

# 人红细胞带 3 蛋白胞质段的克隆及其表达\*

李 至 彭 锋 季朝能 宦春雷 张志鸿<sup>1)</sup>

(复旦大学生命科学学院, 立人实验室, 上海 200433)

**摘要** 人红细胞带 3 蛋白胞质段 (cytoplasmic domain of band 3, cdb3) 起着将膜与膜骨架、细胞内环境相联系的重要作用. 以带 3 蛋白全长基因为模板, 用 PCR 方法扩增出 cdb3 片段, 克隆至 pRSET 表达质粒上, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3). 转化菌经诱导表达出较高含量的 cdb3 蛋白, 纯化后, 测得对醛缩酶有抑制活性.

**关键词** 带 3 蛋白, 胞质段, 质粒, 表达

**学科分类号** Q73

带 3 蛋白是人红细胞膜上含量最多的膜蛋白, 约占膜蛋白总量的 25%, 其单体分子质量约 100 ku, 由两部分组成: 53 ku 的跨膜段及 43 ku 的胞质段 (cdb3). cdb3 功能在于一方面将膜和膜骨架相联, 起着维持细胞特定形状以及沟通内外环境的作用, 另一方面通过与多个糖酵解酶的相互作用来调节糖酵解速率, 因而它是带 3 蛋白的一个重要结构成分<sup>[1]</sup>.

为了得到大量的 cdb3 蛋白以便于结构和功能研究, 我们将 cdb3 基因克隆到 pRSET 质粒上得到较高量的表达, 通过初步纯化得到了较高纯度的 cdb3 蛋白, 并测得它对醛缩酶活性有明显的抑制作用.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

克隆有带 3 蛋白全长基因的质粒 pHB3 为美国哈佛医学院 Lux 教授所赠; 表达载体 pRSET、菌株 BL21 (DE3)、DEAE-Sephrose CL-6B 购自 Pharmacia 公司; PCR 引物由上海生物工程基地合成; Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司及 Biolabs 公司; 其他药品和试剂均为分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1** cdb3 基因的扩增及克隆: cdb3 基因编码带 3 蛋白 N 端 379 个氨基酸. 实验中, 以 pHB3 为模板, 用含 *Nde* I 位点的 N 端引物 Pr1 和含 *Hind* III 位点的 C 端引物 Pr2 扩增 cdb3 片段. 引物序列为: Pr1 5'-TCTCATATGGAGGAGCTGCAGGATG-3' (N 端, 25mer), Pr2 5'-AGAAAGCTTTCAGAAGAGCTGGCTGTCTGCTG-3' (C 端, 32mer). PCR

反应条件: 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 120 s, 25 个循环, 72 °C 延伸 5 min. 将 PCR 产物用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后, 回收, 与同样经双酶切后回收的 pRSET 质粒片段连接, 转化感受态 DH5 $\alpha$  菌, 涂布于氨苄 LB 平板上, 挑取克隆抽质粒, 与空载体 pRSET 相比, 选取变大的质粒, 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定<sup>[2]</sup>. 进一步使用 PE 公司的测序试剂盒和 ABI 377 DNA 测序仪对酶切正确的质粒进行 DNA 序列测定.

**1.2.2** cdb3 蛋白的诱导表达: 对照人带 3 序列<sup>[3]</sup>, 将含有测序正确的 pRSET-cdb3 质粒的 BL21 (DE3) 菌, 于 LB 培养液中 (含 50 mg/L 氨苄青霉素) 37 °C 振荡培养过夜, 以 0.2% 接种于上述 LB 培养液中, 37 °C 培养至  $A_{600}$  为 0.6, 加入 1 mmol/L 的异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG), 转入 25 °C 继续诱导培养, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测全菌液.

