

## A30P $\alpha$ -synuclein 原核表达载体的构建及表达\*

周英泽 王桂芬 刘江月 张代娟 刘同美 $\Delta$

(潍坊医学院病理生理学教研室, 山东 潍坊 261053)

**摘要 目的** 构建 A30P $\alpha$ -synuclein 基因的原核表达载体, 分析其在大肠杆菌中的表达。**方法** 酶切质粒 pcDNA3.0-A30P $\alpha$ -synuclein, 获得 A30P $\alpha$ -synuclein 基因的目的片段, 克隆至原核表达载体 pGEX-6P-1 中, 转化大肠杆菌 BL21。IPTG 诱导后, 经考马斯亮蓝染色和 Western-blot 分析目的蛋白的表达。**结果** A30P $\alpha$ -synuclein 基因克隆至 pGEX-6P-1 载体中, 考马斯亮蓝染色及 Western-blot 检测到 A30P $\alpha$ -synuclein 蛋白在 BL21 中的表达。**结论** 成功构建 A30P $\alpha$ -synuclein 的原核表达载体, 并在大肠杆菌中表达了 A30P $\alpha$ -synuclein 融合蛋白, 为进一步研究 A30P $\alpha$ -synuclein 在帕金森病中的作用奠定了良好基础。

**关键词** A30P $\alpha$ -synuclein; 帕金森病; GST-融合蛋白

**中图分类号**: R33 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)04-097-03

### Construction of prokaryotic expression vector of A30P $\alpha$ -synuclein and expression in E. coli BL21

ZHOU Ying-ze, WANG Gui-fen, LIU Jiang-yue, et al

(Department of Pathophysiology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

**Abstract: Objective** To construct a prokaryotic expression vector of A30P  $\alpha$ -synuclein and analyze its expression in E. coli BL21. **Methods** The fragment of A30P $\alpha$ -synuclein was cloned into pGEX-6P-1 vector correctly and then transformed into E. coli BL21. The expression of A30P $\alpha$ -synuclein was induced with IPTG, and analyzed by Coomassie brilliant blue dyeing and Western-blot. **Results** A30P  $\alpha$ -synuclein was cloned into pGEX-6P-1 properly. The recombinant fusion protein was expressed in E. coli BL21 by Coomassie brilliant blue dyeing and Western-blot. **Conclusion** The prokaryotic expression vector of A30P  $\alpha$ -synuclein has been successfully constructed and expressed in E. coli BL21 which provides a foundation for the further study of A30P $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease.

**Key words**: A30P $\alpha$ -synuclein ; Parkinson's disease ; GST-fusion protein

帕金森氏病(PD)是严重影响人类身体健康的常见神经退行性疾病,其典型的病理表现是多巴胺神经元变性及Lwey小体(LB)的形成。 $\alpha$ -synuclein是LB的主要组成成分,在PD的发病过程中起着重要作用。 $\alpha$ -synuclein是一个含有140个氨基酸的蛋白,其基因定位于染色体4q21.3-q23<sup>[1]</sup>,存在3个点突变,分别是A53T、A30P、E46K<sup>[2-4]</sup>,主要分布于神经细胞突触前膜。研究发现,A30P $\alpha$ -synuclein可促进 $\alpha$ -synuclein蛋白在细胞内的积聚,使细胞对细胞毒性物质的敏感性提高,甚至对细胞产生直接的毒性作用;过表达人A30P $\alpha$ -synuclein的转基因动物模型出现多巴胺能神经元缺

失,形成含 $\alpha$ -synuclein的神经元内包涵体并表现出运动功能障碍,说明A30P $\alpha$ -synuclein与PD有密切的关系。为了进一步研究A30P $\alpha$ -synuclein在PD发病中的作用机制,我们构建A30P $\alpha$ -synuclein的原核表达载体并在大肠杆菌中表达带有GST标签的A30P $\alpha$ -synuclein融合蛋白,为通过GST pull down等方法研究A30P $\alpha$ -synuclein与其他蛋白之间相互作用的研究打下良好基础。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料

质粒 pcDNA3.0-A30P $\alpha$ -synuclein、pGEX-6P-1 和大肠杆菌 BL21 为本实验室保存;限制性内切酶 BamHI 和 XhoI、T4DNA 连接酶为大连宝生物

\* [基金项目]山东省卫生厅青年基金资助项目(编号:2007QW007)

$\Delta$  [通信作者]刘同美,E-mail:blshl@wfmuc.edu.cn

产品;引物、DNA marker 为上海生工生物工程有  
限公司产品;质粒小量抽提试剂盒为碧云天产品;  
小鼠抗人  $\alpha$ -synuclein 单克隆抗体为 Santa Cruz 公  
司产品;辣根酶(HRP)标记抗小鼠 IgG 为北京中  
杉产品;其他化学试剂为国产分析纯级。

