

hER α -LBD 原核表达载体的构建及蛋白表达活性鉴定*

王艳芳¹, 赵继军², 田再民³, 郭彦峰⁴

1. 包头医学院基础医学与法医学院(包头 014040); 2. 包头医学院第一附属医院(包头 014040);
3. 河北北方学院(张家口 075000); 4. 北京科技大学(北京 100083)

【摘要】 目的 构建人雌激素受体 α 亚型配体结合区(hER α -LBD)的原核表达载体,并进行表达蛋白的活性鉴定。方法 以hER α -LBD质粒为模板,采用PCR方法扩增hER α -LBD基因,PCR扩增产物鉴定后与T载体(pGEM-T-easy)连接,将连接物转化到感受态细胞中,阳性菌落经酶切和测序鉴定,和pET-28a(+)-质粒分别进行双酶切,T4 DNA连接酶连接,构建重组表达载体pET-28a(+)-hER α -LBD,转化到大肠杆菌JM109和BL21感受态细胞中。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导细胞表达hER α -LBD融合蛋白;将雌二醇-牛血清白蛋白(BSA)偶联抗原(E2-BSA)与融合蛋白混合,通过电泳法鉴定hER α -LBD的雌激素配体结合活性。结果 PCR扩增的hER α -LBD基因片段约为1.9 kb,与预期目的片段大小一致。与T载体连接,形成pGM-T-hER α -LBD重组质粒,转化到感受态细胞,阳性菌落酶切和测序鉴定正确,与pET-28a(+)-质粒酶切后连接,成功构建原核重组表达载体pET-28a(+)-hER α -LBD;在大肠杆菌中异源表达人雌激素受体ER α 的配体结合区hER α -LBD蛋白。经亲和色谱法纯化后,hER α -LBD蛋白的表达量可达250 mg/L。电泳法证实hER α -LBD具有雌激素结合活性。结论 成功构建原核重组表达载体pET-28a(+)-hER α -LBD,hER α -LBD具有雌激素结合活性。

【关键词】 雌激素受体 α 亚型配体结合区 表达载体 活性

Construction, Expression of hER α -LBD Prokaryotic Vector and the Activity of Expressed Protein WANG Yan-fang¹, ZHAO Ji-jun², TIAN Zai-min³, GUO Yan-feng⁴. 1. College of Preclinical and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014040, China; 2. The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, China; 3. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 4. University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

【Abstract】 **Objective** To construct the prokaryotic expression system of estrogen receptor α ligand binding domain (hER α -LBD) and to evaluate the estrogen receptor ligand binding activity of the expressed protein. **Methods** hER α -LBD was amplified from the plasmid of hER α -LBD by PCR, the identified PCR product was ligated with pGEM-T-easy vector to generate pGM-T-hER α -LBD. After the confirmation, the hER α -LBD fragments were obtained by enzyme digestion and inserted into pET-28a. The expression vectors were expressed in *E. Coli* to produce hER α -LBD protein. We mixed the hER α -LBD protein and estradiol and bovine serum albumin conjugated antigens (E2-BSA), then evaluated the binding activity of hER α -LBD by electrophoresis. **Results** The amplified fragment was about 1.9 kb, which was in agreement with the expected target fragment. Recombinant plasmid of pGM-T-hER α -LBD was confirmed by enzyme digestion and sequencing, then pET-28a(+)-hER α -LBD was constructed successfully. The expressed hER α -LBD protein in *E. Coli* was observed and the expression amount was 250 mg/L after affinity chromatography purification. hER α -LBD was confirmed to had estrogen binding activity by electrophoresis. **Conclusion** The prokaryotic expression system of pET-28a(+)-hER α -LBD was successfully constructed, and hER α -LBD had the activity of binding.

