

牙鲆 RAG2 基因的质粒构建和体外原核表达

王先磊^{1,2}, 谭训刚¹, 张培军¹, 徐永立¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 青岛国家海洋科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 将牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) RAG2 cDNA 序列插入到体外表达质粒 pProEXTM HT, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL-21 中进行体外表达, 分析了诱导时间和 IPTG 浓度对重组蛋白产生量的影响, 确定了最佳诱导条件为: 诱导时间为 3 h, IPTG 诱导浓度 0.2 mmol/L。本研究同时对 RAG2 重组蛋白的可溶性进行确认, 并利用 BD TALONTM 金属亲和柱纯化了 RAG2 蛋白。本研究结果为进一步深入研究 RAG2 蛋白的生物学功能奠定了良好的基础。

关键词: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*); RAG2; 重组; 纯化

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)09-0059-05

重组活化基因 2(Recombination activating gene 2, RAG2)在基因序列上与 RAG1 基因紧密相连, 对于淋巴细胞的 V(D)J 重排是必需的。如果缺失了 RAG1 或者 RAG2 基因产物, 淋巴细胞无法发育成熟, 从而在小鼠(*Mus musculus*)和人体内导致严重的免疫缺陷^[1]。

最初关于 RAG2 蛋白的功能研究主要集中在哺乳动物、两栖类和鸟类^[2-4], 随着鱼类疾病的频繁发生和水产养殖业的发展, 各国学者将目光开始转移到鱼类的 RAG2 基因功能研究, 目前虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[5-6]、斑马鱼(*Denio rerio*)^[7-8]、红鳍东方豚(*Fugu rubripes*)^[9]、鲫鱼(*Carassius auratus*)^[10]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[11]等硬骨鱼类的 RAG2 基因已得到克隆, 而软骨鱼的代表物种鲨鱼(*Rhizoprionodon lalandii*) RAG2 基因也得到克隆^[12], 其在硬骨鱼类体内 mRNA 水平的时空表达情况也进行了分析^[13]。研究发现, 目前已知的所有生物的 RAG2 的基因序列内没有内含子。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国北方重要的经济养殖品种, 目前, 病害的频繁发生严重阻碍了牙鲆养殖业的发展。为了保证牙鲆产业稳定、健康、持续发展, 通过研究牙鲆免疫系统的基本结构和功能而提高牙鲆抵抗病原菌侵害的能力是一条重要的途径^[14]。RAG2 基因产物对于鱼类免疫系统的发育具有重要意义。

在机体内真正起作用的是蛋白质, 只有蛋白质时空表达的确定才能更真实有效地反映免疫细胞和器官发挥作用的时间和空间分布。目前关于硬骨鱼

类 RAG2 生物学功能研究基本上是在 mRNA 水平, 为进一步研究在蛋白水平 RAG2 的生物学功能, 本研究在本实验室的研究^[15-16]及克隆了的牙鲆 RAG2 基因的基础上, 构建了 RAG2 体外原核表达质粒, 并进行了原核表达和纯化, 为 RAG2 蛋白抗体制备奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

限制性内切酶(TaKaRa, 大连), T₄ Ligase (TaKaRa, 大连), *Pfu* polymerase(Shanghai Promega, 上海), 蛋白 Marker(上海生物所), BD TALONTM Metal Affinity Resins(Clontech, USA)。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL-21 及质粒 pBluescript SK, pProEXTM HT 由本试验室保存。

1.2 引物序列

R2F7: 5'-GAC GCAAGC ACC TGT TGG AAA-3'

R2R7: 5'-GCA TCC TAT AGG AAA TGA TTC C-3'

1.3 重组表达菌获得

依据 GST Gene Fusion System 手册(Amersham

收稿日期: 2011-11-04; 修回日期: 2012-02-17

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2012AA092203); 国家自然科学基金项目(30800838); 山东省自然科学基金项目(Y2008E12)

作者简介: 王先磊(1976-), 女, 山东胶南人, 助理研究员, 博士, 主要从事海洋生物学研究, 电话: 0532-80970745, E-mail: wxl@nocq.org; 谭训刚, 通信作者, 电话: 0532-82898559, E-mail: tanx@qdio.ac.cn

