

人甲胎蛋白 AFP 在大肠杆菌中表达和鉴定

李振东¹, 谷华玮¹, 王海鹰², 陈淑仪¹, 宁正祥², 王菊芳¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究通过应用基因工程技术, 重组构建编码人全长甲胎蛋白 AFP 基因的原核表达载体 pET22b-AFP, 并将其转化到大肠杆菌宿主菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达目的蛋白 AFP。采用 PCR 法扩增编码 AFP 蛋白的 cDNA 序列片段, 并将其克隆到含有 His-tag 的 pET22b 原核表达载体上; 重组质粒经双酶切及测序鉴定正确后转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行 IPTG 诱导表达; 对诱导过程中不同浓度的 IPTG 和不同的温度进行优化; 选定最佳的优化条件进行诱导表达目的蛋白; SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 法鉴定表达产物。结果表明, 通过 PCR 扩增技术获得了编码 AFP 蛋白的基因片段; 重组质粒经双酶切和基因测序等方法鉴定后, 确认了重组质粒已经构建成功; 表达产物通过利用 SDS-PAGE 和 Western Blot 法检测到在 66 kDa 附近出现条带, 与预期值相符, 表明重组 AFP 蛋白已成功表达。

关键词: 人甲胎蛋白; 蛋白质印迹法; 重组表达

文章编号: 1673-9078(2013)10-2415-2419

Expression and Identification of Human Alpha Fetoprotein in *E. coli*

LI Zhen-dong¹, GU Hua-wei¹, WANG Hai-ying², CHEN Shu-yi¹, NING Zheng-xiang², WANG Ju-fang¹

(1. School of Bioscience & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, through the application of genetic engineering techniques, the prokaryotic expression vector pET22b-AFP of full-length human alpha-fetoprotein AFP gene was recombined, constructed, encoded, and then transformed into *E. coli* host strain BL21 (DE3) to induce the expression of the target protein AFP. AFP coding sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and then cloned into the prokaryotic expression vector pET-22b containing His-tag. The constructed vector, verified by restriction endonuclease digestion and DNA sequencing, was then transformed into *E. coli* host strain BL21 (DE3) for expression by using IPTG-inducible promoters. Different concentrations of IPTG and different temperatures were optimized to induce the expression of target protein. Expression products were identified by SDS-PAGE electrophoresis and Western Blot. The results showed that AFP gene fragments were obtained by PCR amplification. By double enzyme digestion and gene sequencing methods, it was confirmed that the recombinant plasmid was constructed successfully. Expression product was revealed in the vicinity of the 66 kDa band by using SDS-PAGE and Western Blot., which was consistent with the expected value indicating that the recombinant AFP protein succeeded in expressing.

Key words: Alpha Fetoprotein; western blotting; gene expression

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是在胚胎期由肝细胞、卵黄细胞以及胃肠道细胞产生的一种糖蛋白, 是胚胎血清的主要成分, 具有复杂的生物学功能, 在临床上被认为是肝癌的经典肿瘤标记物, 被当作诊断肝癌的金标准^[1-2], 在疾病诊断方面起到了重要作用。

甲胎蛋白作为胞外增强和抑制细胞生长和分化功

收稿日期: 2013-06-09

基金项目: 卫生部重大新药创制项目(2012ZX09506-001), 新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-10-0399), 中国博士后科学基金面上资助项目(2012M521593)

作者简介: 李振东(1987-), 男, 硕士, 从事生物化学与分子生物学研究

通讯作者: 王海鹰(1983-), 女, 博士, 博士后, 主要研究领域为细胞生物学

能的双向调节因子, 通过AFP的相对浓度, 刺激或抑制细胞的生长活性, 在卵巢、子宫、胎盘、表皮、内皮、肝脏、乳腺、淋巴、睾丸和某些肿瘤细胞中参与调节作用^[3-8]。在肝癌患者体内, 异常表达的AFP也起到了抑制免疫的作用, 抑制肝癌患者T淋巴细胞免疫应答, 诱导T淋巴细胞凋亡, 以有利于肿瘤的生长^[7]; AFP还可以利用与细胞凋亡相关的肿瘤坏死因子(TNF)保护人肝癌细胞, 并通过阻断细胞凋亡途径帮助肿瘤细胞从淋巴细胞攻击中逃脱, 以促进肿瘤细胞生长、增殖, 血管生成和抑制肿瘤细胞凋亡^[8-10]。另外, 人甲胎蛋白(FL-AFP)还可通过与其他蛋白质发生聚合, 如核受体(即维甲酸受体)、转录因子等等, 促进肿瘤细胞的生长^[11-12]。研究结果表明细胞外的AFP能与其受体结

