

PP2A B56 α 调节亚基原核表达载体的构建及表达

赵亚平,程晓清,孙晓莉,李良渊,张 朝

(南京师范大学生命科学学院,江苏省分子医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 为了构建 PP2A B56 α 调节亚基原核表达载体,以 pCEP-4HA-B56 α 质粒为模板,设计引物克隆人源 PP2A B56 α cDNA,连入 pGEX-4T-1 载体中,测序正确后,转化 *E.coli* BL21(DE3),IPTG 诱导表达,并将诱导表达重组蛋白的菌体超声破碎后,进行可溶性分析,对可溶性蛋白进行纯化.SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 分析鉴定重组蛋白.结果表明,经测序和酶切鉴定后成功构建重组质粒 pGEX-4T-1-B56 α ,表达大小约 79 kD 的重组蛋白,可溶性表达的重组蛋白为菌体总蛋白质量的 8.6%,经 GST 纯化系统纯化得到纯度约为 78.9%的重组蛋白,回收率达到 52.2%.因此,本研究成功构建了 PP2A B56 α 原核表达体系,获得重组蛋白,为研究 PP2A B56 α 的生物学功能奠定了基础.

[关键词] PP2A, B56 α , 原核表达

[中图分类号] Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)03-0074-05

Construction of Prokaryotic Expression Vector Conjugated with B56 α Regulatory Subunit of PP2A

Zhao Yaping, Cheng Xiaoqing, Sun Xiaoli, Li Liangyuan, Zhang Zhao

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: pCEP-4HA-B56 α was used as a template to construct the prokaryotic expression vector of PP2A B56 α , primers were designed according to cDNA sequence to clone the gene. The amplified cDNA fragment was inserted into pGEX-4T-1 vector. Positive clones were verified via sequencing. The recombinant plasmid was transformed into BL21 *E.coli*. Fragmentation of IPTG-induced *E.coli* culture was achieved by sonication on ice. Soluble and insoluble fractions were separated and analyzed. Lastly, soluble fraction was purified. Results showed that, the constructed plasmid contained the fragment of PP2A B56 α . The recombinant protein was about 79 kD and soluble recombinant protein was about 8.6% of total bacteria protein. The purification of GST-tagged B56 α was performed by use of GST purification system. The purity of recombinant protein was reached to 78.9% among total protein by using this method and the rate of recovery was 52.2%. The PP2A B56 α Prokaryotic Expression System was constructed successfully and recombinant protein was obtained, which was helpful for the future study of its biological function.

Key words: PP2A, B56 α , prokaryotic expression

Protein Phosphatase 2A (PP2A) 是一种多功能的丝/苏氨酸蛋白酶,广泛地分布在许多组织中,参与多种细胞功能活动的调节,包括 DNA 复制、转录,细胞周期,发育,肌肉收缩和细胞信号转导等^[1-3]. PP2A 全酶由支架亚基 A,催化亚基 C 和调节亚基 B 组成.在脊椎动物中,PP2A 的结构亚基 A 和催化亚基 C 由 2 个基因编码而调节亚基 B 由 13 个基因编码^[4]. B 亚基分为 B/PR55、B'/PR61、B''/PR72 和 B'''/PR93 4 个家族, B 亚基家族之间的同源性非常低,具有组织、细胞及底物的特异性^[5].其中 B56 是 B 亚基中基因最多多样化的家族,其 5 个亚基在许多组织和细胞中差异性表达^[6-7],其中 PP2A B56 α (以下简称 B56 α) 在心肌和骨骼肌中高表达^[8].临床研究发现心脏中 PP2A 活性的改变与多种心脏病理过程密切相关^[9].文献报道,心脏中 B56 α 直接调节 PP2A 的磷酸酶活性,并且发现心脏中 B56 α 是 PP2A 磷酸酶活性的自抑制因

收稿日期: 2016-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金(30570662, 30871228, 31171302).

