

IL-10₂₃₋₅₇-PE40 分泌表达的初步研究

彭其胜¹ 李月红³ 雷连成¹ 华芳⁴ 杨德光^{2*}

(吉林大学畜牧兽医学院 长春 130062)¹ (东北农业大学农学院 哈尔滨 150030)²

(吉林农业大学动物科技学院 长春 130118)³ (长春医学高等专科学校 长春 130000)⁴

摘要: 将 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 基因与 pelB 信号肽融合置于 pET-20b 构建分泌表达质粒 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40, 然后将 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 分别转化至 BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, Rosetta (DE3), *E. coli* K12 TB1, ER2566 中。无论是在 37℃ 或是在 26℃, 亦或在培养基中添加葡萄糖的情况下, IPTG 诱导后, IL-10₂₃₋₅₇-PE40 蛋白只在 BL21 (DE3) pLysS 菌中以可溶分泌形式表达, 其中以 37℃ 时培养基中不添加葡萄糖表达量为最高, 占菌体蛋白总量的 15%, 说明蛋白的分泌表达与菌种的选择有关。表达产物经免疫印记检测可被抗 PE40 的特异抗体识别。通过质粒稳定性实验证明, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 在 BL21 (DE3) 中不稳定, 导致蛋白的不表达, 在 Rosetta (DE3) BL21, *E. coli* K12 TB1, ER2566 中稳定但不表达, 因此, 以 Rosetta (DE3) BL21 为例, 通过 SDS-PAGE、DNASar 和 ANThewin 蛋白分析软件对本室构建的几种 PE 重组毒素进行比较分析, 我们发现: 并不是所有 PE 重组毒素融合信号肽序列后, 就能分泌表达, PE 重组毒素分泌表达还可能与导向部分的性质有关。

关键词: IL-10₂₃₋₅₇-PE40 重组毒素, 分泌表达, 质粒稳定性, 导向部分。

中图分类号: S852.61, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0074-07

IL-10₂₃₋₅₇-PE40 Secretion of Periplasm

PENG Qi-Sheng¹ LI Yue-Hong³ LEI Lian-Cheng¹ HUA Fang⁴ YANG De-Guang^{2*}

(College of Veterinary, Jilin University, Changchun 130062)¹

(College of culture, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030)²

(Anim Sci and Tech College, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)³

(Chang Chun Medical College, Changchun 130000)⁴

Abstract: IL-10₂₃₋₅₇-PE40 was cloned into the prokaryotic expression vector containing pelB signal peptide gene, The constructed plasmid pET20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 were transformed into *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, Rosetta (DE3), ER2566 and *E. coli* K12 TB1 for proposed protein expression, respectively. Through changing temperature of induction or adding 0.1 mol/L glucose in LB, the target protein IL-10₂₃₋₅₇-PE40 was directed to periplasmic space as soluble form only in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS and was up to 15% of the total protein. Western blot analysis showed that the fusion protein may react specifically with anti-PE40 antibody. These results maybe explain translocation across the cell membrane of *E. coli* has to do with the characteristics of host strain. By rationale for plasmid stability test in *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3), ER2566 and *E. coli* K12 TB1, pET20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 was only unstable target plasmids in BL21 (DE3), that maybe explain why IL-10₂₃₋₅₇-PE40 wasn't directed to periplasmic space in BL21 (DE3). However, why the target protein didn't export to periplasm of the other host strains in which have stable recombinant plasmid? When using

* 通讯作者 Tel: 0451-55190249, E-mail: ydgl@tom.com

收稿日期: 2005-06-27, 修回日期: 2005-09-01

SDS-PAGE, DNA Star and ANThewin protein software for analysing the mechanism of immunotoxin of *Pseudomonas* exotoxin A, our result indicate: the leader signal is necessary, but not sufficient for export into the periplasm. Translocation across the cell membrane maybe depend on characteristic of targeting agents.

