

文章编号 :1001- 4721(2011)02- 0007- 04

梅花鹿鹿茸 S100A4 融合蛋白在大肠杆菌中的表达纯化

刘东^{1,2}, 邢秀梅², 赵海平², 褚文辉², 鲁晓萍², 王大涛², 李春义^{2*}

(1.江苏科技大学,江苏 镇江 212018; 2.中国农业科学院特产研究所,吉林 吉林 132109)

摘要 我们的前期研究表明,鹿茸发生和再生都是依赖干细胞的过程。鹿茸的干细胞存在于鹿未来鹿茸发生区的骨膜中,即生茸骨膜。AP 细胞表达特有的分子 S100A4,推测为鹿茸发生的关键调节分子。进一步从分子水平阐述 S100A4 在鹿茸发生中的调节机制需要高质量 S100A4 的纯品。为了解决这一问题,我们针对已从梅花鹿 AP 细胞反转录出的 S100A4 基因序列,设计了含有 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点的上下游引物,并扩增出了目的片段。其后将 S100A4 基因片段和 PGEX- 6P- 1 载体酶切并进行了连接,转入 Top10F' 感受态细胞中,涂板筛选出了阳性克隆,进行了菌液 PCR 及双酶切鉴定,再将重组质粒转入了 BL21(DE3) pLys S 表达菌株进行了 IPTG 诱导表达。用聚丙烯酰胺凝胶电泳及 western blot 鉴定表明融合蛋白成功表达,随后对融合蛋白进行了纯化。本研究成功地实现了鹿本身特有的 S100A4 基因的体外表达。

关键词 S100A4; PGEX- 6P- 1; BL21(DE3) pLys S; 蛋白表达

中图分类号:Q786

文献标识码:A

Expression and Purification of S100A4 Fusion Protein of Deer Antler in *E.coli* BL21

LIU Dong^{1,2}, XING Xiu- mei², ZHAO Hai- ping², CHU Wen- hui²,
LU Xiao- ping², WANG Da- tao², LI Chun- yi^{2*}

(1. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;

2. Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, CAAS, Jilin 132109, China)

Abstract :Our early research demonstrated that antler generation and regeneration both depend on stem cells. Stem cells of antlers exist in the periosteum that will develop into an antler. The periosteum of this area is called antlerogenic periosteum (AP). AP expresses S100A4 molecule, which is thought to be critical for regulating antler generation. High quality of pure S100A4 is required to explore the regulatory mechanism of S100A4 in antler regeneration. In order to meet this demand, we designed the primers which include the cutting sites of *EcoR* I and *Bam* H I to clone the gene of S100A4. We digested the fragment and PGEX- 6p- 1 vector with restriction enzymes and linked them together. The products of linking was transformed into competent cells (Top10F'). We selected positive colonies which were verified with PCR and gel electrophoresis. We transformed the recombinant vector into competent cells (BL21 (DE3) pLys S), and expression of

收稿日期 2011- 04- 15

基金项目 国家自然科学基金(31070878)

作者简介:刘东(1986-)男,山东聊城人,硕士研究生,从事鹿茸再生生物学研究。

*通讯作者:李春义 E- mail: tcslichunyi@126.com.

protein was induced by the lactose analog isopropyl β -D thiogalactoside (IPTG). Successful Expression of S100A4 protein was demonstrated by SDS-PAGE and western blot. In the end we purified the fusion protein. This experiment successfully produced S100A4 molecule belonging to sika through prokaryotic expression system.

Key words : S100A4; PGEX-6P-1; BL21(DE3) pLys S; Protein expression

鹿茸是哺乳动物器官在失去后还能完全再生的唯一器官,在鹿茸再生机制的研究中发现,异位移植的鹿茸生茸骨膜(Antlerogenic Periosteum, AP)能够形成鹿茸,而角柄骨膜(Pedicle Periosteum, PP)则不能形成^[1]。对两种组织中表达蛋白的分析发现,AP中表达S100A4蛋白,而PP不表达(尚未发表)。Ambartsumian等^[2]的研究表明,S100A4具有很强的促进血管生成的作用,并参加了肿瘤发生、发展及其转移的整个病理过程。Grigoria等^[3,4]研究表明,S100A4蛋白可以通过与P53蛋白的调控区结合,使P53丧失其在细胞周期中的调控作用,从而引起增殖。说明S100A4蛋白有可能在鹿茸再生过程中起到关键作用。本实验对AP细胞中的S100A4基因进行了克隆,利用大肠杆菌表达系统进行S100A4蛋白的大量表达,并进行了纯化,获得S100A4蛋白,为下一步鉴定S100A4蛋白在鹿茸再生中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