【Key words】 Estrogen receptor α ligand binding domain Expression vector Activity

雌激素化合物是一类重要的一类环境内分泌干扰物质(EDCs),对地球生态系统、人体的健康以及生殖、发育有重大影响,是当前生态毒理学和环境科学研究的热点问题^[1-4]。目前,对EDCs的一致看法是:EDCs在机体内,干扰机体自身激素的正常代

谢,或者生成类似的机体自身激素,使机体维持正常的动态平衡。它们的共同点是数量少,具有激素样作用,都可以使机体性激素分泌量减少,从而影响生物的性行为、生殖能力,同时增加癌变率,影响免疫系统及神经系统等^[5-11]。目前发现的大多数环境内分泌干扰物都具有雌激素活性,所以这些化合物统称为环境雌激素(EES)。

* 国家自然科学基金(No. 20507002)资助

EES 必须通过雌激素受体 α 和 β 亚型($ER\alpha$ 和 $ER\beta$)发挥作用,因此 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 的开发、筛选及分离是研究雌激素活性化合物的主要手段。 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 是生物体内 2 种主要的雌激素受体蛋白,在不同组织中比例有所差异,正是这种不同配比决定了配体的亲和力及转录活性^[12]。 $ER\alpha$ 虽然首次报道于 1996 年^[13],但与其与环境污染物的作用机制现在还不清楚。本研究通过构建 $ER\alpha$ 配体结合区(estrogen receptor α ligand binding domain, $hER\alpha$ -LBD)的原核表达载体,优化表达条件,大量表达异源 $hER\alpha$ -LBD 融合蛋白,为进一步研究 $ER\alpha$ 与环境化合物的相互作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

表达 $hER\alpha$ -LBD 质粒(携带 His-tag)由 Greene G. L. 教授(美国芝加哥大学)惠赠。大肠杆菌 JM109 和 BL-21(DE3) 购于北京鼎国生物技术公司。酵母提取物和胰化蛋白胨购于 OXOID 公司, pGEM-T Easy、Tag-plus DNA、T4 DNA 连接酶、牛血清白蛋白(BSA)、Xho 1、BamH 1、Buffer E、dNTP 等购于 Promega 公司, Protease Inhibitor Cocktail Set II 购于 Calbiochem 公司, His Bind Purification Kit 购于 Novagen 公司, pET-28a(+) 质粒购于上海西宝生物科技有限公司, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 购于北京欣经科生物技术有限公司, UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购于上海生物工程有限公司, 其它生化试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 $hER\alpha$ -LBD 基因的扩增 用引物设计软件, 通过已知雌激素受体 $hER\alpha$ -LBD 蛋白基因序列设计 $hER\alpha$ -LBD 的上、下游引物, 上游引物: 5'-GGATCCATGACCATGACCCTCCAC-3'; 下游引物: 5'-CTCGAGTGACCGTGGCAGGGAAAC-3'。引物由上海生物工程有限公司合成。以 $hER\alpha$ -LBD 质粒为模板, 扩增 $hER\alpha$ -LBD 基因片段, 通过 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.2 原核表达重组质粒的构建与鉴定 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收。构建原核表达载体需要带粘性末端的 $hER\alpha$ -LBD 基因片段, 而 PCR 扩增出的片段是平端基因片段, 因此需将 PCR 扩增的 $hER\alpha$ -LBD 基因片段分别连接到 T 载体上, 构建

pGM-T- $hER\alpha$ -LBD 连接物, 再进行酶切, 从而产生携带粘性末端的基因片段。将凝胶回收试剂盒回收所得的 $hER\alpha$ -LBD PCR 基因片段和 PGEM-T-easy 混合后 4 °C 过夜连接, 将连接物转化到感受态细胞中, 进行蓝白筛选, 转化后均有白色菌落, pGM-T- $hER\alpha$ -LBD 重组质粒转化成功后, 送上海生物工程有限公司测序。用 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶对 pGM-T- $hER\alpha$ -LBD 和 pET-28a(+) 质粒分别进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶构建重组表达载体。

1.2.3 质粒转化 在含 0.1 mol/L $CaCl_2$ 的感受态细胞溶液 100 μ L 中加入 100 μ L 构建的质粒溶液, 冰浴 30 min, 42 °C 水浴 90 s, 再次进行冰浴 3 min, 随后转入 500 μ L LB 液体培养基中, 37 °C, 100 r/min 振荡培养 45 min, 将上述菌液加 4 μ L IPTG 和 4 μ L X-Gal 涂固体 LB 平板, 放入培养箱, 37 °C 过夜培养, 进行蓝白筛选。