Key words: IL-10₂₃₋₅₇-PE40, Secretion, Plasmid stability, Targeting agent

正确选用合适的载体和宿主菌组合会明显提高目的蛋白可溶部分比例及活性。其中,载体可以通过三种方式改善目的蛋白的溶解性或正确折叠:(1)与本身溶解性高的多肽序列融合表达(例如,谷胱甘肽-S-转移酶(GST),硫氧还原蛋白(Trx)以及NusA);(2)与催化二硫键形成的酶融合表达(如:DsbA, DsbC);(3)与信号序列融合表达,输出到细胞周质内^[1],相比前两种方法,周质腔内氧化还原条件有利于重组蛋白质二硫键的形成,且周质腔内蛋白酶相对较少,不易降解重组蛋白,大肠杆菌自身的信号肽酶在表达蛋白分泌进入周质腔时能将信号肽切出,不需引入特异性蛋白酶切割其它融合蛋白,有利于表达蛋白的纯化和规模制备。因此,国内外学者在构建PE重组毒素时,设法让其在大肠杆菌周质腔中分泌表达,迄今为止,只有我室构建的LHRH-PE40是分泌表达的。

由于我们以前的实验表明:IL-10₂₃₋₅₇-PE40〔以IL-10第23号至57号氨基酸为导向与PE40(绿脓杆菌外毒素A除去受体结合区后的剩余部分)融合的免疫毒素〕在大肠杆菌中能可溶表达^[2]。本实验拟构建免疫毒素的分泌表达质粒,探索IL-10₂₃₋₅₇-PE40的分泌周质表达条件,同时,通过SDS-PAGE, DNASTar和ANThewin蛋白分析软件对本室构建的几种PE重组免疫毒素进行比较分析,尝试探索PE重组毒素分泌表达的机理。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌JM105和BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS、Rosetta(DE3)、质粒pET-20b(+)由本室保存,ER2566及*E. coli* K12 TB1来源于NEB;pET-20b-EGF-PE40、pET-20b-LHRH-PE35、pET-20b-EGF-PE38、pET-20b-MSH-PE40、pET-20b-LHRH-PE40质粒由本室保存。

1.2 试剂和酶

限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、IPTG、DL-2000 marker等购自Takara公司;T4 DNA连接酶、Wizard PCR Preps DNA Purification System、RNase等购自Promega公司。

1.3 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40和pET-28a-IL-10₂₃₋₅₇-PE40质粒的构建

IL-10₂₃₋₅₇基因的PCR产物用NcoI和NdeI双酶切,与经同样双酶切的含有PE40的pet-28a(+)的载体连接,得到pET-28a-IL-10₂₃₋₅₇-PE40融合蛋白表达载体,筛选阳性克隆后测序鉴定,对pET-28a-IL-10₂₃₋₅₇-PE40进行NcoI和EcoRI双酶切,与经同样双酶切的载体pet-20b(+)连接,得融合蛋白表达载体pet-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40,筛选阳性克隆后测序鉴定

1.4 IL-10₂₃₋₅₇-PE40表达形式的鉴定

参考:Novagen公司的鉴定方法^[5],设计检测重组蛋白的表达形式。

1.5 测试质粒的稳定性

通过检测诱导前细菌培养液在下列4种平板上的菌落数,以判断细胞中携带目的

质粒的细胞组成(表1)。

表1 测试质粒的稳定性平板

平板号	铺板指示	对应结果
1	10 ⁻⁶ 稀释在琼脂板平板	所有细胞生长
2	10 ⁻⁶ 稀释在含抗生素平板	只有携带质粒的细胞生长
3	10 ⁻⁶ 稀释在含1mmol/L IPTG 平板	只有质粒已丢失或无法表达目的基因的细胞能生长*
4	10 ⁻⁶ 稀释在含1mmol/L IPTG 和抗生素平板	只有仍携带质粒但已失去表达目的基因能力的细胞能生长*

