

人 FKBP52 的基因克隆、表达及活性研究*

裴武红¹⁾ 贺永怀¹⁾ 陈 兴¹⁾ 李 松^{2)**} 沈倍奋¹⁾

(¹⁾北京基础医学研究所, 北京 100850; ²⁾北京毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 为获得具有生物学活性的 hFKBP52, 来筛选新型的促神经再生药物. 采用半巢式、桥联 PCR 及亲和层析方法, 从人胎脑 cDNA 文库中成功扩增出 hFKBP52 基因, 在 pET28a (+) 中实现了高效、可溶性的融合表达, 表达量约 30%. 重组的蛋白质亲和纯化至电泳纯, 纯化后的 hFKBP52 显示出肽基脯氨酸顺反异构酶活性. 表明原核表达的 hFKBP52 具有类似于其天然蛋白质的生物学活性.

关键词 人 FKBP52, 基因克隆, 原核表达, 肽基脯氨酸顺反异构酶

学科分类号 R392.11

FK506 这种大环内酯类化合物, 在临床上用作免疫抑制剂已有很多年了. 在 1994 年, 人们意外地发现 FK506 具有促损伤神经再生的生物学效应^[1]. 其广阔的临床应用前景, 吸引了很多学者来研究其作用机理, 尤其是对其结合蛋白 (FK506 binding protein, FKBP) 的研究. 早期的研究认为, FKBP12 是 FK506 神经效应的直接介导者^[2~4], 近两年的研究提供了更多的证据, 支持 FKBP52 蛋白是 FK506 的神经效应介导者^[5,6]. 为深入研究 FK506 的作用机理, 本文克隆了人 FKBP52 的基因, 实现了其高效、可溶性表达, 并测定了它的肽基脯氨酸顺反异构酶活性, 为筛选出更有效的促损伤神经再生剂奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

pET28a (+) 质粒、BL21 (DE)、BL21 (DE) plysE 菌株为本实验室保存; 工具酶 *Nde* I、*Sal* I、T4DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 基因克隆及表达的引物由上海生物工程公司合成; 钴离子亲和层析柱购自 Clontech 公司, 测活底物 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- ρ -nitroanilide (AAPF) 购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计: 根据已发表的人 FKBP52 基因序列及 GenBank 同源检索结果, 进行了 PCR 引物设计. 共设计引物五条, 它们分别是: P1: 5' ACC AGC TCC CGG ATA AA 3'; P2: 5' GAGGATCC AT ATG ACA GCC GAG GAG ATG 3';

P3: 5' ATG AAT TCA GAA GAG AAG CTG GAA CAG AGC 3'; P4: 5' GCT CTG TTC CAG CTT CTC TTC TGA ATT CAT 3'; P5: 5' CTC GAG TCG ACTA TGC TTC TGT CTC 3'.

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化: 参照 pET28a (+) 中外源基因的表达方法, 用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测. 发酵菌体用 PBS 悬浮, 冰浴超声破碎, 超声上清直接过钴离子亲和柱, 参照亲和柱使用说明书进行蛋白质纯化.

1.2.3 重组蛋白的生物活性研究: 测定其肽基脯氨酸顺反异构酶活性, 测定方法^[7]: 反应体积 1 ml, 反应于室温进行. 在 865 μ l 反应缓冲液 (50 mmol/L Hepes, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中, 加入 10 μ l 700 nmol/L 纯化的 hFKBP52 蛋白 (对照组加入不含 hFKBP52 蛋白的缓冲液), 混合后移至分光光度计比色杯中, 加入 100 μ l 4 g/L 的 α -胰凝乳蛋白酶后, 立即加入 25 μ l 含 3 mmol/L AAPF 底物的 400 mmol/L 氯化锂/四氢呋喃溶液, 迅速混合, 测定 390 nm 的吸光值 (A_{390nm}), 每 5 秒记录一次.

2 结果与讨论

2.1 hFKBP12 基因克隆

根据文献 [8] 报道, hFKBP52 基因具有以下几个特点: a. 在正常人体的各种组织中丰度都较

* 国家“973”创新药物基金资助项目 (G1998051107).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931250, E-mail: E-mail: Qn_Sli@yahoo.com

收稿日期: 2000-04-17, 接受日期: 2000-06-19

低; b. 与人体中许多基因具有部分同源性; c. 其 cDNA 编码区及非编码区都具有较高的 GC 含量. 为成功获取此基因, 我们采取了相应的措施: a. 选择其丰度相对较高的人胎脑 cDNA 文库为扩增模板; b. 根据文献发表的 hFKBP52 cDNA 的序列, 设计了 hFKBP52 基因克隆引物 (P2、P5). 另外, 我们在 GenBank 数据库中进行了同源检索, 发现此基因, 尤其是编码起始区, 与许多基因同源性都很高. 依据检索结果, 我们在基因的 5' 端起始密码子 ATG 的上游设计了一个前导引物 (P1), 并在基因中部某特定区域, 设计了完全反向互补的两条桥联引物 (P3、P4) (图 1); c. 鉴于基因 GC 含量高的特点, 我们在 PCR 反应中, 除了提高退火温度外, 还有意识地加入了 5% 甲酰胺, 以提高扩增的特异性.

