

卢春霞, 刘长彬, 石国庆, 等. 基于密码子优化策略的牛妊娠相关糖蛋白 9 (bPAG9) 的原核表达及纯化[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 122-129.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.017

基于密码子优化策略的牛妊娠相关糖蛋白 9 (bPAG9) 的原核表达及纯化

卢春霞¹, 刘长彬^{2,3}, 石国庆³, 杨 华³

(1. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100; 2. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003; 3. 新疆农垦科学院省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 新疆 石河子 83200)

摘要: 为了构建 pET30a-bPAG9 重组表达载体, 并在 BL21(DE3) 感受态细胞中转染高效表达牛妊娠相关糖蛋白 9 (bPAG9), 通过生物信息学技术对 bPAG9 基因进行密码子优化, 人工合成 bPAG9 全基因序列, 经双酶切法将 bPAG9 基因插入到表达载体 pET30a 中。将构建的重组质粒 pET30a-bPAG9 转染至 BL21(DE3) 感受态细胞中进行原核表达, 经过超声波裂解和亲和层析方法获得重组蛋白 bPAG9。用 SDS-PAGE 和 Western Blot 方法检测重组蛋白 bPAG9 的表达效果。结果显示, PCR 扩增得到 1 128 bp 的优化 bPAG9 基因片段, 构建的重组质粒 pET30a-bPAG9 经双酶切获得约 5 244 bp 和 1 125 bp 的 2 条片段, 与预期值相符; 对重组载体测序, 测序结果与优化后的基因碱基序列完全一致, 编码的氨基酸序列未发生突变; SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定结果显示, 获得相对分子质量约为 4.0×10^4 的 bPAG9 重组蛋白, 通过亲和层析纯化后, 重组蛋白 bPAG9 纯度到达 90% 以上。

关键词: 牛妊娠相关糖蛋白; 密码子; 重组蛋白; 原核表达

中图分类号: S823.9⁺13⁺.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)01-0122-08

Prokaryotic expression and purification of recombinant bovine pregnancy associated glycoprotein-9 (bPAG9) based on codon optimization

LU Chun-xia¹, LIU Chang-bin^{2,3}, SHI Guo-qing³, YANG Hua³

(1. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 3. Key Laboratories of Sheep Breeding and Reproduce, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: To construct the recombinant expression vector pET30a-bPAG9 and express bovine pregnancy associated glycoprotein-9 (bPAG9) in BL21(DE3) cells, the codons of original bPAG9 gene were redesigned and optimized by bioinformatics techniques. Furthermore, the codon-optimized gene bPAG9 was synthesized by PCR and connected with pET30a vector by double digestion. The pET30a-bPAG9 expression vector was constructed and transfected into BL21(DE3) cells. The recombinant protein bPAG9 was obtained by ultrasonic lysis and affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blotting were performed to detect the expression of the recombinant protein bPAG9. The results showed that the optimized bPAG9 gene fragment of 1 128 bp was obtained by PCR. After amplification and enzymatic digestion, two fragments of

5 244 bp and 1 125 bp were obtained from pET30a-bPAG9 expression vector. These results were consistent with expectations. The sequencing results of recombinant vector showed that the base sequence of bPAG9 gene in expression vector was consistent with the optimized gene, and the amino acid was not mutated. The results Western blotting

收稿日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860647)

作者简介: 卢春霞 (1978-), 女, 河南虞城人, 博士, 副研究员, 主要从事农产品质量安全研究。 (E-mail) shzlcx2002@163.com

通讯作者: 刘长彬, (E-mail) xlchangbin@163.com

and SDS-PAGE indicated that the recombinant protein bPAG9 with the relative molecular weight of about 4.0×10^4 was successfully expressed in BL21(DE3) cells. The purity of recombinant protein bPAG9 was over 90% after purification by affinity chromatography.

Key words: bovine pregnancy associated glycoprotein; codon; recombinant protein; prokaryotic expression

妊娠相关糖蛋白(Pregnancy-associated glycoproteins, PAG)是偶蹄类动物胎儿胎盘滋养层细胞合成、分泌的一类糖蛋白。1991年Zoli等^[1]从奶牛胎盘中分离得到相对分子质量为 6.7×10^4 的糖蛋白,与Butler等^[2]发现的妊娠特异性蛋白B(PSPB)有着高度的相似性,构成了一个庞大的胎盘糖蛋白家族,统称PAG。PAG属于天冬氨酸蛋白酶家族,与胃蛋白酶、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E有50%以上的相同氨基酸序列,但大多数PAG由于催化位点氨基酸发生置换使得其没有酶活性。牛妊娠相关糖蛋白(bPAG)基因家族至少有22个转录本以及变体,由胎盘滋养外胚层细胞和滋养外胚层的双核细胞表达产生,有些在胚胎附植后进入母体血液^[3-5],且整个孕期持续存在,常作为一种标志物用于家畜早期妊娠诊断^[6-8]。