* 3、4不适用,采用T7lac启动子或pLysS、pLsE质粒

1.6 表达产物的Western印迹分析

一抗为兔抗LHRH-PE40血清〔使用前,用适量的BL21(DE3)空菌超声破碎离心上清液吸附血清,然后超滤得一抗血清〕,二抗为HRP-羊抗兔IgG,显色剂为DAB。

1.7 ANThewin 蛋白分析软件

ANTHEPROT 4.3是法国蛋白质生物与化学研究院开发出的蛋白质研究软件包。软件包包括了蛋白质研究领域所包括的大多数内容,能进行各种蛋白序列分析与特性预测。

2 结果

2.1 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 构建的酶切和测序鉴定

将构建的pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体NcoI和EcoRI酶切后,在1200bp处有目的带,与预计结果相符,测序说明构建正确。

2.2 37℃时 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 载体在不同宿主菌里的表达

将pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体分别转化BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS、Rosetta(DE3)、ER2566及E. coli K12 TB1。37℃培养至对数生长期,OD值等于0.6,加入IPTG,使其浓度达到1mmol/mL,37℃诱导表达目的蛋白。结果显示,pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40只在BL21(DE3) pLysS中表达,见图1。使用Kodak1D电泳分析软件

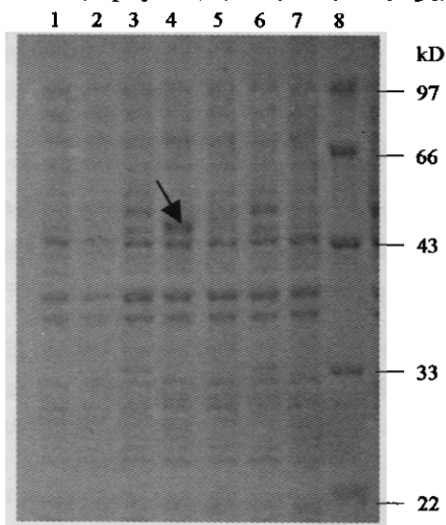


图1 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 载体在不同宿主菌里的表达

1 BL21 (control), 2 BL21 (DE3), 3 Rosetta (DE3) BL21, 4 BL21 (DE3) pLysS
5 ER2566 (control), 6 ER2566, 7 E. coli K12TB1, 8 Marker

分析目的蛋白的表达量, 表达量为15%。

2.3 37℃时, 培养基中含有0.1mol/L葡萄糖时, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在不同宿主菌里的表达

结果显示, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40只在BL21(DE3) pLysS中表达。使用Kodak1D电泳分析软件分析目的蛋白的表达量, 表达量为10%左右。

2.4 26℃时 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在不同宿主菌里的表达

结果显示, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40在BL21(DE3) pLysS中表达。使用Kodak1D电泳分析软件分析目的蛋白的表达量, 表达量为10%左右, 见图2。

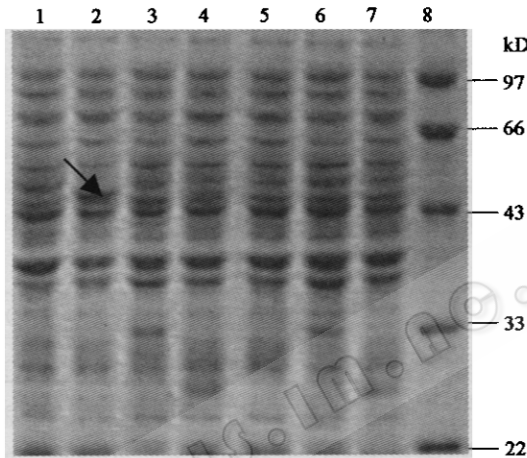


图2 ET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在不同宿主菌里的表达 26℃

1 BL21 (control), 2 BL21 (DE3) pLysS, 3 BL21 (DE3), 4 Rosetta (DE3),
5 ER2566 (control), 6 ER2566, 7 *E. coli* K12 TB1, 8. Marker

