

叶酸受体 α 原核载体的构建及表达

张梅, 邱郑, 邢黎军, 强旭, 张娟, 王旻*

(中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

摘要 PCR法扩增叶酸受体 α 基因片段,经 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切后克隆到原核表达载体 pet22b,并进行双酶切和测序鉴定;将测序正确的重组质粒通过 CaCl_2 法转入 BL21 (DE3) 表达菌株, IPTG 诱导蛋白表达,镍柱亲和纯化,通过 SDS-PAGE, Western blot 和 ELISA 鉴定蛋白表达;免疫小鼠,血清效价检测蛋白免疫原性。经双酶切和测序验证,成功构建 FR α -pet22b 表达载体。Western blot 验证表明,叶酸受体 α 基因能在 BL21 中表达目的蛋白,但 ELISA 值较低。经免疫后小鼠血清与市售叶酸受体 α 亲和力差,预示原核表达虽能得到叶酸受体 α ,但其构象可能与真核表达蛋白不同。

关键词 叶酸受体 α ; 构建; 原核表达; 蛋白鉴定; 亲和力; 构象

中图分类号 Q51; Q78 文献标志码 A 文章编号 1005-8915(2016)01-0026-04

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中死亡率最高的肿瘤,其恶性程度高,预后差。虽然手术和传统化疗、放疗技术均有所改进,但晚期卵巢癌患者长期生存率仍不超过 20%,故探索新的有效卵巢癌的诊断治疗方法已成为卵巢癌的研究重点^[1]。叶酸受体是一种糖基磷脂酰肌醇偶联蛋白,对其天然配体叶酸有着较高的亲和力和内吞转运能力^[2]。其中研究最为深入的是叶酸受体 α (FR α),相对分子质量 38~40 k^[3],由 257 个氨基酸残基组成,含有 8 对二硫键。叶酸受体 α 在正常组织中分布极少,而在几乎所有上皮性卵巢癌中大量表达,其对早期卵巢癌的诊断有很高的阳性率^[4-6],因此,叶酸受体 α 被认为是一种极具潜力的卵巢癌相关肿瘤抗原^[6]。

1 材料和方法

1.1 实验动物、宿主菌和载体

BALB/c 小鼠,由扬州大学动物实验中心提供; *Escherichia coli*, BL21 (DE3), 原核表达载体 pet22b, 均由天然活性组分与药效国家重点实验室保存。

1.2 试剂及仪器

限制性内切酶 *Nco* I、*Eco* R I, Fermentas; 质粒抽提试剂盒, 琼脂糖凝胶回收试剂盒, PCR 产物纯化试剂盒, 上海生物工程有限公司; EasyTaq DNA 聚合酶, DL2 000 DNA Marker, T4 DNA 连接酶, 全式金生物技术有限公司; 镍离子亲和层析柱, 国药集团; 兔 FR α 多克隆抗体(亲和层析纯化), 北京神州义翘生物有限公司; ECL 显色底物液, HRP-羊抗兔

二抗, 上海萨博生物有限公司; QuickAntibody 免疫佐剂, 北京康碧泉生物科技有限公司。

PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; EPS-300 电泳仪、HE-90 小号水平电泳槽 VE-180 垂直电泳槽、转膜仪、Tanon-2500 全自动凝胶图像处理系统, 上海天能科学仪器有限公司; HL-2 恒流泵, 上海沪西分析仪器厂有限公司; DNM-9602 酶标分析仪, 北京普朗新技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 重组表达载体的构建及鉴定

1.3.1.1 *FR α* 基因的扩增 根据 Gene Bank 报道的 *FR α* 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 并用 Oligo 软件进行评估, 上游引物: CATGCCATGGCTCAGCGGATGA-CAACACA 含酶切位点 *Nco* I; 下游引物: CCGGAAT-TCTCAGCTGAGCAGCCACAGC 含酶切位点 *Eco* R I。引物由上海生物工程技术有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min, 然后 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 29 个循环。后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖核酸电泳检测目的片段大小。

