

# 山羊 *Sox2* 基因克隆、原核表达和 GST 融合蛋白纯化

郑喜邦\*, 杨照海, 刘平, 赵华, 卢晟盛, 卢克焕, 毕方方

(广西大学动物科学与技术学院, 南宁 530005)

**摘要:** 本研究旨在克隆山羊 *Sox2* 基因, 构建 pGEX-*Sox2* 原核表达重组质粒, 从大肠杆菌中获得纯化的 GST-*Sox2* 融合蛋白。应用 RT-PCR 方法从 6 周龄胎山羊生殖嵴扩增 *Sox2* 基因编码全序列, 将其克隆到 pMD18-T 载体, 然后再亚克隆到 pGEX-KG 表达载体。重组质粒 pGEX-*Sox2* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导, 用 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 检测 GST-*Sox2* 融合蛋白表达, 用谷胱甘肽 Sepharose 4B 介质分离纯化该融合蛋白。结果表明, 山羊 *Sox2* 基因编码序列全长为 960 bp; 在优化的表达条件 (1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG, 22 °C 诱导 16 h) 下, 重组质粒 (pGEX-*Sox2*) 在大肠杆菌得到了高效表达; 谷胱甘肽 Sepharose 4B 颗粒纯化蛋白得到预期大小的融合蛋白 (约 60 ku)。结论, 本研究克隆了山羊 *Sox2* 基因, 获得了纯化的 GST-*Sox2* 融合蛋白, 为制备其多克隆抗体奠定了基础, 为进一步研究山羊 iPS 细胞 (Induced pluripotent stem cells) 创造了条件。

**关键词:** *Sox2* 基因; 原核表达; 蛋白纯化; 山羊

中图分类号: S827; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)10-1454-06

## Cloning of *Capra hircus Sox2*, and Its Expression in *Escherichia coli* and Purification of GST-*Sox2* Fusion Protein

ZHENG Xi-bang\*, YANG Zhao-hai, LIU Ping, ZHAO Hua, LU Sheng-sheng,

LU Ke-huan, BI Fang-fang

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** The aim of the present study was to clone *Capra hircus Sox2* gene, and to construct its recombinant prokaryotic expressing plasmid (pGEX-*Sox2*), and finally to obtain the purified GST-*Sox2* fusion protein in *E. coli*. The complete coding sequences (CDS) of *Sox2* was amplified from the genital ridges of a *Capra hircus* fetus at the age of six weeks, and inserted into pMD18-T vector, and then subcloned into vector pGEX-KG. The recombinant plasmid pGEX-*Sox2* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the soluble GST-*Sox2* protein was expressed by induction of IPTG; SDS-PAGE analysis and Western blotting was performed to detect the GST-*Sox2* protein which was isolated and purified by glutathione Sepharose 4B. The results showed that the CDS of *Capra hircus Sox2* was 960 bp, recombinant plasmid pGEX-*Sox2* was expressed efficiently in the *E. coli* BL21 (DE3) under the optimized induction condition (1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG for 16 hours at 22 °C); the right-sized GST-*Sox2* fusion protein (60 ku) was purified with glutathione Sepharose 4B. In summary, *Capra hircus Sox2* gene was cloned, and the purified GST-*Sox2* fusion protein was obtained in the present study, which laid a foundation for preparing anti-*Sox2* polyclonal antibody, and deriving *Capra hircus* iPS cells (induced

收稿日期: 2008-12-22

基金项目: 广西自然科学基金项目 (桂科自 0728019; 桂科自 0991043); 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室开放基金项目 (SB0907); 广西大学科学基金项目 (X081102)

作者简介: 郑喜邦 (1964-), 男, 青海大通人, 副教授, 博士, 主要从事动物干细胞方面的研究

\* 通讯作者: 郑喜邦, E-mail: zhixibang2005@126.com

pluripotent stem cells).