目前,基于免疫分析的商品化PAG检测试剂盒在国外已大规模推广应用,并取得较高的诊断准确率^[9-10]。但国内关于PAG相关研究报道较少,无商品化的PAG蛋白和抗体销售,而进口试剂盒检测成本过高,限制了其在国内牧场的推广应用。因此,如何获取高纯度PAG蛋白,研发相应的快速检测方法及产品,是规模化养殖业急需解决的问题。

目前,已有研究者从多种哺乳动物胎盘子叶中分离出PAG天然蛋白^[1, 11-12],但是纯化步骤繁琐复杂,需要多种纯化方法同时使用才能获得高纯度的PAG。也有人利用豌豆凝集素^[13-14]及胃蛋白酶抑制剂^[15-16]等特异性结合PAG,通过亲和层析法分离获得PAG,但该方法成本较高,不利于PAG蛋白的大量纯化。而体外重组蛋白技术为PAG结构、功能和应用研究提供了新思路,目前有人在真核系统中表达了bPAG1^[17],但PAG1在体内的半衰期较长,在母畜产后80~100 d内仍能检测到,在此时间段内检测易出现假阳性结果^[6, 18]。有研究结果表明,bPAG9早在牛妊娠后25 d就已经表达^[3],且在前3个月内转录水平显著高于bPAG1^[19]。因此,bPAG9可作为理想的标志物用于家畜早期妊娠诊断。但迄今为止,尚未见到关于bPAG9重组蛋白的研究报

道。

本研究根据bPAG9基因信息及宿主细胞对密码子的偏好性,在不改变氨基酸序列的前提下对bPAG9基因密码子进行优化,通过PCR方法扩增bPAG9全基因序列,然后构建proEM-bPAG9重组质粒,在BL21(DE3)大肠杆菌中诱导表达bPAG9重组蛋白,为奶牛早期妊娠诊断产品的研发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BL21(DE3)感受态细胞、pET30a载体、ECL化学发光试剂盒购自德泰生物科技(南京)有限公司,Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司,SDS-PAGE变性聚丙烯酰胺凝胶制备试剂盒、Ni-IDA蛋白纯化试剂盒、小鼠抗6×His单克隆抗体、蛋白质Mark、DNA mark、Nde I内切酶、Hind III内切酶、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟、谷胱甘肽、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、咪唑(Imidazole)、尿素(Urea)等购自生工生物工程(上海)股份有限公司。质粒抽提试剂盒、DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司,BCA蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵、硫酸卡那霉素等购自Sigma公司。

1.2 仪器与设备

Veriti™ 96梯度PCR仪,美国ABI公司产品;Gel Doc XR+凝胶成像系统,美国BIO-RAD公司产品;Essential V4凝胶成像系统,英国UVITEC公司产品;Powerpac 300电泳仪,美国BIO-RAD公司产品;DYCZ-24EN双垂直电泳槽,北京六一仪器厂产品;DYCP-31BN琼脂糖水平电泳,北京六一仪器厂产品;Thermo311 CO₂培养箱,美国热电公司产品;Thermo Scientific™ Varioskan Flash全波长扫描式多功能读数仪,美国赛默飞公司产品;AKTA Explorer 100蛋白纯化层析系统,美国GE公司产品;Micro-

Pulser 电转仪,美国 Bio-Rad 公司产品;BSC -150 型恒温恒湿培养箱,上海博讯事业有限公司产品;优普超纯水制造系统,成都超纯科技有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 *bPAGP* 基因优化与合成 根据 GenBank 公布的 *bPAG9* (登录号:AF020511.1) 基因序列,利用密码子优化软件 MaxCodon™ [德泰生物科技(南京)有限公司] 对 *bPAG9* 基因进行优化,在保证氨基酸序列不变的情况下,利用宿主细胞对密码子的偏好性,将低频密码子替换为使用频率高的密码子,提高密码子适用指数(CAI),同时降低序列中碱基重复结构,调整序列的 G+C 含量在理想区间(30%~70%)。并在优化基因 5' 端和 3' 端设计 *Nde* I、*Hind* III 酶切位点和 His 标签序列。根据优化的 *bPAG9* 基因,应用 Primer premier 软件设计 18 条引物。引物 1:5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCGTGAAAATCCCCGCTGCGCCAAGTCAA-AACCATGCGTAAACCCCTGTCCGGCAAAA -3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点);引物 18:5'-CTCAGTGCTGCTGTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCATT-AATGATGATGATGATGATGAACCGCGCGTGCCAG-ACCAATA-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点)(其余引物未列出)。然后通过全基因合成法扩增得到目的产物。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段。*bPAG9* 基因优化及合成由德泰生物科技(南京)有限公司完成。

1.3.2 pET30a-*bPAG9* 重组载体的构建 将 pET30a 载体用 *Nde* I 和 *Hind* III 进行双酶切,pET30a 载体酶切体系:pET30a 载体 5.0 μ l、10 \times FD Buffer 5.0 μ l、*Nde* I 2.5 μ l (10 U/ μ l)、*Hind* III 2.5 μ l (10 U/ μ l)、ddH₂O 加至 50.0 μ l,37 $^{\circ}$ C 酶切 1 h。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,用胶回收试剂盒回收,将回收的酶切产物和目的 DNA 片段用连接酶在 50 $^{\circ}$ C 连接 25 min,连接体系:PAG9 DNA 4.0 μ l、线性 pET30a 载体 3.5 μ l、T4 DNA 连接酶 2.5 μ l (5 U/ μ l)。