合,介导生长信息的传递;细胞内的AFP不仅能抑制凋亡信号的转导,而且也能促进生长信号的传递,这是AFP具有抗凋亡和促进增殖功能的新发现,该研究结果赋予AFP新功能的认识和寻找到治疗肝癌的新靶点^[3]。但是由于先前天然甲胎蛋白的来源及数量的限制,AFP生物学机制的深入研究一直停滞不前;而重组DNA技术合成甲胎蛋白研究的逐步发展,极大推动了AFP结构与功能的研究,为探索其在自身免疫性疾病中的治疗潜力,寻找原发性肝癌有效的诊断与治疗方法提供了有力的保证。

1997年Boismenu等人^[4]成功地建立了一个高效地可大量获得重组AFP的大肠杆菌表达系统,并且对表达量及其影响因素、重组蛋白纯化和特性进行了详细的分析,为以后重组AFP的相关研究起到了重要作用。重组AFP的生物活性通过天然AFP与重组AFP抑制人类淋巴细胞增殖的体外对比试验进行评估,结果可以证明纯化后的蛋白依然同天然蛋白一样具有生物活性。

本研究尝试利用大肠杆菌表达体系重组表达人AFP,成功构建了pET22-AFP原核表达质粒,并且实现了人AFP的重组表达,这将为其在疾病诊断方面以及疾病诊断治疗方面的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

AFP的cDNA序列由复能基因公司(广州)提供。大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)和质粒pET22b为本实验室保藏。Primer Star, Nco I和Xho I, T4连接酶均购自Takara公司。质粒小提试剂盒, PCR产物纯化试剂盒购自TIANGEN公司。抗His-tag抗体购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增

以复能公司提供的质粒B01-AFP(69 ng/ μ L)为模板,用含高保真酶的PCR预混液Primer star扩增目的基因,所用引物为:

AFP-F: CATG CCA TGG AGA ACA CTG CAT
AGA AAT GAA TA

AFP-R: CCG CTC GAG AAC TCC CAA AGC
AGC ACG

100 μ L PCR反应体系为: Premix Primes STAR 50 μ L; 模板 B01-AFP(稀释10倍)0.3 μ L; Primer F/R 1/1 μ L; ddH₂O 47.7 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 sec, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 48 s, 共30

个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增完毕后,通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用TIANGEN PCR产物纯化试剂盒进行纯化。

1.2.2 pET22b-AFP 表达质粒构建

分别对PCR产物和pET22b表达载体进行Nco I和Xho I双酶切后,回收目的片段与pET22b载体并进行连接,转化至大肠杆菌DH5 α 中,利用含氨苄霉素(100 μ g/mL)的LB抗性平板和菌落PCR初步筛选转化子。挑选阳性克隆送至华大基因公司测序鉴定。将鉴定完毕的表达质粒转入大肠杆菌BL21(DE3)中,获得相应的基因工程菌。

1.2.3 pET22b-AFP 的小量诱导表达和 Western Blot 鉴定

将pET22b-AFP工程菌过夜培养物接种于Amp^r LB液体培养基中,25 $^{\circ}$ C、250 r/min培养至OD_{600 nm}约为0.6时加入IPTG(终浓度0.1 mmol/L)诱导;继续培养4h至OD_{600 nm}达到1.5时,离心收集菌体。用裂解液重悬菌体后,使用超声破碎仪裂解菌体,制备SDS-PAGE电泳样品进行电泳检测。经SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉室温封闭2h,使用抗His-tag抗体孵育后TBST洗涤2次,进行ECL显色。

1.2.4 pET22b-AFP 小量表达诱导温度的优化

将pET22b-AFP工程菌过夜培养物接种于Amp^r LB液体培养基中,分别置于18 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C下250 r/min振荡培养。当OD_{600 nm}≈0.6时,加入IPTG(终浓度0.1 mmol/L)诱导;继续培养4h至OD_{600 nm}达到1.5时,离心收集菌体。用裂解液重悬菌体后,使用超声破碎仪裂解菌体,制备SDS-PAGE电泳样品进行电泳检测。

