

· 论 著 ·

重组血红蛋白的原核表达、纯化和鉴定*

杨海波, 廖春丽, 朱 涛, 王莲哲, 陈兰英[△]

(河南城建学院生物工程系, 平顶山 467044)

摘要:目的 利用大肠杆菌表达载体, 表达血红蛋白(Hb)基因, 并进行纯化及鉴定。方法 将原核表达载体 pHE 2-Hb 转入 E. Coli JM109, 经 IPTG 诱导表达; 应用阴离子交换层析、阳离子交换层析分级纯化目的蛋白, 用 Western blot 鉴定纯化出的目的蛋白。结果 SDS-PAGE 分析表明, 表达产物的相对分子质量约为 67 kD, 与理论值相一致; 应用阴离子交换层析、阳离子交换层析分级纯化目的蛋白, Western blot 检测表明得到纯度较高的目的蛋白。结论 利用大肠杆菌表达系统, 获得了较高纯度的目的蛋白, 为进一步研究 Hb 的生物传氧机制研究和以 Hb 为基础载氧药物的研究提供重要基础和依据, 并将为血液替代品和相关疾病的治疗研究奠定研究基础。

关键词: 血红蛋白; 原核表达; 纯化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.016

中图分类号: R331.141; R446.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)21-2889-03

Prokaryotic expression, purification and identification of recombinant hemoglobin*

YANG Hai-bo, LIAO Chun-li, ZHU Tao, et al.

(Department of Biologic Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan, Henan 467044, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic expression vector for the expression of hemoglobin to purify and identify.

Methods Prokaryotic expression vector pHE 2-Hb was expressed in E. Coli JM109. The expressed protein was identified by SDS-PAGE analysis. The target protein was cation-exchange chromatography and anion-exchange chromatography. **Results** The SDS-PAGE showed that the relative molecular mass of this protein was consistent with the predicted value. The protein was expressed in E. Coli JM109 after the prokaryotic expression vector pHE 2-Hb successfully constructed, and the size of the protein was 67 kD, which was consistent with the theoretical data. **Conclusion** The successfully constructed prokaryotic expression vector pHE 2-Hb, and the purified Hb protein can not only provide an important foundation to the study of more about the oxygen transfer mechanism of Hb, and Hb-based oxygen-carrying drugs, but also provide research proofs to the blood substitutes and the treatment of related diseases.

Key words: hemoglobin; prokaryotic expression; purification

血红蛋白(hemoglobin, Hb)是存在于红细胞中的一种重要血红素蛋白质。血红蛋白分子由4个亚基组成,其中两个为 α 多肽链,另两个为 β 多肽链,每个多肽链都含有一个血红素亚基 heme,每个 heme 都有一个氧结合部位。其主要功能是携带氧到组织细胞内和清除组织细胞内 CO_2 , 维持血液酸碱平衡。对于血红蛋白的研究工作受到国内外相关研究者的重视,已成为国际生物医药生物技术领域研究开发的热点^[1-2]。作者通过原核表达、纯化及鉴定,从而为进一步研究血红蛋白的生物传氧机制研究和以 Hb 为基础载氧药物的研究提供重要基础和依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 表达载体 pHE2-Hb 为本系实验室保存。大肠杆菌工程菌株为大肠杆菌 JM109, 为本系实验室保存菌株。QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司。氨苄青霉素、DTT、IPTG、丙烯酰胺、N,N 甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)均购自华美生物工程公司。Q Sepharose FF 和 SP Sepharose FF 交换柱购自 GE 公司。

1.2 重组质粒的诱导表达 将含重组质粒 pHE 2-Hb 的单个菌落接种于 1 mL 含氨苄青霉素(100 mg/L)的 TB 培养液中, 37 °C 振荡培养至饱和。按 1:20 接种量接种饱和培养物到 4 mL LB 培养基中, 于 37 °C 培养约 2 h 至 OD 600 约等于 0.6。留下诱导前对照样本后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 并同时加入 Hemin 至终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 °C 继续培养 2 h 后再次加入 Hemin 至终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 培养 6 h 后收菌, 以 2 \times 凝胶加样缓冲液 50 μL 悬浮, 煮沸 10 min, 离心后取 10 μL 上清液进行 15% SDS-PAGE 分析。

