

牛脑液泡型质子泵70kD 和33kD 亚基基因的表达*

张 瑛

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

彭生斌 D. K. STONE 谢小松

(Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport,
the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.)

摘要 已分离了编码牛脑液泡型质子泵的70kD 亚基的 cDNA. 利用聚合酶链反应 (PCR) 扩增了70kD 亚基的编码片段, 同时直接从牛脑 cDNA 库中得到了33kD 亚基的编码片段. 分别将相应片段连接到 PET 载体上完成70kD 和33kD 亚基基因在大肠杆菌中的表达. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹分析表明70kD 和33kD 亚基基因均得到明显表达.

关键词 质子泵, 70kD 和33kD 亚基, 基因表达

液泡型质子泵 (V-型质子泵) 广泛分布于各种细胞器膜系统中. 这类质子泵的主要功能是通过水解 ATP 产生质子推动力 (pmf) 提供物质跨膜运送的能量, 同时在一些液泡型的细胞器中维持一定的酸化以利于细胞器中各种酶的作用, 因而具有十分重要的生理意义. 液泡型质子泵由几种大小、数目不同的亚基组成, 分子量为500 000-700 000. 已进行的生化研究表明, ATP 或 ATP 类似物能够标记液泡型质子泵的70kD 亚基^[1]; 70kD 亚基的抗体能抑制 ATP 水解^[2]; 质子泵的抑制剂 (¹⁴C)-NEM 亦标记在70kD 亚基上^[3]. 这些实验证据说明, 70kD 亚基是液泡型质子泵的主要活性亚基. 进一步的研究提示, 70kD, 58kD, 40kD, 33kD 四种亚基形成一个 ATP 水解的活性区^[4]. 单纯的生化分析难以对每个亚基的结构与功能进行深入研究. 为了进一步研究液泡型质子泵的活性亚基的作用, 开始进行了液泡型质子泵的活性部分70kD, 58kD, 33kD 亚基的表达研究.

本文用 PCR 方法从70kD 亚基的 cDNA

克隆中合成70kD亚基的编码片段, 从牛脑 cDNA 库中直接合成33kD 亚基的编码片段. 分别插入表达载体 PET 中, 在大肠杆菌中得到了明显表达的70kD 和33kD 亚基.

1 材料与方法

1.1 cDNA 库的总 DNA 的制备 牛脑 λ ZAP cDNA 库的总 DNA 的制备按文献[5]进行. 挑取新鲜 *E. coli* BB4 单菌落在5ml LB 培养液中培养过夜. 取2 μ l 原 cDNA 库裂解液 (效价为 10⁹/ml), 添加0.1ml λ 稀释液, 过夜的0.1ml 细菌培养液和 0.1ml 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L CaCl₂, 37℃保温15min. 将保温的混合液接种至50ml 含10mmol/L MgCl₂ 的 LB 培养液中, 37℃, 剧烈震荡6—8h, 直至菌液完全裂解. 按常规方法制备50ml λ 噬菌体裂解液并进一步制备 cDNA 库的总 DNA.

1.2 聚合酶链式反应 (PCR) PCR 使用

* 在美国德克萨斯大学西南医学中心分子运送室完成. 美国 NIH (DK RO1-33627) 基金资助.

收稿日期: 1993-06-25, 修回日期: 1993-11-24

Perkin-Elmer Cetus 公司的 PCR 试剂盒和热循环仪. 本实验室克隆并测序的牛脑液泡型质子泵的70kD 亚基的 cDNA, λ 29-1 (1) 为70kD 亚基 PCR 的模板, 并设计了两个相应的 DNA 引物. 以 λ cDNA 库的总 DNA 为33kD 亚基 PCR 的模板, 两个对应的 DNA 引物的设计基于已报道的牛肾液泡型质子泵的相应亚基的 cDNA 序列^[6]. 反应采用双温法. 反应体积 50 μ l, 首先将模板 DNA 变性, 100 $^{\circ}$ C, 10min, 然后加 Taq 聚合酶起始反应. 循环数30个, 96 $^{\circ}$ C, 1min 变性, 68 $^{\circ}$ C, 5min 退火并延伸, 引物浓度为50pmol 每反应, 模板浓度为100ng 每反应. 产物用1%琼脂糖电泳鉴定并进一步纯化.

