

苏明慧,汪一荣,杨艳梅,等. 细胞色素 C 氧化酶亚基 Cox4 的克隆及高效表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):31-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.008

细胞色素 C 氧化酶亚基 Cox4 的克隆及高效表达

苏明慧,汪一荣,杨艳梅,商中杰

(南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210046)

摘要:Cox4 是电子传递链上复合体Ⅳ的 1 个关键亚基,实现 Cox4 的高效表达以及制备其抗体,对于线粒体功能研究至关重要。根据裂殖酵母序列信息数据库(*S. pombe*_GeneDB)中 *cox4* 的基因序列(登录号:SPAC1296.02)设计引物,以粟酒裂殖酵母的 cDNA 序列为模板,通过 PCR 扩增技术得到目标蛋白的基因,然后通过克隆构建到含有 T7 强启动子的表达载体 pET-28a(+)上,并将其转入大肠杆菌 BL21(*Escherichia coli* BL21)中实现重组工程菌株的构建。结果表明,通过一系列条件优化实现了对重组工程菌株中 Cox4 的高效表达,并纯化得到大量相应蛋白,最后以纯化的蛋白为抗原成功制备了 Cox4 抗体。Cox4 抗体的成功制备为粟酒裂殖酵母中线粒体功能研究奠定了基础。

关键词:线粒体;粟酒裂殖酵母;细胞色素 C 氧化酶;Cox4

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0031-03

线粒体有自己的基因组,是一种半自主性的细胞器^[1-2],几乎存在于所有真核生物中。线粒体能够进行氧化磷酸化和三磷酸腺苷(ATP)的合成,是有氧呼吸的主要场所^[3-4],可为细胞的生命活动提供能量,被称为细胞内的发动机^[5]。同时,线粒体还参与调控细胞的信息传递、细胞的凋亡和细胞的分化等一系列生理过程,并且还对细胞生长和细胞周期进行调控^[6],因此,线粒体对细胞的生长至关重要^[5]。氧化磷酸化是一个电子传递过程,依赖于线粒体的电子传递链。线粒体的电子传递链对于线粒体功能的正常发挥十分重要^[7],一旦电子传递链受损会引起很多疾病的发生^[8-9]。在粟酒裂殖酵母中,电子传递链由 4 种复合体组成,而组成这些复合体的蛋白是由核基因组和线粒体基因组共同编码的。细胞色素 C 氧化酶(复合体Ⅳ)是线粒体中电子传递链的末端酶,催化电子从细胞色素 C 转移到氧^[10],核编码的细胞色素 C 氧化酶亚基 4(Cox4)是其中 1 个关键亚基。由此可见,在对线粒体功能进行研究时,不可避免地需要对线粒体中构成这些复合体的蛋白水平进行检测,因此制备这些蛋白的相应抗体就显得尤为重要。本研究主要是将粟酒裂殖酵母中构成复合体Ⅳ的细胞色素 C 氧化酶亚基 Cox4 在大肠杆菌中进行高效表达,并制备相应的抗体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 粟酒裂殖酵母单倍体菌株 yHL6381[h⁺,组氨酸生物合成缺陷型(his3-D1),亮氨酸生物合成缺