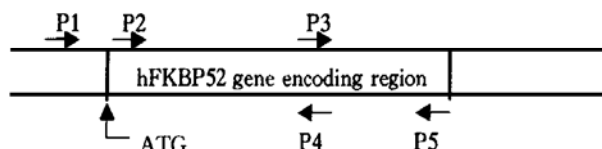


Fig. 1 The primers and their location in gene hFKBP52

PCR 扩增的策略: 首先, 以人胎脑 cDNA 文库为模板, 分别以 P1 和 P4 引物配对、P3 和 P5 引物配对, 进行 PCR 扩增, 分别获得了约 850 bp、600 bp 的 PCR 条带. 然后, 将两条带纯化, 以 1:1 比例混合, 作为 PCR 的模板, 以 P2、P5 为引物进行半巢式、桥联 PCR 扩增, 特异性扩增出预期约 1.4 kb 的 PCR 条带. 扩增产物克隆于 pGEM T-easy 载体, 进行测序, 测序结果证明所扩增基因与文献报道的 hFKBP52 基因序列完全一致 (图 2).

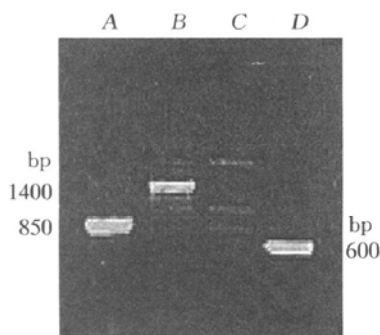


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of cloned hFKBP52 from overlap PCR

A: up-half fragment PCR by primer P1 and P4; B: whole length PCR by primer P2 and P5; C: DL2000 marker; D: down-half fragment PCR by primer P3 and P5.

2.2 hFKBP52 基因的表达及条件优化

将 1.4 kb 的 PCR 片段, 经 *Nde* I、*Sal* I 酶切, 克隆到 pET28a (+) 表达载体, 转入宿主菌中进行表达. 在宿主菌的选择中, 我们使用了 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) plysE 两种菌株. 表达结果表明, BL21 (DE3) plysE 的表达水平高于 BL21 (DE3), 用这种宿主可使转入质粒稳定性提高, 转录水平降低, 有利于蛋白质表达. 同时, 研究发现, 诱导条件的不同, 会直接影响到表达产物的可溶性程度. 我们选择低诱导剂 (IPTG 0.2 mmol/L)、低诱导温度 (30 °C), 获得了可溶性表达的 His-FKBP52 蛋白.

2.3 hFKBP52 融合蛋白的纯化

诱导菌经洗涤后, 悬于 10 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 2 mmol/L DTT (pH 8.0) 溶液中, 冰浴超声破碎, 超声上清直接过钴离子亲和柱, 进行蛋白质纯化. 在 50 mmol/L 咪唑条件下, 洗脱得到电泳纯的 His-FKBP52 蛋白 (图 3).

在 His-FKBP52 蛋白的纯化中, 最初参照亲和柱使用说明书, 在层析系统中用 100 mmol/L NaCl, 结果发现, 目标蛋白的纯度很差. 后来, 我们有意地提高了 NaCl 的浓度, 发现在 500 mmol/L NaCl 时, 纯化效果较好.

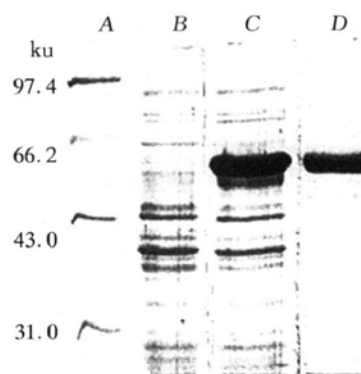


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant hFKBP52

A: molecular weight marker; B: uninduced engineering bacteria; C: induced engineering bacteria; D: purified hFKBP52 protein.

2.4 肽基脯氨酰顺反异构酶的活性

在测定 hFKBP52 的 PPIase 活性测定中, 我们采用 1994 年文献报道方法, 用氯化锂/四氢呋喃代替常规的二甲亚砷、甲醇, 作为底物 AAPF 的溶解液, 提高了其中 Pro-Ala 肽键处于顺式构象的比例, 有利于 hFKBP52 这种肽基脯氨酰顺反异构酶

协助其向反式构象的转变,从而使测定结果更加灵敏、准确。

我们将纯化的 hFKBP52, 以 7 nmol/L 浓度测定其 PPIase 活性。结果显示, 复性后的 hFKBP52

具有较强的 PPIase 活性 (图 4), 其活性明显弱于 hFKBP12 蛋白的活性^[9], 这与文献报道一致, 表明我们表达的重组 hFKBP52 是具有生物学活性的, 从而为以后的药物筛选工作奠定了基础。

