

# Mincle 受体蛋白克隆、原核表达与纯化

严萍<sup>1</sup>, 朱喜梅<sup>1</sup>, 李璐<sup>1</sup>, 林文华<sup>1</sup>, 詹若挺<sup>1</sup>, 唐语谦<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心, 教育部岭南中药资源重点实验室, 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, 构建融合基因 pET14b-Mincle 的原核表达载体, 并将其转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达目的蛋白 Mincle, 并对其表达产物进行纯化、鉴定、透析复性。采用 RT-PCR 技术扩增小鼠 Mincle 的基因片段, 将其克隆于载体 pMD18-T 中, 并克隆到带有 His-tag 的原核表达载体 pET14b 中; 重组质粒经酶切鉴定、序列比对验证正确后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中经 IPTG 诱导表达目的蛋白。经 1mmol/L IPTG 在 37 °C 下诱导 5 h 获得了分子量约为 22 kDa 的重组融合蛋白的优化表达, SDS-PAGE、Western Blot 和 ELISA 证实了重组蛋白的特异性。Mincle 以包涵体形式在宿主中表达, 利用 Ni<sup>2+</sup> 亲和柱进行纯化和生物膜透析复性, 纯化和透析后的蛋白经 Western Blot、ELISA 法定性鉴别以及用白色念珠菌 (SC5314) 整个灭活细胞对复性后蛋白的活性测定, 透析后的 Mincle 重组融合蛋白能与白色念珠菌的特异性结合体现其生物活性, 表明获得了具有活性的蛋白, 为后续研究打下基础。

**关键词:** Mincle 受体蛋白; 基因克隆; 表达; 纯化

文章编号: 1673-9078(2015)3-77-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.014

## Cloning, Prokaryotic Expression, and Purification of the Mincle Receptor Protein

YAN Ping<sup>1</sup>, ZHU Xi-mei<sup>1</sup>, LI Lu<sup>1</sup>, LIN Wen-hua<sup>1</sup>, ZHAN Ruo-ting<sup>1</sup>, TANG Yu-qian<sup>2</sup>

(1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, China) (2. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, genetic engineering techniques were used to construct the recombinant prokaryotic expression vector pET14b-Mincle, which was then transformed into *Escherichia coli* host strain BL21 (DE3) to induce the expression of the target protein Mincle. The expression product was purified, verified, and refolded using dialysis. Mincle coding sequence fragments were amplified by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR), and cloned into the carrier pMD18-T and the prokaryotic expression vector pET14b which containing His-tag. The constructed vector, verified by restriction endonuclease digestion and DNA sequence comparisons, was then transformed into *E. coli* host strain BL21 (DE3) and expression was induced using IPTG. A recombinant fusion protein with a molecular weight of approximately 22 kDa was expressed under optimized induction conditions with 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 5 h. The specificity of the recombinant protein was confirmed using SDS-PAGE, western blots, and ELISA. Mincle was expressed in the host in the form of inclusion bodies, and was purified using a Ni<sup>2+</sup> affinity column and refolded by biofilm dialysis. The purified and dialyzed protein was verified by western blotting and ELISA, and its activity was examined with inactivated whole cells of *Candida albicans* (SC5314). The specific binding with *C. albicans* showed that the Mincle recombinant fusion protein was biologically active. Thus, this method produced active protein and forms a basis for future studies.

**Key words:** Mincle receptor protein; genetic cloning; expression; purification

收稿日期: 2014-07-11

基金项目: 中央财政支持地方高校发展专项资金项目 (粤财教[2010]358号); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20114425120010); 国家自然科学基金项目 (31201330); 广州市科技攻关项目 (201300000202)

作者简介: 严萍, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药质量及活性评价研究

通讯作者: 詹若挺 (1970-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药资源可持续利用与开发; 唐语谦 (1979-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, 分子生物学, 工业微生物

Mincle (Macrophage-inducible C-type lectin) 受体蛋白, 是在巨噬细胞中发现的一种跨膜蛋白, 它包含一个胞外糖基识别, 一个跨膜区和一个短胞浆区<sup>[1]</sup>。它是一种新发现非经典 C 型凝集素受体, 主要表达于抗原递呈细胞表面, 具有分子识别模式、抗原摄取、T 细胞共刺激及信号传导等免疫相关功能<sup>[2-5]</sup>。研究报告巨噬细胞在脂肪重塑中发挥着核心作用, 从而调节脂肪细胞因子的生产<sup>[6-8]</sup>。Masayuki 等<sup>[9]</sup>研究发现肥胖小鼠及人的脂肪组织中 Mincle 受体的表达水平有所上升。当脂肪细胞与巨噬细胞在体内相互作用时, 巨噬细胞中会选择性诱导 Mincle 受体, 而在肥胖小鼠及人的脂肪组织中的 Mincle 受体显著提高。还有研究表明 Mincle 受体是通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路表达于 M1, 或“经典激活”(或促炎)巨噬细胞中, 而不是 M2, 或“选择性激活”(或抗炎)巨噬细胞中<sup>[10-11]</sup>。Lumeng 等<sup>[12]</sup>提出脂肪组织中释放的饱和脂肪酸有可能是诱导 Mincle 受体 mRNA 在巨噬细胞中表达的内源性配体。这些研究结果为分析重建脂肪组织的分子机制提供了一条新思路。

