

# 神经系统富亮氨酸重复超家族成员 LRRN3 C 端 结构域蛋白的原核表达和纯化

杨 静<sup>a,b</sup>, 蔡 艳<sup>b</sup>, 黄 河<sup>a,b\*</sup>, 李 芳<sup>b</sup>, 伍赶球<sup>a</sup>, 杨 景<sup>a</sup>, 罗学港<sup>b</sup>

( 中南大学 湘雅医学院 a.组织学与胚胎学系; b.人体解剖学与神经生物系, 中国湖南 长沙 410013)

摘 要: 神经系统富亮氨酸重复超家族成员 LRRN3 是一种重要的膜蛋白, 与神经系统发生发育和损伤后修复密切相关. 运用多聚酶链式反应 (PCR) 方法, 获得长 555 bp 的 DNA 序列, 扩增产物克隆至 pET21 质粒中, 构建 Mal 和 His 融合表达质粒, 在大肠杆菌中诱导表达融合蛋白, 经 Ni<sup>+</sup>-NTA agarose 亲和层析纯化获得融合蛋白, 并以 Western blotting 鉴定, 为进一步研究 LRRN3 基因的结构和功能奠定了基础.

关键词: LRRN3; 融合蛋白; 蛋白纯化

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)03-0227-05

## Expression and Purification of C-Terminal Domain in LRRN3, a Member of Neuron Leucine Rich Repeat Superfamily

YANG Jing<sup>a,b</sup>, CAI Yan<sup>b</sup>, HUANG He<sup>a,b\*</sup>, LI Fang<sup>b</sup>, WU Gan-qiu<sup>a</sup>,  
YANG Jing<sup>a</sup>, LUO Xue-gang<sup>b</sup>

( a. Department of Histology and Embryology; b. Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China)

Abstract: DNA sequence of C-terminal domain of LRRN3, a member of neuron leucine rich repeat superfamily, was obtained by PCR. A 555 bp sequence was cloned into expression vector pET21 to construct the Mal and His fusion protein. The recombinant plasmid was transformed into E. coli BL21 and the over expressed fusion protein of C-terminal domain was existed in inclusion bodies. The fusion protein was purified with Ni<sup>+</sup>-NTA agarose. Fusion protein was testified by Western blotting using anti-His monoclonal antibody. The foundation was based by this work to do further investigation on the structure and function of LRRN3.

Key words: LRRN3; fusion protein; protein purification

( Life Science Research, 2008, 12(3): 227-231)

神经系统富亮氨酸重复 (Neuronal Leucine Rich Repeat, NLRR) 超家族是一类在神经系统特异性表达的蛋白质超家族, 他们具有共同基因结

构特点, 包含多个连续的 LRR 结构域以及 IgC2 样结构<sup>[1]</sup>. LRR 蛋白从果蝇到哺乳动物高度保守, 哺乳动物中已克隆了小鼠、大鼠、人、马等的同源

收稿日期: 2008-05-27; 修回日期: 2008-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600224, 30700438); 中国博士后科学基金资助项目 (20060390886); 湖南省自然科学基金资助项目 (06JJ30014)

作者简介: 杨静 (1977-), 女, 湖南长沙人, 硕士, 中南大学湘雅医学院组织学与胚胎学系讲师, 博士研究生, E-mail: yangjing\_197702@hotmail.com; 蔡艳 (1975-), 女, 湖南津市人, 中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系讲师, 博士研究生, 并列第一作者, E-mail: caijiyan@yahoo.com.cn; \* 通讯作者: 黄河 (1975-), 男, 湖南汉寿人, 博士, 中南大学副教授, 主要从事神经系统发育的分子机理研究, Tel: 0731-2650436; E-mail: huanghe@xsm.net

