

Cloning and Prokaryotic Expression for Biologically Active Fragments of MAP30 Gene in *Escherichia coli*

苦瓜 MAP30 基因功能性片段的克隆和表达

庄东红^{1,2}/陈秋佳¹/欧阳永长¹

(1. 汕头大学生物系, 广东 汕头 515063;

2. 韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041)

ZHUANG Dong-hong^{1,2}, CHEN Qiu-jia¹, OUYANG Yong-chang¹
(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, Guangdong, China; 2. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, Guangdong, China)

【摘要】背景与目的: MAP30 是一种具有抗肿瘤、抗 HIV 和抗病毒等功能的蛋白。通过克隆和表达该蛋白的核心片段,用于进一步研究基因功能和结构域之间的关系。材料与方法:设计了两对特异性的引物,通过 PCR 技术从苦瓜总 DNA 中分别扩增出两段含有成熟 MAP30 蛋白基因的功能性片段 T8-S194 和 T8-N263,然后将目标基因克隆到原核表达载体 pET-28a 上,构建成带有 C 端 6His-tag 的融合表达载体,经测序鉴定后用 CaCl₂ 介导的化学转化法转化到 *E. coli* RosettaTM(DE3) pLysS 中。利用 PCR 筛选出阳性克隆,经 IPTG 诱导工程菌表达出重组蛋白。通过 Western blot 对重组蛋白进行分析。结果:含 T8-S194 和 T8-N263 基因片段的两个表达载体构建成功,它们的表达重组蛋白能与兔抗 His-tag 多克隆抗体发生特异性反应。结论:构建的两个含目的基因的表达载体均能在 *E. coli* RosettaTM(DE3) pLysS 中表达出预期的重组蛋白,为进一步研究这两个重组蛋白打下了基础。

【关键词】 苦瓜; 克隆; 原核表达; MAP30; 活性片段

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)04-0285-05

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: MAP30 (Momordica anti-HIV protein of 30 kDa) is a 30 kDa, a single-stranded ribosome inactivating protein purified from the fruits and seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). In order to fully understand the relationship between gene function and domain of MAP30, the active gene fragment of this protein must be cloned and expressed precedingly. MATERIALS AND METHODS: Two PCR primers, one for amplifying coding gene for T8-N263 amino acids of mature MAP30 (large fragment), the other for amplifying coding gene for T8-S194 amino acids of mature MAP30 (small fragment) were designed firstly. The objective genes were amplified by PCR from the DNA of bitter melon, and then cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a to construct the expression vectors, containing 6 His-tag in C-terminal. After sequencing analysis, the vectors were transformed into *E. coli* RosettaTM(DE3) pLysS by calcium chloride transformation method to obtain the recombinants respectively. The recombinants were induced by IPTG to express the recombinant proteins, which were analyzed by Western blot. RESULTS: Western blot analysis indicated that the recombinant proteins demonstrated antigenicity to rabbit anti-His-tag polyclona antibody. CONCLUSION: The result demonstrated that both of the two constructed expression vectors could express the expected recombinant proteins in *E. coli* RosettaTM(DE3) pLysS.

【KEY WORDS】 bitter melon; cloning; prokaryotic expression; MAP30; active fragment

MAP30 是 1990 年 Lee-Huang 等^[1]首次从苦瓜果实和种子中分离得到的一种分子量为 30 kD 的单链核糖

体失活蛋白,成熟的 MAP30 由 263 个氨基酸组成。MAP30 具有抗病毒^[1]、抗肿瘤^[2]、抗微生物等多种生物

收稿日期: 2007-01-15; 修订日期: 2007-05-10

基金项目: 广东省高校自然科学基金项目(Z 02036)

作者简介: 庄东红(1955-),女,广东人,博士,教授,研究方向:植物遗传学和生物技术。

学活性^[3],尤其对 HIV 有显著的抑制作用^[1],并且重组蛋白具有与天然蛋白相同的功能和活性^[4],且对人正常细胞,如 T 细胞、二倍体细胞和精细胞等均无细胞毒性^[5]。1999 年 Philip Lin Huang 等^[6]对 MAP30 的蛋白酶水解片段的生物学活性进行的研究表明,MAP30 发挥抗病毒、抗肿瘤活性的核心区域位于 13~195 氨基酸的范围内,MAP30 成熟蛋白在缺少 N 端和 C 端部分序列的情况下仍然具有生物学活性。