通讯联系人: 张朝, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心肌离子通道病与药物作用靶点, 心肌细胞钙信号调控. E-mail: zhangzhaolab@163.com

子^[10-11]. 为了在体外进一步证实 B56 α 对 PP2A 磷酸酶活性具有调节作用,排除细胞中其他因素的影响,有必要克隆 B56 α 基因构建原核表达体系,获得纯化的重组蛋白,为接下来的实验奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

pCEP-4HA-B56 α 购自 Addgene,原核表达载体 pGEX-4T-1 购自 Novagen 公司;大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3)感受态细胞由本实验室制备并保存;Prime STAR max、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DL2000 Marker、DL15000 Marker 均购自 Takara 公司;小提质粒试剂盒购自天根生化,胶回收试剂盒购自 AXY-GEN;IPTG、氨苄霉素、卡那霉素均购自南京生兴生物技术有限公司;Glutathione Agarose 购自 Thermo;引物由生工(上海)股份有限公司合成.

1.2 实验方法

1.2.1 原核表达质粒的构建

根据原核表达载体 pGEX-4T-1 的多克隆位点,及 PP2A B56 α 调节亚基 cDNA 序列的信息,选择酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I,上游引物(包括酶切位点):5'-CGGGATCCATGTCGTCGCCGTCGCCGC-3',下游引物(包括酶切位点):5'-CCGCTCGAGTTATTTGGCACTGGTACTGCTGCG-3',以 pCEP-B56 α 为模板扩增 B56 α 的 cDNA 序列,割胶回收 PCR 产物,将 PCR 产物和原核表达载体 pGEX-4T-1 同时进行双酶切,37 °C 4 h,酶切产物进行割胶回收纯化,将纯化后的酶切产物用 T4 DNA 连接酶进行酶连,16 °C 酶连过夜,次日,将酶连产物转化 DH5 α 感受态细菌,接种于氨苄平板上,37 °C 倒置培养过夜,挑取单克隆,经 PCR,提取质粒及 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切验证,将阳性克隆送上海生工测序.测序正确的命名为 pGEX-4T-1-B56 α .

1.2.2 重组质粒原核表达及鉴定

分别将 pGEX-4T-1 空载质粒和 pGEX-4T-1-B56 α 重组质粒转化到 BL21(DE3)中,挑取单克隆在 LB 液体培养基中,220 R,37 °C 2.5 h 左右,使菌液 OD 值达到 0.6~0.8 时,实验组中加入 1 mmol/L 的 IPTG,对照组中加入同样体积的双蒸水,诱导表达 4 h,各取 2 mL 菌液,离心收集菌体,加入 100 μ L 的 PBS 重悬,然后加入 25 μ L 的 5 \times 的上样缓冲液,吹匀,99 °C 煮样 5 min,用于 SDS-PAGE 电泳.将目的蛋白通过考染和 Western Blot 进行鉴定.

1.2.3 重组蛋白表达条件的优化

于 37 °C 1.0 mmol/L IPTG 诱导不同时间(0、2、4、6、8)h,收集菌体,SDS-PAGE 电泳分析不同时间诱导下蛋白表达量的变化.选取最佳诱导时间,在不同浓度 IPTG(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2.0)mmol/L,37 °C 诱导表达相同时间,收集菌体,SDS-PAGE 电泳分析不同浓度 IPTG 诱导下蛋白表达的差异.

1.2.4 重组蛋白的可溶性分析及纯化

在优化条件下诱导并收集 5 mL 菌液,加入 400 μ L 的重悬液重悬,再加入 PMSF(终浓度为 1 mmol/L),冰水浴中超声破碎,程序为超声 2 s 停 4 s,功率为 100 W,持续 5 min~10 min,4 °C 12 000 rpm 离心 10 min,取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析.

蛋白纯化时,将 100 mL 诱导表达的菌体重悬于 Tris 缓冲液中,加入 PMSF(终浓度为 1 mmol/L)冰水浴中超声破碎,程序为超声 5 s,停 10 s,功率为 300 W,持续 40 min~50 min,然后 4 °C 12 000 rpm 离心 10 min,取上清,用 Glutathione Agarose 进行纯化(步骤参考说明书),纯化过程中每步预留液体进行 SDS-PAGE 分析.

