

人 P53 的原核表达及包涵体复性研究

刘 慧, 张守涛, 郭亚楠

(郑州大学 生命科学学院, 郑州 450001)

摘 要:通过检测血清中 p53 蛋白及其抗体变化诊断肿瘤的 ELISA 试剂盒的研发需要大量制备 p53 蛋白. 本研究通过构建人野生型 p53 基因的原核表达质粒 pET-32a-p53, 在大肠杆菌中诱导表达得到 p53 包涵体蛋白, 经包涵体变性、亲和纯化、复性得到可溶 p53 蛋白. 发现利用 8M 尿素对包涵体进行变性溶解, 经镍柱亲和纯化得到纯度超过 95% 的变性蛋白. 尝试透析复性、稀释复性和柱上复性 3 种方法分别对 p53 变性蛋白进行复性. 结果表明透析复性的复性率最高, 这为原核表达制备 p53 提供了一种参考. 本研究为 ELISA 法检测血清中 p53 蛋白及其抗体诊断肿瘤相关试剂盒研发奠定了基础.

关键词: p53; 包涵体; 透析复性; 稀释复性; 柱上复性

中图分类号: Q816

文献标志码: A

p53 基因是被广泛研究、也是突变率最高的抑癌基因. 在所有人类恶性肿瘤中, 50% 以上出现了 p53 基因的突变^[1]. 人类 p53 基因位于染色体 17p13.1, 含有 11 个外显子和 10 个内含子, 其产物是包含 393 个氨基酸残基的转录激活蛋白. p53 基因的大多数突变位点集中在 5~8 外显子^[2]. 生理条件下, 野生型 p53 通过调控细胞周期、参与损伤 DNA 修复和诱导细胞凋亡等, 发挥着抑制损伤 DNA 堆积、保持细胞基因组稳定及调节细胞增殖分化及凋亡等功能, 抑制了肿瘤的发生. 相反, 突变型 p53 则具有原癌基因的功能, 可促进肿瘤的发生、发展^[3]. 野生型 p53 蛋白半衰期很短, 表达后很快被降解; 突变型 p53 蛋白其半衰期较长, 可在肿瘤组织、血液中积累, 并能进一步诱发机体免疫系统产生抗 p53 抗体. 因而通过 ELISA 法检测血清中 p53 蛋白及其抗体的变化可用来初步诊断肿瘤^[4]. ELISA 检测方法的基础在于得到可溶性的重组蛋白, 进而制备高特异性、高亲和力的抗体. 结构上, 野生型 p53 蛋白 N 末端和 C 末端暴露在分子表面, 中央区由两个反向平行的 β -片层形成一种紧密的“三明治”结构, 易形成二聚体和四聚体^[5]; 突变后的 p53 中央区结构紧密、高度疏水, 致使原核表达 p53 很容易形成包涵体. 本研究通过 3 种不同的复性方法对原核细胞表达的 p53 包涵体进行复性, 以期找到最佳的复性方式, 建立大量制备 p53 复性蛋白的方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

人野生型 p53 基因由北京赛百盛公司合成. 原核表达载体 pET-32a、大肠杆菌感受态细胞 TG-1、BL21 (DE3) 由本研究室制备保存. 质粒提取试剂盒, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 鼠抗人 p53 抗体, HRP 标记抗鼠抗体购自上海生工, T4 DNA 连接酶, 核酸内切酶 BamH I、Xho I, 蛋白、DNA Marker 购自日本 Takara 公司, 镍柱填料及预装柱购自美国 GE, 其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 实验方法

收稿日期: 2016-04-13; 修回日期: 2016-06-10.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31501094); 河南省基础与前沿技术研究项目(152300410032).

第 1 作者简介: 刘 慧(1990-), 女, 河南中牟人, 郑州大学硕士研究生, 研究方向为生物工程, E-mail: 2941308025@qq.com.

通信作者: 郭亚楠(1983-), 男, 河南沈丘人, 郑州大学讲师, 博士, 主要从事分子免疫学、抗体制备及免疫诊断检测技术研究, E-mail: guoyn@zzu.edu.cn.