中药宝库中有着大量可以药食两用的中药, 不但可以作为食品长期服用, 而且具有一定的临床效果。卫生部先后 3 次共批准了 87 种药食两用的中药材名单, 它们是生产中药类功能食品的重要原料, 如何首乌、香菇、灵芝、虫草、枸杞、当归、黄芪、藻类、银耳等。近年来研究已表明何首乌在抑制肥胖、降低血脂胆固醇、防止血管硬化等方面有许多独到之处。大量动物实验研究已经证明何首乌提取物具有抗氧化、抗炎、降血脂、护肝的作用及潜在的治疗肥胖的药理作用和经济价值<sup>[13]</sup>, 极具开发前景, 但其作用机制不清楚。本研究从小鼠 Raw246.7 细胞中克隆得到的 Mincle 基因, 构建 pET14b-Mincle 的原核表达载体, 采用 IPTG 诱导带有融合标签蛋白 Mincle 融合蛋白的大量表达, 并对其表达产物进行了纯化以及透析复性、活性的测定, 最终获得具有特异性结合白色念珠菌的纯化重组蛋白。通过 Mincle 受体与何首乌提取物的相互作用, 研究何首乌对巨噬细胞的调节作用机制, 为降脂类功能性食品及药物的开发打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和材料

#### 1.1.1 细胞株、菌株与质粒

小鼠巨噬细胞细胞系 Raw 264.7 (广州中医药大学临床药理研究所董艳老师惠赠); 质粒 pMD18-T、菌株 E.coli DH5 $\alpha$  购自宝生物工程有限公司; 质粒

pET-14b 购于广州瑞舒生物; E.coli BL21 (DE3)、白色念珠菌 ((SC5314)); 本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基, GIBCO 公司产品; 胎牛血清 (FBS), GIBCO 公司产品; TRIZOL 试剂盒, Invitrogen 公司产品; 脂多糖(LPS), Sigma 公司产品; PCR 扩增用 Taq 酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、反转录试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒, TaKaRa 公司产品; 普通质粒小量提取试剂盒, TIANGEN 公司产品; HisTrap HP 型 Ni<sup>2+</sup>亲和柱, GE Healthcare 公司的产品; 羊抗鼠的 CLEC-4E(P-15)单克隆抗体、HRP 标记的驴抗羊二抗, Santa Cruz 公司产品。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞的培养

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞用含 10% FBS 的 1640 培养基 (含 100  $\mu$ g/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素), 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞长至覆盖率达 80% 时, 经 1  $\mu$ g/mL LPS 刺激 24 h 后, 参照 TRIZOL 试剂盒的使用说明书提取细胞总 RNA, 进行电泳检测完整性及紫外分光光度计测定纯度后, 用于 RT-PCR 扩增基因产物。

### 1.2.2 Mincle 受体基因克隆

根据 GenBank 的 Mincle 受体基因 mRNA 序列 (GenBankTM accession number NM\_019948) 设计引物。用于扩增 Mincle 基因的上游引物为 ATGACTACATATGACATATCGCAGCTCTCAAATT, 下游引物为 TGAGGATC-CTTAGTCCAGAGGACTTATTTTC。引物上游引入 *Nde* I 酶切位点, 下游引入 *Bam*H I 酶切位点 (由北京六合华大基因科技股份有限公司合成)。采用经 1  $\mu$ g/mL LPS 刺激的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的总 RNA 为模板, 先进行 DNA 消化后进行反转录, 反应条件为: 42  $^{\circ}$ C 逆转录 60 min, 70  $^{\circ}$ C 孵育 5 min 终止反应。反应产物 cDNA 立即进行 PCR 扩增 Mincle 基因产物。反应条件如下: 98  $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 按以下的参数进行 30 次循环: 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s。最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 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。

### 1.2.3 表达质粒 pET14b-Mincle 的构建、筛选与鉴定

分别对 Mincle 基因 PCR 回收、纯化后的扩增产物和表达载体 pET-14b 进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切处理, 回收纯化后得到 Mincle 基因和表达载体 pET-14b

的双粘末端 DNA 片段, 连接过夜后, 连接产物转化到感受态细菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 同时设置空质粒阴性对照组, 在含有氨苄霉素 (Amp) 的 LB 平板培养基上培养 12~16 h 后, 挑取单菌落进一步酶切、PCR 扩增鉴定。将经酶切和电泳验证结果为阳性的质粒 DNA 送样测序 (由北京六合华大基因科技股份有限公司完成)。将测序的结果与 GenBank 上 Mincle 受体基因 mRNA 进行序列比对, 从而最后确认重组质粒。