Pharmacia Biotech, USA. GST Gene Fusion System, Third Edition, Revision2,1997)^[17], 将重组表达质粒转入到大肠杆菌 BL-21, 获得重组表达菌株。

1.4 IPTG 诱导浓度对重组蛋白表达量的影响

按照 Qiagen 公司(Qiagen, UAS. The QIAexpressionist™ fifth edition- A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 2003)蛋白表达及纯化手册进行蛋白的诱导表达。IPTG 的诱导浓度为 0.2、0.4、0.6、1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 mmol/L。

1.5 诱导时间对重组蛋白表达量的影响

实验方法同 1.4, 只是 IPTG 诱导浓度为 0.6 mmol/L, 第一次取样时间为诱导后 1 h, 此后每隔 1 h 取样, 共取至第 6 小时, 探讨其诱导时间对重组蛋白表达量的影响。

1.6 蛋白可溶性确定

将诱导表达的菌液 5 mL 12 000 g 离心 1 min, 收集菌体, PBS 洗涤后加入 1 mL PBS 重悬菌体。超声破碎菌体后, 12 000 g 离心 1 min。取上清, 加等体积 2×蛋白处理液, 然后沸水浴 5 min, 取 20 μL 电泳。沉淀加 500 μL PBS 重悬, 加等体积 2×样品处理液, 沸水浴 5 min, 取 10 μL 电泳。

1.7 RAG2 蛋白纯化

按照 Qiagen 公司蛋白表达及纯化手册(Qiagen, UAS. The QIAexpressionist™ fifth edition-A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 2003)进行蛋白的纯化。

1.8 SDS-PAGE 检测

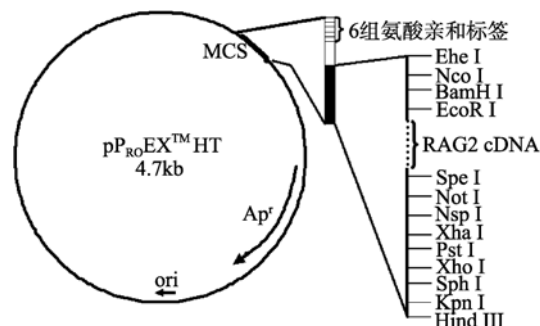
蛋白电泳用 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 8%。电泳采用恒流, 电流强度 10 mA。考马斯亮蓝 R250 进行染色, 7%的醋酸进行脱色。

2 结果

2.1 重组表达质粒构建及重组蛋白分子量确定

根据本实验室获得的牙鲆 RAG2 的基因序列, 设计特异性引物(R2F7, R2R7, 引物序列见 1.2), 利用 Pfu 聚合酶扩增牙鲆 RAG2 cDNA 的全序列; 将得到的基因片段插入到 pBluescript SK 的 Sma 位点;

通过酶切将 RAG2 基因片段转移到带 6 组氨酸标签的 pProEX™ HT 表达质粒, 构建重组表达质粒。测序确认 RAG2 基因插入方向及阅读框架的正确性。成功构建的重组表达质粒图谱见下图:



重组质粒插入的 RAG2 基因的全长为 1602 bp, 可以编码 533 个氨基酸, 加上 pProEX™ HT 表达质粒的氨基酸片段, 表达的融合蛋白 RAG2 的分子量理论值为 60 kDa。

2.2 诱导时间对重组蛋白表达量的影响

当培养温度为 37 ℃, IPTG 诱导浓度为 0.6 mmol/L 时, 加入诱导剂 IPTG 后 1 h, SDS-PAGE 电泳的结果显示, 在接近预测重组蛋白分子量的位置附近出现了一条新的蛋白条带, 与预测的 RAG2 重组蛋白的分子量 60 kDa 接近, 可以确认为该蛋白条带为带 6 组氨酸标签的 RAG2 重组蛋白(图 1)。

随着培养时间的延长, RAG2 蛋白的表达量也不断增加。到 3 h, RAG2 蛋白的表达量达到最大, 在此后的研究时间段内 RAG2 蛋白的表达量变化不大。因此, 在以后诱导 RAG2 蛋白表达时, 诱导时间定为 3 h。

