

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00319

可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART)及其突变体的表达纯化及生物活性观察

Expression, purification and bioactivity observation of cocaine and amphetamine regulated transcript and its mutants

周京晶,路长林,由振东*

第二军医大学基础部神经生物学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**表达纯化可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART)及其突变体,观察其对大鼠进食行为的影响。**方法:**PCR扩增 CART 活性片段 CART₅₅₋₁₀₂ cDNA,构建表达 CART₅₅₋₁₀₂ 原核表达载体,并对其 68 位和 94 位半胱氨酸残基突变,构建表达 CART₅₅₋₁₀₂ (Cys68Ser)和 CART₅₅₋₁₀₂ (Cys94Ser)原核表达菌株,经 IPTG 诱导表达后,亲和层析纯化 3 种小肽;行为学技术检测原核表达小肽对大鼠进食行为的影响。**结果:**获得的重组 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体的纯度在 95% 以上,产物得率约 75%; CART₅₅₋₁₀₂ 可显著抑制饥饿大鼠的进食行为,而 68 和 94 位突变体对饥饿大鼠的进食行为无明显影响。**结论:**原核表达系统可以成功制备高纯度 CART 活性小肽和突变体,68 位和 94 位突变导致 CART 抑制进食的作用消失。

[关键词] 可卡因-苯丙胺调节转录肽;突变体;基因表达;纯化;二硫键

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0319-03

可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine-amphetamine-regulated transcript, CART)是 1995 年发现的,可能是一种内源性精神活性物质,并与药物复吸有关^[1-5]。CART 具神经递质的特征,又不与任何一种神经调质 mRNA 同源,是一类与药物依赖有密切关系的神经肽,在体内广泛分布在脑、内脏、肾上腺、垂体等处^[6-9]。CART 也是目前发现的少数几种可通过血脑屏障(BBB)的肽类物质,如果能以 CART 的结构为基础,合成 CART 受体的拮抗剂或阻断剂,那么这些与 CART 结构相似的肽类物质就既能通过 BBB,又能抑制吗啡依赖。CART₅₅₋₁₀₂ 片段的二硫键正常形式和完全展开形式对大鼠的进食产生截然相反的作用^[10],二硫键的维持与稳定直接影响了 CART 肽的生物学特性。

本研究对可能影响 CART 生物学活性的第 1 对二硫键中的 68 位氨基酸和第 2 对二硫键中的 94 位氨基酸进行了突变,并重组表达纯化 CART₅₅₋₁₀₂、68 位突变体和 94 位突变体,观察其对大鼠进食的影响,为探讨不同形式的 CART 肽对药物依赖形成的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 菌种:大肠杆菌 Origami B (DE3)购自 Novogen 公司;ultra-Pfu DNA 聚合酶购自 Stratagen 工具酶公司;限制内切酶、T4 DNA 连接酶购自 BioLab 公司;Ni·NAT His·Bind亲和层析柱和填料等购自 Pharmacia 公

司。雄性 SD 大鼠(海军医学研究所动物房),体质量 200~230 g,随机分为实验组和对照组,自由饮水、摄食。

1.2 引物设计 从 GenBank 上检索到大鼠 CART mRNA 序列,用 DNA Star (DNASar, Inc.) 软件设计扩增 CART₅₅₋₁₀₂ 引物,上游引物引入 Nde I 酶切位点,下游引物引入 Xho I 酶切位点,同时设计 68 位和 94 位突变引物,送上海生工生物工程技术有限公司合成。上游引物 Nde I (27 bp):5'-ACG CCA TAT GAT TCC GAT CTA TGA GAA-3';下游引物 Xho I (29 bp):5'-GTC CTC GAG TCA CAA GCA CTT CAA GAG GA-3'。

1.3 PCR 扩增、原核表达载体构建和突变体构建 按 DNA Star 提供的最佳 Tm 值,经 35 个循环,电泳回收扩增 CART 片段。经 Nde I 和 Xho I 消化,回收,将片段与经 Nde I 和 Xho I 酶切回收 Pet-32a(+)连接,酶切筛选阳性克隆,并送上海生工生物工程技术有限公司测序确认。将确认阳性质粒,转化 Origami B (DE3),构建成表达 CART₅₅₋₁₀₂ 小肽的原核表达菌株。突变体的构建按 Stratagen 公司点突变试剂盒操作流程进行,测序确认成功后,制备质粒,转化 Origami B (DE3)。

1.4 蛋白表达 将含有 CART 表达载体和突变体载体的单克隆菌株分别接种到 100 ml LB,37℃ 培养过夜。取 20 ml 过夜培养菌液接种到 1 000 ml LB 中培养到 D=0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,转入 37℃ 摇床 250 次/min 诱导 3 h。4℃ 下,17 300×g 10 min 收集菌体。以 5 ml/湿质

