

FimH₁₋₁₅₆融合基因的构建及其原核蛋白表达与纯化*

尹仕伟¹, 邹丽云², 张莹¹, 张晋宇², 唐莎¹, 施维维¹, 吴玉章², 袁发焕¹, 张静波^{1△}

(1. 第三军医大学新桥医院肾内科, 重庆 40037; 2. 第三军医大学全军免疫研究所, 重庆 40038)

摘要:目的 构建含有与溶酶体膜蛋白 2(LAMP-2)P₄₁₋₄₉ 完全同源序列的尿路致病性大肠杆菌(UPEC) I 型菌毛 FimH₁₋₁₅₆ 为目的基因的原核载体, 表达并纯化 FimH₁₋₁₅₆ 融合蛋白。方法 采用 PCR 克隆 pPKL241 质粒获取 FimH₁₋₁₅₆ 基因, 插入原核表达载体 pET28a(+); 将重组表达质粒转染感受态 E. coli BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达 FimH₁₋₁₅₆ 融合蛋白, 超声裂解细菌, Ni-NTA 层析法进行纯化, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析、蛋白免疫印迹法(Western blot)对其进行鉴定。结果 成功构建表达载体, 经对融合蛋白表达条件的优化, 在 IPTG 浓度为 1 mmol/L, 诱导 4 h 目的蛋白表达量最高, 主要以包涵体形式存在; Western blot 证实该 FimH₁₋₁₅₆ 融合蛋白可与抗 6×His 单克隆抗体发生结合反应。结论 成功克隆 FimH₁₋₁₅₆ 融合蛋白表达基因并构建至原核表达载体, 获得了包涵体纯化的 FimH₁₋₁₅₆ 融合蛋白, 为下一步建立实验动物模型奠定了基础。

关键词: FimH₁₋₁₅₆; 融合蛋白; 表达; 纯化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.029 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)05-0589-03

Construction, prokaryotic expression and purification of FimH₁₋₁₅₆ fusion protein*

Yin Shiwei¹, Zou Liyun², Zhang Ying¹, Zhang Jinyu², Tang Sha¹, Shi Weiwei¹, Wu Yuzhang², Yuan Fahuan¹, Zhang Jingbo^{1△}

(1. Department of Nephrology, the Affiliated Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. The institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct and express a prokaryotic expression vector carrying the gene of FimH₁₋₁₅₆ that comprises human lysosome membrane protein 2 P₄₁₋₄₉ gene, and to express and purify the fusion protein. **Methods** FimH₁₋₁₅₆ gene was cloned from plasmid pPKL241 by PCR, and inserted into vector pET-28a(+) to obtain prokaryotic expression plasmid pET-28a-FimH. After transforming Escherichia coli BL21(DE3) with pET-28a-FimH, fusion protein FimH₁₋₁₅₆ was expressed under induction. The target fusion protein was purified, and its antigenicity was detected through Western blot. **Results** The expressed recombinant protein was purified, the expression of protein was the highest when IPTG was 1 mmol/L and 4h after induction, it was expressed as include body form, and the expressed protein was identified to react with monoclonal antibodies 6×His by Western blotting. **Conclusion** We cloned FimH₁₋₁₅₆ fusion protein expressed genes successfully, constructed prokaryotic expression vector, and won the inclusion body purification of FimH₁₋₁₅₆ fusion protein.