#### 1.2.4 pET14b-Mincle 的诱导表达

以测序验证正确的 pET14b-Mincle 表达载体转化感受态 BL21 (DE3), 涂布于含有 Amp 的 LB 平板培养基上培养过夜, 挑取单个菌落接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 230 r/min 振荡培养过夜, 同时设 *E. coli* BL21 空载体菌落作为阴性对照。按 1:50 比例稀释过夜菌液, 取适量过夜培养液接种于 LB 培养基中, 37 °C, 230 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6, 吸取 1 mL 菌液离心, 作为 0 h 非诱导样品, 向剩余菌液加入 IPTG 诱导剂至终浓度 1 mM, 继续诱导培养 3 h、5 h 后吸取 1 mL 菌液。将离心收集得到菌体细胞, 以 100  $\mu$ L Lysis Buffer A (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5 mM 咪唑, pH 7.4) 重悬样品, 在冰浴中超声波破碎菌体, 以 SDS-PAGE 电泳对目的蛋白的表达进行分析。

#### 1.2.5 pET14b-Mincle 形式的确定

重组质粒 pET14b-Mincle 工程菌液培养物接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 同时以空载体为阴性对照, 分别置于 37、25、16 °C 条件下 230 r/min 震荡培养, 当 OD<sub>600</sub> 约为 0.6, 加入 IPTG 诱导剂至终浓度 1 mM, 继续培养。诱导培养 5 h 后吸取 1 mL 菌液。将离心收集得到菌体细胞, 以细胞裂解液重悬样品, 在冰浴中超声波破碎菌体, 4 °C 离心 12000 r/min  $\times$  20 min 后分别收集上清液和沉淀, 以 SDS-PAGE 电泳对目的蛋白的表达形式进行分析。

#### 1.2.6 pET14b-Mincle 原核表达条件优化

重组质粒 pET14b-Mincle 工程菌液培养物接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 同时以空载体为阴性对照, 经不同时间 (2、3、4、5 h), 不同温度 (37、33、29、25、16 °C) 以及不同浓度 IPTG (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mM) 诱导表达, 收集菌体沉淀, 以 100  $\mu$ L Lysis Buffer A 重悬样品, 超声破碎菌体取蛋白主要存在形式部分进行 SDS-PAGE 分析, 确定最适条件。

#### 1.2.7 Mincle 融合蛋白的纯化及复性

将含有重组质粒 pET14b-Mincle 的表达菌株接种于 500 mL LB 中做大量表达, 收集菌体沉淀按 5 mL/g 加入 Lysis Buffer A (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM

NaCl, 5 mM 咪唑, pH 7.4) 重悬细菌后, 加入溶菌酶 (终浓度 1 mg/mL) 置冰浴中超声破碎菌体, 离心收集沉淀。沉淀加入 Lysis Buffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8 M 尿素, pH 8.0) 重悬, 室温溶解过夜, 4 °C 离心 10000 r/min  $\times$  30 min, 收集上清液。将收集得到变性包涵体用 Ni<sup>2+</sup>亲和柱纯化带有 His-tag 的 Mincle 融合蛋白, 具体步骤如下: Ni<sup>2+</sup>亲和柱用蒸馏水冲洗干净后, 用基础缓冲液 Binding Buffer B (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, 8 M 尿素, pH 7.4) 平衡柱子。将稀释一定倍数的蛋白液上样于亲和柱, 先用 Binding Buffer B 洗去未与柱子结合的蛋白, 然后再用 Elution Buffer B (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, 8 M 尿素, pH 7.4) 洗脱柱子, 流速约为 1 mL/min, 收集洗脱液 (0.5 mL/管), 分别取 10  $\mu$ L 收集的洗脱液, 作 SDS-PAGE 电泳分析并用 Bradford 比色法测定纯化后所得蛋白浓度。

根据所测得纯化后 Mincle 蛋白浓度约 0.5 mg/mL, 将其稀释为 0.2 mg/mL, 取 10 mL 入透析袋中 (截留分子量为 7000 W)。按蛋白样品液: 透析缓冲液=1:15 的比例, 透析液的组成为 55 mM Tris pH 8.2、10 mM NaCl、10 mM KCl、400 mM sucrose、1 mM GSH、0.1 mM GSSG、1 mM EDTA+8~0 M 尿素。置于摇床 4 °C、110 r/min 晃动, 每 2 h 递减 1 M 尿素浓度, 当尿素浓度达到 2 M 后, 每 6 h 递减 0.5 M 尿素梯 (2 M-1.5 M-1 M-0.5 M-0)。然后在 20 mM Tris pH 8.2 透析 6 h, -20 °C 保存备用。

