

pET15b-PEP-1-CAT原核表达质粒的构建及 PEP-1-CAT 融合蛋白的表达与纯化

姚玲玲,王家宁,黄永章,郭凌郎(南阳医学院附属人民医院临床医学研究所,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 构建 pET15b-PEP-1-CAT 原核表达质粒,并表达、纯化得到融合蛋白 PEP-1-CAT,为防治与氧化应激有关的疾病奠定基础。方法 设计并合成两端分别带 *Sal* I 和 *Bgl* II 酶切位点的 CAT 引物,用 PCR 方法以 pZeoSV2(+)-CAT 质粒为模板,特异性扩增 CAT 全长 cDNA。将扩增的 CAT cDNA 与 dATP 反应,利用 Taq DNA 聚合酶具有的非模板依赖性末端转移酶活性在 CAT cDNA 的 3' 末端加“A”并纯化,然后应用 TA 克隆策略将纯化后的 CAT cDNA 插入至中间载体 pGEM-T Easy Vector 中得到 pGEM-T-CAT。人工合成编码 PEP-1 的双链寡核苷酸,两端分别引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点,将其插入 pET15b 中得到重组质粒 pET15b-PEP-1。pGEM-T-CAT 和 pET15b-PEP-1 分别经 *Sal* I-*Bgl* II 和 *Xho* I-*Bam*HI 双酶切,利用同尾酶(*Sal* I 与 *Xho* I,*Bgl* II 与 *Bam*HI) 能酶切产生相同黏性末端的特性,将回收得到的 CAT cDNA 片段与 pET15b-PEP-1 相连,构建出重组质粒 pET15b-PEP-1-CAT,经 PCR 及酶切鉴定,并通过核苷酸序列测序证实。将鉴定正确的 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒转化 BL21(DE3),用 IPTG 诱导目的蛋白表达。然后利用重组蛋白 N 端的组氨酸“标签”(His-tag)对其进行金属螯合亲和层析纯化。结果 测序分析证实,克隆入 pET15b 的 PEP-1 序列与设计合成的 PEP-1 序列一致,CAT 序列与 GeneBank 中登录号为“AY028632”的 CAT cDNA 序列一致。SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明,pET15b-PEP-1-CAT 在 *E.coli* 中获得可溶性高表达,经 Ni^{2+} -NTA-树脂柱亲和层析纯化得到了 PAGE 纯的融合蛋白 PEP-1-CAT,并在体外检测到其具有特异的过氧化氢酶活性,活性值为 77.15 U/g。结论 成功构建了原核表达载体 pET15b-PEP-1-CAT,并经表达、纯化得到可以天然活性形式穿透细胞的重组过氧化氢酶蛋白,从而为防治心肌缺血再灌注损伤等与氧化应激有关的疾病奠定了基础。

关键词:原核表达;过氧化氢酶;TA 克隆;同尾酶;融合蛋白

中图分类号:R394.3;R392.4 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)09-1319-07

Construction of prokaryotic expression plasmid pET15b-PEP-1-CAT and expression and purification of PEP-1-CAT fusion protein

YAO Ling-ling, WANG Jia-ning, HUANG Yong-zhang, GUO Ling-yun

Institute of Clinical Medicine, People's Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China

Abstract: Objective To construct the prokaryotic expression plasmid pET15b-PEP-1-CAT to obtain purified fusion protein of PEP-1-CAT. **Methods** Using pfu DNA polymerase, the full-length human catalase cDNA was amplified by PCR from pZeoSV2 (+)-CAT plasmid, and the PCR product was added with "A" using Taq DNA polymerase. The purified product of CAT cDNA with the base A at its 3' end was ligated with pGEM-T Easy vector and transformed into DH5 α . The correct recombinant was identified by PCR and *Sal* I /*Bgl* II digestion and named as pGEM-T-CAT. Two oligonucleotides were synthesized and annealed to generate a double-stranded oligonucleotide encoding the PEP-1 peptide, which was directly ligated into *Nde* I/*Xho* I-digested pET15b. The recombinant plasmid was identified by double-enzyme digestion and named as pET15b-PEP-1. pET15b-PEP-1 and pGEM-T-CAT were further digested by *Xho* I/*Bam*HI and *Sal* I/*Bgl* II, respectively. The purified linear fragment of pET15b-PEP-1 and CAT cDNA fragment were ligated using two pairs of isocaudarners possessing different recognition sequences but producing compatible cohesive ends. The clone with the expected insert was selected using *Xho* I restriction analysis followed by sequence analysis. The recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) which was induced by IPTG. The recombinant protein possessed an N-terminal His-tag sequence which could be used to purify the target protein by affinity chromatography on a Ni^{2+} -NTA-resin column. The fusion protein PEP-1-CAT was produced and confirmed by specific enzyme activity *in vitro*. **Results** Sequence analysis showed that the PEP-1 and the human CAT cDNA sequence of pET15b- PEP-1-CAT had identical sequence with designed PEP-1 peptide and human catalase cDNA sequence in GenBank (accession No. AY028632), respectively. SDS-PAGE and Western blotting confirmed successful expression and purification of PEP-1-CAT fusion protein with specific activity of 77.15 U/g. **Conclusion** The prokaryotic

收稿日期:2005-12-09

作者简介:姚玲玲(1979-),女,硕士,研究方向为细胞穿透肽介导的大分子物质跨膜转运,电话:0719-8637170,E-mail:sandy530530@hotmail.com

通讯作者:王家宁,男,博士,副教授、副主任医师,硕士生导师,研究方向为心血管疾病的基因治疗,电话:0719-8637011,E-mail:rywjin@vip.163.com

expression plasmid pET15b-PEP-1-CAT has been constructed successfully, and the successful expression and purification of PEP-1-CAT provides a basis for prevention and therapy of various disorders related to oxidative stress.