蛋白。许多 LRR 蛋白如 slit, toll, tartan 和 flrt 等与神经系统的发育、分化及损伤后再生密切相关<sup>[2-4]</sup>；含有 IgC2 结构域的蛋白如神经细胞黏附分子 (NCAM) 与脊椎动物神经系统的发育同样有着密切关系<sup>[5]</sup>。同时具有 LRR 和 IgC2 结构的 NLRR 蛋白家族成员通过介导细胞间黏附，参与神经系统发育的一系列过程。

LRRN3 又名 NLRR3) 是 2001 年 Fukamachi 等克隆的 NLRR 超家族新成员，编码 707 个氨基酸，基因表达主要通过 Ras-MAPK 信号传导通路来调控。通过 Northern 对 mLRRN3 基因表达谱进行初步检测，发现该基因主要在大鼠中枢神经系统表达，然而至今尚无人对其精确定位，对 LRRN3 的生理功能和作用机制了解更少<sup>[6,7]</sup>。为深入研究 LRRN3 在哺乳动物中的蛋白表达谱，探讨其在神经系统发育、分化以及损伤后再生中的作用，我们以 cDNA 文库为模板，采用多聚酶链式反应 (PCR) 扩增大鼠 LRRN3 的 C 端基因片段，构建融合蛋白重组表达载体并在大肠杆菌中表达。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

RNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、酶切产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒和 Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose 购自 QIAGEN 公司。反转录试剂盒和 T<sub>4</sub> 连接酶购自 PROMEGA 公司。两种限制性内切酶购自纽英依 (NEB) 生物技术有限公司。核酸相对分子质量标准 DNA Marker DL2000 为 TaKaRa 产品。蛋白质相对分子质量标准购自上海生化所。IPTG 为 Geneview 公司产品。HRP-抗 His 抗体购自金思特科技有限公司。其他化学试剂为进口或国产分析纯产品。表达载体 pET21-mal (末端用 His 标记) 和感受态菌株 E.coli JM109 以及表达大肠杆菌菌株 E.coli BL21 (DE3) 为本室保存。SD 大鼠购自本校实验动物中心。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 生物信息学分析

运用 DS gene 1.1 生物学软件对 Genbank 中大鼠 mLRRN3 基因序列 (登陆号: NM\_030856) 进行结构和功能分析。根据其跨膜结构域、亲水性和抗原性，选择 C 端包含一个 FN 样结构和小段胞浆内尾部序列的 185 个氨基酸 (555 bp) 的最佳区域。

#### 1.2.2 大鼠 LRRN3 分子 C 端序列的扩增

根据预测的蛋白结构域，用 Primer Premier 5.0 软件设计重组体构建引物，并在两端分别加上 BamH I 和 Xho I 酶切位点。上游引物: 5'-GCCGTCTCGGATCCGGGTCATTGAATATTAATAAGAG-3'，下游引物 5'-GCCGTCTCCTCGAGGGACATACTTGTCTGGCACACCT-3'，由 Invitrogen Biotechnology Co., Ltd 公司合成。根据 TRIzol 操作指南，从 SD 大鼠新鲜大脑组织提取总 RNA，依据反转录试剂盒说明将总 RNA 转录成 cDNA。以此 cDNA 为模板，采用上述引物通过 PCR 扩增 LRRN3 的 C 端基因片段。PCR 反应体系为: 95 变性 2 min; 94 变性 30 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 最后 72 延伸 6 min, 30 个循环。取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。

