

大鼠乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶的 C 末端片段 在大肠杆菌中的融合表达及纯化

张春妮 袴田秀^① 宫崎 章^① 松田浩史^① 堀内正公^①
南京军区南京总医院检验科 全军医学检验中心, 南京 210002)

主题词 乙酰辅酶 A; 胆固醇酰基转移酶; 重组融合蛋白; 基因表达; 大肠杆菌; 动脉粥样硬化; 谷胱甘肽转移酶; 大鼠

摘要 为进一步探讨乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶的结构和功能的关系,经聚合酶链反应扩增得到的乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT)的 C 末端膜外结构域 (氨基酸 480~545)用 EcoRI 酶解,插入到表达载体 pGEX-2TK 中,得到重组表达质粒 pGEX-2TK/ACAT (氨基酸 480~545)。阳性重组子在大肠杆菌中经异丙基-β-D 硫代半乳糖苷诱导表达谷胱甘肽转移酶-乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (氨基酸 480~545),重组表达菌裂解上清液经谷胱甘肽-Sepharose CL-4B 亲和柱纯化。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blotting 分析显示得到了较纯的谷胱甘肽转移酶-乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (氨基酸 480~545)融合蛋白。乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶的 C 末端膜外结构域 (氨基酸 480~545)的分离纯化为抗谷胱甘肽转移酶-乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (C 末端片段)抗体的制备及其乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶结构和功能关系的进一步研究打下了基础。

Fusion Expression and Purification of Rat Acyl-Coenzyme A : Cholesterolacyltransferase (Amino Acid 480 ~ 545) in E. coli

ZHANG Chun-Ni, Hakamata Hideki, Akira Miyazaki, Hirofumi Matsuda and Seikon Horiuchi

Department of Medical Laboratory Science, Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China)

MeSH Acyl Coenzyme A; Cholesterol Acyltransferase; Recombinant Fusion Proteins; Gene Expression; Escherichia coli; Atherosclerosis; Glutathione Transferases; Rats

ABSTRACT **Aim** Fusion expression and purification of GST-fusion protein of the extra-membrane domain of rat acyl-coenzyme A: cholesterolacyltransferase (ACAT, amino acid 480 ~ 545). **Methods** Rat ACAT (amino acid 480 ~ 545) amplified by PCR was digested with EcoRI and then subcloned into the expression vector pGEX-2TK to get recombinant plasmid pGEX-2TK/rat ACAT (amino acid 480 ~ 545). Upon IPTG induction, GST-rat ACAT (amino acid 480 ~ 545) was expressed in E. coli. The expressed product was purified with Glutathione-Sepharose CL 4B affinity chromatography from cellular lysate. **Results** SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that purified GST-fusion protein of rat ACAT (amino acid 480 ~ 545) was obtained. **Conclusion** The purification of GST-fusion protein of the extra-membrane domain of rat ACAT (amino acid 480 ~ 545) may be useful in the production of antibody against C terminus of rat ACAT and in the studies of the relationship between the structure of ACAT and its functions.

乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase, ACAT)是位于内质网的膜蛋白,催化细胞内胆固醇与脂肪乙酰辅酶 A 反应生成胆固醇酯 (cholesteryl ester, CE)。ACAT 存在于多种组织中,包括肝、小肠、肾上腺和动脉。它的主要生理功能是:参与肝内极低密度脂蛋白的组装、小肠饮食胆固醇的吸收及胆固醇在合成类固醇组织中的储存。病理状态下,ACAT 则对动脉粥样斑块中泡沫细胞的形成起关键作用^[1,2]。

1993 年,Chang 等^[3]成功地克隆了人 ACAT cD-

NA 序列。随后,几种其它种属的 ACAT cDNA 也相继得以克隆^[4~6]。大白鼠 ACAT cDNA 含 1 635 碱基对,编码 545 个氨基酸,含有 2 个典型基元:签名序列和七个亮氨酸基元。其氨基酸序列与人 ACAT cDNA 编码的氨基酸序列有 83% 同源^[1]。大鼠 ACAT 有两个跨膜区,分别为氨基酸残基 127 ~ 150 和 455 ~ 578。

本文报道大鼠 ACAT 的 C 末端片段 (氨基酸 480 ~ 545)在大肠杆菌中与谷胱甘肽转移酶 (glutathione transferase, GST)的融合表达及其分离纯化,为探讨 ACAT 的结构和功能以及 ACAT 与配基或抗体之间的相互作用奠定基础。

