

连凯琪,周玲玲,王英杰,等.猪 IgG1-Fc 基因的克隆、原核表达及表达条件优化[J].江苏农业科学,2019,47(15):91-94.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.021

猪 IgG1-Fc 基因的克隆、原核表达及表达条件优化

连凯琪,周玲玲,王英杰,李 翠,宋玉伟,张明亮

(河南省动物疫病防控与营养免疫院士工作站/河南省兽用生物制品研发与应用国际联合实验室/
安阳工学院生物与食品工程学院,河南安阳 455000)

摘要:为了探索猪 IgG1-Fc(pIgG1-Fc)基因在大肠杆菌中的高效表达,首先通过反转录 PCR(RT-PCR)扩增 pIgG1-Fc 基因,并构建重组表达质粒 pET30a(+)-pIgG1-Fc,转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中进行原核表达,然后通过优化异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导浓度、菌体培养温度及菌体培养时间,实现 pIgG1-Fc 重组蛋白的高效表达。结果表明,成功克隆了 pIgG1-Fc 的基因 666 bp,共编码 222 个氨基酸;重组原核表达质粒 pET30a(+)-pIgG1-Fc 经过酶切和测序证明构建正确,重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中能够表达,表达的融合蛋白分子量约为 36 ku。其最佳表达条件如下:在 25 ℃ 条件下加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 可形成大量包涵体蛋白。pIgG1-Fc 基因被成功克隆并原核表达,为进一步研究该蛋白的功能及实现其他蛋白与 pIgG1-Fc 融合后原核表达奠定了基础,为制备能与猪 IgG1 结合的二抗提供了材料。

关键词:Fc;原核表达;包涵体;融合蛋白

中图分类号:S858.28;Q785;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)15-0091-03

自 20 世纪末多克隆抗体出现以来,相继出现了杂交瘤单克隆抗体和基因工程抗体。当前,抗体相关技术在疾病诊断、药物靶向性治疗、免疫预防、抗体融合蛋白制药等领域被广泛应用^[1-3]。其中,与宿主主要免疫球蛋白恒定区中 Fc 片段(CH₂和 CH₃功能区)共同表达的融合蛋白被很多科研人员关注,如疫苗开发、新药物研制等^[4-5]。前期更多的研究者都是对 Fc 及其融合蛋白进行真核表达,以期实现 Fc 的功能活性,但是真核表达量均较低,成本比较高,限制了 Fc 融合蛋白的工业化生产。相关文献也表明,一些人源 Fc 融合蛋白已实现原核表达,且表达产物具有生物活性^[6-7]。因此,本研究拟克隆猪 IgG1 的 Fc 基因(pIgG1-Fc),并进行原核表达,然后对其诱导表达的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)浓度、表达温度和表达时间进行了优化,对融合蛋白表达的可溶性进行了分析,为进一步研究 pIgG1-Fc 融合蛋白的原核表达和工业化生产提供基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

pET30a(+)、大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3),由安阳工学院河南省动物疫病防控与营养免疫院士工作站保存。

1.2 试剂

限制性内切酶 BamH I 和 Hind III、T4 DNA 连接酶、DNA 分子质量标准 DL 2000、反转录试剂盒、PCR 扩增酶,均购自大连宝生物工程公司;酵母抽提物、胰蛋白胨、异丙基硫代半乳糖苷,购自 Solarbio 生物公司;胶回收试剂盒和质粒提取试

剂盒,均购自 Omega Bio-tek。PCR 引物合成和 DNA 测序,均由金维智生物科技有限公司完成。

1.3 pIgG1-Fc 基因的克隆

在安阳工学院实验室取猪的脾脏组织和由外周血分离的细胞研磨、按照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA。按照反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链,作为扩增 pIgG1-Fc 基因的模板。