#### 1.2.8 Western Blot 分析 Mincle 蛋白的特异性

分别取 25  $\mu$ L *E. coli* BL21/pET14b 空载体菌体总蛋白、*E. coli* BL21/pET-14b-Mincle 菌体总蛋白、纯化的融合蛋白、经复性的融合蛋白分别进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析, Western Blot 分析以恒电压 100 V 转移 70 min, 将蛋白转移至 PVDF 膜 (Millipore), 5% 脱脂奶粉的封闭液在室温封闭 1 h, 用 TBST 洗至膜上无牛奶颗粒后加 1:2000 稀释的羊抗鼠的 CLEC-4E (P-15) 抗体 (Santa Cruz) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 5 遍, 每次 5 min, 然后加 1:5000 稀释的驴抗羊 IgG-HRP (Santa Cruz) 于室温孵育 1 h, 洗去二抗后于暗室中曝光显影定影。

#### 1.2.9 ELISA 定性鉴别 Mincle 蛋白

分别取 0.1 mL 纯化后融合蛋白、经透析复性的蛋白包被于酶联反应的 96 孔酶标板上, 同时设置空白、阴性对照组, 37 °C 孵育 2 h, 用洗涤缓冲液 TBST 洗涤 3 次, 每次 3 min。每孔加 0.1 mL 0.1% BSA 封闭液, 37 °C 孵育 1 h 后洗涤。然后每孔加 1:200 稀释的 CLEC-

4E (P-15)抗体 4 °C 孵化过夜后洗涤, 然后加 1:2000 稀释的驴抗羊 IgG-HRP(Santa Cruz)室温孵育 1 h, 洗涤后加 TMB 底物显色液反应 15 min, 每孔加 50 μL 的 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应后于 450 nm 处测 OD 值。

### 1.2.10 Mincle 受体蛋白的活性测定

取 0.1 mL 白色念珠菌 (SC5314) 整个灭活细胞包被于 96 孔酶标板上, 37 °C 孵化 2 h。分别取 0.1 mL 纯化后蛋白、透析后蛋白加入 96 孔酶标板里 4 °C 孵化过夜, 同时设置空白、阴性对照组。用洗涤缓冲液 TBST 洗涤 3 次, 每次 3 min。每孔加 0.1 mL 0.1% BSA 封闭液, 37 °C 孵育 1 h 后洗涤。然后每孔加 1:200 稀释的 CLEC-4E (P-15)抗体 4 °C 孵化过夜后洗涤, 然后加 1:2000 稀释的驴抗羊 IgG-HRP (Santa Cruz)室温孵育 1 h, 洗涤后加 TMB 底物显色液反应 15 min, 每孔加入 50 μL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应于 450 nm 处测 OD 值。

### 1.2.11 数据统计分析

实验结果数据用均数±标准差 (x±s) 表示, 数据统计分析采用 SPSS 13.0 的独立样本 t 检验进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 巨噬细胞 RAW264.7 总 RNA 的提取

用 LPS 活化小鼠巨噬细胞, TRIzol 试剂法提取巨噬细胞 RAW264.7 总 RNA, 见图 1, 结合紫外检测 OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub>=1.92 显示 RNA 质量符合反转录要求。

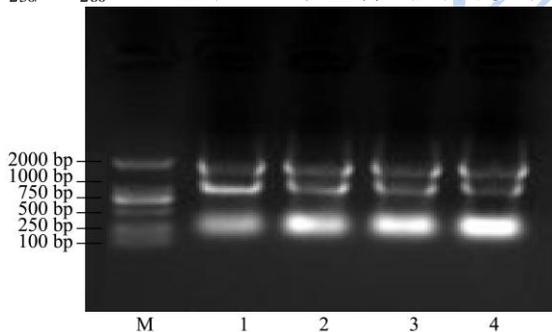


图 1 RAW264.7 细胞总 RNA

Fig.1 Total RNA of RAW264.7 cells

注: M 为 DL2000; 1~4 为平行 4 份 RNA 样品。

### 2.2 pET14b-Mincle 表达质粒的构建

分别挑取阴性, 阳性单菌落进一步 PCR 扩增、酶切鉴定。PCR 电泳结果如图 2 显示, 阳性菌落扩增片段大小与预计大小 (约 500 bp) 一致, 而阴性菌落未见相应的条带。PCR 产物经纯化后与的 pET14b 载体连接, 转化 DH5α 大肠杆菌, 经蓝白斑筛选得到重组子经 BamH I 酶切得到单一条带产物 (约 5100 bp) 和 Scap I 酶切得到两条大小不一样的条带产物 (分别是

2780 bp、2320 bp 左右), 均与预期大小一致, 鉴定结果如图 3。结果表明已正确插入预计大小的外源基因, 说明 Mincle 的表达载体 pET14b-Mincle 构建成功。

