

· 基础研究论著 ·

pET32a-AKT1 重组质粒的构建与表达*

张战锋, 韩丽乔, 庄俊华, 黄宪章[△]

(广州中医药大学第二附属医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 构建重组质粒 pET32a-AKT1, 利用原核表达体系表达 AKT1 蛋白。方法 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增 AKT1 编码区基因, 并将其与 pET32a 质粒融合, 并转化大肠埃希菌 DH5 α 及原核菌株 BL21(DE3), 采用异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其表达, 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western-blot 进行蛋白鉴定。结果 目的基因与质粒完整融合; 重组质粒 pET32a-AKT1 成功转入菌株 DE3; IPTG 诱导后, DE3 表达相对分子质量为 70 000 的蛋白。结论 成功构建重组质粒 pET32a-AKT1, 且 AKT1 蛋白在原核表达菌 DE3 中完整、高效表达。

关键词:蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 质粒; 大肠埃希菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1092-03

Construction and expression of recombinant plasmids pET32a-AKT1^{*}Zhang Zhanfeng, Han Liqiao, Zhuang Junhua, Huang Xianzhang[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant plasmid pET32a-AKT1 and express human AKT1 protein using prokaryotic expression system. **Methods** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) was employed to amplify the gene AKT1 in coding region and integrated it with pET32a plasmid, following by transforming it into *Escherichia coli* DH5 α and prokaryotic strains BL21(DE3). Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG) was adopted to induce its expression. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) and Western-blot were used for protein identification. **Results** Complete fusion of target gene and plasmid was observed. The recombinant plasmid pET32a-AKT1 was successfully transferred into the strain DE3. After IPTG induction, protein with relative molecular mass 70 000 was expressed by DE3. **Conclusion** The recombinant plasmid pET32a-AKT1 is constructed successfully and AKT1 protein is completely and efficiently expressed by prokaryotic strain DE3.

Key words: protein-serine-threonine kinases; plasmids; *Escherichia coli*

磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinases, AKT)信号通路是参与细胞存活调控的重要通路之一。目前已有大量研究证实, PI3K/AKT 信号通路的异常与多种人类肿瘤的发生、发展密切相关^[1-4], 此信号通路是与肿瘤细胞存活相关的首要通路。该通路的 AKT 处于多条信号通路的重要交叉点。目前在哺乳动物中发现至少 3 种 AKT 亚型: AKT1、AKT2 和 AKT3。AKT 在一些肿瘤细胞中高表达, 但 3 种 AKT 亚型的表达和作用却可能显著不同。本实验建立 AKT1 蛋白的原核表达体系, 为进一步探讨以 AKT 为靶点的肿瘤基因免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 质粒和菌株由广东省中医院大学城医院检验科陈茶教授惠赠。逆转录试剂盒、KOD-Plus 高保真聚合酶购自日本 Toyobo 公司; 核酸胶回收试剂盒购自美国 Omega 生物技术公司; 质粒小提试剂盒, 限制性内切酶 *Not* I、*Eco*R I、*T*₄DNA 连接酶及 *Taq* 聚合酶购自 TaKaRa 宝生物公司, AKT 检测相关抗体购自英国 ABCAM 公司, 其余试剂均为国产或

进口分析纯试剂。

1.2 引物设计及基因扩增 从新鲜外周血中提取总 RNA, 采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增 AKT1 编码区基因。检索美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站 AKT1 编码区基因序列, 采用 Primer 5 软件设计特异性 AKT1 引物如下, 编码链引物 P₁: 5'-CC GG/AATTC AGC GAC GTG GCT ATT GTG A-3'(画线部分 *Eco*R I); 非编码链引物 P₂: 5'-CCG CTC/GAG GGC CGT GCC GCT GGC CGA G-3'(画线部分 *Xho* I)。反应体系和条件均按照说明书推荐条件进行。PCR 产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3 融合质粒的构建 AKT1 PCR 产物纯化后与 pET32a 质粒同时进行 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 回收、纯化后进行连接反应, 反应体系按照说明书推荐体系进行, 22 ℃ 过夜连接。连接产物直接转化至大肠杆菌 DH5 α , 将转化菌液于 LB 平板上进行筛选(含浓度为 50 mg/L 的氨苄西林)。对平板上的生长单菌落进行 PCR 鉴定。PCR 产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2010B031600126); 广东省自然科学基金课题(S2011010004750); 科技部重大新药创制专项(2012ZX09303009-003)。作者简介: 张战锋, 男, 博士, 检验师, 主要从事生物化学与分子生物学的研究工作。△ 通讯作者, E-mail: huan-gxz020@163.com。