1.3.1.2 重组载体的构建与鉴定 回收 PCR 产物, 用 *Nco* I 和 *Eco* R I 对回收的产物进行双酶切。对 pet22b 载体进行双酶切后与 *FR α* 目的基因在 T4 DNA 连接酶作用下, 16 °C 过夜连接。将连接产物利用 CaCl_2 法转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 均匀涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C, 220 r/min 过夜培养。双酶切、菌落 PCR、DNA 测序鉴定阳性克隆。

收稿日期: 2015-09-06 修回日期: 2015-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81301902), 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介: 张梅(1991-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 从事重组蛋白分离纯化研究, Tel: 15850635081, E-mail: 909041367@qq.com。

* 通讯作者: 王旻(1956-), 男, 教授, 博士生导师, 从事生物药物研究, Tel: 025-83271395, E-mail: minwang@cpu.edu.cn。

1.3.2 FR α 蛋白的表达

1.3.2.1 IPTG 诱导蛋白表达 挑取测序正确的阳性菌落,接种 LB 培养基中,37 °C 培养 2~3 h,当 A_{600} 值达到 0.4~0.6 时,加 IPTG (终浓度 0.05 mmol/L),16 °C,150 r/min 低温诱导表达 16 h。12 000 r/min,离心 10 min,收集菌体。

1.3.2.2 目的蛋白的分离纯化 收集菌体,按每克菌体(湿重),重悬于 3 mL 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA),再加入 80 μ L 10 mg/mL 溶菌酶,充分搅拌后加入 4 μ L PMSF。静置至菌液变粘稠时超声。超声结束后,4 °C,12 000 r/min 离心 10 min 收集上清。0.22 μ m 滤膜过滤上清,镍柱纯化。10 \times 柱体积的 Binding Buffer 平衡镍柱,上样。样品体积流量 0.5 mL/min。10 \times 柱体积的 Binding Buffer 洗涤,Elution Buffer (20 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.5 mol/L NaCl,10~500 mol/L 咪唑,pH 8.0) 梯度洗脱,收集各梯度洗脱液,SDS-PAGE 检测。

1.3.2.3 蛋白的鉴定

(1) Western blot 鉴定

将不同梯度洗脱的溶液,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,50 V 稳压转膜 90 min。5% 脱脂牛奶于 37 °C 封闭 2 h,市售 FR α 抗体 4 °C 孵育过夜,HRP 标记的羊抗兔 IgG 37 °C 孵育 2 h,充分漂洗后,ECL 显色液曝光显影。

(2) ELISA 鉴定

将不同梯度洗脱的溶液,4 °C 包被过夜。结束后 5% 脱脂牛奶/PBS-T 37 °C 封闭 2 h。倒掉封闭液,PBS-T 洗板 3 次,每孔加入 200 μ L 市售 FR α 抗体,37 °C 孵育 2 h。PBS-T 洗板,每孔加入 150 μ L 羊抗鼠 IgG (1:5 000 稀释),37 °C 孵育 2 h。显色后每孔加入 50 mL 1 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应,利用酶标仪测定 A_{450} 值。

1.3.3 免疫动物

1.3.3.1 蛋白浓度测定 蛋白透析,冻干浓缩,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,绘制标准曲线。测定样品吸光值,根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

1.3.3.2 小鼠血清效价的测定 平行免疫 3 只小鼠,每次免疫 40 μ g 蛋白。免疫流程参照 [Quick Antibody](#) 佐剂的使用说明书,共免疫 3 次。末次免疫 1 w 后,对小鼠进行眼静脉丛取血,全血室温静置 1 h,4 000 r/min 离心 15 min,收集上层血清,同时取未免疫小鼠的血清作为阴性对照。使用间接 ELISA 法对其抗血清效价检测。

2 结果

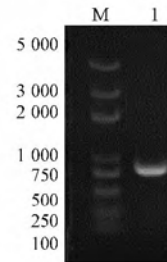
2.1 叶酸受体 α 基因片段的扩增

设计引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析可见与目的片段大小一致的条带,见图 1。

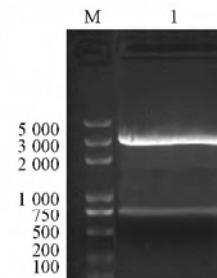
2.2 重组表达载体的构建

分别使用双酶切和菌落 PCR 法对质粒 FR α -pet22b 进行验证。结果显示,质粒经 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切后,可见