1.2.5 pET22b-AFP 小量表达IPTG诱导浓度的优化

将pET22b-AFP工程菌过夜培养物接种于Amp^r LB液体培养基中,25 $^{\circ}$ C、250 r/min培养至OD_{600 nm}约为0.6时加入不同浓度的IPTG(终浓度分别为0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L)诱导;继续培养4h至OD_{600 nm}达到1.5时,离心收集菌体。用裂解液重悬菌体后,使用超声破碎仪裂解菌体,制备SDS-PAGE电泳样品进行电泳检测。

1.2.6 pET22b-AFP 大量表达及纯化

将pET22b-AFP工程菌过夜培养物接种于1L Amp^r LB液体培养基中,25 $^{\circ}$ C、250 r/min培养至OD_{600 nm}约为0.6时加入IPTG(终浓度0.4 mmol/L)诱导;继续培养4h至OD_{600 nm}达到1.5时,离心收集

菌体。用裂解液重悬菌体，使用超声破碎仪裂解菌体，离心收集沉淀，用含有 2 M 尿素的洗涤液洗涤包涵体 2 次，用含有 8 M 尿素的变性液溶解包涵体，离心收集上清，过滤后经镍离子螯合亲和层析柱（5 mL His-Trap, GE）纯化，收集洗脱液。制备 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测后，收集目的蛋白进行透析复性。

2 结果与讨论

2.1 pET22b-AFP 表达质粒的构建



图 1 目的基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of AFP gene

注：M：DNAMarker；1：PCR 产物。

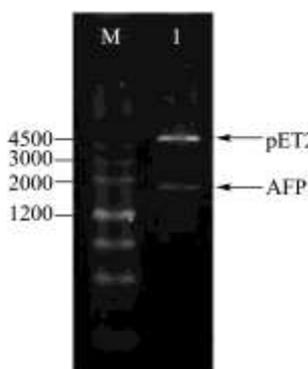


图 2 重组质粒双酶切检测结果

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by double enzyme digestion

注：M：DNAMarker；1：重组质粒双酶切（Nco I 和 Xho I）

以复能公司提供的 B01-AFP 质粒为模板，PCR 扩增目的基因，引物两端分别添加 Nco I 和 Xho I 酶切位点。电泳结果（图 1）显示扩增片段大小与预计大小（1773 bp）一致。PCR 产物经纯化后，给予 Nco I 和 Xho I 双酶切并与同样双酶切的 pET22b 载体连接，转化 DH5 α 大肠杆菌，菌液 PCR 初步筛选后提取转化子质粒进行双酶切鉴定（图 2），结果显示已插入预计大小的外源基因。测序结果显示插入的外源基因与 AFP 基因序列完全相同，说明 AFP 的表达载体

已成功构建。

2.2 pET22b-AFP 工程菌的小量诱导表达与检测

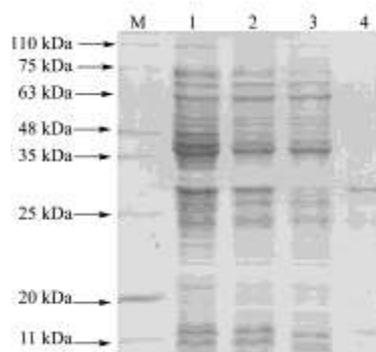


图 3 AFP 小量表达结果

Fig.3 SDS-PAGE analysis of AFP expression.

注：M：蛋白 marker；1：未诱导全菌；2：诱导全菌；3：诱导上清；4：诱导沉淀。

将原核表达阳性克隆过夜培养物接种于 Amp^r LB 液体培养基中，25 °C，250 r/min 振荡培养。当 OD_{600 nm} ≈ 0.6 时，加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L 进行诱导，另取一瓶不加 IPTG 作为对照。25 °C 继续振荡培养 4 h，大约至 OD_{600 nm} ≈ 1.5 时离心收菌，超声破碎菌体。SDS-PAGE 结果如图 3 所示，图中在预期位置（66 kDa 左右）并没有出现明显的目的条带，所以下一步进行诱导温度和 IPTG 浓度的优化。

