

# Lrrc10 蛋白表达载体的构建

李晓霞<sup>1,2</sup>, 陈祥贵<sup>1</sup>

(1. 西华大学生物工程学院, 成都 610039; 2. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

**摘要:**为了构建重组质粒 pET-Lrrc10 和 Lrrc10 蛋白表达, 利用 Nco I 和 BamH I 双酶切载体 pMD18-T-Lrrc10, 回收目的片段与经同样酶切后的表达载体 pET-30a(+), 转入 *E. coli strain* DH5 $\alpha$ , 菌落 PCR 筛选阳性菌落, 提取阳性菌质粒并进行 PCR 和酶切鉴定; 将重组子转入 *E. coli strain* BL21(DE3), 于 37 °C 振荡培养, 用 1 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白的表达。结果表明, 成功构建了融合表达载体并命名为 pET-Lrrc10。转入 *E. coli strain* BL21(DE3) 进行目的蛋白的表达, 获得与预期分子量大小相一致的融合表达蛋白 Lrrc10; Lrrc10 蛋白以包涵体形式存在于宿主菌中, 且 IPTG 诱导 4 小时, 目的蛋白表达量最大。

**关键词:** Lrrc10; 重组质粒; 基因表达; 蛋白表达

**中图分类号:** Q786

**文献标识码:** A

心脏是机体最重要的功能器官之一, 其结构和功能异常所导致的心脏疾病对人类构成巨大威胁。心脏特异性病变可能与心脏特异性表达基因有重要关联。到目前为止, 所发现的心脏特异性基因为数不多, 皆与心脏的功能相关, 如 Nkx2-5 能够上调其它因子的表达并开始心肌发生<sup>[1]</sup>, GATA-4 的异常表达能加速心脏发生形成<sup>[2]</sup>, 是已被报道的心肌特异转录因子<sup>[3]</sup>, 这二者被认为是心脏特异性发育相关基因。Lrrc10 是近年来于小鼠胚胎中新发现的小鼠心脏特异性基因, 而且是具有心脏特异性的 LRR 家族中的一员<sup>[4]</sup>。因此, 研究 Lrrc10 基因的功能, 可能对胚胎心脏发育及心脏疾病的研究至关重要。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

*E. coli strain* DH5 $\alpha$ , *E. coli strain* BL21(DE3)、载体 pET30a(+)(卡那霉素抗性)和 pMD18-T-Lrrc10(卡那霉素抗性)来源于西华大学生物工程实验室。

### 1.2 主要生物化学试剂

DNA 聚合酶 Taq, 限制性内切酶 NcoI, BamHI, 高效 DNA 连接酶 High Ligation Kit 购自天为时代公司; PCR

纯化试剂盒及胶回收试剂盒, 小量质粒提取试剂盒购自赛百盛公司产品。聚丙烯酰胺国产; 诱导剂 IPTG 日本产。试剂的配制见文献[5]。

### 1.3 重组质粒 pET-Lrrc10 的构建

#### 1.3.1 酶切

质粒 pMD18-T-Lrrc10 和质粒 pET30a(+ ) 分别用 BamH I 和 Nco I 进行双酶切。反应条件为: 水浴 37 °C, 20  $\mu$ L(酶各 1  $\mu$ L, 10 X 内切酶反应 Buffer 2  $\mu$ L, DNA 12  $\mu$ L, 无菌水补充至 20  $\mu$ L), 酶切约 6 小时后, 分别进行琼脂糖凝胶电泳并用胶回收试剂盒回收。

#### 1.3.2 连接及转化

取适量的目的片段和目的载体片段按照 3:1 的比例加入到 0.2 mL 的薄壁离心管中, 加入与 DNA 等量(或一半的量)的高效 DNA 连接酶 High Ligation Kit 于管中, 混合均匀, 于 16 °C 连接 30 分钟。将连接反应产物直接转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂于含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 37 °C 温育过夜培养 16~24 小时。

### 1.4 阳性菌落筛选及重组质粒鉴定

分别以菌落为模板进行 PCR 鉴定, 以 pMD18-T-Lrrc10 为模板进行阳性对照, 并进行阴性对照, 设计引物为上游引物: 5'-CTG TCT CGA GAC CAT GGG AAA

CAC CAT CC - 3'下游引物:5' - CGC GGA TCC TCA AGA GCT GGA AGG AAG - 3',上下游引物中分别加入了 BamH I 和 Nco I 酶切位点,PCR 扩增约 800bp 的片断,筛选阳性菌落。挑取 LB 平板上的阳性单菌落于 37 °C 摇床振荡过夜培养,次日使用小量质粒提取试剂盒提取构建的重组质粒。将重组质粒和 pMD18 - T - Lrrc10 分别用 BamH I 和 Nco I 在水浴 37 °C 进行双酶切,进行酶切鉴定。