Key words: FimH₁₋₁₅₆; fusion protein; expression; purification

自身免疫性疾病的发病机制主要是病原体通过分子模拟机制打破机体免疫耐受;即病原体某些抗原表位与宿主组织蛋白的结构相同或相似,导致病原体刺激机体产生的免疫应答直接作用于结构相似的自身组分^[1]。Kain 等^[2]对寡免疫复合物局灶坏死性肾炎(FNGN)的研究发现了分子模拟的直接证据:尿路致病性大肠杆菌(pylonephritic E. coli, UPEC) I 型菌毛 FimH 蛋白表位 P₇₂₋₈₀ 与人溶酶体膜蛋白 2(lysosome membrane protein 2, LAMP-2)致病表位 P₄₁₋₄₉ 具有 100% 的同源性,机体通过识别细菌 FimH 抗原的同时,对自身的 LAMP-2 蛋白也发生了交叉反应。有研究发现, UPEC 存在于多种菌毛,包括:P 型、S 型、Dr 家族黏附素和 I 型菌毛等^[3]。I 型菌毛作为重要毒力因子在 UPEC 中分布广泛,除黏附定殖能力外, FimH 位于最顶端,是真正的黏附素能够与含有甘露糖的糖蛋白受体结合,介导细菌与多种宿主细胞黏附^[4]。FimH 蛋白在免疫方面也起重要作用^[2]。然而,感染 UPEC 的患者与发生自身免疫疾病、甚至 FNGN 的可能机制有待进一步探讨。本研究通过克隆含有与 LAMP-2 P₄₁₋₄₉ 完全同源序列的 UPEC I 型菌毛 FimH₁₋₁₅₆ 为目的基因的原核载体,表达并纯化其融合

蛋白,为建立 FNGN 实验动物模型提供材料和基础,也为基于 LAMP-2 靶抗原的多肽疫苗研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pET-28a(+)质粒由全军免疫研究所邹丽云教师赠送,含 FimH₁₋₁₅₆ 基因序列的 pPKL241 质粒由丹麦 Per Klemm 教授馈赠,大肠杆菌 DH5α 由本室保存,感受态菌株 BL21(DE3)购自北京中杉公司。BamH I、Hind III、Kpn I、DNA Marker、T4DNA 连接酶均购自大连 Takara 公司;预染蛋白 Marker(10×10³~170×10³)购自 MBI 公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Omega 公司;IPTG 购自 Merk 公司;Ni-NTA 树脂购自 Qiagen 公司;抗 6×His 抗体购自 Abcam 公司。引物合成,质粒测序由英潍捷基(上海)公司完成。

1.2 原核表达质粒 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆ 的构建 根据 FimH₁₋₁₅₆ 的编码区序列设计特异性引物,上游引物序列为 5'-ACG GGA TCC AAA CGT GTT ATT ACC CTG TTT GC-3' (含 BamH I 酶切位点),下游引物的序列为:5'-CGG AAG CTT TTA GCC GCC AGT AGG CAC CAC CA-3' (含 Hind

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971366);重庆市国际合作项目(CSTC201110004);第三军医大学科研课题(2011XLC37)。
作者简介:尹仕伟(1984—),硕士,主要从事肾脏病免疫发病机制研究。△ 通讯作者, Tel: (023)68774341; E-mail: cqzhangjb@163.com。

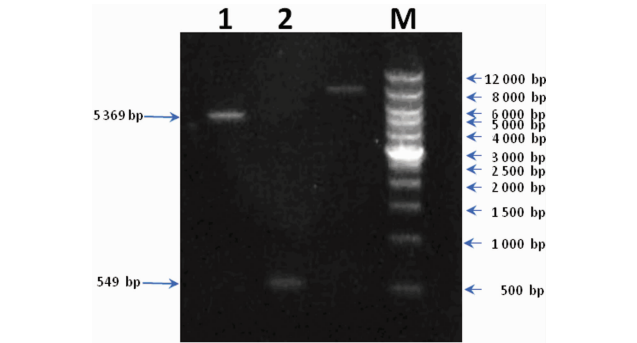
III 酶切位点),引物均由英潍捷基(上海)公司合成。以质粒 pPKL241 为模板进行 PCR 扩增,反应条件:98 ℃ 2 min;98 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 45 s,循环 30 次;72 ℃ 延伸 2 min。用 *Bam* H I、*Hind* III 分别酶切 PCR 产物与 pET28a(+)质粒,经琼脂糖凝胶回收,将载体和目的片段用 T4 连接酶室温连接 5 h。将连接的重组质粒 pET28a(+)-FimH 转化 *E. coli* DH5 α ,在含有 10 mg/L 卡拉霉素的 LB 琼脂糖培养基平板中 37 ℃ 培养过夜。沿平板一直径挑选 3 个菌落,扩增后提取质粒,并用 *Kpn* I 与 *Hind* III 酶切鉴定,并送英潍捷基(上海)公司测序,确认得到正确的重组质粒,重组质粒命名为 pET28a-FimH₁₋₁₅₆。

