

人 β_2 -微球蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的高效表达

何贤辉¹ 徐丽慧^{1,2} 刘毅^{1,3} 曾耀英^{1*}

¹(组织移植与免疫教育部重点实验室(暨南大学)广州 510632)

²(暨南大学生物工程研究所,广州 510632)

³(郑州大学第一附属医院皮肤科,郑州 450052)

摘 要 β_2 -微球蛋白(β_2m)是主要组织相容性复合体(MHC) I 类分子的轻链部分,为制备 MHC I 类分子四聚体的必要成分。根据已报道的序列设计特异引物,利用 RT-PCR 方法从人白细胞中克隆了 β_2m 基因,并构建了成熟 β_2m 的原核表达载体,在大肠杆菌中得到高效表达。表达的 β_2m 大部分在包涵体中,经洗涤、变性和复性,并以强阴离子交换柱层析纯化,获得 SDS-PAGE 纯的人重组 β_2m ,Western 印迹法分析表明该蛋白具有与抗人天然 β_2m 抗体反应的特性。此工作为制备 MHC I 类分子四聚体奠定基础。

关键词 β_2 -微球蛋白,基因克隆,重组蛋白,包涵体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0099-05

主要组织相容性复合体(MHC) I 类分子四聚体技术(Tetramer technology)是近年来发展成熟的研究特异性 CD8⁺T 细胞免疫特性的重要技术^[1-3],该技术正在成为疫苗设计、肿瘤及自身免疫病治疗等研究领域必不可少的关键技术^[3]。MHC I 类分子由一条分子量为 45 kD 的重链(α 链)和分子量 12 kD 的轻链(β 链)经非共价键结合而成,其中重链由多个基因位点和多种等位基因所编码,共显性表达,具高度多态性,而轻链则为不变的 β_2 -微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2m)^[4]。因此制备抗原特异性四聚体,除了需要某种特定的重链和抗原肽外,还需要大量纯化的 β_2m ^[1,4]。为此,我们从人白细胞中克隆了 β_2m 基因,将表达成熟 β_2m 的基因克隆至原核表达载体,在大肠杆菌(*E. coli*)中获得了高效表达,建立了简便有效的 β_2m 包涵体复性方法,并对表达产物进行了纯化和鉴定,为进一步以基因工程方法制备 MHC I 类分子四聚体,以及研究 MHC I 类分子的结构与功能关系奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 由本校周天鸿教授惠赠;BL21 (DE3)pLysS 和质粒 pET-3c 购自 Novagen;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I、T4 DNA 连接酶、高保真 DeepVent DNA Taq 聚合酶等均为美国 New England Biolabs 产品;TRIzol 试剂、ThermoScript RT-PCR 系统购自 Invitrogen;QIAquick Gel Extraction Kit 与 QIAprep Spin Miniprep Kit 为德国 QIAGEN 公司产品;淋巴细胞分离液为挪威 NYCOMED 产品;兔抗人 β_2m 多抗(Protein A 柱纯化)购自 Antibody Diagnostica Inc;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 为北京中山产品;Q-Sepharose (Fast Flow)购自 Amersham;预染蛋白分子量标准为 Gibco 产品;IPTG、尿素等为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 人白细胞总 RNA 抽提及 cDNA 合成:取健康成年志愿者肝素抗凝静脉血 3 mL,按常规方法以

收稿日期 2003-06-30,修回日期 2003-10-08。

基金项目 国家自然科学基金重点项目(No.30230350)和科技部重点基础研究发展规划项目("973"资助(No.G2000057006))。

* 通讯作者。 Tel 86-20-85220679; Fax 86-20-85221337; E-mail hozms@jnu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),以 TRIzol 试剂提取总 RNA,直接进行逆转录反应。以 2 μg 总 RNA 进行逆转录反应合成第一链 cDNA,反应体积为 20 μL ,其中包含 40 u RNase 抑制剂,1 mmol/L dNTP 混合物,2.5 $\mu\text{mol/L}$ Oligo(dT)₂₀ 及 15 u ThermoScript 逆转录酶,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45 min 后,于 85 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min 终止反应,合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增或存 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。RNA 完整性以 1% 琼脂糖凝胶电泳及扩增管家基因 GAPDH 进行验证。

