

研究报告

调宁蛋白 T184 的定点突变、表达、纯化和鉴定*

曹 圣 唐大椿 骆建云

(同济医科大学病理生理教研室, 卫生部呼吸系疾病重点实验室, 武汉 430030)

摘要 为增强调宁蛋白对平滑肌收缩的抑制作用, 用 PCR 重叠延长法使调宁蛋白基因中编码第 184 位苏氨酸的 ACT 突变为编码丙氨酸的 GCC, 将此 PCR 的突变产物装入到质粒载体 pAED₄ 后, 转化至 *E. coli* BL₂₁ (DE₃) 中, 构建的重组转化子用酶切和测序鉴定. 诱导含有重组转化子的 *E. coli* 获得高效表达, 经 SDS-PAGE 和蛋白质印迹鉴定后, 采用反复冻融法及葡聚糖凝胶层析柱分离, 初步纯化出调宁蛋白突变体 T184A.

关键词 调宁蛋白, 定点突变, 表达, 纯化

学科分类号 Q51, Q343.1, R322.7

调宁蛋白 (calponin) 是平滑肌特有的一类蛋白质, 它与肌动蛋白结合, 通过下调肌球蛋白 ATP 酶活性抑制平滑肌的收缩. 当调宁蛋白发生磷酸化后, 它的抑制作用消失, 平滑肌收缩加强^[1]. 调宁蛋白磷酸化可为蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和钙/钙调素依赖性蛋白激酶 (Ca^{2+} /camodulin dependent protein kinase, CaMK II) 催化, 主要磷酸化位点为丝氨酸 175 和苏氨酸 184, 2A 型平滑肌磷酸酶和 I 型平滑肌肌球蛋白磷酸酶可使调宁蛋白脱磷酸, 恢复其抑制 ATP 酶活性能力. 我们以往的工作表明, 用丙氨酸代替第 175 位上的丝氨酸, 其磷酸化程度明显减少, 而且丝氨酸 175 是调宁蛋白与肌动蛋白结合的重要位点^[2], 当它被丙氨酸代替, 该突变体丧失与肌动蛋白结合的能力.

尽管苏氨酸 184 为调宁蛋白的另一主要磷酸化位点, 但对其在调宁蛋白与肌动蛋白之间的关系以及调控平滑肌收缩性等方面的作用, 仍不清楚. 为阐明这一问题, 本文采用基因定点突变法, 将调宁蛋白第 184 位苏氨酸 (含羟基) 密码子替换为丙氨酸 (不含羟基) 密码子, 获得调宁蛋白突变体 T184A (第 184 位苏氨酸被丙氨酸替代), 并进行了初步纯化, 为以后的研究提供了基础.

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株: 大肠杆菌 *E. coli* BD₂₁ (DE₃) 系本室保存菌种.

1.1.2 质粒: 含有 T7 启动子的表达调宁蛋白的

质粒 pAED₄^[3] 由本室所保存.

1.1.3 酶和试剂: 各种限制性内切酶, 连接酶, Taq 酶为 GIBCO 产品; DNA 分子质量标准, PCR 试剂, T7 启动子引物和 PET 通用引物均购于华美公司; 调宁蛋白 IgG 抗体由美国德州大学惠赠; 其他生化试剂均为国产 AR 级试剂.

1.2 方法

1.2.1 质粒的抽提、酶切、连接及转化, 均按文献 [4] 进行.

1.2.2 调宁蛋白 T184A 突变体的设计及其表达质粒的构建: 参见图 1, 以调宁蛋白 cDNA 为模板, 用人工合成的 DNA 片段作引物, 运用 PCR 重叠延长法进行定点突变, *Eco*R I 和 *Nde* I 酶切最终的 PCR 产物, 连接到用 *Eco*R I 和 *Nde* I 处理过的 pAED₄ 载体上, 并转化到 *E. coli* BD₂₁ (DE₃) 中.