1.3 FimH₁₋₁₅₆ 的诱导表达及纯化 将测序正确的重组质粒 pET28a-FimH₁₋₁₅₆ 转化 *E. coli* BL21(DE3),在含有 10 mg/L 卡拉霉素的 LB 培养基中 37 ℃ 摇菌过夜,后以 1 : 100 转接到 20 mL 新鲜的含 10 mg/L 卡拉霉素的 LB 培养基。37 ℃ 摇菌 2 h,A600 nm 约为 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度分别为 0.00、0.01、0.10、1.00 mmol/L,37 ℃ 摇菌诱导 4 h,6 000 r/min 4 ℃ 低温离心 10 min 收菌。对上清液和沉淀均进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,判定表达形式。诱导表达的融合蛋白包含有 6 $\times$ His 片段,适用 Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化目的蛋白。用 10 倍体积 PBS 重悬细菌,分别用 10、20、50、100、250、500 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L 氯化钠、10 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)溶液洗脱。

1.4 SDS-PAGE 及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 将纯化后的 FimH₁₋₁₅₆ 蛋白进行 SDS-PAGE 分析,300 mA 转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜 2 h,50g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,抗 6 $\times$ His(一抗:1 : 1 000)室温孵育 1 h,PBS-Tween20(PBST)洗膜 3 次,每次 10 min,羊抗鼠 IgG(二抗:1 : 5 000)室温孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入发光剂后曝光、显影。

2 结 果

2.1 重组质粒 pET28a(+)-FimH 酶切及鉴定 pPKL241-FimH₁₋₁₅₆ 基因 PCR 产物、pET-28a(+)经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳显示,pET-28a(+)在 5 000 ~ 6 000 有一特异条带,FimH₁₋₁₅₆ 在 549 bp 处有特异条带(图 1)。pET-28a(+)与 FimH₁₋₁₅₆ 基因 PCR 扩增产物连接后,转化 DH-5 α ,沿平板一条直径,挑取 3 个单克隆,*Kpn* I 为 FimH₁₋₁₅₆ 基因序列上的一个酶切位点,经 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切后,可见图 2“1、3”为 FimH 基因连接上载体,而“2”为载体自连接。进一步对重组质粒送至英潍捷基(上海)公司进行 DNA 测序,结果序列和阅读框均完全正确。

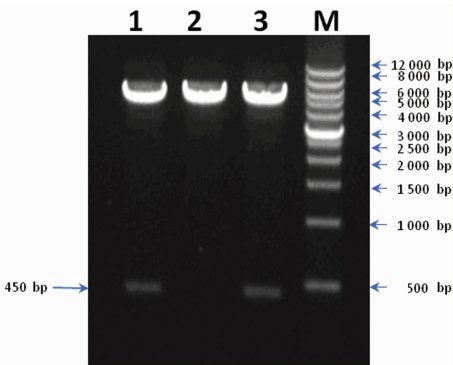


M:500~12 000 DNA Marker;1:pET-28a(+)载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后产物;2:FimH₁₅₆基因 PCR 扩增产物。

图 1 FimH₁₋₁₅₆ 基因 PCR 产物及 pET-28a(+) 载体电泳分析

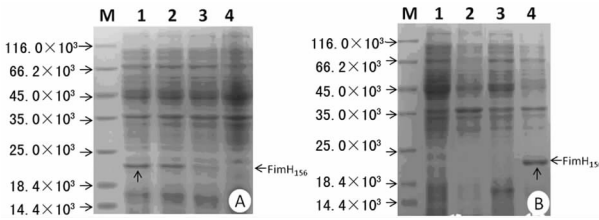
2.2 目的蛋白的纯化 筛选到的阳性 pET28a(+)-

FimH₁₋₁₅₆,将表达菌 *E. coli* BL21(DE3)于 37 ℃ 振荡培养至 A600 nm 值为 0.6 时,在诱导温度为 37 ℃、诱导时间为 4 h、IPTG 浓度依次 0.00、0.01、0.10、1.00 mmol/L,在 IPTG 浓度为 1.00 mmol/L 时,目的蛋白的表达最高。表达形式主要以包涵体表达(图 3)。进一步尝试 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆ 在 *E. coli* BL21(DE3)于 16 ℃ 低温诱导表达,电泳检测显示无目的蛋白诱导表达。Ni-NTA 亲和层析纯化,可见 250 mmol/L 咪唑洗脱液中有少量目的蛋白,但浓度较低(虚线 $\uparrow$),流穿溶液中仍然有较多蛋白(实线 $\uparrow$),表明纯化效果不太好,蛋白挂柱能力差,见图 4。