我们为研究重组表达的核心片段以及带有 C 端片段(即 194~263 之间的氨基酸)的核心区域蛋白与重组表达的不带有 C 端片段的核心区域蛋白在生物活性上的差异,设计了 2 对特异性的引物。通过 PCR 技术,从苦瓜总 DNA 中扩增出目标基因,对其在大肠杆菌中的表达进行研究,这对于 MAP30 的改造和药用具有重要的理论和应用开发意义。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

表达载体 pET-28a(+), *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS 均由本实验室保存。

1.2 生化试剂

DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒, DNA Marker、IPTG、Protein Marker 购自上海生工生物工程技术有限公司,其他试剂均为分析纯。一抗、二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 引物设计与合成

从 NCBI 的数据库获得 MAP30 序列^[4],设计了 2 对引物(引物 A 和 B)。引物 A 扩增的是编码 MAP30 成熟蛋白第 8~263 个氨基酸的基因,片段大小为 788 bp(下称大片段);引物 B 扩增的是编码 MAP30 成熟蛋白第 8~198 个氨基酸的基因,片段大小为 582 bp(下称小片段)。大片段和小片段的上游引物相同。

引物 A:上游引物 5'-CTC ACC ATG GCG ACT GCC ACT GCA AAA AC-3',引入 *Nco* I 限制性酶切位点(划线部分)。下游引物 5'-AAA CTC GAG ATT CAC AAC AGA TTC CCC AA-3',引入 *Xho* I 限制性酶切位点(划线部分)。

引物 B:上游引物 5'-CTC ACC ATG GCG ACT GCC ACT GCA AAA AC-3',引入 *Nco* I 限制性酶切位点(划线部分)。下游引物 5'-TAG CTC GAG GGA GAG AGC AGA CCA TTG ATT T-3',引入 *Xho* I 限制性酶切位点(划线部分)。

引物均由上海生工生物工程技术有限公司合

成。

1.4 苦瓜总 DNA 的提取及 PCR 扩增

将苦瓜种子播种,待长出真叶时,取幼嫩叶片,用 CTAB 法^[7]微量提取苦瓜总 DNA。然后以此做为 DNA 模板,应用高保真 Pfu DNA 聚合酶,分别用引物 A 和引物 B 进行 PCR 扩增。其反应体系:10 \times Buffer(含 Mg²⁺)2 μ l; dNTP(10 mmol/L) 0.4 μ l;上下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μ l;Taq 酶(5 U/ μ l) 0.3 μ l;模板 DNA 1 μ l;用无菌双蒸水补足至 20 μ l。PCR 反应条件为:94.5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s 共 35 个循环。反应结束后,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定目标片段大小,用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

1.5 表达载体的构建

对 PCR 纯化产物和表达载体 pET-28a 进行 *Nco* I/ *Xho* I 双酶切,然后用 DNA 回收试剂盒回收双酶切产物。再用 T4 DNA 连接酶将双酶切后的大、小片段与表达载体 pET-28a 进行酶连过夜(16 $^{\circ}$ C)。酶连产物用 CaCl₂ 法转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,在 LB 平板上经卡那霉素(50 μ g/ml)初步筛选。

1.6 转化子的鉴定及测序

采用质粒酶切法对经卡那霉素初步筛选得到的重组子进行鉴定。筛选得到的阳性克隆送上海博亚生物技术有限公司测序鉴定。

1.7 工程菌的构建与筛选

对测序鉴定后确证为阳性克隆的转化子进行活化,收集菌体用质粒提取试剂盒提取出 质粒。质粒用 CaCl₂ 法转化感受态细胞 *E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS,在 LB 平板上经氯霉素(34 μ g/ml)和卡那霉素(50 μ g/ml)初步筛选,再用菌液 PCR 筛选出阳性克隆,即为工程菌。

1.8 重组蛋白的可溶性分析

取 -70 $^{\circ}$ C 保存的工程菌 20 μ l 于 1 ml LB 液体培养基(含卡那、氯霉素)中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日,将菌液以 1:100 接种于 LB 液体培养基(含卡那、氯霉素)中,37 $^{\circ}$ C 继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。然后加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,分别于 28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 下培养 22 h。收集的菌体经超声波破碎后高速离心,取出上清,沉淀则重悬于与破碎前等体积的 TE 缓冲液中,分别取 100 μ l 上清和 100 μ l 沉淀悬液,加入等体积 2 \times 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,离心后进行 SDA-PAGE 电泳分析。SDS 电泳的配置参照分子克隆^[8],浓缩胶 4%,分离胶 15%。