1.2.1 p53 原核表达载体的构建

根据人野生型 p53 基因序列设计上下游引物,序列分别为:上游引物 F:5'GATATCGGAATTAATTC GGATCCGATGGAAAATCTG TATTTTCAGGG 3',下游引物 R:5'GCTGGCTAGCCCGTTTGAT CTCGAGGTCTGAATCCGGACCTTCC3',引物中下划线序列为酶切位点. PCR 扩增 p53 基因后通过琼脂糖凝胶回收 PCR 产物;用 BamH I 和 Xho I 双酶切 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a,胶回收酶切产物;随后通过 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接酶切产物过夜. 将连接产物转化至 TG-1 感受态细胞,37 °C 过夜培养. 菌落 PCR 挑取阳性克隆,双酶切鉴定后通过测序检验 p53 基因序列准确性.

1.2.2 p53 在大肠杆菌中的表达

将阳性质粒转化至原核表达菌株 BL21(DE3)中,用 IPTG 37 °C 诱导 4 h 后离心收集沉淀, PBS 重悬后超声破碎,离心收集上清、沉淀, SDS-PAGE 检测 p53 的表达,同时通过 Western Blotting 鉴定 p53.

1.2.3 p53 包涵体变性溶解

离心收集表达菌沉淀, PBS 重悬后超声破碎,然后离心收集沉淀. 用含 2% TritonX-100 的 Tris-Cl 缓冲液(50 mM, pH 8.0, 100 mM NaCl)洗涤沉淀两次,然后采用含 8 M 尿素的 Tris-Cl 缓冲液 4 °C 过夜溶解沉淀. 离心收集上清, SDS-PAGE 检测.

1.2.4 亲和层析纯化 p53

通过镍柱亲和层析纯化 p53. 包涵体溶解液过滤后进行亲和层析,结合缓冲液用 Tris-Cl 缓冲液,洗脱时用含 5%、10%、15%、20% 或 30% 咪唑的 Tris-Cl 缓冲液分别洗脱并收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测.

1.2.5 包涵体复性

1.2.5.1 透析复性

透析复性时,首先探索不同浓度尿素和不同的 pH 值对复性的影响. 发现尿素浓度为 2 M、pH 在 8~9 之间时,复性效果最佳. 用含 2 M 尿素的 Tris-Cl 缓冲液(pH 8.5)透析复性可溶性蛋白时,在 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h 取样测蛋白浓度并保留样品;接着透析除去尿素和咪唑,并在透析 12 h、24 h 取样测蛋白浓度并保留样品, SDS-PAGE 检测.

1.2.5.2 稀释复性

稀释复性时采用静脉滴注装置控制滴速,将亲和纯化后的重组蛋白缓慢滴至 2 倍体积的含 2 M 尿素的 Tris-Cl 缓冲液中,4 °C 搅拌 6 h 后取样测蛋白浓度,随后透析除去尿素和咪唑,并在透析 12 h 取样测蛋白浓度,超滤浓缩后 SDS-PAGE 检测.

1.2.5.3 柱上复性

柱上复性时,大致与纯化步骤相同,只是多了尿素洗涤步骤. 具体来说沉淀溶解液和镍柱填料于 4 °C 孵育过夜,离心收集镍柱填料转移至简易重力层析柱,然后每隔 2 h 更换含不同浓度尿素的复性溶液,使尿素浓度由 8 M 逐渐降低到 2 M. 随后使用 Tris-Cl 缓冲液除去非特异性结合蛋白,最后用含咪唑的 Tris-Cl 缓冲液洗脱 3 次,每次间隔 10 min 4 °C 放置,收集洗脱液,随后置于 PBS 缓冲液中透析除去咪唑和尿素,测蛋白浓度, SDS-PAGE 检测.

2 结果

2.1 人 p53 原核表达载体构建与鉴定

从 NCBI 数据库中查到人 p53 基因序列,然后委托公司合成全长基因(约 1300 bp). 进一步通过 PCR 扩增 p53 基因,产物经琼脂糖凝胶电泳后显示大小为 1300 bp,与预期值相符(图 1). 胶回收 PCR 产物、表达载体 pET-32a 经双酶切、T4 连接酶连接后构建 pET-32a-p53 重组质粒,重组质粒转化感受态细胞 TG-1,培养后挑取阳性单克隆质粒进行酶切,酶切产物电泳,结果显示酶切产物大小与预期值相符(图 1). 选取阳性克隆进行测序鉴定,测序结果与 NCBI 数据库中的序列一致,确定重组表达载体 pET-32a-p53 构建正确.