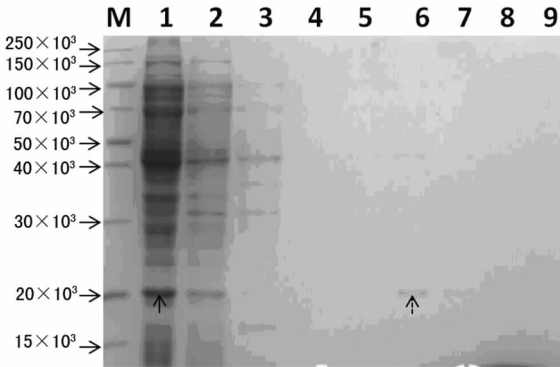
M:500~12 000 DNA Marker;1、3:*Kpn* I 和 *Hind* III 酶切质粒 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆;2:载体自连接。

图 2 重组原核表达载体 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆ 的酶切分析



A:不同浓度 IPTG 诱导融合蛋白表达(M:预染蛋白 Marker;1~4:BL21(DE3)/ pET28a(+)-FimH 分别于 0.00、0.01、0.10、1.00 mmol/L IPTG 诱导);B:FimH₁₅₆融合蛋白表达形式的判定(M:预染蛋白 Marker;1、2:*E. coli* BL21(DE3)/ pET28a(+)-FimH 分别 0 mmol/L 诱导后上清液和沉淀;3、4:*E. coli* BL21(DE3)/ pET28a(+)-FimH 分别 1 mmol/L 诱导后上清液和沉淀)。

图 3 不同浓度 IPTG 诱导及融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

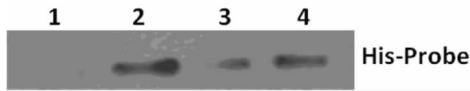


M:标准;1:流穿溶液(实线 $\uparrow$);2~9:分别为 10、20、50、100、250 (虚线 $\uparrow$),500(第 1 管),500(第 2 管),500 mmol/L(第 3 管)咪唑洗脱液。

图 4 重组质粒 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆ 表达纯化检测

2.3 目的蛋白的鉴定 取未诱导 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a

(十)-FimH₁₋₁₅₆对照菌株;纯化后重组蛋白 FimH₁₋₁₅₆和超声后上清液及沉淀,进行 Western blot 鉴定,抗体为抗 6×His 单克隆抗体(图 5),表明 FimH 融合基因 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆在 E. coli BL21(DE3)中正确表达,形式为包涵体表达。



1:未诱导 E. coli BL21(DE3)/pET28a(+)-FimH 对照菌株;2:超声后的上清液;3:纯化后重组蛋白 FimH;4:包涵体。

图 5 FimH₁₋₁₅₆融合蛋白的 Western blot 分析

3 讨 论

抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)相关性血管炎(ANCA-associated systemic vasculitis, AASV)是一种典型的自身免疫性疾病,已证实传统的 ANCA 相关的靶抗原中有中性粒细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)及蛋白酶 3(protease 3, PR3)。van Putten 等^[5]研究韦格纳肉芽肿与金黄色葡萄球菌感染的关系中,明确了感染与自身抗体的间接证据,但一直未能找到感染与 MPO 或 PR3 相关的直接证据。抗 LAMP-2 抗体是最近才发现的 ANCA 新亚型, Kain 等^[6]关于 FNGN 发病机制的研究提示, UPEC 入侵人体后,宿主通过 FimH 启动针对 LAMP-2 的自身免疫是 LAMP-2-ANCA 相关性 FNGN 发病机制的关键,这提供了分子模拟的直接证据。目前,抗 LAMP-2 抗体被认为是 AASV 更为特异而有效的标志,存在于几乎所有的 FNGN 患者中,与病变的相关性是传统抗 MPO 及 PR3-ANCA 的 2 倍^[6];然而,有关抗 LAMP-2 抗体的临床实际价值仍存在较大的争议,有报道就对抗 LAMP-2 抗体与疾病的相关性提出质疑,更多标准化的实验有待进一步研究^[7-8]。