## 1.2 方法

**1.2.1 原核表达载体的构建** BamHI 和 XhoI 切  
质粒 pcDNA3.0-A30P $\alpha$ -synuclein, 与 BamHI 和  
XhoI 双酶切的质粒 pGEX-6P-1 载体片段按摩尔  
数 3:1 的比例在 4℃ 连接 16 h, 取全部连接反应液  
转化 BL21 感受态细菌。

**1.2.2 原核表达载体的鉴定** 上游引物:5'-gatg-  
gatgattcatgaaagg-3, 下游引物:5'-ttaggttcaggttcg-  
tagt-3, 挑取单菌落进行菌落 PCR 反应。PCR 反  
应条件:94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 40 s, 50℃ 退  
火 40 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环, 循环结束后再  
延伸 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.3 GST 融合蛋白的诱导表达** 将鉴定正确  
的菌株常规培养至对数中期(A550 为 0.5~1.0),  
使用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 收获细  
菌, PBS 重悬后加入终浓度为 1 mg/ml 的溶菌酶,  
冰上放置 30 min, 将 0.2% Triton-100 注入裂解物  
中, 剧烈震荡混匀后加入终浓度为 5  $\mu$ g/ml 的  
DNase 和 RNase, 震荡 10 min 后, 4℃, 3000 r/min  
离心 30 min, 取上清并加入 DTT 至终浓度 1  
mmol/L。在蛋白溶液中加入等体积的 2 $\times$ SDS 蛋  
白上缓冲溶液, 100℃ 煮沸 5 min 后进行 SDS-  
PAGE 凝胶电泳。

**1.2.4 考马斯亮蓝 R250 染色** 将 SDS-PAGE 电  
泳后的凝胶放入考马斯亮蓝 R250 染色液中, 在摇  
床上室温缓慢摇 4~5 h, 换掉染色液, 用考马斯亮  
蓝 R250 染色脱色液浸泡凝胶, 缓慢摇动 24 h, 其  
间换 3~4 次脱色液, 用扫描仪扫描凝胶图像。

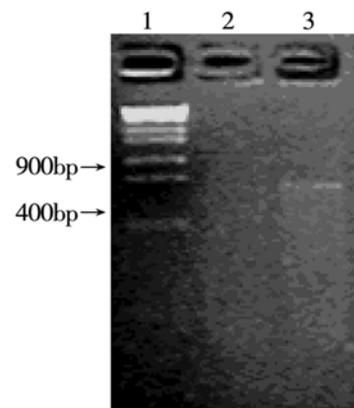
**1.2.5 Western-blot** 蛋白转移到 NC 膜上后,  
5% 的脱脂奶粉封闭液封闭 1 h 后, 加入小鼠抗人  
 $\alpha$ -synuclein 一抗稀释液(1:500), 4℃ 过夜, TBST  
清洗 3 次后, 加入辣根酶(HRP)标记的抗小鼠 IgG  
二抗稀释液(1:10000)室温孵育 2 h, TBST 清洗后  
进行 DAB/NiCl<sub>2</sub> 显色。

## 2 结果

### 2.1 pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein 原核表达载体的鉴定

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后可见约  
450 bp 左右的特异 DNA 条带(图 1), 且未出现非

特异扩增现象, 与 A30P $\alpha$ -synuclein 的 DNA 片段  
大小一致。

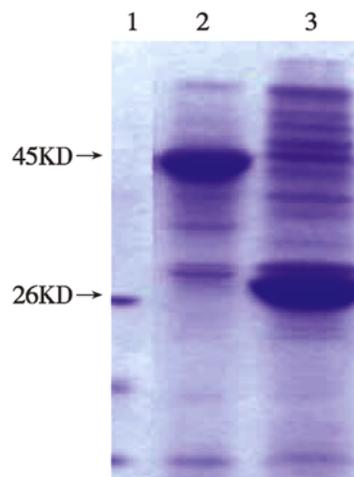


泳道 1: Marker  
泳道 2: 阴性对照  
泳道 3: pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein 菌液 PCR

图 1 pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein 原核表达载体菌液 PCR 结果

### 2.2 考马斯亮蓝 R250 染色

重组的原核表达载体 pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein  
与空载体 pGEX-6P-1 比较在 45KD 处出现新的特  
异性强染蛋白条带, 与预期的融合蛋白分子大小相  
同; 而空载体 pGEX-6P-1 仅在 26KD 附近出现强  
染蛋白条带, 与标签 GST 蛋白条带大小一致(图  
2)。