陷型(leu1-32),尿嘧啶生物合成缺陷型(ura4-D18),腺嘌呤生物合成缺陷型(ade6-M210)],由南京师范大学微生物所实验室保存。质粒 pET-28a(+)为笔者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 rTaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、Solution I(货号:6022)、蛋白 marker,购自 TaKaRa 公司;DNA marker,购自北京金全生物技术有限公司;DNA 割胶回收试剂盒、PCR 过柱纯化试剂盒,购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)、琼脂粉、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、山梨醇(sorbitol)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、30%丙烯酰胺和乙二胺四乙酸(EDTA),购自索莱宝公司;酵母粉,购自 OXOID 公司;腺嘌呤、尿嘧啶、精氨酸、组氨酸、卡那霉素(Kan),购自 Sigma 公司;RNA 提取试剂盒,OMEGA(货号:R6870-00),购自南京贝纳生物技术有限公司;iScript cDNA 合成试剂盒(货号:1708890),购自南京润亚生物科技发展有限公司;PCR 引物,由南京思普金生物工程技术服务有限公司合成;常用试剂为分析纯级,购自国药集团化学试剂有限公司和生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 培养基 (1)LB 培养基配方(100 mL):1 g 胰蛋白胨,0.5 g 酵母粉,1 g 氯化钠,在固体培养基中添加 2 g 琼脂粉。(2)LB + Kan 培养基:在 LB 培养基中添加卡那霉素至终浓度为 50 mg/L。(3)YES 培养基配方(100 mL):3.0 g 葡萄糖,0.5 g 酵母粉,22.50 mg 腺嘌呤,22.50 mg 尿嘧啶,22.50 mg 亮氨酸,22.50 mg 组氨酸。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计 根据裂殖酵母序列信息数据库(*S. pombe*_GeneDB)中登录号为 SPAC1296.02 的基因序列,通过 <https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html> 预测线粒体定位序列,将线粒体定位序列去掉后,设计上下游特异性引物,在正向引物的 5'端加入 *Nde*I 酶切位点,在互补链引物的 5'端加入 *Xho*I 酶切位点(下划线分别表示 *Nde*I、*Xho*I 酶切位点):正向引物:5'-GGAATTCATATGAATGAGCAAAACGTTGTAAAGCC-

收稿日期:2017-03-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31400032);江苏省高校自然科学基金项目(编号:13KJB180010)。

作者简介:苏明慧(1991—),女,河南周口人,硕士研究生,从事粟酒裂殖酵母线粒体蛋白结构与功能研究。E-mail:1579257484@qq.com。

通信作者:商中杰,博士,副教授,从事裂殖酵母中与人类疾病相关基因的结构和功能研究。E-mail:shangjinjiey@163.com。

3'; 反向引物: 5' - CCGCTCGAGATGACTGTGTTCAGCGTTG GG - 3'。

1.2.2 PCR 片段扩增 取用 YES 培养过夜的粟酒裂殖酵母 1.5 mL, 离心收集菌体。按照 OMEGA 的说明书提取总 RNA, 然后加入反转录酶, 以随机六聚体为引物合成 cDNA, 然后以此 cDNA 为模板, 用 SPAC 1296.02 的特异性引物进行扩增, 扩增条件如下: 95 ℃ 2 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 32 个循环; 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 片段用 PCR 过柱纯化试剂盒进行纯化。

1.2.3 原核表达载体 pET-28a(+)/*cox4*p 的构建 把纯化后的 PCR 片段与 pET-28a(+) 载体进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 回收纯化双酶切后的产物, 将两者按合适配比加入至酶连反应体系内, 16 ℃ 连接过夜; 将酶连产物转到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中, 涂布到含有 Kan 抗性的 LB 固体培养基上, 37 ℃ 培养过夜, 挑取菌落 PCR 呈阳性的转化子于 LB + Kan 的液体培养基中, 37 ℃ 振荡培养 10 h, 通过碱裂解法提取重组质粒, 经 *Nde* I、*Xho* I 双酶切初步鉴定后, 由南京思普金生物技术有限公司完成测序。将测序正确的重组质粒转入到 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 得到重组表达菌株。

1.2.4 目的蛋白的表达 将重组表达菌接种到 5 mL 含有 50 mg/L Kan 的 LB 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜, 将重组表达菌分别转接到 2 管 15 mL 含有 50 mg/L Kan 的 LB 液体培养基中, 使其 $D_{600\text{ nm}} \approx 0.2$, 37 ℃、200 r/min 继续振荡培养至 $D_{600\text{ nm}} \approx 0.6$, 此时向其中 1 管菌液中加入 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, 简称 IPTG), 于 37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜。次日, 于 4 ℃、8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 之后用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 值为 7.0) 将菌体重悬, 重复洗涤 3 次后, 加入适量缓冲液 [含 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, 简称 PMSF) 和 14.3 mmol/L β -巯基乙醇], 将其置于冰浴中进行超声波破碎, 破碎 10 s, 冷却 10 s, 待菌体完全破碎后, 于 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min, 收集细胞上清, 取适量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS-PAGE), 以分析目标产物的表达情况。