根据 GenBank 数据库中已公布的 pIgG1-Fc 基因序列,设计引物并引入 2 个酶切位点和保护碱基,Fc-F:5'-CGCG GATCCCCCATATGCCAGGCTGTG-3'(带下划线部分为 BamH I 酶切位点),Fc-R:5'-TCCCCAAGCTTGTTCACCTGAGTCTT GGAG-3'(带下划线部分为 Hind III 酶切位点),该对引物扩增片段大小约为 666 bp,引物送金维智生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μL,其中:Premix Taq 25 μL,上、下游引物(浓度 10 pmol/L)各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,用灭菌蒸馏水补至 50 μL。反应条件如下:94 ℃ 4 min;95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶并纯化。

1.4 重组表达质粒的构建

胶回收纯化的 pIgG1-Fc 基因片段和载体 pET30a(+) 均被 BamH I 和 Hind III 双酶切后回收,将回收的目的片段和载体片段按一定的比例在 T4 DNA 连接酶的作用下于 16 ℃ 连接过夜。将连接产物转化感受态细胞大肠杆菌 DH5α,37 ℃ 温箱培养过夜,挑取单克隆置于 37 ℃ 摇菌 12~16 h,提取质粒,将双酶切鉴定为阳性的质粒送金维智生物科技有限公司测序。

1.5 目的基因在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pET30a(+)-pIgG1-Fc 转化大肠杆菌 BL21(DE3),涂布含有卡那霉素的 LB 琼脂平板,37 ℃ 温箱培养过夜,挑取单克隆菌落摇菌过夜,将菌液分别按 1:100 的

收稿日期:2018-04-21

基金项目:安阳工学院博士科研启动基金(编号:BSJ2016008)。

作者简介:连凯琪(1987—),男,河南新蔡人,博士,讲师,主要从事动物传染病诊断和免疫防控研究。E-mail:liankaiqi616@163.com。

比例接种至含有卡那霉素的 LB 培养液中,37 ℃ 振荡培养 4 h 后,将每管菌液平均分成 2 管,1 管加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,另一管不加 IPTG 作为对照,同时设置 pET30a(+) 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 作为阴性对照。将加入 IPTG 组和对照组菌液都放入 37 ℃ 继续振荡培养 6 h,然后于 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)重悬菌体沉淀,取 80 μL 加入 20 μL 5 × loading buffer 沸水煮 10 min 制备样品,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.6 重组蛋白原核表达条件的优化

1.6.1 IPTG 诱导浓度的优化 将上述过夜培养的阳性菌液按 1:100 的比例接种于含卡那霉素的培养液中,37 ℃ 振荡培养 4 h,分别加入 IPTG 至终浓度为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0、1.5、2.0 mmol/L,37 ℃ 继续振荡培养 4 h,同时设置 pET30a(+) 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 作为阴性对照。参照“1.5”节进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.2 表达温度的优化 将上述过夜培养的阳性菌液按 1:100 的比例接种于含卡那霉素的培养液中,37 ℃ 振荡培养 4 h,分别加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,分别于 16、20、25、30、37 ℃ 继续振荡培养 4 h,同时设置 pET30a(+) 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 作为阴性对照。参照“1.5”节方法进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.3 表达时间的优化 将上述过夜培养的阳性菌液按 1:100 的比例接种于含卡那霉素的培养液中,37 ℃ 振荡培养 4 h,分别加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 25 ℃ 分别继续振荡培养 3、4、5、6、7 h,同时设置 pET30a(+) 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 作为阴性对照。参照“1.5”节进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 重组蛋白可溶性表达分析

将“1.5”节过夜培养的阳性菌液按 1:100 的比例接种于 100 mL 含卡那霉素的培养液中,37 ℃ 振荡培养 4 h,分别加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 25 ℃ 继续振荡培养 6 h,然后于 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,用 PBS 重悬菌体沉淀洗 2 次,加入 10 mL PBS 重悬沉淀,置于冰上进行超声,工作 3 s,间歇 3 s,超声 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 80 μL,用 100 μL PBS 重悬沉淀后也取 80 μL,分别加入 20 μL 5 × loading buffer 沸水煮 10 min 制备样品,进行 SDS-PAGE 分析。