**1.2.3** cdb3 蛋白的纯化: 4 L 培养液离心后, 将菌重悬浮于 50 ml 裂解缓冲液 (20 mmol/L, Tris, pH 7.0, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L 胍 (benzamidine), 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇, 20 mg/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 0.2% Triton) 中, 超声波破菌, 15 000 r/min 离心 15 min, 上清液加入 20 ml 经上柱缓冲液 (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇, 20 mg/L PMSF) 饱和过的 DEAE-Sephrose CL-6B 层析柱介质, 冰上放置 2 h, 不时轻晃, 再 2 000 r/min 离心 5 min, 去上

\* 国家自然科学基金资助项目 (39730150, 39570203).

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-09-11, 修回日期: 1999-01-07

清, 用 200 ml 上柱缓冲液洗 3 次, 装柱. 洗脱时, 先用含 0.2 mol/L NaCl 的上柱缓冲液洗至  $A_{280}$  为 0, 再用含 0.2 mol/L 至 0.5 mol/L NaCl 连续盐浓度梯度的上柱缓冲液洗脱, 取各组分电泳检测, 对主要成分为 cdb3 蛋白的组分用 60% 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀, 离心后  $-20^\circ\text{C}$  冻存.

**1.2.4 cdb3 蛋白活性的检测:** 在 3 ml 反应缓冲液 (3.5 mmol/L 硫酸胍 (hydrazine sulfate), pH 6.0, 0.1 mmol/L EDTA, 0.4 mmol/L 1, 6-磷酸果糖) 中加入 2  $\mu\text{g}$  兔肌肉醛缩酶, 连续记录 240 nm 波长处吸收值变化, 其斜率即代表醛缩酶的活性<sup>[4]</sup>, 5 min 后加入约一定量的 cdb3 蛋白, 观测斜率的变化; 同样情况下, 加入同量的牛血清白蛋白作为对照.

## 2 结果与讨论

### 2.1 cdb3 的克隆

PCR 扩增后用电泳检测得单一条带, 位于 1.3 kb 与 1.08 kb 之间, 与计算得到的 1.15 kb 的人 cdb3 基因相符. 通过 *Nde* I 与 *Hind* III 双酶切克隆至 pRSET 质粒中, 筛选到克隆有该 1.15 kb 片段的克隆子 pRSET-cdb3. *Nde* I 与 *Hind* III 双酶切鉴定显示, pRSET 质粒切出一条 150 bp 左右小片段, pRSET-cdb3 切出一条与 PCR 产物一样大小的片段, 表明 cdb3 基因已成功地克隆到 pRSET 质粒上.

### 2.2 cdb3 蛋白的表达

由于实验过程中发现  $37^\circ\text{C}$  下诱导无明显表达 (可能由于 cdb3 蛋白的不稳定被降解所致), 改为  $25^\circ\text{C}$  下诱导. 考虑到低温下细菌生长缓慢, 故加长诱导时间. 实验发现, 诱导后在 43 ku 处有明显的表达蛋白出现, 且表达量随时间增加而增加, 到 8~10 h 达到最多, 但在 38 ku 左右也观察到明显的降解条带, 从 6 h 以后逐渐增加, 故选择 4~6 h 为最佳诱导时间. 与已知的文献报道<sup>[5]</sup> 比较, 表达过程中不需加入氯霉素, 而且表达量较高, 达到细菌总蛋白量的 15%.

### 2.3 cdb3 蛋白的纯化

用含 NaCl 0.2~0.5 mol/L 盐浓度梯度的上柱缓冲液洗脱. 电泳检测表明, 在 0.35 mol/L 至 0.4 mol/L 之间组分主要含 cdb3 蛋白, 结果见图 1. 与文献报道<sup>[5]</sup> 相比较, 在该盐浓度梯度得到的蛋白质组分更为单一, 利于进一步纯化作晶体结构学等分析.