1.9 重组蛋白的 Western blot 分析

参照分子克隆^[8]的方法,取诱导后的菌体进行 SDS-PAGE,然后将蛋白从凝胶电转移至 NC 膜上,用 1%

BSA 封闭 3 h, 再以兔抗 His-tag 多克隆抗体为一抗, 驴抗兔 IgG-HRP 为二抗, DAB 显色, 对重组蛋白进行蛋白印迹检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增苦瓜总 DNA

以苦瓜总 DNA 为模板, 分别用引物 A 和引物 B 进行 PCR 扩增, PCR 扩增结果见图 1。

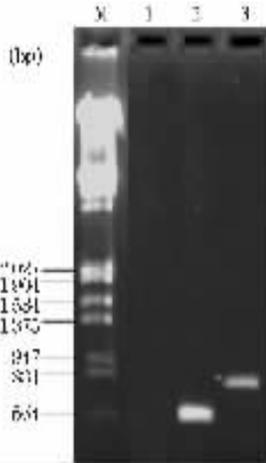


图 1 苦瓜总 DNA 的 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification results of bitter melon genomic DNA. M: Lambda DNA/ EcoR I + Hind III marker; 1: Negative control; 2: Primer B PCR product; 3: Primer A product.

图 1 可见, 引物 A 可扩增到一条约 788 bp 的条带, 引物 B 可扩增到一条约 580 bp 的条带, 均与实验拟扩增条带的大小一致。

2.2 表达载体的构建及转化子的鉴定

表达载体的构建过程如图 2。大小片段重组子的酶切质粒结果见图 3。从图 3 可以看出, 含有大片的表达载体 (泳道 1 和 2) 经过 Nco I 和 Xho I 双酶切得到 5 kb 左右和 788 bp 左右的片段, 初步证明大片段表达载体已经构建成功。含有小片段的表达载体 (泳道 3 和 4) 的双酶切反应产物电泳可得到 5 kb 左右和 580 bp 左右的片段, 初步证明小片段表达载体已构建成功, 后经测序验证 (上海博亚生物技术有限公司测序)。

2.3 测序结果

测序结果表明, 目的基因已经成功克隆入表达载体中, 并且与报道的 MAP30 基因序列无碱基突变。根据测序结果翻译的蛋白及预计分子量大小如下:

大片段: MATATAKTYTKFL...SVVNLEHHHHHH, 30 kD;

