

Intein 介导的重组人 AR DBD 的原核可溶性表达、纯化及活性鉴定^{*}

姚广新¹ 张怡轩¹ 胡双纲^{2,3**}

(1 沈阳药科大学 沈阳 110016 2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

(3 分子生物学国家重点实验室 上海 200031)

摘要 雄激素受体通过 DNA 结合域与效应元件结合发挥作用,在以往的研究中多采用与 GST 或 Protein A 融合的方式对雄激素受体的 DNA 结合域(AR DBD)进行重组表达,但获得无融合标签的纯 AR DBD 的操作非常繁琐。现借助内含肽介导的自剪切作用经一步亲和层析得到纯度较高的无融合标签的 AR DBD,以利于对其性质和功能的研究。通过 PCR 方法扩增了编码人雄激素受体 520~644 位氨基酸的核苷酸序列,将该序列克隆入 pTWIN1 融合表达载体,转化大肠杆菌 BL21(DE3)后对诱导温度及 IPTG 浓度进行优化,重组蛋白几乎全部可溶表达。将可溶性部分吸附到几丁质亲和层析柱上,通过 pH 诱导的内含肽自剪切作用释放出不含融合标签的重组人 AR DBD 蛋白,凝胶阻滞分析证明该蛋白只特异性结合保守的雄激素响应元件(ARE),具备正常的生物学活性。

关键词 雄激素受体 DNA 结合域 内含肽

中图分类号 Q786

雄激素受体(androgen receptor, AR)是一种转录因子,属于核受体超家族成员。当被其配体——雄激素激活后,便进入靶细胞的核内,以高专一性、高亲和力与雄激素响应元件(androgen response element, ARE)结合从而调控靶基因转录^[1-3]。与该家族其他成员相似,AR 包含 N 端转录激活域(transcriptional activation domain, TAD),DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)和 C 端配体结合域(ligand binding domain, LDB)3 个主要功能域^[4]。其中的 DBD 在 AR 对 ARE 的特异性识别与高亲和力结合过程中发挥着主要作用,因此对 AR 正常功能的发挥是必不可少的。

为了更透彻的阐明 AR 对 ARE 特异性识别与结合的分子机制,研究者们对 AR DBD 展开了广泛的研究,如 AR DBD 的三维结构,AR DBD 与 AR 其它结构域的相互作用,AR DBD 内对其功能发挥关键作用的氨基酸,与 AR DBD 结合的 ARE 序列及其特性,抗 AR DBD

多克隆及单克隆抗体制备等。而这些领域的研究用到的 AR DBD 蛋白,多是采用基因工程菌表达的重组蛋白。目前已有多篇应用重组 AR DBD 进行相应研究的报道^[5-9],但普遍存在的一个问题是这些重组蛋白均为融合表达的蛋白,在有些研究中融合标签对 AR DBD 所造成的影响不可忽视,而去除融合标签一般都要经过蛋白酶切和再纯化的过程,导致蛋白质活性和产率下降,而且用于酶切的蛋白酶价格也非常昂贵。针对这些问题,我们采用 pTWIN1 载体对 AR DBD 进行重组表达,将载体自身的几丁质结合结构域(chitin binding domain, CBD)以及集胞藻(*Synechocystis* sp) *dnaB* 基因内含肽(intein)与 AR DBD 融合,可实现重组蛋白的一步纯化,不但操作简单方便,也在很大程度上保证了重组蛋白的活性和产量。

1 材料与方法

1.1 材料

含有人 AR 全长 cDNA 序列的载体 pcDNA3.0-AR

收稿日期:2011-01-07 修回日期:2011-01-27

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30770815)

^{**} 通讯作者,电子信箱:shuangganhgu@ hotmail. com

由本实验室构建;表达载体 pTWIN1, Chitin beads, T4 寡核苷酸激酶购自 New England Biolabs 公司;大肠杆菌 BL21 (DE3) 由本实验室保藏; *Nco*I, *Xho*I DNA 限制性内切酶, La Taq DNA 聚合酶, DNA 分子量 Marker II 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;质粒抽提试剂盒, 大肠杆菌 Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司;胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 购自 Fermentas 公司; IPTG 购自 Sigma 公司; [γ -³²P]-ATP 购自 PerkinElmer 公司;其他试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 首先用 La Taq DNA 聚合酶从 pcDNA3.0-AR 中扩增出编码区 AR520~644 位氨基酸的 DNA 片段,该片段中即包含 AR DBD。PCR 扩增所用上游引物为 5'-GCCCATGGGCAAAAGCGAAATGG GCCC-3',下游引物为 5'-GCCTCGAGTCACTCTCCTTC TCCTGTAGTTTCAG -3'。PCR 扩增条件为:95℃变性 3 min, 95℃变性 10s, 60℃退火 15s,72℃延伸 20s,共 35 个循环,72℃保温 10min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测大小正确后割胶回收。用 *Nco*I 和 *Xho*I 两种酶切割回收后 PCR 产物及 pTWIN1 质粒。T4 DNA 连接酶连接双酶切并回收后的质粒和 DNA 片段,连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑取转化后菌落进行 PCR 和质粒双酶切验证,然后送上海美季生物技术有限公司测序。