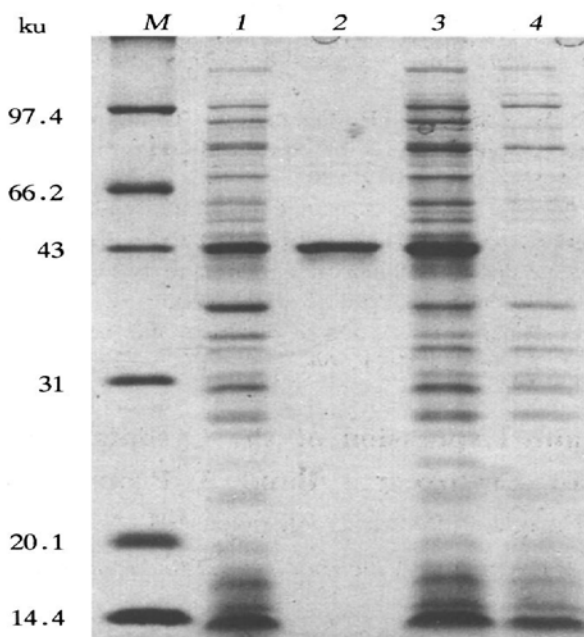


图 1 纯化产物的 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

M: 分子质量标准; 1: 菌的煮沸裂解液; 2: 纯化产物; 3: 超声破菌上清液; 4: 加入柱层析介质吸附后的上清液.

### 2.4 cdb3 蛋白的活性测定

在反应体系中加入约 20  $\mu\text{g}$  的纯化 cdb3 蛋白后, 反应速率降为原来的 20% 左右, 而加入同量的牛血清白蛋白则无明显变化, 表明经纯化的 cdb3 保持有生物活性.

cdb3 虽不直接参与带 3 蛋白转运阴离子, 但迄今有不少研究证实: 若改变血红蛋白、膜骨架蛋白、ankyrin 蛋白、带 4.2 蛋白等和 cdb3 的亲合性, 则膜对阴离子的转运特性也会发生改变. 因而提出 cdb3 段似一“杠杆”, 它能将带 3 蛋白胞质部分的微小变化“放大”并传至跨膜段, 从而起到调控作用, 此即“远距离作用”<sup>[6]</sup>. 此外, cdb3 和骨架蛋白、胞质组分的相互作用还影响到细胞的机械稳定性、细胞内代谢的速率, 而且它还会通过带 3 蛋白在膜上聚集状态的改变影响红细胞在体内循环中被清除的速率. 本研究的目的是用克隆表达的方法, 大量制备均一的 cdb3, 以供作 cdb3 和其他蛋白质相互作用的结构机制研究. 进一步结晶后则能有望从 X 射线晶体结构分析作更深入的探讨.

## 参 考 文 献

- 1 Reithmeier R A F. The erythrocyte anion transporter (band 3). *Curr Opin Struct Biol*, 1993, 3: 515~523
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 6.30

- 3 Lux S E, Kathryn M J, Kopito R R, *et al.* Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (23): 9089~9093
- 4 Low P S, Allen D P, Zinocheck T F, *et al.* Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. *J Biol Chem*, 1987, **262** (10): 4592~4596
- 5 Wang C C, Badylak J A, Lux S E, *et al.* Expression, purification, and characterization of the functional dimeric cytoplasmic domain of human erythrocyte band 3 in *Escherichia coli*. *Protein Science*, 1992, **1** (9): 1206~1214
- 6 Golan D E, Agre P. Action at distance: another lesson from the red cell. *Biophys J*, 1994, **66** (5): 1271~1272

**Cloning and Expression of the Cytoplasmic Domain of Human Erythrocyte Band 3 Protein.** LI Zhi, PENG Feng, JI Chao-Neng, HUAN Chun-Lei, ZHANG Zhi-Hong (*School of Life Sciences, Fudan*

*University, Li Ren Laboratory, Shanghai 200433, China*).

**Abstract** The cytoplasmic domain of human erythrocyte band 3 (cdb3) plays an important role in connection of the membrane with the membrane skeleton, and environment inside the cell as well. With whole length of band 3 gene, cdb3 gene was amplified by PCR and then was cloned into pRSET plasmid. The plasmid was introduced into *E. coli* BL21 (DE3). The cdb3 expression proteins were purified and its function was verified according to the ability to inhibit aldolase.

**Key words** band 3 protein, cytoplasmic domain, plasmid, expression