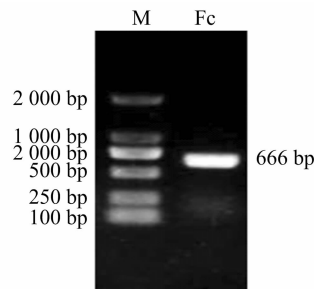
2 结果与分析

2.1 *pIgG1-Fc* 基因克隆

通过反转录和 PCR 特异性扩增的产物用琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明,扩增片段大小约为 666 bp,与预期片段大小相符(图 1)。测序结果进一步表明,PCR 扩增基因为 *pIgG1-Fc*。

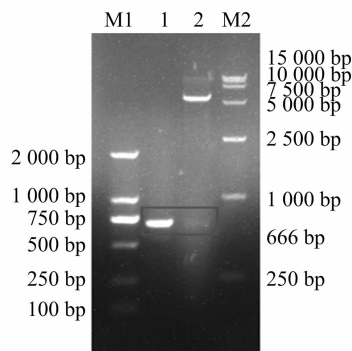
2.2 重组质粒的构建

将重组质粒分别用 PCR 扩增和酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳后,结果显示,PCR 扩增条带单一,大小约为 666 bp, *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切也出现 1 条约 666 bp 大小的条带(图 2),测序结果进一步证实重组质粒 pET30a(+) - *pIgG1-Fc* 构建成功。



M—DL 2 000 DNA marker; Fc—*pIgG1-Fc* 基因的 PCR 扩增产物

图1 *pIgG1-Fc* 基因的 PCR 产物电泳结果



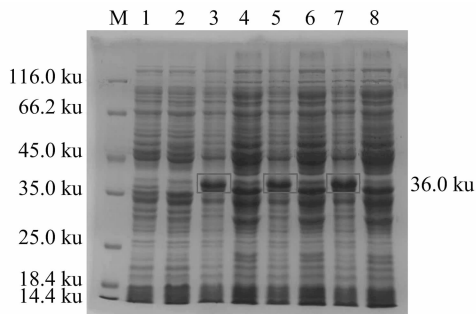
M1—DL 2 000 DNA marker; M2—DL 1 5 000 DNA marker;

1—重组质粒的 PCR 鉴定; 2—重组质粒的双酶切鉴定

图2 重组质粒 pET30a(+)-*pIgG1-Fc* 的 PCR 和双酶切鉴定结果

2.3 重组蛋白的表达

重组质粒 pET30a(+) - *pIgG1-Fc* 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 经 IPTG 进行诱导表达,产物经 SDS-PAGE 分析,可见相对分子量约为 36.0 ku 的特异性蛋白条带, pET30a(+) 空载体表达对照组没有出现目的条带(图 3)。



M—蛋白 marker; 1—BL21[pET30a(+)] 诱导; 2—BL21[pET30a(+)] 未诱导; 3、5、7—BL21[pET30a(+)-*pIgG1-Fc*] 诱导; 4、6、8—BL21[pET30a(+)-*pIgG1-Fc*] 未诱导

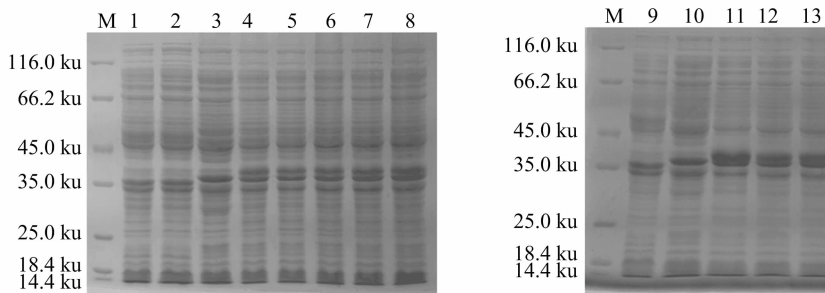
图3 SDS-PAGE 分析 *pIgG1-Fc* 融合蛋白的原核表达

2.4 表达条件的优化

2.4.1 IPTG 最佳诱导浓度的摸索 pET30a(+) - *pIgG1-Fc* 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、37 ℃ 下诱导表达 4 h 时,重组蛋白 *pIgG1-Fc* 的表达量最高(图 4)。