1.2.5 目的蛋白的纯化 重组表达菌破碎完全后, 于 16 000 g、4 ℃ 离心 30 min, 将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中。向上清中加入组氨酸标签蛋白纯化试剂盒 (Ni-NTA 柱), 根据 Ni-NTA 柱的吸附度来决定上清蛋白样品中需要加入的 Ni-NTA 体积。在 4 ℃ 低温冰箱中, 用垂直混匀器匀速转动离心管 2~4 h, 确保目的蛋白与 Ni-NTA 柱充分接触并结合, 2~4 h 后, 1 000 g、4 ℃ 离心 2 min, 小心地将上清转移到另 1 支新的 1.5 mL 离心管中 (该上清中含有未与 Ni-NTA 柱结合的蛋白), 用 Wash Buffer 洗涤 2~5 次离心下来的 Ni-NTA 柱, 保留洗液, 该步的目的是去除没有与 Ni-NTA 柱结合或者与 Ni-NTA 柱结合不牢固的蛋白。再用 Elute Buffer 对 Ni-NTA 柱进行洗脱, 可将与 Ni-NTA 柱结合的目的蛋白洗脱下来。洗脱液的体积按照加入的 Ni-NTA 柱的体积换算, 洗涤 3 次, 洗涤得到的溶液主要含有所纯化的目的蛋白。将目标蛋白洗脱液置于截留量为 3 500 u 的透析袋中对蛋白进

行透析, 透析液为 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 值为 6.8), 经过 3 次换液后, 将得到的蛋白液吸出并加入 1.5 mL 离心管中, 这些蛋白样品可进行对照试验。取适量透析后的蛋白样品进行 SDS-PAGE, 以检测目的蛋白的纯化程度。

1.2.6 抗体的制备与检测 将纯化得到的蛋白作为抗原送巴傲得生物科技有限公司制备相应的抗体, 然后提取粟酒裂殖酵母的线粒体^[11-12], 通过 Western-Blot 方法检测抗体质量。将线粒体提取液上样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶中, 进行 SDS-PAGE, 湿转 (硝酸纤维素膜, 简称 NC 膜), 条件为 300 mA、100 min。用封闭液 (0.137 mol/L NaCl, 0.02 mol/L Tris, 5% 脱脂奶粉, 质量浓度) 封闭硝酸纤维素膜 2 h。用 TBST 缓冲液 (含 0.02 mol/L Tris, 0.137 mol/L NaCl, 0.1% Tween 20, 调节 pH 值至 7.4) 洗膜 3 次, 按比例加入一抗, 室温孵育 4 h, 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 再按比例加入二抗, 室温避光孵育 1 h, 用 ODYSSEY 激光扫描显示结果。

2 结果与分析

2.1 目的片段 *cox4* 的扩增

以提取的 yHL6381 菌株的 RNA 通过反转录得到的 cDNA 作为模板, 通过 PCR 扩增目的片段 *cox4*。目的基因 *cox4* 的碱基数为 393 bp。如图 1 所示, 根据 marker, 所获得的目的片段介于 250~500 bp 之间, 且只有 1 条单一条带, 因此确定该目的片段为 *cox4*。

