

血小板活化因子乙酰水解酶融合蛋白的表达、纯化及鉴定

邹颖¹, 毕新岭¹, 顾军^{1*}, 缪明永², 王梁华², 时多²

(1. 第二军医大学长海医院皮肤科, 上海 200433; 2. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 获得血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)全长编码基因并在 GST 原核表达系统中表达。**方法:** 通过 RT-PCR 方法, 从正常人外周血单个核细胞(PBMC)中扩增出 PAF-AH 全长编码基因, 将其克隆至大肠杆菌表达载体 pGEX-4T-3, 转化大肠杆菌 BL21 并诱导表达, 采用 GST 蛋白纯化系统进行纯化。所得纯化蛋白以 SDS-PAGE 及 Western 印迹方法鉴定, 并进行酶活性测定。**结果:** 获得了 PAF-AH 基因, 序列分析与 GenBank 数据库中序列一致。SDS-PAGE 及 Western 印迹结果显示, 诱导表达出可溶性的融合蛋白, 其相对分子质量与预期相符。纯化蛋白经 Western 印迹检测能够被特异性抗体所识别, 具有免疫学活性; 酶活性检测证实其具有特异的水解 PAF 的活性。**结论:** 本实验在大肠杆菌表达系统中高效表达了有活性的 PAF-AH 蛋白。

[关键词] 血小板活化因子; 乙酰水解酶; 基因表达; 纯化

[中图分类号] Q 786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0504-04

Expression, purification and identification of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase fusion protein

ZOU Ying¹, BI Xin-ling¹, GU Jun^{1*}, MIAO Ming-yong², WANG Liang-hua², SHI Duo² (1. Department of Dermatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To obtain the full-length of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) gene and express it in prokaryocytes. **Methods:** The full-length PAF-AH gene was amplified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by RT-PCR and then cloned into the expression vector pGEX-4T-3. The PAF-AH-GST was expressed in *E. coli* BL21 and purified with GST purifying system. The products was identified by SDS-PAGE and Western blot, and their enzymatic activities were detected. **Results:** Sequence analysis indicated that the sequence of the obtained PAF-AH gene was identical with that in the GenBank. SDS-PAGE and Western blot confirmed the successful expression and purification of PAF-AH, with the molecular weight as expected. Western blotting showed that the purified protein could be recognized by specific antibodies and had immune activities. Enzymatic activity detection confirmed that the protein could specifically hydrolyzing PAF. **Conclusion:** Recombinant PAF-AH protein with biological activity has been efficiently expressed in *E. coli* in the present study.

[KEY WORDS] platelet activating factor; acetylhydrolase; gene expression; purification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 504-507]

血小板活化因子 (platelet-activating factor, PAF) 是一种具有多种生物学活性的磷脂, 不仅在生殖、胚胎发育、血压等方面具有调节功能, 同时又是强效的炎症介质, 参与多种疾病的发生。血小板活化因子乙酰水解酶 (platelet-activating factor acetylhydrolases, PAF-AH) 作为 PAF 的功能性拮抗剂, 通过控制 PAF 的释放和降解, 维持其在体内的生理平衡^[1-2]。近年来的研究表明, PAF-AH 的编码基因为炎症性疾病尤其是某些异位性疾病和自身免疫性疾病的易感基因^[3-4]。

为了进一步研究 PAF-AH 在相关疾病中的作用机制, 尤其是其基因改变对酶活性乃至疾病发生发展的影响, 我们对血浆型 PAF-AH 基因进行了克隆, 表达出特异性的融合蛋白, 并纯化得到高纯度的

具有生物学活性的 PAF-AH 蛋白, 为后续实验室相关研究建立了良好的平台, 也为临床中相关疾病机制的探讨、诊断及治疗技术的新探索创造了条件。

1 材料和方法

1.1 材料 正常人外周血来自解放军上海血站。总 RNA 提取试剂盒、Marker IV、HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天为时代公司。逆转录试剂盒、PCR 试剂、限制性内切酶 *Sal* I 和 *Not* I、DNA marker

[基金项目] 国家自然科学基金 (30271197)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30271197)。

[作者简介] 邹颖, 硕士生, 主治医师。

E-mail: zysh_96@163.com

* Corresponding author. E-mail: gujun01@medmail.com.cn

DL2000、pMD18-T、 T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,吸附柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海博光生物公司。pGEX-4T-3 质粒、Bulk GST Purification Modules 及凝血蛋白酶购自 Amersham 公司。PAF-AH 多克隆抗体购自 Cayman 公司。引物由上海申能博彩生物公司合成。