进行检测,挑选 PCR 阳性克隆送 Life Technology(广州)公司测序。

1.4 融合质粒转化表达菌及阳性克隆的筛选 鉴定正确的融合质粒培养提取后,采用化学法转化表达菌株 BL21(DE3),LB 平板上进行筛选(含终浓度为 50 mg/L 的氨苄西林)。对平板上生长的单菌落进行 PCR 鉴定。PCR 产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,挑选 PCR 阳性克隆送 Life Technology(广州)公司测序。

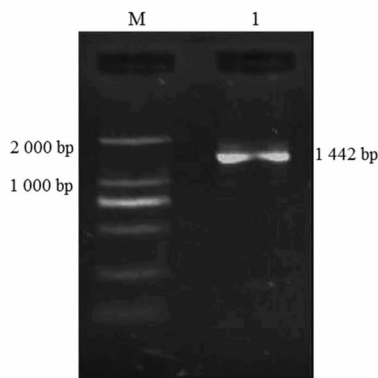
1.5 重组蛋白的优化诱导表达及鉴定 挑取含有完整融合质粒的 DE3 单克隆菌株,于含 50 mg/L 氨苄西林的新鲜 LB 培养基中过夜培养。第 2 天取过夜培养菌液分别加入 3 个含新鲜 LB 培养基(无抗菌药)的烧瓶中,置摇床内以 37 ℃、240 r/min 剧烈摇动,2 h 后加入终浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mmol/L 的异丙基-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG),并继续以 37 ℃、240 r/min 摇动培养。加入 IPTG 后分别于 0、1、2、3、4、5 h 取 1 mL 菌液于 -80 ℃ 冻存,待测。

1.6 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分别配制 10%~12% 的 SDS-PAGE 分离胶、5% SDS-PAGE 浓缩胶。电泳首先以 80 V 进行,待上样缓冲液进入分离胶后调整为 100~120 V,电泳约 2.5 h。电泳完毕,将凝胶放入电转缓冲液中平衡 5 min 后进行转膜。

1.7 Western-blot 检测 转膜结束后将聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)放入 10 mL 5% 的脱脂奶粉含吐温-20 的 Tris 缓冲液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)溶液中,室温轻摇封闭 2~3 h 后弃掉封闭液。分别用第一、二抗体处理后, PVDF 用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,最后显色观察结果。

2 结果

2.1 目的基因的扩增结果 扩增产物经琼脂电泳鉴定,在 1 000 bp 上方可见清晰、单一核酸条带,大小与目的基因相符,见图 1。

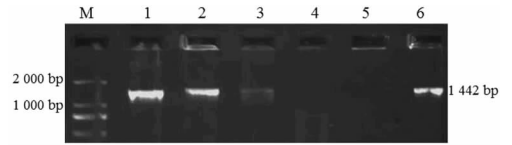


M: DNA Ladder DL2000; 1: AKT1 编码基因扩增产物。

图 1 PCR 扩增 AKT1 编码基因序列

2.2 融合质粒转化 DH5 α 后的菌落鉴定 挑取平板上生长的数个单菌落进行 PCR 鉴定,某些菌落可扩增出清晰的与 AKT1 编码区基因大小相符的核酸条带,见图 2。

2.3 PCR 阳性的 DH5 α 菌株测序结果 挑选 PCR 阳性克隆进行测序,将测序结果与 NCBI 网站中基因信息进行比对,结果显示融合质粒中含有完整的 AKT1 编码序列基因,见图 3。



M: DNA ladder DL2000; 1~4: 平板上不同单菌落的 PCR 结果; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照。

图 2 pET32a- AKT1 重组质粒的 PCR 检测

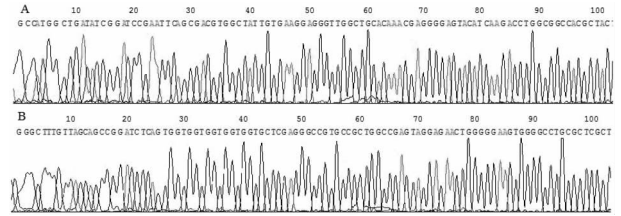
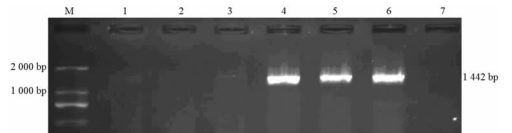


