

膜蛋白 LASS2 的表达研究

蔡兴锋 陶 震 曹 郁 杨胜利 龚 毅*

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘 要 利用多种原核表达系统、真核体外翻译系统和细菌/杆状病毒(Bac to Bac)的昆虫表达系统对一个具有重要生理功能的人的膜蛋白 LASS2(*Homo sapiens longevity assurance homologue 2* of yeast *LAG1*)进行表达研究。在原核表达系统中仅能够表达其羧基端胞外区片段却不能表达完整的 LASS2 蛋白,并制备了该片段的抗体。完整的 LASS2 蛋白能够在两种真核表达系统中进行表达,SDS-PAGE 分析结果表明,表达产物分子量为约 28kD 的 LASS 蛋白,Western 印迹分析也证实了这一结果,并利用 Ni-NTA 树脂亲和层析将该蛋白纯化,纯度达到 90% 以上。

关键词 膜蛋白,昆虫表达系统,真核体外翻译系统,亲和层析

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0069-05

膜蛋白构成了各种神经信号分子、激素和其它底物的受体,各种离子跨膜的通道以及构成呼吸链和转运蛋白,具有多种功能包括物质运输、能量转换、细胞识别、细胞免疫、神经传导、代谢调控以及激素和药物作用,肿瘤发生等等,对细胞的生命活动具有十分重要的意义,因此对膜蛋白的深入研究使我们能够更好地研究生命活动。绝大部分的哺乳动物受体、离子通道和转运子的基因工程表达在目前是非常困难的,存在许多影响因素,例如蛋白质折叠的难度、蛋白质降解的速度和蛋白质对细胞的毒性等等^[1-3]。LASS2(*Homo sapiens longevity assurance homologue 2* of yeast *LAG1*)是由上海市肿瘤研究所首次发现并报道的人的新基因,在人的多种组织中广泛存在,尤其在肝和肾中高水平转录^[4]。它编码一个具有四次跨膜螺旋,预期分子量为 28kD 的膜蛋白。LASS2 蛋白与酵母细胞中第一个发现的寿命相关蛋白 LAG1(yeast longevity assurance gene 1)具有相当的同源性,含有与酵母细胞寿命相关的 LAG1 模体,该模体在真核生物中是十分保守,可能参与神经酰胺的合成^[5,6]。利用酵母双杂交筛选人的肝 cDNA 库及进一步的验证结果表明 LASS2 能和多种膜偶连受体和转运子发生相互作用,且具有极其明显的抑制肝癌细胞 HCC 增殖的作用^[4],因此 LASS2 具有十分重要的细胞生理功能。

本实验室曾尝试利用多种原核表达系统对它进行表达,均未获得成功,仅能够在原核表达系统中表达其羧基端的胞外区片段并制备了多克隆抗体。采用真核体外翻译系统和细菌/杆状病毒(Bac to Bac)的昆虫表达系统能够成功地将 LASS2 表达并纯化,为进一步研究 LASS2 蛋白的功能,以及为今后的哺乳动物膜蛋白的表达研究打下良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和细胞株 :大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存;粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 由华东理工大学谭文松教授提供;Bac to Bac 昆虫杆状病毒表达系统为 Gibco BRL 公司产品;pGEX4T-1, pT7ZZa, pET32a, pT7450 为本实验室保存。

1.1.2 试剂和培养液 :主要购自 Promega、Sangon、NEB、Gibco BRL、Sigma、QIAGEN、Amersham 及 Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 LASS2 开放阅读框片段的获得 :根据文献[4]所报道的 LASS2 cDNA 序列,利用 primer primer 5.0 设计引物, P1 : 5'-GCC GAA TTC GCC GTC ATT GTG GAT AAA CC-3' ; P2 : 5'-GG AAT AAG CTT TCA GTC ATT CTT ACG ATG G-3'。引物由上海生工生物

工程公司合成。以人的肝 cDNA 文库为模板,进行 PCR 反应,扩增 LASS2 的开放阅读框:96℃ 预变性 5min,加入 2u Taq DNA 聚合酶,随之 95℃ 1min,56℃ 50s,72℃ 1.5min 进行 32 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。将 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,克隆到 pUC19 中,命名为 pUC-LASS2,进行测序鉴定。测序由上海博亚公司进行。

1.2.2 体外偶联的转录和翻译:将 pUC-LASS2 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后克隆于载体 pT₇450,置于 T7 启动子的控制下。纯化质粒 pT₇450-LASS2,并溶解在 DEPC 处理的水中。体外偶联的转录和翻译按试剂盒的操作说明进行。在 50 μL 反应体系中,顺序加入下列组分:

TNT [®] Rabbit Reticulocyte Lysate	25 μL
TNT [®] Reaction Buffer	2 μL
TNT [®] RNA Polymerase (T ₇)	1 μL
Amino Acid Mixture (Methionine minus)	1 μL
[³⁵ S] Methionine (10 mCi/mL)	3 μL
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor (40 u/μL)	1 μL
DNA template	1 μg

补加 ddH₂O 至总体积为 50 μL,混匀后在 30℃ 反应 1.5 h。取 2 μL 翻译产物进行 SDS-PAGE 电泳检测翻译效率,其余产物保存在 -70℃ 备用。电泳结束后,先用固定液(50% 甲醇,10% 冰醋酸,40% 水)固定凝胶 30 min,然后在 7% 醋酸,7% 甲醇,1% 甘油的溶液中浸泡 5 min,然后真空抽干,压片。

1.2.3 重组杆状病毒供体质粒 pFastBacHTa-LASS2 的构建:将 pUC-LASS2 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,低熔点胶分离回收,然后与同样双酶切的质粒 pFastBacHTa 相连接,构建重组供体质粒。

1.2.4 重组杆状病毒基因组 Bacmid DNA 的获得:将上述重组杆状病毒供体质粒转化大肠杆菌 DH10 Bac(含有经修饰的昆虫杆状病毒基因组),使其在大肠杆菌体内进行转座,产生含 LASS2 基因的重组杆状病毒基因组 Bacmid DNA。

1.2.5 昆虫细胞培养:昆虫细胞培养、重组病毒的获取、外源基因的表达均参照文献[7]进行;共转染按 Cellfectin 产品说明书进行。

1.2.6 重组杆状病毒的获取和 PCR 鉴定:将上述重组杆状病毒基因组 Bacmid DNA 转染 sf21 细胞,在 3d 后收取感染症状细胞的上清进行病毒扩增,并对此重组杆状病毒进行 PCR 鉴定。将病毒扩增的细胞上清经 8000r/min 离心 15 min,取上清,用等体积

的酚:氯仿:异戊醇(50:49:1)抽提,再用等体积氯仿抽提后乙醇沉淀,用 TE 缓冲液悬浮,以其为模板进行 PCR 鉴定。引物为 LASS2-P1 和 LASS2-P2,PCR 条件与获得 LASS2 片段的条件相同,对 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查。

1.2.7 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析:SDS-PAGE 和 Western 印迹分析均参照文献[8]稍加修改进行。

1.2.8 His₆ 融合表达产物的纯化:收集重组病毒感染昆虫细胞 Tn-5B1-4,用裂解缓冲液(50mmol/L NaH₂PO₄, 300mmol/L NaCl, 10mmol/L 咪唑, 0.05% Tween 20, pH 8.0)悬浮后,超声波裂解细胞,10 000 g 4℃ 离心 10min,取上清,加入适量 Ni-NTA 树脂,4℃ 200 r/min 摇床上摇动 60min,然后将此混合物装柱,收集流出液,再以 10 倍柱体积的洗涤缓冲液(50mmol/L NaH₂PO₄, 300mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑, 0.05% Tween 20, pH 8.0)分 2 次洗脱杂蛋白,最后以 3 倍柱体积的洗脱缓冲液(50mmol/L NaH₂PO₄, 300mmol/L NaCl, 250mmol/L 咪唑, 0.05% Tween 20, pH 8.0)分 3 次洗脱目的蛋白。

2 结 果

2.1 LASS2 蛋白在原核表达系统中的表达研究

按材料与方法中所述,从人的肝 cDNA 文库中 PCR 扩增获得 LASS2 基因编码区片段,经 DNA 序列分析与报道的一致^[4]。在多种原核表达系统包括利用不同的表达载体 pT₇-450, GST 融合蛋白的载体 pGEX4T-1,含有 ZZa 融合蛋白的载体 pT₇ZZa 和 Trx 融合蛋白的载体 pET32a 和不同的菌株均未能发现明显的表达条带,且用相应的融合肽的抗体也未检测到条带(结果未显示)。然而,将 LASS2 的羧基端胞外区片段克隆入载体 pET32a 中,构建表达质粒 pET32a-LASS2-C 转化入 BL21(DE3)菌株,诱导表达,电泳,染色。可以观测到一条明显的由载体的融合肽和 LASS2-C 组成的约 33 kD 的融合蛋白条带,纯化此融合蛋白(图 1),并按文献[8]制备兔源抗体。