## 1.5 Lrrc10 蛋白表达

### 1.5.1 重组质粒转化 BL21 (DE3)

将 pET30a(+) 空载体和成功构建的质粒 pET - Lrrc10 一起转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,转化方法同上。目的是用 pET30a(+) 作为对照。

### 1.5.2 重组载体 pET - Lrrc10 诱导表达

分别挑取单菌落于含卡那霉素的 LB 培养液中 37 °C 摇床过夜培养。将培养物按 1:50 的比例接种于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中 37 °C 摇床通气培养 2 小时以上,至 OD 值 0.6 ~ 1.0,取 1 mL 未诱导菌液。加入 IPTG 至终浓度分别为 1 mmol/L,继续 37 °C 通气培养 6 小时,每隔 1 小时取 1 mL 诱导菌液。7 份菌液 13 000 rpm 离心 30 秒,倒掉上层培养液,加入 100 μL 1 × SDS 凝胶上样缓冲液,混匀,沸水浴 5 分钟,13 000 rpm 离心 1 分钟保留上清。各取 20 μL 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。检测最佳诱导时间。

### 1.5.3 融合蛋白表达形式的检测及纯化

取 1.5 mL 诱导 4 小时的诱导菌液,高速离心,弃去上清液收集菌体,加入 100 μL STE (Tris - Cl, EDTA, NaCl) 溶液洗涤,高速离心,弃上清,以 50 μL STE 重悬菌体,加溶菌酶溶液至终浓度 2 g/L,于 4 °C 放置 20 分钟。加入 DNase I 和 MgCl<sub>2</sub> (终浓度分别为 1 × 10<sup>5</sup> U/L 和 8 mmol/L),室温下放置至溶液变稀,以 12 000 rpm 离心 10 分钟。采用 12% SDS - PAGE 对目的蛋白的表达形式进行鉴定<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒 pET - Lrrc10 的构建

质粒 pMD18 - T - Lrrc10,经限制性内切酶 Nco I 和 BamH I 双酶切后,回收目的基因,克隆入经同样酶切的 pET30a(+) 载体,构建重组质粒 pET - Lrrc10,如图 1 所示。

通过直接酶切含有目的基因片断的质粒获取目的基因,再进行载体的构建,避免了因 PCR 扩增带来的基因突变问题。

### 2.2 重组质粒的鉴定

用 PCR 方法(图 2)和酶切方法(图 3)鉴定,结果构

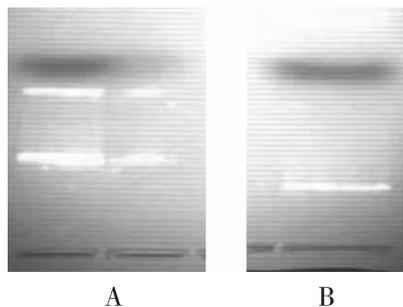


图 1 质粒酶切图

A 是质粒 pMD18 - T - Lrrc10 酶切的琼脂糖电泳图;  
B 是质粒 pET30a(+) 酶切的琼脂糖电泳图。

建的质粒是正确的,即成功构建了质粒 pET - Lrrc10。

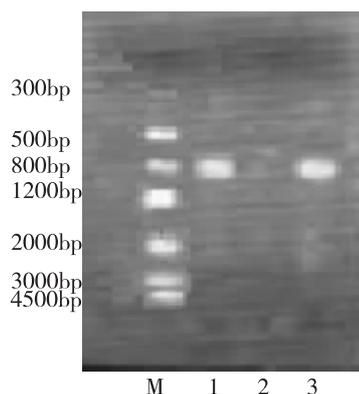


图 2 PCR 鉴定

M: Maker; 1. 以 pET - Lrrc10 为模板的 PCR 产物; 2. 阴性对照;  
3. 阳性对照,以 pMD - 18 - T - Lrrc10 为模板的 PCR 产物。

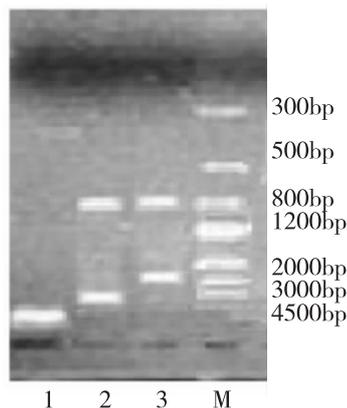


图 3 载体酶切

1. 未酶切 pET - Lrrc10; 2. 酶切 pET - Lrrc10;  
3. 酶切 pMD - 18 - T - Lrrc10; M: Maker;