**Key words:** *Sox2* gene; prokaryotic expression; protein purification; *Capra hircus*

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有高度分化潜能,可分化为机体全部类型细胞,在再生医学领域有着很好的应用前景。一些重要的转录因子如 Oct-4、*Sox2* 和 Nanog,对维持 ESCs 的自我更新和多能性有着重要的作用。在体外,*Sox2* 在未分化的胚胎干细胞(ES 细胞)和胚胎癌细胞(EC 细胞)中表达,随着这些细胞的分化其表达下调<sup>[1]</sup>。缺乏 *Sox2* 的胚胎由于不能形成上胚层而在附植时发生死亡<sup>[2]</sup>。敲除 *Sox2* 的 ESCs 分化为滋养层细胞<sup>[3]</sup>。因此,像 Oct-3/Oct-4 一样,*Sox2* 在多能性维持方面也是必需的。有试验证明,敲除 *Sox2* 的小鼠 ES 细胞导入 *Sox2* 和 Oct-3/Oct-4 又恢复了 ESCs 功能,这说明 *Sox2* 的主要功能就是维持 Oct-3/Oct-4 的表达<sup>[3]</sup>。

2006 年日本科学家首次将 *Sox2*、Oct-4、c-Myc 和 Klf4 4 种干细胞相关转录因子共转染小鼠成纤维细胞后诱导产生了多能性干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)<sup>[4]</sup>。此后,用上述类似的方法相继获得了人<sup>[5-8]</sup>、大鼠<sup>[8]</sup>、猕猴<sup>[9]</sup>的 iPS 细胞。到目前为止,尚未见到有关山羊 iPS 细胞的报道。Yuan 等<sup>[1]</sup>首先从胚胎癌细胞的 cDNA 文库中克隆了小鼠 *Sox2* 的全长 cDNA;Collignon 等<sup>[10]</sup>又用人的 SRY 基因作探针筛选 8.5 日龄小鼠的胚胎 cDNA 文库,分离出 *Sox2* 的全长 cDNA。张琦等<sup>[11]</sup>克隆了人 *Sox2* 基因,并对其原核表达进行了研究。然而,山羊 *Sox2* 基因的克隆表达达至今未见报道。

本研究旨在克隆山羊 *Sox2* 编码全序列,构建 pGEX-*Sox2* 原核表达重组质粒,在原核细胞中诱导表达并获得 GST-*Sox2* 融合蛋白,从而为制备山羊 *Sox2* 多克隆抗体奠定基础,也为进一步将山羊成纤维细胞诱导为 iPS 细胞创造条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

TRIzol LS<sup>®</sup> Regent RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司(美国);感受态大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、BL21、质粒 pGEX-KG 为本实验室保存;反转录试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、质粒 pMD18-T、IPTG 及 X-gal 以

及 DNA marker 购自 TaKaRa 生物公司(日本);蛋白预染 marker 购自 Fermentas 公司(立陶宛);质粒小提试剂盒购于金思特(南京);胶回收试剂盒购自 OMEGA(美国);引物合成及 DNA 序列测定均由上海生物工程公司完成;鼠源 GST 标签抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自碧云天公司(海门);化学发光剂购自 Millipore 公司(美国)。

### 1.2 目的片段的克隆与测序

根据 GenBank 中绵羊 *Sox2* 序列(X96997)设计上游引物 5'-CGGGATCCGCCATGTACAA-CATGATGGAGACGG-3' 及下游引物 5'-CCGCTCGAGTTCACATGTGCGAGAGGGGCAGTG-3' (下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点),预计扩增片段长度为 963 bp。引物由上海生物工程公司合成。

取约 6 周龄胎山羊,用于总 RNA 提取。反转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板,进行 PCR 反应,PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。用琼脂糖凝胶电泳分离待回收的 PCR 产物,切胶回收。回收产物与 pMD18-T vector 连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌。挑取阳性菌落,增菌、提取质粒后用 *Bam*H I 及 *Xho* I 进行双酶切,其酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。酶切鉴定正确的质粒送上海生物工程公司测序。

### 1.3 *Sox2* 原核表达载体构建和鉴定

选择测序正确的 pMD18-T-*Sox2* 和 pGEX-KG 载体分别用 *Bam*H I 及 *Xho* I 进行双酶切,酶切产物胶回收并用 T4DNA 连接酶 16 °C 连接过夜,转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,阳性菌落增菌获得的重组质粒进行酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒送上海生物工程公司测序。

### 1.4 重组质粒在大肠杆菌中诱导表达及 Western blotting 免疫印迹

经鉴定阅读框正确的阳性重组质粒转化 BL21 感受态细胞,涂板挑菌,筛选出阳性重组菌。在含氨苄青霉素(终浓度 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 LB 培养基中 37 °C 振荡培养过夜后,取重组菌按 1:100 体积比转入含氨苄青霉素(终浓度 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 LB