1.3 蛋白纯化

1.3.1 阴离子交换层析 将收集的菌体破碎后, 12 000 \times g 离心 30 min 后, 收集上清液并在透析缓冲液中(20 mM Tris-HCl, pH 8.3)透析过夜。将透析后的样品高速离心后进行 Q Sepharose FF 阴离子交换柱的离子交换吸附。上样后, 交换柱由 20 mM Tris·HCl 溶液(pH 8.3)平衡 3~5 个柱体积, 洗脱至没有基线水平, 然后用 20 mM Tris·HCl 溶液(1 M NaCl, 0.2 mM TETA, pH 7.15)梯度洗脱, 梯度长度为 100 mL, 流出

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470877); 河南省重点科技攻关项目(092102310006)。 [△] 通讯作者, E-mail: lychen666@

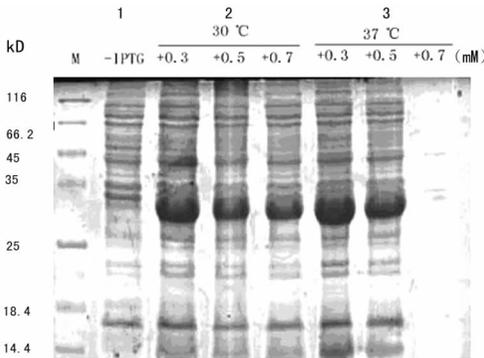
液相对洗脱液的盐浓度从 0 增加到 100%，流速为 1 mL/min，分管收集目标峰，并进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.2 阳离子交换层析 合并目标蛋白，将上述目标蛋白进行 SP Sepharose FF 阳离子交换柱的离子交换吸附。交换柱由 0.05 mol/L Tris · HCl 溶液(含 0.1 mol/L 尿素, pH 7.2)平衡 3~5 个柱体积,上样,洗脱至没有蛋白流出,然后用 0.05 mol/L Tris · HCl 溶液(含 0.1 mol/L 尿素 + 4 mol/L NaCl, pH 7.2)梯度洗脱,梯度长度为 100 mL,流出液相对洗脱液的盐浓度从 0 增加到 100%,流速为 5 mL/min,收集目标峰,把目标峰过 Sephadex G225 脱盐柱脱盐,浓缩,冻干。

1.4 Western blot 检测 蛋白质样品经 SDS-PAGE 电泳分离后,取出凝胶,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。室温平衡 30 min。用半干法转膜,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min。以 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。一抗室温孵育 1 h。PBST 漂洗 4 次,每次 5 min。二抗室温孵育 1 h。用 PBST 漂洗 4 次,每次 5 min。显影、定影并扫描。

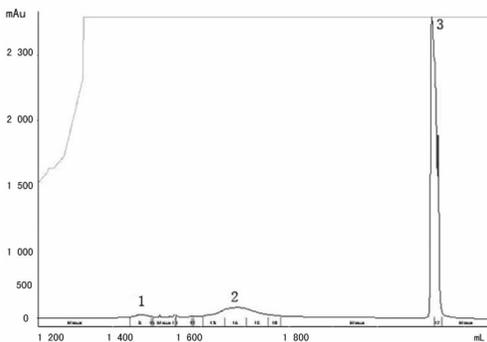
2 结 果

2.1 Hb 的原核表达 用 IPTG 诱导蛋白表达,含 PHE2-Hb 质粒的重组菌诱导后在蛋白相对分子质量约 15 kD 处有明显特异性蛋白条带,与预期大小一致,而空载体菌和未诱导菌均无此特异性表达条带,并同时可以看到共表达的 MAP 的特异性条带,位于 30 kD 左右,见图 1。