1.2.2 PCR 扩增 $\beta_2\text{m}$ 基因及其克隆:参照文献 [5] 报道 $\beta_2\text{m}$ 基因全序列设计引物,前向引物为 5'-ATATCCATATGCTCTCGCTCCGTGGCCTTAG-3', 逆向引物为 5'-AACTAGGGATCCTTACATGTCTCGATCCCAC-3', 引物由上海博亚(Bioasia)合成。PCR 反应在 50 μL 总体积中进行,以 2 μL cDNA 第一链为模板,反应条件为在 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min 后开始循环,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物以 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切并以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收,与 pET-3c 连接后,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,以碱裂解法从转化子中提取质粒,双酶切法筛选接入正确外源基因的转化子,QIAprep Spin Miniprep Kit 少量制备质粒,以 ABI377 自动 DNA 测序仪测定克隆的 $\beta_2\text{m}$ 基因序列(由 TaKaRa 公司测定)。

1.2.3 成熟 $\beta_2\text{m}$ 表达载体的构建:根据成熟 $\beta_2\text{m}$ 基因 5' 序列并进行优化使 G/C 含量降低,设计前向引物为 5'-ATATCCATATGATTCAACGTACTCCAAA AATTCAAGTTTACTCACGTCATCG-3', 逆向引物为 5'-CGACTGGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAG-3', 以携带 $\beta_2\text{m}$ 基因全序列的 pET-3c 质粒为模板,按上述方法进行 PCR 扩增编码成熟 $\beta_2\text{m}$ 基因,经 *Nde* I + *Bam* H I 双酶切、连接至 pET-3c、转化 DH5 α 感受态细胞、筛选转化子,从阳性克隆中提取质粒测序鉴定。

1.2.4 $\beta_2\text{m}$ 在 *E. coli* 中的表达、包涵体复性和纯化:以测序验证的 pET- $\beta_2\text{m}$ 表达载体转化感受态 BL21(DE3)pLysS,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,然后以 1:100 接种于含 50 mg/L 氨苄青霉素和 30 mg/L 氯霉素的 LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振

荡培养至 A_{600} 约为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h,离心收集菌体,以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0,含 1 mmol/L EDTA,50 mg/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 及 10 mmol/L DTT)重悬,在冰浴中以超声波破碎菌体,离心后分别收集上清和沉淀,其中沉淀部分(包涵体)以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0,含 100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT 及 0.5% Triton X-100)重悬并经超声处理洗涤 3 次,然后再以不含 Triton X-100 的同一缓冲液洗涤 3 次,得到的包涵体 $\beta_2\text{m}$ 以 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0,含 8 mol/L 脲和 1 mmol/L DTT)溶解,离心去不溶物后,对 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)透析使 $\beta_2\text{m}$ 复性^[4]。复性产物上 Q-Sepharose 柱,以 0~100 mmol/L NaCl 线性梯度洗脱(Pharmacia GradiFrac System),合并含 $\beta_2\text{m}$ 的主峰级分,透析后以 Amicon Ultra-4 (MWCO10000)进行离心超滤浓缩。所有样品以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳进行分析。

1.2.5 SDS-PAGE:参照 Laemmli 的方法进行,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%,以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

1.2.6 Western 印迹法:蛋白样品以 15% SDS-PAGE 进行电泳,然后以 15V 电压转移 16 h,将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Bio-Rad),膜以封闭液(Tris-Buffered-Saline, pH 7.5,含 3% 小牛血清和 0.05% Tween 20)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡封闭 30 min,加入以封闭液稀释(1:800)的兔抗人 $\beta_2\text{m}$ 抗体,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,洗膜后加 1:2000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,洗

