

重组七鳃鳗 PHB2 蛋白的原核表达及纯化

李铁松, 王颖, 高杨, 李庆伟

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁大连 116081)

摘要: 为了研究 PHB2 蛋白的生物学活性及后续抗体的制备, 作者以前期构建的 pMD18-T-*Lm-PHB2* 质粒为模板, PCR 扩增 *Lm-PHB2* 基因全长 CDS 区, PCR 产物经 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后连接至表达载体 pET-32a, 构建重组质粒 pET-32a-*Lm-PHB2*。将鉴定正确的重组质粒转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*)Rosetta Blue, 经 IPTG 诱导表达后, 表达产物通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行检测, 利用镍柱亲和层析纯化得到纯度较高的目的蛋白 rLm-PHB2。结果表明, 经 PCR、双酶切和测序鉴定, 所构建的重组质粒 pET-32a-*Lm-PHB2* 序列正确, 表达产物存在于裂解菌液的上清和沉淀中, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 证实约在 47 ku 处有目的蛋白 rLm-PHB2 的表达条带。本研究构建了重组七鳃鳗 (*Lampetra japonica*)PHB2 蛋白的原核表达载体, 并大量表达和纯化目的蛋白, 为该蛋白后续的抗体制备及生物活性研究奠定了基础。

关键词: 海洋生物学; 七鳃鳗(*Lampetra japonica*); PHB2; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: R915 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)04-0037-06

doi: 10.11759/hyxx20140310001

七鳃鳗(*Lampetra japonica*)属无颌脊椎动物, 是现存脊椎动物中最古老、最原始的物种之一。其化石记录可以追溯到志留纪及泥盆纪, 有现存的“活化石”之称, 被认为是进化和发育生物学的新的模式生物, 是研究有颌脊椎动物起源和进化十分难得的实验材料。

Prohibitin(PHB)是一种高度保守的蛋白, 广泛分布于细菌、植物、酵母、原虫、果蝇及哺乳类等多种生物细胞中^[1]。目前已知人的 PHB 家族包括 PHB1 和 PHB2, 其结构的保守性和功能的多样性决定了其参与细胞的多种生物学进程。研究表明, PHB 在细胞核内起负调节细胞周期的作用^[2-5], 抑制细胞周期转换和 DNA 合成^[2, 6], 从而抑制细胞增殖。同时, PHB 蛋白也可以调控细胞凋亡, 且这种凋亡作用具有双向性, 一方面能够阻止细胞的过度增殖, 另一方面又能抵抗细胞凋亡的产生^[7-11]。PHB 正是通过调节细胞增殖、凋亡与分化和调控激素及其受体活性而发挥着抗肿瘤作用。

近年来, 陆续又有研究发现 PHB2 与由氧化应激因子(活性氧自由基, reactive oxygen species, ROS)作用引起的生物进程如衰老、2 型糖尿病、神经退行性疾病及心肌疾病等的改变密切相关^[12]。PHB2 在呼吸链复合物亚单位的装配中充当分子伴侣, 参与能量代谢, 起到抗衰老的作用^[13]。糖尿病病人体内

ROS 含量和氧化应激水平均显著增高, 引发线粒体结构功能紊乱, 而 PHB 可起到稳定线粒体结构功能的作用。PHB2 也存在在人类淋巴细胞的线粒体内膜上, 不仅仅在保证电子转运酶的稳定和维持线粒体结构完整性方面起作用, 也参与细胞的信号转导通路, 同时也可作为细胞内 T 细胞活化的重要生物标记^[12]。PHB2 作为 PHB 家族的重要成员, 它与 PHB1 相互作用共同构成嵌于线粒体内膜上的“花环”复合体结构, 维持细胞线粒体结构功能的稳定^[13]。