Key words: prokaryotic expression; catalase; TA-cloning; isocaudarner; fusion protein

活性氧介导多种疾病发生的病理生理过程。细胞防御体系利用抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)来对抗活性氧。SOD 催化 $\cdot O_2$ 分解产生 H_2O_2 ,CAT 和 GPx 则将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 而彻底解毒,并避免 $\cdot OH$ 基团的产生。尽管长期以来人们希望将过氧化氢酶应用于防治各种氧化应激损伤,但由于其穿透细胞的能力不足因而限制了其在临床上的应用。为了使胞外途径加入的 CAT 能够有效的清除胞内活性氧,本研究合成编码可携带目的蛋白以天然活性形式穿透生物膜的肽段载体 PEP-1 的 DNA,通过基因工程手段构建出 pET15b-PEP-1-CAT 原核表达载体。在构建过程中,我们设计合成 CAT 的引物,其上游引物 5' 端引入 *Sal* I 位点、下游引物 3' 端引入 *Bgl* II 位点,而 *Sal* I 与 *Xho* I、*Bgl* II 与 *Bam*HI 互为两组同尾酶,利用两组同尾酶切割后能产生相同粘性末端并能通过碱基互补作用彼此连接的特性,将 CAT cDNA 片段插入到 pET15b-PEP-1 上,从而成功构建了 pET15b-PEP-1-CAT。将其在工程菌中表达出 N 端带有 6 个组氨酸标签的重组蛋白,然后通过金属螯合亲和层析对其进行纯化,从而成功制备了可穿透细胞的重组过氧化氢酶蛋白 PEP-1-CAT,为防治与氧化应激损伤有关的疾病(如心肌缺血再灌注等)奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 PCR 仪(Biometra,德国)、透射式紫外分析仪(EF-90A,上海)、凝胶成像系统(Touching 955 gel Document System,上海)、台式高速冷冻离心机(Hettich,Universal 32R,德国)、超声波细胞粉碎机(JY-98-3D,宁波)、超速冷冻离心机(HITACHI,himac CP 80MX,日本)、核酸蛋白检测仪(HD-2004B,上海)、恒流泵(HL-2,上海)、转移电泳仪(DYY-7,北京)、紫外分光光度计(CE2041,北京)。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、dATP、 T_4 DNA 连接酶、IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)购自 Promega 公司,Pfu 酶为 New England Biolabs 公司产品,限制性内切核酸酶 *Xho* I、*Bam*HI、*Nde* I、*Xba* I 购自北京赛百盛基因技术有限公司,*Sal* I、*Bgl* II 购自晶美生物工程有限公司,DNA 分子量标准(Marker)为北京华美生物工程有限公司产品,预染蛋白分子量标准(P0066)购

自 Beyotime Biotechnology 公司, Ni^{2+} -NTA-树脂为 Qiagen 公司产品,His-probe(G-18)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,Western blot 检测试剂盒为 KPL 公司产品,CAT 试剂盒购自南京聚力生物医学工程研究所。PCR 引物及 PEP-1 的寡核苷酸链由赛百盛公司合成。

1.1.3 质粒与菌株 模板质粒 pZeoSV2(+)-CAT 由美国西奈山医学院生化/药理学系白景香博士惠赠;质粒 pET15b 购自 Novagen 公司;pGEM-T Easy 载体系统为 Promega 公司产品;*E.coli*.BL21(DE3) 购自 Novagen 公司;大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 pET15b-PEP-1-CAT 构建流程图 详见图 1。