Top10F'大肠杆菌(invitrogen)、BL21(DE3) pLys S、PGEX-6P-1表达载体均由中国农业科学院特产研究所生物技术实验室保存。

1.2 主要试剂和材料

100 bp DNA Ladder、1 Kb DNA Ladder(天根生化科技有限公司);限制性内切酶(*EcoR* I、*Bam* H I)、T4DNA连接酶、Takara *Taq*™酶、Takara Minibest Plasmid Purification Kit、PCR产物纯化试剂盒、Takara胶回收试剂盒、异丙基硫代半乳糖苷 IPTG(sigma);蛋白质分子量标准(宽)(大连宝生物工程有限公司)、氨苄青霉素(Amp)(石家庄中诺药业);丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(bio-rad)、GST融合蛋白纯化试剂盒(中科晨宇生物科技公司);硝酸纤维素膜(Amersham Biosciences);兔S100A4多克隆抗体(Abcam公司)、HRP标记羊抗兔IgG二抗(Abcam公司)、增强型DAB显色试剂盒(福建迈新生物技术公司)。

1.3 S100A4基因片段的扩增、重组及鉴定

根据本实验室已经反转录出的S100A4基因设

计分别含有*EcoR* I和*Bam* H I酶切位点的上下游引物并进行PCR扩增。

上游引物 5' CTGACTGGATCCATGGCATATC-CC 3'

下游引物 5' GAGGAGAATTCATTTTTTC-CG GGGT 3'

分别用*Bam* H I和*EcoR* I酶切S100A4基因目的片段和PGEX-6P-1载体,然后切胶回收酶切产物,通过T4连接酶37℃连接1h,取10μL连接产物加入到200μL Top10F'感受态细胞中,冰上放置30min,然后42℃热击90s,再于冰上放置3~5min,随后加入800μL LB培养基,37℃ 100r/min摇床培养1h。取100μL培养菌液涂布含100μg/mL氨苄青霉素(Amp)的LB板,37℃培养14h。挑取8个单菌落接种在含有Amp+抗性的LB液体培养基中培养,将鉴定结果为阳性的菌株测序鉴定。

1.4 重组载体转入BL21表达菌株并进行诱导表达

取阳性重组载体1μL加入到200μL BL21感受态细胞,冰上放置30min,然后42℃热击90s,再于冰上放置3~5min,加入800μL LB培养基,37℃,100r/min摇床培养1h。取100μL培养菌液涂布含100μg/mL AMP的LB板,37℃培养14h,挑取单菌落,接种于Amp+抗性(200μg/mL)的液体TB培养基中,37℃ 220rpm/min摇床培养过夜,第2天以1:100比例接种于5mL Amp+抗性(200μg/mL)的TB液体培养基中培养3h(OD₆₀₀≈0.8),加入IPTG使终浓度为0.5mM,25℃ 220r/min培养条件下诱导4h。同时设立空载体菌株表达的阴性对照。

1.5 SDS-PAGE及Western Blot分析

取诱导表达后的菌液5mL,11 000g离心2min,取菌体沉淀,并用10mL pH7.4的PBS重悬菌体,超声波破碎功率400W、作用2s、间隔3s、作用100次。然后6 000g离心5min,取上清做SDS-PAGE分析(浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度15%,上样量为15μL)。

上述得到的上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳

后,再电转移到硝酸纤维素膜上(电压 100V,15 min),封闭液(含 5%脱脂奶粉的 TBST)封闭 3h 后,分别与兔 S100A4 多克隆抗体(1:1 000 稀释)和羊抗兔 IgG 二抗(1:3 500 稀释)孵育,二氨基联苯胺(DAB)显色,并保存结果。

