

• 基础实验研究论著 •

清道夫受体蛋白的原核表达及初步鉴定^{*}

许甜甜, 朱 冰[△], 王长兵, 钟家禹, 林正方

(广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心中心实验室, 广东广州 510120)

摘要:目的 表达清道夫受体 B2 蛋白 (SCARB2), 初步鉴定表达产物。方法 培养 RD 细胞, 提取其 mRNA 经逆转录 PCR (RT-PCR) 方法扩增出 *scarb2* 基因片段, 构建表达载体 pET28a(+)/SCARB2, 在原核表达系统 (大肠杆菌 BL21) 中表达 SCARB2 蛋白, 并用 His 单抗对表达蛋白进行免疫印迹法 (Western blot) 鉴定。结果 构建的重组质粒 pET28a(+)/SCARB2 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 重组蛋白 SCARB2 高效表达并纯化成功, 经 His 单抗初步验证有目的蛋白表达。结论 表达并初步鉴定了 SCARB2 蛋白, 为肠道病毒 71 型 (EV71) 与清道夫受体蛋白的作用机制及清道夫受体的单克隆制备提供参考。

关键词: 肠道病毒 71 型; 清道夫受体; 基因克隆; 原核表达

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1523-03

Prokaryotic expression and preliminary identification of scavenger receptor protein^{*}

Xu Tiantian, Zhu Bing[△], Wang Changbing, Zhong Jiayu, Lin Zhengfang

(Central Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To express and preliminary identify scavenger receptor B2 (SCARB2) protein. **Methods** SCARB2 cDNA was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from mRNA extracted from RD cells, and cloned into pMD19-T vector. Expression vector pET28a(+)/SCARB2 was constructed, and SCARB2 protein was expressed in prokaryotic expression system. Obtained recombinant proteins were identified by detection of Western blot using His labeled monoclonal antibody. **Results** Recombinant SCARB2 proteins, expressed by induction of isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), were successfully purified and specifically recognized by His labeled monoclonal antibody. **Conclusion** SCARB2 proteins could be expressed and identified successfully, which could provide reference for researching mechanism of enterovirus type 71 (EV71) and scavenger receptor protein, and for preparation of SCARB2 monoclonal antibodies.

Key words: enterovirus type 71; scavenger receptors; gene clone; prokaryotic expression

手足口病 (HFMD) 是儿童常见的传染病之一。引起该病的肠道病毒以肠道病毒 71 型 (EV71) 和柯萨奇病毒 A 组 16 型 (CoxA16) 最为常见^[1]。CoxA16 所致 HFMD 的症状相对较轻, 一般不合并严重的并发症, 疾病过程多为自限性。但 EV71 引起的 HFMD 较为严重, 可以导致严重的神经性疾病, 如急性肺水肿、急性迟缓性麻痹等^[2]。

近年来, 针对 EV71 感染的细胞受体和宿主因子已被识别, 但多种证据表明了清道夫受体 B2 (SCARB2) 在 EV71 的感染和致病中起到关键作用^[3]。SCARB2 是葡萄糖脑苷脂酶的一种特异结合配体, 是内吞高密度脂蛋白和致病细菌内摄的一种膜蛋白^[4], 归属于清道夫受体 B 类亚科家族, 该亚科包括 SCARB1 和 SCARB2, SCARB2 是一个相对分子质量为 85 000 的Ⅲ型跨膜的唾液酸糖蛋白。人 *scarb2* 基因位于第 4 常染色体上, 编码一个含 478 个氨基酸前体的肽链, SCARB2 主要位于溶酶体和内涵体并参与膜运输和内涵^[4], 广泛存在于细胞膜上, 参与 EV71 感染与致病过程; SCARB2 也作为 CoxA16 的受体, 与 CoxA16 引起的 HFMD 密切相关^[5]。目前临床上还没有有效的抗病毒药物, 仍以对症治疗为主, 研制安全有效的疫苗、早期诊断试剂盒和抗病毒药物是防控 EV71 感染的当务