1.2.3 调宁蛋白 T184A 突变体 cDNA 的酶切鉴定和测序: 提取转化子以 *Eco*R I 和 *Nde* I 双酶切鉴定重组片段大小, 用 ABI 公司的 373A 型 DNA 测序仪进行重组质粒 DNA 序列测定.

1.2.4 诱导表达及 SDS-PAGE: IPTG 诱导 T7 启动子以表达调宁蛋白 T184A 突变蛋白, SDS-PAGE 分析所表达的蛋白并用 CS-910 色谱扫描仪检测其含量.

1.2.5 用反复冻融法和 Sephadex G-50 初步纯化重组蛋白: 参见文献 [3].

1.2.6 蛋白质印迹法 (Western blotting) 鉴定: 参见文献 [4].

* 国家自然科学基金资助项目 (39670833).

收稿日期: 1997-08-08, 修回日期: 1997-12-02

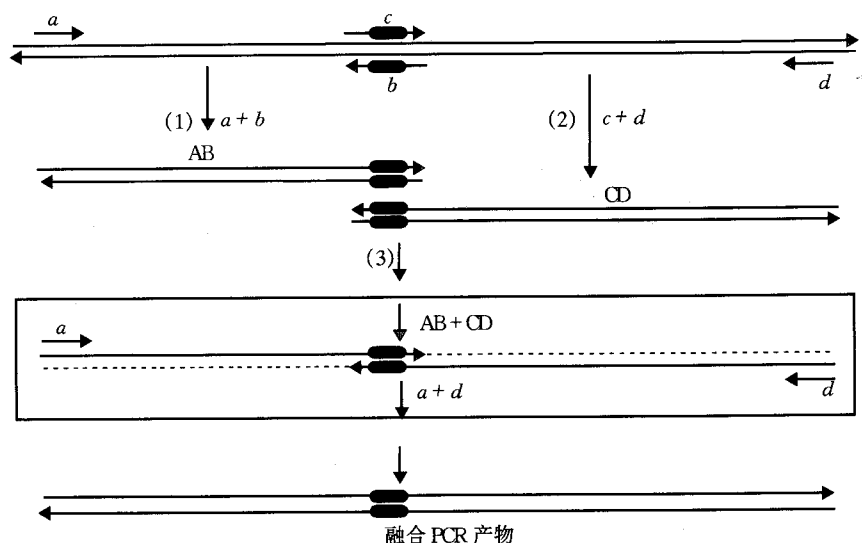


图1 PCR重叠延长法定点突变调宁蛋白 cDNA

a, d : T7 启动子引物和 PET 通用引物; b, c : 含有突变密码子 (黑方块) 的寡核苷酸引物 1、引物 2; AB: 上片段; CD: 下片段. 引物 1: 5'GCCTCCG GGCCCCATAGGC3'; 引物 2: 5'GCCTATGGG GCCCGGAGGC3' (下划线为突变密码子).

2 结果

2.1 调宁蛋白基因的定点诱变

首次 PCR 获得上、下片段, 分子质量分别为 352 bp 和 566 bp (图 2a, 2b), 然后采用 PCR 重叠延长法扩增出已带有突变密码子的调宁蛋白全长 cDNA 片段 (图 2c).