小片段: MATATAKTYTKFL...SLENQWSALSLEHHHHHH, 22.5 kD。

从翻译出的蛋白序列可以看出目标基因的 3' 端已经与编码 6 个 His 的基因融合在一起, 表明已经成功构

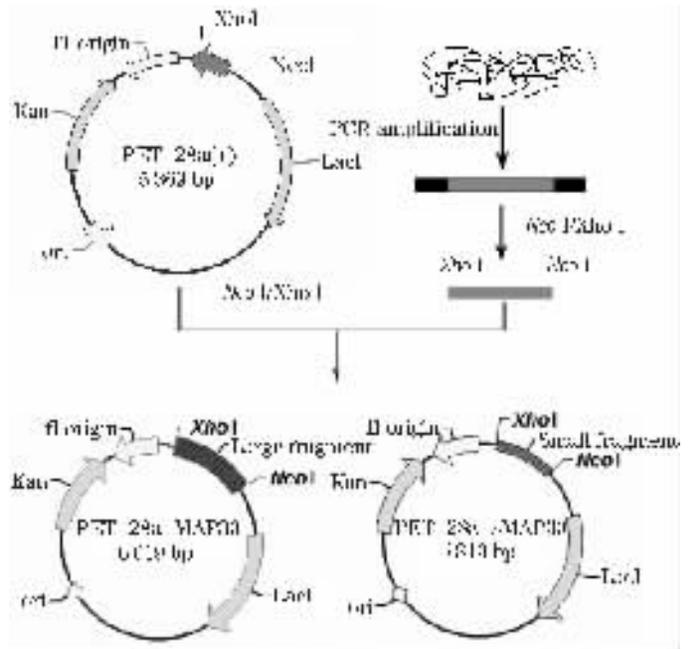


图 2 表达载体的构建

Figure 2 Construction of expression vectors

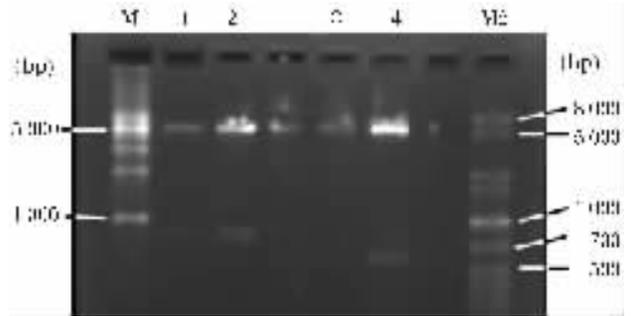


图 3 表达载体 pET-28a-MAP30 大小片段的双酶切鉴定

Figure 3 Identification of pET-28a-MAP30 by enzyme digestion. M1: 1kb DNA ladder; 1-2: Large fragment expression vectors; 3-4: Short fragment expression vectors; M2: 1kb plus DNA ladder.

建出带有 C 端 6His-tag 的融合表达载体。

2.4 重组蛋白的可溶性分析

结果如图 4 所示, 两种重组蛋白的表达量少, 且均以可溶和包涵体两种形式表达。大片段在沉淀中的含量较上清中的多, 主要以包涵体形式表达; 小片段重组蛋白表达量少, 在沉淀中和上清中的含量相当, 无明显差别。

降低诱导的温度, 收集经 1mmol/L IPTG, 16 °C 诱导 22 h 的菌体, 经过超声波破碎后离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。结果如图 5 所示, 重组蛋白仍然主要以包涵体形式表达。

2.5 重组蛋白的 Western blot 分析

对重组蛋白进行蛋白印迹检测, 结果如图 6。从图上可以看出, 重组蛋白能与兔抗 His-tag 多克隆抗体发生特异性反应, 在 30 kD 和 20 kD 处各有一条特异条带。



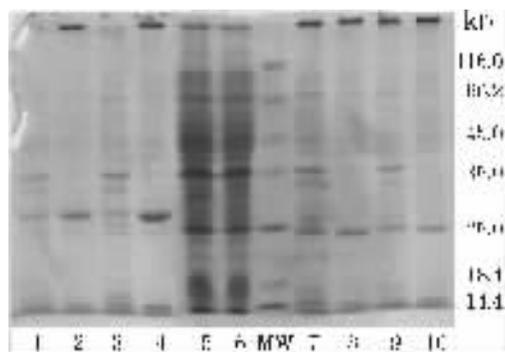


图 4 MAP30 重组蛋白可溶性分析

Figure 4 Solubility analysis of recombinant protein of MAP30

1-2: Supernatant liquor and deposit of large fragment induced by 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 22 h, after ultrasonication, respectively; 3-4: Supernatant liquor and deposit of large fragment induced by 1 mmol/L IPTG at 28 °C for 22 h, after ultrasonication, respectively; 5-6: Control without induction; MW: Protein molecular weight marker; 7-8: Supernatant liquor and deposit of small fragment induced by 1 mmol/L IPTG at 28 °C for 22 h, after ultrasonication, respectively; 9-10: Supernatant liquor and deposit of small fragment induced by 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 22 h, after ultrasonication, respectively.

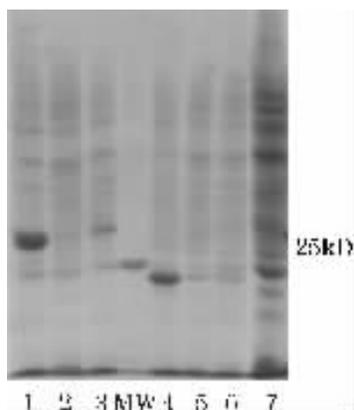


图 5 16°C诱导表达的 MAP30 重组蛋白可溶性分析

Figure 5 Solubility analysis of recombinant protein of MAP30 produced by induced at 16°C. 1-3: Deposit, supernatant liquor and total protein of large fragment induced by 1 mmol/L IPTG at 16 °C for 22 h, after ultrasonication, respectively; MW: Protein molecular weight marker; 4-6: Deposit, supernatant liquor and total protein of small fragment induced by 1 mmol/L IPTG at 16 °C for 22 h, after ultrasonication, respectively; 7: Control without induction.