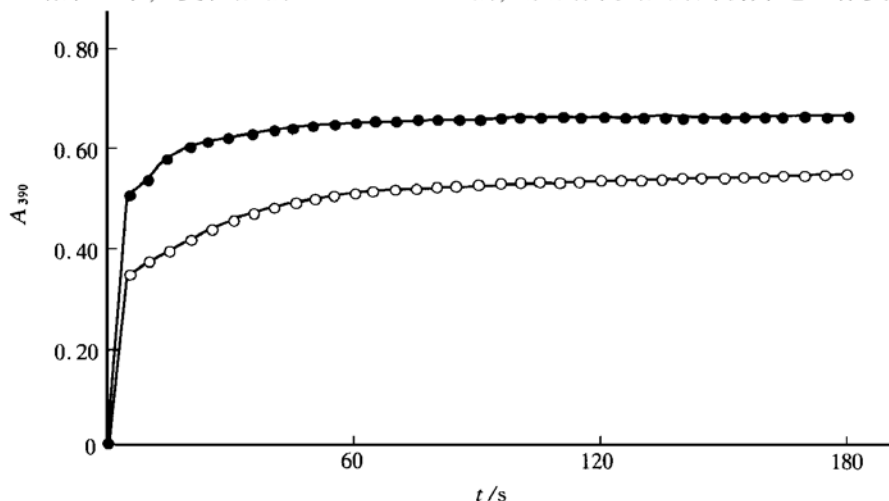


Fig. 4 α -chymotrypsin coupled chromogenic assay of PPIase activity of purified hFKBP52

●—●: 7 nmol/L hFKBP52; ○—○: No hFKBP52.

对于 hFKBP12、hFKBP52 谁是 FK506 神经效应的介导者, 目前仍无定论。hFKBP12 在人体各组织中含量都很高, 而低剂量的 FK506 诱导的神经效应, 仿佛并非是通过与 hFKBP12 结合, 抑制其活性而引起的。而且, 也有文献报道, hFKBP 的肽基脯氨酸顺反异构酶活性与神经效应并无直接的关系。1999 年的多篇文献报道, hFKBP52 是神经效应的介导者, 并试图借助 hFKBP12 基因敲除鼠实验、抗体阻断及激素刺激实验来证实自己的观点。人们早已知道, hFKBP52 是热休克蛋白 90, 即类固醇激素受体复合物的成分, 这一复合物所介导的生物学效应复杂多样。要弄清 hFKBP52 究竟怎样介导神经效应, 恐怕也并非易事。我们用原核方法表达 hFKBP52, 对这一方面的研究有一定的帮助。FK506 的神经效应, 在理论研究及临床应用都具有重要意义, 相信会吸引更多的专家致力于这一领域的研究, 从而早日理清迷津。

参 考 文 献

- 1 Hamilton G S, Steiner J P. Immunophilins: Beyond immunosuppression. *J Med Chem*, 1998, **41** (26): 5119~ 5143
- 2 Snyder S H, Sabatini D M, Lai M M, *et al.* Neural action of immunophilin ligands. *Trends Pharmacol Sci*, **19** (1): 21~ 26
- 3 Steiner J P, Hamilton G S, Ross D T, *et al.* Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerated animal models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (6): 2019~ 2023
- 4 Gold B G, Densmore V, Shou W, *et al.* Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, **289** (3): 1202~ 1210
- 5 Sabatini D M, Lai M M, Snyder S H. Neural action of immunophilin and their ligands. *Mol Neurobiol*, 1997, **15** (2): 223~ 239
- 6 Chambraud B, Radanyi C, Camonis J H, *et al.* Immunophilins, refsum disease, and lupus nephritis: The peroxisomal enzyme phytanoyl-CoA α -hydroxylase is a new FKBP-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (5): 2104~ 2109
- 7 Kofron J L, Kuzmic P, Kishore V, *et al.* Determination of kinetic constants for peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*, 1991, **30** (25): 6127~ 6134
- 8 Peattie D A, Harding M W, Fleming M A, *et al.* Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associate with the 90-KDa a heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (22): 10974~ 10978
- 9 裴武红, 李松, 沈倍奋, 等. 人 FKBP12 基因的克隆表达及活性研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (3): 19~ 21
- Pei W H, Li S, Shen B F, *et al.* *Chin Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (3): 19~ 21

The Gene Cloning, Expression and Bioactivity of the Human FKBP52*

PEI Wu-Hong¹⁾, HE Yong-Huai¹⁾, CHEN Xing¹⁾, LI Song^{2)**}, SHEN Bei-Fen¹⁾

(¹⁾ Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²⁾ Beijing Institute of pharmacology and toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract To obtain active hFKBP52 protein for screening novel neurotrophic drugs. Semi-nested and overlap PCR and affinity chromatography were used. hFKBP52 gene was cloned successfully from human fetal brain cDNA library, and then highly expressed (about 30%) as fusion protein in pET28a (+) vector system. The recombinant protein was purified as one band on SDS-PAGE. The purified hFKBP52 showed peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity, similar to the wild type.

Key words hFKBP52, gene clone, proyoatic expression, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase

* This work was supported by the Ministry Science and Technology of China (G1998051107).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931250, E-mail: Qn_Sli@yahoo.com

Received: April 17, 2000 Accepted: June 19, 2000