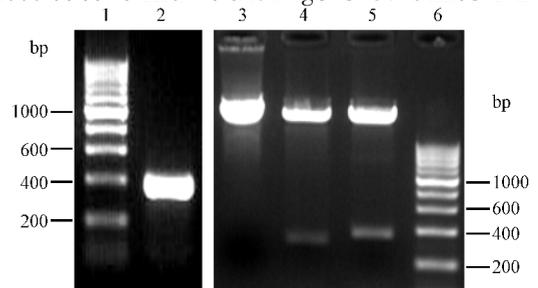


图 1 以 RT-PCR 方法从人白细胞中克隆 $\beta_2\text{m}$ 基因及成熟 $\beta_2\text{m}$ 表达载体的构建

Fig. 1 Cloning of $\beta_2\text{m}$ gene from human leukocytes and construction of recombinant expression vector for mature $\beta_2\text{m}$ 1 6: 200 bp DNA ladder; 2: RT-PCR product; 3: pET-3c/*Nde* I + *Bam* H I; 4: expression vector for mature $\beta_2\text{m}$ /*Nde* I + *Bam* H I; 5: recombinant plasmid containing $\beta_2\text{m}$ gene/*Nde* I + *Bam* H I

去二抗后以 4-氯-1-萘酚显色。

2 结果

2.1 人 β_2 m 基因的克隆及其序列测定

根据 Parker 等^[5]报道的 β_2 m 基因序列设计引物,以人白细胞总 RNA 逆转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增出一条与预计大小(360 bp)相符的 DNA 片段(图 1)。该片段经酶切后,与 pET-3c 连接,转化 DH5 α ,选取 3 个菌落抽提质粒,经酶切鉴定其中 2 个质粒已插入预计大小的外源片段(图 1, lane 5, 显示其中一个),序列分析显示该基因即为 β_2 m 全长编码区基因,该基因已在 GenBank 登记,接受号为 AY187687。

2.2 表达成熟 β_2 m 的原核表达载体构建及鉴定

为在 *E. coli* 中表达成熟 β_2 m,以含 β_2 m 全基因的质粒为模板,经 PCR 方法扩增编码成熟 β_2 m 的 DNA 片段(长度 300 bp),经酶切、连接至 pET-3c 载体,筛选接入 β_2 m 基因的阳性克隆(图 1, lane 4)经测序验证插入序列为正确编码成熟 β_2 m 的基因,含

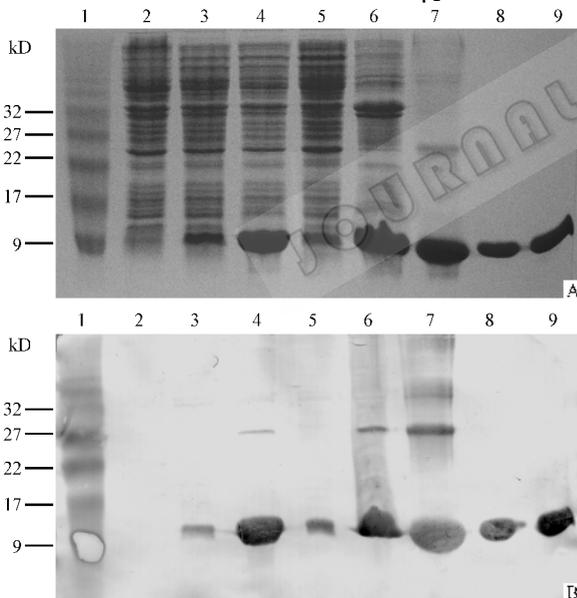


图 2 大肠杆菌中表达的 β_2 m 的 SDS-PAGE 和 Western 印迹鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analyses of mature β_2 m expressed in *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain (BL21)