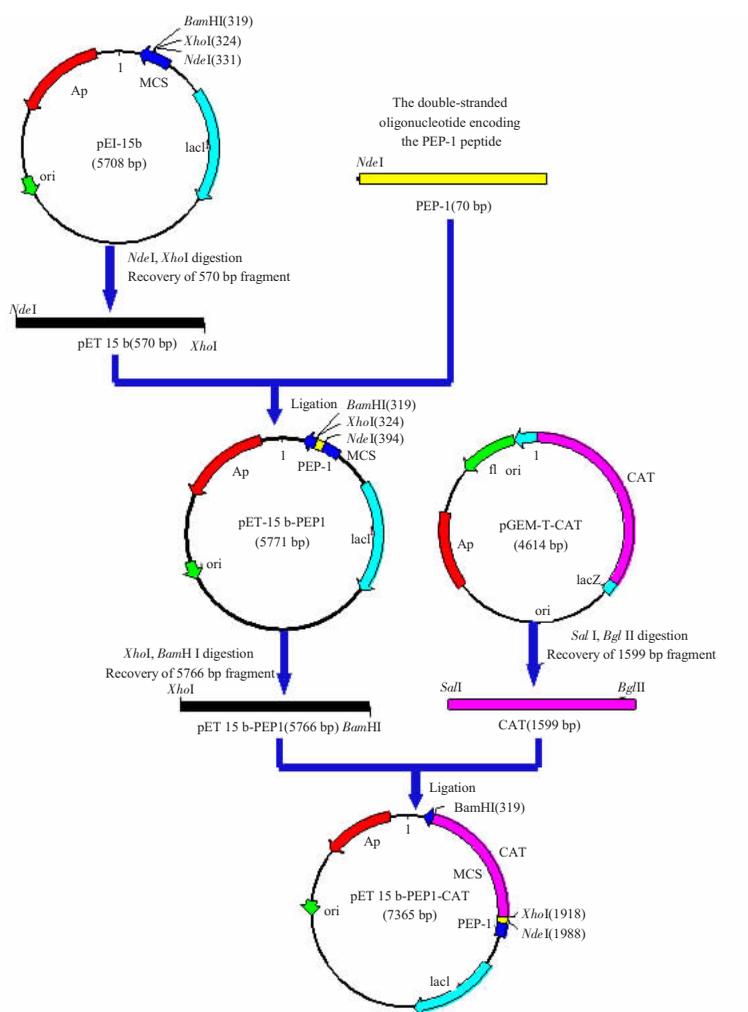


图 1 重组质粒 pET15b-PEP1-CAT 的构建流程图

Fig.1 Construction chart of pET15b-PEP-1-CAT

1.2.2 PCR 扩增目的片段 根据 GeneBank 中登录号为“AY028632”的人 CAT cDNA 设计合成 CAT 的引物,两端分别直接引入 *Sal* I、*Bgl* II 酶切位点,上游引物:5' *Sal* I GTCGAC ATG GCT GAC AGC CGG GAT

CCC GCC 3' (30 bp), 下游引物: 5' *Bgl* II AGA TCT TCA CAG ATT TGC CTT CTC CCTTGC3' (30 bp)。以 pZeoSV2(+)-CAT 为模板, PCR 扩增两端分别带有 *Sal* I 和 *Bgl* II 酶切位点的 CAT 片段。PCR 反应体系: 10×buffer(含 MgSO₄) 10 μl、10×dNTP 10 μl(2 μmol/L)、上下游引物各 10 μl、Pfu 酶 4 μl、模板 2 μl, 补加去离子水至总体积 100 μl。循环参数: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 10 min。取 10 μl PCR 产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果得到一条约 1600 bp 的片段。将剩余 PCR 产物用乙醇沉淀法进行纯化回收。

1.2.3 CAT cDNA 片段两 3' 端加“A”在纯化得到的 PCR 产物沉淀中, 加入高压三蒸水 34 μl、10×buffer 5 μl、10×MgCl₂ 5 μl、2 mmol/L dATP 5 μl、Taq 酶 1 μl, 总反应体系 50 μl。PCR 仪上 70 °C 30 min 后, 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收加“A”后的 CAT cDNA 片段。

1.2.4 T 载体与加“A”后的 CAT cDNA 连接 将上步中回收所得片段, 按 pGEM-T Easy Vector 说明书进行 T 载体克隆。配制连接体系: 将上步中所得 3' 加 A 的 CAT 沉淀以 3 μl 高压三蒸水溶解, 2×Rapid ligation buffer 5 μl, pGEM-T 载体 1 μl, T₄ DNA 连接酶 1 μl, 总体系为 10 μl, 4 °C 连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α, 将转化的大肠杆菌液涂布于含 X-gal、IPTG、Ampicillin 的固体 LB 培养板上, 以蓝白筛选法筛选阳性克隆。经 PCR 及 *Sal* I-*Bgl* II 双酶切鉴定, 阳性重组子命名为“pGEM-T-CAT”, -20 °C 保存备用。

1.2.5 pET15b-PEP-1 重组质粒的构建 人工合成编码 PEP-1 的序列, 上游引物: 5'^{Nde} ITAT GAA AGA AAC CTG GTG GGA AAC CTG GTG GAC CGA ATG GTC TCA GCC GAA AAA AAA ACG TAA AGT GC 3' (68 bp); 下游引物: 5'^{Xho} ITCG AGC ACT TTA CGT TTT TTT TTC GGC TGA GAC CAT TCG GTC CAC CAG GTT TCC CAC CAG GTT TCT TTC A 3' (70 bp)。将人工合成的编码 PEP-1 的两条单链寡核苷酸煮沸变性, 再逐渐降温复性为双链 DNA。pET15b 用 *Xho* I-*Nde* I 双酶切后回收大片段, 然后将两者相连, 反应体系: pET15b(沉淀)、PEP-1 4 μl、2×Rapid ligation buffer 5 μl、T₄ DNA 连接酶 1 μl, 总体系为 10 μl, 4 °C 连接过夜。连接产物转化 DH5α 后, 随机挑取单菌落培养, 碱裂解法提取质粒 DNA, 经 *Xho* I-*Xba* I 双酶切鉴定。因 pET15b 上带有一个 *Xba* I 的酶切位点, 因此重组质粒采用 *Xho* I-*Xba* I 双酶切电泳, 切下含有 PEP-1 的片段应为 167 bp, 不含 PEP-1 的片段为 104 bp。鉴定正确的重组质粒命名为