1.3.3 pET30a-*bPAG9* 重组载体的转化、筛选与鉴定 将连接产物使用 42 $^{\circ}$ C 热激法转化到 BL21(DE3) 感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C 培养 1 h,取 20 μ l 菌液涂到含有硫酸卡那霉素的 LB 固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单个菌落接种到新的 LB 培养基中,

37 $^{\circ}$ C、200 r/min 震荡培养 4 h,取 2 μ l 菌液为模板进行 PCR 鉴定。上游引物:5'-TAATACGACTCAC-TATAGGG-3';下游引物:5'-TGCTAGTTATTGCT-CAGCGG-3'。反应体系:菌液 1.0 μ l,上游引物 0.5 μ l,下游引物 0.5 μ l,聚合酶 0.5 μ l,dNTP 0.5 μ l (10 mmol/L),ddH₂O 加至 50.0 μ l;反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 25 s,62 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

将初步判断为阳性的转化子接种到新鲜的 LB 培养基中,培养 12 h 后,收集菌液。采用质粒抽提试剂盒提取质粒,并对质粒进行双酶切鉴定,酶切体系和条件:重组质粒 5.0 μ l、10 \times FD Buffer 5.0 μ l、*Nde* I 2.5 μ l (10 U/ μ l)、*Hind* III 2.5 μ l (10 U/ μ l),ddH₂O 加至 50.0 μ l,37 $^{\circ}$ C 酶切 1 h,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 鉴定与双酶切鉴定得到的阳性克隆送德泰生物科技(南京)有限公司测序。经测序验证插入序列正确无误后,进行质粒大量抽提,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.4 表达菌株的制备 将重组质粒采用 42 $^{\circ}$ C 热激法转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 表达菌株中,加入 200 μ l LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C、195 r/min 培养 1 h,取 80 μ l 菌悬液涂布于含有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 平板中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑取单菌落接种到含有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h,取 0.9 ml 的菌液与 0.1 ml 80% 无菌甘油混合,-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.5 重组蛋白的诱导表达 取表达菌株菌液 20 μ l 接种到含有 50 μ g/ml 的硫酸卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜。次日接种到含 50 μ g/ml 的硫酸卡那霉素的 LB 培养基中扩大培养,当 OD_{600} 为 0.5~0.8 时,取少量样品作为未诱导对照,其余菌液加入终浓度 0.25 mmol/L IPTG,分别在 15 $^{\circ}$ C 或 37 $^{\circ}$ C 条件下诱导培养 4 h。收集 600 μ l 培养液,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 50 μ l PBS 重悬沉淀,加热变性,SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.6 重组蛋白的纯化 收集扩大培养获得的菌体,加入细胞裂解液 Buffer A [50 mmol/L Tris (pH8.0)、300 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、1 mmol/L DTT、1% TritonX-100、1 μ g/ml Leupeptin], 超声波裂解破碎菌体,4 $^{\circ}$ C、12 500 r/min 离心 15

min,分别收集上清液和沉淀,上清液过 0.45 μm 滤膜。沉淀用 Buffer B[50 mmol/L Tris (pH8.0)、150 mmol/L NaCl、2 mmol/L DTT、1% Triton X-100、2 mmol/L EDTA]重悬,超声波裂解破碎,12 500 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,保留沉淀,加入 Buffer C[50 mmol/L Tris (pH8.0)、150 mmol/L NaCl、8 mol/L 尿素、20 mmol/L 咪唑],超声波破碎,12 500 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,上清液用 0.45 μm 滤膜过滤。采用 Ni-IDA 柱对以上两种上清液分别进行亲和层析,首先用 Buffer A 或 Buffer C 平衡 Ni-IDA 柱,直至吸光度 A_{280} 接近基线,将制备好的上清液分别上柱,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,用 15 倍柱体积的 Buffer A 或 Buffer C 冲洗 Ni-IDA 柱,除去杂蛋白,直至吸光度 A_{280} 接近基线,然后分别采用含 50 mmol/L、100 mmol/L、500 mmol/L 咪唑的 Buffer A 或 Buffer C 洗脱目的蛋白,流速 1.5 ml/min。分别收集上清液、流穿液、洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色检测纯化效果,收集含目的蛋白质的洗脱液。纯化后的目的蛋白质采用 BCA 试剂盒测定浓度。

