓝蛋白 亚基基因,经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 6h 后,目的蛋白占菌体总蛋白 50% 以上,这与罗文新等的结果一致^[8],且目的蛋白多以包涵体的形式存在。

作者获得的目的蛋白大小约为 19.7 kD(图 2)。利用 DNAMAN 软件根据 *apcA* 基因的核苷酸序列推导的 亚基多肽链的分子量为 17.5 kD,在对纯化的坛紫菜别藻蓝蛋白进行 SDS-PAGE 电泳发现,天然的坛紫菜别藻蓝蛋白 亚基的分子量约为 18.8 kD(资料未发表)。这表明表达的 APC 为融合了 12 个氨基酸的融合蛋白。进一步对表达的蛋白进行 western blot 鉴定时发现(图 3),诱导表达的工程菌 BL21(DE3)超声波破碎的包涵体裂解物在 20 kD 左右有一条明显的印迹,而对照组未见条带,这证明重组的目的蛋白可以和天然的坛紫菜别藻蓝蛋白发生免疫反应。另外,在 40 kD 左右的地方有一条较弱的印迹条带(图 3),通过对目的蛋白单体及该条带相对分子量的分析,认为该条带为别藻蓝蛋白 亚基通过二硫键形成的同源二聚体。张玉梅等在进行

人 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体主亚基 M3-M4 环靶基因片段的原核表达时也出现过类似的情况。对重组蛋白的质谱分析的结果表明,肽段质量数与理论值匹配率为 60%,可认为坛紫菜重组 APC 的氨基酸序列与预期一致。

参考文献:

- [1] Sheng S B, Zhang F T, Deng M G, *et al.* Cloning and expressing Phycoerythrocyanin E gene of *Mastigocladus Laminosus* in *Escherichia coli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25** (4): 427—430 [盛树斌, 张富铁, 邓明刚, 等. 层理鞭枝藻红蓝蛋白 E 基因的克隆和表达. 水生生物学报, 2001, **25** (4): 427—430]
- [2] Shih S R, Tsai K N, Li Y S, *et al.* Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis* [J]. *J Med Virol*. 2003, **70** (1): 119—125
- [3] Estrada J E. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina Platensis* protean extract [J]. *Il Farmaco*. 2001, **56**: 497—500
- [4] Yu L J, Li Y M, Chen Y L, *et al.* Studies on phycobiliprotein of *Spirulina platensis* for its purification and ability to scavenge active oxygen radical [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*. 1999, **18** (2): 172—176 [俞丽君, 李永明, 陈艳丽, 等. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的纯化及其清除自由基的作用 [J]. 台湾海峡, 1999, **18** (2): 172—176]
- [5] Rimba V, Camins N, Romay C, *et al.* Protective effects of C-phyco-cyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus [J]. *Neuroscience Letters*. 1999, **76**: 75—78
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual (third edition)* [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2002
- [7] Bergman A C, Benjamin T, Alaiya A, *et al.* Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*. 2001, **21**: 679—686
- [8] Luo W X, Zhang J, Xia N S, *et al.* Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*. 2000, **16** (5): 578—581 [罗文新, 张军, 夏宁邵, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用. 生物工程学报. 2000, **16** (5): 578—581]

PROKARYOTIC EXPRESSION AND IDENTIFICATION OF ALLOPHYCOCYANIN SUBUNIT GENE FROM PORPHYRA HAITANENSIS

ZUO Zheng-Hong, LI Bo-Wen, NIE Xin-Yi, WANG Chong-Gang and CHEN Yi-Xin

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: Allophycocyanins (APC) consist of α and β subunits, was one of phycobiliproteins, act as substances of light-harvesting and transferring energy to photosystem reaction centers in algal photosynthesis; it also as a kind of bioactive substances applied perspective in quite a lot of fields. Although the *apcA* and *apcB* genes encoding allophycocyanin α and β subunits of *Cyanophora paradoxa*, *Anabaena variabilis*, *Cyanidium caldarium*, *Synechocystis* 6714 and *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta) were also cloned, the research related to *apc* genes in macro-alga has not been reported. In this study, the *apcA* gene of *Porphyra haitanensis* was PCR amplified from pMD-*apcAB* recombinant plasmid and cloned into *E. coli* fusion expression pTO-T7 vector which allows the overexpression of a target protein. The recombinant plasmid pTO-T7-*apcA* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced in 0.5 mmol/L IPTG in 37 °C, the induce product was identified by western blotting and mass spectrum.

The results showed that the 486bp sequence of *apcA* was successfully inserted into pTO-T7 plasmid. SDS-PAGE analysis of the inclusion of *E. coli* carrying pTO-T7-*apcA* showed a band with molecular mass of 19.7 kD in agreement with a fusion APC protein with the first 12 Nterminaminol amino acids of Tg10, which was identical to what had been anticipated. And the recombinant fusion protein accounted for more than 50% of the total *E. coli* protein after 6 hours inducing. The result of western blotting confirmed that the recombinant fusion protein could specifically react with antibody against native APC proteins. And the mass spectrum results proved that the target protein was allophycocyanin α subunit of *Porphyra haitanensis*.

Key words: *Porphyra haitanensis*, Allophycocyanin, Prokaryotic expression, Western blot