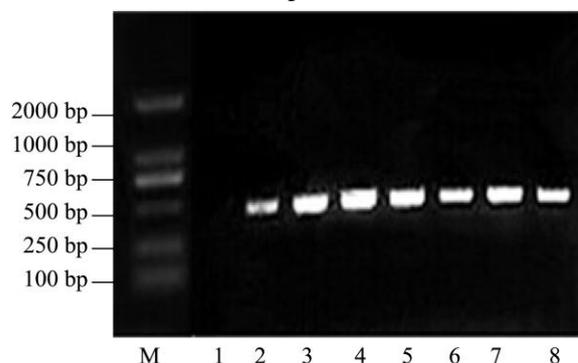


图 2 重组质粒 pET14b-Mincle 菌落 PCR 电泳

Fig.2 PCR electrophoresis of the recombinant plasmid from pET14b-Mincle colonies

注: M 为 DL2000; 1 为空质粒菌落; 2~8 为挑取的 7 个阳性单菌落。

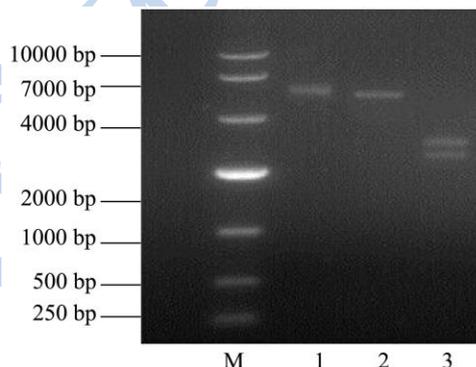


图 3 原核表达质粒 pET14b-Mincle-2 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzyme digestion of the pET14b-Mincle prokaryotic expression plasmid

注: M 为 DL10000; 1 为未经酶切的质粒; 2 为经 BamH I 单酶切产物; 3 为经 Scap I 单酶切产物。

### 2.3 pET14b-Mincle 的表达与检测

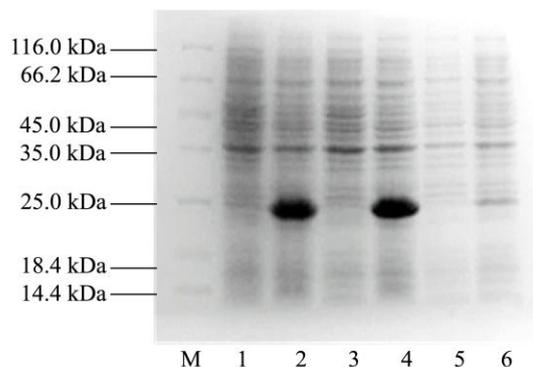


图 4 原核质粒 pET14b-Mincle 诱导表达总蛋白

Fig.4 Total induced protein expression of the Mincle prokaryotic plasmid

注: M 为蛋白 Marker; 1、3、5 分别空载体对照重组菌诱导 5 h、3 h、0 h; 2、4、6 分别为重组菌诱导 5 h、3 h、0 h。

将原核表达阳性克隆分别培养 3 h、5 h 后离心收菌, 加 Lysis Buffer A 重悬菌体后冰上超声破碎菌体。SDS-PAGE 结果如图 4 所示, 与对照相比, 经过诱导的重组菌株裂解物约在 22 kDa 处出现明显的高水平表达的外源蛋白条带, 该蛋白分子质量与预期的 Mincle 融合蛋白的分子质量一致, 这表明 Mincle 融合蛋白可在大肠杆菌中表达。

### 2.4 pET14b-Mincle 表达形式的确定

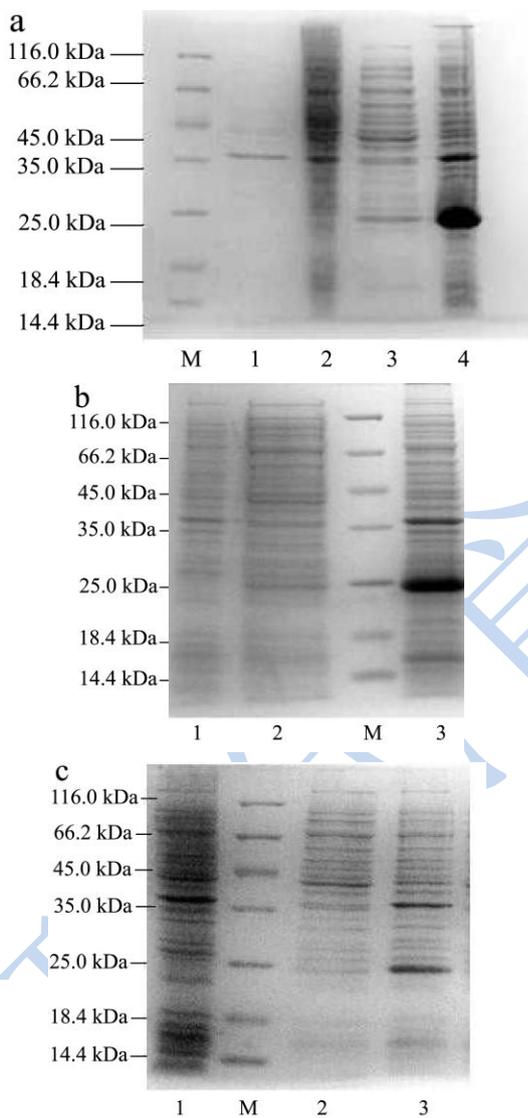


图 5 pET14b-Mincle 不同温度诱导表达蛋白

**Fig.5 Induced protein expression of pET14b-Mincle at various temperatures**

注: 图 5a: M 为蛋白 Marker; 1、2 分别为 37 °C 空载体对照全菌裂解上清和沉淀; 3、4 分别为 37 °C 重组菌全菌裂解上清和沉淀; 图 5b: M 为蛋白 Marker; 1 为 25 °C 空载体对照;