1.2.2 AR DBD 诱导表达条件的优化 将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取阳性克隆接种至含 100μg/ml 氨苄青霉素的 4ml LB 液体培养基 37℃震荡培养过夜。然后以含 100μg/ml 氨苄青霉素的新鲜 LB 液体培养基按 1:100 比例稀释菌液,继续 37℃震荡培养至 A₆₀₀ 达到 1 左右时,将菌液管分为三个温度组,每组各加入终浓度为 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1mmol/L 的 IPTG,分别放入 20℃震荡培养 7h,30℃震荡培养 5h,37℃震荡培养 3h。5000r/min 离心 5min 收集菌体,以 1ml 含 1mmol/L PMSF 的 PBS 混悬菌体,160W 超声 20 次,超声 10s,间隔 10s。超声完毕后除 IPTG 终浓度为 0 的菌液外,其余超声菌液 13200r/min 4℃离心 10min,上清转入另一微量离心管中,沉淀以 1ml 上样缓冲液重悬,取相同体积各样品 12% SDS-PAGE 检测表达情况。

1.2.3 AR DBD 的纯化及最适切割 pH 值的选择 取

100ml 在 0.5mmol/L IPTG 终浓度下 30℃过夜诱导表达的工程菌菌液离心收集菌体,以 40ml 缓冲液 B1 [20mmol/L PBS (pH8.5), 0.5mol/L NaCl, 0.1mmol/L EDTA] 重悬并超声,离心后收集上清。取 500μl Chitin beads 上柱,以 5ml 缓冲液 B1 平衡,然后加入 4ml 超声上清液,4℃孵育 30min,15ml 含 0.2% Tween20 缓冲液 B1 洗柱。加入 1.2ml 缓冲液 B1 重悬 Chitin beads 并等分为 12 等份,瞬时离心弃上清,分别以 1ml 不同 pH 缓冲液 B1 重悬 Chitin beads,室温过夜裂解。短暂离心,分离上清和 Chitin beads,其中 Chitin beads 加入 50μl 4% SDS 沸水浴 5min,取 5μl 进行 SDS-PAGE,上清取 15μl 进行 SDS-PAGE。当确定最适切割 pH 后,将剩余超声上清液全部加入以 100ml 缓冲液 B1 平衡后的 10ml Chitin beads 柱,4℃孵育 30min,流掉液体,以 200ml 含 0.2% Tween20 缓冲液 B1 洗柱,加入 20ml 相应 pH 的缓冲液 B1 重悬 Chitin beads,静止片刻后流掉,重新加入 10ml 该缓冲液重悬 Chitin beads,室温过夜切割。收集流出液后另加入 20ml 相同缓冲液洗柱,合并得到的 AR DBD 蛋白溶液,SDS-PAGE 检测纯度。

1.2.4 凝胶阻滞分析^[10] 分别取 50ng 双链寡核苷酸探针,变性后在 20μl 反应体系中利用 T4 寡核苷酸激酶和 [γ -³²P]-ATP 进行末端标记,标记产物乙醇沉淀后以 100μl 双蒸水溶解,取 1μl 稀释到 15μl 测定探针比活,标记成功的探针退火后 4℃备用。取 0.5μg 纯化后的重组 AR DBD 与 [γ -³²P] 标记的双链探针 (2 × 10⁵ cpm) 在蛋白反应缓冲液 (20mmol/L HEPES, pH 7.3, 0.2mmol/L EDTA, 1mmol/L dithiothreitol, 1mmol/L MgCl₂, 50mmol/L NaCl, 0.5g/L NP-40, 10% glycerol) 中于 25℃温育 25min。DNA/蛋白质复合物经 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,胶抽干后进行放射自显影,-80℃压片 1h 后 X 光片曝光观察。其中选择已被证明具有 ARE 活性的 C3(1) 作为保守 ARE 寡核苷酸探针,其序列为: 5'-ATAGTACGTGATGTTCTCAA-3'; 转录因子 AP1 结合序列作为无关探针,其序列为: 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pTWIN1-CBD-Intein-ARDBD 的构建