2.5 26℃时, 培养基含有0.1mol/L葡萄糖时, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在不同宿主菌里的表达

结果显示, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40在BL21(DE3) pLysS中能表达。使用Kodak1D电泳分析软件分析目的蛋白的表达量, 表达量为10%左右。

2.6 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在BL21(DE3) pLysS里的表达定位

结果显示, IL-10₂₃₋₅₇-PE40是分泌在BL21(DE3) pLysS的周质腔, 见图3。

2.7 表达产物的免疫印迹鉴定

对pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在BL21(DE3) pLysS里的表达进行免疫印迹鉴定, 结果表明, 在相应位置, 显现一条区带的免疫印迹, 产物为IL-10₂₃₋₅₇-PE40, 从而说明

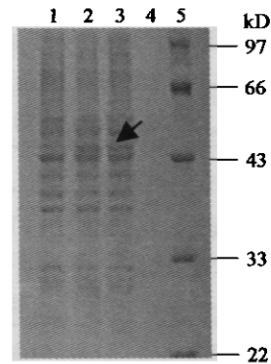


图3 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40载体在BL21 (DE3) pLysS里的表达定位

1 BL21 (DE3) pLysS (Con), 2 BL21 (DE3) pLysS,
3 periplasm, 4 Insoluble, 5 Marker

表达产物是分泌在周质表达。如图4所示。

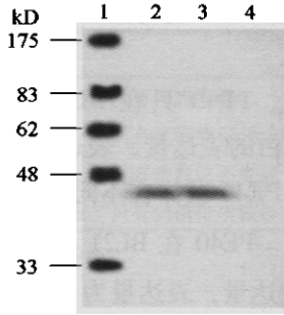


图4 重组蛋白 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 的 Western blot 的鉴定

1 Marker, 2 Periplasmic fraction (expression), 3 Total cell protein (expression), 4 Total cell protein (control)

2.8 测试质粒的稳定性

根据质粒稳定性规律, 表2所示, pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 在 BL21 (DE3) 中不稳定; 在 Rosetta (DE3)、ER2566、TB1 宿主菌中稳定。

表2 质粒的稳定性测试

菌种	不同培养基的生长情况 (个/平板)			
	LB	LB + Amp	LB + IPTG	Amp + IPTG
BL21	± 200	± 5	± 5	± 3
RosettaBL21	± 200	± 180	± 4	0
ER2566	± 200	± 200	± 4	0
TB1	± 200	± 200	± 5	0

2.9 利用蛋白分析软件 PE 重组毒素疏水性、前 18 位氨基酸电荷分布

以精氨酸、赖氨酸计为一个正电荷 (+1), 谷氨酸、天冬氨酸计为一个负电荷 (-1), 其它氨基酸计为中性 (0), 分别计算 MSH-PE40、IL-10₂₃₋₅₇-PE40、LHRH-PE35、EGF-PE38、LHRH-PE40N 端第 1 至 18 位氨基酸的电荷总数; 以 PEA 前 20-30 个氨基酸的疏水性为参照, 通过两种蛋白分析软件 DNASTar、ANThewin 分析比较这 6 种 PE 重组毒素前 20-30 位氨基酸的疏水性; 分析结果见表3。

表3 不同 PE 重组毒素的疏水性和电荷分布分析

性质	不同的 PE 重组毒素					
	1	2	3	4	5	6
Charge	+1	+2	-3	-2	-3	-2
Hydrophobic	弱	弱	较强	弱	较强	弱

注: 1 MSH-PE40, 2 IL-10₂₃₋₅₇-PE40, 3 EGF-PE40, 4 LHRH-PE35, 5 EGF-PE38, 6 LHRH-PE40

2.10 6 种 PE 重组毒素分泌表达的 SDS-PAGE 分析

将 pET-20b-IL-10₂₃₋₅₇-PE40 转化至 BL21 (DE3) pLysS; 另外 5 种用 pET-20b 构建 PE 重组毒素质粒转化至 Rosetta (DE3), 通过质粒稳定性实验证明其为稳定质粒后 IPTG 诱导表达, 结果显示只有 LHRH-PE40、LHRH-PE35 和 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 分泌表达 (图5)。