1.2.4 pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD 原核表达载体在大肠杆菌中的表达 将已经构建好的 pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD 的宿主菌按 5% 接种比接种到 5 mL LB 液体培养基培养 12~16 h(含 50 μ g/mL 卡那霉素)。紫外可见分光光度计 600 nm 读数, 当吸光度(A)值为 0.5~0.7 时, 吸出 1 mL 用于电泳时的对照样品, 加 IPTG(1 mmol/L)于剩下的培养物中, 诱导细胞表达蛋白 3 h。然后取 1 mL 诱导物离心(12 000 r/min, 1 min), 将菌体沉淀溶于 100 μ L 的 2 \times SDS-PAGE 样品溶解液, 沸水浴 3~5 min, 冰浴冷却, 使菌体壁破裂从而释放出目的蛋白。用 120 g/L SDS 聚丙烯酰胺电泳检测。

1.2.5 $hER\alpha$ -LBD 融合蛋白的纯化 细胞破壁后释放的蛋白中有目的蛋白还有杂蛋白, 因此, 用蛋白纯化试剂盒对所得到的蛋白进行纯化, 并用 Bradford 检测法测定其浓度。悬浮树脂, 转移浆液到柱内, 使其形成 2.5 cm 高的树脂柱(每 100 μ L 浆液能沉积形成 50 μ L 的树脂柱)。亲和层析柱的准备, 依次用下列缓冲液洗涤和平衡填料: 3 倍柱床体积的去离子水, 5 倍柱床体积的 Charge Buffer, 3 倍柱床体积的 Binding Buffer。

粗蛋白的制备: 将已诱导的菌液 10 000 \times g 离心 10 min, 将所得细胞悬浮于冰冷的 1 倍 Binding Buffer(每 100 mL 的菌液加 10 mL 1 倍 Binding Buffer), 并放入冰浴中进行超声波破碎, 直至样品中 DNA 被剪断。离心破碎液, 14 000 \times g, 20 min, 除去细胞碎片, 再用 0.45 μ m 的膜过滤上清液。

蛋白柱层析:将粗蛋白液过柱层析,先用 1×Binding Buffer 10 倍柱床体积洗涤层析柱,接着用 1×Wash Buffer 6 倍柱床体积洗涤层析柱,洗脱目的蛋白用 6 倍柱床体积的 1×Elute Buffer。

1.2.6 蛋白的浓缩和检测 纯化后的 hER α -LBD 融合蛋白浓度较小,为了后续实验及样品保存,用超滤离心管将 hER α -LBD 融合蛋白溶液进行浓缩,采用 Bradford 法测定浓缩后的 hER α -LBD 融合蛋白浓度,并以已知浓度的 BSA 标准溶液作为浓度对照,对经超滤浓缩的纯化蛋白浓度进行标定。

1.2.7 雌激素受体蛋白的活性鉴定 本研究利用雌激素与其受体的配体结合,复合物分子质量会发生变化的特点,将雌二醇-BSA 偶联抗原(E2-BSA)与融合蛋白混合,观察复合物分子质量的变化,检测 hER α -LBD 和 E2-BSA 的结合能力,从而判定其活性。将 hER α -LBD 配成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,与等浓度等体积的 E2-BSA 混合(hER α -LBD 终质量浓度为 500 μ g/mL, E2-BSA 终质量浓度为 500 μ g/mL),4 $^{\circ}$ C 放置 12~16 h,进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后进行银染并分析。

2 结果

2.1 hER α -LBD 基因的扩增

用设计的引物,以 hER α -LBD 真核表达质粒为模板,PCR 扩增后经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增的 hER α -LBD 基因片段约为 1.9 kb,与预期目的片段大小一致,未见非特异性扩增带(图 1)。

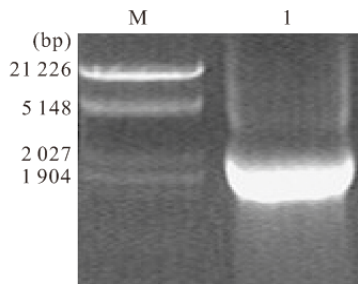


图 1 PCR 扩增 hER α -LBD 基因

Fig 1 Agrose electrophoresis for PCR product of hER α -LBD

M: Marker; 1: PCR product of hER α -LBD gene

2.2 pGM-T-hER α -LBD 的构建和转化

将凝胶回收试剂盒回收所得的 hER α -LBD PCR 基因片段和 PGEM-T-easy 混合后 4 $^{\circ}$ C 过夜连接,将连接物转化到感受态细胞中,进行蓝白筛选,转化后均有白色菌落,说明 hER α -LBD 的 PCR 扩增片段和 pGEM-T-easy 连接成功,从而得到 pGM-