Kain 等^[2]的研究证实了人 FNGN 的 LAMP-2 靶抗原的致病性的表位,即 P₄₁₋₄₉(HGTVTYNGS)和 P₃₃₁₋₃₄₁(QGKYSTAQDCS),并成功构建了 WKY 大鼠 FNGN 动物模型。明确致病性表位后,特异性诱导针对 LAMP-2 靶抗原的免疫耐受,这有望成为个性化治疗 FNGN 的有力手段,也为基于 LAMP-2 靶抗原的多肽疫苗开发提供了可能。作者利用 LAMP-2 靶抗原的致病性的表位 P₄₁₋₄₉多肽联合完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA),乳化后皮下注射 WKY 大鼠建立 FNGN 模型实验已经完成,3 只实验组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显增多,但肾病理检查未见明显新月体及小球坏死,这可能与人工合成多肽免疫原性低有关。本研究成功构建了表达质粒 pET28a(+)-FimH₁₋₁₅₆,采用大肠杆菌表达,获得免疫原性更高的 UPEC I 型菌毛 FimH₁₋₁₅₆表达蛋白,通过 Ni-NTA 纯

化后,利用标签抗体进一步间接鉴定了该表达蛋白,与文献报道结果类似^[9],该蛋白的表达形式也为包涵体,这可能与表达蛋白自身特性有关。随后,作者采用反复冻融、超声、离心和反复洗涤的方法,经 SDS-PAGE 分析,切胶纯化出较高纯度的 FimH₁₋₁₅₆融合蛋白,为进一步采用 FimH₁₋₁₅₆融合蛋白诱导 WKY 大鼠建立 FNGN 模型奠定基础。

参考文献:

[1] Rashid T, Ebringer A. Autoimmunity in rheumatic diseases is induced by microbial infections via crossreactivity or molecular mimicry [J]. Autoimmune Dis, 2012, 2012: 539282.

[2] Kain R, Exner M, Brandes R, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis [J]. Nat Med, 2008, 14(10): 1088-1096.

[3] Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract [J]. Traffic, 2005, 6(1): 18-31.

[4] Connell I, Agace W, Klemm P, et al. Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9827-9832.

[5] van Putten JW, van Haren EH, Lammers JW. Association between Wegener's granulomatosis and Staphylococcus aureus infection [J]. Eur Respir J, 1996, 9(9): 1955-1957.

[6] Kain R, Tadema H, McKinney EF, et al. High prevalence of autoantibodies to hLAMP-2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3): 556-566.

[7] Roth AJ, Brown MC, Smith RN, et al. Anti-LAMP-2 antibodies are not prevalent in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody glomerulonephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3): 545-555.

[8] Fervenza FC, Specks U. Vasculitis: Will LAMP enlighten us about ANCA-associated vasculitis [J]. Nat Rev Nephrol, 2012, 8(6): 318-320.

[9] 尹晓琳, 石新丽, 魏林, 等. 尿路致病性大肠杆菌 I 型菌毛 fimH 和 fimC 基因原核表达质粒的构建及表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(11): 1131-1134.

(收稿日期: 2013-09-25 修回日期: 2013-11-14)

(上接第 588 页)

cells in human glomeruli [J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(6): 867-880.

[6] Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, et al. Hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66255.

[7] Wen J, Cheng QL, Ma Q, et al. Effects of kidney stem cells on injure-recovery of human renal tubular epithelial cells [J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2013, 45(4): 619-624.

[8] Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, et al. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(12): 3128-3138.

[9] O'Neill AC, Ricardo SD. Human kidney cell reprogramming: applications for disease modeling and personalized medicine [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(9): 1347-1356.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-09-26)