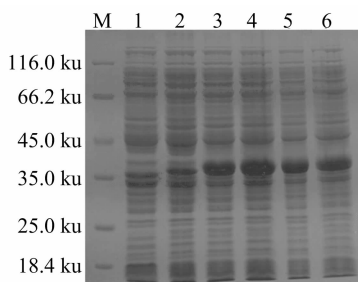
2.4.2 最佳表达温度的摸索 pET30a(+) - *pIgG1-Fc* 转化的大肠杆菌 BL21(DE3) 在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、25 ℃ 下诱导表达 4 h 时,重组蛋白 *pIgG1-Fc* 的表达量最高(图 5)。

2.4.3 最佳表达时间的摸索 pET30a(+) - *pIgG1-Fc* 转



M—蛋白 marker; 1—BL21[pET30a(+)] 未诱导; 2, 9—BL21[pET30a(+)] 诱导; 3, 10—BL21[pET30a(+)-pIgG1-Fc] 未诱导; 4~8—0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mmol/L IPTG 诱导 pIgG1-Fc 蛋白表达; 11~13—1.0、1.5、2.0 mmol/L IPTG 诱导 pIgG1-Fc 蛋白表达

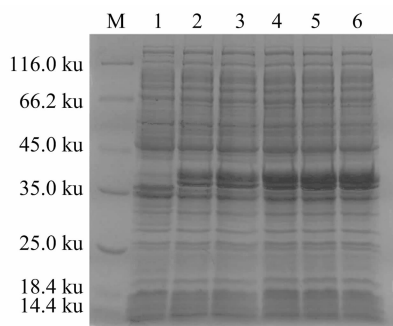
图4 SDS-PAGE 分析 IPTG 浓度对 pIgG1-Fc 蛋白表达的影响



M—蛋白 marker; 1—BL21[pET30a(+)] 诱导; 2~5—16、20、25、30、37 °C 下诱导 pIgG1-Fc 蛋白表达

图5 SDS-PAGE 分析诱导温度对 pIgG1-Fc 蛋白表达的影响

化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、25 °C 下诱导表达 6 h 时, 重组蛋白 pIgG1 - Fc 的表达量最高 (图 6)。



M—蛋白 marker; 1—BL21[pET30a(+)] 诱导; 2~6—诱导 3、4、5、6、7 h 的 pIgG1-Fc 蛋白表达

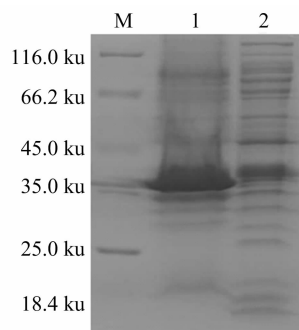
图6 SDS-PAGE 分析诱导时间对 pIgG1-Fc 蛋白表达的影响

2.5 重组蛋白可溶性表达鉴定

pET30a(+) - pIgG1 - Fc 转化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、25 °C 下诱导表达 6 h 时, 重组 pIgG1 - Fc 蛋白既在包涵体中表达也在上清中表达, 但主要在包涵体中表达 (图 7)。

3 讨论

Fc 段作为免疫球蛋白的恒定区, 由物种决定。外源蛋白通过与免疫球蛋白 Fc 段结合形成融合蛋白可延缓靶蛋白在机体内的降解, Fc 与免疫细胞表面受体结合的功能也可加强递呈靶蛋白给免疫细胞、介导融合蛋白穿过胎盘和黏膜屏障、促进抗体依赖细胞介导的吞噬作用及调控抗体依赖细胞介导