“pET15b-PEP-1”, -20 °C 保存备用。

1.2.6 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒的构建 首先用 *Xho* I-*Bam*HI 对 pET15b-PEP-1 进行双酶切后回收大片段, 再用 *Sal* I-*Bgl* II 消化 pGEM-T-CAT 回收 1600 bp 的 CAT 片段。*Xho* I 与 *Sal* I, *Bam*HI 与 *Bgl* II 互为两组同尾酶, 利用同尾酶酶切后能产生相同黏性末端的特性进行片段的连接。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 后铺板, 37 °C 温箱孵育。挑取单菌落少量培养后, 经 PCR、*Xho* I 单酶切鉴定。因为通过同尾酶技术连接后原有酶切位点均被破坏, pET15b 上的 *Xho* I 位点不存在了, 而 CAT cDNA 上有一个 *Xho* I 的位点, 因此用 *Xho* I 单酶切鉴定, 如切出一条 7365 bp 的片段则重组正确, 命名为“pET15b-PEP-1-CAT”。

1.2.7 pET15b-PEP-1-CAT 序列测定 取 10 μl pET15b-PEP-1-CAT, 加 10 μl 高压三蒸水稀释后寄往北京华大中生科技发展有限公司进行核苷酸序列测定。

1.2.8 工程菌 *E.coli*.BL21(DE3) 的转化和 PEP-1-CAT 融合蛋白的诱导表达 将表达质粒 pET15b-PEP-1-CAT 转化感受态 BL21(DE3) 大肠杆菌, 转化的菌液铺于含 Ampicillin(100 μg/ml) 的 LB 平板上, 37 °C 温箱培养待长出菌落。挑单菌落接种于 5 ml LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 然后用新鲜培养基按 1:50 比例稀释, 扩大培养至 D₆₀₀ ≈ 0.8 时加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 培养 24 h 以诱导目的蛋白表达。4 °C、5000 r/min 离心 5 min, 收集细菌沉淀, 1×PBS 漂洗 3 次, 加 50 ml 结合缓冲液(5 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris·HCl, pH 7.9) 重悬菌体。然后冰浴超声破菌(400 W、5 s/15 s、30 min), 将菌液置超速冷冻离心机中 20 000 r/min 离心 10 min, 以除去细胞壁, 则融合蛋白以天然、可溶的形式存在于上清中。

1.2.9 目的蛋白的纯化 pET15b 作为载体所表达的基因工程重组蛋白在其 N 端带有一个由 6 个组氨酸组成的“标签”(His-tag), 可用 Ni²⁺-NTA- 树脂柱进行亲和层析纯化^[1]。收集上步超离心后的上清, 将其转入装有 Ni²⁺-NTA- 琼脂糖的层析柱中, 上样完毕后静置 2 h, 以便 6 个组氨酸标签与填料中 Ni²⁺ 充分结合。分别用 10 倍柱体积的结合缓冲液和 6 倍柱体积的漂洗缓冲液(30 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris·HCl, pH 7.9) 过柱以洗去未结合的杂蛋白, 然后用洗脱缓冲液(500 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris·HCl, pH 7.9) 将 His-tag-PEP-1-CAT 融合蛋白洗脱下来。收集峰值洗脱液行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白表达水平及纯化效果。洗脱的蛋白加入 10% 甘油后用生物半透膜透析 48 h, 以充分脱盐(透析液为 pH 7.4 的 PBS,

含 10%甘油)。纯化的融合蛋白过 0.22 μm 滤器除菌后,用 1.5 ml Eppendorf 管分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.10 12% SDS-PAGE 和 Western blot 检测 制备 12% 分离胶、浓缩胶,分别取含有目的蛋白的细菌裂解上清(纯化前)和收集的峰值洗脱液(纯化后)行 SDS-PAGE 电泳(150 V、25 mA、2 h),凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 40 min 后,用含 10% 冰醋酸的 10% 甲醇脱色至本底无色为止。经凝胶成像系统扫描,可得出目的蛋白的相对分子质量及占全部菌体蛋白的百分含量。融合蛋白经 SDS-PAGE 分离后行 Western blot 以进一步证实纯化产物。将凝胶电转印至硝酸纤维素膜上,1 \times TBS/0.2% 戊二醛固定 40 min,加 10 ml 封闭液封闭 1 h 阻断非特异性结合部位,加入 1:1000 稀释的一抗(兔抗组氨酸多克隆抗体)10 μl ,室温振荡孵育过夜。Western 漂洗液漂洗 3 次,加 10 ml 封闭液及按 1:1000 稀释的羊抗兔二抗 10 μl ,水平摇床孵育 1 h 后漂洗 3 次,加 1 ml 显色剂显色。

1.2.11 蛋白浓度测定 采用 Bradford 法^[2]进行蛋白浓度定量(以 BSA 作为标准对照)。

1.2.12 融合蛋白的酶活性检测 用紫外分光光度计测定 230 nm 时 H_2O_2 的消失即可反映过氧化氢酶活性。1 单位酶活性定义为:25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 时,每克融合蛋白中的 CAT 每秒钟分解底物 H_2O_2 (吸光度为 0.5~0.55)的相对量。活性检测按试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 编码人 CAT cDNA 的 PCR 扩增