1.6 GST融合蛋白的纯化

培养30mL BL21大肠杆菌并IPTG诱导表达,离心取菌体沉淀,用PBS重悬,超声波破碎功率400W、作用2s、间隔3s、作用100次。将裂解后的溶液6 000g离心5min,取上清,用0.45μm滤膜过滤。取滤液与谷胱甘肽琼脂糖4B混匀,上柱,500g离心1min,将底部收集的液体保存。然后用PBS漂洗谷胱甘肽琼脂糖4B 2次,500g离心1min。再用还原型谷胱甘肽洗脱融合蛋白,500g离心,得到的洗脱液即为纯化的 S100A4融合蛋白。

2 结果

2.1 S100A4基因扩增

用含有 *Bam*HI 的上游引物和 *Eco*RI 的下游引物扩增目的基因片段,通过琼脂糖凝胶电泳分析,片段位于300bp~400bp之间,与理论值相符,见图1。

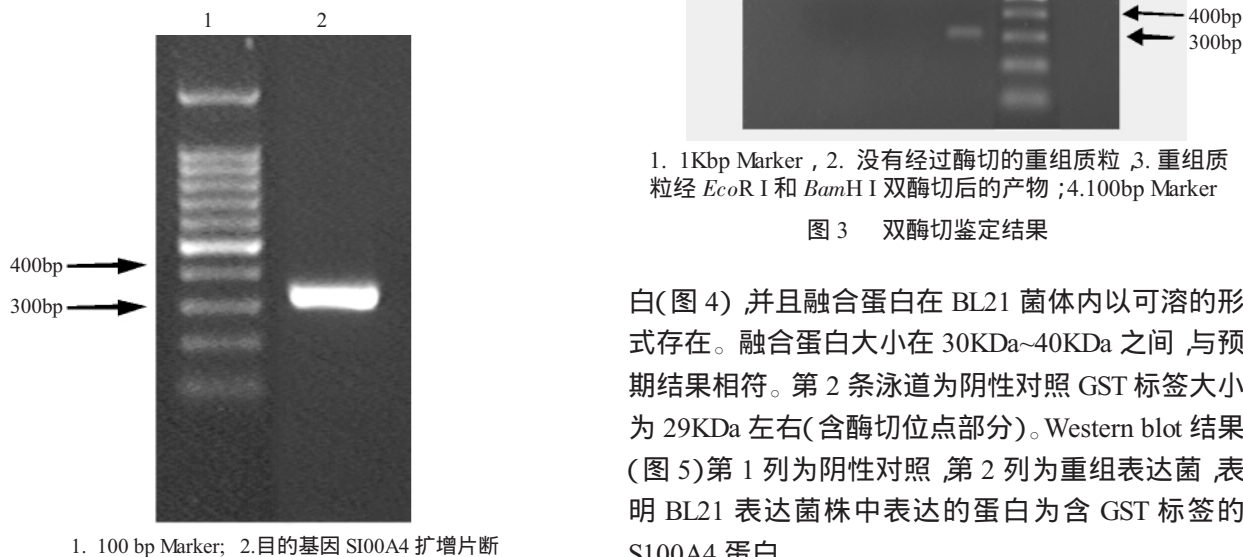


图1 S100A4 基因扩增结果

2.2 PGEX- 6P- 1 重组载体鉴定结果

挑选单克隆菌落进行 PCR 鉴定(图 2),结果均为阳性,且大小一致。提取质粒双酶切鉴定(图 3)结果显示,双酶切后小片段大小与预期大小相符。测序结果显示片段与载体连接正确。