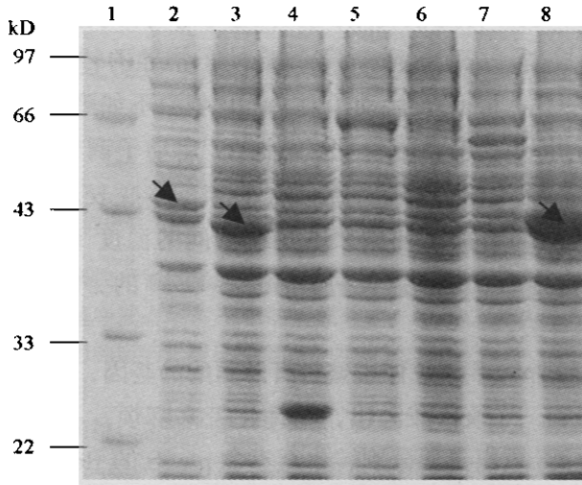


图 5 6 种 PE 重组毒素分泌表达的 SDS-PAGE 分析
1 Marker, 2 IL-1023-57-PE40, 3 LHRH-PE35, 4 Control,
5 EGF-PE38, 6 MSH-PE40, 7 EGF-PE40, 8 LHRH-PE40

3 讨论

本研究表明,并不是所有 PE 重组毒素融合信号肽序列后,就能分泌表达,影响蛋白分泌表达的因素有很多,但是,由于 PEA (绿脓杆菌外毒素)的前体中含有信号肽序列,是绿脓杆菌分泌的外毒素,这就提示我们,如果能提供合适的导向部分,采用合适的载体和宿主菌组合也许能让 PE40 重组免疫毒素分泌表达。实验结果显示,IL-10₂₃₋₅₇-PE40 能在 BL21 (DE3) pLysS 中分泌表达(我们以前的实验表明,MSH-PE40, EGF-PE38, EGF-PE40, LHRH-PE40 也能在 BL21 (DE3) pLysS 中分泌表达,结果未发表)。究其原因,我们认为虽然 pET 系统理论上讲可以严格调控目的基因的表达,但调控不是绝对的,即使在 IPTG 存在的情况下,也会有少量 lacUV5 启动子表达的 T7RNA 聚合酶,而且,由于 pET-20b 载体中不含有 lacI 阻抑蛋白基因和 lac 操纵子基因,目的蛋白的表达完全通过宿主菌 DE3 上的基因来调控,因此,在 IPTG 诱导前,存在目的蛋白的本底表达。任何重组蛋白在 *E. coli* 内表达都会或多或少地影响宿主的正常功能,并对宿主产生毒性^[3],可能 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 对 BL21 (DE3) 毒性大,这种本底表达就足以影响 BL21 (DE3) 宿主菌中质粒的稳定性,这一点从本文的质粒稳定性实验也可以得到证实,因此,导致了 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 在 BL21 (DE3) 中的不表达^[5]。在 BL21 (DE3) pLysS 中能稳定表达,主要是由于该宿主菌中除了含有 DE3 上的调控基因外,还含有 T7 溶菌酶质粒,T7 溶菌酶是一种双功能蛋白:它能够切割大肠杆菌细胞壁肽聚糖层,它也可以与 T7RNA 聚合酶结合,阻止转录^[4],未经 IPTG 诱导时,能防止目的蛋白的“漏”表达,不会造成质粒的不稳定,是一种“严谨”型质粒,一旦有 IPTG 诱导时,pLysS 提供的低水平溶菌酶对 T7RNA 聚合酶诱导后的目的蛋白表达影响很小,产生的 T7RNA 聚合酶比被少量溶菌酶抑制的要多,因而目的蛋白大量表达。