图 3 PCR 阳性 DH5 α 菌株正向 (A) 及反向 (B) 测序结果

2.4 含融合质粒 DE3 转化菌株的筛选 融合质粒转化 DE3 后对平板上生长的单菌落进行 PCR 鉴定,某些菌落可扩增出与目的基因片段大小相符的核酸片段,见图 4。



M: DNA Ladder DL2000; 1~5: 平板上不同单菌落的 PCR 结果; 6: 阳性对照; 7: 阴性对照。

图 4 重组质粒 pET32a- AKT1 转化入 DE3 菌株的 PCR 检测

2.5 PCR 阳性的 DE3 菌株的测序结果 挑选 PCR 阳性克隆进行测序,将测序结果与 NCBI 网站中基因信息进行比对,结果显示 PCR 阳性的菌株中含有完整的 AKT1 编码序列基因,见图 5。

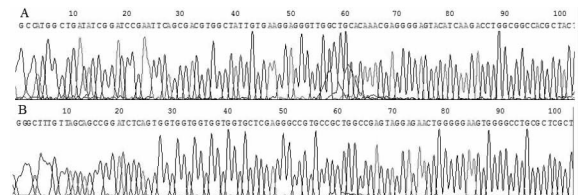


图 5 PCR 阳性 DE3 菌株正向 (A) 及反向 (B) 测序结果

2.6 蛋白诱导表达的优化及 SDS-PAGE 鉴定 挑选含融合质粒的 DE3 菌株在相同环境下进行不同浓度 IPTG 诱导表达,在 5 个特定时间段取少量菌液进行 SDS-PAGE 检测。在相对分子质量为 70 000 的上方有清晰蛋白条带出现,大小与目的蛋白相似 (AKT1 蛋白的相对分子质量约为 56 000,与 AKT1 蛋白融合的 pET32a 质粒标签蛋白的相对分子质量约为 18 000,目的蛋白的相对分子质量约为 74 000)。

2.7 Western-blot 鉴定诱导产物 挑选 PCR 阳性的 DE3 菌株进行 IPTG 诱导表达,对不同诱导浓度和不同诱导时间收集的菌液进行 Western-blot 检测,结果显示在相对分子质量为 70 000 的上方有荧光条带出现,大小与目的蛋白相符。

3 讨论

AKT/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 相对分子质量约为 60 000,调控细胞生长与存活、增殖与凋亡、糖类代谢、基

因转录、新生血管形成、细胞迁移运动以及细胞周期调控等,对生存通路,如蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、受体酪氨酸激酶 (receptor protein tyrosine kinases, RTK)-丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联通路、酪氨酸激酶 (Janus kinase, JAK)/信号转导子和转录激活子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 通路的促进或抑制作用显示其在细胞生长存活和增殖中的主导地位^[5-8]。体内许多肿瘤组织中 AKT 异常激活与肿瘤发生、发展的各个环节关系密切^[9-10]。对小鼠胚胎成纤维细胞的研究发现, AKT1 亚型在胚胎发育、生长及生存中起着至关重要的作用,而 AKT2 和 AKT3 分别在葡萄糖代谢的动态平衡和出生后脑部的发育中起着必不可少的作用。研究表明,抑制 AKT 基因的表达,能影响其生物学效应的发挥,如可以促进细胞凋亡,抑制细胞的迁移和新生血管的形成^[11-12]。为了能在原核细胞中表达 AKT1, 将其用于在体或离体的实验研究, 深入探讨该肿瘤治疗新靶点 AKT 的生物学功能, 本实验构建了原核重组质粒 pET32a-AKT1, 并进一步优化诱导表达条件。

目前国内、外对蛋白的获取有较多的方法, 如从组织或血清中直接分离纯化及基因工程方法等。基因工程方法发展迅速并且成熟, 如哺乳动物表达系统、酵母表达系统和原核表达系统等^[13-15] 均被广泛接受和使用。对于不同表达体系的选择, 除了考虑外源蛋白表达后的性质和活性, 还要考虑目的蛋白能否胞外表达、表达量以及能否对表达的蛋白质进行快速有效的纯化以获得高纯度蛋白质。本实验选择较为常用的大肠埃希菌表达系统, 这种表达体系是发展最早, 也是最成熟的外源蛋白表达方法, 具有遗传背景清楚, 表达水平较稳定, 易操作的优点, 有许多菌株突变体和含强启动子的载体可供选择, 且成本低、蛋白表达量高、容易纯化等。