随着人们对 PHB2 在各类生命活动发生、发展过程中所起重要作用的深入认识, 以 PHB2 蛋白功能与疾病发展之间关系的研究也在不断增加, 它的功能研究正逐渐被重视并成为热点。本课题以 pMD18-T-*Lm-PHB2* 的克隆载体为模板进行前期实验, 后期将 *Lm-PHB2* 与含有 His 标签的表达载体 pET-32a 连接, 以有利于目的蛋白在大肠杆菌内以可溶性形式高效表达并进行纯化, 为满足后期该蛋白抗体的制备及其生物学功能的研究奠定实验

收稿日期: 2014-03-10; 修回日期: 2014-09-17

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20102136120002); 大连市科技基金资助项目(2010J21DW018)

作者简介: 李铁松(1976-), 女, 大连人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事海洋生物功能蛋白学研究, E-mail: sally_ts_li@163.com; 李庆伟, 通信作者, 博士生导师, E-mail: liqw@263.net

基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

质粒 pET-32a、表达菌 Rosetta Blue 为本实验室保存,感受态细菌 Rosetta Blue 为课题组自己制备,重组质粒 pMD18-T-*Lm-PHB2* 为本室自己构建。

1.2 试剂和药品

Taq 酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I、T4-DNA Ligase、DNA Marker、质粒小提试剂盒、DNA 纯化试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司;本实验所用引物由上海英潍捷基广州分公司合成;His-Bind Column 组氨酸亲和层析柱、卡那霉素、IPTG、PVDF 膜、Anti-PHB2 抗体购自上海生工生物公司;低分子量蛋白 Marker 购自大连绿竹生物工程有限公司;考马斯亮蓝,琼脂糖,琼脂粉,蛋白胨,酵母膏,氯化钠,Tris, SDS, 甘油, 溴酚蓝, 甲叉双丙烯酰胺, 丙烯酰胺, Tween 20, 甘氨酸, 甲醇, 醋酸, 乙醇等其他生化药品为国产分析纯。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)为本实验室博士惠赠。

1.3 引物的设计及合成

根据 Ensembl 提供的七鳃鳗 PHB2 基因序列和课题组前期克隆得到的该基因序列,按照一般引物设计原则和原核表达载体 pET-32a 克隆要求,采用 primer 6.0 软件设计 PCR 引物。正向引物引入 *Hind* III 酶切位点,反向引物引入 *Eco*R I 酶切位点,其序列如下:

Forward(正向引物): 5'- GGAATTCCATGGCT-CAGCAGCTCAAGGA-3'

Reverse(反向引物): 5'- CCCAAGCTTGGGC-TTCTTTTTCACCGAC-3'

1.4 目的基因的扩增

以质粒 pMD18-T-*Lm-PHB2* 为模板,用上述引物扩增 *Lm-PHB2* 基因编码序列(CDS 区)。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 DNA 纯化试剂盒进行纯化。

1.5 表达载体的构建

将 PCR 扩增产物和 pET-32a 质粒用 *Hind* III 和 *Eco*R I 进行双酶切,酶切回收的 PCR 产物和载体与 DNA 连接酶混合,16℃连接 6 h,将连接产物转化至

感受态 Rosetta Blue,筛选单菌落然后提取质粒,进行 PCR 和酶切鉴定,将初步鉴定正确的重组质粒送上海生工生物公司进行测序。

1.6 重组蛋白的诱导表达及纯化

将带有重组质粒的菌落接种在含有 50 mg/L 氨苄霉素(Amp)的 LB 液体培养基中,37℃振荡培养过夜(12~16 h),次日按 1:100 的比例转接至 1 000 mL LB 培养基(含 50 mg/L Amp),37℃培养至 OD₆₀₀ 0.4~0.6,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,37℃诱导表达 5 h,表达产物 rLm-PHB2 经 12%SDS-PAGE 电泳检测,并用 Western blotting 进行鉴定。SDS-PAGE 的分离胶经半干电转化使蛋白从胶上全部转移到 PVDF 膜上,用预染彩色 Marker 作为转移程度的依据,PVDF 膜置于封闭液(含 5%脱脂牛奶的 TBST)中 37℃封闭,分别加入一抗兔抗鼠 PHB2 单克隆抗体(1:1000)和二抗羊抗兔 IgG(H+L)(1:5000)孵育,ECL 显色。