1.3 表达质粒的组建及筛选 构建牛脑液泡型质子泵的70kD 和33kD 亚基的表达质粒的载体为 PET-3a. 重组质粒的转化菌株为 *E. coli* HB101. 表达质粒的组建基本上与前文相同^[7], 相应的插入片段的酶切接点依亚基不同而不同. 33kD 亚基的重组质粒筛选按常规方法进行^[8]. 70kD 亚基的重组质粒筛选用 ³²P 末端标记的 DNA 引物作探针, 在 1mmol/L EDTA, 0.5mol/L NaHPO₄ pH7.2, 7% SDS, (65 $^{\circ}$ C) 杂交液中杂交硝酸纤维素滤膜 20h, 然后在 65 $^{\circ}$ C, 用 1mmol/L EDTA, 40mmol/L NaHPO₄ pH7.2, 5% SDS 洗 30—60min, 两次漂洗滤膜. 阳性克隆的质粒进一步用限制内切酶酶切图谱分析以确定含有正确插入.

1.4 70kD 和33kD 亚基基因的表达 表达菌株为 *E. coli* BL21 (DE3). 按 Studier 方法^[9]将正确的重组质粒转化到 BL21 (DE3) 中并鉴定其稳定性. 挑选单个转化菌落接种至 2—3ml 含氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的 M9-ZB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 震荡培养 4h 左右, 使培养液 A_{600} 为 0.6—1. 添加诱导剂, 在 33kD 亚基基因表达中, 使 IPTG 终浓度为 1mmol/L; 在 70kD 亚基基因表达中, 使 IPTG 终浓度为 0.4mmol/L. 放大规模的培养, 可将有氨苄青霉素抗性的转化菌落接种至 5ml 的 M9-ZB 培养液中, 使菌生长至对数期. 接着将 5ml 对数期菌液接种

500ml 培养液中, 再按上述条件添加诱导剂. 通常在诱导 2—3h 后收集样品作分析测定或进一步分离表达产物.

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳参照常规方法^[10]进行. 牛脑笼状囊泡颗粒质子泵制剂作为对照样品与表达样品一起电泳. 电泳凝胶浓度一般为 11%, 染色用考马斯亮蓝.

1.6 蛋白质印迹分析 基本上按 Burnette 方法^[12]进行蛋白质印迹分析. 抗牛脑笼状囊泡颗粒质子泵的 70kD 亚基的血清按文献 [4] 制备. 具体分析过程见前文^[7].

2 结果与讨论

2.1 聚合酶链反应及表达质粒的组建

利用聚合酶链反应克隆了牛脑液泡型质子泵的 70kD 与 33kD 亚基的全编码片段. 分离到的牛脑液泡型质子泵的 70kD 亚基的 cDNA 编码 617 个氨基酸, 含起始密码及终止密码. 已报道^[6]的牛肾液泡型质子泵的 31kD (33kD) 亚基的 cDNA 全序列亦含有起始及终止密码. 这为设计并合成相应的 DNA 引物提供了依据. 实验中所用的两对 DNA 引物如图 1 所示, 引物 YZ6 相应于 33kD 亚基的 N 末端编码序列, 带有起始密码的 Nde I 酶切位点; 引物 YZ7 互补于 33kD 亚基 C 末端编码序列, 并带终止码及 BamH I 位点; 引物 YZ10 基于 70kD 亚基 N 末端的编码序列, 包括起始码及 Nde I 位点; 引物 YZ11 互补于 70kD 亚基的 C 末端的编码序列, 并带终止码、EcoR I 位点和 Bgl I 位点. 在要扩增的 70kD 亚基的编码片段中有 1 个 BamH I 位点, 因此在引物 YZ11 中设置 Bgl I 位点与载体上 BamH I 位点相应. 另外在引物 YZ11 中又添加了 EcoR I 位点以利于 70kD 亚基编码片段的再克隆. 实验结果表明, 以 λ ZAP 的牛脑 cDNA 库总 DNA 为模板, 用 YZ6 与 YZ7 两个 DNA 引物扩增了牛脑液泡型质子泵 33kD 亚基的编码片段. 如图 2 所示, 在 1% 琼脂糖电泳上可以看到 0.7kb 的 PCR 产物带, 与文献 [6] 报道的相应的 cDNA 大小一致. 经