2 分别为 25 °C 全菌裂解上清; 3 分别为 25 °C 全菌裂解沉淀; 图 5c: M 为蛋白 Marker; 1 为 16 °C 空载体对照; 2 分别为 16 °C 全菌裂解上清; 3 分别为 16 °C 全菌裂解沉淀。

将原核表达阳性克隆 pET14b-Mincle 分别在不同温度 (37 °C、25 °C、16 °C) 条件下用终浓度为 1 mM 的 IPTG 诱导 5 h 后, 离心取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 上清液中约在 22 kDa 处未见明显蛋白条带, 而沉淀部分约在 22 kDa 处的重组蛋白条带更加明显, 结果显示在不同温度条件下表达产物大多数在沉淀中, 说明 pET14b-Mincle 蛋白在不同温度条件下主要以包涵体的形式存在, 并且在 37 °C 下表达量最高 (图 5 所示)。

### 2.5 原核表达最佳诱导时间、诱导温度及 IPTG 的浓度的确定

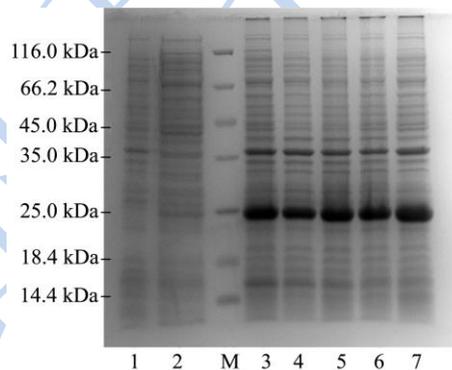


图 6 不同时间 pET14b-Mincle 表达

**Fig.6 Expression of pET14b-Mincle at various time periods**

注: 1 为空载体对照; 2 为 16 °C 全菌裂解上清; M 为蛋白 Marker; 3~7 分别为 16 °C、25 °C、29 °C、33 °C、37 °C 全菌裂解沉淀。

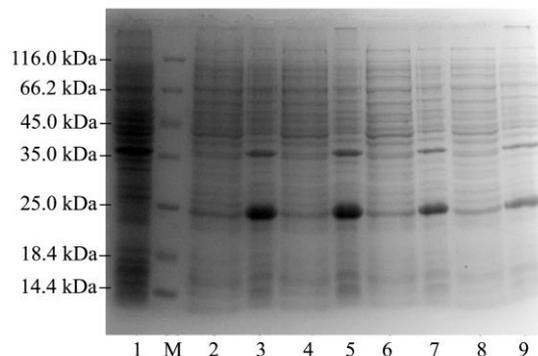


图 7 不同温度 pET14b-Mincle 表达

**Fig.7 Expression pET14b-Mincle at various temperatures**

注: 1 为空载体对照; M 为蛋白 Marker; 2、4、6、8 分别为诱导 5 h、4 h、3 h、2 h 全菌裂解上清; 3、5、7、9 分别为诱导 5 h、4 h、3 h、2 h 全菌裂解沉淀。

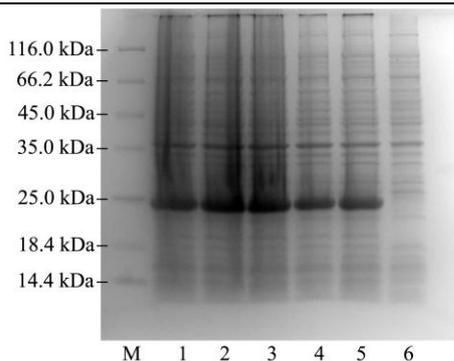


图8 不同 IPTG 浓度的 pET14b-Mincle 表达

Fig.8 Expression pET14b-Mincle for various IPTG concentrations

注: M 为蛋白 Marker; 1~5 分别为 IPTG 诱导浓度 1.2 mM、1.0 mM、0.8 mM、0.6 mM、0.4 mM 全菌裂解沉淀; 6 为空载体对照。

将原核表达阳性克隆过夜培养液物接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 经不同时间 (2、3、4、5 h), 不同温度 (37、33、29、25、16 °C) 以及不同浓度 IPTG (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mM) 诱导表达, 结果显示最佳诱导时间为 5 h, IPTG 浓度以 1.0 mM 为佳, 诱导温度为 37 °C, 结果如图 6-8。