用 His-Bind Column 组氨酸亲和层析柱进行纯化,纯化方法参照说明书进行。纯化的重组蛋白经透析后,再经 SDS-PAGE 电泳分析得到的目的蛋白 rLm-PHB2。

2 实验结果

2.1 *Lm-PHB2* 基因的扩增

以前期构建的质粒为模板扩增 *Lm-PHB2* 基因 CDS 区,PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 PCR 产物大小约为 900 bp,与 *Lm-PHB2* 基因 CDS 区序列大小相符(图 1),表明 PCR 所扩增的片段为目的基因 *Lm-PHB2* 的全长 CDS 区。

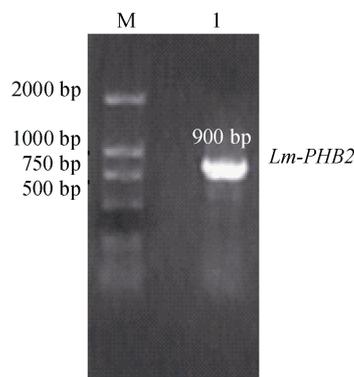


图 1 *Lm-PHB2* 基因 CDS 区 PCR 扩增产物
Fig. 1 PCR products of *Lm-PHB2* gene CDS region
M.DNA Marker DL2000;1.PCR 产物
M.DNA Marker DL2000;1.PCR products

2.2 重组质粒 pET32a-*Lm-PHB2* 的鉴定

2.2.1 阳性菌落的 PCR 鉴定

Lm-PHB2 基因 CDS 区的 PCR 产物双酶切后, 插入 pET-32a 载体中, 转化感受态 Rosetta blue, 得到数十个阳性菌落, 随机挑取 1~3 个单菌落进行培养, 并作 PCR 初步鉴定, 结果扩增出约 900 bp 的目标片段(图 2), 表明 *Lm-PHB2* 基因 CDS 区已插入 pET-32a 载体。

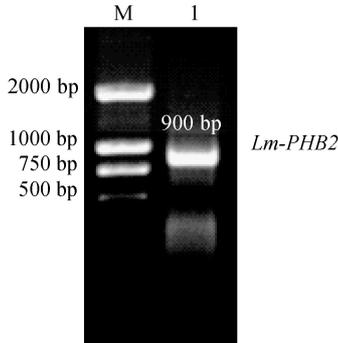


图 2 载体 pET32a-*Lm-PHB2* 的 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of pET32a-*Lm-PHB2* by PCR
M.Marker DL2000;1.pET32a-*Lm-PHB2* 阳性克隆
M.Marker DL2000;1.Positive clone with pET32a-*Lm-PHB2*

2.2.2 重组质粒的双酶切鉴定

挑取经 PCR 鉴定为阳性克隆的菌落, 挑菌培养后提取质粒, 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定(图 3)。电泳结果显示, 与未酶切的质粒相比, 质粒双酶切后出现两个片段, 小片段分子量约为 900 bp, 与 *Lm-PHB2* 基因 CDS 区的分子量相符; 大片段分子量约为 5900 bp, 与线性化的 pET-32a 大小相符, 进一步证明重组质粒构建成功。

2.2.3 重组质粒的测序鉴定

将经 PCR 和酶切鉴定的重组质粒 pET-32a-*Lm-PHB2* 送上海生工生物公司测序, 测序结果与 Ensembl 提供的海七鳃鳗 *PHB2* 基因和课题组前期克隆得到的该基因序列进行比对, 结果表明 *Lm-PHB2* 编码序列正确, 并且没有发生移码突变, 重组质粒构建成功。

