

• 基础实验研究论著 •

Siglec-9 V 型结构域原核表达载体的构建、鉴定和初步表达*

俞 杨, 杜同信, 王自正, 邬 兰, 焦 杰

(南京医科大学附属南京医院核医学科分子诊断室, 江苏南京 210006)

摘要:目的 构建重组 Siglec-9 V 型结构域(Siglec-9-V)原核表达质粒,并在大肠杆菌中进行表达,初步摸索其可溶性表达的条件,为进一步研究其生物学意义奠定基础。方法 合成 Siglec-9-V 的 cDNA 序列;通过 PCR 和 TA 克隆,构建重组表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V,利用酶切和 DNA 测序鉴定插入序列;将重组细菌用 IPTG 诱导表达,利用 His6 标签蛋白特异性染料鉴定蛋白质;通过尝试不同的诱导表达温度,摸索 Siglec-9-V 可溶性表达的条件。结果 证实重组表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V 构建正确;表达的融合蛋白相对分子质量约为 29×10^3 ,证实为目的蛋白,在 24 °C 时经 IPTG 诱导,能够实现可溶性表达。结论 成功构建了重组表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V,实现 Siglec-9-V 的可溶性表达。

关键词:蛋白表达; Siglec-9 V 型结构域; 重组载体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0269-02

Construction, identification and expression of prokaryotic expression vector of Siglec-9-V*

Yu Yang, Du Tongxin, Wang Zizheng, Wu Lan, Jiao Jie

(Molecular Diagnosis Unit, Department of Nuclear Medicine, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

Abstract: Objective To construct prokaryotic expression vector of Siglec-9 V set domain(Siglec-9-V) and induce the soluble expression of the recombinant plasmid in *E. coli* for further biological function research. **Methods** Siglec-9-V cDNA sequence was synthesized. The recombinant vector pET-His6-SUMO-Siglec-9-V was constructed by PCR and TA cloning. pET-His6-SUMO-Siglec-9-V was confirmed by enzyme digestion and DNA sequencing and induced by IPTG for soluble expression at different temperature level. At last, the expression product was identified by His6 tag specific stain. **Results** pET-His6-SUMO-Siglec-9-V was confirmed and expressed in soluble status at 24 °C. The recombinant protein was with relative molecular weight of 29×10^3 and was identified to be the target protein. **Conclusion** The recombinant vector pET-His6-SUMO-Siglec-9-V was constructed successfully and the fusion protein could be expressed in soluble status in *E. coli*.

Key words: protein expression; Siglec-9 V set domain; recombinant vector

Siglec-9 是唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(Siglecs)的成员之一,可以通过唾液酸的结构和糖蛋白的糖链相结合^[1]。最近的研究表明 Siglec-9 分子是血管黏附蛋白 1 的新型白细胞表面受体,可以将 Siglec-9 的模拟短肽作为分子探针,对炎症和肿瘤部位进行初步的 PET 显像^[2]。这提示通过分子改造, Siglec-9 可能具备一定的临床应用潜能。从分子结构上来看, Siglec-9 的细胞外区域具备免疫球蛋白超家族样分子的典型结构,由 1 个 V 型结构域和 2 个 C2 型结构域组成,其中 V 型结构域中的某些保守的氨基酸残基在 Siglec-9 的结合功能中起重要作用^[3-4]。COSMIC 数据库中的数据还显示, Siglec-9 的 V 型结构域在原发性肝癌和黑色素瘤的患者中可发生错义突变。因此,对于 Siglec-9 V 型结构域(Siglec-9-V)的研究有助于了解其可能的临床应用价值。本研究即利用 His6-SUMO 融合系统,对 Siglec-9-V 进行原核表达载体的构建、鉴定和初步表达。

1 材料与方 法

1.1 试剂 高保真 Taq 酶和 pET-His6-SUMO 蛋白质表达系统购自 Life Technologies(Invitrogen)公司;GelCode Blue Stain 和 6xHis Protein Tag Stain 购自 Thermo Scientific(Pierce)公司;E. Z. N. A. 切胶纯化试剂盒与质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;限制性内切酶 HindⅢ 和 EcoR I 购自 Takara 公司。