以 pZeoSV2(+)-CAT 质粒为模板,经 CAT 上下游引物 PCR 后,行 1.0% 普通琼脂糖凝胶电泳,可见扩增出 1600 bp 的 CAT 片段(图 2)。

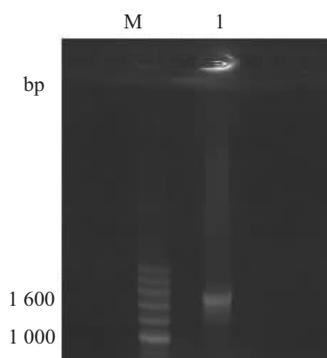


图 2 pZeoSV2(+)-CAT 质粒的 PCR 产物

Fig.2 PCR amplification of the full length coding region of CAT from pZeoSV2(+)-CAT plasmid

Marker: 200 bp DNA ladder; Lane 1: PCR product (1600 bp)

2.2 T 载体克隆

用乙醇沉淀法对 PCR 扩增的 CAT cDNA 进行

纯化,利用 Taq 酶的非模板依赖性末端转移酶活性,在 PCR 产物的 3' 末端加单个脱氧腺苷酸(A),纯化后将其直接克隆入 3' 末端带 T 的中间载体 pGEM-T-Easy vector 上,连接产物转化 DH5 α 。经 Amp 抗性和蓝白斑筛选,见培养板上长出蓝白斑比例约为 1:2,总菌落数约 32 个。挑取白色单菌落接种扩增后提取质粒,经 *Sal*I-*Bgl*II 双酶切鉴定,发现有 1600 bp 的条带(图 3),阳性克隆命名为“pGEM-T-CAT”。

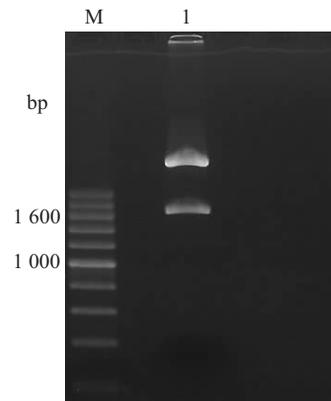


图 3 pGEM-T-CAT 的 *Sal*I-*Bgl*II 双酶切鉴定

Fig.3 Identification of pGEM-T-CAT digested with *Sal*I and *Bgl*II

Marker: 200 bp DNA ladder; Lane 1: Identification of pGEM-T-CAT digested with *Sal*I and *Bgl*II (1600 bp, 3000 bp)

2.3 pET15b-PEP-1 重组质粒的构建

首先将人工合成的编码 PEP-1 的两条单链寡核苷酸复性为双链 DNA,质粒 pET15b 用 *Xho*I-*Nde*I 双酶切后行 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收线性大片段,然后将带 *Xho*I、*Nde*I 黏性末端的 PEP-1 双链克隆至 pET15b 中,连接产物转化 DH5 α ,提取质粒后经 *Xho*I-*Xba*I 双酶切鉴定,见一 167 bp 的片段(图 4),命名为“pET15b-PEP-1”。

2.4 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒的构建

质粒 pET15b-PEP-1 用 *Xho*I-*Bam*H I 双酶切后行 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收约 5766 bp 的大片段,pGEM-T-CAT 用 *Sal*I-*Bgl*II 双酶切后行 1.0% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收约 1600 bp 的片段。利用两组同尾酶(*Sal*I 与 *Xho*I、*Bgl*II 与 *Bam*H I)能酶切产生相同黏性末端的特性,进行 DNA 片段的连接,转化 DH5 α ,提取质粒后经 *Xho*I 单酶切鉴定,可见约 7365 bp 的条带(图 5),命名为“pET15b-PEP-1-CAT”。

2.5 pET15b-PEP-1-CAT 的核苷酸序列测定

将经上述限制性酶切分析、电泳鉴定有目的片段插入的纯化质粒,寄往北京华大中生科技发展有限公

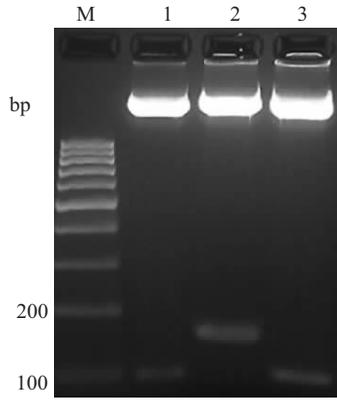


图 4 pET15b-PEP-1 重组质粒用 *Xho*I-*Xba*I 双酶切鉴定

Fig.4 Identification of pET15b-PEP-1 digested with *Xho*I and *Xba*I

Marker:100 bp DNA ladder; Lane 2: pET15b-PEP1/*Xho*I+*Xba*I (167 bp, 5604 bp); Lanes 1, 3: pET15b/*Xho*I+*Xba*I (104 bp, 5604 bp)

