

天花粉蛋白基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

蔡 煊¹ 胡拥军² 徐 洪² 俞吉安^{1**} 孙 兵^{2**}

(上海交通大学生命科学与技术学院 上海 200030)¹

(中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所 上海 200030)²

摘要: 天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 全长基因通过 PCR 从 pCDNA3.1 中获得, 克隆至表达载体中。双向测序表明获得的天花粉蛋白全长基因序列正确。建立大肠杆菌原核表达系统, 表达并纯化 His-TCS 活性融合蛋白, 鉴定出其具有 RNA N-糖苷酶活性和与 TCS 特异性单克隆抗体 TE1 (IgE) 结合的抗原活性。

关键词: 天花粉蛋白, 克隆表达, 分离纯化, 生物活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0031-03

CLONING AND EXPRESSION OF TRICHOSANTHIN GENE IN *E. COLI*

CAI Xuan¹ HU Yong-Jun² XU Hong² YU Ji-An^{1*} SUN Bing^{2**}

(School of Life Science and Biological Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030)¹

(Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, C.A.S., Shanghai 200030)²

Abstract: TCS (Trichosanthin) gene is cloned into expression vector pPROEX-HTb from pCDNA3.1. The result of sequencing analysis indicates we obtain the TCS whole length gene. TCS protein is expressed in *E. coli*. After the analysis of SDS-PAGE, the TCS protein's biological activity of RNA N-glycosidase is characterized. The result of ELISA shows that this antigen can bind with specific antibody TE1 (IgE).

Key words: Trichosanthin, Gene clone, Protein expression and purification, Biological activity

天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 是中药“天花粉”的有效成分, 传统用于早中期引产^[1]。近来研究表明, 天花粉蛋白是一种有前途的抗肿瘤药物^[2]。

天花粉蛋白是一种核糖体失活蛋白, 具有 RNA N-糖苷酶活性^[3], 可以在多个环节上同时抑制 HIV 的复制过程^[4]。但是天花粉蛋白是一种很强的过敏原^[5]。诱发抗天花粉蛋白的 IgE 应答^[6]。

用分子生物学和免疫学手段, 建立稳定的具有一定蛋白产率的大肠杆菌原核表达系统, 克隆表达并纯化天花粉蛋白, 鉴定其生物学活性和功能, 在此工作基础上, 今后可进一步研究天花粉蛋白 IgE 抗原决定簇结构和功能。

1 材料与方法

1.1 材料

引物 (上海博亚生物技术有限公司); 高保真聚合酶和缓冲液 (Sangon 公司); 限制性内切酶 (Takara 公司); 柱式小量质粒纯化试剂盒, 柱式胶回收试剂盒 (华舜生物

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30070708)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30070708)

** 联系人 E-mail: caixuan2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2001-10-18, 修回日期: 2001-12-28

有限公司);表达载体(GIBCO公司);连接酶和连接缓冲液(华美生物公司);感受态菌, Ni-NTA Agarose (Qiagen 公司);天然天花粉蛋白(购自金山)。

1.2 方法

1.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction): TCS 基因引物: sense primer 5'GGATCCATGG-ATGTTAGCTTCCG 3'; antisense primer 5'GAATTCATGCCATATTGTTTC3'。PCR 条件: 94℃、2min, 94℃、1min, 60℃、1min, 72℃、1.5min, 72℃、5min, 25cycles。

1.2.2 小量质粒抽提: 按华舜生物有限公司柱式小量质粒纯化试剂盒的说明操作。

1.2.3 天花粉蛋白表达纯化: 将 50mL 37℃ 过夜培养 12h 的菌液加入 1L 的含有相应的抗生素的培养液中, 37℃, 220r/min, 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8。加入相应浓度的 IPTG, 30℃, 220r/min, 振荡培养 4h, 4℃ 5000r/min 离心 10min, 收集菌体后, 用裂解液溶解菌体, 洗脱液洗去杂蛋白, 最后收集天花粉蛋白保存于 -20℃。

1.2.4 酶联免疫吸附法 ELISA: 抗原包被 ELISA96 孔板, 第 1 抗体, 第 2 抗体反应后, 显色剂显色, 并用光吸收度自动测试仪测定 OD_{450} 的数值。

1.2.5 RNA N-糖苷酶活性的测定: 按文献 [3] 方法用核糖体失活蛋白处理大鼠肝核糖体后, 抽提 RNA 进行苯胺反应, 电泳鉴定 RNA。

2 结果与讨论

2.1 TCS 克隆构建筛选和鉴定

从插入天花粉蛋白基因的质粒 pCDNA3.1 中用 PCR 扩增出带有 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切位点的 TCS 全长基因大约 741bp (图 1)。抽提质粒 TCS-pPROEX-HTb, 进行 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定, 分别得到大约 741bp 和 4.7kb 两个片段。用 *Sca*I 酶切质粒, 得到大约 1.2kb 和 4.3kb 两个片段。将鉴定后的单克隆菌落进行双向测序 (博亚公司), 证明克隆的 TCS 全长基因序列正确。

2.2 3TCS 蛋白的表达和纯化

IPTG 诱导大肠杆菌表达 TCS 蛋白 1.5h, 超声波破碎菌体, 离心后取上清, 用 Ni-NTA Agrose 亲和纯化, 纯化的样品走 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (图 2)。电泳结果表明, 大约 30kD 的 TCS 蛋白成功表达, 纯化后 TCS 蛋白产率大约 4mg/L。