2.2 LASS2 蛋白在真核体外翻译系统中的表达研究

利用 Promega 公司的真核体外翻译系统 TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems 对 LASS2 进行表达研究。体外翻译产物经电泳,压片后,有预期的约 28 kD 大小的条带(图 2),表明 LASS2 在该系统中能够正确地进行转录和翻译。

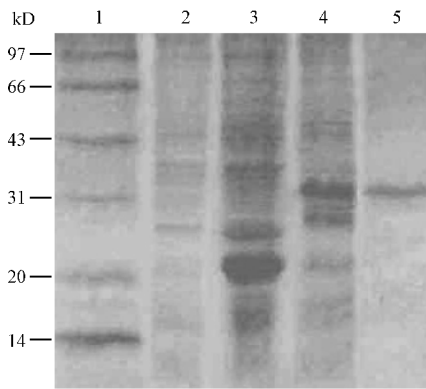


图 1 LASS2 羧基端胞外区片段的融合蛋白的表达和纯化
Fig.1 Expression and purification of pET32a-LASS2-C protein
1. Protein molecular marker ; 2. The cell lysate of the pET32a clone without induction by IPTG ; 3. The cell lysate of the pET32a clone induced by IPTG ; 4. The cell lysate of the pET32a-LASS2-C recombinant clone induced by IPTG ; 5. Purified pET32a-LASS2-C protein

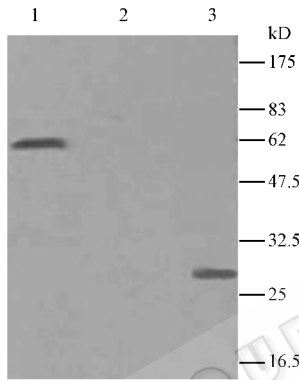


图 2 LASS2 在真核体外翻译系统中的表达

Fig.2 Expression of pT₇-450-LASS2 using TNT[®] coupled reticulocyte lysate system

1. Luciferase T₇ control DNA (61kD) ; 2. No DNA template control ; 3. pT₇-450-LASS2 DNA (~ 28 kD)

2.3 LASS2 蛋白在昆虫细胞表达系统中的表达研究

2.3.1 重组供体质粒 pFastBacHTa-LASS2 的构建 : 通过 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切将 LASS2 基因片段从 pUC-LASS2 中克隆到昆虫供体质粒 pFastBacHTa 载体中,获得了重组供体质粒 pFastBacHTa-LASS2 (图 3)。重组供体质粒可与大肠杆菌-昆虫细胞的穿梭载体 Bacmid 在大肠杆菌中发生转座,将外源基因片段转到 Bacmid 中,该方法较传统的重组病毒空斑筛选法具有实验操作方便,周期短的特点。

2.3.2 重组 Bacmid DNA 的获得 : 将重组供体质粒 pFastBacHTa-LASS2 转化 DH10Bac 感受态细胞,在含有 Bluo-gal 和 IPTG 的平板上(庆大霉素 7 μ g/mL,卡那霉素 50 μ g/mL,四环素 10 μ g/mL)经两轮筛选后,挑

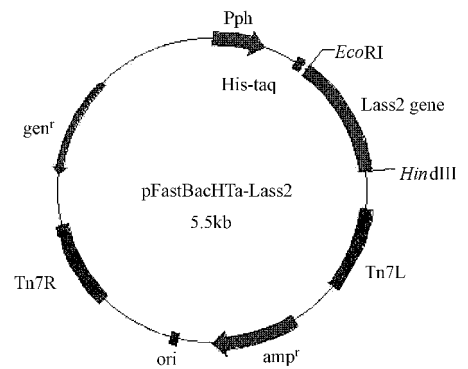


图 3 pFastBacHTa-LASS2 供体质粒构建图

Fig.3 Schematic representation of the pFastBacHTa-LASS2 donor vector

取一个白色克隆接种于 3mL LB 培养基中,培养 24h 后提取重组 Bacmid DNA。重组 Bacmid DNA 片段大于 135kb,难以进行常规的酶切方法鉴定,采用 LASS2 引物对进行 PCR 鉴定,可以扩增出约 710bp 的 DNA 片段,说明 LASS2 基因已转座到 Bacmid DNA 中。

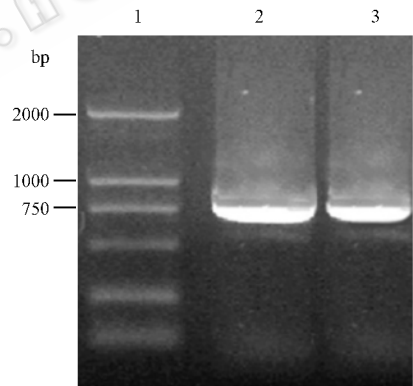


图 4 重组 Bacmid DNA 和重组杆状病毒的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant viral DNA by PCR amplification