[收稿日期] 2008-08-29 **[接受日期]** 2008-10-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30271258,3067244);国家重点基础研究项目("973"计划,2003CB515407);上海市重点基金(06JC14008)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271258, 3067244), the National Key Basic Research Program of China(973 Project,2003CB515407),and the Key Foundation of Shanghai(06JC14008)。

[作者简介] 周京晶,硕士。E-mail:zjbird@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-81871043,E-mail:youzd630719@yahoo.com.cn

量(g)悬浮菌体于预冷的裂解缓冲液 PBS 中(20 mmol/L 磷酸缓冲液,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0),反复冻融法(将细胞在-20℃冰冻,室温融解,反复多次)及超声破菌法(冰浴条件下超声波破碎菌体,100 W 超声 3 s,停 1 s,超声 30 min)裂解菌体,17 300×g 离心 30 min,收集上清。沉淀用相同体积裂解缓冲液重悬,取上清及重悬沉淀各 20 μl,加等体积 2X 蛋白电泳上样缓冲液,100℃处理 3 min 后,SDS-PAGE 三层胶电泳,考马斯亮蓝染色,确定表达目的蛋白。将能正确表达目的蛋白的菌液制备甘油菌,-80℃保存。

1.5 蛋白纯化 取培养菌裂解液上清,离心(17 300×g、15 min、4℃)。用 5 倍柱体积的预冷平衡液洗涤(平衡液/洗涤液:20 mmol/L 磷酸缓冲液,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)平衡 1 ml Ni Sepharose 6 FF 柱,加入 15 ml 裂解液上清,用预冷平衡液洗涤洗脱杂蛋白,并将流速控制在每小时 2~10 倍柱体积,当流出液的 D_{280} 值接近上柱前 D 值后,加入 5 倍体积的洗脱液(洗脱液:20 mmol/L 磷酸缓冲液,0.5 mol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑,pH 8.0),保留 30 min 后开始洗脱。洗脱目的蛋白时,将流速控制于每小时 2~10 倍柱体积,每 ml 收集 1 管,每管取 20 μl 洗脱液,电泳鉴定纯化蛋白的纯度。将洗脱出来的含目的蛋白的溶液置半透膜中,用 500 ml 预冷 PBS 透析 12 h,每 3~4 h 更换 1 次 PBS 透析液。将终产物冰冻干燥,置-20℃保存备用。

1.6 大鼠进食行为测定 SD 雄性大鼠随机分为 4 组:脑脊液组(对照)、CART₅₅₋₁₀₂ 组、CART₅₅₋₁₀₂₋₆₈ 组和 CART₅₅₋₁₀₂₋₉₄ 组($n=10$)。大鼠在戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉下,按常规侧脑室埋植注射用导管,手术 7 d 后,大鼠禁食 24 h,侧脑室注射含有 CART₅₅₋₁₀₂ 或突变体的人工脑脊液 5 μg/5 μl,立即将大鼠放入代谢笼中,连续测定注射后同一只大鼠第 1、2、3、4 和 24 h 的进食量。观察 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体对大鼠饥饿后进食行为的影响。

1.7 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 统计软件中 one way ANOVA 检测组间差异,LSD 被用于检验组间差异, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CART₅₅₋₁₀₂ 原核表达载体及其突变体的的构建 将从大鼠脑 cDNA 中 PCR 扩增的 CART₅₅₋₁₀₂ cDNA 连接到原核表达载体 pET-32a(+)多克隆位点 *Nde* I 和 *Xho* I 之间,阳性克隆测序表明插入序列没有发生突变,且正确与 His 标签融合。用 Stratagen 公司 ultra-Pfu DNA 聚合酶将 CART 原型表达载体 68 位和 94 位半胱氨酸残基突变为丝氨酸残基,阳性克隆测序表明除 68 位和 94 位发生有效突变外,其他位点没有发生其他突变。

2.2 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体的表达优化 如图 1 所示。各表达菌株经 IPTG 诱导后出现了 1 条很浓的相对分子质量约 6 400 的条带,而未经 IPTG 诱导的表达菌株无明显条带,

表明 CART₅₅₋₁₀₂、CART₅₅₋₁₀₂₋₆₈ 和 CART₅₅₋₁₀₂₋₉₄ 的转化菌经 IPTG 诱导后确实表达了相对分子质量约 6 400 的蛋白,诱导表达的该蛋白相对分子质量与 His-CART 融合蛋白的相对分子质量理论计算值一致,灰度扫描显示,该融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 50%。