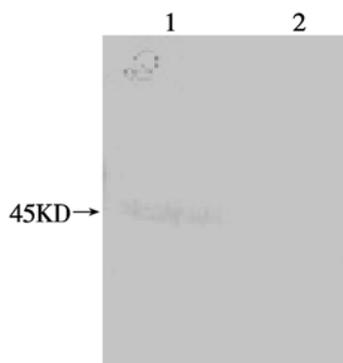


泳道 1: 蛋白 Marker  
泳道 2: pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein 诱导表达  
泳道 3: pGEX-6P-1 诱导表达

图 2 考马斯亮蓝 R-250 染色结果

### 2.3 Western-blot

如图 3 所示,重组的原核表达载体 pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein 在 1 泳道的 45KD 处出现 GS-A30P $\alpha$ -synuclein 的融合蛋白表达;而 2 泳道则没有出现同样的蛋白条带。



泳道 1:pGEX-A30P $\alpha$ -synuclein 诱导表达  
泳道 2:pGEX-6P-1 诱导表达

图 3 Western-blot 结果

### 3 讨论

$\alpha$ -synuclein 在帕金森氏病的发病过程中发挥十分重要的作用,该蛋白的主要结构由 3 部分组成:1)N 末端,包含引起常染色体显性遗传 PD 的点突变(A30P,E46K,A53T),该区含有一个 11 个氨基酸的重复序列,高度保守的 KTKEGV 基元就位于该重复序列中。该区在阴离子膜表面呈两歧性螺旋结构,这提示它有结合脂质的特性;2)NAC 区,是该蛋白发挥作用的核心部位,具有神经毒性作用,能够转变成为  $\beta$  片层结构并形成 A $\beta$  样原纤维和纤维;3)C 末端区,这个区富含酸性氨基酸和脯氨酸,结构比较紊乱。在通常情况下, $\alpha$ -synuclein 以原始非折叠状态存在,但在较高浓度的时候,野生型及突变型  $\alpha$ -synuclein 则呈低聚体  $\beta$  片层结构,形成淀粉样纤维和原纤维化<sup>[5-6]</sup>。 $\alpha$ -synuclein 可在突触囊泡上产生小孔,使囊泡的渗透性增加,而 A30P $\alpha$ -synuclein 可使这种作用增强; $\alpha$ -synuclein 突变能够改变  $\alpha$ -synuclein 蛋白在细胞内的正常分布,提高  $\alpha$ -synuclein 蛋白与细胞内其它蛋白之间的相互作用,并且能够促进  $\alpha$ -synuclein 原纤

维蛋白的沉积,从而进一步形成神经细胞内容物。

蛋白质的相互作用能产生许多效应,如改变蛋白质的动力学,形成特异底物作用通道,生成新的结合位点,使蛋白质失活,改变蛋白质对其作用底物的专一性等。了解蛋白质相互作用的方式、作用程度、作用结果,将有助于解决蛋白质功能的分析、疑难病理的研究等问题。GST pull-down 是一种研究蛋白相互作用的高通量敏感手段,该技术利用重组技术将一种已知蛋白与 GST 标签融合表达作为诱饵,与其它已知蛋白或未知蛋白孵育,通过 pull-down 验证它们之间特异性的相互作用。

本实验采用基因工程的方法构建 A30P $\alpha$ -synuclein 的原核细胞表达载体,IPTG 诱导后,考马斯亮蓝染色和 Western-blot 均在 45 KD 处出现特异性蛋白条带,说明我们构建的 A30P $\alpha$ -synuclein 原核表达载体成功并在 BL21 细菌中表达。这为下一步通过 GST pull down 捕获与 A30P $\alpha$ -synuclein 作用的蛋白及研究其在 PD 发病机制中的作用奠定了良好的基础。

### 参考文献:

- [1] Campion D, Martin C, Heilig R, et al. The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease[J]. Genomics, 1995, 26(2): 54-57.
- [2] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease[J]. Science, 1997, 276(5321): 2045-2047.
- [3] Kruger R, Kulm W, Muller T, et al. Ala30P mutation in the gene encoding  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease [J]. Nat Genet, 1998, 8(2): 106-108.
- [4] Zarranz JJ, Lezcano E, Alegre J, et al. The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes Parkinson and Lewy Body Dementia[J]. Ann Neuro, 2004, 55(2): 164-173.
- [5] Conway KA, Harper JD, and Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant  $\alpha$ -synuclein linked to early-onset Parkinson disease[J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1318-1320.
- [6] Clayton DF, George JM. Synucleins in synaptic plasticity and Neurodegenerativedisorders[J]. J Neurosci Res, 1999, 58(1): 120-129.

(收稿日期 2012-04-01)