2.2 人 p53 融合蛋白的诱导表达及鉴定

将质粒 pET-32a-p53 转化至表达菌 BL21(DE3)中,尝试在不同温度,不同浓度 IPTG 条件下诱导重组

蛋白表达,发现 p53 始终以包涵体形式存在. 选定 37 °C、0.5 mM IPTG 诱导 4 h 大量制备 p53. 菌液离心后收集沉淀, PBS 重悬后超声破碎, 离心收集沉淀, SDS-PAGE 检测, 同时通过 Western Blotting 鉴定(图 2). 结果证实, 人重组蛋白 p53 成功在大肠杆菌中表达.

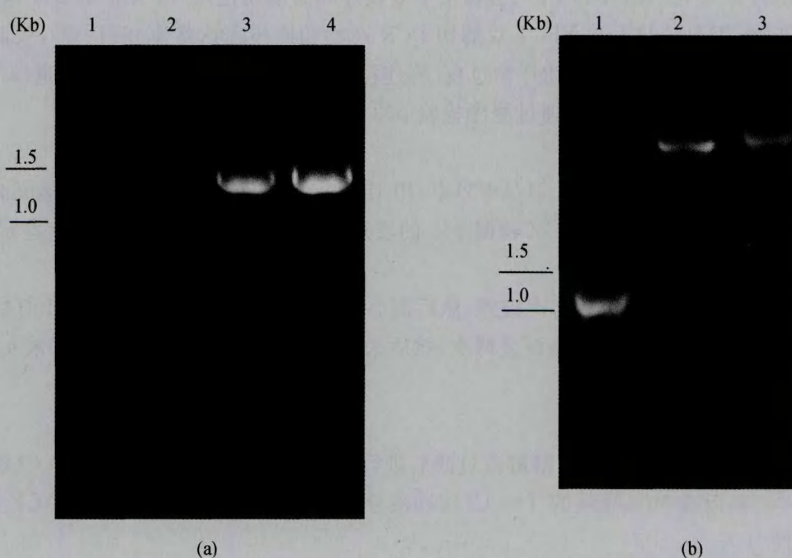


图1 (a).PCR 扩增p53基因; 1.DNA marker; 3、4.PCR扩增p53基因.(b) pET-32a-p53重组质粒双酶切鉴定.1.Marker; 2.双酶切质粒pET-32a-p53; 3.质粒pET-32a-p53.

2.3 人 p53 融合蛋白的纯化

超声破碎表达菌后离心收集包涵体沉淀. 先用含 2% TritonX-100 的洗涤液洗涤除去部分杂质, 然后采用 8 M 尿素, 4 °C 搅拌过夜充分溶解包涵体蛋白沉淀; 第二天离心收集上清, SDS-PAGE 检测分析包涵体蛋白变性溶解状况(图 3). 结果显示大部分包涵体蛋白变性溶解. 将包涵体溶解液过滤后, 通过镍亲和层析预装柱纯化 p53; 收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测 p53 纯度(图 3). 结果显示得到高纯度的 p53, 图中分子量较高的条带被证实为 p53 多聚体.

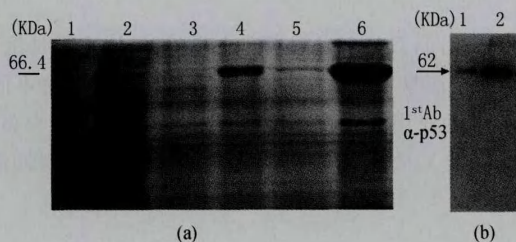


图2 (a)SDS-PAGE检测p53表达; 1.Marker;2.空菌对照;3.无IPTG全菌;4.诱导全菌;5.破碎上清;6.破碎沉淀;(b)Western blotting检测p53; 1.诱导全菌;2.破碎沉淀.

