

膜联蛋白 A5 cDNA 的克隆及其在大肠杆菌中的表达

颜宏利, 贺 燕, 刘 凡, 杨湘越, 孙树汉*

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**克隆人膜联蛋白 A5 cDNA 并在大肠杆菌系统内作表达。**方法:**利用 RT-PCR 技术从人胎盘组织的总 RNA 扩增膜联蛋白 A5 的 cDNA 序列, 将该基因插入 GST 融合表达载体 pGEX-5T, 在 tac 启动子控制下, IPTG 诱导表达 GST 融合蛋白。以亲和层析法纯化表达的融合蛋白, 用 KPTT 法验证抗凝血活性。**结果:**凝胶电泳显示 PCR 扩增产物的长度为 978 bp, 重组质粒测序结果表明, 插入片段与人膜联蛋白 A5 的序列完全一致。在 IPTG 诱导下, K802 重组菌高效表达出相对分子质量为 58 000 的融合蛋白, 表达量占菌体总蛋白的 26%。纯化蛋白具有很强的抗凝血活性。**结论:**成功克隆人膜联蛋白 A5 基因并在大肠杆菌中高效表达。

[关键词] 膜联蛋白 A5; 克隆; 基因表达; 大肠杆菌

[中图分类号] Q 785 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0041-03

cDNA cloning and expression of Annexin A5 in *E. coli*

YAN Hong-Li, HE Yan, LIU Fan, YANG Xiang-Yue, SUN Shu-Han* (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To clone and prokaryotically express human annexin A5 (AnxA5) gene. **Methods:** The encoding sequence of human AnxA5 gene was amplified from human placenta total RNA by RT-PCR and was inserted into the GST fusion expression vector pGEX-5T. The expression of fusion protein GST-AnxA5 was induced by IPTG and the products were purified. The anticoagulant activity was assayed using modified kaolin partial thromboplastin time (KPTT). **Results:** The PCR product was 978 bp in size, which was consistent with the expected size of AnxA5; the sequence of insert was corresponded with the published encoding sequence of human AnxA5. Plasmid pGEX5T-AnxA5 was transformed into *E. coli* K802 and a new protein with a relative molecular weight of about 58 000 was induced after adding IPTG to the culture, which amounted to about 26% of the total bacterial protein. Then the protein was purified by affinity chromatography. KPTT assays showed that the purified protein had high anticoagulant activity. **Conclusion:** The encoding sequence of human AnxA5 gene is successfully cloned into the GST fusion expression vector pGEX-5T.

[KEY WORDS] annexin A5; cloning; gene expression; *E. coli*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 41-43]

膜联蛋白(annexins)是真核生物中广泛存在的一类钙依赖性磷脂结合蛋白。膜联蛋白 A5(annexin A5, 以下简称 AnxA5)是 annexins 家族中分布最广泛、含量最丰富的成员之一, 参与很多重要的生理功能: 如抗凝活性^[1]、钙离子通道活性^[2]、蛋白激酶 C 抑制活性^[3]等等。AnxA5 在钙离子存在的情况下, 对磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)具有很高的亲和力, 因此可以特异性地识别活化血小板和凋亡细胞, 一方面可以作为一种新型的分子探针用于细胞凋亡的检测, 另一方面可以作为载体发展血栓靶向的溶栓药物^[4]。近年来的研究发现, 肝细胞表达的 AnxA5 是乙肝病毒(HBV)的特异性受体, 所以可以通过封闭 AnxA5 来阻断乙肝病毒的感染。为了深入研究 AnxA5 的结构与功能以及在临床诊断和治疗中的应用, 我们从人胎盘组织中克隆了 AnxA5 的 cDNA, 并在大肠杆菌中作了表

达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 新鲜的人胎盘组织由长海医院妇产科提供; 大肠杆菌 Top10、K802, 质粒 pGEX-5T 由本室保存; TRIzol 试剂、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、cDNA 第一链合成试剂盒(RNA PCR Kit Ver 2.1)购自 TaKaRa 公司; pfu 高保真 DNA 聚合酶购自上海申能博彩公司; 胶回收试剂盒

[基金项目] 国家高新技术发展规划(“863”)课题(101-06-05-04); 国家自然科学基金(30271167)。

[作者简介] 颜宏利(1973-), 男(汉族), 博士, 讲师。

E-mail: hongliy888@hotmail.com

* Corresponding author. Tel: 021-25070332, Fax: 021-25070331, E-mail: shsun@smmu.edu.cn