T-hER α -LBD 连接物。分别挑取上述 pGM-T-hER α -LBD 转化的白色菌落,进一步验证(图 2),结果显示,在挑取白色菌落中,均有质粒,pGM-T-hER α -LBD 转化成功。

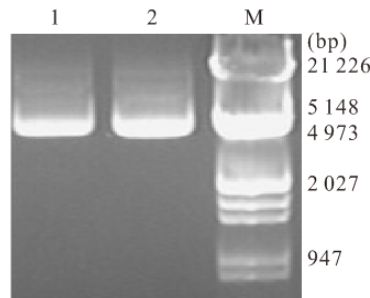


图 2 pGM-T-hER α -LBD 的转化

Fig 2 Transformation of pGM-T-hER α -LBD

M: Marker; 1, 2: pGM-T-hER α -LBD

2.3 重组表达质粒 pGM-T-hER α -LBD 的序列测定

选取上述 3 个经菌液 PCR 鉴定为阳性的重组表达质粒 pGM-T-hER α -LBD,送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。测序结果用 DNAMAN 软件进行拼接并去除载体,用 Vector NTI Advance10 软件对序列进行分析、比对,结果显示,所测序列和已知序列(NM_001033954)一致。

2.4 pGM-T-hER α -LBD 和 PET28(+)的双酶切

对 pGM-T-hER α -LBD 和 PET28 分别进行双酶切,得到带有黏性末端的 hER α -LBD 和线形 PET28 基因片段(图 3)。

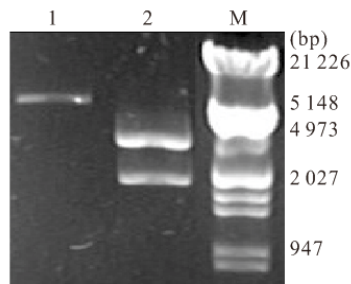


图 3 pGM-T-hER α -LBD 和 PET28 双酶切

Fig 3 Double enzyme digestion of pGM-T-hER α -LBD and PET28

M: Marker; 1: Double enzyme digestion of PET28; 2: Double enzyme digestion of pGM-T-hER α -LBD

图 3 中,泳道 1 中的条带为线形 PET28,由于酶切下来的相对分子质量较小的片段浓度较低,不显示条带,图中只有一条可见条带;泳道 2 中相对分子质量较小的条带为携带黏性末端的 hER α -LBD 基因片段(1.9 kb),较大的条带是 pGM-T-hER α -LBD 酶切的剩余部分。

2.5 hER α -LBD DNA 片段与 pET-28a(+)连接

经双酶切的 $hER\alpha$ -LBD DNA 片段和线性 pET-28a(+)均产生了黏性末端,由于 $hER\alpha$ -LBD DNA 片段的黏性末端和 pET-28a(+)黏性末端互补,因此 $hER\alpha$ -LBD DNA 片段可以和 pET-28a(+)黏性末端连接,形成环状质粒 pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD,转化后挑选菌落提取质粒进行电泳验证(图 4),可见 pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD 已经成功转化到 JM109 和 BL21(DE3) 感受态细胞中。

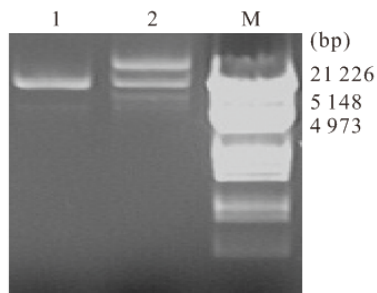


图 4 $hER\alpha$ -LBD DNA 片段和线性 pET-28a(+)连接转化

Fig 4 The transformation of pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD

M: Marker; 1: pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD from JM109; 2: pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD from BL21

2.6 构建载体的酶切验证

如图 5 所示,泳带 1 有两条带,相对分子质量较小的条带在 1.9 kb 处,符合 $hER\alpha$ -LBD DNA 片段的大小。说明 $hER\alpha$ -LBD DNA 片段已经连到了 pET-28a(+)上, $hER\alpha$ -LBD 原核表达载体构建成功。