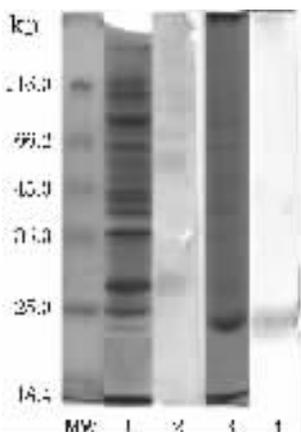


图 6 重组蛋白 Western blot 分析

Figure 6 Western blot analysis of recombinant proteins MW: Protein molecular weight marker; 1: SDS-PAGE of large fragment; 2: Western blot of large fragment; 3: SDS-PAGE of small fragment; 4: Western blot of small fragment

3 讨论

MAP30 蛋白具有抗 HIV 病毒,抗肿瘤等多种生物学活性,与其结构的独特性有很大的关系^[9]。实验证明 MAP30 发挥抗病毒抗肿瘤活性的核心区域位于 T13-K195 氨基酸的范围内^[6]。利用基因工程的方法,若能成功地克隆出编码这一功能区域的基因,并在合适的体系中表达出具有生物活性的重组蛋白,将会对开发新型抗病毒抗肿瘤基因工程药物奠定良好的基础。因为功能片段与成熟蛋白相比,其分子量小,免疫原性相对较低,具有很好的开发前景。所以我们将编码核心区域蛋白的相关基因克隆出来,并构建成表达载体。由于成熟 MAP30 蛋白的第 13 位氨基酸 T13 的二级结构在 A11-A23 的 α 螺旋内,而 S195 位于近 C 末端的 α 螺旋内。因此在构建表达载体的过程中,为了尽量保持这两个二级结构,使重组蛋白处于天然状态,我们选择去除载体自身前面的融合蛋白,将克隆编码的基因片段直接位于表达载体的 rbs 位点下。天然蛋白 T8-S194 的 C 末端是一个 α 螺旋^[9],而 6His 也较易形成 α 螺旋,因此推测在 C 末端接上这个 His-tag 对重组蛋白结构不会产生太大影响,并且携带有 His-tag 的重组蛋白便于表达的检测和纯化。为了比较带有 C 端片段的核蛋白与不带有 C 端片段核蛋白在生物活性上的差异,还克隆了编码 T8-N263 氨基酸的基因,并构建成表达载体。测序结果表明 MAP30 基因中的两个基因片段已经成功克隆进表达载体中,而且与载体中的读码框吻合。

在 MAP30 基因片段的异源表达的过程中,两个基因片段都能诱导表达出特异蛋白,经 Western blot 分析,证实此重组蛋白能与兔抗 His-tag 多克隆抗体发生特异性反应,说明工程菌经 IPTG 诱导表达出了带有 6His-tag 的重组蛋白,这为后续的研究提供了保证。

本实验中我们对重组蛋白的可溶性表达进行的研究发现,即使在低温下(16 °C)诱导,重组蛋白仍然以包涵体形式存在,可溶性蛋白的含量很少。所以后续的研究应摸索出包涵体溶解与重折叠的最佳方案以减少重组蛋白活性的丧失。

MAP30 基因功能性片段的克隆和在原核细胞中的表达尚未见报道,我们成功克隆并构建的两个含目的基因的表达载体均能在 *E. coli* Rosetta™(DE3) pLys 中表达出预期的重组蛋白,为进一步研究这两个重组蛋白打下了基础。

参考文献:

- [1] Lee-Huang S, Huang PL, Nara PL, et al. MAP30: a new inhibitor of HIV infection and replication [J]. *FEBS Lett*,

1990,272(1-2):12-18.

- [2] Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, *et al*. Inhibition of MDA-MB-231 human breast tumor xenografts and HER3 expression by anti-tumor agents GAP31 and MAP201 [J]. *Anticancer Res*, 2000,20(2A):653-659.
- [3] Arazi T, Lee Huang P, Huang PL, *et al*. Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002,292(2):441-448.
- [4] Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, *et al*. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon [J]. *Gene*, 1995,161:151-156.
- [5] Schreiber CA, Wan L, Sun Y, *et al*. The antiviral agents, MAP30 and GAP31, are not toxic to human spermatozoa and maybe useful in preventing the sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1[J]. *Fertil Steril*, 1999,72(4):686-690.
- [6] Huang PL, Sun Y, Chen HC, *et al*. Proteolytic Fragments of Anti-HIV and Anti-tumor Proteins MAP30 and GAP31 Are Biologically Active[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999,262(3):615-623.
- [7] Clark M S. *Molecular Biology of Plant: Experiment Handbook* [M]. Beijing: High Education Press, 1998:6-7.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983:888-897.
- [9] Wang YX, Neamati N, Jacob J, *et al*. Solution structure of anti-HIV-1 and anti-tumor protein MAP30: structural insights into its multiple functions[J]. *Cell*, 1999,99(4):433-442.