2.3 重组蛋白 rLm-PHB2 的表达及纯化

2.3.1 重组蛋白 rLm-PHB2 的 SDS-PAGE 分析

含有重组质粒的阳性菌落经 IPTG 诱导表达后, 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 在约 47 ku 处出现融合蛋白条带(图 4, 如箭头所示), 与预期的分子量基本相符。表达产物存在于裂解菌液上清和沉淀中, 说明重组蛋白 rLm-PHB2 在大肠杆菌中可以以可溶蛋白形式表达。

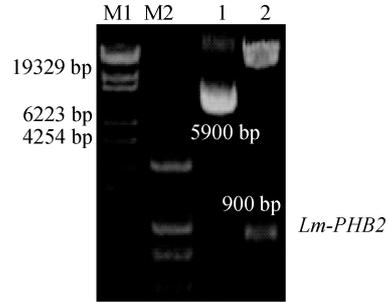


图 3 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pET-32a-*Lm-PHB2* by restriction enzyme digestion

M1.Marker DL2000; M2. λ -*Eco*T14 I digest DNA Marker; 1.pET-32a-*Lm-PHB2*; 2.pET-32a-*Lm-PHB2*/*Hind* III+*Eco*R I

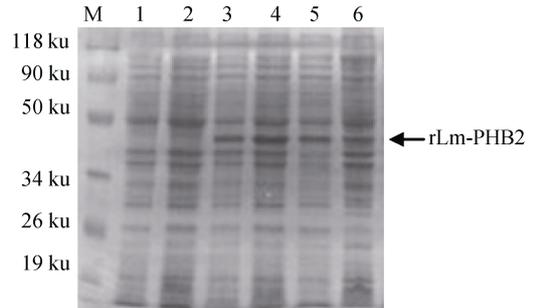


图 4 SDS-PAGE 电泳检测 rLm-PHB2 在 Rosetta Blue 菌中的表达

Fig. 4 Expression of rLm-PHB2 in Rosetta Blue tested by SDS-PAGE

M. Protein Marker; 1.未诱导的菌液上清; 2.未诱导的菌液沉淀; 3, 4.由 IPTG 诱导的 Rosetta blue/pET-32a-*Lm-PHB2* 全菌; 5.由 IPTG 诱导的 Rosetta blue/pET-32a-*Lm-PHB2* 菌液上清; 6.由 IPTG 诱导的 Rosetta blue/pET-32a-*Lm-PHB2* 菌液沉淀

M. Protein Marker; 1. Supernatant of uninduced control; 2. Deposit of uninduced control; 3, 4. Bacteria liquid of Rosetta blue/pET-32a-*Lm-PHB2* induced by IPTG; 5. Supernatant of Rosetta blue/pET-32a-*Lm-PHB2* induced by IPTG; 6. Deposit of Rosetta blue/pET-32a-*Lm-PHB2* induced by IPTG

2.3.2 重组蛋白 rLm-PHB2 的纯化

诱导表达得到的 rLm-PHB2 重组蛋白用 His-Bind Column 组氨酸亲和层析柱进行纯化, 然后用不同浓度的咪唑洗脱层析柱。纯化产物经 SDS-PAGE 分析, 在约 47 ku 处出现融合蛋白条带(图 5), 与预期的分子量基本相符, 表明纯化得到即为重组蛋白 rLm-PHB2。纯化后的蛋白经透析后, 用考马斯亮蓝法测得质量浓度为 210 mg/L。

2.4 重组蛋白 rLm-PHB2 的 Western Blotting 分析

利用兔抗鼠 *PHB2* 单克隆抗体(1: 1000)对表达的重组蛋白进行 Western blotting 鉴定, 结果表明诱导的蛋白提取液中有目的蛋白的存在(图 6), 重组蛋白正确表达。

