

研究报告

重组人胰岛新生相关蛋白的高水平表达与纯化*

沙建平^{1**} 薛耀明¹ 陈炫² 朱永红³ 李时升⁴ 王晓勤³ 卓凤婷¹ 曾展军¹

(1 南方医科大学南方医院内分泌科 广州 510515 2 暨南大学第一附属医院临床实验中心 广州 510630)

(3 重庆市生物制药工程技术中心第三军医大学临床微生物学及免疫学教研室 重庆 400038)

(4 第三军医大学附属西南医院麻醉科 重庆 400038)

摘要 通过 RT-PCR 体外扩增目的基因胰岛新生相关蛋白(islet neogenesis associated protein, INGAP),并将其克隆入原核表达载体 pET22b(+),在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达。表达的目标蛋白主要以包涵体形式存在,洗涤杂蛋白后用尿素溶解,经 Heparin Agrose 亲和柱层析分离后,再用 Superdex75 凝胶过滤层析进一步纯化。纯化后的 INGAP 皮下注射免疫家兔,制备兔抗 INGAP 血清,采用免疫双扩、ELISA 评价 INGAP 的免疫活性。结果显示 INGAP 表达量高达菌体总蛋白的 40% 左右,经 HPLC 测定,分离纯化后的目标蛋白纯度达到 98.81%,且具有良好的免疫原性。

关键词 胰岛新生相关蛋白 表达 纯化 免疫原性

中图分类号 Q786

近年 Rosenberg 等学者在研究胰腺瘤动物模型时,发现一种能促进胰腺导管上皮细胞分化为胰岛细胞的蛋白质,并将其命名为胰岛新生相关蛋白(islet neogenesis associated protein, INGAP)。动物实验证明,INGAP 或由其衍生的多肽能促使胰岛细胞再生,逆转链脲佐菌素诱导的糖尿病^[1]。由于 INGAP 是内源性蛋白质,不存在免疫排斥反应,有望用于治疗胰腺 β 细胞减少所导致的糖尿病^[2]。本研究通过克隆人 INGAP 基因,体外诱导表达、纯化重组人 INGAP,并对其促胰岛新生及潜在的糖尿病治疗作用予以评价,旨在为开发抗糖尿病新型基因工程药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺组织来源于第三军医大学西南医院胰腺外科出血坏死性胰腺炎及胰腺瘤患者术后标本, *E. coli* DH5α, *E. coli* BL21(DE3) 由第三军医大学临床微生物教研室馈赠。质粒 pET22b(+), 购自 Novagen 公司。质

粒 pMD18-T 为 TaKaRa 公司产品。总 RNA 提取试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。尿素、三氯乙酸、磺基水杨酸、Tricine、TEMED、IPTG、咪唑、BSA、谷胱甘肽氧化型、谷胱甘肽还原型为 Sigma 公司产品, T4 DNA 连接酶、Ex-Taq 酶、限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品。日本大耳兔:普通级,雄性,体重 2Kg 左右,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 INGAP 基因的克隆 (1)引物设计 上游引物序列为 5'-CGCATATGATGCTTCCCATGACCCTCTGT 3', 其中 CATATG 为 *Nde* I 酶切位点 下游引物序列为 5'-CGCTCGAGTCCCTATATCTGCAAATTCAGGTC -3', 其中 CTGAG 为 *Xho* I 酶切位点。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

(2)总 RNA 的提取和 RT-PCR Trizol 一步法提取胰腺组织总 RNA (参照试剂盒说明书),以随机引物 Oligo(dT)进行逆转录,以上述合成的上下游引物 PCR 扩增目的基因。反应程序为: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 1.5min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 20min。凝胶成像系统扫描后进行图像分析。

收稿日期:2007-06-14 修回日期:2007-08-29

* 国家“十五”“863”计划资助项目(2001AA215161)

** 电子信箱:shajianping99@sina.com

(3) 目的基因亚克隆入 T 载体 凝胶回收纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 连接过夜(16℃), 连接产物采用常规 CaCl_2 法转化感受态 *E. coli* DH5 α 。在含 IPTG 和 X-gal 的 Amp⁺ LB 平板上 37℃ 培养 12h, 挑取白色菌落小量扩增, 常规碱裂解法提取质粒, *Nde* I、*Xho* I 双酶切鉴定阳性重组子(命名为 pMD18-T-INGAP)。