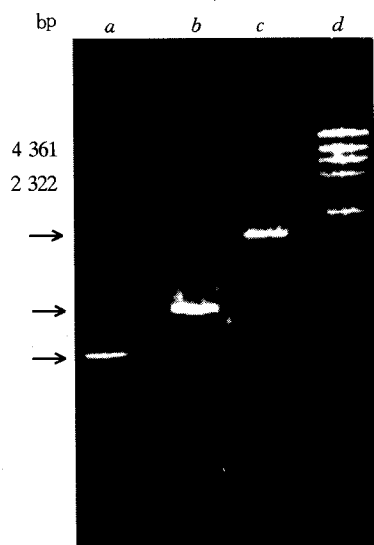


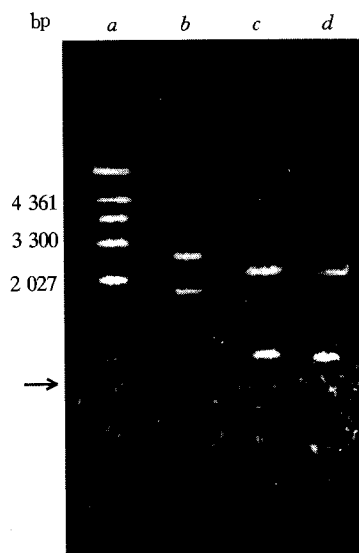
图2 PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图谱

a : 上片段; b : 下片段; c : 融合 PCR 产物 (含有突变密码子的调宁蛋白 cDNA); d : λ DNA + *Hind*III 分子质量标准.

2.2 表达质粒的构建及其酶切和测序鉴定

筛选转化菌落, 抽提重组质粒, 经酶切鉴定,

结果如图 3, 可见 3.3 kb 的载体片段和 0.9 kb 的插入片段, 它与 PCR 扩增产物长度一致. 重组片段中引入的突变位点为测序所证实.

图3 重组质粒 pAED₄ 的酶切图谱

a : λ DNA + *Hind*III 分子质量标准; b : 重组质粒 pAED₄; c, d : 经 *Eco*RI 和 *Nde*I 双酶切.

2.3 诱导表达和纯化

用 IPTG 诱导含有重组质粒的 *E. coli* BD₂₁ (DE₃) 16 h 后, 如图 4b 所见, 重组蛋白获得高效表达, 其分子质量约 34 ku; 色谱扫描仪检测显示, 重组蛋白占菌体总蛋白的 15% ~ 20%, 将菌体反复冻融, 葡聚糖柱层析纯化冻融上清液后, 重组蛋白含量在 80% 以上 (图 4a).

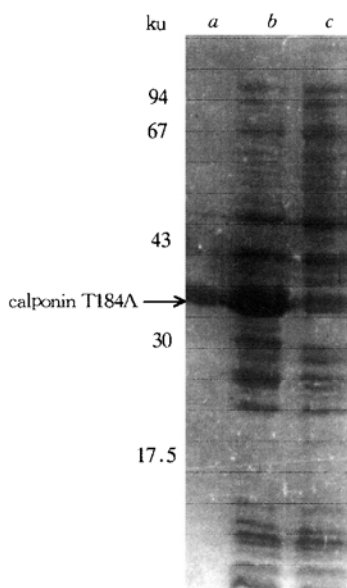


图4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

a: 经纯化的重组蛋白; b: 经 IPTG 诱导表达的细菌总蛋白; c: 对照细菌总蛋白。

2.4 蛋白质印迹法鉴定

采用调宁蛋白的 IgG 抗体进行免疫印迹反应, 图 5 表明高效表达的重组蛋白及纯化产物均为突变的调宁蛋白 cDNA 所编码的蛋白质。

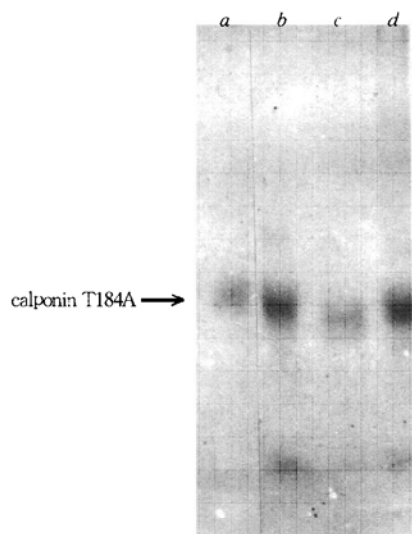


图5 蛋白质印迹结果

a, c: 经 IPTG 诱导表达的细菌总蛋白; b, d: 经纯化的重组蛋白。

3 讨 论

平滑肌收缩调节的信号传导主要包括肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 和 PKC 途径, 各类激动剂与相应受体结合后, 通过