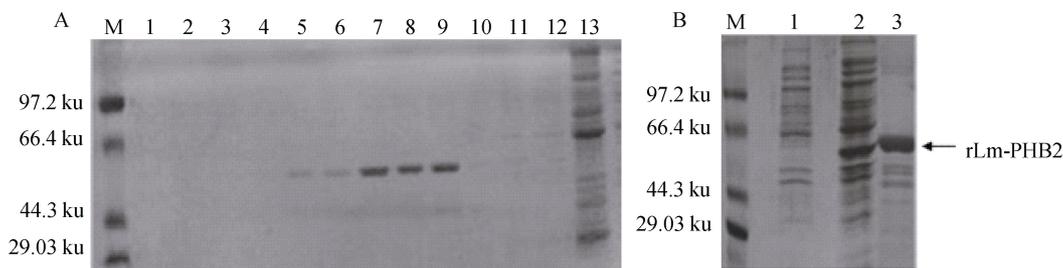


图5 rLm-PHB2 的洗脱及纯化

Fig. 5 Elution and purification of rLm-PHB2 by His system

A. 不同浓度咪唑洗脱 rLm-PHB2 蛋白效果图;M.protein marker;1-4. 分别使用 250, 200, 150, 125 mmol/L 咪唑洗脱; 5, 6. 100 mmol/L 咪唑洗脱;7, 8. 80 mmol/L 咪唑洗脱;9. 60 mmol/L 咪唑洗脱;10-12. 40 mmol/L 咪唑洗脱;13. 20 mmol/L 咪唑洗脱; B. rLm-PHB2 的纯化 M.protein marker;1.未诱导的 rLm-PHB2 蛋白; 2.诱导之后的 rLm-PHB2 蛋白;3.纯化后的 rLm-PHB2 蛋白

A. Elution with different concentrations of imidazole M.protein marker; 1-4. 250, 200, 150 and 125 mmol/L imidazole elution; 5, 6. 100 mmol/L imidazole elution; 7, 8. 80 mmol/L imidazole elution; 9. 60 mmol/L imidazole elution; 10-12. 40 mmol/L imidazole elution; 13. 20 mmol/L imidazole elution; B. purification of rLm-PHB2 M. protein marker; 1.rLm-PHB2 proteins before induced; 2. rLm-PHB2 proteins after induced; 3. Purified rLm-PHB2 protein

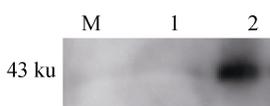


图6 rLm-PHB2 的 Western blotting 鉴定

Fig. 6 Identification of rLm-PHB2 by Western blotting

M.低分子量蛋白 marker;1.未经诱导的 rLm-PHB2 表达; 2.诱导后 rLm-PHB2 的表达

M.low molecular weight protein marker;1.non-induced expression of Rosetta blue/pET-32a-Lm-PHB2;2.induced expression of Rosetta blue/pET-32a-Lm-PHB2

3 讨论与结论

PHB 在多种疾病、尤其是肿瘤和退行性疾病的发生、发展中起关键作用,因此近年来受到越来越多的关注。Jang 等^[14]发现在早期胃癌和肝癌组织中 PHB 表达下调。Gamble 等^[15]也发现在雄激素刺激增殖的前列腺癌组织中 PHB 下调超过 50%。然而在乳腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌等多数肿瘤的研究中证实 PHB 的表达均显著上调^[16],推测其原因可能与 PHB 的磷酸化状态、细胞内浓度、细胞的类型以及肿瘤分期有关。由于在肿瘤发生早期 PHB 表达缺陷,造成了细胞的过度增生而发生癌变。随着肿瘤的发展,由于肿瘤细胞代谢旺盛,线粒体含量丰富,进而主要在线粒体中表达的 PHB 也随之上调,可能起到一定的负反馈作用^[17]。目前认为 PHB 可以作为肿瘤的早期诊断的一个标志分子^[12-13]。对于糖尿病病人,有研究证实检测到其体内 ROS 含量和氧化应激水平均显著增高,引发线粒体结构功能紊乱,而 PHB 可起到稳定线粒体结构功能的作用^[12-13]。同样,在心肌疾病中,氧化应激能造成多种心肌细胞