2.4 人 p53 蛋白的复性

2.4.1 透析复性

透析复性时, 透析液选用含 2M 尿素的 Tris-Cl 缓冲液(pH 8.5), 每 3 h 更换一次透析液. 透析结束后在 PBS 缓冲液中透析除去尿素和咪唑. 在选定的时间点, 检测溶液的总蛋白, 通过分析总蛋白的变化检测复性效率. 进一步, 取等体积蛋白溶液 SDS-PAGE 检测, 以验证复性效率(图 4). 结果显示, 人 p53 蛋白透析复性效率高达 64%.

2.4.2 稀释复性

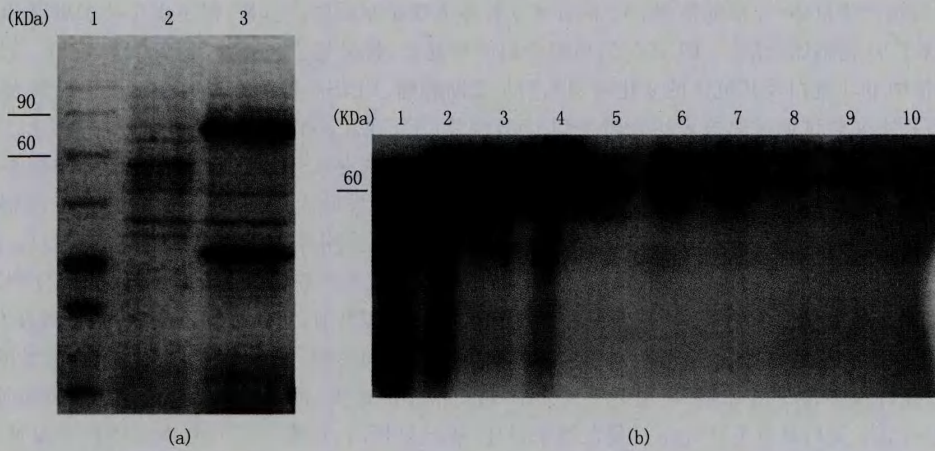


图3 (a) p53包涵体的变性溶解. 1. Marker; 2. 包涵体溶解后剩余沉淀; 3. 包涵体溶解上清; (b) p53的纯化. 1. Marker; 2. 包涵体溶解上清; 3. 包涵体溶解后沉淀; 4. 穿出色液; 5. 洗涤液; 6. 5%咪唑洗脱液; 7. 10%咪唑洗脱液; 8. 15%咪唑洗脱液; 9. 20%咪唑洗脱液; 10. 50%咪唑洗脱液.

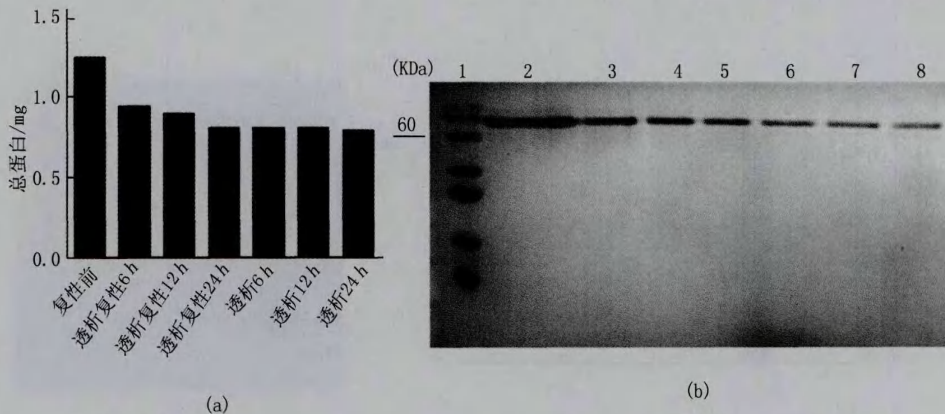


图4 (a) 透析复性不同时间点p53总蛋白; (b) SDS-PAGE检测p53蛋白 1. Marker; 2. 复性前蛋白; 3. 透析复性6 h蛋白; 4. 透析复性12 h蛋白; 5. 透析复性24 h后蛋白; 6. 复性后PBS透析6 h蛋白; 7. 复性后透析12 h后蛋白; 8. 复性后透析24 h蛋白.