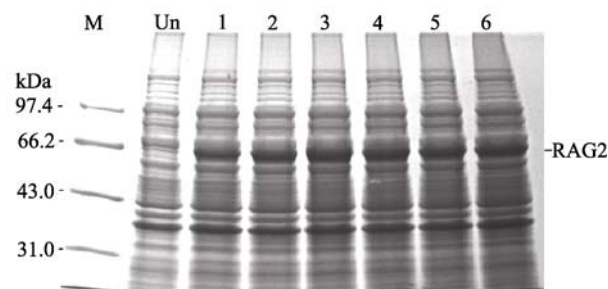


图 1 诱导时间对 RAG2 蛋白表达量的影响

Fig. 1 The effect of induction time on the expression of recombinant RAG2 protein

M. 蛋白 marker; Un. 未诱导; 诱导时间: 1. 1 h, 2. 2 h, 3. 3 h, 4. 4 h, 5. 5 h, 6. 6 h
M. protein marker; Un. uninduced; induction time: 1. 1 h, 2. 2 h, 3. 3 h, 4. 4 h, 5. 5 h, 6. 6 h

2.3 IPTG 浓度对重组蛋白产生量的影响

当培养温度为 37℃，诱导时间为 2 h 时，尽管 IPTG 浓度(0.2 ~4.0 mmol/L)变化比较大，但是其对 RAG2 蛋白的重组表达量的影响却变化不大(图 2)，因此在大量表达 RAG2 蛋白时，IPTG 浓度用最小浓度 0.2 mmol/L 对重组表达质粒进行诱导即可。

2.4 蛋白可溶性确定

菌体经超声破碎后电泳结果显示，上清中几乎没有目的蛋白带，而沉淀中主要以目的蛋白为主，这说明 RAG2 蛋白是主要以包涵体的形式存在于宿主细胞中(图 3)。

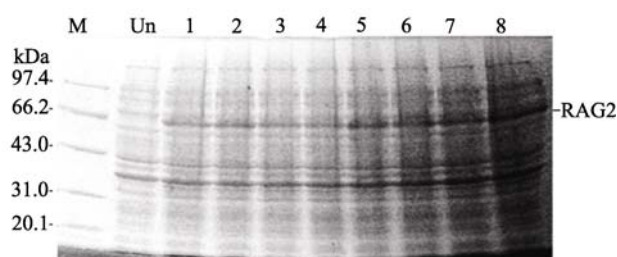


图 2 IPTG 浓度对 RAG2 蛋白表达量的影响

Fig. 2 The effect of IPTG concentration on the expression of recombinant RAG2 protein

M. 蛋白 Marker; Un. 未诱导; 1 ~ 8. IPTG 诱导浓度为 0.2、0.4、0.6、1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 mmol/L
M. protein marker; Un. Uninduced; 1 ~ 8. concentration of IPTG 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 mmol/L respectively

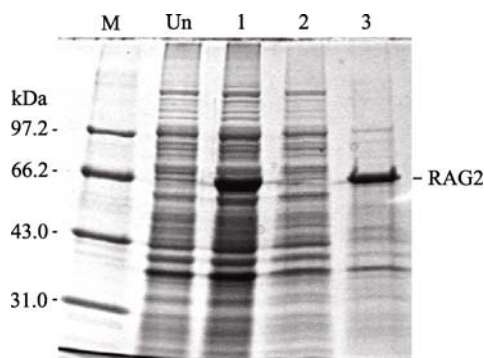


图 3 RAG2 蛋白可溶性的确定

Fig. 3 Determination of the solubility of the recombinant RAG2 protein

M. 蛋白 Marker; Un. 未诱导; 1. 诱导 3 h 样品; 2. 超声破碎离心后上清; 3. 超声破碎离心后沉淀
M. protein marker; Un. uninduced; 1. induced 3 h; 2. supernatant after ultrasonic treatment and centrifugation; 3. pellet after ultrasonic treatment and centrifugation