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,结果显示获得了大小约为 396bp 的目的片段(图 1),重组后表达质粒 pTWIN1-CBD-Intein-ARDBD 经 PCR 和质粒双酶切实实

目的片段已插入到载体中,测序后结果也证实目的片段插入方向正确并且无突变发生。

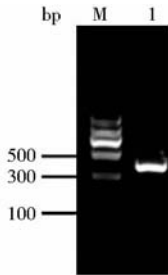


图1 AR DBD 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of AR DBD

M: Marker II ; 1: AR DBD(396bp)

2.2 融合蛋白 CBD-Intein-ARDBD 的表达

诱导后的重组大肠杆菌 BL21(DE3) 蛋白经 SDS-PAGE 分析表明,在 37℃ 以不同 IPTG 终浓度诱导表达时,在 36 ~ 55kDa 之间有一明显的特异条带,其位置与预测的融合蛋白 CBD-Intein-ARDBD 理论分子量 39.9kDa 基本一致,但各 IPTG 终浓度下重组蛋白均为部分可溶表达(图 2c)。而在 20℃ 和 30℃ 诱导时,重组蛋白几乎全部可溶表达,且这种表达受 IPTG 终浓度的影响并不显著(图 2a、图 2b)。考虑到菌体生长速度及蛋白产量等因素,诱导条件定为 IPTG 终浓度 0.5mmol/L,30℃ 过夜诱导。

2.3 最适切割 pH 值的确定

将不同 pH 值条件下诱导自剪切的样品进行 SDS-PAGE 分析后发现,在较宽的 pH 值范围内融合蛋白均发生了自剪切,但不同 pH 值诱导的自剪切效率不同,当 pH 值为 5 ~ 5.5 时切割效率最高(图 3a、图 3b),后续实验中将切割 pH 值定为 5.5。当大量纯化 AR DBD 时,对上样前样品及流出液进行 SDS-PAGE 检测证明,重组蛋白均已结合到 Chitin beads 上。对纯化后的 AR DBD 蛋白进行 SDS-PAGE 检测发现,虽然有一条较弱的杂带,但重组的 AR DBD 蛋白纯度仍较高(图 4),灰度分析结果显示蛋白纯度在 95% 以上。

2.4 凝胶阻滞分析验证重组 AR DBD 活性

当重组 AR DBD 与保守 ARE 和无关探针孵育后, PAGE 分析结果表明,仅加入 AR DBD 重组蛋白的泳道内无信号;与保守 ARE 孵育的泳道内电泳迁移率明显降低;而加入 50 倍非标记冷探针与其竞争后电泳迁移率恢复;与无关探针孵育的泳道内电泳迁移率无变化(图 5)。以上结果说明重组 AR DBD 具有与保守 ARE