1: prestained protein molecular weight marker; 2: BL21 (pET-3c) induced with IPTG for 4 h; 3: BL21 (pET- β_2 m) before IPTG induction; 4: BL21 (pET- β_2 m) induced with IPTG for 4 h; 5: supernatant of BL21 (pET- β_2 m) bacterial lysate; 6: pellet of BL21 (pET- β_2 m) bacterial lysate; 7: washed pellet (inclusion body); 8: purified β_2 m (5 μ g); 9: purified β_2 m (10 μ g)

起始密码 ATG。获得的表达载体称 pET- β_2 m。

2.3 成熟 β_2 m 在 *E. coli* 中表达、包涵体复性和纯化

将构建的 pET- β_2 m 质粒转化 BL21(DE3) pLysS, 得到含重组质粒的基因工程菌。SDS-PAGE 分析表明,该工程菌在未加 IPTG 诱导前就泄漏表达一定水平的分子量为 12 kD 外源蛋白(图 2, lane 3),而转入 pET-3c 空载体的 *E. coli* 在相同分子量部位的蛋白条带明显弱;经 IPTG 在 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 后,分子量 12 kD 的外源蛋白表达水平大大提高(图 2, lane 4),该外源蛋白分子量与人成熟 β_2 m 一致。菌体经破碎后分为上清和沉淀,可见大部分重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分(图 2, lane 6)。因此,沉淀部分经洗涤、脲溶解和透析复性后,以 Q-Sepharose 离子交换柱层析纯化(图 3),合并主峰各管并经超滤浓缩,以 Lowry 法测定蛋白浓度为 4.0 mg/mL, SDS-PAGE 分析表明该峰为纯的重组蛋白(图 2, lanes 8 and 9)。

2.4 重组 β_2 m 的 Western 印迹分析

Western 印迹分析显示,含 pET- β_2 m 的工程菌表达产物在分子量 12 kD 处的重组蛋白与抗人 β_2 m 抗体有特异性反应,而阴性对照(即转入 pET-3c 空载体的同一菌株)在 IPTG 诱导后,无任何特异性反应条带(图 2B, lane 2); β_2 m 大部分在沉淀中,仅有少量在上清可溶性部分。未经分离的混合物中在 27 kD 处显示的可能为非特异性条带,纯化后的 β_2 m 仅显示一条分子量为 12 kD 的特异性条带,说明纯化获得的重组 β_2 m 达到抗原性纯。

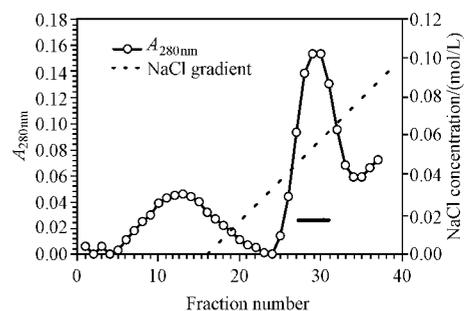


图 3 以 Q-Sepharose 离子交换柱层析纯化重组 β_2 m 结果
Fig. 3 Purification of recombinant β_2 m with Q-Sepharose column (2 cm \times 8 cm) chromatography

The column was equilibrated with 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0). The sample dialyzed against the same buffer was loaded onto the column and eluted with 0 ~ 100 mmol/L NaCl linear gradient at a low rate of 1 mL/min. Fractions of 3 mL were collected. Bar indicates the pooled fractions

3 讨 论

β_2m 是组成 MHC I 类分子复合体的轻链分子, 对于 MHC I 类分子在细胞表面稳定表达和有效提呈抗原肽必不可少^[6,7], 并且 β_2m 能促进抗原肽与细胞表面 MHC I 类分子的结合^[8,9]; 它也是制备 MHC I 类分子四聚体的必要成分^[1-3]。我们从人白细胞中克隆了 β_2m 全基因, 构建了成熟 β_2m 表达载体, 在 *E. coli* 中得到高效表达, 并对包涵体中 β_2m 进行了复性和纯化, 获得了高纯度的 β_2m , 为特异性四聚体制备和探索 MHC I 类分子结构与功能关系提供了条件。