(上接第 279 页)

3. 可长时间检出染色体异常

用诱发染色体异常的化合物(诱变剂)处理处于增殖期的细胞,可引起细胞分裂周期的延迟。延迟的程度因诱变剂的种类、用量而异。另一方面,MN是在细胞染色体受损伤后,在有丝分裂期不能结合进子代核,而在胞浆中形成的小核。因此,MN必须在细胞受损后的第二个细胞周期才能观察到。所以与染色体诱变试验相比较,MNT能较长时间地反映出化合物的诱变效应。

小鼠一次腹腔注射阿糖胞苷(cytarabine, cytosine arabinoside, Ara-C)25 mg/kg,给药后2h染色体异常检出频率最高,10h后检出率渐降至对照水平。而MN检出率给药后8h开始出现,28h检出率达峰值,至48h回复至对照水平,MN可检出时间持续约30h之长。此结果表明,MNT可较长时间地检出化合物的染色体损伤效应。

4. 可分辨纺锤体毒剂和非整倍体毒剂

MNT不仅可检测诱变剂诱发染色体结构异常的效应,而且可以检出诱变剂对细胞分裂器的损伤和诸如纺锤体毒剂和分裂阻断剂所致的染色体数目的异常。

纺锤体毒剂诱发MN形成的机理仍不十分明确。一般说来,损伤细胞的有丝分裂装置,所形成MN的构成并不是染色体的断片,而可能是一条或数条染色体。它们在细胞分裂时因缺乏纺锤丝牵引未能进入子代细胞核,而丢失在细胞质中形成MN。因此,分裂阻断剂诱发的MN较之损伤染色体断裂诱变剂所致的MN,从理论上讲形态应更大,这种微核可能由一条或数条染色体所组成。目前可以通过测定MN大小(面积或DNA含量)、抗着丝粒抗体染色(CREST染色)、着丝粒DNA探针荧光原位杂交(FISH)、C-带染色等方法而检出非整倍体毒剂。

5. 背景清楚影响因素少

用小鼠骨髓进行MNT,常在显微镜下计数1000~2000个晚幼红细胞(嗜多染红细胞)的MN数目,并计算含MN的晚幼红细胞出现的频率。由于可清晰地判定有无MN出现,并且是在大样本的观察细胞中采集数据,因而试验结果的可信度高。

此外,无论用体内试验抑或是体外试验方法,MNT易于重复进行验证,易于控制试验条件。

6. 不需加入被检化合物以外的化学物质

化合物毒理安全性评价时,仅用被检化合物处理样本所得结果更为可信。染色体异常试验时为了便于观察染色体,使细胞停滞于分裂中期,常辅与细胞分裂阻滞剂秋水仙碱(colchicines, COL)处理,姐妹染色体交换试验时也常采用此类辅助处理,这种处理常不能排除辅用化合物的作用以及辅用化合物与被检化合物相互作用对试验结果的影响。而根据我们目前的认识,COL具有纺锤体毒剂作用。而应用MNT,不需被检化合物以外的物质处理,因而没有这些弊端。

7. 经济、简便、快速

由于MNT除化学诱变剂以外,无需其他处理,染色和观片也仅按一般细胞遗传学方法即可,无需特殊设备,因而是一种非常经济和简便的试验。由于终点明确,所以一般初中以上技工稍加培训即可计数微核。计数一张玻片一般仅需20~30min左右,实乃是一种快速的方法。

8. MNT不能判定染色体异常的种类

判定染色体异常的类型,在评价化合物的致癌作用中具有重要意义。识别染色体异常的类型,能为检出化合物致癌作用提供有价值的线索。而MNT仅能根据MN的大小初步判断其组成是染色体断片还是整条染色体,不能判定染色体异常的具体类型。

(下转第 293 页)