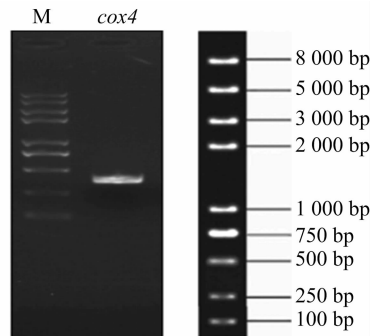


图1 目的片段 *cox4* 扩增产物

2.2 重组质粒 *cox4*-pET28a 的构建及验证

将扩增得到的 *cox4* 目的片段进行 PCR 过柱纯化, 将纯化后的目的片段与载体质粒 pET-28a(+) 分别用 *Nde* I、*Xho* I 进行双酶切, 酶切过夜后割胶回收载体质粒片段, 过柱纯化目的 PCR 片段。将纯化后的载体片段与目的 PCR 片段酶连, 16 ℃ 反应过夜。接下来通过化学转化法将酶连产物转入 TOP10 大肠杆菌感受态细胞中, 涂布于添加卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 ℃ 培养 12 h 后, 将平板取出, 接种单菌落于添加卡那霉素的 LB 液体培养基上, 于 37 ℃ 振荡培养 12 h 后提取重组质粒。提取的重组质粒如图 2 所示。笔者选取图 2 中的 4 号质粒进行酶切验证。由图 3 的验证结果可以看出 *cox4* 基因的释放片段, 将 4 号重组质粒送至南京思普金生物科技有限公司测序。由图 4 的测序结果可以看出, 该片段与 *S. pombe*_Gene DB 数据库中的序列完全一致, 表明 4 号重组质粒的构建是成功的。

2.3 目的蛋白 Cox4 的表达

将上述验证正确的重组质粒转入 BL21 大肠杆菌感受态

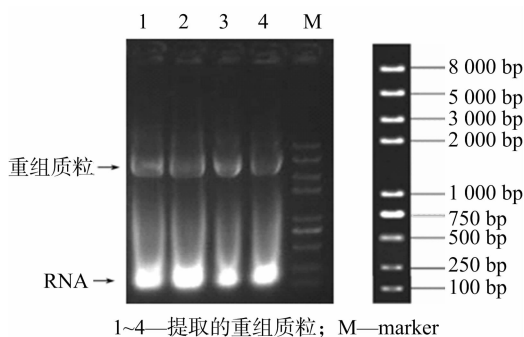


图2 提取的重组质粒

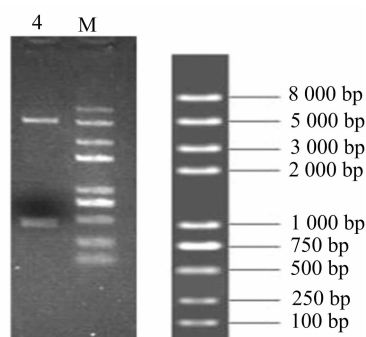


图3 重组质粒酶切验证结果

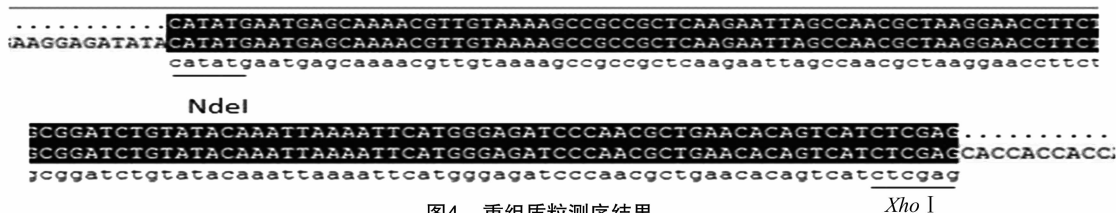
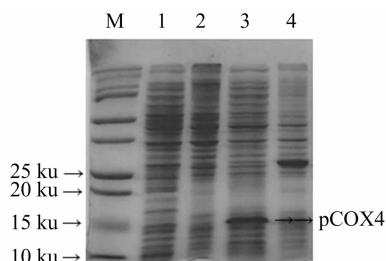


图4 重组质粒测序结果

细胞中,得到带有 pET - 28a(+) / *cox4* 的重组菌株,通过 IPTG 诱导,使得重组质粒在细胞中表达,得到本研究所需的 Cox4 蛋白。笔者将经过 IPTG 诱导和未经过 IPTG 诱导的重组表达菌株通过超声破碎处理后,进行 SDS - PAGE,结果如图 5 所示,在经过 IPTG 诱导的重组表达菌的上清组分中,可以看到 1 条大小为 16 ku 左右的蛋白条带,与 *S. pombe* - GeneDB 上公布的 Cox4 蛋白大小 18.16 ku 相近,表明 Cox4 蛋白得到了表达。



M—标准蛋白 marker; 1—未用 IPTG 诱导的细胞上清;
2—未用 IPTG 诱导的细胞沉淀; 3—用 IPTG 诱导的细胞上清;
4—用 IPTG 诱导的细胞沉淀