### 2.6 包涵体蛋白的纯化

包涵体蛋白, 经 Ni<sup>2+</sup>亲和和柱纯化蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析, 见图 9。结果显示洗脱峰样品中出现约在 22 kDa 的蛋白产物, 与预期融合蛋白大小一致。这表明 Mincle 融合蛋白经过 Ni<sup>2+</sup>亲和柱的纯化, 可以得到单一条带的目的蛋白。

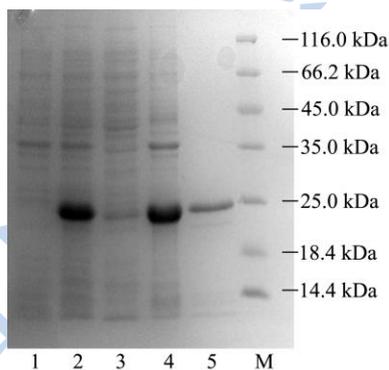


图9 Mincle 蛋白纯化结果图

Fig.9 Purification of recombinant Mincle protein

注: M 为蛋白 Marker; 1 为空载体对照; 2 为全菌总蛋白; 3 为裂解后上清液; 4 未纯化蛋白; 5 为纯化后蛋白。

### 2.7 Western Blot 分析 Mincle 蛋白的特异性

分别取 25 μL 空载体总蛋白、重组质粒总蛋白、纯化的融合蛋白、经复性的融合蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。分析可见, 含重

组质粒菌及纯化蛋白均约在 22 kDa 处出现阳性反应带, 而 pET14b 空载体的同一菌株在 IPTG 诱导后, 约在 22 kDa 处无任何特异性反应条带, 表明表达和纯化的蛋白是有 His-tag 的 Mincle 蛋白, 结果见图 10。

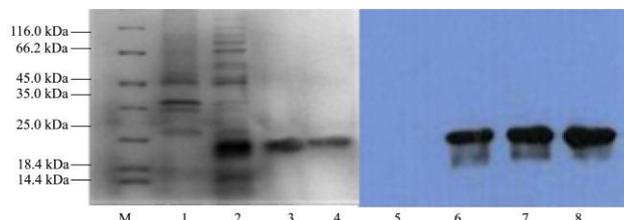


图10 pET14b-Mincle 菌株表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.10 SDS-PAGE and western blot analyses of the expression product of pET14b-Mincle in bacteria

注: 1、2、3、4 分别为 pET14b 空载体蛋白; 重组质粒总蛋白; 纯化后蛋白; 透析复性蛋白的 SDS-PAGE 分析; 5、6、7、8 分别为 pET14b 空载体蛋白; 重组质粒总蛋白; 纯化后蛋白; 透析复性蛋白的 Western blot 分析。

### 2.8 ELISA 定性鉴别 Mincle 蛋白

通过 ELISA 方法分别检测纯化后蛋白、经透析复性后蛋白的免疫特异性, 结果显示纯化后蛋白在 450 nm 处的 OD 值比阴性对照组显著上升 (P<0.05), 透析后蛋白组在 450 nm 处的 OD 值比阴性对照组极显著上升 (P<0.01), 见图 11。透析后蛋白组在 450 nm 处的 OD 值显著性的高于纯化后蛋白的 OD 值, 由此推测可能经过透析复性后 Mincle 蛋白恢复了一定空间结构, 这更利于表面抗原与抗体的结合。

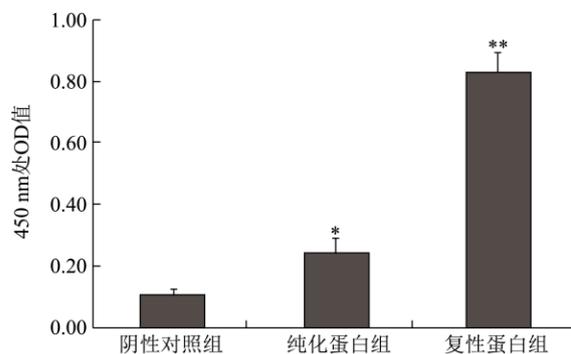


图11 pET14b-Mincle 菌株表达产物的 ELISA 分析

Fig.11 ELISA analysis of the bacterial expression product of pET14b-Mincle

注: \*表示与阴性组相比 P<0.05; \*\*表示与阴性组相比 P<0.01。

### 2.9 Mincle 蛋白生物活性的测定

用白色念珠菌 (SC5314) 整个灭活细胞来测定纯

化后、透析后Mincle蛋白的活性,结果显示透析后蛋白组在450 nm处的OD值比阴性对照组显著上升( $P<0.01$ ),而纯化后蛋白在450 nm处的OD值比阴性对照组没有显著性差异,结果见图12。结果表明了,包涵体变性的Mincle蛋白经过透析后,恢复了一定的空间结构,从而具有一定的生物活性,能够结合白色念珠菌整个细胞。

