

## Annexin A4-EGFP 融合蛋白的表达纯化及其凋亡检测能力初探

刘 婧<sup>1</sup>, 王 杰<sup>1</sup>, 华子春<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省产业技术研究院医药生物技术研究所, 江苏 南京 210023)

**摘要:** 膜联蛋白 (annexin) 是一类进化保守的多基因家族蛋白, 可与细胞膜磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 结合, 由于 PS 与许多重要疾病密切相关, 具有作为药物发现新靶点的潜力, 使得 annexin 具有良好的药物发现价值和新药研发前景。Annexin A4 (以下称 A4) 是膜联蛋白家族成员之一, 参与多项细胞功能, 如胞吐作用和凝血反应, 所有这些功能与膜联蛋白可结合酸性磷脂的能力相关。目前对 A4 的功能尚不完全了解, 获得足量的 A4 是深入了解 A4 的结构与功能的基础。为了克服传统从生物组织中提纯人源 A4 的方法得率不高, 且较为复杂等问题, 本文通过原核系统重组表达 A4, 以获取大量可溶性蛋白, 探究其与 PS 的结合能力, 为后续研究奠定基础。利用分子生物学的手段构建融合表达质粒 pET28a-annexin A4-EGFP, 大量表达、选用并比较了两种获取可溶性 annexin A4-EGFP (以下称 A4-EGFP) 融合蛋白的纯化方法, 同时检测 A4-EGFP 对凋亡细胞的识别能力。通过亲和层析纯化获得纯度为 80% 的 A4-EGFP; 而选用膜吸附纯化方式, 最终获得了纯度达 90% 的蛋白。流式细胞仪检测结果显示: A4-EGFP 融合蛋白可识别和标记早期凋亡细胞, 其与 PS 亲和力为  $79.58 \pm 11.68 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与 A5-EGFP 和 PS 的亲和力同处一个数量级。本文成功实现了 A4-EGFP 在原核体系中的高效可溶性表达, 建立了简易、高效的分离纯化方法, 获得了产率高达  $75.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 A4-EGFP, 为深入研究 A4 的功能及其潜在的应用奠定了基础。

**关键词:** 膜联蛋白 A4; 原核表达; 纯化; 凋亡检测; 序列比对

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0904-07

## Expression, purification of annexin A4-EGFP fusion protein and preliminary study on its apoptosis detection ability

LIU Jing<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>1</sup>, HUA Zi-chun<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 2. Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Jiangsu Industrial Technology Research Institute, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Annexin is a protein of evolutionarily conserved polygene family that binds to cell membrane phosphatidylserine (PS). PS is closely related to many diseases with a potential as a new drug target. Annexin has a good value in drug discovery and new drug development. Annexin A4 is a member of the annexins family. Annexin A4 involves in a number of cellular functions, such as exocytosis and coagulation. These functions are related to binding of annexin to acidic phospholipids. However, the detail function(s) of annexin A4 has not been fully uncovered. Production of annexin A4 in large quantity is prerequisite for indepth investigation of the structure-function relationship of annexin A4. Human annexin A4 was originally purified from the natural resource at a low yield due to the complex procedure. In the present study, annexin A4 was expressed in a prokaryotic system with a high yield of soluble protein. The plasmid pET28a-annexin A4-EGFP

收稿日期: 2017-04-08; 修回日期: 2017-05-03.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助 (81630092, 81421091); 国家重点基础研究计划 (2014CB744501).

\*通讯作者 Tel: 86-25-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0340

was constructed for the expression. Recombinant annexin A4-EGFP was purified using two methods. Affinity chromatography approach gave a protein yield at purity of 80%. While, the membrane absorption method produced the protein with the purity over 90%. Flow cytometric analysis showed that the annexin A4-EGFP fusion protein could recognize and bind to the apoptotic cells with an affinity PS at  $79.58 \pm 11.68 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , which is at the same order of magnitude as A5-EGFP. We successfully achieved the efficient expression of annexin A4-EGFP in prokaryotic system, and provided an easy and convenient method for purifying a large amount of annexin A4-EGFP with a high purity. This study has laid a solid foundation for our study of the function of annexin A4 in the future.