2 结果

2.1 原核表达质粒的构建

PP2A B56 α 调节亚基 cDNA 扩增片段为 1 461 bp(图 1A),连入载体 pGEX-4T-1,菌落 PCR 结果 2#、3#、5#~10#均与目的条带大小符合(图 1B),选取 5#~8#进行质粒小提,跑胶,条带位置与预期相符(图 1C),将 5#~8#提取的质粒,进行双酶切鉴定,重组质粒酶切片段与预期相符(如图 1D),5#~8#经测序证实读码框架正确,命名为 pGEX-4T-1-B56 α (图 2).

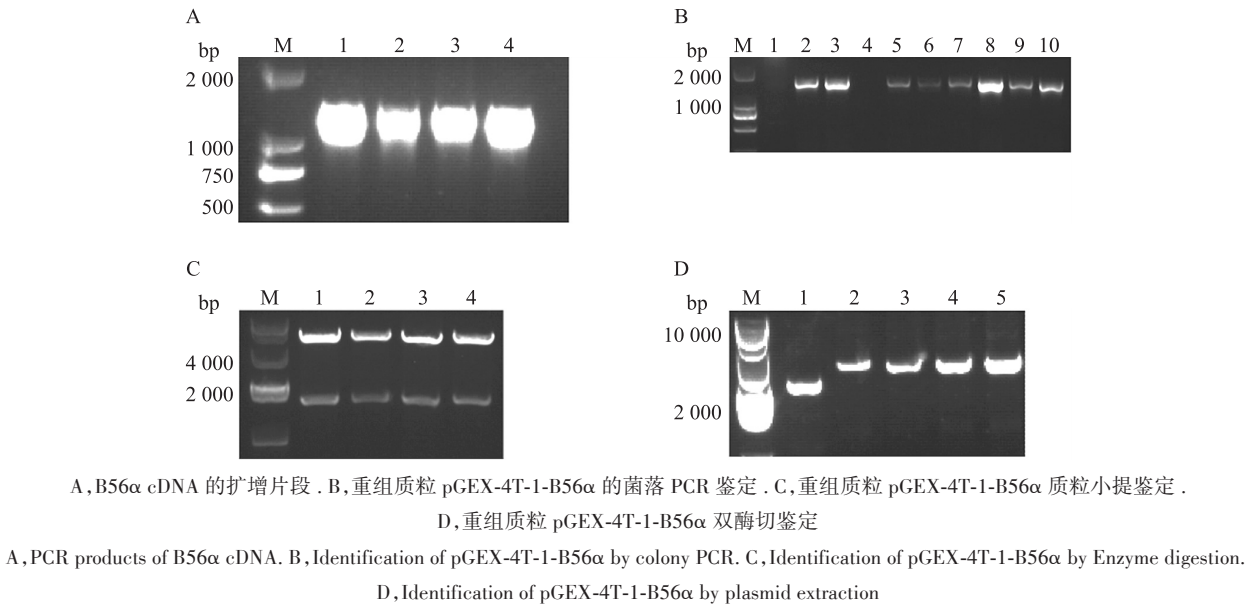


图1 重组质粒pGEX-4T-1-B56α的构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of pGEX-4T-1-B56α recombinant plasmid

2.2 重组蛋白的表达和鉴定

转化空载质粒 pGEX-4T-1 和重组质粒 pGEX-4T-1-B56α 到大肠杆菌 BL21(DE3)中,摇菌培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时,加入 1 mmol/L 的 IPTG,37 ℃诱导表达 4 h,对照组不加,收集菌体,处理后进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 3A 所示,在 72 KD 处有一明显的蛋白条带,而对照组均没有.菌液经 IPTG 诱导表达后,进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜上,与 GST 单克隆抗体结合,再结合 HRP 标记的二抗后,TMB 避光显色,进行蛋白印记分析,结果显示在约 72 KD 处有一明显的条带(图 3B),从而证明 B56α-GST 融合蛋白表达成功.