有关 β_2m 在 *E. coli* 中的表达国内也有报道, 其中一个研究报道在 β_2m 末端融合 His₆ 标签以便于纯化, 但未进行复性纯化^[10], 另一研究报道在 β_2m 上连接一段 OVA 肽^[11]。与这些报道的设计不同, 我们构建的载体表达不带任何外源序列的成熟 β_2m , 主要考虑到 β_2m 与 MHC I 类分子重链及抗原肽复性形成与天然相似的肽-MHC 复合物 (pMHC), 需要天然的 β_2m ; 如在末端连接其它外源氨基酸序列, 可能影响 β_2m 的整体构象^[9], 进而对 pMHC 的构象造成影响, 使获得的四聚体特异性发生改变, 不同于天然 pMHC I 类分子。可能基于这一理由, 一般利用不带外源序列的成熟重组 β_2m 构建 MHC I 类分子四聚体^[1-3]。因此, 本研究获得的重组 β_2m 对于 MHC 四聚体的制备更为合适。其次, 我们通过对包涵体进行洗涤而进行初步纯化, 然后以离子交换柱层析进一步纯化, 获得了 SDS-PAGE 和 Western 印迹纯的 β_2m 重组蛋白, 复性和纯化都比较简便, 因此无需为了纯化方便而加入 His₆ 标签等外源序列, 避免外源序列对其构象带来影响。

我们构建的 β_2m 在 *E. coli* 中获得高效表达, 原因之一可能是该蛋白为只有 99 个氨基酸组成的小分子蛋白, 因而易于在原核系统表达; 另一重要原因可能是我们对 β_2m 基因 5' 密码进行无同突变, 保持氨基酸不变而降低了 G/C 含量^[12], 因而提高了表达水平。表达的 β_2m 大部分都在包涵体内, 这更利于纯化, 并且复性和纯化也较易进行, 这对于 MHC I 类分子四聚体的制备都是有利的^[1,4]。

通过 Western 印迹法显示, 在转化空载体的 *E. coli* 中无任何阳性条带, 只有转入带有人 β_2m 基因载体的 *E. coli* 后才出现预计分子量大小的反应条

带, 因为检测所用的抗体为对人 β_2m 特异的 IgG, 这证明在 *E. coli* 中表达获得的重组蛋白为人 β_2m 。由于 β_2m 为组成 MHC 的轻链结构成分, 除了通过 Western 印迹法等免疫学方法鉴定其抗原特性外, 无合适的生物活性测定方法, 只能通过构建 pMHC 复合体间接予以证明^[4]。我们已经成功构建 MHC 重链分子原核表达载体, 并在大肠杆菌中得到高水平表达 (未发表数据), 目前正在进行 MHC 四聚体的构建工作。

总之, 我们克隆了 β_2m 的基因并构建了原核表达载体, 同时, 建立了简便有效的 β_2m 包涵体复性和纯化方法, 为进一步大量工程化制备 MHC I 类分子四聚体及研究 pMHC 的功能奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [published erratum appears in *Science* 1998, 280(5371):1821]. *Science*, 1996, **274**: 94-96
- [2] Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8⁺ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods*, 2002, **268**: 9-19
- [3] Hugues S, Malherbe L, Filippi *et al.* Generation and use of alternative multimers of peptide/MHC complexes. *J Immunol Methods*, 2002, **268**: 83-92
- [4] Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3429-3433
- [5] Parker KC, Silver ML, Wiley DC. An HLA-A2/beta 2-microglobulin/peptide complex assembled from subunits expressed separately in *Escherichia coli*. *Mol Immunol*, 1992, **29**: 371-378
- [6] Kozlowski S, Takeshita T, Boehncke WH *et al.* Excess β_2 -microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules. *Nature*, 1991, **349**: 74-77
- [7] Otten GR, Bikoff E, Ribaldo RK *et al.* Peptide and β_2 -microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression. *J Immunol*, 1992, **148**: 3723-3732
- [8] Shields MJ, Assefi N, Hodgson W *et al.* Characterization of the interactions between MHC class I subunits: a systematic approach for the engineering of higher affinity variants of (2-microglobulin). *J Immunol*, 1998, **160**: 2297-2307
- [9] Shields MJ, Kubota R, Hodgson W *et al.* The effect of human β_2 -microglobulin on major histocompatibility complex I peptide loading and the engineering of a high affinity variant. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 8010-8018
- [10] Qian L (钱丽), Qian SB (钱书兵), Qian GX (钱关祥). Cloning and expression of human β_2m . *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2001, **17**: 384-