为上海华舜公司产品;IPTG为Sigma公司产品;蛋白凝胶扫描定量采用美国Alpha公司的Chemilmager™5500凝胶成像系统。

1.1.2 引物 引物主要参照AnxA5的基因序列(GenBank No. M18366)的编码区、利用DNA tools软件进行设计,上游引物P1:5'GCC GGA TCC ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC 3',同AnxA5 N端序列一致,并引入BamH I酶切位点(划线部分);下游引物P2:5'GCC CTC GAT TTA GTC ATC TTC TCC ACA G 3',为AnxA5 C端序列的互补序列,并引入Xho I位点。

1.2 总RNA提取 取300 mg新鲜的人胎盘组织,加入4 ml的TRIzol试剂,置于玻璃匀浆器充分研磨后室温静置5 min。加入0.8 ml氯仿充分振荡,室温放置3 min。15 000×g离心15 min。上清加入2 ml的异丙醇,混匀后室温放置10 min。15 000×g离心10 min,沉淀用70%乙醇漂洗1次,37℃放置5 min,溶于40 μl焦磷酸二乙酯(DEPC)处理的水中,-70℃保存。以电泳和 D_{260}/D_{280} 的比值来判断抽提的总RNA质量。

1.3 第一链cDNA的合成 按照TaKaRa试剂盒说明书进行,在20 μl反应体系中含总RNA 1 μg, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 0.5 μg, RNA抑制剂0.5 μl, AMV逆转录酶20 U。反应产物-70℃保存。

1.4 PCR反应 取上述反应产物2 μl,常规PCR反应扩增AnxA5的基因序列。反应体系50 μl,引物P1、P2各25 pmol,4种dNTP各0.2 mmol/L, pfu高保真DNA聚合酶3 U。扩增条件:94℃预变性4 min;94℃45 s,55℃45 s,72℃1 min,共25个循环;72℃延伸5 min。

1.5 PCR产物克隆及序列分析 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,胶回收目的DNA。回收产物经BamH I/Xho I双酶切,与同样用BamH I/Xho I双酶切的pGEX-5T载体连接。连接产物转化大肠杆菌Top10,挑取阳性克隆扩增培养后抽提质粒进行酶切鉴定,对酶切产物中含有978 bp片段的重组菌委托上海申友生物技术公司进行测序。以上基因克隆、酶切、连接等操作参见文献[5]。

1.6 GST-AnxA5在大肠杆菌中的诱导表达 重组表达质粒转化大肠杆菌K802,挑取单菌落于LB(含氨苄100 μg/ml)培养液中37℃培养过夜。按2%浓度接种于新鲜的LB培养液中,37℃培养至

D_{600} 为0.6~0.8,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG诱导表达3~4 h,冰浴冷却菌液,取样测 D_{600} (一般应为1.6~2.0)。取100 μl菌液离心,加10 μl Tris-EDTA缓冲液和10 μl上样缓冲液悬浮沉淀,煮沸5 min后进行10% SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色鉴定表达结果。

1.7 GST-AnxA5的分离纯化 400 ml表达菌液,离心收集菌体。加20 ml PBS缓冲液(pH 7.4)重悬,冰浴超声破菌,12 000×g离心10 min,上清液加入400 μl Glutathione Sepharose 4B,混匀后静置30 min。500×g离心5 min, PBS洗沉淀,利用Elution buffer(50 mmol/L, Tris-HCl, 10 mmol/L还原型谷胱甘肽, pH 8.0)洗脱表达的融合蛋白,冻存于-20℃备用。

1.8 GST-AnxA5的抗凝活性分析 抗凝实验采用白陶土部分凝血活酶时间(KPTT)测定。取100 μl部分活化的凝血活酶试剂,加入100 μl待测蛋白样品,磷酸缓冲液(PBS)和空载体表达的GST蛋白作对照。37℃温育5 min。加入100 μl的标准参比血浆,37℃温育3 min。最后加入100 μl 25 mmol/L CaCl₂溶液,测定血浆凝固时间。

2 结果和讨论

2.1 胎盘组织总RNA提取的质量 测得胎盘组织提取的总RNA D_{260}/D_{280} 比值为1.84,琼脂糖凝胶电泳可清晰见到5s、18s、28s 3条核糖体RNA,无降解。

2.2 RT-PCR获得膜联蛋白A5的cDNA序列 根据GenBank中人AnxA5的cDNA序列,自行设计针对AnxA5编码区的PCR引物。以逆转录合成的第一链cDNA为模板,扩增出一条特异性的条带,长度略低于marker中1 000 bp的条带,与AnxA5的预期长度978 bp相符(图1)。