培养基中,  $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养过夜。取  $500 \mu\text{L}$  培养物接种于  $5 \text{ mL}$  的 LB 培养液中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡培养至  $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$  时, 菌液中加入终浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IPTG 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  诱导表达, 收集  $1 \text{ mL}$  菌液分装于  $1.5 \text{ mL}$  的离心管中, 以  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $5 \text{ min}$ , 沉淀用  $100 \mu\text{L}$  PBS(pH 7.4) 悬浮, 再如上离心, 重复 3 次, 加入  $200 \mu\text{L}$  NP-40 裂解液, 混匀后置冰上  $10 \text{ min}$ , 再加入  $1/5$  体积  $5 \times$  聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液, 水浴煮沸  $5 \text{ min}$ ,  $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $5 \text{ min}$ , 取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 确定目的蛋白是否表达。

将筛选出的阳性重组菌按  $1:100$  体积比再次接种于 LB 液体培养基中。在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡培养至对数生长期, 加入 IPTG 使其终浓度分别为  $0.25$ 、 $0.5$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 诱导表达  $4 \text{ h}$ , 将表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 确定最佳诱导浓度后, 加样时, 将样品与标准分子量 Marker 在 2 块同样的凝胶上重复点样, 便于共同用来染色检验, 另一块用于转膜。用全湿电转印法将蛋白转到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 用 TBST 缓冲液洗  $10 \text{ min}$ , 然后用 TBST 配制的  $5\%$  脱脂奶粉  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  缓慢摇动封闭  $1 \sim 2 \text{ h}$ , 或  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭过夜, 用 TBST 稀释的 GST 抗体 ( $1:1\,000$ )  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  摇床上缓慢摇动作用  $1 \text{ h}$ ; 然后用 TBST 洗 3 次, 每次  $10 \text{ min}$ 。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG ( $1:1\,000$ ), 室温或  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  轻摇孵育  $1 \sim 2 \text{ h}$ , 取出用 TBST 洗 3 次, 每次  $10 \text{ min}$ 。取化学发光剂 A、B 各  $0.3 \text{ mL}$ , 在保鲜膜上混匀, NC 膜的蛋白面朝下, 覆盖在显色剂上作用  $5 \text{ min}$ 。用镊子夹起 NC 膜, 多余的显色剂用滤纸吸掉。保鲜膜包裹 NC 膜, 固定在暗盒内 (蛋白面朝上), 压 X 光胶片, 曝光, 显影, 定影。用预染蛋白 Marker 判定目的蛋白的相对分子量。

### 1.5 重组蛋白纯化

将诱导成功的 GST-Sox2 阳性重组菌液按  $1:100$  体积比转接于  $5 \text{ mL}$  LB 液体培养基中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡培养过夜。将活化的菌液按  $2\%$  的接种量转接  $200 \text{ mL}$  含氨苄青霉素 (终浓度  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 LB 培养基中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养至  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  值达到  $0.4 \sim 0.6$  时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $18 \sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$  继续诱导培养过夜。将诱导的菌液离心收集于  $50 \text{ mL}$  离心管中, 弃上清, 加入含适量溶菌酶 (lysozyme) 的裂解液, 吹匀后转到  $50 \text{ mL}$  离心管中。超声破碎菌体, 加入适量已平衡好的谷胱甘肽-

Sepharose 4B 小颗粒,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  结合, 离心收集结合有目的蛋白的谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒。用不含溶菌酶的裂解液清洗非特异结合在谷胱甘肽-Sepharose 4B 小颗粒上的杂蛋白。还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱 GST-Sox2 融合蛋白。最后用 SDS-PAGE 分析 GST-Sox2 融合蛋白纯度。纯化后蛋白冷冻干燥保存于冰箱待用。

## 2 结果

### 2.1 山羊 Sox2 目的片段克隆与测序

从胎山羊生殖嵴提取总 RNA, 反转录成 cDNA 第一链, 以此为模板, 用克隆引物扩增得到山羊 Sox2 基因片段, PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。挑取的阳性菌落, 在增菌、提取质粒后以 BamH I 和 Xho I 进行双酶切, 酶切鉴定正确的质粒测序 (测序结果见图 1) 并与牛 (*Bostaurus*)、犬 (*Canis familiaris*)、马 (*Equus caballus*)、绵羊 (*O. aries*) 等物种进行序列同源比较, 结果见图 2。经比较分析该序列与绵羊 Sox2 序列相似性最高为  $99.8\%$ , 将其命名为 pMD18-T-Sox2。PCR 产物经  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳, 在预期位置出现约  $1 \text{ kb}$  的单一一条带 (图 3A)。其酶切产物经  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳, 也在预期位置出现约  $1 \text{ kb}$  的单一一条带 (图 3B)。