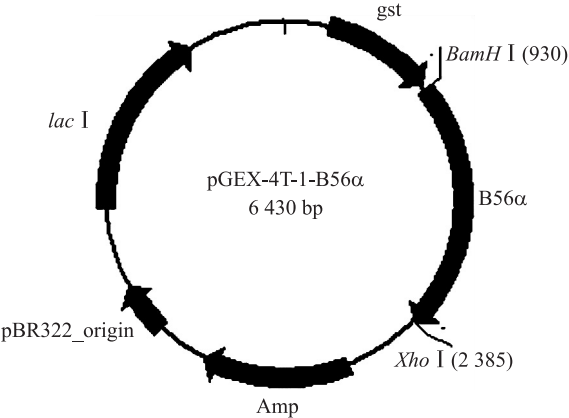


图2 重组质粒pGEX-4T-1-B56α的质粒图谱

Fig.2 The map of pGEX-4T-1-B56α recombinant plasmid

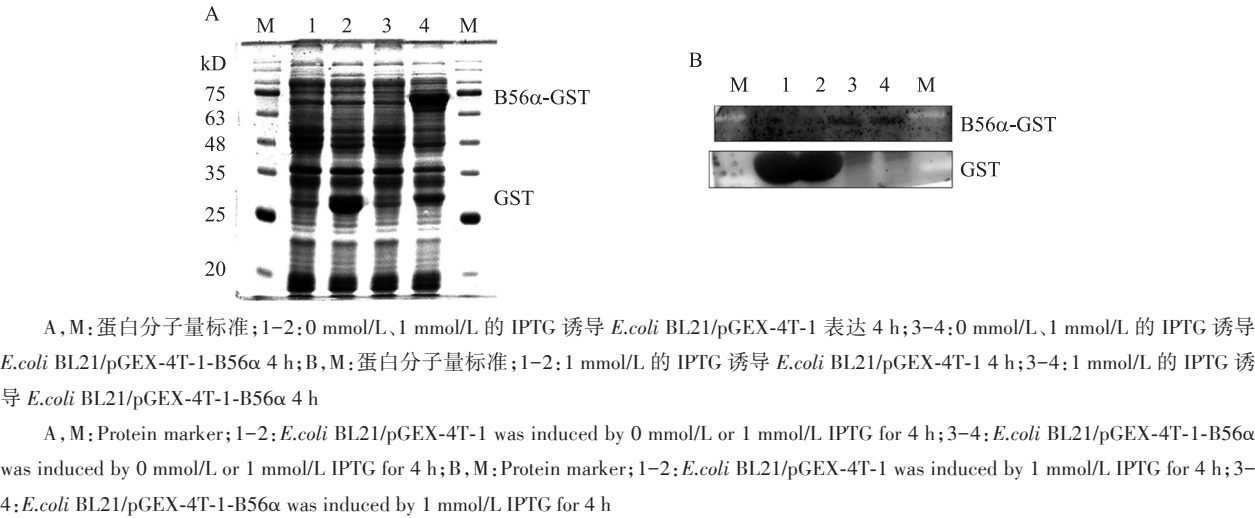
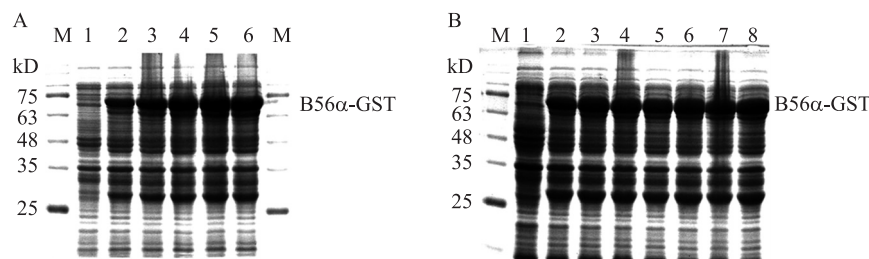


图3 重组蛋白的表达分析和免疫印迹鉴定

Fig.3 Analysis of recombinant protein expression and Western Blot

2.3 重组蛋白的条件优化

转化重组质粒 pGEX-4T-1-B56 α 的 BL21(DE3) 经 1 mmol/L IPTG 诱导不同时间(0、2、4、6、8、10)h, 收菌进行 SDS-PAGE 电泳, 发现 8 h 后重组蛋白的表达量无明显变化(图 4A), 因此固定诱导时间为 8 h, 不同浓度的 IPTG(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0)mmol/L 诱导蛋白表达, 发现重组蛋白的表达量没有显著差异(如图 4B). 因此, 选用 0.01 mmol/L 的 IPTG 在 37 °C 诱导 8 h 来获得重组蛋白.