### 2.3 Lrrc10 蛋白表达检测及纯化

将转化 pET - Lrrc10 和 pET30a(+) 的 BL21 (DE3) 菌于 37 °C 摇床通气过夜培养,次日按 1:50 接种,摇床 2 小时,加入 IPTG 诱导表达,如图 4 所示。

由图 4 可以看出,转化 pET - Lrrc10 的 BL21 (DE3) 菌,与转化 pET30a(+) 的 BL21 (DE3) 菌对照,在 31KD 条带处有明显的诱导条带,与预期的大小一致。且诱导

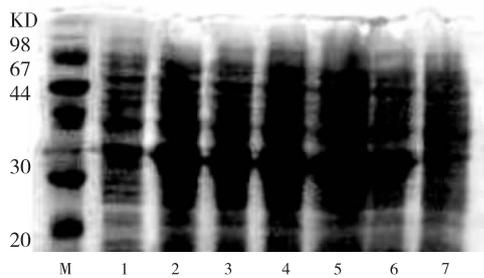


图 4 pET-Lrrc10/BL21(DE3)经 IPTG 诱导表达的 SDS-PAGE 分析

M:Maker;1. pET-Lrrc10/BL21(DE3)未诱导;2-6. pET-Lrrc10/BL21(DE3)分别诱导 2,3,4,5,6 小时;7. 诱导的 pET-30a(+).

表达 4 小时时蛋白表达量最好。

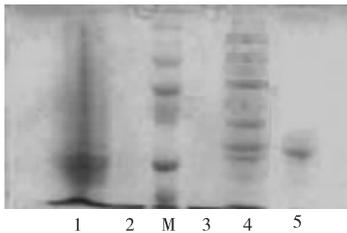


图 5 Lrrc10 纯化后的 SDS-PAGE 电泳

1. 裂解沉淀;2. 裂解上清;3. M; Maker; 由上而下分子量分别是:98kD,64kD,44kD,30kD,20kD;4. 洗涤上清;5. 纯化之后的 Lrrc10 蛋白。

由图 5 中的裂解上清和裂解沉淀可分析出,该蛋白主要以不可溶的形式表达,在大肠杆菌 BL21(DE3)中形成包涵体。

### 3 结束语

成功构建了融合表达载体并命名为 pET-Lrrc10。

转入 *E. coli* strain BL21(DE3)进行目的蛋白的表达,获得与预期分子量大小相一致的融合表达蛋白 Lrrc10; Lrrc10 蛋白以包涵体形式存在于宿主菌中,且 IPTG 诱导 4 小时时,目的蛋白表达量最大。

### 参考文献:

- [1] Ilona S, Skerjanc, Helen Petropoulos, Alan G. Ridgeway. Myocyte Enhancer Factor 2C and Nkx2-5 Up-regulate Each Other's Expression and Initiate Cardiomyogenesis in P19 Cells[J]. *J Biol Chem*, 1998, 27(3):34904-34910.
- [2] Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart[J]. *Sci*. 1993, 90:8145-8149.
- [3] Grepin C, Robitaille L, Antakly T, et al. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol*, 1995 (15): 4095-4102.
- [4] 陈祥贵,李勇,赵如冰,等.心脏特异新基因 Lrrc10 的分子克隆与特性分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003(30):617-622.
- [5] 黄培堂. *分子克隆试验指南*[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [6] 江虹,阎小君,苏成之,等.幽门螺杆菌 vacA 基因毒性相关片段原核表达载体的构建和表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001(17):237-240.

## Construction of Lrrc10 Protein Expression Vector

LI Xiao-xia<sup>1,2</sup>, CHEN Xiang-gui<sup>1</sup>

(1. School of Biotechnology Engineering, Xihua University, Chengdu 610039, China;

2. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract:** To construct pET-Lrrc10 and Express protein of Lrrc10, pMD18-T-Lrrc10 was digested by BamH I and Nco I to get Lrrc10, which was ligated with pET-30a(+) digested by BamH I and Nco I. Then the recombinant was transformed into *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Positive strains were identified by PCR to extract recombinants which were transformed into *E. coli* strain BL21(DE3) to induce Lrrc10 protein with IPTG at 37 $^{\circ}$ C. The results show that the recombinant plasmid was constructed successfully and was named as pET-Lrrc10. After induced by IPTG, the *E. coli* strain BL21(DE3) transformed by pET-Lrrc10 expressed recombinant protein which was consistent with expected molecular weight. Lrrc10 recombinant protein existed as inclusion body and reached its expression peak after induced by IPTG for four hours.

**Key words:** Lrrc10; recombinant plasmid; gene expression; protein expression