(4) 目的基因克隆入表达载体 pMD18-T-INGAP 经 *Nde* I、*Xho* I 双酶切, 回收纯化的目的基因片段与经同样双酶切的表达载体 pET-22b(+) 连接, 常规 CaCl_2 法转化感受态 *E. coli* DH5 α , 转化产物涂布于 Amp⁺ LB 平板。将经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定的阳性重组子进一步测序鉴定。

1.2.2 重组 INGAP 蛋白的鉴定 将经测序鉴定正确的重组菌于 Amp⁺ LB 液体中扩大培养, 37℃, 150r/min 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG 诱导表达 8h, 集菌后用 SDS-PAGE 上样缓冲液裂解, 15% SDS-PAGE 鉴定。

1.2.3 重组 INGAP 的大量表达纯化

(1) 重组工程菌 pET22b-INGAP / BL21(DE3) 的发酵 采用德国 B. Braun 10L 发酵罐, 发酵过程为: 种子菌按 10% 比例接种, 70% 溶氧、温度 37℃、pH 7.0, 在菌液 ODA₆₀₀ 达到 2 时方加补料, 此后每 0.5h 补料一次, 以使葡萄糖、胰化蛋白胨和酵母抽提物的终浓度分别为 0.5%、0.2% 和 0.2%。在第 4 次补料后待葡萄糖浓度降为 0.1% 时, 加入终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 IPTG 诱导表达 6h 后, 8000g 离心(4℃) 15min 收菌, 称重后冻存备用。

(2) 包涵体的提取 将所收集的菌体按 1:9(W/V) 比例用包涵体洗涤液 I (50mmol/L PB, pH7.0、7.5、8.0) 重悬, 再以 1:10(W/V) 的比例分别用包涵体洗涤液 II (50mmol/L PB, 1.0% Triton X-100, pH7.0、7.5、8.0) 和包涵体洗涤液 III (50mmol/L PB, 2mol/L 尿素, pH7.0、7.5、8.0) 各洗涤 2 次。洗涤条件为: 4℃ 搅拌 20min, 15000r/min 离心 40min, 收集包涵体沉淀。最后将洗涤后的包涵体按 1:10(W/V) 的比例用包涵体溶解液 (50mmol/L PB; 8mol/L 尿素;) 溶解, 4℃ 搅拌过夜, 15000r/min 离心 45min, 取上清备用。

(3) 重组 INGAP 的纯化 重组 INGAP 的 Heparin Agarose 柱亲和层析纯化

将所制备的包涵体溶解液用 Centriplus (Amicon) 过滤浓缩备用。将 Heparin Agarose 亲和柱层析填料装

填于 XK16/10 柱中, 柱床体积为 10cm³。用 5 倍体积的双蒸水流洗后, 用平衡液(同上样缓冲液 20mmol/L PBS)平衡层析柱。将浓缩的包涵体溶解液缓慢上柱, 上样蛋白总量约为 30mg, 用亲和层析缓冲液 A (50mmol/L PB, 8mol/L 尿素) 平衡柱子至基线平稳后, 再以亲和层析缓冲液 B (50mmol/L PB, 8mol/L 尿素, 0.5mol/L 咪唑) 梯度洗脱。根据洗脱峰收集样品, 对以下纯化条件进行调整: 采用不同的缓冲液 pH (pH7.0, pH8.0, pH9.0); 尝试在 A、B 缓冲液中加入高浓度的 NaCl, 最后用 1mol/L NaCl 洗脱直至将所有蛋白质全部洗下为止。将含较多 INGAP 蛋白的组分汇集, 经 Centriplus 10unit (Amicon) 脱盐浓缩 3 次(流速 5.0ml/min)。通过 SDS-PAGE 分析目的蛋白的纯化效果, 摸索最佳的柱亲和层析条件。