① 日本熊本大学医学部生化系

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli XL-1 Blue 系日本熊本大学医学部生化系保存; 表达质粒 pDEX-2TK 和 Sepharose CL-4B 购自 Pharmacia 公司, 聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 试剂购自 Life Technologies; Sarkosyl 系 Sigma 产品; 羊抗兔免疫球蛋白为 Bio-Rad 产品; ECL 试剂为 Amersham 产品。

1.2 聚合酶链反应

依照大鼠 ACAT 序列^[1]的 C 末端 66 个氨基酸残基片段寡核苷酸引物引入 EcoRI 酶切位点, 设计如下: 5' 端引物为: 5'-GGGAATTCCGGCTTTTAACTTC-ATCG-3', 3' 端引物为: 5'-CGGAATTCCGAAACA-CGTAACGAC-3'。以 pGEM-鼠 ACAT 为反应模板, cDNA 产物 94℃ 变性 10 min 后, 按下列顺序扩增: 94℃ 变性 30 s → 60℃ 退火 60 s → 75℃ 延伸 90 s, 共 30 个循环后, 75℃ 维持 10 min, 取 5 μL 反应物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。

1.3 DNA 酶切及重组质粒的构建

从低熔点琼脂糖中回收 DNA 片段, 经 EcoRI 酶切处理, 与质粒 pGEX-2TK 经 T₄ DNA 连接酶连接, 转化入 *E. coli* XL-1 Blue, 蓝白筛选法^[2]挑选白色克隆, 提纯质粒, 用 EcoRI 酶切鉴定是否有插入片段, 然后测序分析。

1.4 重组表达质粒的构建和表达

将重组质粒转化至感受态 *E. coli* 菌株中。取新鲜过夜菌液, 接种于 LB (含 100 mg/L Amp) 培养基中, 37℃ 培养 3 h 至 OD₆₀₀ = 0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), 诱导表达 3 h。

1.5 重组融合表达产物的分离纯化

将表达菌于 5 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀部分用 1% Sarkosyl-PBS 溶液悬浮, 超声破菌, 40 000 r/min 离心 20 min, 谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) Sepharose CL 4B 凝胶介质装柱, 用 1% Sarkosyl-PBS 溶液平衡柱 2 个床体积。表达菌上清液上样, 1% Sarkosyl-PBS 溶液洗脱, 去除杂蛋白。换洗脱液 (50 mmol/L Tris, pH 8.0, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L GSH) 洗脱, 收集洗脱峰。

1.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白凝胶电泳

按文献^[3]方法, 用含 1% SDS, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12.5% 凝胶进行。

1.7 Western blotting

参照文献^[2], 亲和层析洗脱峰收集液浓缩后经

12.5% SDS-PAGE 分离, 转移至硝酸纤维素膜上。转印缓冲液为 25 mmol/L Tris, 190 mmol/L Glycine, 20% Methanol 和 0.01% SDS (pH 8.3), 120 mA 下转印 1 h。然后膜用溶于 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl 和 0.3% Tween-20 (pH 7.6) 的 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜。再与 0.5 mg/L 抗人 ACAT-C 末端抗体室温孵育 4 h, 洗膜后, 与 0.6 mg/L 羊抗兔 IgG-HRP 反应 40 min, 最后用 ECL 试剂显色。

2 结果

2.1 表达质粒的构建和鉴定

原核表达载体 pGEX-2TK 含有 Tac 启动子, 克隆位点的 5' 端含有 GST 编码基因。将经 PCR 扩增得到的 201 bp ACAT 基因片段经 EcoRI 酶解后, 插入载体 pGEX-2TK, 得到表达质粒 (图 1, Figure 1)。重组表达质粒 pGEX-2TK/ACAT (氨基酸 480 ~ 545) 转染入大肠杆菌中, 经 IPTG 诱导表达。酶切电泳图谱 (图 2, Figure 2) 显示, 构建的载体经 EcoRI 酶切可得到一个 201 bp 片段, 证实已成功构建了表达载体。

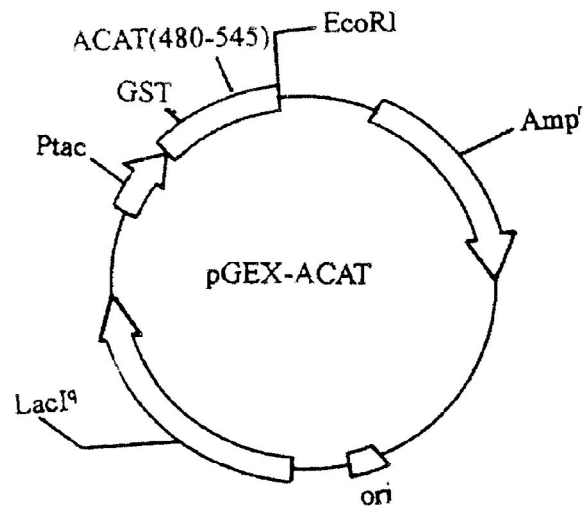


图 1. pGEX-2TK/ACAT 质粒的结构示意图

Figure 1. Construction of plasmid pGEX-2TK/ACAT

2.2 融合蛋白的分离纯化

亲和层析洗脱峰浓缩后用 12.5% SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 3 (Figure 3) 所示。在分子质量为 34 000 处, 有一明显条带。用 Western blotting 证实, 为 GST-ACAT 融合蛋白。