1.3.7 重组蛋白的 Western blot 鉴定 纯化后的重组蛋白 bPAG9 经 SDS-PAGE 电泳后,取下凝胶,采用半干式电转印法将重组蛋白 bPAG9 转至 PVDF 膜上。PVDF 膜使用之前在甲醇中浸泡 30 s,之后将 PVDF 膜、凝胶、滤纸置于转膜液浸泡,浸泡后将三者按照正确顺序放在转印仪上,转印 45 min。取下 PVDF 膜于 5% 脱脂奶粉中,室温封闭 2 h 后,1 \times PBST 漂洗 3~4 次,每次 5 min。加入 1:2 000 稀释的抗 His 标签小鼠单克隆抗体,室温孵育 1 h,1 \times PBST 漂洗。最后用 ECL 发光底物拍照。

2 结果与分析

2.1 bPAG9 基因优化结果

GenBank 公布(登录号:AF020511.1)的 bPAG9 基因全长为 1 311 bp,蛋白质编码区(Coding sequence, CDS)长度为 1 140 bp。对该基因进行优化后,优化基因 bPAG9 的密码子适用指数(CAI)由 0.73 提高到 0.89,G+C 含量无明显变化,优化前后分别为 48.82%和 49.00%,优化前后两个基因的核苷酸同源率为 63.4%,氨基酸序列完全一致。将优化的基因加入酶切位点、His 标签等序列,切去信号肽编码序列,bPAG9 优化基因序列全长 1 128 bp,蛋白质编码区序列为 1 113 bp(图 1)。

2.2 bPAG9 优化基因 PCR 扩增与鉴定

对 bPAG9 优化基因进行 PCR 扩增,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 2)表明,PCR 成功扩增出带有酶切位点的优化的目的基因 bPAG9,片段大小约 1 128 bp,与理论大小基本相符。

2.3 重组质粒 pET30a-bPAG9 的构建及鉴定

将 PCR 扩增的优化的目的基因片段和线性化的 pET30a 载体进行连接,反应液转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,构建牛妊娠相关糖蛋白 9 的重组表达载体 pET30a-bPAG9。将鉴定为阳性克隆的重组质粒进行双酶切,结果(图 3)显示重组质粒电泳后呈现环状、线性和超螺旋 3 种基本形态,酶切后的 pET30a 线性载体和 bPAG9 基因片段大小与理论值(5 244 bp 和 1 125 bp)相符,且酶切条带单一,表明重组载体构建成功。将测序结果与优化后的 bPAG9 基因对比分析,碱基序列完全一致,符合率为 100%,其编码的氨基酸序列与 GenBank (protein ID: AAC04682.1) 公布的完全一致,表明 bPAG9 优化基因插入片段完全正确,未发生任何碱基突变。

2.4 bPAG9 重组蛋白的诱导表达

测序正确的重组质粒 pET30a-bPAG9 转入到 BL21(DE3)大肠杆菌后,在相同的 IPTG 诱导浓度下,分别进行 15 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 4 h,以未加入 IPTG 作为对照。SDS-PAGE 检测结果(图 4)显示,15 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导条件下,在相对分子质量 4.0×10^4 左右均有明显的蛋白质条带,未诱导的对照则无相应的目的条带。考虑低温诱导表达有利于蛋白质的正确折叠,因此选择诱导表达温度为 15 $^{\circ}\text{C}$ 。以上结果说明,bPAG9 基因在原核表达宿主 BL21(DE3)中成功诱导表达。

2.5 bPAG9 重组蛋白的纯化

诱导表达后的菌株超声波破碎后,对上清液进行 Ni-IDA 柱亲和层析纯化,随后利用 SDS-PAGE 对纯化的蛋白质进行检测。结果(图 5)显示,所有泳道均没有目的蛋白,表明表达菌株裂解后上清液中没有可溶性 bPAG9 重组蛋白。菌体破碎后收集的沉淀经 2 次超声波溶解后,再经过 Ni-IDA 纯化得到高浓度的融合蛋白,SDS-PAGE 分析结果(图 6)显示,菌体沉淀溶解后的上清液在相对分子质量约 4.0×10^4 处出现高浓度的目的条带,表明 bPAG9 重组蛋白分布在沉淀即包涵体中,所有洗脱组分中均含有目的蛋白,其中含 500 mmol/L 咪唑的洗脱溶液

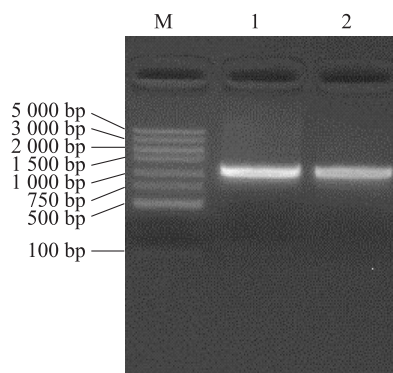
获得纯度较高的 bPAG9 重组蛋白。经 DS-PAGE 分析,纯化后的重组蛋白 bPAG9 纯度大于 90%。BCA 方法测定其浓度为 0.34 mg/ml。