#### 1.2.3 重组克隆载体的构建与鉴定

RT-PCR 产物经凝胶回收试剂盒回收后，用回收的目的 DNA 片段作为插入 DNA，经 BamH I 和 Xho I 双酶切，在 T<sub>4</sub> 连接酶作用下与用同种酶切并线性化好的载体 pET21 连接。载体与片段比例 1:2，反应温度 16  $^{\circ}$ C，反应时间 16 h。将重组质粒导入感受态细菌 E.coli JM109 中，具体方法如下: 将 10  $\mu$ L 连接产物加入 50  $\mu$ L E.coli JM109 感受态细胞中，冰上放置 1 h; 42  $^{\circ}$ C 热激 60 s; 冰浴 3 min; 加入 400  $\mu$ L 无抗性 LB 培养基，37  $^{\circ}$ C 摇床培养 1 h; 离心，10 000 r/min，1 min; 弃上清，将菌体重悬，均匀涂在含 100 mg/L 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 琼脂平板培养基上，37  $^{\circ}$ C 静置培养 14~20 h，至长出大小适当、均一性较好的菌落。挑选两个菌落 LRRN3-A 和 LRRN3-B，将挑选菌落在 5 mL LB 培养基培养过夜，用质粒抽提试剂盒抽提质粒，并用内切酶 BamH I 和 Xho I 做酶切鉴定分析。取鉴定正确的重组质粒样本送 Invitrogen Biotechnology Co., Ltd 公司测序验证。

#### 1.2.4 重组蛋白的原核表达与分析

将构建好的表达载体转化至原核表达宿主 E.coli BL21 (DE3) 感受态菌株中，转化方法同上。将含重组表达载体的阳性转化菌株接种于 Amp<sup>r</sup> (100 mg/L) 的 LB 琼脂平板上，37  $^{\circ}$ C 过夜活化。取 100 mL 过夜培养物接种于 2 L 同种培养基中，200~250  $\times$ g，37  $^{\circ}$ C 震荡培养 3.5 h，至 A<sub>600</sub> = 0.53 时，加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L，37  $^{\circ}$ C 诱导培养 5 h。取 1.5 mL 菌液留样，其它菌液转入大离心瓶，4 000  $\times$ g，4  $^{\circ}$ C 离心 20 min，收集菌体。

用蛋白纯化试剂盒 buffer A PBS( pH 7.5) 100 mL 洗涤细胞, 4 000 ×g, 20 min, 4 离心. 弃上清, -80 冻存过夜. 样品菌液经 PBS( pH 7.5) 重悬, 室温放置 20 min, 超声破碎, 10 000 ×g 离心 10 min( 4 ), 分别收集上清和沉淀, 进行常规 SDS-PAGE 分析.

### 1.2.5 表达产物的纯化与鉴定

冻存细菌在冰上溶解 15 min, 按每克细菌 5 mL 体积加入 buffer B 裂解细菌, 室温下轻悬细胞 15~60 min, 避免产生泡沫, 至溶液完全变透明. 室温下 10 000 ×g, 30 min 离心细菌裂解液, 收获上清. 每 4 mL 裂解液上清加 1 mL 的 50% Ni<sup>+</sup>-NTA 胶, 室温下轻摇 60 min. 将含有 Ni<sup>+</sup>-NTA 胶的裂解液上清灌入下端封闭的层析柱, 去掉层析柱下端盖子, 让液体自由流出, 收集流穿液. 用 buffer C 洗 Ni<sup>+</sup>-NTA 胶, 共两次, 每次 4 mL, 用 buffer E 洗脱重组蛋白, 共洗 4 次, 每次 0.5 mL, 收集洗脱液并用 SDS-PAGE 分析.

### 1.2.6 Western blotting

SDS-PAGE 电泳后的凝胶, 经电转仪将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上, 用 HRP-抗 His 抗体进行 Western blotting 分析.

## 2 结果

### 2.1 C 端序列的 PCR 克隆及表达载体的鉴定

从 SD 大鼠大脑组织总 RNA 扩增出来的 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 产物基因片段长度约 550 bp, 与预期扩增目的片段大小一致, 并且高度特异, 无其它特异性扩增条带存在( 图 1).

回收的 PCR 产物经 BamH I 和 Xho I 双酶

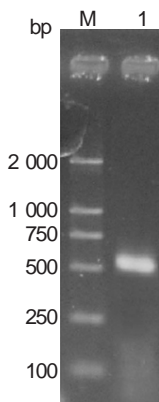


图 1 PCR 扩增结果  
M: DNA Marker DL2000; 1: LRRN3 的 C 端扩增序列.