本实验从人外周血单核细胞中成功提取出高纯度总 RNA (结果未给出), 通过逆转录和 PCR 等方法扩增出完整的人 AKT1 编码区基因, 并将其插入原核表达质粒 pET32a(+), 构建融合载体 pET32a-AKT1, 通过测序保证融合载体的正确性和完整性。融合质粒转化 DE3 后进行 IPTG 诱导, 并对诱导产物进行检测, SDS-PAGE 结果显示在相对分子质量为 70 000 的上方有明显条带, 大小与目的蛋白相符, 且表达量明显高于细菌自身表达蛋白; 最后使用 AKT 特异性单克隆抗体对诱导产物进行 Western-blot 检测, 结果与 SDS-PAGE 相符, 提示人 AKT1 蛋白在大肠埃希菌中表达。笔者还对工程菌表达条件进行了初步的优化, 诱导剂 IPTG (0.5 ~ 2.0 mmol/L) 对 AKT1 蛋白表达量的改变无明显影响; 而随着诱导时间的延长, 蛋白表达量有上升趋势。

以上结果充分说明 AKT1 在此体系中具有好的表达效果。本实验通过亚克隆的方法成功构建了 pET32a-AKT1 的融合蛋白重组质粒, 有利于获得人 AKT1 重组蛋白, 为进一步研究其结构、功能活性和抗体制备等奠定了一定的实验基础。

参考文献

[1] Conley-LaComb MK, Saliganan A, Kandagatla P, et al. PTEN loss

mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1):85.

- [2] Fang Y, Xue JL, Shen Q, et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 55(6):1852-1862.
- [3] Sellitto C, Li L, Gao J, et al. AKT activation promotes PTEN hamartoma tumor syndrome-associated cataract development[J]. J Clin Invest, 2013, 123(12):5401-5409.
- [4] Tian WY, Chen WC, Li R, et al. Markers CD40, VEGF, AKT, PI3K, and S100 correlate with tumor stage in gastric cancer[J]. Onkologie, 2013, 36(1/2):26-31.
- [5] Xu H, Song J, Gao X, et al. Paeoniflorin attenuates lipopolysaccharide-induced permeability of endothelial cells: involvements of F-actin expression and phosphorylations of PI3K/Akt and PKC[J]. Inflammation, 2013, 36(1):216-225.
- [6] Wang C, Cigliano A, Delogo S, et al. Functional crosstalk between AKT/mTOR and Ras/MAPK pathways in hepatocarcinogenesis: implications for the treatment of human liver cancer[J]. Cell Cycle, 2013, 12(13):1999-2010.
- [7] Cokic VP, Bhattacharya B, Beleslin-Cokic BB, et al. JAK-STAT and AKT pathway-coupled genes in erythroid progenitor cells through ontogeny[J]. J Transl Med, 2012, 10:116.
- [8] Martelli AM, Faenza I, Billi AM, et al. Intracellular 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: New mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis[J]. Cell Signal, 2006, 18(8):1101-1107.
- [9] Lim WT, Zhang WH, Miller CR, et al. PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early- and late-stage non-small cell lung Cancer[J]. Oncol Rep, 2007, 17(4):853-857.
- [10] McCoy E, Sontheimer H. Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes[J]. Glia, 2007, 55(10):1034-1043.
- [11] Dillon RL, Marcotte R, Hennessy BT, et al. Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression[J]. Cancer Res, 2009, 69(12):5057-5064.
- [12] Sasaki T, Nakashiro K, Tanaka H, et al. Knockdown of Akt isoforms by RNA silencing suppresses the growth of human prostate Cancer cells in vitro and in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 399(1):79-83.
- [13] 徐宁, 张战锋, 黄宪章, 等. PET32a-IL-1R I 重组质粒的构建及表达[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(9):964-966.
- [14] 黄宪章, 张战锋, 谢诗园, 等. pPICZαA-CDK2 重组质粒的构建及表达[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(16):2917-2919.
- [15] 黄宪章, 张战锋, 陈炜烨, 等. PET32a-CDK2 重组质粒的构建与表达[J]. 广东医学, 2011, 32(6):681-683.

(收稿日期:2014-01-31)