G 蛋白的活化, 进而激活磷脂酶 C, 后者水解磷酸酰肌醇二磷酸 (phosphatidylinositol 4, 5-phosphate, PIP₂) 生成三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP₃) 和甘油二酯 (diacylglycerol, DAG). DAG 可激活 PKC, 使调宁蛋白和 caldesmon 磷酸化, 导致肌球蛋白 ATP 酶活性上升, 平滑肌收缩^[5, 6]; 脱磷酸化调宁蛋白能恢复抑制 ATP 酶活性的能力, 使平滑肌舒张, 这是平滑肌由收缩转为舒张状态的一种机制^[7, 8]。

平滑肌收缩的分子机理是当前研究的一个热点问题, 治疗其相关疾病时, 抑制平滑肌收缩所使用的药物和生物活性分子层出不穷^[9], 但如何在信息传递的下游抑制平滑肌的收缩, 进展不大, 暂时难以开发特异的平滑肌收缩抑制剂^[10]. 因此, 不少学者把研究重点集中在调宁蛋白上。

本文选用含有突变碱基 (编码调宁蛋白第 184 位苏氨酸的 ACT → GCC) 的寡核苷酸引物 1、引物 2 和通用 T7 启动子与 PET 引物, 以调宁蛋白 cDNA 为模板, 用 T7 启动子引物与引物 1、引物 2 与 PET 通用引物分别进行扩增, 获得已带有突变密码子的上游和下游两个片段 (图 2a, 2b), 将上、下片段混合在一起, 再做一次融合 PCR 得到完整的带有突变密码子的调宁蛋白 cDNA 全长片段 (图 2c), 将其定向克隆到含有 T7 启动子的质粒载体 pAED₄ 中, 转化 *E. coli* BD₂₁ (DE₃), 扩增后, 抽提质粒, 酶切鉴定结果与预期相符 (图 3), 重组片段经测序后, 确认定点突变成功. 构建含有调宁蛋白 T184A 突变体 cDNA 的表达载体工作完成后, 用 IPTG 诱导其表达, 经 SDS-PAGE 电泳, 色谱扫描仪测定其表达量达 15%, 说明调宁蛋白 T184A 已获得高效表达 (图 4b). 蛋白质印迹证实该条带为含有突变密码子的调宁蛋白的产物 (图 5a, 5c). 我们使用反复冻融法结合葡聚糖凝胶柱层析方法, 初步纯化了调宁蛋白突变体 T184A, 纯度达 80% 以上, 经过蛋白质印迹鉴定, 也被确证 (图 4a, 5b, 5d)。

如前所述, 调宁蛋白 T184 磷酸化后可降低其对平滑肌收缩的抑制作用, 因此, 我们将不能被磷酸化的丙氨酸 (A) 来替代 T184, 获得的诱变体 T184A, 能减少调宁蛋白的磷酸化, 增强调宁蛋白对平滑肌收缩的抑制作用, 并且由于已获得初步纯品, 为进一步研究该诱变产物对平滑肌收缩的影响, 及其对于平滑肌收缩增强的相关疾病如高血压、肺动脉高压、哮喘等治疗作用的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 唐大椿, 向继洲, 鲁文彤 (Tang D C, Xiang J Z, Lu W T). 一种新的平滑肌调控蛋白 Calponin. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1996, **23** (4): 325~ 329
- 2 Tang D C, Kang H M, Jin J P, *et al.* Structure-function relations of calponin. Biophys J, 1995, **68** (2Pt2): A163
- 3 曹 圣, 唐大椿, 骆建云 (Cao S, Tang D C, Luo J Y). 冻融对分离重组蛋白影响的实验研究. 同济医科大学学报 (Acta Universitatis Medicinal Tongji), 1997, **26** (1): 67~ 68
- 4 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼可 T (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T). 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南 (Molecular cloning: a laboratory manual). 北京 (Beijing): 科学出版社 (Science Press), 1992. 23~ 371
- 5 Winder S J, Walsh M P. Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. Cell Signal, 1993, **5** (6): 677~ 682
- 6 Sobue K, Sellers J R. Caldesmon: a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. J Biol Chem, 1991, **266** (19): 12115~ 12118
- 7 Tang D C, Stull J T, Kubota Y, *et al.* Regulation of Ca^{2+} dependence of smooth muscle contraction. J Biol Chem, 1992, **267** (17): 11839~ 11845
- 8 Hiromitsu N, Katsuhiko S, Minoru S, *et al.* Phosphorylation of calponin by PKC is blocked by F-actin *in vitro*. Biochem and Biophys Res Comm, 1994, **203** (3): 1502~ 1507
- 9 王迪浚 (Wang D X). 病理生理学 (Pathophysiology). 北京: 人民卫生出版社, 1994. 147~ 437
- 10 Kolakowski J, Makuch R, Stepkowski D, *et al.* Interaction of calponin with actin and its functional implications. Biochem J, 1995, **306** (Pt1): 199~ 204