1.2 方 法

1.2.1 Siglec-9-V 的设计与合成 根据文献报道的 Siglec-9 的 cDNA 序列和细胞外结构域的分区^[4],选择信号肽和 V 型结构域作为合成序列。该序列在 NCBI Blast 中进行了验证,证实 Siglec-9 分子两个不同的转录本具有相同的 V 型结构域的核酸和氨基酸序列。将 Siglec-9-V 的氨基酸序列在 NCBI Conserved Domains、Pfam 和 SMART 数据库中进行比对,确认该序列中存在完整的 V 型结构域。将信号肽和 V 型结构域的基因片段送金斯瑞公司合成。

1.2.2 引物设计与合成 选择合成基因片段的首尾进行引物设计,在上游引物的 5'端加 AGT,使得产物序列上以丝氨酸起始,从而保证在将来的纯化中能够利用 SUMO 蛋白酶(其对丝氨酸起始的蛋白质具有较高的消化效率)切去 His6-SUMO;在下游引物的 5'端加 TTA,能够保证产物序列上以 TAA 的终止密码子结束。该引物设计策略可以确保在纯化后只留下 Siglec-9-V 的天然蛋白。上游引物 Siglec-9-V-F 的序列为:5'-AGT ATG CTG CTG CTG CTG CTG-3',下游引物 Siglec-9-V-R 的序列为:5'-TTA GGC TGT CAC ATT CAC A-3',送 Invitrogen 公司合成。

1.2.3 Siglec-9-V 的扩增和表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V 的构建 利用合成的引物,以合成的基因片段为模板,PCR 扩增 Siglec-9-V 的 cDNA 片段。50 μL 的扩增体系

* 基金项目:南京市医学科技发展资金项目(卫生青年人才培养项目 NJH201132)。 作者简介:俞杨,男,主管检验技师,主要从事乙型肝炎病毒性肝炎的分子基础研究。

中,上下游引物各 0.4 μmol/L,10 mmol/L 的 dNTP 1 μL,高保真 Taq 酶 1 U。在 S1000 热循环仪(Bio-rad)上进行 PCR 反应,反应参数为:94 °C 1 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,68 °C 45 s,循环 35 次,68 °C 20 min。取 50 μL 的产物,进行 2%琼脂糖电泳,将特异性产物切胶纯化;将新鲜的纯化产物按 TA 克隆的策略与 pET-His6-SUMO 表达载体 15 °C 连接过夜。

1.2.4 表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V 的鉴定 用连接产物转化大肠杆菌 Mach1-T1,挑取 10 个单克隆菌落过夜培养,提取质粒。用 Hind III/EcoR I 双酶切质粒,鉴定片段大小;将酶切片段大小正确的质粒送 Invitrogen 公司测序,鉴定插入片的方向和序列是否正确。

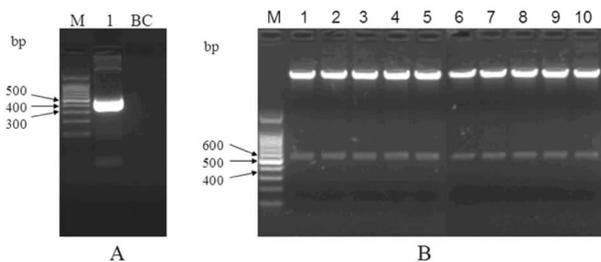
1.2.5 Siglec-9-V 的初步表达和鉴定 将鉴定正确的重组表达质粒 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),将转化产物转入 10 mL 含有卡那霉素和 1%葡萄糖的 LB 培养基中,37 °C 培养过夜。将 500 μL 的过夜培养物接种入 10 mL 含有卡那霉素和 1%葡萄糖的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.7 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 °C 诱导表达 4 h。按试剂盒说明书收集裂解细菌,进行 SDS-PAGE 电泳,将同一块 SDS-PAGE 胶先用 6×His Protein Tag Stain 染色,特异性检测含有 His6 的 Siglec-9-V;再用 GelCode Blue Stain 染色,检测总蛋白。全程用试剂盒自带的 pET-His6-SUMO-CAT 重组表达质粒作为阳性对照。