稀释复性时将亲和纯化后的变性蛋白缓慢滴至 2 倍体积的复性液中, 4 °C 缓慢搅拌, 复性结束后透析除去尿素和咪唑, 最后超滤浓缩 p53 蛋白. 通过分析复性前后 p53 总蛋白量的变化检测稀释复性的复性效率. 进一步, 取等体积蛋白溶液 SDS-PAGE 检测, 以验证复性效率(图 5). 结果显示, 人 p53 蛋白稀释复性的复性效率仅为 3%.

2.4.3 镍柱亲和层析复性

包涵体溶解液和镍柱填料于 4 °C 孵育过夜, 离心收集镍柱填料转移至简易重力层析柱, 然后逐渐降低尿素浓度到 2 M 使蛋白复性, 20 mM 咪唑洗去非特异性结合蛋白后洗脱收集目标蛋白. 最后置于 PBS 缓冲液中透析除去咪唑和尿素. 通过分析复性前后 p53 总蛋白量的变化检测柱上复性的复性效率. 进一步, 取等体积蛋白 SDS-PAGE 检测, 以验证复性效率(图 6). 结果显示, 人 p53 蛋白镍柱亲和层析复性的复性效率为 11.5%.

3 讨 论

p53 基因是目前研究最为广泛和深入的抑癌基因, 人类恶性肿瘤中至少有 50% 发生了 p53 基因的突变. P53 基因的突变常导致 p53 蛋白表达增多、半衰期延长, 与肿瘤的发生和发展都存在有密切关联, 也会激发

机体免疫系统产生抗体^[6]. 目前检测 p53 是否突变首要方法是基因测序分析, 但是由于技术难度和费用问题使得它很难广泛在临床开展^[7]. ELISA 法检测蛋白简单易行、特异性强, 适合广泛开展和应用. 通过 ELISA 法检测血清中 p53 蛋白及其抗体的变化可用来初步诊断肿瘤. ELISA 检测方法的基础在于得到大量可溶性的重组蛋白. 本文尝试通过原核表达人野生型 p53, 构建 pET-32a-p53 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导 p53 表达, 结果显示蛋白表达量很高但主要以包涵体的形式存在. 溶解 p53 蛋白包涵体时探索了不同浓度尿素对包涵体溶解效果的影响, 发现 8 M 尿素溶解包涵体效果最佳, 故采用含 8 M 尿素的溶解液对 p53 蛋白包涵体进行变性溶解. 由于 p53 融合蛋白带有 His 标签, 可采用镍-柱亲和和层析纯化 p53 蛋白. 洗脱目标蛋白时, 5% 咪唑洗脱时开始出现目的蛋白, 增高至 30% 咪唑洗脱时洗脱完毕. 变性复性时, 分别用透析复性、稀释复性和柱上复性 3 种复性方法对变性蛋白进行复性. 在复性时, 蛋白浓度不宜过高, 一般在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右为宜, 否则易出现沉淀. 分析对不同尿素对复性效果的影响, 发现 2 M 尿素的综合复性效果最佳. 因此, 蛋白复性液中含 2 M 尿素. 在用透析复性时, 透析液不能过少, 否则复性不完全且易出现沉淀. 透析复性 12 h 左右 p53 蛋白基本复性完全且复性效率很高. 稀释复性时, 探索了不同复性液体积对复性效果的影响. 发现当蛋白浓度在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右时, 用 2 倍变性蛋白溶液体积的复性液稀释复性 6 h 可使蛋白复性且不出沉淀, 但蛋白易降解, 复性率较低. 柱上复性时, 复性率也较低. 综合比较 3 种复性方法, 透析复性操作简便且复性率高, 这为原核表达制备 p53 提供了一种参考. 本研究为 ELISA 法检测血清中 p53 蛋白及其抗体诊断肿瘤相关试剂盒研发奠定了基础.