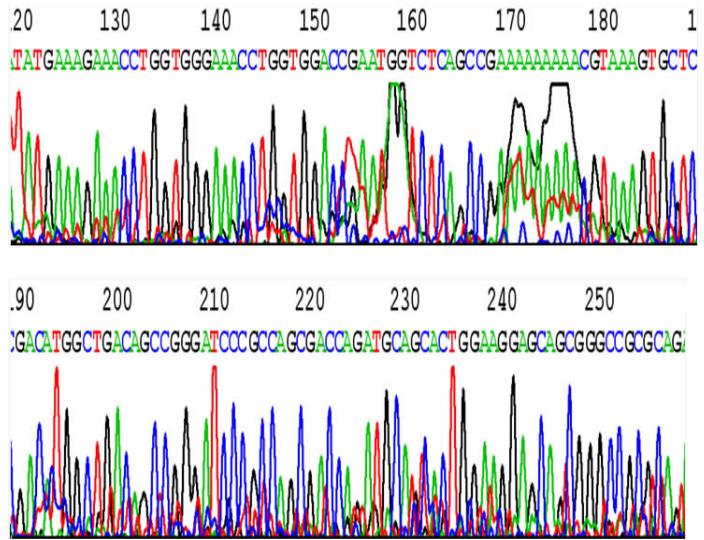


图 6 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒的部分核苷酸序列正向测定结果

Fig.6 Partial sequencing result of the recombinant plasmid of pET15b-PEP-1-CAT (forward primer)

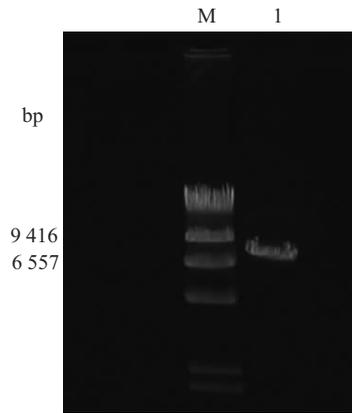


图 5 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒用 *Xho*I 单酶切鉴定

Fig.5 Identification of pET15b-PEP-1-CAT digested with *Xho*I

Marker: λDNA/*Hind* III marker; Lane 1: pET15b-PEP-1-CAT/*Xho*I (7365 bp)

司进行核苷酸序列测定。分析证实:PEP-1 编码区和 CAT cDNA 编码区均成功地克隆入了 pET15b 质粒, 而且其序列分别与设计合成的 PEP-1 序列和 GeneBank 中登录号为“AY028632”的人 CAT cDNA 序列完全一致(图 6)。

2.6 PEP-1-CAT 融合蛋白的表达和纯化

经 IPTG 诱导蛋白表达后,用氨基三乙酸(NTA)共价固定的含 Ni²⁺ 树脂进行金属螯合层析来纯化 PEP-1-CAT 融合蛋白。分别取含有目的蛋白的细菌裂解上清(纯化前)及收集的峰值洗脱液(纯化后)行 SDS-PAGE,相对分子质量 69 000 附近可见目的蛋白的表达条带,且融合蛋白高水平表达成为 *E.coli* 中总蛋白的主要成分,应用 Ni²⁺-NTA- 树脂纯化的蛋白纯

度达 90%左右(图 7A)。用兔抗组氨酸多克隆抗体行 Western blot,显示为单一印迹,无降解条带,说明在工程菌 BL21 中得到了 PEP-1-CAT 的可溶性表达,且目的蛋白在表达过程中无降解(图 7B)。

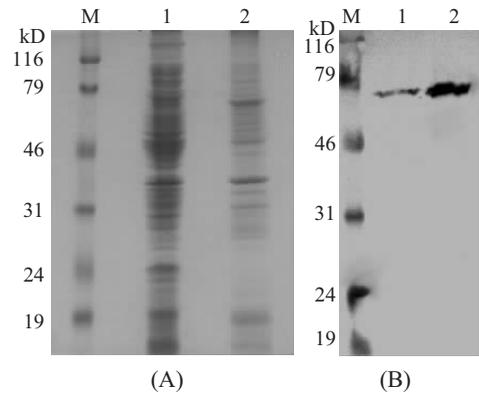


图 7 细菌的蛋白提取物和纯化的融合蛋白行 12% SDS-PAGE 分析(A)和 Western blot 分析(B)

Fig.7 Protein extracts of the cells and the purified fusion protein analyzed by 12% SDS-PAGE (A) and Western blotting (B)

M: Molecular weight standard; Lane 1: Unpurified PEP-1-CAT; Lane 2: Purified PEP-1-CAT