### 2.2 原核表达载体构建和鉴定

选择测序正确的 pMD18-T-Sox2 和 pGEX-KG 载体分别用 BamH I 及 Xho I 进行双酶切, 酶切产物胶回收连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 阳性菌落增菌获得的重组质粒进行酶切鉴定。酶切产物经  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳, 获得约  $1.0 \text{ kb}$  片段, 与预期结果相符 (图 3C)。鉴定确认的质粒经测序读码框正确, 将其命名为 pGEX-Sox2。

### 2.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

用不同 IPTG 浓度诱导表达的重组菌进行 SDS-PAGE, 对比结果发现 IPTG 浓度对其表达影响不大。含有 pGEX-Sox2 的大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导, 表达的蛋白为 GST-Sox2 融合蛋白。pGEX-KG 载体表达的 GST 单体蛋白为  $26 \text{ ku}$ , 表达的 Sox2 蛋白约为  $34 \text{ ku}$ , 二者的融合蛋白约为  $60 \text{ ku}$ 。离心取菌体进行 SDS-PAGE 分析, 在相对分子质量约  $60 \text{ ku}$  处有一蛋白条带 (图 4); 诱导的空载体在相对分子质量约  $26 \text{ ku}$  处有一特异性条带, 系 GST 单体蛋白。

ATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCCGGGCCCGCAGCAAACCTCGGGGGGGCGGGCGGGG  
 CGGGCGCAACTCCACCGCGGGCGGGCGGGCGGCAACCAGAAGAACAGCCCGACCGAGTCAAGCGGCCATGAA  
 CGCCTTCATGGTGTGGTCCC CGGGCAGCGGCGCAAGATGGCCCAAGAGAATCCTAAGATGCACAACTCGGAAAT  
 CAGCAAGCGCTTGGGCGCCGAGTGGAACTTTTGTCCGAGACAGAGAAGCGGCCGTTTCATCGACGAGGCCAAGCG  
 GCTGCGAGCGCTGCACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAATACCGGCCCGGGCGGAAAACCAAGACGCTCATGAA  
 GAAGGATAAGTACACTGCCGGGAGGGTGTCTGCCCCGGGCGGCAACAGCATGGCGAGCGGGTTCGGGGTGGG  
 CGCCGGCCTCGGGCGGGCGTGAACCAGCGCATGGACAGCTACGCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTA  
 CAGCATGATGCAGGACCAGCTGGGCTACCCGACGACCCGGGCTCAACGCGCACGGGCCGCTCAGATGCAGCC  
 CATGCACCGTACGACGTGAGCGCCTGCAGTACAACCTCTATGACCAGCTCGCAGACCTACATGAACGGCTCGCC  
 CACCTACAGCATGTCTATTCTCAGCAGGGCACCCCTGGCATGGCGCTTGGCTCCATGGGCTCGGTGGTGAAGTC  
 CGAGGCCAGCTCCAGCCCCCTGTGGTTACCTTCTTCCCACTCCAGGGCGCCCTGCCAAGCCGGGGACCTCCG  
 GGACATGATCAGCATGTACTCCCCGGCGCGAGGTGCCGGAGCCAGCCGCCCCAGCAGACTTACATGTCCCA  
 GCACTACCAGAGCGGCCGGTGCCTGGCACGGCCATTAACGGCACACTGCCCTCTCGCACATGTGA

图 1 山羊 *Sox2* 基因核苷酸序列  
 Fig. 1 Nucleotide sequence of *Capra hircus Sox2* gene

		Percent identity						
		1	2	3	4	5		
Divergence	1	█	97.6	99.3	95.8	99.5	1	<i>Bos taurus</i> (牛)
	2	2.4	█	97.3	97.0	97.5	2	<i>Canis familiaris</i> (犬)
	3	0.7	2.8	█	95.5	99.8	3	<i>Capra hircus</i> (山羊)
	4	2.5	1.3	2.8	█	95.7	4	<i>Equus caballus</i> (马)
	5	0.5	2.5	0.2	2.6	█	5	<i>O.aries</i> (绵羊)
		1	2	3	4	5		