1.2 总 RNA 的提取 常规分离正常人外周血单个核细胞(PBMC),提取 RNA。提取方法参照试剂盒中的说明书。将 RNA 沉淀溶于 40 μ l 无 RNA 酶水中,琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 PAF-AH 基因的 RT-PCR 取含 1 μ g RNA 的溶液,分别加入 10 \times RT 缓冲液 2 μ l,dNTP Mixture(各 10 mmol/L)2 μ l,Oligo(dT) 1 μ l,RNase 抑制剂 0.5 μ l,AMV 逆转录酶 1 μ l,室温静置 10 min,42 $^{\circ}$ C 保温 1 h,99 $^{\circ}$ C 5 min,冰浴冷却 2 min。所得产物即为 cDNA 第一链。根据 GenBank 数据库中 PAF-AH 的序列,应用软件 Prime premier 5.0 设计了扩增全长编码基因的引物并合成,序列如下:P1 5'-ACG CGT CGA CAT GAT ACA AGT ACT GAT GGC-3',P2 5'-AAG GAA AAA AGC GGC CGC CTA ATT GTA TTT CTC TAT TC-3'。PCR 体系:10 \times PCR 缓冲液 2 μ l,Ex Taq 0.25 μ l,dNTP 1.5 μ l,P1、P2 各 0.25 μ l,模板 2 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。所得目的片段含 Sal I 和 Not I 酶切位点。

1.4 RT-PCR 产物的克隆与测序 胶回收 PCR 产物,接入克隆载体 pMD18-T,转化大肠杆菌 JM109。抽取质粒,双酶切鉴定后送上海申能博彩生物公司测序。

1.5 PAF-AH GST 表达载体的构建 取连接了目的基因片段的 pMD18-T 及 pGEX-4T-3 质粒,均以 Sal I 和 Not I 双酶切处理后,以 T_4 DNA 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌 BL21,经双酶切鉴定后测序。

1.6 PAF-AH-GST 融合蛋白的表达及鉴定 取构建的表达载体菌,按照 Amersham 的 GST 操作指南,摇菌至 D_{600} 值 0.6~1.0 左右,以终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 30 $^{\circ}$ C 诱导 3~4 h,收集细菌,以 PBS 重悬后超声裂菌。分别取菌体和裂菌上清做 SDS-PAGE 鉴定。

1.7 PAF-AH 的纯化 收集 1 L 诱导菌,按 100 mg/ml 加入 1 \times PBS 重悬,超声裂菌后,收集上清与 Glutathione Sepharose 4B 混合后,室温轻柔搅拌 30 min,过 Amersham 一次性亲和柱,控制流速为 1 ml/min,以 50 倍柱床体积的 1 \times PBS 洗柱,之后以

洗脱液洗下融合蛋白,或者以凝血蛋白酶切下 GST 融合标签,收集流出的液体,即为纯化的融合蛋白或者 PAF-AH 蛋白。

1.8 纯化蛋白的免疫学鉴定 按照常规 Western 印迹法,取纯化蛋白与 PAF-AH 多克隆抗体杂交,以 DAB-HRP 法显色,参照文献[5]方法对纯化的融合蛋白及 PAF-AH 蛋白进行鉴定。

1.9 纯化蛋白的酶活性鉴定 取纯化蛋白,以 Bradford 法定量后,应用 PAF-AH 活性检测试剂盒,采用酶水解底物显色法测定其活性。设置阴性对照孔、阳性对照孔(试剂盒提供标准 PAF-AH 蛋白)和样品孔,底物均为 2-硫代 PAF(2-Thio PAF),室温放置 30 s,酶标仪读取不同时间各孔在 405 nm 波长下的光密度值(D_{405}),并计算出各孔的光密度变化率 $\Delta D_{405}/\text{min}$ 。根据以下公式计算出纯化 PAF-AH 的活性:

$$\text{PAF-AH 活性} = \frac{\Delta D_{405}/\text{min}}{10.66 (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})} \times \frac{0.225 (\text{ml})}{0.01 (\text{ml})} \times \text{样本稀释倍数}$$

2 结果

2.1 PAF-AH 基因的获取 从健康人 PBMC 提取的 RNA,经 RT-PCR 获得 PAF-AH 的全长编码基因。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳可于 1 200 bp 左右见单一明亮条带(图 1),与预期大小一致。基因片段接入克隆载体 pMD18-T 后,经双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳可于相应大小见载体及目的基因片段的条带(图 2)。测序结果表明,克隆的 PAF-AH 基因序列与 GenBank 数据库中的序列一致。