之急。本研究表达 SCARB2 蛋白并初步鉴定表达产物, 为 EV71 疫苗、抗病毒药物及检测试剂盒的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 RD 细胞、EV71 病毒株、质粒 pET28a(+) 为本室保存; RNA 提取试剂盒、一步法逆转录 PCR (RT-PCR) 试剂盒、DL2000 DNA 标记物、pMD19-T 载体、DNA 凝胶电泳回收试剂盒、质粒纯化试剂盒、DH5α 及 BL21 (DE3) 菌株均购自大连宝生生物工程公司; 1640 培养基购自 GIBCO 公司; 鼠 His 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 MBI 公司; Fermentas 预染蛋白标记物购自广州赛哲生物科技有限公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 目的基因选择及引物设计 查阅 GenBank 中 *scarb2* 基因序列设计引物, 在上游引物 5' 端引入 *EcoR* I 酶切位点 (GAA TTC), 下游引物 5' 端引入 *Xho* I 酶切位点 (CTC GAG), 序列如下: *scarb2* PLS (上游), 5'-GCG GAA TTC ATG GGC CGA TGC TGC TTC TAC A-3'; *scarb2* PLA (下游), 5'-CAT CTC GAG TTA GGT TCG AAT GAG GGG T-3'。引物

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (309726300)。 作者简介: 许甜甜, 女, 检验技师, 主要从事肠道病毒 EV71 的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhubing0327@163.com。

由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2.2 RD 细胞总 mRNA 提取及目的基因扩增 常规培养 RD 细胞,待细胞生长约 80%后,弃培养上清,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍后,用 RNA 提取试剂盒提取 RNA 并以其为模板进行逆转录,逆转录反应体系为 10 μ L,反应条件为 30 $^{\circ}$ C 10 min;42 $^{\circ}$ C 30 min,99 $^{\circ}$ C 5 min,1 个循环。PCR 反应体系为 25 μ L,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,56 $^{\circ}$ C 1.5 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,33 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,DNA 凝胶电泳回收试剂盒回收目的带。

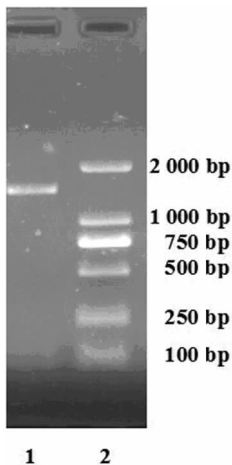
1.2.3 重组质粒的构建及鉴定 将上述回收片段连接于 pMD19-T 载体,转化 DH5 α 感受态菌株,提取质粒做 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,并委托英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。将片段与经相同双酶切的 pET28a(+) 质粒连接、转化 BL21(DE3)感受态菌株,用 PCR 法进行鉴定。

1.2.4 目的蛋白表达 挑取 PCR 鉴定阳性菌落,按 1:1 000 接种于 5 mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 剧烈震荡培养 17 h,以 1:100 转接于新鲜 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 剧烈震荡培养约 5 h,直到 600 nm 处培养液吸光度(A_{600})约为 0.7,加入浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),继续 37 $^{\circ}$ C 剧烈震荡培养 4 h,取 1 mL 菌液,8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,加入 50 μ L 2 $\times$ 电泳加样缓冲液重悬,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,12 000 r/min 离心 10 min。取上清液 10 μ L 与蛋白质标记物同时行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),用考马斯亮蓝染色,脱色液脱色后观察有无目的条带。

1.2.5 用 His 单抗鉴定重组蛋白表达产物 重组蛋白经 SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭,然后加羊抗鼠 His 单抗,37 $^{\circ}$ C 反应 0.5 h。PBS 洗膜后用 DAB 显色,出现棕色条带者判为阳性。

2 结 果

2.1 目的基因扩增 RT-PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,在 1 500 bp 处获得特异性条带,与预期目的基因 *scarb2* 的同源率均在 99%以上(图 1)。测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,与大部分 *scarb2* 序列(GenBank 序号:AK313016.1)的同源率为 100%。