1. DL2000 marker ; 2. LASS2 recombinant baculovirus ; 3. pFastBacHTa-LASS2

2.3.3 重组杆状病毒的获取 : 用 Cellfectin 法将重组的 Bacmid DNA 转染 sf21 细胞,收集上清进行病毒扩增,获得含 LASS2 基因的重组杆状病毒。感染上清提取病毒 DNA,以 LASS2 基因特定引物进行 PCR 反应,可以扩增出约 710bp 的 DNA 片段,与相应供体质粒扩增出的 DNA 片段相一致(图 4),说明 LASS2 基因已整合到病毒基因组中。

2.3.4 昆虫细胞 Tn-5B1-4 中表达重组蛋白 LASS2 : 重组杆状病毒 LASS2 感染 Tn-5B1-4 昆虫细胞(简称 Tn 细胞),72 h 后收集细胞,超声裂解破碎细胞,取上清用于 SDS-PAGE 分析,结果如图 5 所示,表明

LASS2 在 Tn 细胞中得到表达,表达量占细胞可溶性蛋白的 5% 左右,其分子量约为 28kD,和我们预期的表达蛋白分子量大小相符。

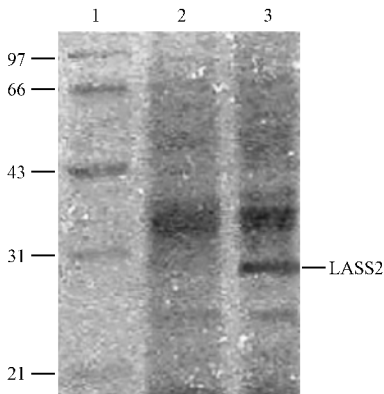


图 5 Tn 细胞表达的 LASS2 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of LASS2 protein expressed in recombinant virus infected Tn cells

1. Molecular weight markers ; 2. Total extract from cells infected with baculovirus control ; 3. Total extract from cells infected with LASS2 recombinant baculovirus

2.3.5 Western 印迹分析: 由于在重组 LASS2 蛋白的 N 端融合了 6 个组氨酸,目的蛋白可以用 His-tag 的抗体或由 LASS2 羧基端胞外区的融合蛋白 32a-LASS2-C 制备的抗体进行检测。为进一步确认表达产物,进行蛋白印迹分析,一抗用在大肠杆菌中表达的融合蛋白 pET32a-LASS2-C 制备的抗体(图 6A)或 His-tag 的抗体(图 6B),二抗采用碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG。可以看到有相应位置的杂交条带,说明在昆虫细胞中表达的确为 LASS2 蛋白。

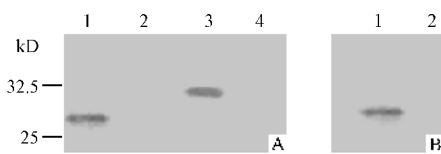


图 6 在昆虫细胞中表达的 LASS2 蛋白的 Western blot

Fig.6 Analysis of LASS2 protein expressed in baculovirus expression system by Western blot

A. Anti-LASS2-C antibody was used in the immunoblot. 1. The clear lysate of transfected pFastBachHTa-LASS2 cells ; 2. The clear lysate of transfected pFastBachHTa cells ; 3. Total proteins from pET32a-LASS2-C/BL21 (DE3) ; 4. Total proteins from BL21(DE3)

B. Penta His antibody was used in the immunoblot 1. The clear lysate of transfected pFastBachHTa-LASS2 cells ; 2. The clear lysate of transfected pFastBachHTa cells

2.3.6 His₆ 融合表达产物的纯化: 由于在重组蛋白的 N 端融合了 6 个组氨酸,目的蛋白可以用 Ni-NTA 树脂纯化。纯化的 LASS2 蛋白纯度达到 90% 以上,

分子量为 28kD 左右(图 7)。

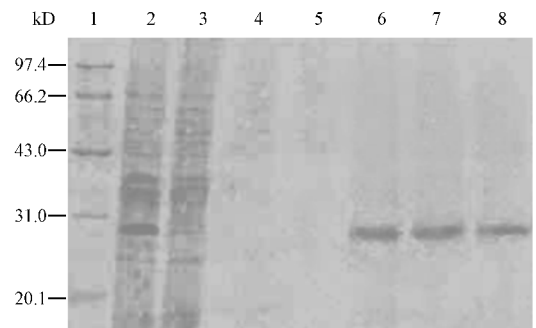


图 7 用 Ni-NTA 树脂纯化 LASS2 蛋白的 SDS-PAGE

Fig.7 Purified LASS2 protein with Ni²⁺ affinity resins

1. Protein molecular marker ; 2. The cleared lysate of transfected pFast-BachHTa-LASS2 cells ; 3. Flow-through ; 4. Wash 1 ; 5. Wash 2 ; 6. Eluate 1 ; 7. Eluate 2 ; 8. Eluate 3