- [11] Qian L (钱丽), Qian GX (钱关祥). Induction of *in vivo* CTL immunity by OVA₂₅₇₋₂₆₄- β_2 m fusion protein. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2002 , 18 : 439 - 441
- [12] Allan DSJ , Colonna M , Lanier LL *et al.* Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* , 1999 , 189 : 1149 - 1155

Cloning of Human β_2 -microglobulin Gene and Its High Expression in *Escherichia coli*

HE Xian-Hui¹ XU Li-Hui^{1 2} LIU Yi^{1 3} ZENG Yao-Ying^{1*}

¹(Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology (Jinan University) , Ministry of Education , Guangzhou 510632 , China)

²(Institute of Bioengineering , Jinan University 601 Huangpu Road West , Guangzhou 510632 , China)

³(Department of Dermatology , the First Affiliated Hospital , Zhengzhou University , Zhengzhou 450052 , China)

Abstract Human β_2 -microglobulin (β_2 m) is the light chain of major histocompatibility complex (MHC) class I molecule. High-yield production of this protein is a prerequisite to the preparation of MHC I tetramer. The present study aims to obtain recombinant human β_2 m expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*), for the purpose of preparing MHC class I tetramers. For cloning of human β_2 m gene , a pair of specific primers was designed based on the published sequence of this gene and the cDNA of full coding region for β_2 m precursor was obtained by RT-PCR from the total RNA of human leukocytes. The amplified cDNA was subsequently cloned and its sequence was confirmed by DNA sequencing analysis (the sequence has been deposited in GenBank with accession number of AY187687). The prokaryotic expression vector containing a gene encoding mature β_2 m was constructed by inserting the DNA fragment , which was generated by PCR reaction with the cloned β_2 m gene as template , into an IPTG-inducible expression vector pET-3c plasmid. The first eight codons for N terminal amino acid residues of β_2 m were optimized for its expression in *E. coli* . The complete sequence of β_2 m gene in the expression vector was verified by DNA sequencing analysis. High-yield expression of β_2 m was achieved in *E. coli* transformed with the expression vector , and most of the recombinant β_2 m existed in the inclusion body after IPTG induction. The inclusion body was washed extensively and β_2 m in the inclusion body was solubilized with 8 mol/L urea. The β_2 m was refolded by dialysis and purified by ion-exchange chromatography (Q-Sepharose). Western blotting assay indicated that the polyclonal antibody against human native β_2 m could react specifically with the recombinant protein. The purified protein appeared as a single band on both SDS-PAGE and Western blotting , indicating that it was chemical and antigenic pure. This work establishes a convenient approach for renaturation and purification of large quantity of recombinant β_2 m which is identical to the native protein without any tags fused except for a methionine residue at the amino terminus. This provides the basis for the preparation of MHC tetramers.

Key words β_2 -microglobulin ; gene cloning ; recombinant protein ; inclusion body

Received : 06-30-2003

This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China (No. 30230350) and National Basic Research Priorities Program of China (No. G2000057006).

* Corresponding author. Tel 86-20-85220679 ; Fax : 86-20-85221337 ; E-mail : zoms@jnu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>