Nde I 与 BamH I 双酶酶切后, 仍得单一的 0.7kb 带. 图3显示, 用分离的牛脑液泡型质子泵的70kD 亚基的 cDNA 作模板, 添加 YZ10与 YZ11 一对 DNA 引物进行 PCR 反应, 得到

1.9kb 的产物带, 与测序的70kD 亚基的编码片段大小相同, PCR 产物经 Nde I 与 Bgl I 双酶作用后, 依旧为1.9kb 带.

引物名称	序 列	编码链	亚基
YZ6	CGGCATATGGCCCTCAGCGATGCCGACGTG Nde I 起始密码	+	33kD
YZ7	CGCGGATCCTGCTGGCTTAGTCCAAAACTTCC BamH I 终止密码	-	33kD
YZ10	GCGCATATGATGGATTCTCCAAGCTCCCC Nde I 起始密码	+	70kD
YZ11	GGAGAGATCTCAGAATTCTAATCTTCAAGGCTACGG Bgl I EcoR 终止密码	-	70kD

图1 聚合酶链式反应中的两对 DNA 引物

DNA 引物序列从5' 到3', YZ6相应于33kD 亚基 N 末端编码链, YZ7互补于33kD 亚基 C 末端编码链; YZ10相应于70kD 亚基 N 末端编码序列, YZ11互补于70kD 亚基 C 末端编码序列. 单底线指明限制性内切酶位点, 双底线标明起始密码及互补于终止密码的对应碱基.

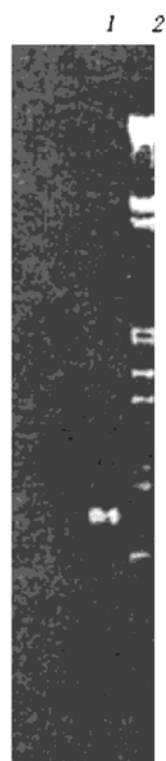


图2 33kD 亚基编码片段的 PCR 产物电泳图

1: 33kD 亚基编码片段的 PCR 产物; 2: λDNA 被 Hind III 和 EcoR I 酶切片段.

0.7kb —

在质粒重组中, Nde I 和 BamH I 双酶酶切 PET-3a, 得线性的带 Nde I 和 BamH I 粘末端的载体, 插入 Nde I 和 BamH I 双酶酶解

的33kD 亚基编码片段, 重组成33kD 亚基基因的表达质粒; 插入 Nde I 和 Bgl I 酶切的70kD 亚基编码片段, 组建成70kD 亚基的表达质粒. 33kD 亚基的重组质粒的酶切电泳图见图4. 由图4可见, 33kD 亚基的重组质粒经 Nde I 酶切得5.3kb 单一带, 经 Nde I 与 BamH I 双酶消化得4.6kb, 0.7kb 两条带. 图5为70kD 亚基的重组质粒的酶切电泳图. 图5说明, 70kD 亚基的重组质粒经 Nde I 作用得6.5kb 单带, 经 Nde I 与 BamH I 双酶作用得4.7kb, 1.8kb 双带. 70kD 亚基重组质粒中, 载体的 BamH I 位点 (G' GATCC) 与插入片段中的 Bgl I 位点 (A' GATCT) 相连形成两酶均不能酶切的封闭位点, 但插入片段中的 BamH I 位点位于封闭位点附近. 结果说明, 上述两个重组质粒均符合原设计. 进一步用几种不同限制性内切酶对两个重组质粒进行酶切后指出, 两个插入片段的酶切图谱均与已知的牛脑液泡型或牛肾液泡型质子泵的相应亚基的 cDNA 的酶切图谱

一致, 含有从起始码到终止码的 33 kD

和 70kD 亚基编码片段的两个表达质粒已重组成功.