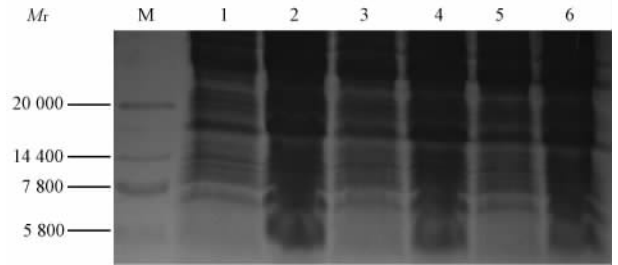


图 1 表达蛋白的 SDS-PAGE 三层胶电泳图

M:蛋白相对分子质量标准;1:未经 IPTG 诱导的 Origami B (DE3) CART₅₅₋₁₀₂ 菌;2:经 IPTG 诱导的 Origami B(DE3)CART₅₅₋₁₀₂ 菌;3:未经 IPTG 诱导的 Origami B (DE3)CART₅₅₋₁₀₂₋₆₈ 菌;4:经 IPTG 诱导的 Origami B (DE3)CART₅₅₋₁₀₂₋₆₈ 菌;5:未经 IPTG 诱导的 Origami B (DE3) CART₅₅₋₁₀₂₋₉₄ 菌;6:经 IPTG 诱导的 Origami B (DE3) CART₅₅₋₁₀₂₋₉₄ 菌

目的产物条带在沉淀中占菌体蛋白总量的 60% 以上,而在上清中仅占总量的 20% 左右,说明目的蛋白绝大部分存在于沉淀中。为简化纯化步骤,降低以包涵体形式表达的重组蛋白与天然蛋白存在的活性差异,经过优化诱导条件,将培养体积降低到 500 ml,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,诱导条件改变为 18℃ 摇床 200 次/min 12 h。目的产物条带在上清中占菌体蛋白总量的 60% 以上,而在沉淀中仅占总量的 30% 左右,说明目的蛋白在优化诱导条件后,可溶性增加,大部分目的产物存在于上清中。

2.3 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体的纯化 取适量纯化的蛋白样品,SDS-PAGE 三层胶电泳,结果见图 2 和图 3,蛋白纯度大于 95%,纯化产物得率约为 75%。

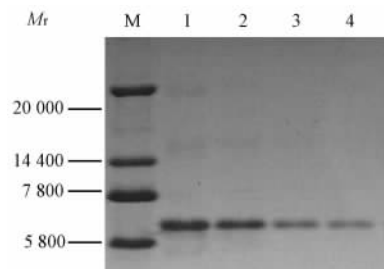


图 2 重组 CART₅₅₋₁₀₂ 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 三层胶电泳图

M:蛋白相对分子质量标准;1~4:逐步纯化的 CART₅₅₋₁₀₂ 蛋白

2.4 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体对大鼠进食行为的影响 结果(图 4)显示:CART₅₅₋₁₀₂ 显著抑制饥饿大鼠第 1 h 和第 24 h 进食量,而突变体对饥饿大鼠的进食行为无明显影响($P<0.05$)。

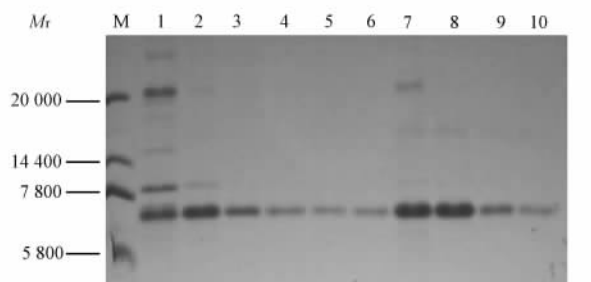


图3 重组 CART 蛋白突变体纯化后的 SDS-PAGE 三层胶电泳图

M: 蛋白相对分子质量标准; 1~6: 分步纯化的 CART₅₅₋₁₀₂₋₆₈ 蛋白; 7~10: 分步纯化的 CART₅₅₋₁₀₂₋₉₄ 蛋白

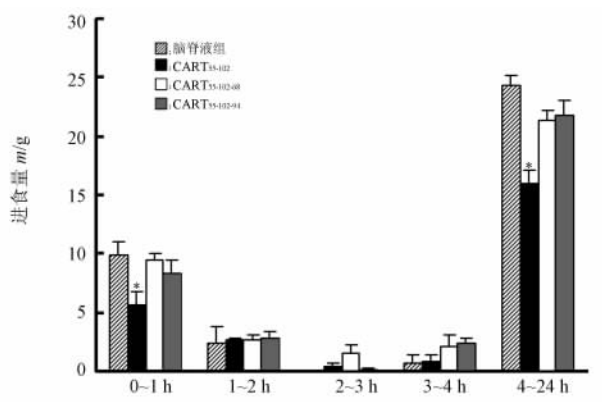


图4 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体对大鼠进食行为的影响

* $P < 0.05$ 与脑脊液组比较; $n = 10, \bar{x} \pm s$

3 讨论

CART 是一种与奖赏、强化、摄食、应激、内分泌调节、感觉加工等生理过程密切相关的肽类神经递质^[6-12]。CART 除具有摄食行为的独特效应外,它还是一种中脑边缘多巴胺系统的调节物,现已成为一种具有潜在开发能力、用于治疗精神活性物质依赖的靶标^[4-5,13]。