AA	1	M K W I V L L G L V A F S E C I V K I
Origina	1	ATGAAGTGGATTGTGCTCCTCGGCTGGTGGCCTTCTCAGAGTGCATAGTCAAAATC
Optimized	1	GATATGATCGTGAAATC
AA	20	P L R Q V K T M R K T L S G K N M L K N
Origina	58	CCTCTAAGGCAAGTGAAGACCATGAGAAAAACCTCAGTGGAAAAACATGCTGAAGAAT
Optimized	19	CCGCTGCGCCAAGTCAAAACCATGCGTAAACCTGTCCGGCAAAACATGCTGAAAAAC
AA	40	F L K E H P Y R L S Q I S F R G S N L T
Origina	118	TTCTTGAAGGAGCATCCTTACAGACTGTCCAGATTTCCTTTCTGGCTCAAATCTAACT
Optimized	79	TTCTTGAAGGAGCACCCGTATCGTCTGAGCCAGATTAGCTTTTCGGGTAGTAACCTGACC
AA	60	I H P L R N I M N L V Y V G N I T I G T
Origina	178	ATTCAACCCGCTGAGGAACATCATGAATTTGGTCTACGTGGGTAACATCACCATTGGAACA
Optimized	139	ATTCACTCCGCTGCGTAACATCATGAACCTGGTCTACGTCCGCAACATTACCATTGGTACC
AA	80	P P Q E F Q V V F D T G S S D L W V P S
Origina	238	CCCCCTCAGGAATTCAGGTTGTCTTTGACACAGGCTCATCTGACTTGTGGGTGCCCTCC
Optimized	199	CCGCGCAAGAATTTCAGGTTGTTTTGATACCGGCAGCAGCGATCTGTGGGTTCCGTCT
AA	100	F C T M P A C S A P V W F R Q L Q S S T
Origina	298	TTTTGTACCATGCGCATGCTCTGCACCGGTTTGGTTTCAGACAACTTCAGTCTCCACC
Optimized	259	TTTTGTACCATGCGCGCTTGTCTGCACCGGTTTGGTTTCGTCAACTGCAGAGTAGCACC
AA	120	F Q P T N K T F T I T Y G S G S M K G F
Origina	358	TTCCAGCCTACCAATAAGACCTTCACCATCACCTATGGATCTGGGAGCATGAAGGGATT
Optimized	319	TTTCAGCCGACCAACAAACCTTTACCATTACCTACGGCTCTGGTAGCATGAAAGGCTTT
AA	140	L A Y D T V R I G D L V S T D Q P F G L
Origina	418	CTTGCTTATGACACAGTTCGGATTGGGGACCTTGTAAAGTACTGATCAGCCGTTCCGTCTA
Optimized	379	CTGGCGTAGCATACCGTCCGTATTGGCGATCTGGTTTCTACCGATCAGCCGTTTGGTCTG
AA	160	S V V E Y G L E G R N Y D G V L G L N Y
Origina	478	AGCGTGGTGAATATGGGTTGGAGGGCAGAAATTATGATGGTGTCTTGGGCTTGAACATC
Optimized	439	TCTGTTGTAGAATACGGGCTGGAAGGTCGTAATTACGACGGCGTTCTGGGCTTGAACATC
AA	180	P N I S F S G A I P I F D N L K N Q G A
Origina	538	CCCAACATATCCTTCTCTGGAGCCATCCCATCTTTGACAACCTGAAGAATCAAGGTGCC
Optimized	499	CCGAACATCAGCTTTAGCGGCGGATTCCGATTTTCGACAACCTGAAACACGAGGCGCG
AA	200	I S E P V F A F Y L S K N K Q E G S V V
Origina	598	ATTTCTGAGCCTGTTTTTGCCTTCTACTTGAGCAAAACAGCAGGAGGGCAGTGTGGTG
Optimized	559	ATTTCTGAACCGGTTTTTTCGCTTCTACCTGAGCAAAACAAACAGGAAGGCTCCGTAGTT
AA	220	M F G G V D H Q Y Y K G E L N W I P L I
Origina	658	ATGTTTGGTGGGTGGACCACTACTACAAGGAGAGCTCAACTGGATACCACTGATT
Optimized	619	ATGTTTGGCGGCTTGTATCACCAGTACTACAAGGCGAGCTGAAGTGGATTCCGCTGATT
AA	240	E A G E W R V H M D R I S M K R T V I A
Origina	718	GAAGCAGGCGAATGGAGAGTACACATGGACCGCATCTCCATGAAAAGAACGGTTATTGCT
Optimized	679	GAAGCTGGCGAGTGGCGGTTACATGGATCGCATCAGCATGAAACGCACCGTTATTGCC
AA	260	C S D G C E A L V H T G T S H I E G P G
Origina	778	TGTTCTGATGGCTGTGAGGCCCTTGTGCACACTGGGACATCACATATCGAAGGCCAGGA
Optimized	739	TGTTCTGATGGCTGTGAGGCCCTTGTGCACACTGGGACATCACATATCGAAGGCCAGGA
AA	280	R L V N N I H R L I R T R P F D S K H Y
Origina	838	AGACTGGTGAATAACATACAGGCTCATCCGACACAGGCCATTGATTCCAAGCACTAC
Optimized	799	CGTCTGGTTAAACAACATTATCGCCTGATCCGTACCCGTCGGTTTGATAGCAAACTAC
AA	300	V S C F A T K Y L P S I T F I I N G I K
Origina	898	GTTTCATGTTTTGCCACCAATACTGCCCTCTATTACTTTTCATCATCAACGGCATCAAG
Optimized	859	GTCACTGCTTTTGCAACCAATACTGCCGAGCATCACCTTCATCATCAACGGTATCAAA
AA	320	Y P M T A R A Y I F K D S R G R C Y S A
Origina	958	TACCAATGACAGCTCGAGCCTACATCTTTAAGGATTCTAGAGGCGCTGCTATTCCGCT
Optimized	919	TATCCGATGACCGCACGCGGTATATCTTCAAAGATAGCCGCGGTGCTGTACAGCGCG
AA	340	F K E N T V R T S R E T W I L G D A F L
Origina	1018	TTTAAAGAGAACACAGTGAGAACATCTAGAGAGACCTGGATCCTCGGTGATGCCCTCCTG
Optimized	979	TTCAAAGAAAACACCGTCCGTACAGTTCGGAACCTGGATTCTGGGGACGCGTTCTG
AA	320	R R Y F S V F D R G N D R I G L A R A V
Origina	1078	AGGCGGTATTTCTCAGTCTTTGATCGAGGAAATGACAGGATTGGCTGGCACGGGCAGTG
Optimized	1039	CGTCGTTATTTTAGCGTGTTCGATCGCGTAACGATCGTATTGGTCTGGCACGCGCGTT
Origina	1138	TAA
Optimized	1099	CATCATCATCATCATCATTAATGAAGGCTT