750 bp 片段,见图 2。菌落 PCR 验证可见 750 bp 的目的条带,见图 3。同时测序结果显示与目的基因序列一致,说明成功构建了 FR α -pet22b 重组表达质粒。

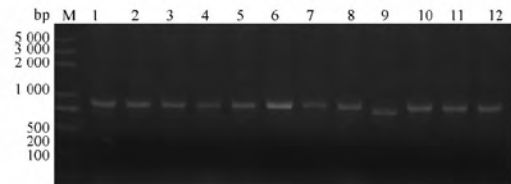


Lane M:DNA Marker; Lane 1:PCR product of FR α
Fig 1 PCR amplification of FR α coding sequence



Lane M:DNA Marker; Lane 1:FR α -pet22b digested by *EcoR* I and *Nco* I

Fig 2 Double restriction endonuclease digestion analysis of FR α -pet22b

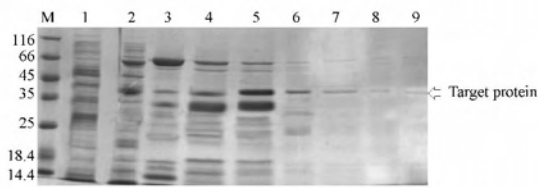


Lane M:DNA Marker; Lane 1~12:Selected clones of FR α -pet22b
Fig 3 Colony PCR analysis of selected clones

2.3 叶酸受体 α 蛋白的诱导表达

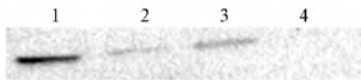
2.3.1 SDS-PAGE 验证 诱导表达后菌液纯化后进行 SDS-PAGE。泳道 1 为未诱导菌液,泳道 2 为诱导后菌液。泳道 3~9 为不同梯度洗脱溶液。考马斯亮兰染色发现在分子质量大约为 38 k 处有一条较浓集而且表达量受 IPTG 诱导的蛋白条带,并且在 200 mmol/L 咪唑浓度下,可以得到比较纯的蛋白。见图 4。

2.3.2 Western blot 鉴定 用市售 FR α 抗体进行 Western blot,验证 FR α 蛋白的表达,同时以市售 FR α 蛋白为阳性对照。结果显示,市售 FR α 蛋白和重组表达蛋白在相对分子质量大约 38 k 处有蛋白表达的阳性信号,而未转染组免疫印迹为阴性,见图 5。



Lane M: Protein Marker; Lane 1: Before IPTG induced; Lane 2: After IPTG induced; Lane 3~5: Eluted by 20, 50, 100 mmol/L imidazole; Lane 6~8: Eluted by 200 mmol/L imidazole; Lane 9: Eluted by 500 mmol/L imidazole

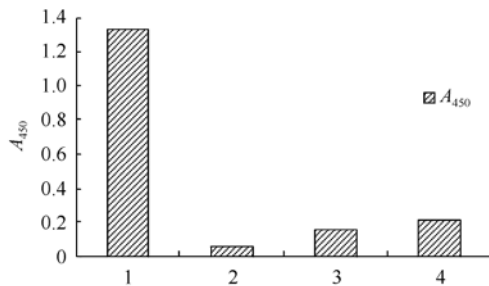
Fig 4 SDS-PAGE of FR α



Lane 1: FR α positive control; Lane 2: Recombinant protein eluted by 100 mmol/L imidazole; Lane 3: Recombinant protein eluted by 200 mmol/L imidazole; Lane 4: Negative control

Fig 5 Western blot analysis of FR α expression in *E. coli*

2.3.3 酶联免疫吸附试验鉴定 用市售 FR α 抗体进行酶联免疫吸附试验,验证蛋白免疫原性。同时以市售 FR α 蛋白为阳性对照。结果显示,市售 FR α 蛋白与市售 FR α 抗体结合阳性值较高,而纯化所得蛋白与市售 FR α 抗体结合力较低,见图 6。



Lane 1: Eukaryotic protein FR α control; Lane 2: Negative control; Lane 3: Recombinant protein eluted by 100 mmol/L imidazole; Lane 4: Recombinant protein eluted by 200 mmol/L imidazole