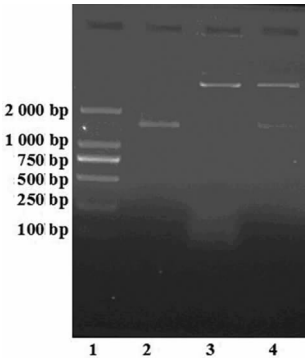


1:化学合成的 *scarb2* 片段;2:DL2000 DNA 标记物。

图 1 目的基因的扩增结果

2.2 重组质粒的构建及鉴定 重组质粒 pET28a(+)/

SCARB2 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后,进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示,在 1 500 bp 获得电泳带,大小与 *scarb2* 及载体片段长度一致,见图 2。



1:DL2000 DNA 标记物;2:重组质粒 pET28a(+)/SCARB2;3:质粒 pET28a;4:*Eco*R I、*Xho* I 双酶切 pET28a(+)/SCARB2 的产物。

图 2 重组质粒 pET28a(+)/SCARB2 的鉴定

2.3 目的蛋白的 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE 结果显示,含重组质粒的诱导菌在相对分子质量约为 55 000 处出现一强蛋白条带,而空载体菌在相应位置未出现该蛋白条带,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.4 重组蛋白 SCARB2 表达鉴定 以羊抗鼠 His 单抗为抗体,进行免疫印迹法(Western blot)鉴定,结果显示表达的融合蛋白在相对分子质量 55 000 处出现阳性条带,而空载体菌与 His 单抗无反应,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

3 讨 论

EV71 是一种具有较强致病性的肠道病毒,主要引起 HFMD,自 20 世纪 70 年代首次被报道以来,许多国家和地区相继报道了 EV71 的流行情况^[6]。近年来,东南亚、中国台湾及我国大部分省份 EV71 的流行日趋严重,已引起疾病预防与控制部门的高度重视。

EV71 感染引起 HFMD 的主要机制为病毒与宿主细胞表面的特异性受体结合从而吸附于被感染的细胞表面,受体的特异性决定了该病毒的细胞或组织嗜性以及宿主范围。因此,确定和描述 EV71 的细胞受体在阐明 EV71 的致病性中起着重要的作用,近年来,针对 EV71 感染的细胞受体和宿主因子已获识别,尤其是日本科学家 Yamayoshi 和 Nishimura 的团队几乎同时鉴定出 EV71 的 2 个不同受体:SCARB2 和 P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)。Yamayoshi 等^[5]认为 SCARB2 是 EV71 的功能性受体,Nishimura 等^[7]鉴定出 PSGL-1 为 EV71 受体,另外唾液酸化多聚糖类也可作为 EV71 的受体^[8]。PSGL-1 是白细胞膜表面的一种唾液黏蛋白,是选择素的主要糖蛋白配体,主要通过在选择素相互作用介导白细胞滚动,在炎症早期发挥作用^[7],研究显示,PSGL-1 N 末端的酪氨酸硫酸化,有利于病毒侵入白细胞并在其中复制^[9]。SCARB2 是一个广泛表达的蛋白,可作为大多数 EV71 病毒株的侵入受体,最近已被证明,*scarb2* 的 4 个外显子在 SCARB2 蛋白与 EV71 VP1 蛋白的相互作用中起着重要的作用^[10]。阻断 PSGL-1 或 SCARB2,可有效抑制病毒的入侵,对其进行转染则可以辅助或增强病毒的感染。但是这些实验结果显示 EV71 的受体不止 1 种^[11],因此无论用上述 2 种受体的配体或抗体都无法阻

断 EV71 对宿主细胞的感染。

在目前已知的受体中,几乎全部都是宿主细胞膜相关的脂蛋白及糖蛋白,但由于这些膜蛋白的数量很少,使得分离纯化这些蛋白质变得很困难。在本实验中,成功克隆了 *scarb2* 基因,并构建了表达载体 pET28a(+)/SCARB2,用 pET28a(+)/BL21 系统大量表达了 EV71 的受体蛋白 SCARB2,使得分离微量的受体蛋白变得更容易操作。但是表达出的蛋白活性是否同天然蛋白相同,是否具有免疫原性,还有待进一步的实验证明。因此,下一步本研究组将对表达出的蛋白进行免疫原性及抗原性的鉴定,以更好地为 EV71 的感染及致病机制研究提供实验依据,为 EV71 疫苗、检测试剂盒及抗病毒药物的研制奠定基础。

参考文献

[1] Chatproedprai S, Theanboonlers A, Korkong S, et al. Clinical and molecular characterization of hand-foot-andmouth disease in Thailand, 2008—2009[J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(4): 229-233.