重组 INGAP 的凝胶过滤柱纯化 用 1 倍体积的双蒸水平衡 Superdex-75 26/60 凝胶预装柱, 再用 1 倍体积的凝胶过滤层析缓冲液 (50mmol/L PB, 8mol/L 尿素) 平衡。上样蛋白总量约为 30mg, 用凝胶过滤层析缓冲液平衡柱子, 至紫外吸收值为零时停止, 收集洗脱峰馏分。并尝试添加 DTT 来改善纯化效果。

(4) 重组 INGAP 的纯度分析 重组 INGAP 纯度的 SDS-PAGE 分析

收集蛋白样品用加 DTT 上样缓冲液处理, 进行还原 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝 R-250 染色, 凝胶成像系统扫描分析纯化蛋白的纯度和分子量。

重组 INGAP 纯度的 HPLC 分析 先用流动相 A (900ml 超纯水、100ml 乙腈和 1.0ml 三氟乙酸) 平衡柱子, 流动 B 相 (100ml 超纯水、乙腈 900ml 和 0.9ml 三氟乙酸) 的洗脱梯度为 0%~80%, 20min; 柱温 30℃; 流速 1.0ml/min; 上样量 100 μl ; 检测波长分别为 280nm。

1.2.4 重组 INGAP 的免疫效果检测 每只白兔每次抗原免疫用量 1.0mg。取 2.5mg INGAP 蛋白加完全弗氏佐剂 2.5ml, 研磨成乳剂, 皮下注射白兔; 第 3 周和第 4 周分别加强免疫一次, 取 2.5mg INGAP 蛋白加不完全弗氏佐剂 2.5ml, 皮下注射白兔; 第 5 周注射 INGAP 蛋白溶液。第 6 周起, 于兔耳缘静脉取血, 用琼脂糖双扩法检测特异性抗体的效价; 心脏放血, 室温下待血清完全分离, 离心后分装, -70℃ 冻存备用。

(1) 双向免疫扩散 在水平仪或水平桌面上, 将熔化的琼脂倒于载玻片上, 每张载玻片约 2.5~3.0ml。用打孔器打孔, 孔径 3mm, 孔距 4mm, 呈梅花形。将待测抗体作 1:2~1:64 稀释, 顺时针分别加入周围孔中,

INGAP 原液作一定稀释后加入中间孔中,每孔约 10 μ l。放入湿盒中,37 $^{\circ}$ C 作用 24h,观察结果。

(2)ELISA 按常规方法进行,以 OD_{样品} 与 OD_{阴性} 之比 \geq 2.1 者为阳性。

2 结 果

2.1 INGAP 基因的扩增及重组质粒的酶切鉴定

RT-PCR 扩增出一条 500bp 大小的片段,与理论大小基本相符(图 1)。

重组质粒 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切得到一条 500bp 大小的片段,与理论大小基本相符(图 2)。初步表明重组质粒 pET22b⁽⁺⁾-INGAP 构建正确,测序结果显示重组质粒 pET22b⁽⁺⁾-INGAP 成功构建。

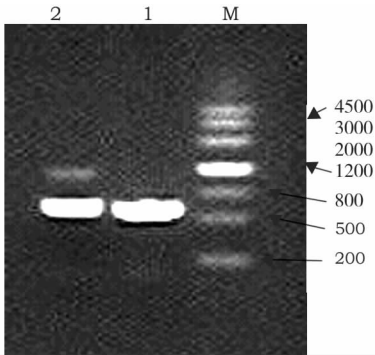


图 1 PCR 产物图

Fig.1 Map of PCR products of INGAP

Line M :4500bp Markers,1,2: PCR prodcits of INGAP

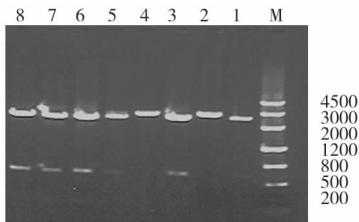


图 2 重组表达质粒 pET22b⁽⁺⁾-INGAP 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme digestion identification of recombinant plasmid pET22b⁽⁺⁾-INGAP

M:4500bp DNA marker;1,3,5,6,7,8:plasmid pET22b⁽⁺⁾-INGAP;2,4 vacant carrying

2.2 重组工程菌 pET22b⁽⁺⁾-INGAP/ BL21 (DE3) 的表达及纯化

重组质粒 pET22b⁽⁺⁾-INGAP 转化感受态 BL21 (DE),收集 IPTG 诱导前后及不同诱导条件下的重组工程菌,用超声波裂解细菌,离心收集上清与沉淀,