图 2 山羊 *Sox2* 基因核苷酸序列与牛、犬、马、绵羊等物种进行序列同源比较  
 Fig. 2 Nucleotide identity comparison of *Sox2* gene among *Capra hircus*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Equus caballus* and *O. aries*

2.4 GST-*Sox2* 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 检测

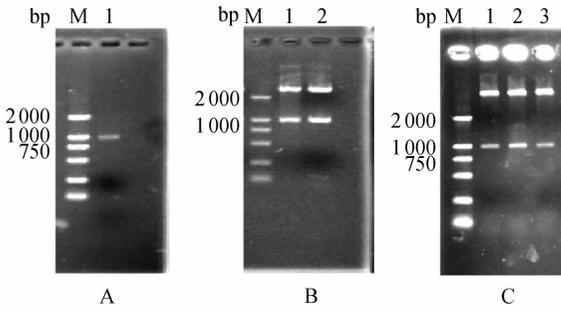
重组质粒 pGEX-*Sox2* 在大肠杆菌诱导表达的蛋白,用 GST 标签抗体检测其表达。如图所示,含有重组质粒的菌体蛋白出现了 1 条约 60 ku 的特异性条带,而未诱导 BL21 菌液和诱导的空载体均未出现此条带(图 5)。仅有 1 条约 26 ku 的 GST 单体条带。

2.5 GST-*Sox2* 融合蛋白纯化

GST-*Sox2* 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得高表达。试验表明 22 °C IPTG (1 mmol · L<sup>-1</sup>) 诱导 16 h 得到融合蛋白。融合蛋白约为 60 ku(图 6), SDS-PAGE 显示其条带基本单一,有微量杂蛋白。

3 讨论

*Sox2* 被认为是 ES 细胞中表达的一个 SOX (SRY 相关的 HMG 盒) 蛋白。高迁移组 (high motility group, HMG) 结构域是一个 DNA 结合域,在富含染色体的蛋白(包括 HMG1 和 HMG2) 中是一个保守的结构域, HMG1 和 HMG2 能以很低的特异性或非特异性与 DNA 结合; 在 SRY、SOX、LEF-1 这类序列特异性转录因子中, 这一结构域也是保守的。所有的 SOX 因子都能组织相似的结合基元—A/TA/TCAAA/TG<sup>[12-13]</sup>。像 Oct-3/Oct-4 一样, *Sox2* 也是小鼠早期胚胎多能性细胞的标志; *Sox2* 在内细胞团上胚层和生殖细胞中表达。 *Sox2* 在生殖嵴的原生殖细胞 (PGCs) 中也表达。在体外,

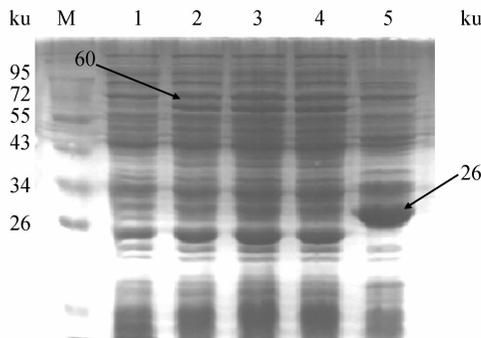


A. *Sox2* 基因 PCR 扩增, M. DNA marker (DL2000), 1. PCR 产物; B. pMD18-T-*Sox2* 酶切鉴定, M. DNA marker, 1、2. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 pMD18-T-*Sox2*; C. pGEX-*Sox2* 酶切鉴定, M. DNA marker, 1、2、3. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 pGEX-*Sox2*

A. PCR amplification of *Capra hircus Sox2*, M. DNA marker(DL2000), 1. PCR products of *Capra hircus Sox2* cDNA . B. Identification of recombinant plasmid pMD18-T-*Sox2* by restrictive enzyme digestion, M. DNA marker, 1, 2. pMD18-T- *Sox2* digested by *Bam*H I and *Xho* I . C. I-identification of recombinant plasmid pGEX-*Sox2* by restrictive enzyme digestion, M. DNA marker, 1, 2, 3. pGEX-*Sox2* digested by *Bam*H I and *Xho* I