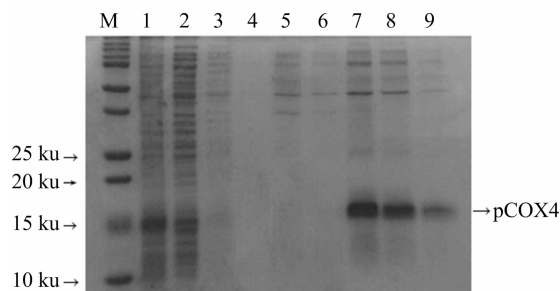
图5 Cox4 蛋白表达 SDS-PAGE 结果

2.4 目的蛋白 Cox4 的纯化

在 Cox4 蛋白成功得到了表达后,笔者对表达的蛋白进行纯化,通过 Ni - NTA 柱与目的蛋白结合,用 wash buffer 洗去杂蛋白与未与 Ni - NTA 柱结合的蛋白,最后用 elute buffer 将目的蛋白洗脱下来,去除盐离子后进行 SDS - PAGE,检测蛋白的纯化效果。从图 6 可以看出,经过 wash buffer 洗脱后,去除了大部分杂蛋白,得到了纯度较高的目的蛋白。

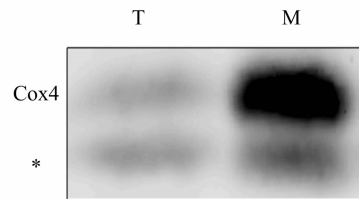
2.5 Cox4 蛋白抗体的制备及检测

笔者将纯化后的 Cox4 蛋白样品送至巴傲得生物科技有限公司制备抗体。抗体制备完成后,提取 yHL6381 的线粒体,通过免疫印记分析试验对抗体进行检测。如图 7 所示,在线粒体提取液中,本试验成功检测到了 Cox4 蛋白且大量富集,其分子量大小与之前表达的蛋白大小是一致的,表明抗体的制备是成功的。



M—marker; 1—全细胞提取液; 2—柱上清;
3~6—wash buffer 洗脱液; 7~9—Elute Buffer 洗脱液

图6 Cox4 蛋白纯化 SDS-PAGE 结果



T—全细胞提取液; M—线粒体样品; *—非特异性条带

图7 Cox4 蛋白抗体检测结果

3 讨论

在本研究中,笔者将 Cox4 蛋白的编码序列去除线粒体定位序列后克隆到表达载体 pET - 28a(+) 上,构建了 pET - 28a(+) / *cox4* 重组表达质粒,因为表达载体 pET28a(+) 上含有 T7/Lac 启动子,该启动子在受 IPTG 诱导时会启动基因的表达,因此表明重组表达质粒经过 IPTG 诱导,在表达型的大肠杆菌中成功表达,通过一系列优化后提高了 Cox4 蛋白在细胞中的表达量,得到了成功表达的 Cox4 蛋白。接下来将成功表达的蛋白以过 Ni - NTA 柱的方式进行纯化,使目的蛋白与 Ni - NTA 柱相结合,从而去除其他杂蛋白,达到纯化蛋白的目的。最后将纯化的蛋白作为抗原送相关公司制备相应的抗体。通过检测发现,本研究所制备的抗体是成功的,而且特异性较好,从而为检测 Cox4 的蛋白水平研究奠定了基础。

王进军,薛 藩. 虾过敏 DNA 疫苗的设计和构建[J]. 江苏农业科学,2018,46(15):34-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.009

虾过敏 DNA 疫苗的设计和构建

王进军,薛 藩

(扬州大学环境科学与工程学院,江苏扬州 225127)

摘要:通过“一珠一化合物”方法筛选虾过敏的抗原表位,加上免疫元件构建重组真核表达质粒。取对虾过敏患者的血清,纯化抗体。用所得抗体从耦联氨基酸多肽库中筛选出不同长度的多肽 20 个。在每个多肽前后加入免疫元件(KOZAK 序列、Th-PADRE、CpG1、Th-P18mn、CpG2、iPA 前导序列、多肽加尾信号),根据密码子表和 JCAT 网站选出适宜在小鼠内表达的 DNA 序列。按重叠 PCR 的方法设计 6 个 20 bp 的核苷酸链,通过 PCR 获得全长片段,双酶切连接入真核表达载体,构建重组表达质粒。经测序分析,证明成功构建虾抗原表位的重组表达质粒 pCIneo-TM。本研究为虾过敏抗原表位在真核系统的表达以及已建立的虾过敏小鼠动物模型奠定了良好基础,可为虾过敏的治疗提供新的方法。