1.2.6 Siglec-9-V 可溶性表达的条件摸索 在上述表达条件的基础上,摸索使 Siglec-9-V 可溶性表达的条件。考虑到诱导表达时温度的重要性,将 1 mmol/L IPTG 诱导条件下 24 °C 6 h 的诱导表达结果和 37 °C 4 h 的诱导表达结果进行了比较。在以上诱导条件下,为了尽可能地使 Siglec-9-V 可溶性表达,适当降低诱导起始时的细菌浓度,使得 OD₆₀₀ = 0.5。

2 结 果

2.1 Siglec-9-V 的扩增 PCR 产物经 2%琼脂糖电泳,在预期大小(429 bp)的位置出现了清晰的特异性条带(见图 1A)。

2.2 表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V 的构建 重组的表达载体 pET-His6-SUMO-Siglec-9-V 10 个单克隆的酶切产物经 2%琼脂糖电泳,在预期大小(516 bp)的位置出现了清晰的插入片段(见图 1B)。测序的结果显示 4 号、5 号、6 号和 10 号克隆插入片的方向和序列与目的片段一致。

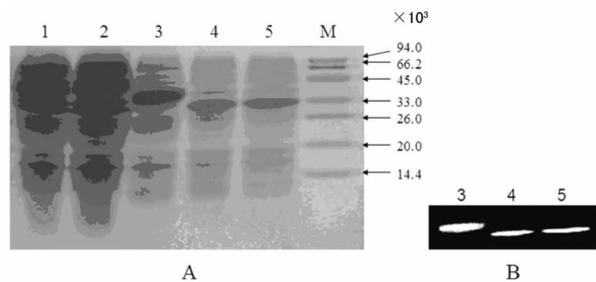


M:100 bp DNA 分子标记物;BC:空白对照。

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳(A)、表达载体单克隆质粒的酶切产物琼脂糖凝胶电泳(B)

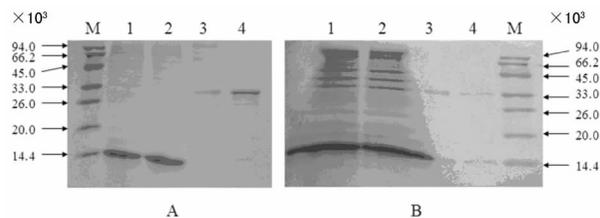
2.3 融合蛋白的表达 经 SDS-PAGE 电泳可发现,与未诱导的体系相比,诱导表达的蛋白在预期大小(29×10³,其中 His6-SUMO 13×10³,Siglec-9-V 16×10³)的位置出现了高水平表达的条带(见图 2A)。以 6×His Protein Tag Stain(特异性染色 His6 融合蛋白的染料)进行 SDS-PAGE 胶染色的结果显示:阳性对照 His6-SUMO-CAT 和目的蛋白 His6-SUMO-Siglec-9-V 均出现了特异性条带(见图 2B)。

2.4 Siglec-9-V 的可溶性表达 经 SDS-PAGE 电泳可发现,37 °C 时 1 mmol/L IPTG 4 h 诱导条件下,Siglec-9-V 主要表达在细菌裂解的沉淀物中(见图 3A);而 24 °C 时 1 mmol/L IPTG 6 h 诱导条件下,Siglec-9-V 主要表达在细菌裂解的上清液中(见图 3B)。



M:蛋白分子标记物;1~2:未经 IPTG 诱导的目的蛋白粗提物;3: IPTG 诱导的阳性对照 CAT 的蛋白粗提物;4~5: IPTG 诱导的目的蛋白粗提物。

图 2 目的蛋白 SDS-PAGE 电泳的总蛋白染色(A)、His6 融合蛋白特异性染色(B)



M:蛋白分子标记物;1~2:目的蛋白诱导物的裂解液上清液;3~4:目的蛋白诱导物的裂解液沉淀物。

图 3 37 °C 诱导的目的蛋白 SDS-PAGE 电泳(A)、24 °C 诱导的目的蛋白 SDS-PAGE 电泳(B)