2.3 TCS 蛋白 RNA N-糖苷酶活性的测定

将纯化的天花粉蛋白处理大鼠肝核糖体后抽提 rRNA, 苯胺处理后用 3.5% 聚丙烯酰胺的尿素变性胶电泳进行分析 (图 3)。天然天花粉蛋白 (nTCS) 阳性对照和表达纯化的天花粉蛋白 (wTCS) 都能作用于核糖体, 水解出 400bp 小片段, 未加天花粉蛋白的空白对照组没有水解小片段出现。证明表达纯化的天花粉蛋白具有 RNA N-糖苷酶活性, 能裂解 28SrRNA 的腺核苷的 N-糖苷键。

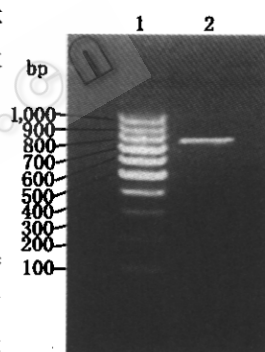


图 1 TCS 全长基因片段核酸电泳
1 Marker,
2 TCS gene (741bp)

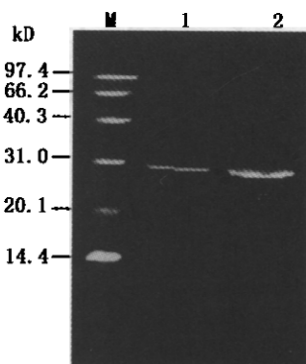


图 2 TCS 蛋白表达和纯化 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
1~2 purified TCS protein (30kD)

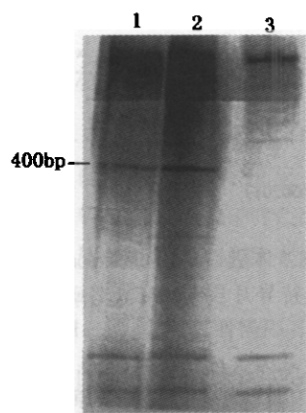


图 3 聚丙烯酰胺的尿素变性胶电泳

1 wTCS, 2 nTCS, 3 negative control

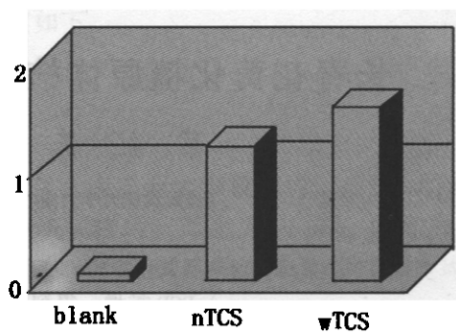


图 4 酶联免疫吸附反应

blank 空白对照, nTCS 天然天花粉蛋白,
wTCS 表达纯化的天花粉蛋白, OD_{450}

2.4 TCS 蛋白的酶联免疫吸附反应 ELISA

用天然天花粉蛋白和表达纯化的天花粉蛋白以 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度包被 ELISA 96 孔板, 用分泌 TCS 特异性单克隆抗体 TE1 (IgE) 的杂交瘤细胞培养上清作为第 1 抗体, anti-IgE-Biotin 作为第 2 抗体, 显色充分后, 用 1mol/L 硫酸终止反应, 用光吸收度自动测试仪测 OD_{450} 值 (图 4)。ELISA 结果表明, 表达纯化的天花粉蛋白能和 TCS 特异性单克隆抗体 TE1 (IgE) 结合, 具有抗原抗体结合活性。

3 结语

从 pCDNA3.1 中克隆出天花粉蛋白全长基因, 建立大肠杆菌原核表达系统, 用 Ni-NTA Agarose 纯化天花粉蛋白, 并鉴定出其具有 RNA N-糖苷酶活性和与 TCS 特异性单克隆抗体 TE1 (IgE) 结合的抗原活性。说明已成功表达出有生物活性的天花粉蛋白。由于天花粉蛋白的三维空间立体结构已研究清楚^[7], 所以在这些工作基础上, 可进一步研究天花粉蛋白 IgE 抗原决定簇结构和功能^[8]。

致谢 本项研究工作由 973 项目 (No.G1999053907) 支持, 特此致谢。

参考文献

- [1] 汪绍福, 金善炜, 董 颖, 等. 天花粉蛋白的研究及其应用. 北京: 科学出版社, 1979. 9.
- [2] 胡梅洁, 张 曙, 王德宝, 等. 上海医学, 1998, 21 (8): 456 ~ 457.
- [3] 张劲松, 刘望夷. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (6): 51 ~ 54.
- [4] Bourinbaier A S, Lee-Huang S. Biochem Biophys Res Comm, 1995, 208 (2): 779 ~ 785.
- [5] Palca J. Science, 1990, 247 (4949): 1406 ~ 1409.
- [6] Ferary P, Traubaud M A, Romain T, et al. AIDS, 1991, 5 (6): 865 ~ 870.
- [7] 顾 华, 叶 敏, 姚 鑫. 实验生物学报, 1986, 19 (40): 121 ~ 129.
- [8] 辛玉华, 东秀珠. 微生物学通报, 2000, 27 (3): 178 ~ 181.