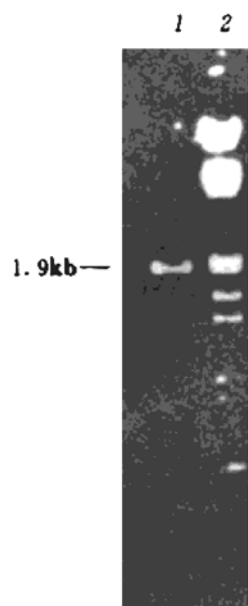


图3 70kD 亚基编码片段的 PCR 产物电泳图

1: 70kD 亚基编码片段的 PCR 产物; 2: λ DNA 被 Hind III 和 EcoR I 酶切片段.

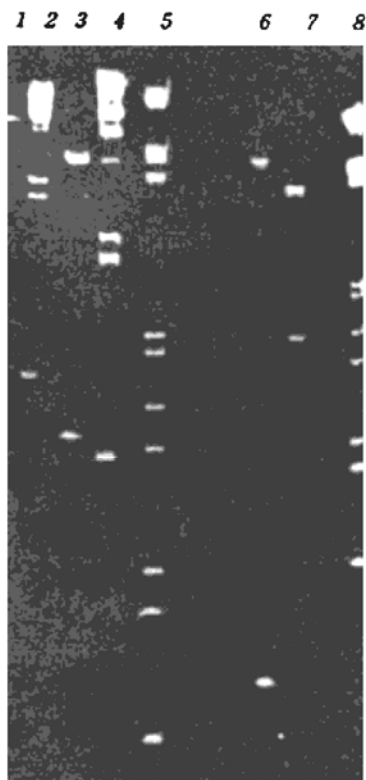


图4 33kD 亚基基因的表达质粒的酶切电泳图

1: 33kD 亚基基因表达质粒经 Nde I 酶切 (5.3kb); 2: λ DNA 被 Hind III 酶切片段; 3: 表达质粒被 Bgl II 酶切 (4.7kb, 0.6kb); 4: λ DNA 被 Hind III 酶切片段; 5: λ DNA 被 Hind III 和 EcoR I 酶切片段; 6: 表达质粒被 Nde I 和 BamH I 双酶切 (4.6kb, 0.7kb); 7: 表达质粒被 Pst I 酶切 (3.9kb, 1.4kb); 8: λ DNA 被 Hind III 和 EcoR I 酶切片段.

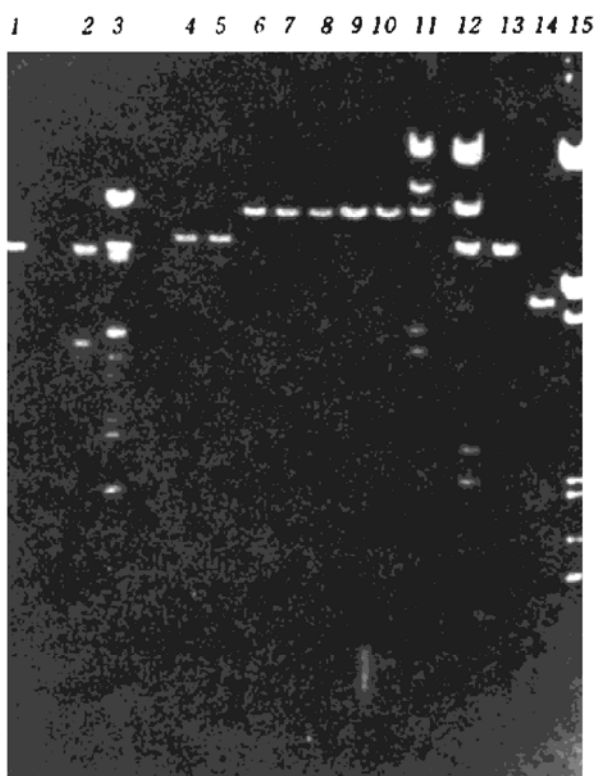


图5 70kD 亚基基因表达质粒的酶切电泳图

1: PET-3a 载体被 Nde I 和 BamH I 双酶切; 2: 70kD 亚基基因表达质粒被 Nde I 和 BamH I 双酶切 (4.7kb, 1.8kb); 3: λ DNA 被 Hind III 和 EcoR I 酶切的片段; 4: PET-3a 载体被 Nde I 酶切; 5: PET-3a 载体被 BamH I 酶切; 6-7: 表达质粒经 Nde I 酶切 (6.5kb); 8-10: 表达质粒被 BamH I 酶切 (6.5kb); 11: λ DNA 被 Hind III 酶切的片段; 12: λ DNA 被 Hind III 酶切的片段; 13: 表达质粒被 Bgl II 酶切 (6.5kb); 14: PET-3a 载体被 Bgl II 酶切; 15: λ DNA 被 Hind III 和 EcoR I 酶切的片段.