Fig.1 Result of PCR

M: DNA Marker DL2000; Lane 1: C-terminal domain sequence of LRRN3.

切, 在 T<sub>4</sub> 连接酶的作用下与经相同酶切处理的载体 pET21 连接后, 转化入 E.coli JM109 感受态细胞. 挑选两个阳性菌落抽提质粒并用 BamH I 和 Xho I 酶切鉴定. 目的基因片段长约 0.5 kb, 线性 pET21 长约 5.4 kb, 重组质粒酶切产物分别在 550 bp 和 5.4 kb 处出现条带( 图 2), 与线性载体片段及目的片段大小相符, 表明重组质粒构建成功.

酶切鉴定正确的重组质粒样本经 Invitrogen Biotechnology 公司测序, 表明该插入序列与预期一致, 阅读框架完整, 并且无移码.

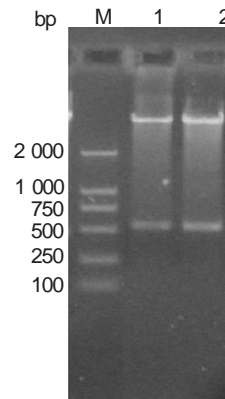


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

M: DNA Marker DL2000; 1: 重组体菌落 LRRN3-A 的酶切产物; 2: 重组体菌落 LRRN3-B 的酶切产物.

Fig.2 Identification of recombinant by restriction endonuclease digestion

M: DNA Marker DL2000; Lane 1: LRRN3-A recombinant; Lane 2: LRRN3-B recombinant.

### 2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将重组表达载体转化 E.coli BL 21, 37 震荡培养, 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L 诱导表达 5 h. 样品菌液经超声破碎裂解后, 可溶与不可溶产物经 SDS-PAGE 分析表明表达产物主要存在于不溶性包涵体中, 上清中几乎没有预期蛋白带. 重组子不可溶性产物在相对分子质量约 61.8 kD 处有一较强的特异带, 与预期相对分子质量相符, 为目的蛋白( 图 3).

### 2.3 表达产物纯化后 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

表达产物在变性状态下经 Ni<sup>+</sup>-NTA agarose 层析纯化后, SDS-PAGE 分析表明在相对分子质量 61.8 kD 处特异蛋白条带明显, 并且纯化效果好( 图 4). Western blotting 分析显示新生的蛋白条带可与抗 His 抗体结合, 分子质量大小约为 61.8 kD, 表明该蛋白条带即为 His 融合蛋白( 图 5).

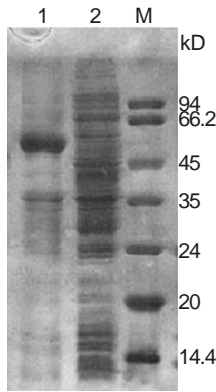


图3 融合蛋白表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析  
M: 蛋白质分子质量标准; 1: 重组体转化菌株 37 °C 诱导 5 h 的包涵体总蛋白; 2: 重组体转化菌株 37 °C 诱导 5 h 的上清总蛋白.

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression product of the recombinant

M: Standard protein marker; Lane 1: Inclusion bodies of the lysates of E.coli BL21 transformed with pET21 /LRRN3 with IPTG-induced at 37 °C for 5 h; Lane 2: Supernatant of the lysates of E.coli BL21 transformed with pET21 /LRRN3 with IPTG-induced at 37 °C for 5 h.

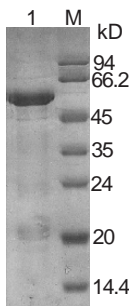


图4 重组蛋白纯化后 SDS-PAGE 凝胶电泳分析  
M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化的融合蛋白.

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the purified protein  
M: Standard protein marker; Lane 1: Purified protein.