3 讨 论

唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(Siglecs)是一类广泛表达在人体内血液细胞表面的受体,其在人类生理和病理状态下均具有重要的免疫信号转导功能,是具有重要研究价值的蛋白质分子^[5]。CD33 相关的唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(CD33rSiglecs)是 Siglecs 中一大类家族分子,在人类中包括 Siglec-3、Siglec-5~Siglec-11、Siglec-14 和 Siglec-16。已有的研究数据表明:人类 CD33rSiglecs 在蛋白质结构和功能方面都表现出功能化蛋白质模块的特征,以功能结构域(domain)为基本的结构单位^[3-4]。尤其值得注意的是与小鼠相比,人类 CD33rSiglecs 通过以功能结构域为单位进行重组,快速进化出多样性显著增加的分子种类,从而获得复杂的生物学功能,因此其功能结构域具有重要的研究意义^[4]。

Siglec-9 是 CD33rSiglecs 家族中的一个分子,其在骨髓、胎盘、脾脏和胎肝中有相对较高的表达,因其与 CD33 分子具有较高的同源性(64%)而被认为是潜在的抗肿瘤免疫治疗的靶点^[6],同时它也是炎症相关性疾病的重要靶点^[7]。如上所述,Siglec-9 在结构和功能方面都以功能结构域(domain)为基本的结构单位,考虑到细胞外的 V 型结构域在其介导的分子间相互作用中具有重要意义,故选择 Siglec-9-V 进行蛋白表达,希望为将来的功能研究和分子改造奠定基础。

His6-SUMO 融合蛋白表达系统是近年来应用较多的蛋白质融合表达系统^[8],其主要的特点是:能够保证蛋白质在可溶性表达的同时也具有较高的表达量;SUMO 提供了合适的酶切位点,可用于去除 His6-SUMO 的标签序(下转第 273 页)

实验后质控物不要保留。

本文对 HCV-RNA 检测的质控物制备及利用 Excel 绘制质控图, 可以作为 PCR 实验室 HCV-RNA 检测室内质控的重要手段。由于各单位标本量不同, 每月做不到 20 批次, 应及时将每批次质控结果绘成质控图便于动态观察。本单位每月不足 20 批次, 一方面将质控结果绘成质控图, 另一方面将标本放入 -70 °C 冰柜中保存 12 个月后, 集中检测 HCV-RNA 来评价其稳定性, 这样便于消除批间误差。表 1 显示 RCV 与 OCV 接近, 并 $RCV < 2OCV$, 则认为 RCV 可以接受^[1]; B 组与 C 组均值的对数 无显著性差异, 同时可以看出 s 、 CV 相差很小, 表明自制 HCV-RNA 质控物在 -70 °C 保存稳定性至少可达 1 年, 能够满足临床要求; 所绘质控图能有效地帮助我们判断质控情况。本文 RCV 为 4.54%, 小于临床允许误差; 20 次质控值结果均在 $\pm 2s$ 范围内, 且符合 Westgard 质控规则的 1_{3s} 、 2_{2s} 和 4_{1s} , 此图可以用做“管理用质控图”, 对检验过程进行控制。同时此质控图标示出了警告线和失控线, 将给判断质控结果是否在控提供方面, 实用性强, 作图简单, 判断清晰, 值得推广应用。

同时, 自制质控物可以与国家标准物质进行比对, 这样自制物就有了溯源性, 将极大地改善不同实验室间检验结果的可比性, 从而逐步实现不同实验室间检验结果有条件互认^[12]。

参考文献

[1] 申子瑜, 李金明. 临床基因扩增检测技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 147-148.
 [2] Jardi R, Rodriguez F, Buti M, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence

PCR assay[J]. J Viral Hepat, 2001, 8: 465-471.
 [3] 王露楠, 吴健民, 李金明, 等. 丙型肝炎病毒核酸检测的国家标准物质的研制[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(4): 354-357.
 [4] 魏来, 杨瑞锋. 丙型肝炎病毒实验室诊断的现状与存在的问题[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 845-848.
 [5] Neum UP, Berg T, Bahra M, et al. Fibrosis progression after liver-transplantation in patients with recurrent hepatitis C[J]. J Hepatol, 2004, 41(5): 830-836.
 [6] 陈作芬, 曹永平. 丙肝患者治疗前后 HCV-RNA 与抗 HCV 及丙氨酸氨基转移酶水平的分析[J]. 临床医学与检验, 2010, 7(12): 1175-1177.
 [7] 钟海军, 唐孝亮, 曾刚毅, 等. 核酸纯化柱提取核酸定量检测丙型肝炎病毒 RNA 的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(13): 783-798.
 [8] 周薇薇, 马鑫, 周洪明. 123 例抗-HCV 阳性患者 HCV-RNA 定量检测结果分析[J]. 黑龙江医药科学杂志, 2010, 33(6): 89.
 [9] 王虹, 许颂霄. 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 74-76.
 [10] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 942.
 [11] 李金明, 邓巍, 王露楠, 等. PCR 测定乙型肝炎病毒 DNA 弱阳性质控血清的适用研究[J]. 临床检验杂志, 2000, 18(1): 6-7.
 [12] 李金明. 临床实验室分子诊断折标准化[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 483-486.

(收稿日期: 2012-10-09)

(上接第 270 页)

列; His6 标签序列方便后续的蛋白质纯化; 可以有效用于大肠杆菌的原核表达环境^[9-10]。本研究利用了 His6 融合蛋白的特异性染料进行目的蛋白的检测, 该染料只对含有 His6 标签序列的蛋白质染色^[11-12], 而且和总蛋白的染料兼容(可以先后染色同一块蛋白电泳胶), 尤其适用于没有特异性抗体的蛋白质和蛋白质结构域的检测; 和 His6 的抗体相比, 该染料的使用省去了 Western Blotting 的过程, 合理简化了实验流程。在本研究中, 利用 His6-SUMO 融合蛋白表达系统, 在低温诱导时可以保证 Siglec-9-V 可溶性表达, 从而有助于进一步研究其如何通过分子间相互作用实现生物学功能。

参考文献

[1] Angata T, Varki A. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs[J]. J Biol Chem, 2000, 275(29): 22127-22135.
 [2] Aalto K, Autio A, Kiss EA, et al. Siglec-9 is a novel leukocyte ligand for vascular adhesion protein-1 and can be used in PET imaging of inflammation and cancer[J]. Blood, 2011, 118(13): 3725-3733.
 [3] Varki A, Angata T. Siglecs the major subfamily of I-type lectins [J]. Glycobiology, 2006, 16(1): 1R-27R.
 [4] Cao H, Crocker PR. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation[J]. Immunology, 2011, 132(1): 18-26.
 [5] Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, et al. Siglecs and immune regu-

lation[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30(3): 357-392.
 [6] Foussias G, Yousef GM, Diamandis EP. Identification and molecular characterization of a novel member of the siglec family[J]. Genomics, 2000, 7(2): 171-178.
 [7] Mary K, O'Reilly J, Paulson C. Siglecs as targets for therapy in immune cell mediated disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(5): 240-248.
 [8] Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE, et al. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes[J]. Methods Mol Biol, 2011, 705: 15-30.
 [9] Saitoh H, Uwada J, Azusa K. Strategies for the expression of SUMO-modified target proteins in Escherichia coli[J]. Methods Mol Biol, 2009, 497: 211-221.
 [10] Wang Z, Li H, Guan W, et al. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility[J]. Protein Expr Purif, 2010, 73(2): 203-208.
 [11] Williams NK, Prossellkov P, Liepinsh E, et al. In vivo protein cyclization promoted by a circularly permuted synechocystis sp. PCC6803 DnaB mini-intein[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 7790-7798.
 [12] Smallwood ND, Hausman BS, Wang X, et al. Involvement of NH2 terminus of PKC-delta in binding to F-actin during activation of Calu-3 airway epithelial NKCC1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(4): C906-912.

(收稿日期: 2012-10-06)