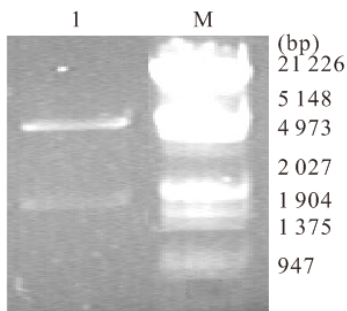


图 5 pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD 的酶切验证图

Fig 5 Enzyme digestion of pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD

M: Marker; 1: pET-28a(+)- $hER\alpha$ -LBD

2.7 $hER\alpha$ -LBD 融合蛋白的诱导、纯化、浓缩和测定

由图 6 可见,IPTG 诱导后,重组细菌中蛋白表达较高,其相对分子质量约 30×10^3 ,与 $hER\alpha$ -LBD 蛋白相对分子质量相近。未诱导的没有发现该蛋白条带,说明重组细胞中有融合蛋白,原核表达载体构建成功。

如图 7 所示,经纯化后的 $hER\alpha$ -LBD 样品蛋白

纯度较高,杂蛋白含量少,纯化后 $hER\alpha$ -LBD 蛋白表达可达 250 mg/L。浓缩后 $hER\alpha$ -LBD 融合蛋白浓度约为 1 800 mg/L。

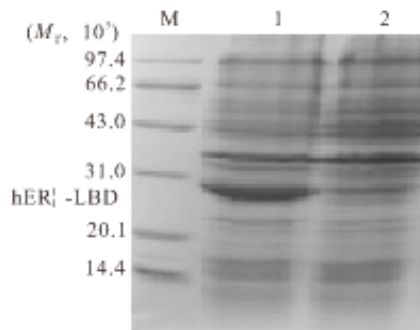


图 6 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE

Fig 6 SDS-PAGE of recombinant plasmid expression products

M: Marker; 1: The expression product of plasmid after induction; 2: The expression product of plasmid without induction

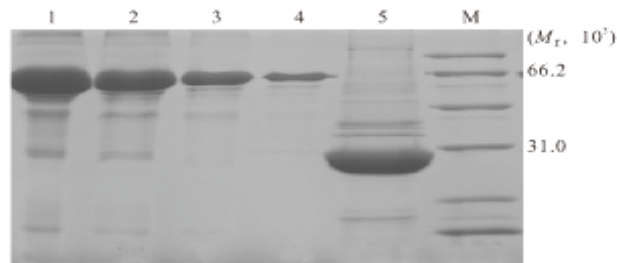


图 7 $hER\alpha$ -LBD 纯化及浓缩的 SDS-PAGE

Fig 7 SDS-PAGE of purification and concentration of $hER\alpha$ -LBD

1: 2 mg/mL BSA; 2: 1 mg/mL BSA; 3: 0.5 mg/mL BSA; 4: 0.25 mg/mL BSA; 5: Concentration of $hER\alpha$ -LBD; M: Marker

2.8 $hER\alpha$ -LBD 活性的鉴定

由图 8 可见,E2-BSA 蛋白条带明显减弱, $hER\alpha$ -LBD 蛋白条带有所减弱。可见,E2-BSA 与 $hER\alpha$ -LBD 蛋白发生了特异性结合,即 $hER\alpha$ -LBD 蛋白具有雌激素配体结合活性。

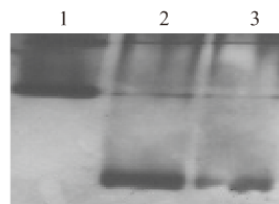


图 8 非变性电泳检测 $hER\alpha$ -LBD 蛋白的配体结合活性

Fig 8 Detection of binding activity of $hER\alpha$ -LBD protein by non denaturing gel electrophoresis

1: 20 μ L of E2-BSA (100 ng/ μ L); 2: 20 μ L of $hER\alpha$ -LBD (100 ng/ μ L); 3: 20 μ L mix of E2-BSA and $hER\alpha$ -LBD