2.2 33kD 亚基基因的表达

BL21 (DE3) 的 DE3 噬菌体上携带的 T7 RNA 聚合酶基因, 在 T7 启动子作用下可以产生 T7 RNA 聚合酶. T7 RNA 聚合酶能非常专一地控制基因表达. 用 Studier^[9] 的方法测定指出, 绝大多数转化菌中含有受 T7 RNA 聚合酶作用的诱导基因或功能完整的质粒. 换言之, 33kD 亚基重组质粒在 BL21 (DE3) 中是稳定的.

诱导剂 IPTG 的终浓度为 0.4mmol/L.

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测到表达的 33kD 亚基,但随着诱导时间延长,非表达的蛋白条带与表达的条带相对比例升高,使表达产物在整个细菌细胞质蛋白中的含量变低,为此,我们将诱导剂的终浓度提高为 1mmol/L,以观察表达效率.图6表明,在 1mmol/L IPTG 诱导下,用 10 μ l 菌液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,可以看到一条与对照样品中 33kD 亚基大小一致的明显的蛋白条带,表达产物带随诱导时延长而逐渐加深,到 3h 最深.用 Bio-Rad 的 GS-670 光密度扫描仪对凝胶染色带进行反射扫描测试表明,表达效率高于文献报道^[9].

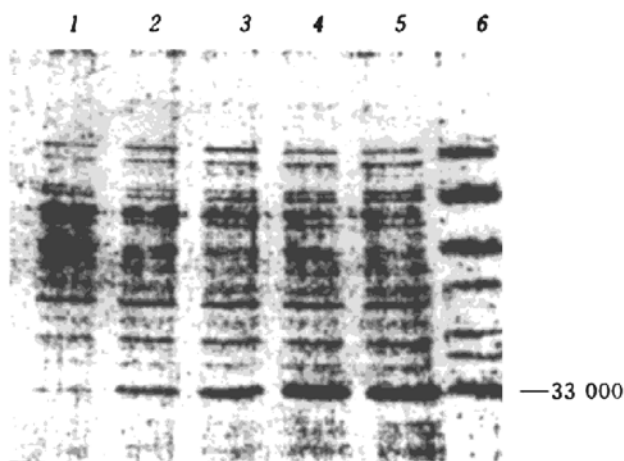


图6 表达的33kD亚基的 SDS

聚丙烯酰胺凝胶电泳

1-5: 在 IPTG 诱导前及诱导 0.5, 1.0, 2.0 和 3.0h 后,表达 33kD 亚基基因的菌液样品. 6: 纯化的牛脑笼状囊泡颗粒质子泵复合物.

2.3 70kD 亚基基因的表达

实验表明,70kD 亚基基因的表达质粒容易在 BL21 (DE3) 中转化并具有稳定性.图7为 70kD 亚基基因表达产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图.由图7可见,一条明显的分子量为 70 000 的蛋白条带出现在加诱导剂的表达菌液样品中.随着诱导时间延长,表达的 70kD 亚基带渐渐加深.