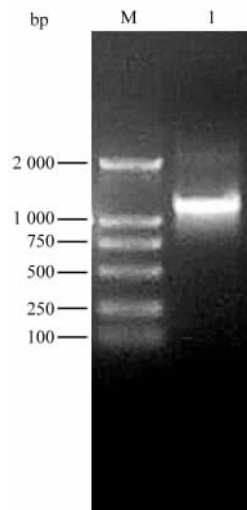


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

M: DNA marker DL2000; 1: RT-PCR products

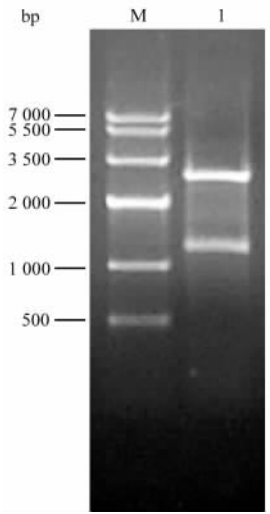


图2 重组克隆载体 pMD18-T-PAF-AH 的酶切鉴定
 Fig 2 Restriction enzyme digestion of recombinant expression plasmid pMD18-T-PAF-AH
 M: DNA marker IV; 1: pMD18-T-PAF-AH/(Sal I + Not I)

2.2 PAF-AH GST 表达载体的构建 经 Sal I 和 Not I 双酶切处理后,将目的片段与表达载体 pGEX-4T-3 连接,所构建的载体即为 PAF-AH 的重组表达载体。经酶切鉴定可于 1 200 bp 的目的基因大小处及 4 900 bp 大小处各见单一明亮条带(图 3)。

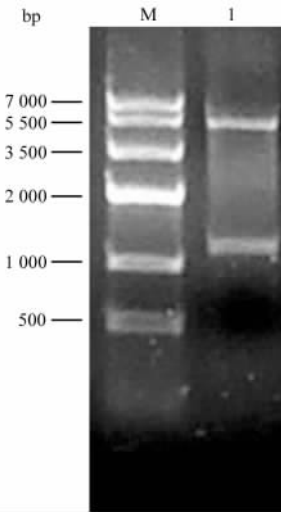


图3 重组表达载体 pGEX-4T-3-PAF-AH 的酶切鉴定
 Fig 3 Restriction enzyme digestion of recombinant expression plasmid pGEX-4T-3-PAF-AH
 M: DNA marker IV; 1: pGEX-4T-3-PAF-AH/(Sal I + Not I)

2.3 PAF-AH-GST 融合蛋白的表达与鉴定 对 PAF-AH-GST 融合蛋白的大批量诱导条件进行优化,检测了不同的菌浓度、温度、IPTG 的浓度以及诱导时间下蛋白上清的表达量。结果表明在菌液摇至 D_{600} 值为 1.0 左右,IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L

时,30℃ 诱导 3~4 h,表达量较高。取诱导表达菌液及上清做 SDS-PAGE,可在相对分子质量约 72 000 处见蛋白条带,与预期大小一致(图 4)。

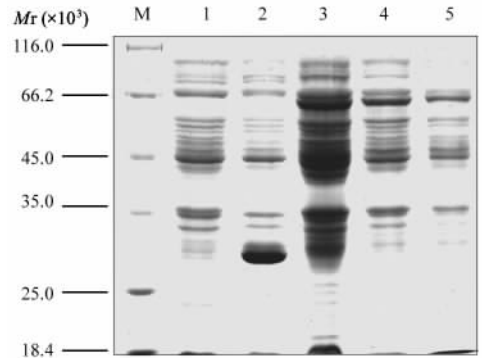


图4 PAF-AH-GST 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定
 Fig 4 SDS-PAGE analysis of fusion protein PAF-AH-GST
 M: Protein marker; 1: Total protein of BL21; 2: Total protein of BL21 transformed with pGEX-4T-3; 3: Total protein of BL21 transformed with pGEX-4T-3-PAF-AH expressed clone after ultrasonic treatment; 4-5: Supernatant of pGEX-4T-3-PAF-AH expressed clone after ultrasonic treatment

2.4 PAF-AH 蛋白的纯化与免疫学鉴定 经 Glutathione Sepharose 4B 亲和柱纯化的蛋白,以 SDS-PAGE 检测纯化的 PAF-AH-GST 融合蛋白及 PAF-AH 蛋白,可分别于相对分子质量为 72 000 及 44 000 处见目的条带。用 PAF-AH 多克隆抗体进行免疫学检测,也可于相应相对分子质量大小处见蛋白印迹(图 5)。

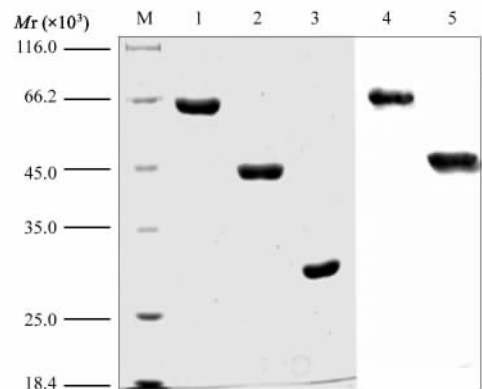


图5 纯化蛋白的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析
 Fig 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified protein