Original 为原始 bPAG9 基因序列,Optimized 为优化后的 bPAG9 基因序列,下划线为优化后基因与原始基因的差异碱基位点,粗体为起始和终止密码子,方框为 Nde I 和 Hind III 酶切位点,斜体为 His 标签序列,省略号为删除的信号肽位点。

图 1 bPAG9 基因优化前后核苷酸序列对比

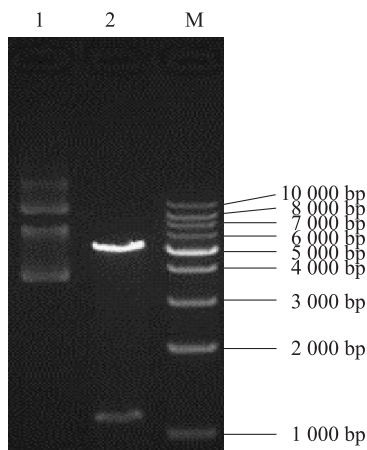
Fig.1 Alignment of nucleotide sequence between the original bPAG9 gene and optimized bPAG9 gene



M: DNA marker; 1, 2: *bPAG9* 优化基因。

图2 *bPAG9* 优化基因 PCR 产物电泳图

Fig.2 Electropherogram of PCR products from optimized *bPAG9* gene



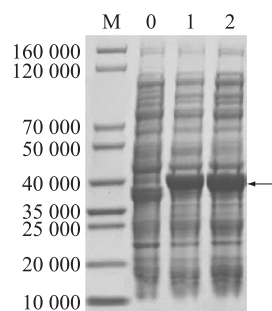
M: DNA marker; 2: 重组质粒; 1: 双酶切片段。

图3 重组质粒 pET30a-*bPAG9* 双酶切鉴定结果

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pET30a-*bPAG9* by double digestion

2.6 重组蛋白 bPAG9 的 Western blot 鉴定

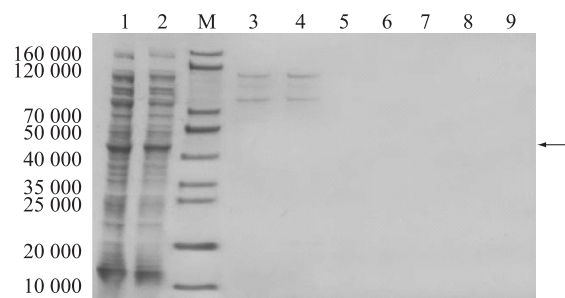
纯化的 bPAG9 重组蛋白 C 端包含一个 His 标签,根据这一特性,利用 His 标签抗体对 bPAG9 重组蛋白进行 Western blot 检测。结果(图 7)显示,在相对分子质量约 4.0×10^4 处有特异杂交条带,与 SDS-PAGE 结果一致。*bPAG9* 原始基因 CDS 长度为 1 140 bp,包含 9 个外显子和 8 个内含子,编码 379 个氨基酸残基(Amino acid, AA),信号肽区域位于第 1~15 位氨基酸残基,蛋白质理论相对分子质量为 4.286×10^4 ,等电点 8.82。优化的基因在去除信号肽和增加 His 标签序列后,CDS 长度为 1 113 bp,编码 371 个氨基酸,理论相对分子质量为 4.212×10^4 。本



