

研究简报 ·

载脂蛋白 E3 的克隆及原核表达

李会成, 李玉新*, 金萍, 张聪, 乌垠, 陆军, 杨红, 麻彤晖, 黄百渠

(东北师范大学细胞与遗传学研究所, 长春 130024)

The Cloning of Apolipoprotein E3 Gene and Its Expression in *E. coli*

LI Hui-cheng, LI Yu-xin*, JIN Ping, ZHANG Cong, WU Yin, LU Jun, YANG Hong, MA Tong-hui, HUANG Bai-qu

(Institute of Cytology and Genetics, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract The *apoE* cDNA was amplified from four-months old fetus liver tissue mRNA by RT-PCR. It was inserted into the TOPO^R vector, whose sequence is the same as that reported. The right *apoE* cDNA was inserted into pQE30 vector to construct pQE30-*apoE* recombinant expressed plasmid, which was expressed as a histidine-tag fusion protein in *E. coli* strain BL21 (DE3) with higher level. The purified protein was gained by Ni-NTA column. SDS-PAGE showed that 34 kD protein was expressed. Western blot analysis showed a positive band at 34 kD.

Key words human *apoE3* cDNA, molecular cloning, gene expression

中图分类号 Q78, Q51

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 由 299 个氨基酸组成, 分子量 34 kD, 是维持人体正常脂质代谢的必需蛋白质。它是乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 和高密度脂蛋白 (HDL) 的组分, 是极低密度脂蛋白受体的重要配体, 是脂质进入细胞不可缺少的中介。apoE 有 3 种同分异构体: apoE2、apoE3、apoE4, 分别具有不同的生理作用。apoE4 与血浆高胆固醇、心血管疾病和老年痴呆等疾病关联^[1-3]。apoE2 与 II 型高脂血症有关, 并对老年痴呆有防治作用^[4,5]。apoE3 是大多数健康人所具有的载脂蛋白。

apoE 可以从血浆中提取, 也可以利用基因重组技术表达制备^[6,7]。血浆提取蛋白很困难, 因为人群中 E2 和 E4 基因频率只有 0.073 和 0.143, 纯合基因供血者极少。哺乳动物细胞表达的 apoE 蛋白量少, 而且存在不同程度的糖基化修饰, 其异质性不利于蛋白结构及功能研究。apoE 蛋白糖基化与否不影响其生物活性的发挥。因此, 我们采用 pQE30 表达载体系统, 表达带有 6 个组氨酸尾的融合蛋白, 将从分子水平研究其变异体及其在各相关疾病中的作用, 探讨 apoE3 及其变异体对动脉粥样硬化、老年痴呆等疾病的防治作用。

1 材料与方法

1.1 材料

TOPO^R 载体、RT-PCR 试剂盒购自 INVITROGEN 公司; pQE30 质粒载体、DH5、BL21 本室保存; 实验中所用酶为 PROMEGA 产品; RNA 提取试剂盒购自鼎国生物公司; mRNA 分离试剂盒、核酸片段回收纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; apoE 单克隆抗体购自晶美生物工程公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 肝组织总 RNA 提取 取 4 月龄流产胎儿肝组织, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 经紫外分光光度计定量及电泳分析 RNA 质量。将提取的 RNA 用 Oligotex mRNA Mini Kit 分离 mRNA。

1.2.2 引物设计及 RT-PCR 根据文献^[8]报道的人 *apoE* cDNA 序列, 设计并合成下述引物:

收稿日期: 2002-06-05, 接受日期: 2002-09-19

* 联系人 Tel: (0431) 5269502, E-mail: Lyx.cc@yahoo.com.cn

李会成, 男, 1967 年 3 月生, 博士研究生

Received: June 5, 2002; Accepted: September 19, 2002

* Corresponding author Tel: (0431) 5269502

E-mail: Lyx.cc@yahoo.com.cn

5 端引物 (P1) : 5 -CGGGATCCAAGATGAAGGTG-GACCAAGCGGTGGA GA-3

3 端引物 (P2) : 5 -CGAAGCTTTTAGTGATT-GTCGCTGGGCACA-3

按试剂盒说明进行 RT-PCR.

1.2.3 人 *apoE* cDNA 克隆 PCR 产物经凝胶回收 cDNA 片段,与 TOPO^R载体室温连接 5 min 后转化,酶切鉴定有无插入 cDNA 片段^[9].