M—蛋白 marker; 1—pIgG1-Fc 蛋白的包涵体表达; 2—pIgG1-Fc 蛋白的可溶性表达

图7 SDS-PAGE 分析 pIgG1-Fc 蛋白的可溶性表达

的细胞毒作用等多种生物学效应^[5,8-11]。人源 Fc 段形成多种融合蛋白已被大量研究^[12-13], 动物源 Fc 段形成的融合蛋白近些年来也逐渐被关注^[14-15], 但大多以真核表达为主, 猪源 Fc 片段的原核表达在国内外鲜有报道。

本研究首先克隆了猪 IgG1 - Fc 片段基因, 并构建了原核表达载体 pET30a(+) - pIgG1 - Fc。在确定该重组质粒能够原核表达后, 又对原核表达条件进行了优化, 确定该重组质粒在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、25 °C 下诱导表达 6 h 时, 重组蛋白 pIgG1 - Fc 的表达量最高。最后鉴定该融合蛋白的表达不仅存在于上清中, 也存在于包涵体中, 且主要以包涵体形式表达。该表达所用原核表达载体为 pET30a(+) , 是常用的原核表达载体之一, 带有组氨酸标签可用于镍柱纯化融合蛋白。该载体含有肠激酶作用位点, 可用于融合蛋白纯化后去除标签等多余氨基酸, 表明重组蛋白可方便地用于后续研究。

本研究对猪 IgG1 - Fc 基因的成功克隆和原核表达, 为后续研究 IgG1 - Fc 融合蛋白的原核表达, 实现工业化大量生产提供了基础, 为研究能与猪 IgG1 结合的二抗提供了抗原材料。

参考文献:

- [1] Carter P J. Potent antibody therapeutics by design [J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6: 343 - 357.
- [2] Presta L G. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies [J]. Current Opinion in Immunology, 2008, 20(4): 460 - 470.
- [3] Leavy O. Therapeutic antibodies: past, present and future foreword [J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(5): 297.

曹辉庆,黄诚梅,蒋胜理,等. 甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):94-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.022

甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列的克隆及生物信息学分析

曹辉庆¹,黄诚梅¹,蒋胜理¹,罗海斌¹,邓智年²,吴凯朝²,徐林²,魏源文¹

(1. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室,广西南宁 530007;2. 广西农业科学院甘蔗研究所,广西南宁 530007)

摘要:蔗糖磷酸合成酶(SPS)是蔗糖合成途径的关键限速酶,对蔗糖的合成和碳水化合物的分配具有重要的调控作用。采用染色体步移法技术克隆获得了甘蔗 *SPSB* 基因 5'端侧翼序列,并对其序列进行生物信息学分析。分离获得了 4 399 bp 的 5'侧翼序列,该序列除具有启动子核心序列 TATA-box 和增强子元件 CAAT-box 等典型的真核生物启动子基本元件外,还含有多种光应答元件、激素响应元件,以及与缺氧、干旱、低温诱导有关的顺式作用元件和一些组织调控表达有关的顺式调控元件,表明 ScSPSB 启动子可能具有逆境应答、激素应答及组织特异表达特性,值得开展进一步的功能研究。

关键词:甘蔗; *ScSPSB* 基因;侧翼序列;生物信息学分析

中图分类号: S566.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0094-05

甘蔗属高光合效率 C_4 植物,是我国主要的糖料作物,其蔗糖产量占我国食糖总量的 90% 以上。甘蔗蔗糖积累过程是甘蔗生长发育中最重要的代谢途径,与甘蔗产量和品质形成密切相关。蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,简称 SPS)作为蔗糖代谢途径中的关键限速酶,其活性不仅能影响蔗糖的合成能力,还影响光合产物的分配和糖分积