M: 蛋白质分子量标准;0:对照;1:15 °C; 2: 37 °C。

图4 不同诱导温度对重组蛋白 bPAG9 表达的影响

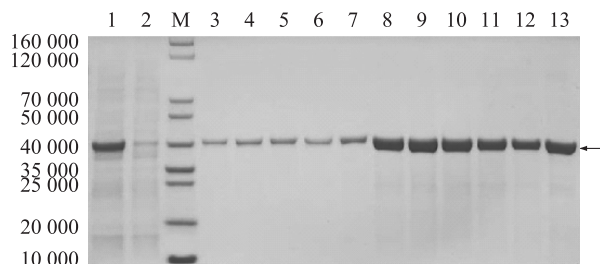
Fig.4 Effects of different induction temperature on the expression of recombinant protein bPAG9



M: 蛋白 Marker; 1: 全菌破菌后上清液; 2: 流出液; 3~4: 50 mmol/L 咪唑洗脱组分; 5~6: 100 mmol/L 咪唑洗脱组分; 7~9: 500 mmol/L 咪唑洗脱组分。

图5 SDS-PAGE 分析细菌裂解液上清液中重组蛋白 bPAG9

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein bPAG9 in the supernatant of the bacterial lysate



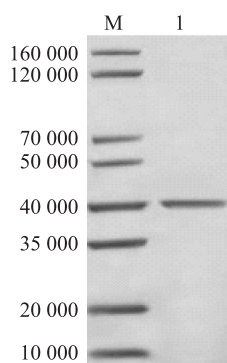
M: 蛋白 Marker; 1: 包涵体溶解离心后上清液; 2: 流出液; 3~4: 50 mmol/L 咪唑洗脱组分; 5~7: 100 mmol/L 咪唑洗脱组分; 8~13: 500 mmol/L 咪唑洗脱组分。

图6 SDS-PAGE 分析包涵体中重组蛋白 bPAG9

Fig.6 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein bPAG9 in the inclusion body

研究原核表达的重组蛋白质相对分子质量约 $4.0 \times$

10^4 ,与预期蛋白质大小基本一致,说明该重组蛋白质在原核表达系统中成功诱导表达。



M:蛋白质分子质量标准;1:纯化后的 rbPAG9(0.5 μ g)。

图7 重组蛋白 bPAG9 的 Western blot 鉴定

Fig.7 Western blotting analysis of the recombinant protein bPAG9

3 讨论

牛妊娠相关糖蛋白(bPAG)种类繁多,人们利用 RT-PCR 技术从牛胎盘组织中筛选出了至少 22 种 PAG 的 cDNA 转录本,根据其出现的时间将其分为古代组与现代组,古代组 PAG 出现在 8.000×10^7 年前,经过进化在约 5.000×10^7 年前出现现代组 PAG^[4]。大多数 bPAG 如 bPAG1、bPAG3、bPAG4、bPAG5、bPAG6、bPAG7、bPAG9、bPAG14、bPAG15、bPAG16、bPAG17、bPAG18、bPAG19、bPAG20、bPAG21、bPAG22 属于现代组,由胎盘滋养外胚层的双核细胞表达产生,由于催化中心碱基发生了突变而不具有酶活性;而 bPAG2、bPAG8、bPAG10、bPAG11、bPAG12、bPAG13 属于古代组,在整个滋养外胚层细胞中产生,保留了典型天冬氨酸胺酶的所有特征,具有酶活性^[3,5,20]。由于 bPAG 家庭成员间的序列差异,bPAG 基因在整个妊娠期的表达呈现时空特异性^[3,5,19-21],如 Green 等运用核糖核酸酶保护实验检测胎盘中 RNA 的表达,发现 bPAG2、bPAG4、bPAG5、bPAG8、bPAG9、bPAG10、bPAG11 早在妊娠后 25 d 就已经表达,而 bPAG1、bPAG6、bPAG7 在妊娠后 45 d 开始表达,主要存在于妊娠中后期^[3]。而且,bPAG9 在妊娠后 3 个月内表达水平显著高于 bPAG1^[19]。因此,bPAG9 可作为一个更理想的标志物用于牛早期妊娠诊断。

由于 bPAGs 蛋白种类繁多,增加了对其结构和功能研究的难度,体外重组蛋白质的出现为探究该类蛋白质的结构和功能提供了新思路。因此,前人对 bPAGs 在真核和原核系统中的表达进行了相关研究。Patel 等^[17]构建真核表达载体 PAG-pRcRSV,分别在 HEK 293 和 CHO 细胞中首次表达了 PAG1 重组蛋白,Western blot 分析结果显示,HEK293 细胞表达效果优于 CHO 细胞。Telugu 等^[22]为验证古代组 bPAG 是否具有酶活性,利用昆虫细胞杆状病毒表达系统成功表达了 bPAG2 和 bPAG12 重组蛋白,并对这 2 种蛋白质的水解活性进行研究,结果显示 2 个重组蛋白质具有良好的蛋白质水解活性。但是真核表达系统操作复杂,且表达量低,成本较高。与真核表达系统相比,原核表达系统以其低成本、高表达等优点受到人们的青睐。国内对于 PAG 的研究极少,薄小辉^[23]将 bPAG4 基因插入到 pET28a 原核表达载体后,转化大肠杆菌 BL21,采用 IPTG 诱导表达 bPAG4 重组蛋白,但蛋白质表达效率没有报道。