SDS-PAGE 结果表明(图 3)。

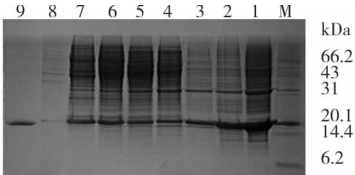


图 3 INGAP 表达的 SDS-PAGE 分析
Fig.3 SDS-PAGE analysis of protein expressed in *E. coli*

M: Protein marker1: Pellet of ultrasonically broken pET22b⁽⁺⁾-INGAP/ BL21,inclusion body pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21 induced at 0 h at 37 $^{\circ}$ C ;2: pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21 induced at 10h at 37 $^{\circ}$ C ; 3: pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21 induced at 8h at 37 $^{\circ}$ C ;4: pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21 induced at 6 h at 37 $^{\circ}$ C ; 5: pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21induced at 4h at 37 $^{\circ}$ C ;,6: pET22b⁽⁺⁾-/BL21 induced at 2 h at 37 $^{\circ}$ C ;7: pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21 induced at 1 h at 37 $^{\circ}$ C 8: Supernatant of ultrasonically broken pET22b⁽⁺⁾-INGAP/BL21;9:

The analysis results of INGAP purity by SDS-PAGE

2.3 重组 INGAP 的纯化结果

2.3.1 重组 INGAP 的亲层析纯化 (1) 纯化实验结果 在 pH7.0,pH8.0,pH9.0 3 种层析缓冲液中,pH9.0 条件下纯化效果较好,而且蛋白最稳定。我们最后确定的纯化条件为:层析缓冲液 A 为 50mmol/L PB,8mol/L 尿素,0.5mol/L NaCl,pH9.0;层析缓冲液 B 为 50mmol/L PB,8mol/L 尿素,0.5mol/L NaCl,0.5mol/L 咪唑,pH9.0;洗脱梯度为缓冲液 B 在 90min 内从 0%~50%,洗脱速度为 5ml/min;上样量 30mg;上样速度为 0.5ml/min。目的蛋白初步纯化效果显著,纯度达到 80% 以上,回收率大于 80%(图 4)。

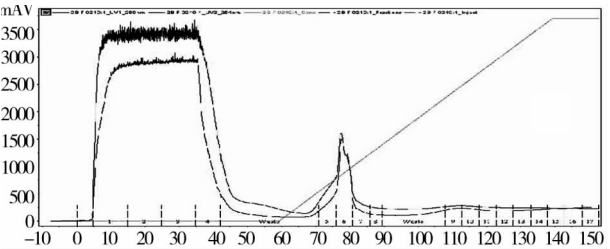


图 4 Heparin Agarose 亲和层析柱层析纯化

Fig.4 Chelating affinity chromatography profile of INGAP

2.3.2 凝胶过滤柱层析纯化 将经 Heparin Agarose 亲和层析纯化的重组 INGAP 蛋白通过凝胶过滤纯化柱以进一步纯化,此二步纯化方法成功地获得了较高产量及较高纯度的 INGAP 蛋白,(图略)。

2.4 重组 INGAP 的纯度检测

在 RP-HPLC 上纯化后的目的蛋白样品出现一个色谱吸收峰(旁边的小峰可能为 INGAP 的二聚体),保留时间为 16.74min,利用面积归一法^[3]分析 INGAP 的纯度为 98.97% (图 5)。

2.5 重组 INGAP 的免疫活性检测结果

2.5.1 双向免疫扩散结果 双向免疫扩散结果显示,在抗体稀释度为 1:32 时,出现明显沉淀线,兔抗 INGAP 多克隆抗体效价为 1:32。

2.5.2 ELISA 结果 ELISA 显示,抗 INGAP 多抗血清在稀释度为 1:600000 时,OD₄₉₂ 值为 0.468,与兔阴性血清的比值为 3.5,大于 2.1,因而判定兔抗 INGAP 血清的滴度为 600000 EU(表 1)。