2.3 GST 融合蛋白表达鉴定和 western blot 验证

取上清进行 SDS- PAGE 电泳,检测到了融合蛋

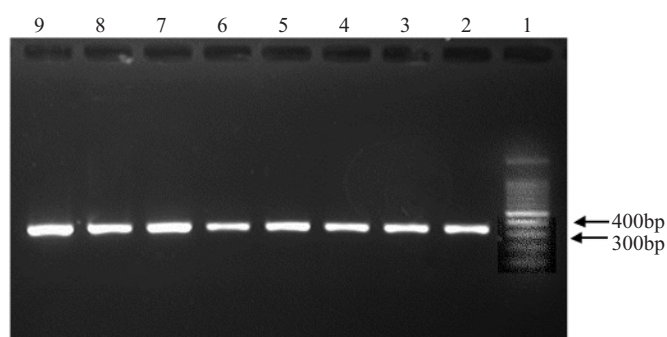


图2 菌液 PGR 鉴定结果

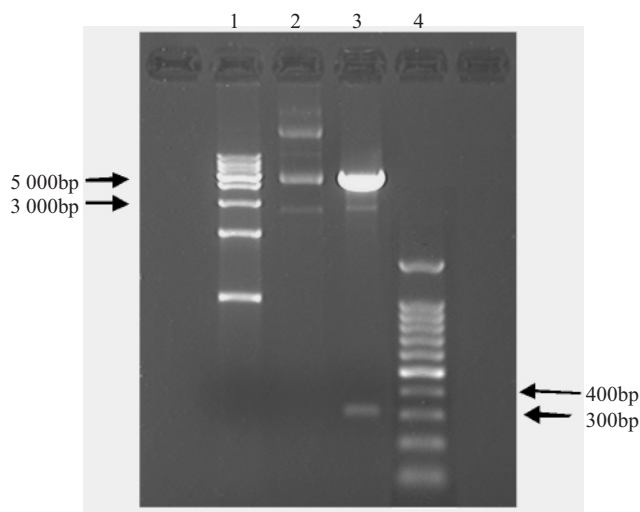
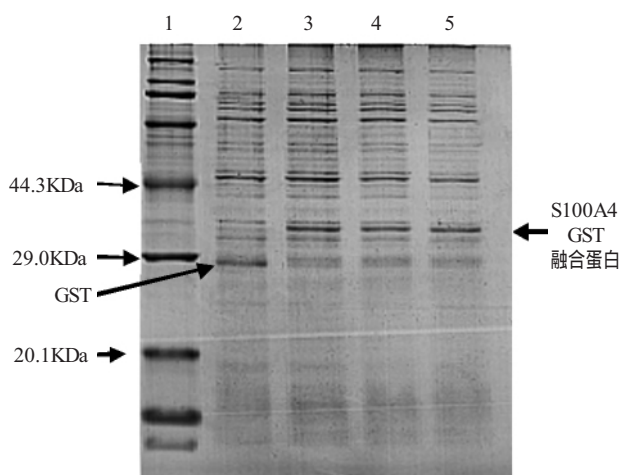


图3 双酶切鉴定结果

白(图 4),并且融合蛋白在 BL21 菌体内以可溶的形式存在。融合蛋白大小在 30KDa~40KDa 之间,与预期结果相符。第 2 条泳道为阴性对照 GST 标签大小为 29KDa 左右(含酶切位点部分)。Western blot 结果(图 5)第 1 列为阴性对照,第 2 列为重组表达菌,表明 BL21 表达菌株中表达的蛋白为含 GST 标签的 S100A4 蛋白。

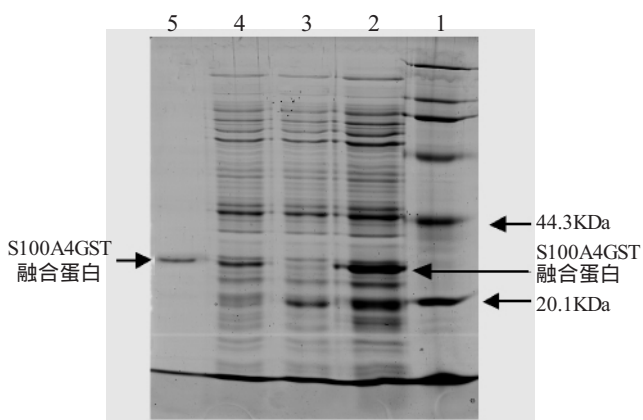
2.4 S100A4- GST 融合蛋白的纯化

聚丙烯酰胺凝胶电泳验证结果(图 6),第 2 泳道的蛋白是将蛋白样品和谷胱甘肽琼脂糖 4B 混合,上柱 500g 离心后收集得到的液体,表明有大部分 S100A4- GST 融合蛋白没有结合到柱子上。第 3 泳道为含空质粒的菌株蛋白。第 4 泳道为含重组质粒的菌株蛋白。第 5 泳道为纯化得到的蛋白。结果表明,纯化得到了单一的 S100A4- GST 融合蛋白。