累^[1-6]。因此,研究甘蔗 *SPS* 基因的表达调控机制对提高甘蔗产量及蔗糖含量具有重要意义。

目前,已从拟南芥^[7]、荔枝^[8]、水稻^[9]、玉米^[10]、甘蔗^[11]、狼尾草^[12]等多种作物中克隆到 *SPS* 基因,并进行了 *SPS* 基因家族的基因组鉴定和表达分析^[7-12]。前期研究发现,植物 *SPS* 基因可分为 4 个家族共 5 种类型:*SPSA*(Ⅱ类)、*SPSB*(Ⅴ类)、*SPSC*(Ⅰ类)、*SPSD*(Ⅲ类和Ⅳ类)^[13-15],且不同植物体内不同家族的 *SPS* 基因表现出不同的表达模式和功能差异^[16-21]。至今,在甘蔗中已经鉴定出 5 个 *SPS* 基因家族,桂意云等对其中的 4 个家族 *SPS* 基因进行了时空表达特性分析^[18]。研究表明,在甘蔗伸长期、蔗糖积累前期和蔗糖积累后期,*SPSD*Ⅲ基因在所有甘蔗品种的未成熟叶片、成熟叶片和茎中均高水平稳定表达;*SPSB* 基因在成熟叶片中几乎不表达,而以茎中表达量最高;在蔗糖积累后期,*SPSA* 和 *SPSC* 基

收稿日期:2019-05-05

基金项目:广西农业科学院基本科研业务专项(编号:桂农科 2017YM35、2015YT96)。

作者简介:曹辉庆(1975—),女,广西全州人,硕士,助理研究员,主要从事作物栽培学与分子生物学研究工作。E-mail:1034403583@qq.com。

通信作者:魏源文,博士,研究员,主要从事植物分子生物学与分子病理学研究。E-mail:yw-wei@126.com。

[4]王宇恒,郭薇,王欣,等. Fc 融合蛋白在药学领域的研究进展[J]. 药学进展,2014,38(6):419-425.

[5]陈沁韵,万延民,张晓燕. IgG-Fc 融合蛋白的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2015,28(11):1223-1227.

[6]冀丽军,白乌仁图雅,柴琳,等. TACI-Fc 融合蛋白的基因构建、原核表达及生物活性鉴定[J]. 生物技术,2013,23(3):24-28.

[7]白乌仁图雅,赵亚聪,朱燕锋,等. sTACI-Fc-Myc 重组质粒的构建、原核表达及活性鉴定[J]. 现代生物医学进展,2015,15(2):217-220.

[8]Jefferis R, Lund J, Pound J D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation[J]. Immunological Reviews, 1998, 163: 59-76.

[9]Morgan E L, Thoman M L, Weigle W O. Enhancement of T lymphocyte functions by Fc fragments of immunoglobulins. I. Augmentation of allogeneic mixed lymphocyte culture reactions requires I-A or I-B-subregion differences between effector and stimulator cell populations[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1981, 153: 1161-1172.

[10]Gupta S, Gach J S, Becerra J C, et al. The neonatal Fc receptor

(FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(11):e1003776.

[11]de Groot A S, Moise L, Memury J A, et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes"[J]. Blood, 2008, 112(8):3303-3311.

[12]罗岚,刘洪洪,李祥,等. 含人 Fc 重组凋亡融合蛋白体内外抗肿瘤活性初步研究[J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(1):18-23.

[13]张晓光,杨韧,王娇,等. 埃博拉病毒重组膜蛋白 Gp-Fc 表达及免疫原性研究[J]. 病毒学报, 2016, 32(1):8-13.

[14]Liu Z H, Liu Y K, Zhang Y Y, et al. Surface displaying of swine IgG1 Fc enhances baculovirus-vectored vaccine efficacy by facilitating viral complement escape and mammalian cell transduction[J]. Veterinary Research, 2017, 48(1):29.

[15]Dong W W, Zhang H, Huang H, et al. Chicken IgY Fc linked to *Bordetella avium* ompA and Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide adjuvant enhances macrophage function and specific immune responses[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7:1708.