质粒 pET32a-c(+) 在大肠杆菌 Origami B(DE3) 中能够高拷贝复制,并在诱导后高效表达。因表达的蛋白量过高,可能造成快速合成的蛋白分子来不及充分折叠,致使其可溶性下降而形成包涵体,给以后的纯化工作造成困难。为简化纯化步骤和降低可能的蛋白活性影响,在诱导时,我们选用了较低的诱导温度、较少的 IPTG 用量和较长的诱导时间,降低重组目的蛋白的合成速度和总产量,使其有较充分的时间进行正确折叠,结果大部分目的产物都以可溶的形式存在于裂解液的上清中,并提高了纯化率。

本研究用基因工程技术表达纯化 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体,以大鼠摄食量为指标检测其生物学活性,获得的重组 CART₅₅₋₁₀₂ 及其突变体的纯度在 95% 以上,产物得率约 75%。表达纯化的 CART₅₅₋₁₀₂ 可显著抑制饥饿大鼠的进食行为,这与已有文献^[10] 相符,证明构建的 CART₅₅₋₁₀₂ 具有生物学活性。68 位突变体和 94 位突变体对饥饿大鼠的进食行为无明显影响,可能由于二硫键被打断,CART 的二级结构

受到了影响,致使 CART 肽的生物学特性产生改变,表现为对饥饿大鼠的进食行为无明显影响。

CART 具有 3 对二硫键,分别是第 1 对:68 位和 86 位氨基酸;第 2 对:74 位和 94 位氨基酸;第 3 对:88 位和 101 位氨基酸。CART 活性片段中 3 对二硫键中的哪一对二硫键或 6 个半胱氨酸残基中哪一个半胱氨酸残基发挥关键性作用,需要进一步的研究探讨。本实验显示 68 位和 94 位半胱氨酸残基的突变可显著影响 CART 抑制饥饿诱导的进食行为,表明半胱氨酸残基的突变诱导的二硫键的破坏可导致 CART 生物活性的丧失,即二硫键的存在对 CART 的生物活性具有重要作用。

[参考文献]

- [1] Kuhar M J, Dall Vechia S E. CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides[J]. Trends Neurosci, 1999, 22:316-320.
- [2] Kuhar M J, Adams L D, Hunter R G, Vechia S D, Smith Y. CART peptides[J]. Regul Pept, 2000, 89(1-3):1-6.
- [3] Kuhar M J, Adams S, Dominguez G, Jaworski J, Balkan B. CART peptides[J]. Neuropeptides, 2002, 36:1-8.
- [4] Vicentic A, Jones D C. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 320:499-506.
- [5] Hubert G W, Jones D C, Moffett M C, Rogge G, Kuhar M J. CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75: 57-62.
- [6] Adams L D, Gong W, Vechia S D, Hunter R G, Kuhar M J. CART: from gene to function[J]. Brain Res, 1999, 848(1-2): 137-140.
- [7] Couceyro P R, Lambert P D. CART peptides: therapeutic potential in obesity and feeding disorders[J]. Drug News Perspect, 1999, 12:133-136.
- [8] Kimmel H L, Gong W, Vechia S D, Hunter R G, Kuhar M J. Intra-ventral tegmental area injection of rat cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 induces locomotor activity and promotes conditioned place preference[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294:784-792.
- [9] Couceyro P R, Fritz T. Production of recombinant CART peptides in *Escherichia coli* with agonist and antagonist effects on food intake in rats[J]. Protein Expr Purif, 2003, 32:185-193.
- [10] Lambert P D, Couceyro P R, McGirr K M, Dall Vechia S E, Smith Y, Kuhar M J. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y [J]. Synapse, 1998, 29:293-298.
- [11] Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript[J]. Gene, 1996, 169:241-245.
- [12] Abrahm H, Orsi G, Seress L. Ontogeny of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide and calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus in the rat [J]. Int J Dev Neurosci, 2007, 25:265-274.
- [13] 何慧, 由振东, 王永久, 李建红, 黄矛, 路长林, 等. 慢性吗啡处理加强可卡因-苯丙胺调节转录肽 mRNA 在大鼠下丘脑的表达[J]. 中国药物依赖性杂志, 2002, 11:95-99.

[本文编辑] 贾泽军