为进一步测定牛脑液泡型质子泵的 70kD 亚基在大肠杆菌中的表达,用牛脑笼状囊泡颗粒质子泵的 70kD 亚基抗血清对表达产物进行

了蛋白质印迹分析.图8为蛋白质印迹分析的结果.图8表明,在 IPTG 诱导的含重组质粒

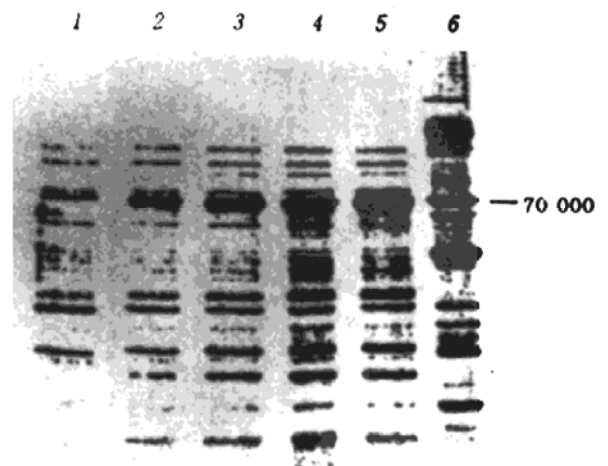


图7 表达的70kD亚基的 SDS

聚丙烯酰胺凝胶电泳

1-5: 在 IPTG 诱导前及诱导 0.5, 1.0, 2.0 和 3.0h 后,表达 70kD 亚基基因的菌液样品. 6: 纯化的牛脑笼状囊泡颗粒质子泵复合物.

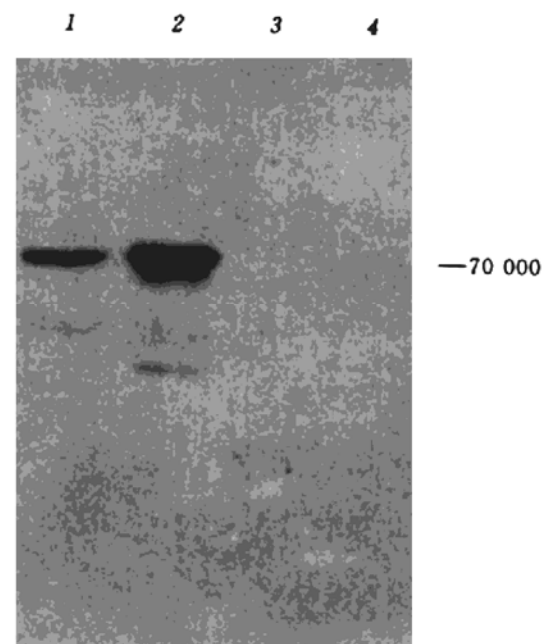


图8 表达的70kD亚基的

蛋白质印迹分析

1: 纯化的牛脑笼状囊泡质子泵; 2: 诱导的含 70kD 亚基基因表达质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品; 3: 没有诱导的含表达质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品; 4: 添加诱导剂的含对照质粒 PET-3a 的 BL21 (DE3) 菌液样品.

的 BL21 (DE3) 菌液样品中出现特异的免疫带, 与对照的牛脑笼状囊泡颗粒质子泵样品中免疫带位置完全一致. 在不加 IPTG 诱导的含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品以及对照质粒 PET-3a 转化的 BL21 (DE3) 中添加 IPTG 后的样品中均没有相应的免疫带. 在蛋白质印迹分析中, 我们对结合样品的硝酸纤维素滤膜进行了两次封闭, 使大部分非特异性带难以出现, 背景变得很浅, 特异的免疫带更加明显了. 蛋白质印迹分析说明, 在大肠杆菌中表达的 70kD 亚基具有与纯化的质子泵中相应亚基相同的免疫性能.

液泡型质子泵的 70kD 亚基和 58kD 亚基是直接结合的^[4]. 在分离纯化中, 可以得到 70kD 和 58kD 两个亚基的复合纯化物. 这表明, 70kD 和 58kD 亚基在质子泵中的作用是紧密相关的. 已相继完成了液泡型质子泵的 70kD, 58kD 和 33kD 亚基在大肠杆菌中的高效表达. 进而得到了单一的高纯度的几个表达亚基. 这对于进一步研究单个亚基以及液泡型质子泵的结构与功能将是重要的一步.

致谢 在本工作中, 高波宁博士给予指导及协

助, 蔡秀锦女士在技术上进行帮助. 在此一并致谢.