M: Protein marker; 1-3: SDS-PAGE analysis of purified PAF-AH-GST, PAF-AH and GST; 4-5: Western blot analysis of PAF-AH-GST and PAF-AH

2.5 纯化蛋白的酶活性鉴定 酶活性测定结果表明,

纯化的 PAF-AH 蛋白具有特异性的水解 2-Thio PAF 的活性,活性值为 $39.78 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ (PAF-AH 标准品活性为 $41.36 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

3 讨论

PAF-AH 属于磷脂酶 A2 家族,特异性作用于甘油骨架的 sn-2 位乙酰基或短链(含氧化)脂肪酸,水解强炎性介质 PAF 及氧化的磷脂使之失活,而不攻击正常的膜磷脂和脂蛋白^[1-2]。国内外研究证实 PAF-AH 表达水平与多种具有炎症背景的疾病相关,如哮喘、心肌梗死、多发性硬化症、败血症、炎性肠病等^[6-8]。

对 PAF-AH 在疾病中的相关机制的研究中,证实 PAF-AH 的 DNA 序列中存在导致酶生物学性质改变的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),如 Arg92His、Ile198Thr、Val279Phe、Gln281Arg 及 Val379Ala 等^[9-10],这些 SNP 可能与上述炎性疾病相关,但其与银屑病等免疫性皮肤病的相关性未见系统报道。为明确 PAF-AH 的 SNP 与免疫性皮肤病的相关性,我们拟应用 GST 表达系统构建其原核表达载体,以得到该蛋白的可溶性高表达;在此基础上运用点突变技术获得各个携带特异性 SNP 的 PAF-AH 基因并予以表达,进一步研究不同 SNP 对酶活性的影响,及其在银屑病等皮肤病的发生发展中的作用。

我们用 GST 表达系统成功表达并纯化出了重组 PAF-AH。GST 基因表达系统广泛用于各种融合蛋白的表达,该系统具有表达效率高、操作简便等特点,其表达的融合蛋白质带有 GST 标签,可利用含有还原型谷胱甘肽的纯化柱,通过一步达到 90% 以上的纯化,并保存良好的抗原性及功能^[11-12],为后续的活性相关研究奠定良好的基础。鉴于不同的融合蛋白诱导条件差异较大,我们在蛋白表达过程中,从诱导时机、IPTG 浓度、诱导时间等多方面优化其诱导条件,发现在诱导前菌液 D_{600} 值为 1.0 左右,IPTG 终浓度 0.1 mmol/L 时,于 30℃ 诱导 3~4 h 时上清中蛋白的表达量较高,形成的包涵体较少,蛋白活性保存较好。

通过本研究,我们获得了高纯度的、具有免疫性及生物学活性的重组 PAF-AH 蛋白,为进一步研究其基因改变对酶活性的影响,探讨其在银屑病等多种相关疾病的病因、病理中的作用机制,乃至今后的

生物学治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Prescott S M, Zimmerman G A, Stafforini D M, et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 419-445.
- [2] Yamaguchi S, Tomomatsu N, Komatsu H. Effect of Y-24180, a receptor antagonist to platelet-activating factor (PAF), on allergic cutaneous reactions in actively sensitized mice[J]. *Inflamm Res*, 2000, 49: 584-590.
- [3] Tjoelker L W, Eberhardt C, Unger J, et al. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 25481-25487.
- [4] Kruse S, Mao X Q, Heinzmann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66: 1522-1530.
- [5] Lee E, Lee S J, Lee T Y, et al. cDNA cloning and expression of biologically active platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) from bovine mammary gland[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 580-583.
- [6] Stafforini D M, Satoh K, Atkinson D L, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97: 2784-2791.
- [7] Claus R A, Russwurm S, Dohrn B, et al. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in critically ill patients[J]. *Crit Care Med*, 2005, 33: 1416-1419.
- [8] Oshimoto H, Okamura S, Iida T, et al. Diagnostic value of the serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity in inflammatory bowel disease[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2005, 207: 65-71.
- [9] Castro Faria Neto H C, Stafforini D M, Prescott S M, et al. Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor-acetylhydrolase[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005, 100(Suppl 1): 83-91.
- [10] Osoegawa M, Niino M, Ochi H, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism and its activity in Japanese patients with multiple sclerosis[J]. *J Neuroim*, 2004, 150: 150-156.
- [11] Wu X, Oppermann U. High-level expression and rapid purification of rare-codon genes from hyperthermophilic archaea by the GST gene fusion system[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 786(1-2): 177-185.
- [12] Haneskog L, Johansson H J, Heijbel K. A fast and simple purification of GST fusion proteins using prepacked GSTrap affinity columns[J]. *Life Sci News*, 2000, 4: 651-655.

[收稿日期] 2006-09-07

[修回日期] 2007-03-08

[本文编辑] 曹静