培养基中添加葡萄糖可以维持 pET 系统中低水平本底表达,当细菌生长到稳定期

时,葡萄糖会作为第一碳源首先被利用,如果此时葡萄糖缺乏,替代碳源的代谢导致将宿主菌 cAMP 水平提高,从而刺激 lacUV5 启动子指导的转录, T7RNA 聚合酶表达。与野生型 lac 启动子相比, lacUV5 启动子对 cAMP 刺激不如野生型敏感,但研究表明,足够的刺激可以提高 T7RNA 聚合酶水平,继而 T7 启动子调节的基因表达。已观察到在标准培养基中加入葡萄糖, lacUV5 启动子带来的本底表达大幅度降低^[3]。但从本实验来看,在培养基中加不加葡萄糖,以及在不同的温度下, IL-10₂₃₋₅₇-PE40 只能在 BL21 (DE3) pLysS 中分泌表达,这说明 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 的分泌表达与 cAMP 浓度关系不大,与菌种的选择有关。

由于 BL21 (DE3) pLysS 染色体中整合有溶菌酶的基因,在常温和 4℃ 之间来回转换操作时极易细胞裂解,导致核酸溢出,给纯化带来麻烦,不利于规模制备。因此我们将本室构建的几种 PE 重组毒素分别转化至不含 pLysS 的 Rosetta (DE3) 中,初步探索 PE 重组毒素的分泌表达机理,结果表明,只有 LHRH-PE40 和 LHRH-PE35 能分泌表达。这几种 PE 重组毒素的导向部分大小在 10~53 个氨基酸之间,经过我们的调整后,与 PE 融合后不会干涉 PE 的阅读框,因此,导致有些重组毒素不能分泌表达的主要原因是导向的性质。从目前研究文献来看,对于一种分泌蛋白来说,对其适当改造后能否继续分泌周质表达,取决于两个条件:在 N 端前 18 个氨基酸的净电荷为 0 或 -1、-2、-3; N 端前 20~30 位氨基酸的疏水性不能太强^[6,7]。通过 DNASTar 和 ANThewin 蛋白软件分析了本室构建的 6 种 PE 重组毒素前 20~30 位氨基酸疏水性和电荷分布情况,只有 LHRH-PE40 和 LHRH-PE35 达到这两个条件,其它之所以不能分泌周质表达,我们分析,可能是 pelB 信号肽将重组蛋白“锚定”在大肠杆菌细胞膜上后^[8],重组蛋白的前 20-30 位氨基酸疏水性强,与疏水性的细胞膜通过疏水键结合的能力强,阻碍重组蛋白的转膜,或者说前 18 个氨基酸中的正电荷氨基酸与膜上带负电磷脂层有吸引作用,而周质膜上的正电荷对其又有排斥作用,导致所耗能量超过肽的转膜自由能,因此,合成的肽不能转膜至细胞的周质腔内。下一步实验我们将尝试改变 IL-10₂₃₋₅₇-PE40 的 N 端前 18 个氨基酸的净电荷,进一步证实 PE 重组毒素的分泌机理。

参考文献

- [1] 吴乃虎编著. 基因工程原理(下册)(第2版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 彭其胜, 张国立, 吴广谋, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(4): 504~509.
- [3] Grossman, T H, Kawasaki E S, Punreddy S R, et al. Gene, 1998, 209: 95~103.
- [4] Huang J, Villemain J, Padilla R. J Mol Biol, 1999, 293: 457~475.
- [5] pET System Manual 10th ed. USA: Novagen press, 2002.
- [6] Kajava A V, Zolov S N, Kalinin A E, et al. J Bacteriology, 2000, 182: 2163~2169.
- [7] Davis N G, Peter M. Cell, 1985, 41: 607~614.
- [8] Engelman D M, Steitz. Cell, 1981, 181(24): 411~422.