1.2.4 DNA 序列测定分析 ABI PRISMTM Model377 核酸序列自动分析仪进行序列分析(大连宝生物公司).

1.2.5 重组人 pQE30-*apoE* 质粒载体的构建 双酶切阳性克隆质粒和 pQE30 载体,回收 *apoE* cDNA 及 pQE30 载体片段,用 T4 DNA 连接酶连接,构建 pQE30-*apoE* 表达质粒,酶切确认插入片段分子量.

1.2.6 重组 *apoE* 蛋白表达及 SDS-PAGE 检测分析 以重组质粒转化宿主菌,经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析.

1.2.7 重组 *apoE* 蛋白的分离纯化 表达菌体超声破碎后,过 Ni-NTA 亲和柱,用 20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,150 mmol/L 咪唑 pH 8.0 洗脱,进行 SDS-PAGE 分析.

1.2.8 Western 印迹分析 将纯化的 *apoE* 蛋白样品用鼠抗人血源性 *apoE* 单克隆抗体 IgG 作为一抗,以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行杂交,以 DAB 为底物进行显色^[10].

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增人 *apoE3* cDNA

RT-PCR 扩增产物为 900 bp DNA 带 (Fig. 1).

2.2 重组 TOPO^R-*apoE* 质粒鉴定

对 TOPO^R-*apoE* 进行酶切分析 (Fig. 1) 和 DNA 测序分析,测序显示 *apoE* 基因序列与文献[8]一致.

2.3 *apoE* 表达载体的构建及鉴定

TOPO^R-*apoE* 用 *Bam*H 和 *Hind* 酶切,电泳分离 900 bp 左右大小的片段,连入相应酶切的 pQE30 中,经双酶切鉴定,获得重组表达载体 pQE30-*apoE* (Fig. 1).

2.4 *apoE* 表达产物的分析

与未诱导表达的重组菌相比,诱导表达的重组菌于 34 kD 处有一明显的表达蛋白产物.对表达的细菌用超声波进行破碎处理,高速离心发现在其破胞上清中于 34 kD 处有一明显的表达蛋白带,而在破胞沉淀中仅有微量的重组蛋白 (Fig. 2),由此可见

重组 *apoE* 蛋白在细菌中以可溶蛋白形式表达.

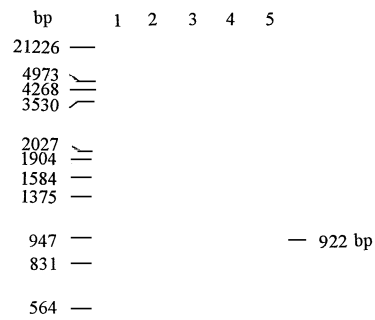


Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of RT-PCR product and recombinant plasmids digested with *Bam*H and *Hind*

1:Marker; 2:*apoE* PCR product; 3:TOPO-*apoE*/*Bam*H and *Hind*; 4:pQE30-*apoE*/*Bam*H and *Hind*; 5:pQE30/*Bam*H and *Hind*

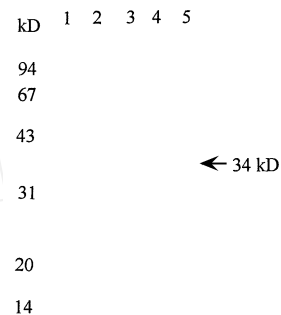


Fig. 2 SDS-PAGE analysis for the expression of *apoE* in *E. coli*

1:Molecular weight marker; 2:Uninduced bacterial cells(- IPTG); 3:Expressed bacterial cells(+ IPTG); 4:Supernatant of the cell lysate; 5:Precipitate of the cell lysate

2.5 *apoE* 蛋白的分离纯化

表达菌体破胞上清液经 Ni-NTA 亲和柱分离可得到电泳纯的蛋白制品 (Fig. 3).