2.3 pET22b-AFP 工程菌诱导温度的优化

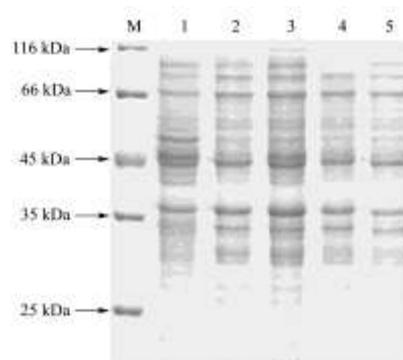


图 4 不同诱导温度下 AFP 小量表达结果

Fig.4 Optimization of AFP expression at different temperatures

注：M：蛋白 marker；1：未诱导全菌；2：18 °C 诱导全菌；3：25 °C 诱导全菌；4：30 °C 诱导全菌；5：37 °C 诱导全菌。

将 pET22b-AFP 工程菌过夜培养物接种于 Amp^r LB 液体培养基中，分别置于 18 °C、25 °C、30 °C、37 °C 下进行诱导表达，制备 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测。结果如图 4 所示，各个温度蛋白条带的

没有出现明显差异,也没有出现明显的目的条带(66 kDa左右),但是25℃更接近室温,因此选定此温度作为诱导条件并进行IPTG的浓度条件优化。

2.4 pET22b-AFP 工程菌的 IPTG 诱导浓度的优化

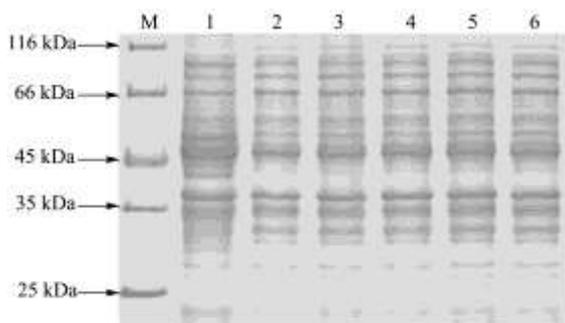


图5 不同 IPTG 诱导浓度下 AFP 小量表达结果

Fig.5 Optimization of AFP expression with different IPTG concentrations

注:M:蛋白 marker; 1:未诱导全菌; 2:0.1 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 3: 0.5 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 4: 1.0 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 5: 1.5 mmol/L IPTG 诱导下全菌; 6: 2.0 mmol/L IPTG 诱导下全菌。

将 pET22b-AFP 工程菌过夜培养物接种于 Amp^r LB 液体培养基中, 25℃、250 r/min 培养至 OD_{600 nm} 约为 0.6 时加入不同浓度的 IPTG (终浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L) 进行诱导表达, 制备 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测。结果如图 5 所示。IPTG 浓度在 0.1~2.0 mmol/L 范围内对 AFP 的表达量影响不明显, 但在结果中仍无明显的目的条带(66 kDa 左右)。由于 IPTG 具有细胞毒性, 高浓度时不利于细胞生长, 在保证表达量不受明显影响的同时, 本文最终选定的诱导 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L。

2.5 重组 AFP 蛋白的 Western Blot 鉴定



图6 AFP 的 Western Blot 结果图

Fig.6 Western Blot analysis of recombinant AFP

注: M: 蛋白 marker; 1: 未诱导全菌; 2: 诱导全菌; 3: 诱导上清; 4: 诱导沉淀。

在 25℃ 和 IPTG 为 0.1 mmol/L 的条件下, AFP 蛋白小量表达 Western Blot 验证结果如图 6 所示, 在预期条带附近有明显目的蛋白条带, 说明重组 AFP 蛋白在大肠杆菌中有表达, 但是蛋白表达量很低。

2.6 pET22b-AFP 工程菌的大量表达与纯化

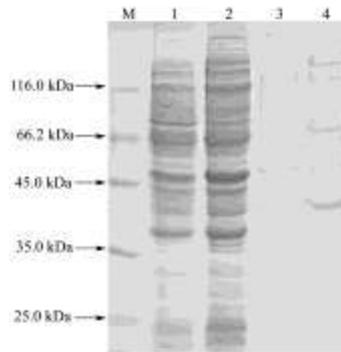


图7 纯化后 AFP 蛋白电泳结果图

Fig.7 Expression and purification of recombinant AFP

注: M: 蛋白 marker; 1: 未诱导全菌; 2: 诱导全菌; 3: 穿过液; 4: 洗脱峰。

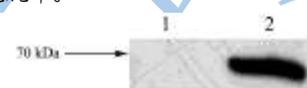


图8 纯化后 AFP 蛋白 Western Blot 结果图

Fig.8 Western Blot analysis of purified AFP

注: 1: 未诱导全菌; 2: 纯化后样品。

在 25℃ 和 IPTG 为 0.1 mmol/L 的条件下进行 AFP 蛋白的大量表达和纯化, SDS-PAGE 图结果如下(图 7): 在洗脱峰样品中在预期位置有蛋白条带。用抗 His-tag 抗体对纯化后的蛋白进行 Western Blot (图 8) 分析, 结果显示目的蛋白含有 His-tag 标签, 可能是因为蛋白的表达量低, 故在 SDS-PAGE 中无明显的蛋白条带, 但重组 AFP 已成功表达。