Fig 6 ELISA analysis of FR α expression in *E. coli*

2.4 蛋白浓度测定

采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。浓缩后蛋白浓度为 0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 小鼠血清效价的测定

取小鼠血清,ELISA 法检测血清效价。将不同比例稀释的小鼠血清作为一抗,分别与市售 FR α 蛋白以及重组表达蛋白进行孵育,同时设定空白血清孔作为阴性对照,见图 7。结果显示,相同比例稀释条件下,市售 FR α 的 A_{450} 值明显低于重组蛋白。

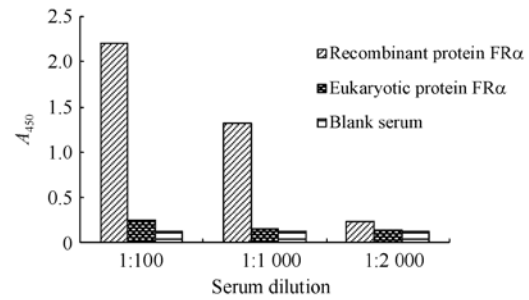


Fig 7 Ab responses of the sera from mouse immunized with FR α on different serum dilutions

3 讨论

肿瘤抗原指在肿瘤发生发展过程中过度表达的抗原物质,目前基于肿瘤抗原的诊断方法以及生物学治疗已成为人们发现肿瘤、治疗肿瘤的有效手段。积极探索早期卵巢癌的筛查方法,寻找新的、特异的、灵敏的肿瘤标志物,用于卵巢癌的早期筛查具有重要价值^[7-10]。叶酸受体 α 在卵巢肿瘤中具有特异性的高表达,被认为是一种具有潜力的卵巢癌诊疗靶点,可以作为肿瘤的诊断标记物^[11-13]。

由于原核表达系统具有生产成本低,易培养和繁殖等优点,本文尝试使用大肠杆菌表达系统表达叶酸受体 α 。虽然 Western blot 结果显示阳性,但 ELISA 实验表明,在非变性情况下,经原核表达系统制得的目的蛋白与市售 FOLR1 抗体结合程度较低。进一步小鼠免疫实验表明,重组蛋白免疫小鼠产生的抗体与市售真核表达的叶酸受体 α 结合较弱。分析原因可能有以下几点:(1)大肠杆菌表达系统属于原核生物表达系统,缺乏糖基化等翻译后加工和修饰过程^[14],而叶酸受体 α 天然状态需要糖基化修饰等过程,其三维结构表面的寡糖对其免疫原性有非常重要的作用,故原核表达系统不能满足其生物学活性的形成;原核表达系统较难形成正确的二硫键,而叶酸受体 α 具有 8 对二硫键,不利于正确三维结构的形成。(2)Western blot 是在蛋白变性条件下进行检测,ELISA 是在非变性条件下,在不破坏蛋白空间构象情况下进行检测。天然条件下,蛋白的结合表位被包裹,导致抗体不能正确识别并结合,而在变性的条件下,相应结合位点被暴露,因而出现了 Western blot 有结果而 ELISA 结果较低的现象。

本实验的结果表明,要证明一个蛋白是否为目的蛋白,不能只进行 Western blot 分析,还要通过 ELISA 等手段检测蛋白在非变性条件下与相应抗体的结合,并结合其他免疫学活性检测实验,才能判断目的蛋白表达的正确性。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. *CA: Cancer J Clin*, 2008, 58 (2) :71-96.