Construction, Expression and Purification of Calponin T184A: a Mutant of Calponin. CAO Sheng, TANG Da-Chun, LUO Jian-Yun (Key Laboratory of Pulmonary Disease, Health Ministry of China; Department of Pathophysiology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China).

Abstract Calponin cDNA was site-mutated (Thr184 → Ala184) by overlap extension PCR method to reduce the opportunity for calponin to be phosphorylated by PKC or CaMK II. The PCR product was sequenced. The mutated cDNA was then recombined into an expression vector pAED₄ and transferred into, expressed in *E. coli* BD₂₁ (DE₃) induced by IPTG. The expression level was up to 15% of total bacterial proteins. Mutated calponin was liberated from *E. coli* by freezing and thawing and purified by Sephadex G-50. The recombinant protein and the purified mutant protein was identified by Western blotting.

Key words recombinant calponin, site-directed mutation, *E. coli* expression purification

TF-1 细胞凋亡相关基因的研究

刘红涛 王玉刚 张颖妹 宋泉声 敬保迁 袁 勇 马大龙

(北京医科大学卫生部医学免疫学重点实验室, 北京 100083)

摘要 利用近年来发展起来的代表差异分析 (cDNA representational differences analysis, cDNA-RDA) 技术研究了在人红白血病细胞株 TF-1 细胞撤除细胞因子后进入凋亡时诱导表达的基因. 发现了 6 个新基因片段. 其中有三个经与 GenBank nr 和 dbEST 查询均没有发现同源性, 已经向 GenBank 进行登记, 登记号分别为 U83208, U83279, U83397. 此外还发现一批已知基因的表达与凋亡相关, 其中包括 Hsp 和人硫氧还蛋白等, 提示它们在凋亡中可能起作用. 这项作为为进一步研究凋亡相关基因打下了良好基础. 通过 RDA 的研究结果, 有可能发现人白血病细胞凋亡的特异标记蛋白或发挥作用的重要蛋白, 以期对白血病治疗提供理论基础.

关键词 TF-1 细胞株, 代表差异分析, 凋亡

学科分类号 R392.1

细胞凋亡 (apoptosis) 是当前国际生物研究的热点之一. 目前已发现多种基因参与细胞凋亡, 例如 TNF/FAS 家族, BCL2 家族, ICE/CED-3 家族, 多种癌基因, 抗癌基因, 热休克蛋白等^[1]. 但由于细胞凋亡为多阶段, 多系统, 多基因参与的复杂过程, 目前对其参与的全部基因尚远未了解清

楚. 通过进一步克隆化新的凋亡诱导基因, 特别是具有启动作用的凋亡早期表达基因, 将有助于阐明凋亡机理, 为一些凋亡相关疾病特别是肿瘤的治疗提供新的思路.

收稿日期: 1997-08-28, 修回日期: 1998-01-07