A, M: 蛋白分子量标准; 1-6: 1 mmol/L IPTG 诱导 *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α 表达(0、2、4、6、8)h; B, M: 蛋白分子量标准; 1-8: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α 分别经(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2)mmol/L IPTG 诱导 8 h

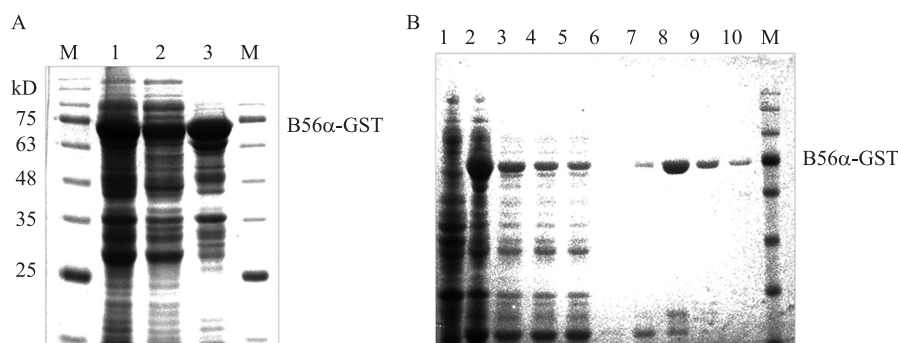
A, M: Protein marker; 1-6: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α was induced by 1mmol/L IPTG for(0、2、4、6、8)h; B, M: Protein marker; 1-8: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α was induced by(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2)mmol/L IPTG for 8 h

图4 不同诱导时间和不同浓度 IPTG 对蛋白表达的影响

Fig.4 The effect of induced time and IPTG concentration on protein expression

2.4 重组蛋白的可溶性分析及纯化

根据条件的优化, 转化重组质粒的菌株在 37 °C 0.01 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后, 超声破碎, 取上清和沉淀分别电泳, 发现目的蛋白大量表达, 在上清和沉淀中都有(图 5A). 在此条件下, 大量诱导, 收集 100 mL 的菌液, 超声破碎, 离心后取细胞破碎液上清, 将其通过柱进行纯化, 按顺序依次加入: 细胞破碎液上清, 第一次上柱样品流出液, 漂洗缓冲液, 洗脱缓冲液 E1-4, 并分别收集过柱后的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 加入洗脱缓冲液 E2 后条带非常明显, 且较单一. 最后得到纯度约为 78.9% 重组蛋白, 回收率达到 52.2%(图 5B).



A, M: 蛋白分子量标准; 1: 0.01 mmol/L IPTG 诱导 *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α 表达 8 h; 2: 上清; 3: 沉淀; B, 1: IPTG 诱导 *E. coli* BL21/pGEX-4T-1 表达 8 h; 2: IPTG 诱导 *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α 表达 8 h; 3: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α 诱导 8 h 超声破碎后上清; 4: 第一次上柱样品流出液; 5: 第二次上柱样品流出液; 6: 加入漂洗缓冲液流出液; 7-10: 加洗脱缓冲液样品流出液

A, M: Protein marker; 1: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α was induced by IPTG for 8 h; 2: Supernatant; 3: Pellet; B, 1: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1 was induced by IPTG for 8 h; 2: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α was induced by IPTG for 8 h; 3: Supernatant of *E. coli* BL21/pGEX-4T-1-B56 α induced by IPTG after sonication; 4: Flowthrough(1); 5: Flowthrough(2); 6: Wash fraction; 7-10: Eluate

图5 重组蛋白的可溶性分析及纯化

Fig.5 Soluble analysis of the recombinant protein and purification

3 讨论

大肠杆菌系统是表达许多外源蛋白的首选系统, 其遗传背景清晰、容易培养、价格低廉, 能够对外源蛋白进行高水平表达. 但是大肠杆菌不能够对蛋白进行糖基化修饰, 其胞质是一个相对还原的环境, 不利于二硫键的形成, 其中表达的蛋白大多没有折叠, 易形成不溶解的包涵体, 需要进行变复性处理. 同时影