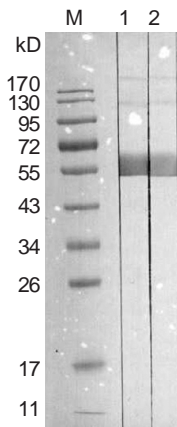


图5 Western blotting 检测融合蛋白的表达  
M: 蛋白质分子质量标准; 1和 2: His 融合蛋白.

Fig.5 Expression analysis of the fusion protein by Western blotting

M: Standard protein marker; Lane 1 and Lane 2: His-fusion protein

### 3 讨论

NLRR 蛋白超家族是一类重要的膜蛋白, 可通过多种作用介导细胞黏附, 与细胞运动及信号传导密切相关. NLRR 蛋白在神经系统发生和发育中有着重要作用. NLRR1、NLRR2 均与神经系统的发育关系密切. 最近文献报道, 家族成员中 XINLRR-6 也可能是参与后期晶状体、视网膜和角膜发育的关键调控分子<sup>[8]</sup>. 原位杂交显示 LRRN3 主要在不同发育阶段的胚胎神经系统中表达. 第 10.5 d 小鼠胚胎中可见 LRRN3 在三叉神经节中高表达; 在背根神经节、神经管、后脑和视杯中亦有表达. 这些结果均提示其可能与胶质细胞和运动神经元的发生发育相关<sup>[9]</sup>. Fukamache 等发现 LRRN3 可能与 EGF 受体信号传导的调控有关, 而这种作用可能正是通过其胞浆尾部序列上的网格蛋白连接内吞模体 ( clathrin binding endocytosis motif) 实现<sup>[7]</sup>. 此外, 小鼠大脑皮质损伤后, 发现 LRRN3 mRNA 的表达上调, 这提示 LRRN3 与神经系统的损伤修复可能也有密切关系<sup>[10]</sup>.

LRRN3 蛋白包含 1 个信号肽、12 个 LRR 结构域、1 个 IgC2 样结构、1 个 FN 样结构、1 个跨膜结构以及 C 端的小段胞浆内尾部序列. 这种结构使得 LRRN3 具有一段稳定的较长的胞外结构, 其 N 端的 LRR 重复序列主要与黏附分子的相互作用有关, 为其它分子提供结合位点<sup>[11]</sup>. 靠近 C 端的纤维连接蛋白 3 型结构域 fibronectin type 3 domain, FN- ) 是血浆蛋白纤维连接蛋白 ( FN) 结构内部的 3 种重复结构序列之一, 大约 2% 的动物蛋白分子结构中含有 Fn- 重复序列结构, 是许多跨膜因子受体、黏附分子的组成成分. 其胞内的短肽具有网格蛋白连接内吞模体样结构, 能与网格蛋白形成构架, 把其它分子吸引到膜上被自身覆盖的凹陷中来, 通过细胞膜再收缩形成囊泡并通过形成细胞内独立小泡介导内吞作用的发生<sup>[12]</sup>. 网格蛋白连接内吞模体样结构可能与多种神经生长因子的转运有关. 针对 LRRN3 的细胞内定位实验也表明该蛋白能定位于内质网, 并可转运至胞膜, 具有介导蛋白-蛋白作用膜蛋白的共同特性.

随着人类基因组计划的完成, 新基因和蛋白的结构与功能研究已成为当前研究热点. 蛋白质结构域作为功能单位, 广泛存在于各种复杂的蛋白质中, 将蛋白质按其结构单元划分为相对独立

的模块, 就这些模块单独展开研究成为研究结构功能复杂蛋白质的新思路。

LRRN3 分子的 C 端在昆虫和哺乳动物中同源性很低, 与其他已知蛋白没有同源性。为了进一步研究 LRRN3 基因编码蛋白的结构与功能, 本文从 C 端结构域入手, 通过简便、高效及生产成本低的原核表达系统获得 LRRN3 基因编码的 C 端结构域重组蛋白。考虑到目的蛋白是未知的基因所编码的蛋白, 我们选择麦芽糖结合蛋白 (Mal) 和组氨酸 (His) 标记的表达载体, 为后来的鉴定与分离纯化提供方便。