**Key words:** annexin A4; prokaryotic expression; purification; apoptosis detection; sequence alignment

膜联蛋白 (annexins) 是一类钙依赖的磷脂结合蛋白超家族, 在结构上具有高度同源性, 由保守 C-端中心结构域和承担独特功能的 N-端结构域构成, 中心结构域延伸为 C-末端结构, 由 4 组 (annexin A6 为 8 组)、每集约 70 个氨基酸残基组成的重复序列构成。膜联蛋白存在于大多数真核生物物种中, 是能够钙依赖性结合磷脂的胞质蛋白, 以钙依赖的方式结合带负电荷的磷脂几乎是所有膜联蛋白的共同特点<sup>[1-3]</sup>。它们的保守性和丰度表明其在体内具有重要的功能。

在不同的物种中已经发现了超过 100 种膜联蛋白。脊椎动物的 12 个膜联蛋白被归为膜联蛋白 A 家族, 并从 annexin A1 到 annexin A13 分别命名 (简称 A1~A13, A12 未命名)。除脊椎动物外的其他膜联蛋白被分为 B 家族 (无脊椎动物)、C 家族 (真菌和一些单细胞真核生物群)、D 家族 (植物) 和 E 家族 (原生物)。人 annexin 家族包括 12 个成员, 其中 annexin A5 (以下称 A5) 是 annexin 家族中分布最广、功能最特殊的蛋白, 参与很多生理活动, 在细胞凋亡和抗凝血等方面有重要的应用前景。科学家们已经证明标记或修饰后的 A5 可通过不同的成像技术进行凋亡显像而被广泛用于细胞凋亡检测, 如应用于化疗或同种异体移植监测<sup>[4-15]</sup>。A5 与活化血小板的亲亲和活性使之有可能在全身造影术中用于血栓定位, 甚至开发成能溶解可见及不可见血栓的靶向溶栓药。A5 功能异常造成的显著病理变化正引起越来越多的重视, 基于 A5 的一批新药已处于从实验室到临床 II 期的各研发阶段<sup>[16]</sup>。

依据 NCBI 中提供的 annexin 家族成员的蛋白质序列, 利用 Clustal X2 软件对 A5 与 annexin 其他家族成员进行多重序列比对<sup>[17]</sup> (图 1), 发现 annexin A4 (以下称 A4) 与 A5 的同源性最高, 其氨基酸长度和构成与 A5 相似性很高 (图 2)。因此与 A5 相比, A4 很可能同样具有良好的应用开发前景。A4, 也称为脂

皮质素 IV、内毒素 I 或碳水化合物结合蛋白 P33/P41, 同样是膜联蛋白家族的重要成员之一。相较 A5, A4 的功能研究较少。A4 拥有 4 个 annexin 重复序列, 这些重复序列位于 1 个高度对称、平滑对立的凹凸面阵列中, 每个重复序列中都包含了 1 个特异的钙离子结合位点和 5 个  $\alpha$ -螺旋结构。人类 A4 含有 319 个氨基酸残基, 分子质量为 35.9 kDa<sup>[18]</sup>。作为一类钙结合蛋白, A4 理论上应当同样具有结合磷脂酸的能力, 可参与细胞外分泌和凝血等过程。A4 在许多组织中表达, 特别是在肺、肠、胃和肾的分泌上皮细胞质中<sup>[19]</sup>。Ca<sup>2+</sup>浓度升高后, A4 易位至质膜或核膜。A4 在体外结合钙离子后, 可在脂质层上聚集, 这个特性对其功能至关重要。

膜联蛋白的功能直接取决于它们结合磷脂的能力<sup>[20]</sup>。而目前关于 A4 大部分研究集中在检测其在真核细胞内过表达对细胞的影响<sup>[21, 22]</sup>或 Ca<sup>2+</sup>结合位点对蛋白功能的影响<sup>[23, 24]</sup>等, A4 与 PS 的真实结合强度尚不清楚。为了研究 A4 与细胞膜上 PS 的结合及其相关的生物学功能, 本文构建了 annexin A4-EGFP (以下简称 A4-EGFP) 融合蛋白表达载体, 且为了便于其后续纯化, 在融合蛋白的 C-末端加入了 His-tag。本研究选用并比较了不同纯化方法, 最终获得了大量的高纯度 A4 蛋白。并以 A4 与细胞膜上 PS 的结合能力即以凋亡检测功能为对象, 运用流式细胞仪对 A4 与凋亡细胞的结合情况进行了结合动力学常数分析, 为后续研究奠定了基础。