1. 蛋白质 Marker; 2. 空质粒阴性对照上清表达蛋白为 GST, 大小在 29KDa 附近; 3. 3~5 重组质粒上清表达 GST 与 S100A4 的融合蛋白, 大小在 29KDa~44.3KDa 之间

图 4 超声波破碎后取上清电泳验证结果



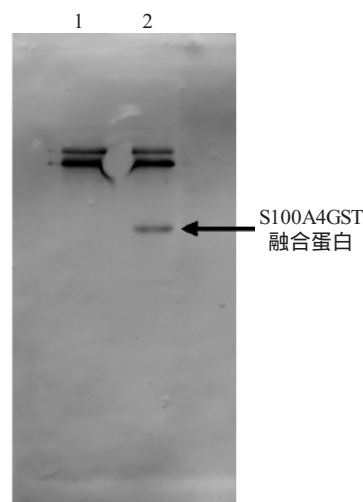
1. 蛋白质 Marker; 2. 离心收集的液体; 3. 空质粒菌体裂解液; 4. 含重组质粒的菌体裂解液; 5. 纯化得到的 S100A4- 融合蛋白

图 6 融合蛋白的纯化

3 讨论

鹿茸的发生依赖于生茸骨膜, 生茸骨膜细胞可能是出生后保留的胚胎组织, 并且其表达一些干细胞标记分子, 如 CD9、OCT4 等^[5]。而且在生茸骨膜细胞内表达 S100A4 蛋白, 而角柄骨膜细胞不表达(尚未发表)。在肿瘤的研究中发现, S100A4 蛋白具有促进血管生成的作用^[2], 在鹿生茸过程中伴随有血管的生成。这可能表明 S100A4 蛋白在生茸过程中发挥重要的调控作用。

获取单一的 S100A4 蛋白对于研究该蛋白在鹿茸发生过程中的调控作用是必要的, 因此通过将 GST 标签与 S100A4 蛋白融合的方法, 可以方便纯化单一的 S100A4 蛋白。本实验首次将梅花鹿生茸



1. 空质粒阴性对照; 2. 重组质粒结果

图 5 Western blot 验证结果

骨膜中的 S100A4 基因进行原核表达, 并对表达后的融合蛋白进行了纯化。通过 BL21(DE3) pLys S 原核表达系统成功地表达出了含有 GST 融合标签的 S100A4 蛋白。SDS-PAGE 电泳结果显示, GST 标签大小为 29KDa, 融合后的蛋白大小在 37KDa 左右, 并通过 western blot 分析表明表达的蛋白为 S100A4 蛋白, 为后续研究 S100A4 蛋白在鹿茸再生机制中所起的作用打下基础。

参 考 文 献

- [1] Li C Y, Yang F H, et al. Stem cells responsible for Deer Antler regeneration are unable to recapitulate the process of first antler development- revealed through intradermal and subcutaneous tissue transplantation [J]. J. Exp. Zool (Mol.Dev. Evol), 2010, 314B:552- 570.
- [2] 贾富鑫, 张东, 刘江伟. S100A4 蛋白与肿瘤血管生成的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2): 389- 391.
- [3] 陈永锋, 张令达. 钙结合蛋白 S100A4 与肿瘤[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12(3): 248- 251.
- [4] 赵玉泽, 王宏坤, 郑会霞. S100A4 基因在肿瘤研究中的进展[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(8): 731- 732.
- [5] Li C Y, Yang F H, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration- insights from studying annual renewal of deer antlers[J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009, 4: 237- 251.