3 结论

3.1 大肠杆菌表达系统是目前掌握最成熟的原核表达系统, 成本低, 表达量大, 是非常理想、稳定的表达体系; 但由于其是原核表达体系, 没有翻译后加工修饰体系, 成为了表达某些真核蛋白的关键弱点: 对于某些真核蛋白来说, 表达初产物只有通过一些折叠和二硫键形成过程, 才能得到具有生物活性的成熟蛋白; 并且利用大肠杆菌表达重组蛋白, 可能会形成包涵体, 影响蛋白产率。人甲胎蛋白是一种糖蛋白, 需要进行简单的糖基化过程, 然而就目前来看, 用大肠杆菌表达系统表达的甲胎蛋白已经具有一定的生物学活性, 并且技术比较成熟, 使用大肠杆菌系统表达甲胎蛋白较为经济、有效, 关于重组蛋白的生物活性、功能及应用方面都可以继续做进一步的研究。

3.2 本研究利用 pET-22 原核表达载体, 成功构建了 pET22-AFP 重组表达质粒, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功进行了表达, 得到了重组人 AFP 蛋

白。

3.3 本研究首次全长人 AFP 在大肠杆菌中表达, 经过 Western Blot 的鉴定, AFP 已成功表达, 这为其单克隆抗体的制备和在疾病诊断方面的应用奠定了基础。但比较遗憾的是, 我们构建的重组体系蛋白表达量仍然比较低, 并且以包涵体的形式存在, 变复性过程有待优化研究, 从而提高蛋白表达量。

参考文献

- [1] Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, et al. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 2817-2825
- [2] Mizejewski G J. Biological role of alpha-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2002, 2: 709-735
- [3] Mizejewski G J. Alpha-fetoprotein structure and function: Relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants [J]. Exp Biol Med, 2001, 226: 377-408
- [4] Schnater J M, et al. Subcutaneous and intrahepatic growth of human hepatoblastoma in immunodeficient mice [J]. J Hepatol, 2006, 45: 377-386
- [5] Oertel M, Menthen A, Chen Y Q, et al. Properties of cryopreserved fetal liver stem/progenitor cells that exhibit long-term repopulation of the normal rat liver [J]. Stem Cells 2006, 24: 2244-2251
- [6] Dudich E, et al. Alpha-fetoprotein antagonizes X-linked inhibitor of apoptosis protein anticaspase activity and disrupts XIAP-caspase interaction [J]. Febs J, 2006, 273: 3837-3849
- [7] Ritter M, et al. Immunoregulation of dendritic and T cells by alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2004, 41: 999-1007
- [8] Dudich E, et al. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells [J]. Tumor Biol, 1998, 19: 30-40
- [9] Li MS, et al. alpha-Fetoprotein shields hepatocellular carcinoma cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [J]. Cancer Lett, 2007, 249: 227-234
- [10] Li M, Liu X, Zhou S, et al. Effects of alpha fetoprotein on escape of Bel 7402 cells from attack of lymphocytes [J]. BMC Cancer, 2005, 5: 96
- [11] Mitsuhashi N, et al. Clinical significance of alpha-fetoprotein: involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23: 189-197
- [12] Li M S, et al. Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells [J]. Int J Cancer, 2009, 124: 2845-2854
- [13] Nizri E, Irony MS, Grigoriadis N, et al. Novel Approaches to Treatment of Autoimmune Neuroinflammation and Lessons for Drug Development. Pharmacology [J]. Pharmacology, 2007, 79: 42-49
- [14] Boismenu R, Semeniuk D, Murgita R A. Purification and characterization of human and mouse recombinant alpha-fetoproteins expressed in Escherichia coli [J]. Protein Expres. Purif., 1997, 10: 10-26