2.5 RAG2 蛋白亲和柱纯化

将菌体离心后，用变性裂解缓冲液裂解后，加入到 BD TALONTM 金属亲和柱，通过缓冲液 pH 逐渐降低的梯度变化，进行纯化。实验结果显示，当缓冲液 pH 为 8.0 和 6.3 时，洗涤液中没有目的蛋白，当 pH 降到 4.5 时，在对应的 RAG2 蛋白的位置出现了单一的蛋白电泳条带(图 4，带 6-9)，说明携带组氨酸序列标签表达的 RAG2 蛋白可以结合到 BD

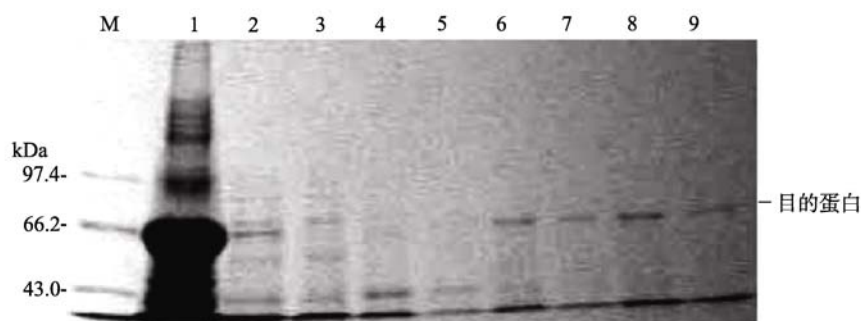


图 4 体外重组表达蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of recombinant RAG2 protein

M. 蛋白 marker; 1. 超声波破碎离心后的沉淀; 2. 样品过柱流通液; 3, 4. 2 mL 8 mol/L 尿素缓冲液(pH 8.0); 5. 2 mL 8 mol/L 尿素缓冲液 (pH 6.3); 6 ~ 9. 1.5 mL 8 mol/L 尿素缓冲液洗脱(pH 4.5)
M. protein marker; 1. pellet after ultrasonic treatment and centrifugation.; 2. flow-through; 3, 4. the wash flow by 2 mL 8 mol/L Urea (pH 8.0); 5. the wash flow by 2 mL 8 mol/L Urea (pH 6.3); 6 ~ 9. the eluates by 1.5 mL 8 mol/L Urea (pH 4.5)

TALONTM Metal Affinity Resins 亲和柱，通过 pH 的改变，RAG2 蛋白可被洗脱下来，并且蛋白纯化效果比较好。

3 讨论

对原核表达载体作者使用了带 6 组氨酸标签的

pP_{ROEX}TM HT 表达质粒, 6 组氨酸标签可与 BD TALONTM 金属亲和柱结合, 从而将目的蛋白吸附在亲和柱上, 通过改变 pH 值梯度变化进行洗脱, 从而获取高纯度的目的蛋白。得到的 RAG2 蛋白电泳后分子量比理论分子量偏大, 这可能是由于在重组蛋白前面加上一段带 6 组氨酸的载体序列造成的。

重组蛋白的表达量受到宿主菌、诱导时间和诱导物浓度的影响。作者最终使用的宿主菌株是大肠杆菌 BL-21, 作者实验初期使用的菌株是大肠杆菌 DH 5 α , 但是没有诱导出 RAG2 蛋白的表达(实验结果没有列出), 可能大肠杆菌 DH 5 α 不适合 RAG2 蛋白的表达, 说明选择合适的宿主菌对于重组蛋白在原核表达是一个重要的因素。重组蛋白表达量的多少与诱导物的浓度和诱导时间有密切关系, 本实验所用的诱导物为 IPTG, 由于 IPTG 本身有毒性, 而且价格较贵, 经过条件优化, 最终 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L。诱导时间实验显示, 经过 IPTG 的诱导, 菌体很快产生目的蛋白, 随着诱导时间的增加, 重组蛋白的量不断增加, 到 3 h 时, 重组蛋白表达量达到最大值, 此后进入平台期, 因此作者使用的诱导时间为 3 h。