本研究为提高 bPAG9 在 BL21(DE3)的表达量,利用 MaxCodon™ 软件在不改变氨基酸序列的前提下,通过消除稀有密码子,利用偏好密码子以及平衡 G+C 含量等策略对 bPAG9 基因进行优化,优化的 bPAG9 基因 G+C 含量为 49%,密码子适用指数(CAI)提高到 0.89。然后通过全基因合成法合成了 bPAG9 优化基因,并将其成功插入到 pET30a 载体中,采用 BL21(DE3)感受态细胞经原核表达获得表达量和纯度均较高的 bPAG9 重组蛋白,为 bPAG9 抗体的制备和牛早期妊娠诊断产品的研发奠定了基础。

参考文献:

- [1] ZOLI A P, BECKERS J F, WOUTERS-BALLMAN P, et al. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein[J]. Biology of Reproduction, 1991, 45(1): 1-10.
- [2] BUTLER J E, HAMILTON W C, SASSER R G, et al. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins[J]. Biology of Reproduction, 1982, 26: 925-933.
- [3] GREEN J A, XIE S, QUAN X, et al. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy[J]. Biology of Reproduction, 2000, 62: 1624-1631.
- [4] HUGHES A L, GREEN J A, GARBAYO J M, et al. Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placental-

- ly expressed genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97: 3319-3323.
- [5] WOODING F B, ROBERTS R M, GREEN J A. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications[J]. Placenta, 2005, 26: 807-827.
- [6] ZOLI A P, GUILBAULT L A, DELAHAUT O W B, et al. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis[J]. Biology of Reproduction, 1992, 46: 83-92.
- [7] FRIEDRICH M, HOLTZ W. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2010, 45: 142-146.
- [8] DUFOUR S, DUROCHER J, DUBUC J, et al. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle[J]. Animal Reproduction Science, 2015, 159: 31-37.
- [9] DUFOUR S, DUROCHER J, DUBUC J, et al. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a milk pregnancy-associated glycoprotein-based ELISA and of transrectal ultrasonographic exam for diagnosis of pregnancy at 28 to 45 days following breeding in dairy cows[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2017, 140: 122-133.
- [10] KAYA M S, KÖSE M, BOZKAYA F. Early pregnancy diagnosis using a commercial ELISA test based on pregnancy-associated glycoproteins in Holstein-Friesian heifers and lactating cows[J]. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 2016, 40: 694-699.
- [11] BELLA A, SOUSA NM, DEHIMI ML, et al. Western analyses of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) in placental extracts of various mammals[J]. Theriogenology, 2007, 68: 1055-1066.
- [12] EI AMIRI B, REMY B, DE SOUSA N M, et al. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation[J]. Reproduction Nutrition Development, 2004, 44: 169-181.
- [13] KLISCH K, DE SOUSA N M, BECKERS J F, et al. Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and-17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy[J]. Molecular Reproduction and Development, 2005, 71(4): 453-460.
- [14] BARBATO O, SOUSA N M, KLISCH K, et al. Isolation of new pregnancy-associated glycoproteins from water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta by Vicia villosa affinity chromatography[J]. Research in Veterinary Science, 2008, 85: 457-466.
- [15] GREEN J A, PARKS T E, AVALLE M P, et al. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers[J]. Theriogenology, 2005, 63(5): 1481-1503.
- [16] EGEN T E, EALY A D, LANDON L A, et al. Autoimmunization of ewes against pregnancy-associated glycoproteins does not interfere with the establishment and maintenance of pregnancy[J]. Animal An International Journal of Animal Bioscience, 2009, 3(6): 850-857.
- [17] PATEL O V, TAKAHASHI T, IMAI K, et al. Generation and purification of recombinant bovine pregnancy associated glycoprotein[J]. The Veterinary Journal, 2004, 168: 328-335.
- [18] MIALON M M, CAMOUS S, RENAND G, et al. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle[J]. Reprod Nutr Dev, 1993, 33: 269-282.
- [19] PAREL O A, YAMADA O, KIZAKI K, et al. Quantitative analysis throughout pregnancy of placental and interplacental expression of pregnancy-associated glycoproteins-1 and -9 in the cow[J]. Mol Reprod Dev, 2004, 67: 257-263.
- [20] TELUGU B P V, WALKER A M, GREEN J A. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family- analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 185-201.
- [21] XIE S, GREEN J, BIXBY J B, et al. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 12809-12816.
- [22] TELUGU B P, PALMIER M O, VAN DOREN S R, et al. An examination of the proteolytic activity for bovine pregnancy-associated glycoproteins 2 and 12[J]. Biol Chem, 2010, 391(2/3): 259-270.
- [23] 薄小辉. 妊娠相关糖蛋白在奶牛早期妊娠诊断上的应用研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2017.

(责任编辑:张震林)