响蛋白表达速度的因素也会影响蛋白的折叠,如温度、诱导剂浓度和摇床转速等。pGEX-4T-1 是一个相对成熟的原核表达载体,带有 GST 标签,在 IPTG 的诱导下能够表达 GST 融合蛋白,可以通过 Glutathione Agarose 亲和纯化,GST 融合于蛋白的 N 端一般不会影响蛋白的活性,因此大多纯化后不需要去除。

本研究将目的序列置于大肠杆菌表达载体 pGEX-4T-1 GST-tag 下游,成功构建了 PP2A B56 α 调节亚基的原核表达载体并诱导其表达。优化表达条件发现 1 mmol 的 IPTG 诱导 8 h 后,重组蛋白的表达量趋于稳定,不同浓度的 IPTG 诱导 8 h 后,重组蛋白的表达量并没有显著差异。在 0.01 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后,菌体超声破碎,发现重组蛋白表达量很高并且在上清和沉淀中都存在。表明 B56 α 一部分可溶性的存在于上清中还有一部分以包涵体的形式存在。这可能是由于 B56 α 含有 487 个氨基酸,分子量过大而且 B56 α 表达速度很快,一部分蛋白没有来得及正确折叠而以包涵体的形式存在,B56 α 中含有的半胱氨酸很少,所以在大肠杆菌中表达时应该不会因为无法正确折叠形成二硫键而产生包涵体。在后续的实验中,可以通过低温诱导减少包涵体的形成。上清中可溶的 B56 α 的量很丰富,足够用来进行纯化,大量诱导表达重组蛋白进行纯化,洗脱样品中出现很单一的条带即 B56 α -GST,得到纯度约为 78.9%的重组蛋白。

以往的研究中,在大肠杆菌中表达大于 100 个氨基酸残基的胞质蛋白就很困难,这些蛋白质常常不稳定或形成包涵体,难以纯化出来,在本研究中,通过条件的优化,在大肠杆菌中成功表达含有 487 个氨基酸的 B56 α ,其大部分以可溶的形式稳定存在于上清中,并纯化得到纯度很高的蛋白,为后续实验打下良好的基础。

[参考文献]

- [1] JANSSENS V, GORIS J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling[J]. *Biochemical journal*, 2001, 353(Pt 3): 417-439.
- [2] SONTAG E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling[J]. *Cellular signalling*, 2001, 13(1): 7-16.
- [3] VIRSHUP D M. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes[J]. *Current opinion in cell biology*, 2000, 12(2): 180-185.
- [4] DEGRANDE S T, LITTLE S C, NIXON D J, et al. Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart[J]. *Journal of biological chemistry*, 2013, 288(2): 1 032-1 046.
- [5] MCCRIGHT B, RIVERS A M, AUDLIN S, et al. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm[J]. *Journal of biological chemistry*, 1996, 271(36): 22 081-22 089.
- [6] GIGENA M S, ITO A, NOJIMA H, et al. A B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A localizes to nuclear speckles in cardiomyocytes[J]. *Ajp heart & circulatory physiology*, 2005, 289(1): H285-H294.
- [7] MCCRIGHT B, VIRSHUP D M. Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits[J]. *Journal of biological chemistry*, 1995, 270(44): 26 123-26 128.
- [8] JORDI H, MATTHIAS D, ALI E A, et al. Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart[J]. *Journal of molecular & cellular cardiology*, 2013, 64(5): 90-98.
- [9] NEUMANN J, ESCHENHAGEN T, JONES L R, et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure[J]. *Journal of molecular & cellular cardiology*, 1997, 29(1): 265-272.
- [10] UWE K, ALEXANDER H, SIMONE K, et al. Protein phosphatase 2A is regulated by PKC α -dependent phosphorylation of its targeting subunit B56 α at Ser41[J]. *Journal of biological chemistry*, 2014, 289(1): 163-176.
- [11] LITTLE S C, CURRAN J, MAKARA M A, et al. Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 α limits phosphatase activity in the heart[J]. *Science signaling*, 2015, 8(386): ra72.

[责任编辑:黄 敏]