[2] Blomqvist S, Klemola P, Kajjalainen S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. J Clin Virol, 2010, 48(1): 49-54.

[3] Chen P, Song Z, Qi Y, et al. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenge receptor B 2[J]. J Biol Chem, 2012, 287(9): 6406-6420.

[4] Reczek D, Schwake M, Schröder J, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase[J]. Cell, 2007, 131(4): 770-783.

[5] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 798-801.

[6] Schuffenecker I, Mirand A, Antona D, et al. Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000—2009[J]. J Clin Virol, 2011, 50(1): 50-56.

[7] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 794-797.

[8] Nilsson EC, Jamshidi F, Johansson SMC, et al. Sialic acid is a cellular receptor for coxsackievirus A24 variant, an emerging virus with pandemic potential[J]. J Virol, 2008, 82(6): 3061-3068.

[9] Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(11): e1001174.

[10] Yamayoshi S, Koike S. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection[J]. J Virol, 2011, 85(10): 4937-4946.

[11] Patel KP, Bergelson JM. Receptors identified for hand, foot and mouth virus[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 728-729.

(收稿日期: 2014-02-12)

(上接第 1522 页)

自噬可延缓衰老的进程。西罗莫司靶向(Tor)激酶是一种抑制自噬途径的重要因子, Tor 激酶抑制剂西罗莫司在酵母和哺乳动物细胞中都可以促进自噬基因 *ATG8* 转录水平的提高^[11-12]。

研究发现低浓度的西罗莫司可以通过刺激酵母自噬的增强来延长酵母的时序寿命。本文的研究发现, 尽管 *KSP1* 基因作为细胞自噬的负调控因子, 但是 *KSP1* 基因缺失并没有延长酵母的复制寿命, 很可能是因为 *KSP1* 缺失虽然可以增加酵母自噬能力, 但是同时也会影响其他未知基因的功能, 进而导致酵母细胞复制寿命的缩短, 其中的机制需要进一步研究。

参考文献

[1] Fleischmann M, Stagljar I, Aebi M, et al. Allele-specific suppression of a *Saccharomyces cerevisiae* prp20 mutation by overexpression of a nuclear serine/threonine protein kinase[J]. Mol Gen Genet, 1996, 250(5): 614-625.

[2] Umekawa M, Klionsky DJ. *KSP1* kinase regulates autophagy via the target of rapamycin complex 1 (TORC1) pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16300-16310.

[3] Laxman S, Tu BP. Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-dependent cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26081.

[4] Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes[J]. Dev Cell, 2003, 5(4): 539-545.

[5] 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 马学军, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 577-578.

[6] 方炳雄, 赵炜, 崔红晶, 等. 酿酒酵母寿命的研究方法及进展[J]. 国际老年医学杂志, 2013, 34(1): 28-34.

[7] Steffen KK, Kennedy BK, Kaerberlein M. Measuring replicative life span in the budding yeast[J]. J Vis Exp, 2009(28): 1209.

[8] Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span from yeast to humans[J]. Science, 2010, 328(5976): 321-326.

[9] Steinkraus KA, Kaerberlein M, Kennedy BK. Replicative aging in yeast: the means to the end[J]. Ann Rev Cell Dev Biol, 2008, 24: 29-54.

[10] Sampaio-Marques B, Felgueiras C, Silva A, et al. Yeast chronological lifespan and proteotoxic stress: is autophagy good or bad[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(5): 1466-1470.

[11] Gelino S, Hansen M. Autophagy—an emerging anti-aging mechanism[J]. J Clin Exp Pathol, 2012, Suppl 4: 6.

[12] Alvers AL, Wood MS, Hu D, et al. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin[J]. Autophagy, 2009, 5(6): 847-849.

(收稿日期: 2014-01-16)