外源基因在大肠杆菌中的表达产物, 通常可以以可溶性和不可溶(即包涵体)的形式存在。RAG2 蛋白主要以包涵体的形式存在于宿主菌中, 由于包涵体的不溶性、致密性和相对稳定性, 通过超声波破碎、离心可以很容易地进行初级分离。纯化后, 通过在包涵体中加入含尿素的变性裂解缓冲液, 打开蛋白中的次级键, 使组蛋白标签暴露出来, 与树脂上的 Co²⁺ 离子结合。另外, 在沉淀中发现了大量的目的蛋白存在(图 3), 可能是由于在将重悬浮液放到摇床上振荡得不够充分, 大多数包涵体都没有溶解, 可以将沉淀用变性裂解液重新悬浮, 通过 BD TALONTM 金属亲和柱进一步进行纯化, 提高目的蛋白的回收率。

参考文献:

- [1] Shinkai Y, Rathbun G, Lam K P, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement[J]. *Cell*, 1992, 68(5): 855-867.
- [2] Oettinger M A, Schatz D G, Gorka C, et al. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination[J]. *Science*, 1990, 248(4962): 1517-1523.
- [3] Carlson L M, Oettinger M A, Schatz D G, et al. Selective expression of RAG-2 in chicken B cells undergoing immunoglobulin gene conversion[J]. *Cell*, 1991, 64(1): 201-208.
- [4] Greenhalgh P, Olesen C E, Steiner L A. Characterization and expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*[J]. *J Immunol*, 1993, 151(6): 3100-3110.
- [5] Hansen J D. Inspection of the 3' UTR genomic region for RAG1 and RAG2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals potential regulatory motifs[J]. *Dev Immunol*, 1997, 5(2): 129-131.
- [6] Hansen J D, Kaattari S L. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Immunogenetics*, 1996, 44(3): 203-211.
- [7] Willett C E, Cherry J J, Steiner L A. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish[J]. *Immunogenetics*, 1997, 45(6): 394-404.
- [8] Zhong H, Li Z, Lin S, et al. Initiation of V(D)J recombination in zebrafish (*Danio rerio*) ovaries[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(7): 1784-1792.
- [9] Peixoto B R, Mikawa Y, Brenner S. Characterization of the recombinase activating gene-1 and 2 locus in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*[J]. *Gene*, 2000, 246(1-2): 275-283.
- [10] 范嗣刚, 张琼宇, 罗琛. 鲫鱼 Rag 基因的克隆及表达分析[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(4): 603-612.
- [11] 张琼宇, 范嗣刚, 罗琛. 草鱼 RAGs 的克隆及不同发育阶段的表达分析[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 795-803.
- [12] Bernstein R M, Schluter S F, Bernstein H, et al. Primordial emergence of the recombination activating gene 1 (RAG1): sequence of the complete shark gene indicates homology to microbial integrases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9454-9459.
- [13] Zapata A, Diez B, Cejalvo T, et al. Ontogeny of the immune system of fish[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(2): 126-136.
- [14] Liu Y, Zhang S, Jiang G, et al. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(5): 621-632.
- [15] 徐芑, 谭训刚, 张培军, 等. 牙鲆 Myogenin 蛋白在大

- 肠杆菌中重组表达的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 35(5): 754-758.
- [16] 文爱韵. 性别相关基因在牙鲆性腺分化和性别表型形成中的遗传学分析[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
- [17] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001: 636-644.

Construction and expression of a prokaryotic vector of recombinant olive flounder RAG2

WANG Xian-lei^{1, 2}, TAN Xun-gang¹, ZHANG Pei-jun¹, XU Yong-li¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. National Oceanographic Center, Qingdao 266071, China)

Received: Nov.,4,2011

Key words: Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*); RAG2; recombination; purification

Abstract: The full length of olive flounder RAG2 cDNA was ligated to plasmid pPROEXTM HT, and was transferred into *Escherichia coli* (BL-21) for recombinant protein expression. It showed that the protein expression was induced by IPTG. The optimal concentration of IPTG and optimal induction time were 0.2 mmol/L and 3 h, respectively. The recombinant RAG2 protein was purified by BD TALONTM Metal Affinity Resins. This study will be useful for further research on the function of flounder RAG2.

(本文编辑: 谭雪静)