3 讨论

为了保证 hER α -LBD DNA 基因片段和线性 pET-28a(+)连接和转化的成功,本实验中,通过适当的放大反应体系,增加回收 DNA 片段的量,从而提高 hER α -LBD DNA 基因片段和线性 pET-28a(+)DNA 浓度,成功构建了 hER α -LBD 原核表达载体。原核表达系统与其他表达系统相比^[14-15],其优点在于细胞培养容易,生长速度较快,操控性强,获得基因表达产物比较多。多数原核生物基因表达调控机制和代谢途径已经研究清楚,适合建立实验所需的表达载体。

酶的加样量、酶切温度和酶切时间等对双酶切是否成功影响较大,本实验中发现适当的延长酶切时间,酶切效果更好。本实验优化了融合蛋白的表达条件,即诱导温度 25 °C、诱导时间 8 h、诱导剂浓度 0.2 mmol/L。经亲和色谱纯化后,目的蛋白 hER α -LBD 最高表达量达到 250 mg/L。在细胞破碎时加入蛋白酶抑制剂,保证在细胞破壁、蛋白提取、浓缩纯化的过程中目标蛋白不被蛋白酶所降解,从而提高了目的蛋白的稳定性和产率。

现在多数的研究利用氘标记雌二醇,通过比较放射性活度来评价雌激素配体结合活性。此法准确度高,但检测费用也高,需要放射性操作,一般实验室开展有难度。本研究建立了一种基于非变性电泳的活性鉴定方法,并用此法证明了 hER α -LBD 具有雌激素结合活性。

参 考 文 献

[1] 李 杰, 司纪亮. 环境内分泌干扰物质简介. 环境与健康杂志, 2002, 19(1): 83-84.

[2] 杜克久, 徐晓白. 环境雌激素研究进展. 科学通报, 2000, 45(21): 2241-2251.

[3] ROUSSELLE C, ORMSBY JN, SCHAEFER B, *et al.* Meeting report: international workshop on endocrine disruptors: exposure and potential impact on consumers health. Regul Toxicol Pharmacol, 2013, 65(1): 7-11.

[4] 张 倩, 水小溪, 范玉玲, 等. 基于哺乳动物单杂交技术 ER α 调节剂高通量筛选模型的建立及应用. 生物工程学报, 2009, 25(7): 1088-1094.

[5] KRÓLIK M, MILNEROWICZ H. The effect of using estrogens in the light of scientific research. Adv Clin Exp Med, 2012, 21(4): 535-543.

[6] PATISAUL HB, TODD KL, MICKENS JA, *et al.* Impact of neonatal exposure to the ER α agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. Neurotoxicology, 2009, 30(3): 350-357.

[7] SKAKKEBAEK NE. A brief review of the link between environment and male reproductive health: lessons from studies of testicular germ cell cancer. Horm Res Paediatr, 2016, 86(4): 240-246.

[8] LOUTCHANWOOT P, SRIVILAI P, JARRY H. Lack of anti-androgenic effects of equol on reproductive neuroendocrine function in the adult male rat. Horm Behav, 2014, 65(1): 22-31.

[9] WANG J, LEUNG PC. Arachidonic acid as a stimulatory mediator of luteinizing hormone-releasing hormone action in the rat ovary. Endocrinology, 1989, 124(4): 1973-1979.

[10] DESSÌ-FULGHERI F, PORRINI S, FARABOLLINI F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. Environ Health Perspect, 2002, 110(Suppl 3): 403-407.

[11] SEREDYNSKI AL, BALTHAZART J, BALL GF, *et al.* Estrogen Receptor β Activation Rapidly Modulates Male Sexual Motivation through the Transactivation of Metabotropic Glutamate Receptor 1a. J Neurosci, 2015, 35(38): 13110-13123.

[12] KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology, 1997, 138(3): 863-864.

[13] MARUYAMA K, ENDOH H, SASAKI-IWAOKA H, *et al.* A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246(1): 142-147.

[14] 杨志建, 蔡 谨, 孙 健, 等. 粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶在大肠杆菌中组成型表达及分离纯化. 生物工程学报, 2004, 20(5): 736-740.

[15] 孙晓东. GST-MAGE-3 蛋白诱导特异性抗肿瘤免疫应答的实验研究. 杭州: 浙江大学, 2003[2016-03-14]. <http://www.docin.com/p-802478787.html>.

(2016-04-27 收稿, 2016-09-17 修回)

编辑 沈 进