参 考 文 献

- 1 Bowman E J, Mandala S, Taiz L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 48
- 2 Mandala S, Taiz L. J Biol Chem, 1986; **261**: 12850
- 3 Stone D K, Xie X S. Kidney Int, 1988; **33**: 767
- 4 Xie X S, Stone D K. J Biol Chem, 1988; **263**: 9859
- 5 Frederick M A, Roger B, Robert E K *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, John Wiley & Sons, 1989; 1.13
- 6 Hirsch S, Strauss A, Masood K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 3004
- 7 张 瑛, 彭生斌, Stone D K 等. 生物化学与生物物理进展, 1994; **21** (4): 334
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1.85
- 9 Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J *et al.* Methods in Enzymology, 1990; **185**: 60
- 10 Laemmli U K. Nature (London), 1970; **227**: 680
- 11 Xie X S, Stone D K, Racker E. Methods in Enzymology, 1988; **157**: 634
- 12 Burnette W N. Anal Biochem, 1981; **112**: 195

大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症的心肌膜损伤*

董传仁 喻学刚 汪学军

(湖北医科大学病理生理学教研室, 武汉 430071)

摘要 通过大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症的模型证实, 两者均有明显的生物膜损伤, 主要表现为膜磷脂的降低、胆固醇及胆固醇/磷脂比增高、膜脂流动性及膜酶 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) 活性降低, 这些异常变化与氧自由基引发的脂质过氧化增强或脂质交换有关.

关键词 磷脂类/药效学, 脂质体/药效学, 心肌, 血液灌注, 细胞膜/病理学

生物膜具有多种重要的生理功能, 最近认为, 生物膜损伤是心肌细胞由可逆性损伤转化为非可逆性损伤的早期特征和重要标志^[1], 但因导致生物膜损伤的原因、实验对象及方法的不同, 人们对生物膜损伤的特征性表现的认识

尚不充分^[2]. 本文通过大鼠心肌缺血/再灌及高脂血症模型, 探讨不同原因导致的心肌损伤其生物膜改变的共同表现形式及机制, 旨在为

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1993-05-31, 修回日期: 1993-11-29

Vector. Zhang Tonghai, Song Shiduo, Zhao Weicheng, Chen Kunming, Qi Wei, Hu Wenzhi, Wang Peifu, Fang Peihua. (*Department of Internal Medicine, The Second Teaching Hospital Tianjin Medical College, Tianjin 300211*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 338—341

A cDNA fragment encoding mature salmon growth hormone (sGH) was successfully amplified by polymerase chain reaction and the restriction recognition sequences were respectively introduced into the 5' end and 3' end of the amplified fragment. The recombinant secretion vector pOsGH153 containing genes coding for the *E. coli* ompA signal peptide and mature sGH was constructed and confirmed by restriction enzyme analysis and Southern blot hybridization with the oligonucleotide probe. Upon induction of IPTG, the sGH was expressed in *E. coli* cells and was secreted into the *E. coli* periplasma.

Key words salmon growth hormone, secretion vector, periplasma expression, *E. coli*

Expression of the Genes of the 70kD and 33kD Subunits of the Bovine Brain Vacuolar Proton Pump in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 342—347

The genes of the 70kD and 33kD subunits of the bovine brain vacuolar proton pump have been successfully expressed in *E. Coli*. The fragment of the gene of 70kD subunit was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from an isolated cDNA encoding the 70kD subunit of the bovine brain vacuolar proton pump.

The fragment of the gene of 33kD subunit was also obtained by PCR from the bovine brain cDNA library. Two clones encoding 70kD and 33kD subunits were individually obtained by directly joining the PCR products into PET vector. Sodium dodecyl sulfate (SDS) -polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression.

Key words vacuolar proton pump, 70kD and 33kD subunits, expression of genes

Myocardial Membrane Injury of Myocardial Ischemia/Reperfusion and Lipidaemia in Rat. Dong Chuanren, Yu Xuegang, Wang Xuejun. (*Department of Pathophysiology, Hubei Medical University, Wuhan 430071*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 347—350

Through the experiment model of the myocardial ischemia/reperfusion and lipidaemia in rat, both of them obviously induce membrane injury: a drop of membrane phospholipids, an increase in content of free fatty acids, cholesterol and cholesterol/phospholipid ratio, a decrease in membrane lipids fluidity and activity of membrane enzymes (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase). These alterations perhaps related to the increase of lipids hyperoxidation induced by free radical and exchange of lipids.

Key words phospholipids/PD, liposomes/PD, myocardium, hemoperfusion, cell membrane

Effects and Interaction of Angiotensin II and Opioids on Fos Protein Expression. Chen Suzhen, Han Jisheng. (*Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 350—352