关键词:虾过敏;抗原表位;克隆;真核表达质粒;DNA 疫苗

中图分类号: R392.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0034-04

虾作为海产品的主力军,其味道鲜美闻名于世,但不少人因对虾过敏而无法享用。目前,还没有针对虾过敏的治疗方法。虾过敏的主要原因是虾中存在过敏原。随着免疫学、临床医学和食品生物化学等学科和分子生物学技术的发展,不同品种的虾过敏原的性质被研究,结果表明不同品种的虾主要过敏原均为分子量 36 ku 组分,而且其氨基酸的组成和顺序很相似,都是肌肉中的原肌球蛋白^[1-2]。这种蛋白质存在

于肌原纤维中,和肌钙蛋白一起,结合在 F-肌动蛋白上,形成细丝。进一步研究表明,虾过敏原的抗原表位,即能引起过敏反应的最小单位,通常为几个氨基酸的多肽或者肽段,如棕虾的抗原表位为 9 个肽段,这 9 个肽段有两大重叠区域^[3-7]。

DNA 疫苗即基因疫苗,是在分子生物学技术基础上发展起来的第 3 代新型疫苗,指的是将编码外源性抗原的基因插入到含真核表达系统的质粒上,然后将质粒直接导入人或动物体内,让其在宿主细胞中表达抗原蛋白,诱导机体产生免疫应答。抗原基因在一定时限内的持续表达,不断刺激机体免疫系统,使之达到防病的目的^[8-9]。

本研究通过基因克隆技术构建虾过敏原抗原表位的 DNA 疫苗,通过“一珠一化合物”的分析方法获得虾过敏抗原表位的多肽的氨基酸序列,通过真核表达载体 pCI neo 为骨

收稿日期:2017-03-06

基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金(编号:20151098);江苏省扬州市基础研究计划(编号:YZ2015098);扬州大学高层次人才科研启动基金。

作者简介:王进军(1979—),男,江苏海安人,博士,副教授,主要从事微生物学的相关研究。Email:wangjinjun@yzu.edu.cn。

参考文献:

- [1] Ostojić J, Panozzo C, Bourand-Plantefol A, et al. Ribosome recycling defects modify the balance between the synthesis and assembly of specific subunits of the oxidative phosphorylation complexes in yeast mitochondria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(12): 5785-5797.
- [2] Gouget K, Verde F, Barrientos A. *In vivo* labeling and analysis of mitochondrial translation products in budding and in fission yeasts[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 457: 113-124.
- [3] Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria[J]. *Nature*, 2003, 426(6963): 127-128.
- [4] Wang C, Youle R J. The role of mitochondria in apoptosis[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43(1): 11-22.
- [5] Vo T D, Palsson B O. Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007, 292(1): C164-C177.
- [6] Foury F, Roganti T, Lecrenier N, et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Letters*, 1999, 440(3): 325-331.
- [7] Birsoy K, Wang T, Chen W W, et al. An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis[J]. *Cell*, 2015, 162(3): 540-551.
- [8] 张 颖, 胡国华. 线粒体呼吸链功能异常在帕金森病中作用的研究进展[J]. *中风与神经疾病*, 2010, 27(1): 89-91.
- [9] Herrmann P C, Gillespie J W, Lu C, et al. Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer[J]. *Proteomics*, 2003, 3(9): 1801-1810.
- [10] Oliva C R, Markert T, Gillespie G Y, et al. Nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunit 4 regulates BMI1 expression and determines proliferative capacity of high-grade gliomas[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 4330-4344.
- [11] Meisinger C, Pfanner N, Truscott K N. Isolation of yeast mitochondria[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 313: 33-39.
- [12] Boldogh I R, Pon L A. Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Methods in Cell Biology*, 2007, 80(9): 45-64.