- [2] 陈亮亮,郝敏. 叶酸受体 α 在妇科恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志,2015,2:158-160.
- [3] Basal E, Eghbali-Fatourehchi GZ, Kalli KR, et al. Functional folate receptor alpha is elevated in the blood of ovarian cancer patients [J]. *PLoS ONE*,2009,4(7):6292-6296.
- [4] 谢俊玲,沈丹华,杜金荣. 叶酸受体 α 在女性生殖系统肿瘤中的研究进展 [J]. 中国妇产科临床杂志,2008,04:312-315.
- [5] Christen L, Walters, Rebecca C, et al. Folate and folate receptor alpha antagonists mechanism of action in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*,131(2):493-498.
- [6] Toffoti G, Sorio R, Gallo A, et al. Folate binding protein as a prognostic marker in ovarian cancers [J]. *Inter J Gynecol Canc*,1999,9(26):30-35.
- [7] Dainty, Louis A, Risinger J, Morrison, et al. Overexpression of folate binding protein and mesothelin are associated with uterine serous carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*,105(3):563-570.
- [8] 丁滨. 卵巢癌治疗研究进展 [J]. 人民军医杂志,2011,54(03):237-239.
- [9] 陈玉梅,王丽,钟丽红,等. 肿瘤标志物在卵巢癌早期诊断中的应用进展 [J]. 当代医学,2012,18(20):12-13.
- [10] Mor G, Visintin, Lai Y, et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer [J]. *Nat Acad Sci USA*,2005,102(21):7677-7682.
- [11] Bueno R, Appasani K, Mercer H, et al. The alpha folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma [J]. *J Thor Cardiova Surg*,2001,121(2):225-233.
- [12] Hartmann LC, Keeney GL, Lingle WL, et al. Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer [J]. *Inter J Can*,2007,121(5):938-942.
- [13] Knutson KL, Krco CJ, Erskine CL, et al. T-cell immunity to the folate receptor alpha is prevalent in women with breast or ovarian cancer [J]. *J Clin Oncol*,2006,24(26):4254-4261.
- [14] 范翠英,冯利兴,樊金玲,等. 重组蛋白表达系统的研究进展 [J]. 生物技术,2012,2:76-80.

Construction and Expression of Prokaryotic Expression Vector Encoding Folate Receptor α

ZHANG Mei, QIU Zheng, XING Li-jun, QIANG Xu, ZHANG Juan, WANG Min*

(Department of Molecular Biology, School of Life Science&Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract The cDNA fragment encoding folate receptor α (FR α) was amplified using PCR and was cloned into the prokaryotic expression vector pet22b between the two restriction enzyme sites *Nco* I and *Eco*R I. The recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease digestion and DNA sequencing. BL21 (DE3) was transformed with the recombinant plasmid using CaCl₂ method. The expression of FR α was purified by Ni²⁺ column and was identified by SDS-PAGE, Western blot and ELISA. The purified protein was injected intramuscularly into BALB/c mice. The immunogenicity of the protein was tested by serum titer. The prokaryotic expression vector was successfully constructed. The expression of FR α in BL21 was confirmed by Western blot, but it showed lower ELISA values, indicating that although the prokaryotic expression can get folate receptor α , its conformation differs from the natural product.

Key words Folate receptor α , Construction, Prokaryotic expression, Protein identification, Affinity, Conformation

• 信 息 •

2016-04 一种产 γ -环糊精糖基转移酶的重组大肠杆菌及其应用 一种产 γ -环糊精糖基转移酶的重组大肠杆菌及其应用,一种优化信号肽提高 γ -环糊精糖基转移酶胞外分泌表达的方法,属于基因工程技术领域。通过与 γ -环糊精糖基转移酶融合表达4种大肠杆菌胞外分泌信号肽,乳糖类似物 IPTG 诱导激活 T7 RNA 聚合酶基因的转录,在 T7 RNA 聚合酶作用下进行 γ -环糊精糖基转移酶的转录,从而表达重组 γ -环糊精糖基转移酶。本发明的 DacD 信号肽与常用的 PelB 信号肽相比, γ -环糊精糖基转移酶酶活更高,解决了 γ -环糊精糖基转移酶胞外分泌量低的问题;应用本发明方法生产 γ -环糊精糖基转移酶,产量高、工艺简化、便于工业化应用。

2016-05 与几丁质特异结合的碱性成纤维细胞生长因子及其编码基因、制备方法与应用 一种涉及基因工程领域,尤其涉及与几丁质特异结合的碱性成纤维细胞生长因子及其编码基因、制备方法与应用。本发明提供的与几丁质特异结合的碱性成纤维细胞生长因子,包括 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列和 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。其能够与几丁质特异性的结合,且结合能力远远高于 bFGF,因而缓释效果也强于 bFGF。且经体外实验证实,本发明提供的与几丁质特异结合的碱性成纤维细胞生长因子与天然 bFGF 具有相似的促进细胞增殖的生物学活性。