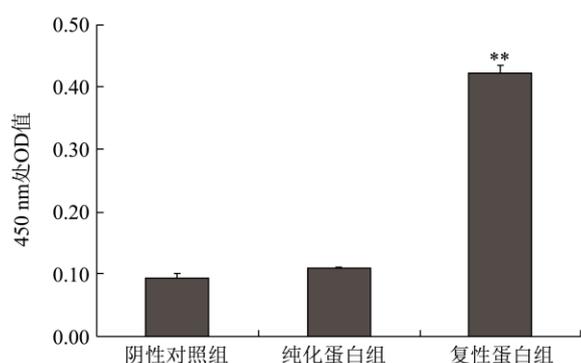


图 12 白色念珠菌加热灭活的细胞测定 Mincle 蛋白活性

Fig.12 Activity of the Mincle protein using heat-inactivated whole *C. albicans* cells

注: \*表示与阴性组相比  $P<0.05$ ; \*\*表示与阴性组相比  $P<0.01$ 。

### 3 结论

3.1 本实验采用分子生物学技术导入的外源基因在原核表达系统中获得外源蛋白的高效表达,但过高蛋白质产物来不及加工与修饰在细菌内凝集为没有活性的固体颗粒,即为包涵体<sup>[14]</sup>。包涵体基本由蛋白质构成,其中50%以上是克隆产物,这些产物的一级结构是完全正确的,但是立体构型却存在错误,所以没有生物学活性。本研究诱导表达的Mincle融合蛋白即为包涵体蛋白,实验通过降低温度促融,但效果不明显。接着尝试采用透析复性方法,是将包涵体蛋白溶液置于透析袋内,通过逐渐降低外透液的浓度来控制变性剂的去除速度,在氧化剂还原剂的作用下促进蛋白质形成正确的二硫键,进行特定空间结构的折叠,从而促使恢复其特定的生物活性。使用大肠杆菌系统表达Mincle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<sup>[15]</sup>。

3.2 为了获得高产量、高活性的Mincle重组蛋白,有必要继续对Mincle蛋白在*E.coli*原核中的表达进行深入的研究。包涵体蛋白复性是一个非常复杂的问题,应结合变性蛋白本身特性选择适当的复性方法,在复性过程中控制好适当的外部条件,使复性过程能够正确形成二硫键及分子内次级键,避免在复性过程中折叠速度过快形成无活性结构的蛋白分子或分子间聚集

形成蛋白聚集体。

3.3 我们成功克隆Mincle的基因片段,构建了pET14b-Mincle蛋白的原核表达载体,并通过大肠杆菌BL21(DE3)中获得表达和亲和层析法纯化,获得纯度较高的重组Mincle蛋白,经过Western Blotting和ELISA鉴定了Mincle蛋白的特异性,且初步测定了其生物活性,符合后续实验的要求。这些结果为进一步研究奠定了坚实的基础,为后续药食两用中药与其作用的机理的深入研究,开发符合中药性味功用、适应国内外市场需求的功能性食品及药物开发打下基础。

### 参考文献

- [1] Matsumoto M, Tanaka T, Kaisho T, et al. A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages [J]. *J. Immunol.*, 1999, 163: 5039-5048
- [2] Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle [J]. *J. Exp. Med.*, 2009, 206(13): 2879-2888
- [3] Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, et al. Cutting edge: mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate [J]. *J. Immunol.*, 2010, 184: 2756-2760
- [4] Lee WB, Kang JS, Yan JJ, et al. Neutrophils promote mycobacterial trehalose dimycolate-induced lung inflammation via the M-incle pathway [J]. *Plos. Pathog.*, 2012, 8: 2610-261
- [5] Behler F, Steinwede K, Balboa L, et al. Role of Mincle in alveolar macrophage-dependent innate immunity against mycobacterial infections in mice [J]. *J. Immunol.*, 2013, 189(6): 3121-3129
- [6] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature* 2006;444:860-867
- [7] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease [J]. *Circ. Res.*, 2005, 96: 939-949
- [8] Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling [J]. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, 88: 33-39
- [9] Ichioka M, et al. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans [J]. *Diabetes*, 2011, 60: 819-826
- [10] Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, et al. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback

- mechanism that attenuates saturated fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue [J]. *Circ. Res.*, 2009, 105:25-32
- [11] Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes* 2007, 56: 1986-1998
- [12] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization [J]. *J. Clin. Invest.* 2007, 117: 175-184
- [13] Murthy BN, Joshi JB. Assessment of standard, RSM and LES turbulence models in a baffled stirred vessel agitated by various impeller designs [J]. *Chem. Eng. Sci.*, 2008, 63: 468-495
- [14] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 183
- WANG Jia-zheng, FAN Ming. The manual of protein technology [M]. Beijing: Sciencepress, 2005: 183
- [15] 李振东, 谷华玮, 王海鹰, 等. 人甲胎蛋白 AFP 在大肠杆菌中表达和鉴定 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2418-2419
- LI Zhen-dong, GU Hua-wei, WANG Hai-ying, et al. Expression and Identification of human alpha fetoprotein in *E. Coli* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(10): 2418-2419