图 3 山羊 *Sox2* 基因原核表达载体构建

Fig. 3 Construction of prokaryotic expression vector of *Capra hircus Sox2* gene



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 未诱导的重组 BL21; 2、3、4. 0.25、0.5、1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 37 °C 分别诱导后的表达产物; 5. IPTG 诱导的 pGEX-KG 空载体

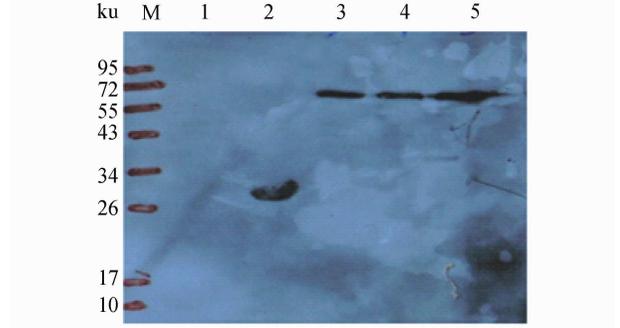
M. Protein marker; 1. Recombinant BL21 without induction by IPTG; 2, 3, 4. Induced pGEX-*Sox2* with different levels of IPTG (0.25, 0.5, 1 mmol · L<sup>-1</sup>); 5. pGEX-KG induced by IPTG(0.5 mmol · L<sup>-1</sup>)

图 4 GST-*Sox2* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis for expression of GST- *Sox2*

*Sox2* 基因在未分化的 ESCs 和胚胎癌细胞中表达, 而随着细胞的分化表达下调。

笔者以原始生殖嵴 RNA 为模板, 扩增 *Sox2* 基因。以测序正确的 pMD18-T-*Sox2* 质粒和 pGEX-KG 载体成功构建了原核表达质粒 pGEX-*Sox2*。经

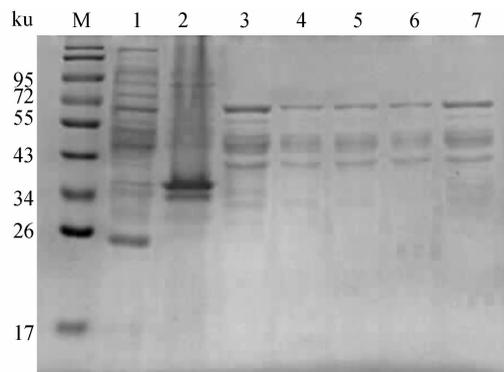


M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 未诱导的重组 BL21; 2. IPTG 诱导的 pGEX-KG 空载体; 3、4、5. 0.25、0.5、1mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 37 °C 分别诱导后的表达产物

M. Protein marker; 1. Recombinant BL21 without induction by IPTG; 2. pGEX-KG induced by IPTG; 3, 4, 5. Induced pGEX-*Sox2* at different levels of IPTG (0.25, 0.5, 1 mmol · L<sup>-1</sup>)

图 5 融合蛋白 GST-*Sox2* 的 Western blotting 检测

Fig. 5 Western blotting detection of GST-*Sox2* fusion protein



M. 蛋白预染 marker; 1. 菌体裂解上清; 2. 菌体裂解沉淀; 3. 洗脱前的 GST-beads; 4. 第 1 次洗脱的 GST-*Sox2*; 5. 第 2 次洗脱的 GST-*Sox2*; 6. 第 3 次洗脱的 GST-*Sox2*; 7. 3 次洗脱后的 GST-beads

M. Prestained protein marker; 1. The supernatant removed from sonicated recombinant bacterium fluid; 2. The precipitation isolated from sonicated recombinant bacterium fluid; 3. The GST-beads without elution; 4. The GST-*Sox2* fusion protein after the first time elution; 5. The GST-*Sox2* fusion protein after the second elution; 6. The GST-*Sox2* fusion protein after the third elution; 7. The GST-beads after three times of elution

图 6 GST-*Sox2* 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis for purification of GST-*Sox2*

测序显示, pGEX-*Sox2* 中插入的外源基因与 GenBank 中的相应绵羊基因序列相似性达 99.8%, 存在 2 个点突变。笔者认为, 造成这种突变的原因可能是物种间的差异所致, 也有可能属于一种多态现象。该处的点突变对表达蛋白质的反应原性可能影