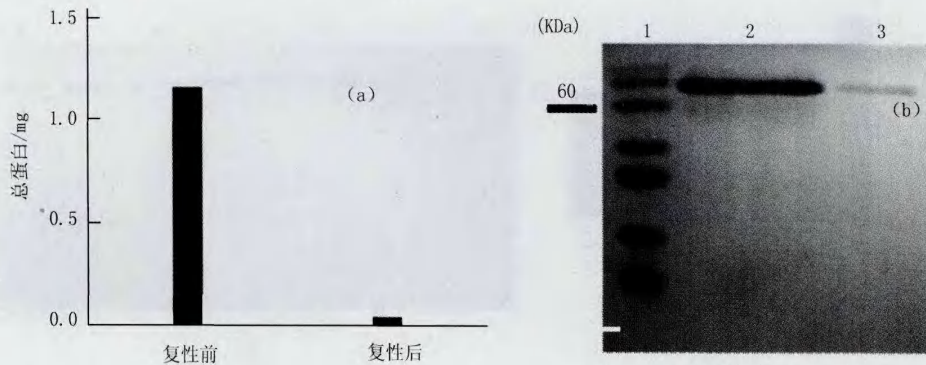


图5 (a) 稀释复性前后p53总蛋白量; (b) SDS-PAGE检测p53蛋白. 1. Marker; 2. 复性前蛋白; 3. 复性后蛋白.

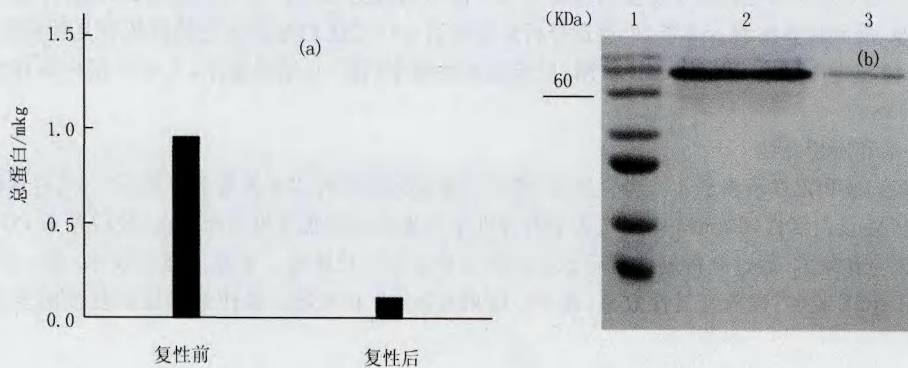


图6 (a) 镍柱亲和和层析复性前后p53总蛋白量; (b) SDS-PAGE检测p53蛋白. 1. Marker; 2. 复性前蛋白; 3. 复性后蛋白.

参 考 文 献

- [1] Muller P A J, Vousden K H. p53 mutations in cancer[J]. Nat Cell Biol,2013,15:2-8.
- [2] Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities[J]. Cancer Cell,2014,25:304-317.
- [3] Kim M P, Zhang Y, Lozano G. Mutant p53: Multiple mechanisms define biologic activity in Cancer[J]. Front Oncol,2015,5:249
- [4] Park Y, Kim Y, Lee JH, et al. Usefulness of serum anti-p53 antibody assay for lung cancer diagnosis[J]. Arch Pathol Lab Med,2011, 135(12):1570-1575
- [5] 湛 芳,吴 意,林 雪. p53 功能的多效性[J]. 基础医学与临床,2015,35(12):1672-1676.
- [6] 缪明永. P53 突变或缺失与肿瘤代谢重编程[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志,2014,1(2):26-30.
- [7] Kantorova B, Malcikova J, Smardova J, et al. TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia: comparison of different detection methods[J]. Tumor Biology,2015,36(5):3371-3380.

Expression, Purification and Renaturation of Human P53

LIU Hui, ZHANG Shoutao, GUO Yanan

(School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The preparation of p53 protein was foundation of the development of ELISA kit to diagnose tumor by detection of serum p53 protein and its antibody. Through construction of p53 prokaryotic expression vectors pET-32a-p53, induced the expression, denaturation of inclusion bodies, purification, and renaturation, soluble recombinant protein of p53 was produced. Results showed denatured protein of p53 more than 95% purity was got through the denaturation of the inclusion bodies with 8M urea, purified by Ni-affinity chromatography. To renature it, Ni-NTA affinity renaturation, dilution renaturation, and dialysis renaturation were used, in which dialysis renaturation came to the best result. The study provides a reference which p53 was prepared by the expression of prokaryotic organism and lays foundation of the development of ELISA kit to diagnose tumor by detection of serum p53 protein and its antibody.

Keywords: p53; inclusion body; dialysis renaturation; dilution renaturation; Ni-NTA affinity renaturation