M: 标准蛋白;1: 阴性对照;2: 诱导后的菌液上清液;3: 诱导后的菌液沉淀。

图 1 pHE 2-Hb 重组基因的诱导表达

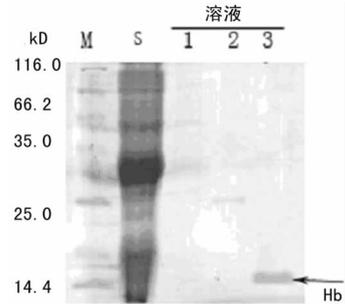


每个峰分别以数字 1、2、3 标示。

图 2 重组血红蛋白的阴离子交换层析图

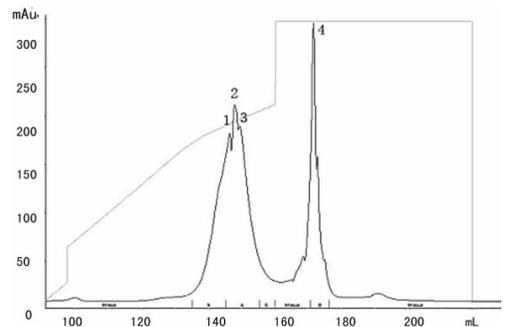
2.2 Hb 的分离纯化 收集的培养菌用裂解缓冲液重悬后,经超声波破碎,4 °C,12 000 r/min 离心 40 min,取上清液,利用 FPLC 系统和阴离子交换层析分离出粗蛋白,在分离过程中可以看到层析柱洗脱的过程中有明显的变红现象。层析图如图

2 所示,在洗脱过程中出现了 3 个洗脱峰,分别收集进行 SDS-PAGE 检验,见图 3。SDS-PAGE 检验结果显示,目标蛋白所在位置为洗脱峰 3,浓度较高,但是出现了杂带,收集的洗脱峰 3 溶液显示明显的红色。



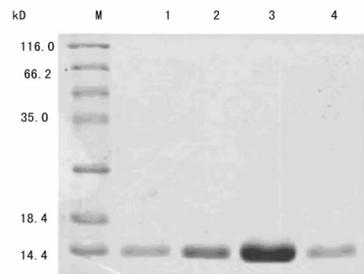
M: 标准蛋白;S: 破碎液上清液;1~3: 对应图 2 中的 3 个峰。

图 3 阴离子交换层析收集样品的 SDS-PAGE 检测



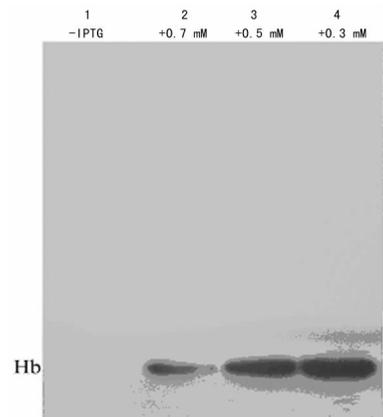
每个峰分别以数字 1、2、3、4 标示。

图 4 重组血红蛋白的阳离子交换层析图



M: 标准蛋白;1~4: 对应图 4 中的 4 个峰。

图 5 阳离子交换层析收集样品的 SDS-PAGE 检测。



1: 阴性对照;2: 0.7 mM IPTG 诱导后的菌液上清液;3: 0.5 mM IPTG 诱导后的菌液上清液;4: 0.3 mM IPTG 诱导后的菌液上清液。

图 6 诱导表达后的重组 Hb 的 Western blotting 分析

合并洗脱峰 3 的样品,透析过夜后通过阳离子交换色谱柱进行第 2 次纯化,直接上样,上样前必须用缓冲液平衡色谱柱,层析图如图 4 所示,出现了 2 个主峰和 4 个小峰。SDS-PAGE 检验结果显示,每个峰洗脱的样品都为同一样品,而且样品纯度达到所要求,见图 5。

2.3 Hb 的鉴定 Western blott 检测结果显示,在 37 ℃ 条件下,对照组未经 IPTG 诱导,则未出现 Hb 蛋白的表达。而经不同浓度 IPTG 诱导处理之后,则有不同程度的蛋白表达效果,0.3 mM IPTG 诱导时,Hb 蛋白表达量较高,随着浓度的增加,0.5 mM IPTG 和 0.7 mM IPTG 诱导时 Hb 表达量较 0.3 mM IPTG 诱导时 Hb 表达量略为降低,见图 6。