损伤和凋亡,并且能引起心肌病、心力衰竭和房颤等^[18]。Liu^[18]通过给予幼鼠心肌细胞过氧化氢刺激发现,PHB 的表达量代偿性增加,且 PHB 定位发生一定的转移,从而保护心肌细胞免受氧化应激损伤。并且发现丹参酮 A 可以降低在氧化应激条件下的 PHB 的代偿性增加,这可以起到对心肌细胞的保护作用,并且还会下调引起心肌炎症发生的一些分子^[19-20],而其中 IL6 和 TNF-a 又与 mapk 通路有关,并且均能调节 PHB 的表达^[21]。作者的研究也证实了七鳃鳗 PHB 在心肌细胞中具有抗氧化活性。因而在未来 PHB 可作为抗心肌氧化损伤的药物靶标而得到应用。另外,Sripathi^[22]等发现了在过氧化氢刺激的氧化应激胁迫下视网膜色素上皮细胞中 PHB 定位从线粒体往细胞核迁移,作为抗凋亡因子和转录调节因子发挥功能。这些表明 PHB 在氧化应激胁迫中可以通过定位的变化,在细胞核和线粒体及其他细胞亚结构中担当不同的功能分子发挥不同功能,从而增强细胞的氧化应激耐受性。本研究初期扩增了七鳃鳗 *PHB2* 基因,并纯化出纯度较高的 rLm-PHB2 蛋白,有利于深入探究七鳃鳗的 rLm-PHB2 蛋白在七鳃鳗体内氧化应激状态下发挥的功能。后期还可以构建 *PHB2* 的真核过表达载体,有助于七鳃鳗 rLm-PHB2 蛋白在细胞水平上的功能初探。

鉴于 PHB 在肿瘤发生发展等病理过程及慢性疾病中的重要作用^[13],本课题组对 PHB 家庭成员之一 PHB2 的结构和功能进行了系统研究,为了获得足量可用于体内活性研究的蛋白,作者选择 pET-32a 载体构建 rLm-PHB2 的表达系统,采用 His 标签融合表达,不仅能增加靶蛋白的溶解性和稳定性,还有利

于蛋白的进一步纯化和检测。在本研究中作者利用 pET-32a 载体, 成功表达了可溶性重组蛋白, 并制备了足够的纯度较高的可溶性重组蛋白 rLm-PHB2, 为其后续的相关功能研究提供了必要基础。

参考文献:

- [1] 陈操, 刘欣, 孙晶, 等. 抗增殖蛋白研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(5): 405-410.
- [2] Nuell M J, Stewart D A, Walker L, et al. PHB, an evolutionarily conserved intracellular protein that block DNA synthesis in normal fibroblasts and Hela cells[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(3): 1372-1381.
- [3] Upe E R, Liu X T, Kiehlbauch J L, et al. Prohibitin antiproliferative activity and lack of heterozygosity in immortalized cell lines[J]. Exp Cell Res, 1995, 218(2): 577-580.
- [4] Roskams A J, Friedman V, Wood C M J, et al. Cell cycle activity and expression of prohibitin mRNA[J]. J Cell Physiol, 1993, 157(2): 289-295.
- [5] Wang S, Nath N, Fusaro G, et al. Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals[J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(11): 7447-7460.
- [6] Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, et al. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(2): 459-466.
- [7] Fusaro G, Dasgupta T P, Rastogi S, et al. PHB induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling [J]. J Biol Chem, 2003, 278(48): 47853- 47861.
- [8] 石松林, 李祺福, 刘庆榕, 等. 人参皂苷 Rg1 组合诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞分化过程中 Prohibitin 的表达与定位变化[J]. 中国生物化学与分子生物学报. 2008, 24(2): 180-187.
- [9] Fusaro G, Wang S, Chellappan S. Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camp tothecin-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2002, 21(29): 4539-4548.
- [10] Wang S, Zhang B H, Faller D V. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(12): 3019-3028.
- [11] Choi D, Lee S J, Hong S, et al. Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways [J]. Oncogene, 2008, 27(12): 1716-1725.
- [12] 李铁松, 高杨, 王颖, 等. 抗增殖蛋白与氧化应激[J]. 生物技术通报, 2013, 10: 34-39.
- [13] 祝丽晶, 潘旭东, 王翎. 抗增殖蛋白抗肿瘤及抗衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(21): 3197-3201.
- [14] Jang J S, Cho H Y, Lee Y J, et al. The differential proteome profile of stomach cancer identification of the biomarker candidates[J]. Oncology Res, 2004; 14: 491-499.
- [15] Gamble S C, Odontiadis M, Waxman J, et al. Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells[J]. Oncogene, 2004; 23(17): 2996-3004.
- [16] Wu T F, Wu H, Wang Y W, et al. Prohibitin in the pathogenesis of transitional cell bladder cancer[J]. Andrology Res, 2007; 27(2): 895-900.
- [17] 郭维, 黄文彦, 徐虹. Prohibitin 的研究进展[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2005, 25(3): 254-257.
- [18] Liu X H, Ren Z, Zhan R, et al. Prohibitin protects against oxidative stress-induced cell injury in cultured neonatal cardiomyocyte[J]. Cell Stress and Chaperones, 2009, 14: 311-319.
- [19] Muraguchi T, Kawawa A, Kubota S. Prohibitin protects against hypoxia-induced H9c2 cardiomyocyte cell death[J]. Biomed Res, 2010, 31: 113-122.
- [20] 杨萍, 贾钰华. 丹参酮 II A 抗心肌细胞氧化应激作用及抗增殖蛋白功能研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 6: 145-150.
- [21] Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, et al. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration[J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(8): 837-843.
- [22] Sripathi S R, He W, Atkinson C L, et al. Mitochondrial-Nuclear communication by prohibitin shuttling under oxidative stress[J]. Biochemistry, 2011, 50: 8342-8351.

Prokaryotic expression and purification of recombinant lamprey PHB2 protein

LI Tie-song, WANG Ying, GAO Yang, LI Qing-wei

(Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian 116081, China)

Received: Mar., 10, 2014

Key words: marine biology; lamprey; PHB2; prokaryotic expression; protein purification

Abstract: To study the in vivo biological activities of lamprey PHB2 protein and prepare the antibody of PHB2 protein, herein, we aimed to construct the soluble prokaryotic expression vector of *Lm-PHB2*, and obtain adequate amount of purified rLm-PHB2 protein. The *Lm-PHB2* gene was amplified from the previously constructed pMD18-T-*Lm-PHB2* plasmid template. The PCR products were subjected to *Hind* III and *Eco*R I digestion and then linked to a soluble expression vector pET-32a. The identified recombinant plasmid pET-32a-*Lm-PHB2* was transformed into Rosetta Blue, and IPTG induced expression of rLm-PHB2 was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting assay. The rLm-PHB2 fusion protein was purified using His affinity chromatography purification system to get highly purified protein. The correct construction of recombinant plasmid pET-32a-*Lm-PHB2* was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and gene sequencing identification. Expression products were verified to present in the supernatant of bacteria lysis, indicating the successful soluble expression of rLm-PHB2. The SDS-PAGE and Western blotting results showed that the molecular weight of rLm-PHB2 protein was about 47 ku, corresponding with the anticipated size. The pET-32a-*Lm-PHB2* prokaryotic expression vector was constructed correctly, and the soluble rLm-PHB2 protein was successfully expressed. Ultimately, the rLm-PHB2 protein with high purity was obtained after purification.

(本文编辑: 谭雪静)