由于融合蛋白在大肠杆菌表达时大部分以包涵体形式存在, 这给融合蛋白的纯化带来了不便。通常采用的尿素等变性剂变性、复性纯化蛋白的方式, 需要在适当条件下才能使重组蛋白正确折叠恢复活性, 复性效率与蛋白质终浓度高低及复性速度有关, 给样本的后处理也带来了极大不便。本试验采用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖凝胶作为吸附介质, 吸附柱中偶联的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖凝胶能与载体上的 His 发生特异性作用而紧密结合<sup>[13]</sup>。同时实验所采用的表达质粒 pET21-MAI 带有较强的 T<sub>7</sub> 启动子, 外源基因插入后, 在 IPTG 的诱导下与麦芽糖结合蛋白基因一起以融合蛋白的形式进行表达。而融合蛋白中的麦芽糖结合蛋白的存在, 能与多糖树脂结合, 很容易被含麦芽糖的缓冲液洗脱下来。这使得我们能在变性的条件下, 不需要通过复杂的变性和复性过程, 就能得到较高浓度的高纯度融合蛋白。本研究通过重组、分离、纯化 LRRN3 分子 C 端结构域蛋白, 为进一步研究 LRRN3 基因编码蛋白的结构与功能奠定了基础。

#### 参考文献 (References):

[1] TAGUCHI A, WANAKA A, MORI T, et al. Molecular

- cloning of novel leucine-rich repeat proteins and their expression in the developing mouse nervous system[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 35(1-2):31-40.
- [2] AKIRA S, TAKEDA K. Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice[J]. *C R Biol*, 2004, 327(6):581-589.
- [3] MILÁN M, PÉREZ L, COHEN S M. Boundary formation in the *Drosophila* wing: functional dissection of Capricious and Tartan[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(3):804-810.
- [4] BRYAN P H, LEE M W, DENNIS S, et al. Regulated expression of FLRT genes implies a functional role in the regulation of FGF signalling during mouse development[J]. *Dev Biol*, 2006, 297(1):14-25.
- [5] GRUMBLES R M, ALMEIDA V W, THOMAS C K. Embryonic neurons transplanted into the tibial nerve reinnervate muscle and reduce atrophy but NCAM expression persists[J]. *Neuro Res*, 2008, 30(2):183-189.
- [6] FUKAMACHI K, MATSUOKA Y, KITANAKA C, et al. Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(1):257-263.
- [7] FUKAMACHI K, MATSUOKA Y, OHNO H, et al. Neuronal leucine-rich repeat protein-3 amplifies MAPK activation by epidermal growth factor through a carboxyl-terminal region containing endocytosis motifs[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46):43549-43552.
- [8] WOLFE A D, HENRY J J. Neuronal leucine-rich repeat 6 (XINLRR-6) is required for late lens and retina development in *Xenopus laevis*[J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(4):1027-1041.
- [9] HAINES B P, GUPTA R, JONES C M, et al. The NLRR gene family and mouse development: Modified differential display PCR identifies NLRR-1 as a gene expressed in early somitic myoblasts[J]. *Dev Biol*, 2005, 28(2):145-159.
- [10] ISHII N, WANAKA A, TOHYAMA M. Increased expression of NLRR-3 mRNA after cortical brain injury in mouse[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 40(1):148-152.
- [11] ENKHBAYAR P, KAMIYA M, OSAKI M, et al. Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins[J]. *Proteins*, 2004, 54(3):394-403.
- [12] LUNDBERG M, WIKSTROM S, JOHANSSON M. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains[J]. *Mol Ther*, 2003, 8(1):143-150.
- [13] BEELER J A, TANG W J. Expression and purification of soluble adenylyl cyclase from *Escherichia coli*[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 237:39-53.