3 讨 论

重组 Hb 的设计和纯化制备过程是寻求血液替代品,获得 Hb 制品的重要手段和重要基础。目前人类 Hb 制品基本上分为 3 类,即化学修饰 Hb、含酶类的人工红细胞和微包裹 Hb、分子遗传工程重组 Hb。随着基因工程和分子生物学技术的迅猛发展,克隆技术的进步深刻影响着人工血液的研究工作,可以借助基因工程手段将 rHb 经微生物大量繁殖并纯化来大批量生产人 Hb。作为血液替代品,因基因工程可以避免化学修饰、微囊包被 Hb 的盲目性和试探性,所以展示出更实用的前景。由于 Hb 具有高效的载氧能力和维持胶体渗透压的功能,目前国内外都致力于研制以 Hb 为基质的携氧剂作为红细胞代用品研究开发的主攻方向。rHb 已成为人造血液研究的最新前沿工程和热点领域^[3-4]。

Hb 具有生物传氧功能,因此以 Hb 为基础的载氧药物研究一直是国内外研究的热点之一,该研究可以较好地解决多种

疾病如缺血性心脑血管病的供氧问题^[5-6]。因此,对载氧药物原料 Hb 的要求将会越来越高,需要探索更为高效、合理的 Hb 纯化方法。本文采用 Q Sepharose FF 阴离子交换柱和 SP Sepharose FF 阳离子交换柱的离子交换吸附进行分离纯化,得到纯度较高的重组蛋白。

Hb 的成功表达和纯化为进一步将更好地了解 Hb 的生物传氧机制研究和以 Hb 为基础载氧药物的研究提供了重要基础和研究依据,并将为血液替代品和相关疾病的治疗研究奠定研究基础。

参考文献:

- [1] Chang TMS. Blood substitutes; Principles, methods, products and clinical trials[J]. Clin Chem, 1998, 44: 2229.
- [2] Abdu l, Alayash. Oxygen therapeutics: Can we tame hemoglobin[J]. Nature Rev, 2004, 3: 152.
- [3] Winslow RM. Artificial blood: Aneient dream, modemenignna[J]. Nature Biotechnol, 1998, 16: 621.
- [4] 高林, 张文博, 胡永祥, 等. 红细胞代用品的临床研究进展[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(6): 486.
- [5] Chang TMS. Oxygen carriers [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2002, 3: 1187.
- [6] Robert M, Winslow RM. Blood Substitutes[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 40(2000): 131

(收稿日期: 2010-06-28 修回日期: 2010-08-17)

(上接第 2888 页)

2002, 46(3): 273.

- [9] Nazam-Ansari M, Bhandari U, Pillai KK, et al. Protective role of curcumin in myocardial oxidative damage induced by isoproterenol in rats[J]. Hum Exp Toxicol, 2007, 26(12): 933.
- [10] 谭兴琴, 陈玉培. 凋亡因子 Bcl-2/Bax 与心肌缺血再灌注损伤[J]. 重庆医学, 2007, 36(18): 1885.
- [11] Eeva Palojoki, Antti Saraste, Anders Eriksson, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(6): 2726.
- [12] Flora Sam, Douglas B, Sawyer, et al. Progressive left ven-

tricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000, 279(1): 422.

- [13] Bäcklund T, Palojoki E, Saraste A, et al. Effect of vaso-peptidase inhibitor omapatrilat on cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling in rat myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(3): 727.
- [14] Sumbilla C, Lewis D, Hammerschmidt T, et al. The Slip-page of the Ca²⁺ Pump and Its Control by Anions and Curcumin in Skeletal and Cardiac Sarcoplasmic Reticulum [J]. J Biol Chem, 2002, 277(16): 13900.

(收稿日期: 2010-01-10 修回日期: 2010-04-30)

署名的基本原则

1. 主要收集数据,对数据进行分析和总结,执笔撰写文稿者作为第一作者。
2. 课题负责人参与整个研究过程、数据分析讨论及文稿修改等,作为通讯作者。
3. 所有某研究组的硕士、博士、博士后,凡是在研究组学习工作期间受到研究组的相关经费支持而获得的所有数据和相关资料,在撰文发表时,第一单位必须是实际研究单位。
4. 研究组任何成员(无论离开的还是在学的),在发表与研究组相关的学术论文时,成稿后必须经过研究组的讨论和集体修改,方可投稿。在没有通过研究组的修改讨论时,任何人都不得擅自投稿。
5. 进入研究组的博士生、博士后,在总结发表其在硕士期间和博士期间的数据时,作者单位都要署原工作和学习单位,通讯作者原则上是原导师。