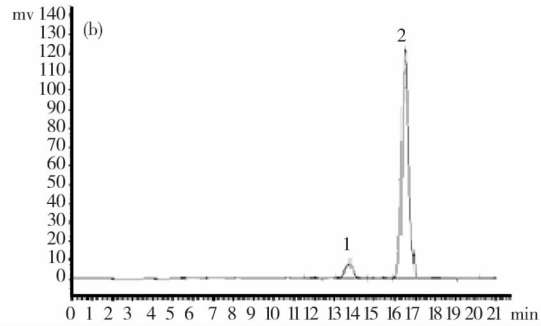


图 5 RP-HPLC 检测 INGAP 的纯度结果
Fig. 5 The analysis results of INGAP purity by RP-HPLC

表 1 ELISA 检测兔抗 INGAP 血清滴度 (OD₄₉₂)^{a)}

Table 1 Analysis of rabbit anti- INGAP serum titer with ELISA (OD₄₉₂)

(×10 ⁵)	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8	1:9	Negative control	Blank
No. 1	3.739	3.412	3.560	3.526	3.494	3.311	3.275	3.208	2.991	0.147	0.074
No. 2	3.539	3.266	3.326	3.280	3.225	3.071	2.947	2.873	2.165	0.137	0.049

a) 表中 Judgement criterion: OD_{sample}/OD_{negative control} ≥ 2.1

3 讨论

世界卫生组织的有关资料表明,糖尿病的患病率、致残率和病死率以及对总体健康的危害程度,已居慢性非传染性疾病的第 3 位。世界卫生组织预测,至 2025 年全球范围内糖尿病患者人数将是目前的 2 倍,达 3 亿人。糖尿病患者人数急剧增加,意味着为制药工业带来了赢利的机会。据决策源 (Decision Resources) 公司预测,至 2012 年 II 型糖尿病药物市场将达 2050 亿美元,年增长率为 8%。随着经济的增长,人们生活水平的提高与生活方式的改变,我国糖尿病的患病率不断增加,患者人数已超过 5000 万,每年耗费用 1700 多亿元。胰岛 β 细胞过度凋亡,胰岛细胞增生与胰腺导管上皮细胞分化障碍,导致胰岛素绝对缺乏,在 1 型糖尿病发病中起关键作用。2 型糖尿病患者可能在胚胎时期就存在某些调控基因的缺陷,导致成年后机体胰岛细胞增生分化障碍。研究胰岛新生及其调控因素不仅可以探讨糖尿病发病机制,而且可能为糖尿病治疗提供新途径^[4]。

随着分子生物学技术的快速发展,利用细菌表达系统获得大量科研或商业用途的蛋白质已成为最简便、最廉价的生产方法。其中大肠杆菌系统是应用最早、研究最为广泛的表达系统,具有很多优点:安全性

好、遗传学和生理学特性明确、生长周期短、操作简单、易于获得高表达,小体积摇瓶培养诱导表达的方法可以很好地应用于大体积培养或商业生产中去。对于蛋白质工程来说,不仅要获得高产量的重组蛋白,更需要的是功能性蛋白分子一带有正确的二硫键和完整的四级结构。因此,大肠杆菌表达系统是分子生物学基础研究中重要的表达系统之一,同时也是生物制药工业的首选宿主菌^[5]。

为获得大量的细胞粗提液以备纯化 INGAP 蛋白,我们采用德国 B. Braun 10L 发酵罐,进行了细菌的大体积培养,发酵过程在级联溶氧控制的分批培养基础上,流加补料。发酵过程所用培养基为改良 M9-CAA 培养基,发酵过程中随着细胞培养体积的增大,抑制因素如氨离子,二氧化碳等的积聚可能限制细胞密度的增长,并对细胞产生毒性作用或者改变细胞代谢水平。因此,在培养过程中保持 70% 溶氧、温度 37℃、pH7.0,在 A₆₀₀ 未达到 2 时不加补料,定时取样测定培养液浓度并注意防止污染。对培养细胞蛋白质的粗提取证明了本实验确定的发酵工艺既快速且效果较好。