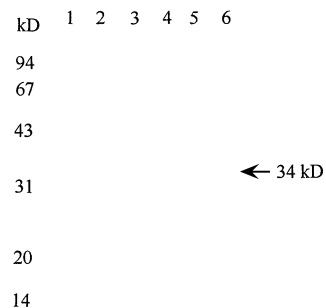


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified *apoE* protein and Western blot assay

1:Molecular weight marker; 2:Uninduced bacterial cell total proteins; 3:Expressed bacterial cell total proteins; 4,5:Purified *apoE* protein with Ni-NTA column; 6:Western blot hybridization band

2.6 表达产物的 Western 印迹

表达产物 Western 印迹显示,约在 34 kD 处有一明显的杂交带出现(Fig. 3)。

3 讨论

apoE cDNA 序列中 GC 含量高达 73%,用标准 RT-PCR 条件很难扩增出所需片段。因此在逆转录反应中适当延长反应时间,PCR 反应中添加 1%~10%的 DMSO,有助于 RNA 二级结构的打开,我们利用优化的 RT-PCR 条件成功地克隆出了 900 bp cDNA 片段,序列分析与文献报道的一致。

pQE30-*apoE* 可以表达带有 his-tag 的融合蛋白,可用金属螯合吸附剂特异性地分离纯化,为目的蛋白的快速特异性纯化提供了方便。pQE30 载体表达的 apoE 蛋白在大肠杆菌中以可溶性的蛋白形式表达,免去了形成包涵体需要变性复性处理等繁琐的工序,因而对目的蛋白的分离纯化极为方便。

apoE 的功能近年来在国外有很多的研究,除了与其载脂功能相关的心血管疾病和老年痴呆病外^[1~5],近来还发现其与细胞内信号传导、稳定微管结构、糖代谢、免疫调节、氧化应激等功能相关^[11]。我们克隆表达的 apoE 蛋白,为研究其结构与功能及其在人类相关疾病中的作用机制创造了条件。

参考文献 (References)

- 1 Mensenkamp A R, Jong M C, Van Coor H, Van Luyn M J A, Blocks V, Havinga R, Voshol P J, Hofker M H, Van Dijk K W, Havekes L M, Kuipers F. Apolipoprotein E participates in the regulation of very density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 35711 ~ 35718
- 2 Ji Zhong-sheng, Dichek H L, Miranda R D, Mahley R W. Heparan sul-

- fate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins including high density lipoproteins. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 31285 ~ 31292
- 3 Linton M F, Hasty A H, Vladimir R. Hepatic apoE expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 1726 ~ 1936
- 4 Poirier J, Delisle M, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahini D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix B M, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 12260 ~ 12264
- 5 Bellosta S, Nathan B P, Orth M, Dong Li-ming, Mahley R W, Pitas R E. Stable expression and secretion of apolipoprotein E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 27063 ~ 27071
- 6 Gretch D G, Sturley S L, Friesen P D, Beckage N E, Attie A D. Baculovirus-mediated expression of human apolipoprotein E in *Manduca sexta* larvae generates particles that bind to the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 8530 ~ 8533
- 7 Morrow J A, Arnold K S, Weisgraber K H. Functional Characterization of apolipoprotein E isoforms overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1999, **16**: 224 ~ 230
- 8 Rall S C Jr, Newhouse Y M, Clarke H R. Isolation and characterization of a variant allele of the gene for human apolipoprotein E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **130**(3): 1261 ~ 1266
- 9 谢振华,王爱民,刘长振,马春. PC12 细胞 APE/ref-1 cDNA 的克隆和表达. 中国生物化学与分子生物学报(Xie Zhen-hua, Wang Ai-min, Liu Chang-zhen, Ma Chun. Cloning and expression of APE/ref-1 cDNA gene from PC12 cells in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17**(5): 585 ~ 589
- 10 卢桎栋主编. 现代分子生物学实验技术,第 2 版. 北京:高等教育出版社(Lu Shengdong ed. *Experimental Techniques of Modern Molecular Biology*, 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1993: 403 ~ 406
- 11 Saunders A M. Apolipoprotein E and Alzheimer disease, an update on genetic and functional analyses. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000, **59**(9): 751 ~ 758

中国生物化学与分子生物学会 2003 年继续教育、技术培训计划表

培训班名称	时间	规模(人)	地点	联系人	电话
1 第八届全国高级生物化学与分子生物学训练班(原为全国高级生化训练班)	第二季度	100	上海	刘军华	(021) 55620284
2 生物技术培训班(第十届)	7月下旬	80	北京	许雷	(010) 68919695
3 分子生物学技术培训班	7~8月	40	北京	魏群 孙秀英	(010) 62207365 (010) 62208197