响不大,这在 Western blotting 分析中得到了证实。

影响大肠杆菌中外源基因表达的因素很多,如表达载体的选择,外源基因中密码子的使用,mRNA 的一级和二级结构的作用,mRNA 稳定性的影响,宿主的选择及培养条件的控制等<sup>[14]</sup>。本试验中采用了 pGEX 系统中的融合蛋白高效表达载体 pGEX-KG,该载体 SD 顺序下游是谷胱甘肽巯基转移酶(GST)基因,该基因与克隆的外源基因相连,诱导表达时,表达产物为谷胱甘肽巯基转移酶和目的基因产物的融合体。该载体的优点是将外源蛋白基因置于载体蛋白 GST 基因后边,可以减少真核基因中大肠杆菌稀有密码子对蛋白表达的影响<sup>[15]</sup>,可诱导目的蛋白稳定、高效表达,在体外易于纯化,其中最为突出的优点是表达的融合蛋白用凝血酶特异切除融合蛋白中 GST 部分后,可获得具有活性的目的蛋白<sup>[16]</sup>。但笔者在试验中发现该系统仍存在几个问题:一是细菌蛋白酶对外源性表达产物的分解。电泳中发现除诱导产物带外,GST 带也较明显,说明存在着蛋白酶的分解问题,这一问题可通过更换蛋白酶缺陷性的宿主菌得到改善。另一个问题是表达的融合蛋白的凝集和包含体的形成。为了减少包含体的形成,降低了诱导温度,在 22 °C 低温诱导,并在 LB 中添加葡萄糖(5%~10%),结果在上清液得到了大量的可溶性的表达产物,这些可溶性产物进一步用谷胱甘肽 Sepharose-4B 珠子纯化,得到较纯的融合蛋白。

笔者克隆了山羊的 *Sox2* 基因,并成功地获得了山羊 *Sox2* 基因的融合蛋白,该融合蛋白的分子量约 60 ku,经 Western blotting 分析其显示了较强的反应原性。本研究为制备多克隆抗体创造了条件,也为 *Sox2* 在真核细胞的表达检测奠定了基础。

#### 4 结 论

本研究利用 RT-PCR 方法从原始生殖嵴组织克隆了山羊 *Sox2* 基因全长编码序列;构建的原核表达质粒 pGEX-*Sox2* 经 IPTG 低温诱导,在大肠杆菌中获得了高效表达;经谷胱甘肽 Sepharose-4B 介质纯化,获得了 GST-*Sox2* 融合蛋白。

#### 参考文献:

- [1] YUAN H, CORBI N, BASILICO C, et al. Developmental specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3 [J]. *Genes Dev*, 1995, 9 (21): 2635-2645.
- [2] AVILION A A, NICOLIS S K, PEVNY L H, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 126-140.
- [3] MASUI S, NAKATAKE Y, TOYOOKA Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 625-635.
- [4] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [5] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5):861-872.
- [6] PARK I H, ZHAO R, WEST J A, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors [J]. *Nature*, 2008, 451(7175):141-146.
- [7] HUANGFU D, OSAFUNE K, MAEHR R, et al. Induction of pluripotent stem cells form primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11):1269-1275.
- [8] LI W, WEI W, ZHU S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combing genetic reprogramming and chemical inhibitors[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1):16-19.
- [9] LIU H, ZHU F, YONG J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells form adult Rhesus monkey fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587-590.
- [10] COLLIGNON J, SOCKANATHAN S, HACKER A, et al. A comparison of the properties of Sox-3 with SRY and two related genes, Sox 1 and Sox-2 [J]. *Development*, 1996, 122(2): 509-520.
- [11] 张琦,忻珍桦,成国祥,等. 人 *Sox2* 基因的克隆表达和纯化[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2008, 42(1): 102-105.
- [12] YAMANAKA S. Strategies and new developments in the generation of patient specific pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 39-49.
- [13] 陈艳玫,姚鑫. 转录因子 *Sox2* 的研究进展[J]. 生命科学, 2004, 16(3): 129-134.
- [14] 隋广超,胡美浩. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(2): 128-132.
- [15] 王华,高杰英,刘永全,等. 人 FasL 分子的克隆、表达及多抗制备[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(4): 304-308.
- [16] 杜敏,朱美君,张曼夫. 钙蛋白酶抑制蛋白功能结构域 IV 在大肠杆菌中的表达、纯化及其抗血清的制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(1): 23-27.