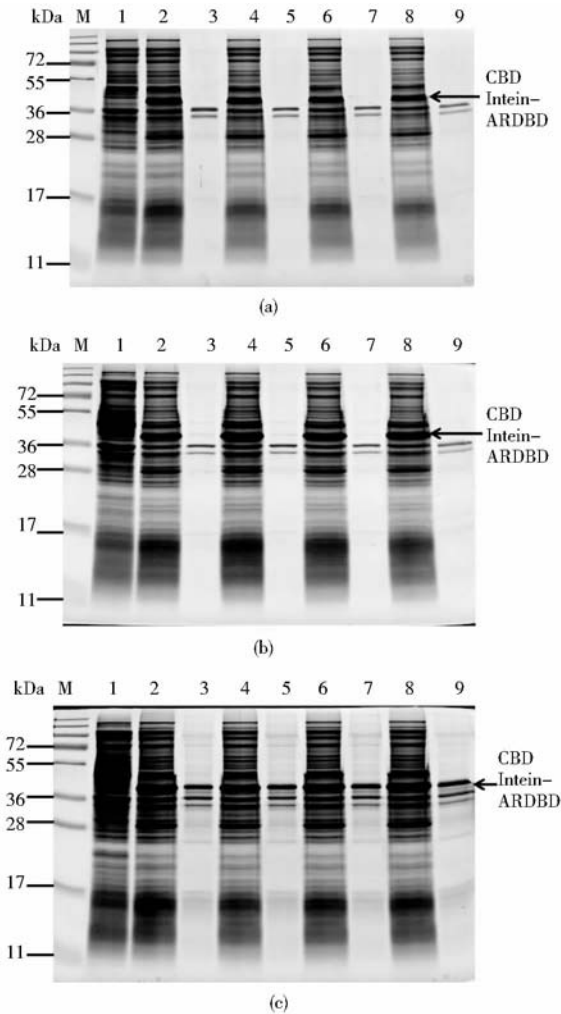


图2 融合蛋白 CBD-Intein-AR DBD 诱导条件的优化

Fig.2 Optimization of expression condition of fusion protein CBD-Intein-AR DBD

- (a) SDS-PAGE analysis of CBD-Intein-ARDBD induced by different IPTG concentration at 20℃
 - (b) SDS-PAGE analysis of CBD-Intein-ARDBD induced by different IPTG concentration at 30℃
 - (c) SDS-PAGE analysis of CBD-Intein-ARDBD induced by different IPTG concentration at 37℃
- M: Marker; 1: Whole cell lysate by 0mmol/L IPTG; 2,4,6,8: Supernatant induced by different IPTG concentration (0.25, 0.5, 0.75, 1mmol/L); 3,5,7,9: Pellet induced by different IPTG concentration(0.25, 0.5, 0.75, 1mmol/L)

特异结合的生物学活性。

3 讨 论

随着分子生物学技术的发展,很多蛋白质都可进

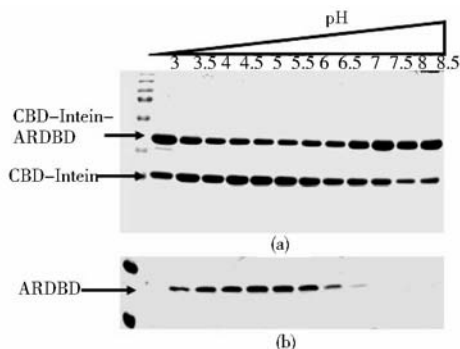


图3 CBD-Intein-AR DBD 切割 pH 的优化

Fig.3 Optimization of the cleavage pH of CBD-Intein-AR DBD

(a) SDS-PAGE analysis of chitin beads after cleavage at different pH
(b) SDS-PAGE analysis of supernatant after cleavage at different pH

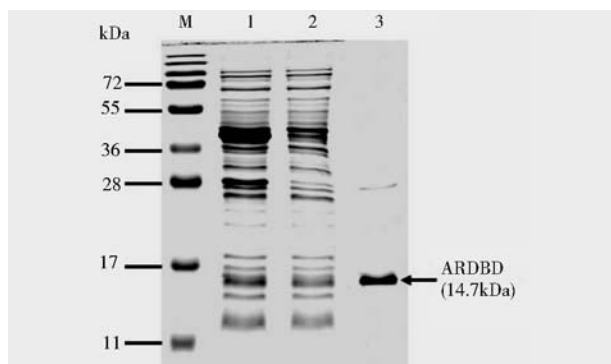


图4 AR DBD 的纯化

Fig.4 Purification of AR DBD

M: Marker; 1: Whole cell lysate before loading to chitin beads column; 2: Flowthrough after binding to chitin beads; 3: Purified AR DBD

行原核重组表达,但由于多种已知和未知的原因,所表达出的重组蛋白往往形成不可溶的包涵体,这对重组蛋白的纯化和活性是极大的威胁。为解决这一难题,很多研究者采用融合表达的方式来增加重组蛋白的溶解性,但融合标签对重组蛋白的活性可能产生影响。而如果想去除融合标签,却往往并非易事。

与其它融合表达载体相比,pTWIN1 载体最显著的优势在于它利用了 Intein 的自剪切特性,在通过融合蛋白增加重组蛋白溶解性和稳定性的同时,可以非常方便温和地去除融合标签,以防止融合标签对重组蛋白的影响。此外,由于切割与纯化过程是同时完成的,所以利用此系统表达的重组蛋白的纯化也是极其简单的。通过 pH 诱导后,目的蛋白与吸附在 Chitin beads

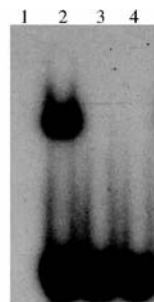


图5 纯化后 AR DBD 的凝胶阻滞分析

Fig.5 Electrophoretic mobility shift assay with purified AR DBD

1: AR DBD without oligonucleotide probe; 2: AR DBD incubated with conserved ARE; 3: AR DBD incubated with conserved ARE and fifty times unlabelled competitors; 4: AR DBD incubated with API response element