2.7 酶活性检测

活性测定结果表明,纯化的 PEP-1-CAT 蛋白具有特异的 CAT 酶活性,其活性值为 77.15 U/g。

3 讨论

CAT 是机体抗氧化防御系统的重要组成部分,

可通过清除体内的氧自由基而发挥其对抗氧化应激的作用,因此,应用抗氧化酶来防治氧自由基介导的疾病已引起了医学界的广泛关注^[3]。目前认为,基因治疗是实现将外源基因导入细胞内表达治疗性蛋白的一种很有前途的方法,但基因治疗存在一些关键问题尚未解决,包括基因导入效率、基因表达的可控性、有效性、安全性等^[4]。近年来,细胞穿透肽(Cell penetrating peptides, CPPs)的发现为这一难题的解决提供了突破口。CPPs 是一种能携带多种大分子物质高效穿透生物膜的结构。CPPs 作为一种很有前途的运载工具,已经得到了广泛关注,其中研究最多的是 Tat。许多文献报道, Tat-GFP^[5]、Tat-GDH^[6]、Tat-SOD^[7]、Tat-CAT^[8] 融合蛋白均能被有效转入哺乳动物细胞,并穿透动物皮肤。进一步研究发现,转导的 Tat-SOD、Tat-CAT 能增加百草枯(一种可产生超氧阴离子的外源性物质)处理过的哺乳动物细胞的存活力,这就表明这些融合蛋白有对抗氧应激的作用。虽然 Tat 等自然界存在的 CPPs 作为一种运载工具具有很多优点,但同时也存在缺憾,如需要将融合蛋白变性后才能使其进入细胞,融合蛋白进入细胞后需要分子伴侣将其重折叠为有活性的天然构象,因此其活性发挥有赖于重折叠效率。此外,关于其是否有细胞毒性和免疫遗传性等问题尚存在争议。因此,为了提高被转导的蛋白在细胞内的生物学活性,就需要设计一种可将目的蛋白以天然活性形式导入细胞内的新型载体。Morris 小组设计合成了一个 21 个氨基酸的肽段载体 PEP-1,它由三个结构域构成:一个富含色氨酸的疏水区(KETWWETWWTEW);一个连接区(SQP);一个富含赖氨酸的亲水区(KKKRKV)^[9]。此载体具有很多自然界存在的 CPPs 所无法比拟的优势:能携带多种肽段和蛋白质以天然活性形式进入多种细胞系,而不需要任何化学的共价结合或变性步骤;在生理缓冲液中具有高度的稳定性;安全无毒性;不受血清影响等。

本研究通过基因工程手段构建出 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒。常规方法是在目的基因片段的两端引入与载体酶切位点相同的黏性末端来克隆 PCR 扩增片段,从而通过粘性末端连接的方案将目的片段克隆入载体。我们根据 pET15b 有 *Nde* I 和 *Xho* I 的酶切位点,而 PEP-1 的编码序列中不含这两个位点,因此在其正义链的 5' 端加入 *Nde* I、反义链的 5' 端加入 *Xho* I 的位点,从而保证了 PEP-1 的编码序列正向插入到 pET15b 中。但在将 CAT cDNA 插入到 pET15b-PEP-1 时,用同样的策略就遇到了困难,因为 pET15b 有 *Xho* I 和 *Bam*H I 的位点,而 CAT 的基因序列中有 1 个 *Xho* I 和 3 个 *Bam*H I 的位点,

这样就不能保证 CAT cDNA 在需要的位置被 *Xho* I 和 *Bam*H I 切开。常规的方法是采用部分酶切,通过做预试验、改变酶切时间、温度及酶浓度等反应条件而找到不足以把所有的酶切位点都切断的最适反应体系,然后进行大量酶切,但这一方法繁琐、费时。林澄涛等^[10]在疟疾多价重组 DNA 疫苗的构建中曾应用同尾酶技术,在所有组合片段的两侧分别加上一组同尾酶,将不同的抗原表位加以灵活重组,从而构建了不同组合形式的疟疾多价重组 DNA 疫苗。因此我们在重组过程中也借鉴了这一思路。我们设计合成 CAT 的引物,其上游引物 5' 端引入 *Sal* I 位点、下游引物 3' 端引入 *Bgl* II 位点,而 *Sal* I 与 *Xho* I、*Bgl* II 与 *Bam*H I 互为两组同尾酶,利用两组同尾酶切割后能产生相同粘性末端并能通过互补作用彼此连接的特性,将 CAT cDNA 片段成功地插入到 pET15b-PEP-1 上。另外,传统的粘性末端克隆法可能会遇到一定的技术困难,原因之一就是许多限制性内切酶不能正确切割位于 DNA 末端的识别位点,这些酶包括 *Hind* III、*Sal* I、*Xba* I、*Xho* I、*Not* I 等,它们已被证明在酶切位于 DNA 片段末端与次末端的识别效率不高^[11],因此不能保证在连接前 PCR 片段是被完全切开的。丁鹏等^[12]采用高保真的 pfu DNA 聚合酶,然后对 PCR 产物进行纯化,利用 Taq 酶在其 3' 末端加单个不配对“A”的特性,成功地利用 TA 克隆构建了 pET15b-SOD1 重组质粒。我们在重组中也采用了这一方案,实现了表达载体的成功构建,然后将其转化 *E.coli* BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达出 N 端带 6 个 His 标签的融合蛋白,而这种含组氨酸尾的融合蛋白可借助 NTA 共价固定的含 Ni²⁺ 的树脂来纯化,从而得到了纯度较高、具有 CAT 酶活性的融合蛋白。

本研究构建了 pET15b-PEP-1-CAT 原核表达载体,并成功表达和纯化出了可穿透细胞的重组过氧化氢酶蛋白 PEP-1-CAT,为防治与氧化应激损伤有关的疾病(如心肌缺血再灌注等)奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] 陈长征, 黄华, 龚健, 等. 大肠杆菌 His6 融合表达载体及其产物一步纯化[J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28(5): 523-30.
Chen CZ, Huang H, Gong J, et al. The construction of T7 promoter-based His (6)-tagging vectors and the single-step purification of the expression products [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 1996, 28(5): 523-30.
- [2] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-54.
- [3] Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review [J]. Free Radic Biol Med, 1990, 8(2): 201-9.