2.3 AnxA5 cDNA序列的克隆及鉴定 PCR产物经BamH I/Xho I双酶切后,插入质粒pGEX-5T,构建了tac启动子控制下的含有完整AnxA5 cDNA的表达质粒pGEX5T-AnxA5。将其转化宿主菌K802,得到数个阳性克隆。随机挑取5个阳性克隆抽提质粒,利用BamH I/Xho I双酶切,能够切出978 bp的条带,说明PCR产物克隆成功。从中选择2个克隆进行两端测序,将测序结果拼接后同GenBank中AnxA5的编码序列进行比对,两者序列完全一致。

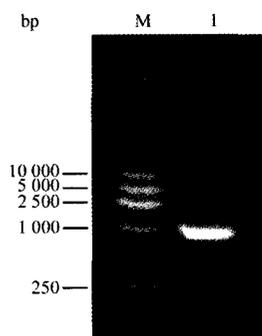


图1 AnxA5 RT-PCR 扩增产物电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

M: DNA marker; 1: RT-PCR product

2.4 GST-AnxA5 在大肠杆菌中的表达与纯化

将酶切和测序均鉴定正确的菌株 K802(pGEX5T-AnxA5)挑取单克隆进行培养,加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达。从图 2 可以看出,IPTG 诱导 1 h 后在靠近 66 000 处出现一条较浓的蛋白条带,该区带的相对分子质量与预期的 GST 融合 AnxA5 的相对分子质量 58 000 一致。随着诱导时间的延长,该条带浓度增加,在诱导后 5 h 达到最大值。蛋白凝胶扫描显示,此时表达的重组蛋白占菌体总蛋白的 52%。将表达菌体超声破菌后离心,超声上清和沉淀分别电泳,发现重组蛋白主要存在于超声上清中,说明表达产物主要以可溶性的形式存在。表达产物经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析纯化后,纯度达 95%以上。

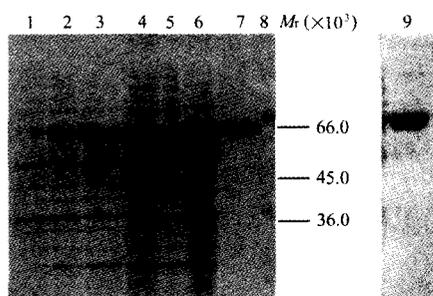


图2 GST-AnxA5 的表达、纯化和 Western Blot 验证

Fig 2 Expression, purification and

Western blot identification of GST-AnxA5

1: Total bacterial proteins before induced; 2-4: Total bacterial proteins after induced 1, 3, 5 h by 0.8 mmol/L IPTG; 5, 6: The sonicated cells were centrifuged, the pellet (lane 5) and the supernatant (lane 6) were shown; 7: Purified protein GST-AnxA5; 8: Protein marker; 9: Western blot

2.5 重组蛋白 GST-AnxA5 的抗凝活性测定 利用 KPTT 法检测重组蛋白 GST-AnxA5 的抗凝血活性。结果表明,同对照 GST 蛋白相比,GST-AnxA5 在 30 mg/L 时能显著延长血浆的凝固时间($P < 0.05$)。随着蛋白浓度的增加(60, 90 mg/L),血浆凝固时间不断延长($P < 0.01$),说明这种抗凝血活性具有剂量依赖性(图 3)。

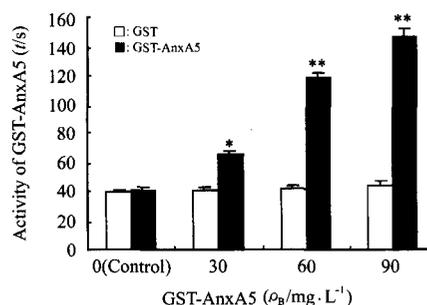


图3 GST-AnxA5 的抗凝血活性

Fig 3 Anticoagulant activity of GST-AnxA5

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs GST group

综合以上结果,我们成功的利用 RT-PCR 方法从人胎盘组织中克隆了人膜联蛋白 A5 的 cDNA,并在大肠杆菌中高效表达和纯化了 GST-AnxA5 蛋白。KPTT 实验证实,重组蛋白 GST-AnxA5 具有很强的抗凝血活性。本工作为进一步研究 AnxA5 的应用研究打下了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 331-371.
- [2] Dubois T, Mira JP, Felie D, et al. Annexin V inhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipids sequestration[J]. *Biochem J*, 1998, 330: 1277-1282.
- [3] Hawkins TE, Christien J, Merrifield, et al. Calcium signaling and annexins[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2000, 33: 275-296.
- [4] Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: Effects of calcium and membrane phosphatidylserine content[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 298(1): 187-191.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 34-60.

[收稿日期] 2003-08-05

[修回日期] 2003-11-03

[本文编辑] 尹 茶