3 讨论

乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 是细胞膜酶, 催化胆固醇 3β 位的羟基与脂肪酸羧基酯化生成胆固醇酯。病理状态下, ACAT 对动脉粥样硬



图 2. 重组表达的 pGEX-2TK/ACAT 质粒的结构分析

Figure 2. Restriction analysis of recombinant expression of Plasmid pGEX-2TK/ACAT.

1, Nucleic acid molecular weight marker; 2, Restriction fragments of recombinant plasmid

化斑块中泡沫细胞的形成起关键作用,因而与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。具有生物活性的 ACAT 膜外片段的表达及其纯化,已成为 ACAT 结构和功能研究的关键因素。我们用 GST 为标签的融合表达系统实现了大量 ACAT 的 C 末端膜外片段 (氨基酸 480~545) 在 *E. coli* 表达体系中的表达,并利用 GST 亲和层析获得了较纯的 GST-ACAT (氨基酸 480~545) 融合蛋白。

经过对融合蛋白分离纯化条件的研究,发现溶菌缓冲液的选择对产物的得率至关重要。我们比较了两种去污剂 Sarkosyl 和 Triton X-100 对 GST-ACAT (氨基酸 480~545) 融合蛋白的溶解效果,发现 1% 的 Triton X-100 仅溶解极少量融合蛋白,而 Sarkosyl 可使约 80% 融合蛋白溶于上清液中。通过比较,选择 1% Sarkosyl-PBS 作为溶菌缓冲液。另外 GST 融合表达体系的纯化效果在很大程度上也依赖于融合基因本身的性质。GSH-Sepharose CL 4B 亲和层析对 GST-ACAT (C 末端片段) 的纯化效果低于对一些其他重组 GST 融合蛋白,如 GST-人 ACAT (N 末端片段) 和 GST-大鼠 ACAT (N 末端片段) 等。此外,由于 GST-ACAT 融合蛋白不稳定,易降解,因此层析须在 4℃ 情况下进行,所有溶剂包括裂解菌上清液、溶菌缓冲液、洗脱液等均应用 0.45 μm 滤膜过滤除菌后方可使用,收集洗脱液的试管也须消毒后使用。

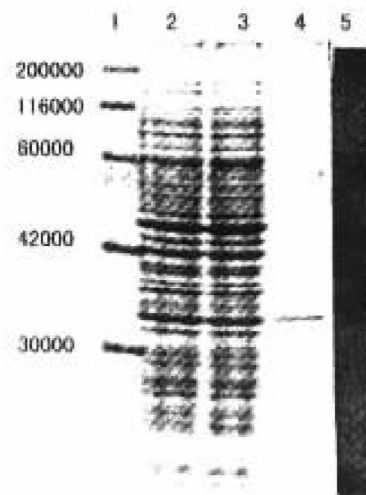


图 3. SDS-PAGE 和 Western blotting 的结果

Figure 3. The result of SDS-PAGE and Western blotting.

1, Molecular weight marker; 2, Lysate; 3, Supernatant; 4, Elution peak; 5, Western blotting

参考文献

- Matsuda H, Hakamata H, Kawasaki T, et al. Molecular cloning, functional expression and tissue distribution of rat acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1391**: 193 - 203
- Matsuda H, Hakamata H, Miyazaki A, et al. Activation of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity by cholesterol is not due to altered mRNA levels in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1301**: 76 - 84
- Chang CCY, Huh HY, Cadigan KM, et al. Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 20 747 - 755
- Cao GO, Goldstein JL, Brown MS. Complementation of mutation in acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) fails to restore sterol regulation in ACAT-defective sterol-resistant hamster cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 14 642 - 648
- Uelman PJ, Oka K, Sullivan M, et al. Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization and regulations of ACAT in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 26 192 - 201
- Pape ME, Schultz PA, Rea TJ. Tissue specific changes in acyl-coA: cholesterol acyltransferase (ACAT) mRNA levels in rabbits. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 823 - 838
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, **227**: 680 - 685
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989

此文 1998 - 06 - 26 收到)

此文编辑 胡必利)