- [4] Verma IM, Somia N. Gene therapy: promises, problems and prospects [J]. Nature, 1997, 389(6648): 239-42.
- [5] Han K, Jeon MJ, Kim KA, et al. Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of *Drosophila* Fushi-tarazu and engrailed proteins[J]. Mol Cells, 2000, 10(6): 728-32.
- [6] Yoon HY, Lee SH, Cho SW, et al. Tat-mediated delivery of human glutamate dehydrogenase into PC12 cells[J]. Neurochem Int, 2002, 41(1): 37-42.
- [7] Kwon HY, Eum WS, Jang HW, et al. Transduction of Cu, Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells[J]. FEBS Lett, 2000, 485(2-3): 163-7.
- [8] Jin LH, Bahn JH, Eum WS, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(11): 1509-9.
- [9] Morris MC, Depollier J, Merry J, et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(12): 1173-6.
- [10] 林澄涛, 姜燕芳, 阴彬, 等. 同尾酶技术再构建疟疾多价重组 DNA 疫苗中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(6): 974-7.
- Lin CT, Jiang YF, Yin B, et al. Construction of malaria multivalent recombinant DNA vaccine with isocaudarner technique [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 1999, 15(6): 974-7.
- [11] Zimmernann K, Schogl D, Mannhalter JW. Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products [J]. Biotechniques, 1998, 24(4): 582-4.
- [12] 丁鹏, 王家宁, 黄永章, 等. 利用 TA 克隆载体构建 pET15b-SOD1 重组质粒[J]. 邵阳医学院学报, 2005, 24(2): 65-8.

自动酶联荧光免疫分析系统检测冻肉中李斯特氏菌

孙素霞¹, 陈思强², 罗海吉¹ (¹南方医科大学营养与食品卫生学系, 广东 广州 510515; ²佛山出入境检验检疫局, 广东 佛山 528000)

摘要:目的 评价自动酶联荧光免疫分析系统(VIDAS)检测冻肉中李斯特氏菌的灵敏度和特异度。方法 采用 VIDAS 法和常规细菌培养法(GB 4789.30-2003)平行检测 148 份进境冻肉样品中李斯特氏菌, 以常规细菌培养法作为参照, 对 VIDAS 法进行评价。结果 148 份样品中 VIDAS 法检测李斯特氏菌阳性 28 份; 常规细菌培养法检测阳性 16 份, 这 16 份皆是 VIDAS 法检测阳性的样品。VIDAS 法用于冻肉李斯特氏菌检测的灵敏度为 100%, 特异度为 90.9%。结论 VIDAS 法检测冻肉中李斯特氏菌具有很高的灵敏度和较高的特异度, 用于进境冻肉的检测, 既可有效把关, 又大大缩短检验时间, 加快通关速度。

关键词:李斯特氏菌; 自动酶联荧光免疫分析系统; 冻肉; 细菌检测

中图分类号:R155.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4254(2006)09-1325-02

李斯特氏菌(*Listeria*)是近年来报道较多的食源性病原菌之一, 可引起人兽共患病, 其致病性强, 病死率高达 30%~70%, 轻者为一般胃肠炎症状, 重者可表现为败血症、脑膜炎、神经症状等, 尤其是老人、小孩和孕妇更容易发病^[1]。有报道, 美国最多的一年约有 1850 人死于李斯特氏菌引发的严重疾病, 其中 400 多人是孕妇和新生儿^[2]。法国、日本、瑞士、英国等都相继发生李斯特氏菌污染事件, 但在我国仅有少数散发李斯特氏菌报道, 原因可能有两个: 一是饮食习惯的差异, 发达国家居民膳食以动物类食物为主, 而我国居民膳食以植物性食物为主, 李斯特氏菌主要污染动物类食物, 尤其是冻肉、生乳制品; 二是我国此类疾病并不少, 是由于我们对李斯特氏菌及其引起的疾病认识不足, 将其中毒事件归为“不明原因的食物中

毒”。为防止李斯特氏菌在我国造成食品安全事件, 其检测方法的研究已成为食品安全方面研究人员的重要任务之一, 也是口岸食品卫生工作者的重要任务之一。对李斯特氏菌的检测, 一般采用我国国家标准(GB 4789.30-2003)规定的方法, 即常规的细菌培养法, 检测时间需 1~2 周。为缩短检测时间, 加快食品口岸通关速度, 本研究采用一种快速、简便、敏感的方法——自动酶联荧光免疫分析系统(VIDAS)结合常规的细菌培养法对 148 份样品进行检测, 其结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 2003 年 12 月~2005 年 12 月从美国、加拿大、丹麦、巴西等国进口的猪、鸡、牛等冻肉产品 148 份。

1.1.2 培养基 李斯特氏菌的增菌液(LB1, LB2)、李

收稿日期: 2006-03-20

作者简介: 孙素霞(1976-), 女, 硕士, 助教, 电话: 020-62789127, E-mail: sunsuxia@fimmu.com