在蛋白质纯化过程中,我们尝试了其它一些 DNA 结合蛋白的纯化方法,如硫酸盐沉淀与透析,离子交换层析 DEAE - cellulose, phosphocellulose 等,然而纯化效果不佳,显然,INGAP 对这些传统的纯化方法无明显特

异性,本实验证实,肝素亲和层析法对 INGAP 选择性强,其洗脱峰明显,纯化倍数高. 初步纯化后的 INGAP 蛋白再经 Superdex75 凝胶过滤层析纯化后,其纯度达 98% 以上,此纯化方法成功地得到了较高产量,高纯度的 INGAP 蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳实验结果证明 INGAP 蛋白分子量在 19. 6kDa 左右。这为 INGAP 蛋白的进一步研究以及开发治疗糖尿病的新型基因工程药物奠定了良好的基础。在本研究中,我们获得了大量高纯度的 INGAP 蛋白,我们将纯化的 INGAP 蛋白免疫家兔制备兔抗 INGAP 血清,经免疫双扩、ELISA 证明兔抗 INGAP 多抗具有较好的免疫反应性。但大肠杆菌胞内高效表达基本上为包涵体表达方式,包涵体表达方式为随后的蛋白纯化提供了方便,但表达蛋白的复性条件需要大量探索工作。我们目前正进行蛋白纯化与复性工作,并已有初步结果。

参考文献

[1] Joseph T, Rosenberg L, Maysinger D, et al. Islet neogenesis

associated protein enhances neurite outgrowth from DRG neurons. Biochem Biophys Res Commun,2002,291 (3) :649 ~654

[2] Del Zotto H, Borelli M I, Flores L, et al. Islet neogenesis: an apparent key component of long-term pancreas adaptation to increased insulin demand. J Endocrinol,2004,183(2) :321 ~330

[3] 李发美. 医药高效液相色谱技术. 北京: 人民卫生出版社, 1999

Li F M. The Technology of Medicine High Performance Liquid Chromatography. Beijing: People ’ s Medical Publishing House, 1999

[4] Jamal A M, Lipsett M, Sladek R, et al . Morphogenetic plasticity of adult human pancreatic islets of Langerhans. Cell Death Differ,2005 ,12(7) :702 ~712

[5] 董德祥. 疫苗技术基础与应用. 北京: 化学工业出版社/现代生物技术与医药科技出版中心,2002. 250 ~253

Dong D X. The Base and Applience of Vaccine Technology. Beijing: Chemical Industry Press/Modern Biology Technic and Publish Center of Medicine Science,2002. 250 ~253

High Level Expression and Purification of Human Islet Neogenesis Associated Protein

SHA Jian-ping¹ XUE Yao-ming¹ CHen Xuan² ZHU Yong-hong³ LI Shi-sheng⁴
WANG Xiao-qin³ ZHUO Feng-ting¹ ZENG Zhan-jun¹

(1 Department of Endocrinology, The Affiliated Southern Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)
(2 Department of Clinic Experiment Center, The First Affiliated Hospital of JiNan University, Guangzhou 510630, China)
(3 ChongQing Biology Pharmacy Engineering Research Center, Department of Clinical Microbiology and Immunology, The Third Military Medical University, Chongqin 400038, China)
(4 Department of Anesthesiology , The Affiliated Southwest Hospital of Third Military Medical University , Chongqing 400038, China)

Abstract The gene of human Islet neogenesis associated protein (INGAP) was amplified with RT-PCR and cloned into prokaryotic expression vector pET22b (+). INGAP was expressed in the *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography and gel filtration chromatography. The inclusion bodies of the expressed protein were extracted and dissolved in 8mol/L. The heparin Agrose affinity chromatography was used to separated the desired protein, and the further purified protein was obtained by the Superdex75 the gel filtration chromatography. The purified INGAP protein immune the rabbits by injection, and the polyclonal antibody against INGAP protein was prepared. The immunological activity of expressed and purified LexA protein was detected by ELISA , and Western blot. The result showed that the INGAP was accounted for about 40 % of the total bacteria protein. The final purity of the INGAP was 98. 81% , which was determined by the HPLC. The expressed and purified LexA protein had satisfactory immunological activity, which was confirmed by immunodiffusion and ELISA.

Key words Islet neogenesis associated protein Expression Purification Immunogenicity