上的内含肽分离并被洗脱下来,而剩余的内含肽和未被切割的融合蛋白则继续吸附在层析填料上,不需再经过纯化过程将其去除,真正实现了一步纯化。由于避免了使用蛋白酶对融合蛋白的长时间切割,并且简化了繁琐的纯化步骤,因此对重组蛋白活性的维持和产量的提高提供了有力保障。基于以上诸多优点,利用该载体对目的蛋白进行重组表达的报道也越来越多^[11-13]。与利用此系统进行重组表达相比,同样为了得到不含融合标签的重组 AR DBD,Shaffer 等^[8]采用 GST 融合表达系统,融合蛋白经过谷胱甘肽-琼脂糖凝胶柱纯化后,以凝血酶 4℃ 过夜切割,切割产物再经 SP Sepharose FastFlow 和 Source 15S 柱纯化后才得到无融合标签的 AR DBD。不仅步骤繁琐,而且需要更多的试剂和材料。

从以上结果可以看出,利用 Intein 系统表达 AR DBD 操作简单方便,得到的纯化蛋白不仅纯度较高,而且也具有较理想的生物学活性。经初步计算,利用该系统表达的纯化后的 AR DBD 蛋白产量基本可达到 4mg/L 左右。由于核受体超家族的成员之间 DBD 区的氨基酸序列及三维结构保守性较高,因此可初步推测,用 Intein 系统表达该家族其它成员的 DBD 区可行性也是很大的,这将使对该家族成员的很多研究得到简化。

参考文献

- [1] Heinlein C A, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*, 2002, 23(2):175-200.
- [2] Heemers H V, Tindall D J. Androgen receptor (AR) coregulators: a

- diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*, 2007, 28(7):778-808.
- [3] Patrao M T, Silva E J, Avellar M C. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009, 53(8):934-945.
- [4] Jin L, Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(13):1218-1226.
- [5] De Vos P, Claessens F, Winderickx J, et al. Interaction of androgen response elements with the DNA-binding domain of the rat androgen receptor expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1991, 266(6):3439-3443.
- [6] Roche P J, Hoare S A, Parker M G. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(12):2229-2235.
- [7] Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Shimazaki S, et al. Dimerization characteristics of the DNA-and steroid-binding domains of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994, 50(5-6):225-233.
- [8] Shaffer P L, Jivan A, Dollins D E, et al. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(14):4758-4763.
- [9] Fan L, Hardy D O, Catterall J F, et al. Identification and characterization of the minimal androgen-regulated kidney-specific kidney androgen-regulated protein gene promoter. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40(12):979-988.
- [10] Haendler B, Schuttke I, Schleuning W D. Androgen receptor signalling: comparative analysis of androgen response elements and implication of heat-shock protein 90 and 14-3-3 η . *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 173(1-2):63-73.
- [11] 许成钢, 范晓军, 张志云, 等. Intein 介导的重组昆虫毒素 BmKIT 在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及活性分析. *生物工程学报*, 2007, 23(6):989-994.
- Xu C G, Fan X J, Zhang Z Y, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(6):989-994.
- [12] Esipov R S, Stepanenko V N, Chupova L A, et al. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expr Purif*, 2008, 61(1):1-6.
- [13] Collins E D, Espinoza A, Le L T, et al. Cloning the human vitamin D receptor into the pTwin-1 expression vector. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(1-2):121-123.

Intein-mediated Soluble Expression, Purification and Functional Identification of Human AR DBD in *E. coli*

YAO Guang-xin¹ ZHANG Yi-xuan¹ HU Shuang-gang^{2,3}

(1 Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

(2 Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai 200031, China)

(3 State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai 200031, China)

Abstract Androgen receptor (AR) is a transcription factor belonging to Nuclear Hormone Receptor Superfamily and its DNA binding domain (DBD) is essential for its binding affinity and specificity to androgen response element. Traditional method to obtain the recombinant AR DBD is fusing it to glutathione S epoxide transferase or *Staphylococcus aureus* proteinA in order to improve the solubility and yield. The question is the fusion tag might affect the characterization of target protein, and removing of the fusion tag is usually cumbersome. In order to obtain functional AR DBD without fusion tag in an easy and convenient way, the sequence encoded human AR 520 ~ 644 amino acids which includes the DBD is amplified by PCR, and then inserted into pTWIN1 vector. After optimizing of the inducing temperature and IPTG concentration, almost all recombinant protein is expressed in a soluble manner at 20°C and 30°C in host *E. coli* strain BL21(DE3). The whole cell lysate is then loaded to Chitin beads and the optimal pH for self-cleavage is determined. Using this method the AR DBD without any fusion tags is purified by only one step and the product shows high purity and good performance in electrophoretic mobility shift assay.

Key words Androgen receptor DNA binding domain Intein