3 讨 论

LASS2 是合作实验室在进行肿瘤相关基因的研究时发现的一个新基因,它的蛋白序列和在酵母细胞中第一个发现克隆的酵母细胞寿命相关基因 LAG1 具有相当的同源性,含有在多种真核生物中存在的相当保守的 LAG1 模体,该模体可能参与神经酰胺的合成^[6]。LASS2 蛋白具有 4 个跨膜区,在细胞实验中能够明显地抑制肝癌细胞的生长,且酵母双杂交结果表明它能与具有不同生理功能的蛋白因子相互作用,表明它具有十分重要的功能作用,但是对它的作用机制和结构等仍然十分不清楚。本实验室曾经试图在多种原核表达系统中表达该膜蛋白 LASS2,包括利用不同的表达载体 pT7-450, GST 融合蛋白的载体 pGEX4T-1,含有 ZZa 融合蛋白的载体 pT7ZZa 和 Trx 融合蛋白的载体 pET32a 和不同的菌株,均未能检测到其表达。

体外翻译系统比传统的原核细菌表达系统所需的时间要缩短许多,而且操作简便,对 LASS2 cDNA 进行体外转录和翻译,放射自显影可以检测到 LASS2 的表达。但是,该系统表达蛋白的量是极其少量的,限制了对表达蛋白的更深入的研究。

我们利用 Bac to Bac 杆状病毒表达系统使膜蛋白 LASS2 成功地获得表达,而且利用亲和层析方法能迅速快捷地获得了纯化的 LASS2 蛋白。通过对膜蛋白 LASS2 在不同的表达系统中的表达研究,制备了其部分片段的抗体,并获得了纯度较高的 LASS2 蛋白,可以为将来对该蛋白进一步纯化并结晶,解析其三维结构,更深入地了解其功能打下了

良好的基础,并同时为将来对哺乳动物膜蛋白的表达研究作了初步的探索。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ward A, O'Reilly J, Rutherford N G *et al.* Expression of prokaryotic membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans*, 1999, **27**(6): 893 - 899
- [2] Schatz G, Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 1996, **271**(5255): 1519 - 1526
- [3] Matlack K E, Mothes W, Rapoport T A. Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, 1998, **92**(3): 381 - 390
- [4] Pan H, Qin W X, Huo K K *et al.* Cloning, mapping, and characterization of a human homologue of the yeast longevity assurance gene

LAG1. *Genomics*, 2001, **77**(1): 58 - 64

- [5] Jiang J C, Kirchman P A, Zagulski M *et al.* Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in *Caenorhabditis elegans* and Human. *Genome Research*, 1998, **8**: 1259 - 1272
- [6] Guillas I, Kirchman P A, Chuard R *et al.* C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J*, 2001, **20**: 2655 - 2665
- [7] Summers M D, Smith G E. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas: Texas Agriculture Experiment Station and Texas A&M University College Station, 1987
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Study of the Expression Membrane Protein LASS2

CAI Xing-Feng TAO Zhen CAO Yu YANG Sheng-Li GONG Yi*

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

Abstract A human membrane protein LASS2 (*Homo sapiens* longevity assurance homologue 2 of yeast *LAG1*), which has important physiologic functions, was expressed in three different expression systems. Only the LASS2 protein carboxyl terminal hydrophilic fragment could be expressed in the prokaryote expression system and its polyclonal antibody was produced. The full length of LASS2 protein could be expressed successfully in both eukaryotic *in vitro* translation system and Baculovirus expression system: Bac-to-Bac system. SDS-PAGE analysis revealed that the molecular weight of expressed product of LASS2 was about 28 kD. The product was also proved by Western blot. This recombinant LASS2 protein was purified by metal affinity resin and the purity is above 90%.

Key words membrane protein, baculovirus expression system, eukaryotic *in vitro* translation system, affinity chromatography

Received: 07-15-2002

* Corresponding author. Tel: 86-21-64369607; Fax: 86-21-64700244; E-mail: ygong@srcb.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>