## 材料与方法

**实验材料** 含有 EGFP-His-tag 基因的改造型质粒 pET28a-EH<sup>[25]</sup>、annexin-A5-EGFP-His 和 EGFP-His 重组蛋白 (以下称 A5-EGFP 和 EGFP), 均保存于本实验室。Top10、BL21 等菌株保存于本实验室中。Jurkat 淋巴瘤细胞和 A549 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 依

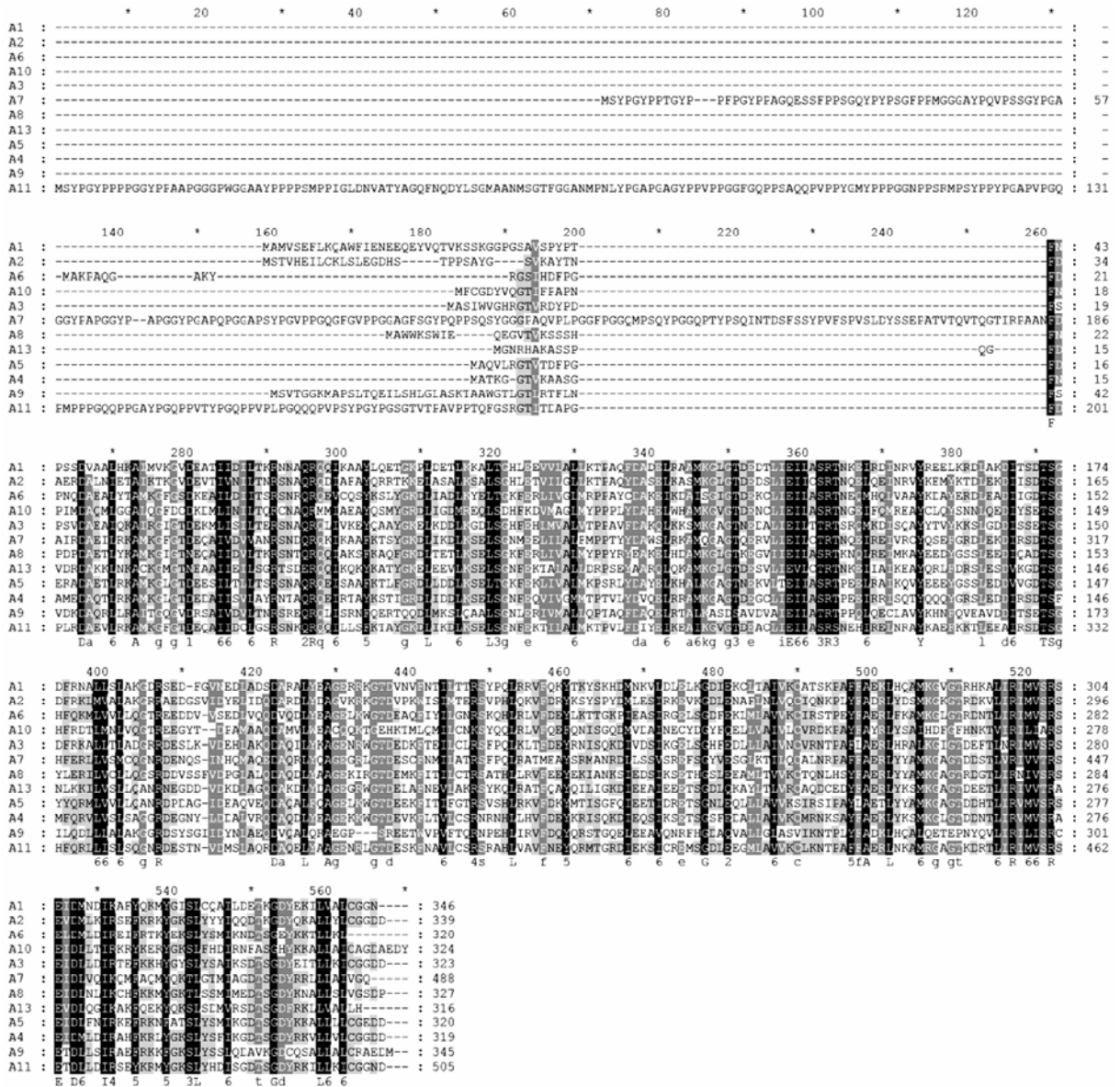


Figure 1 Multiple alignment of amino acid sequences of annexins family

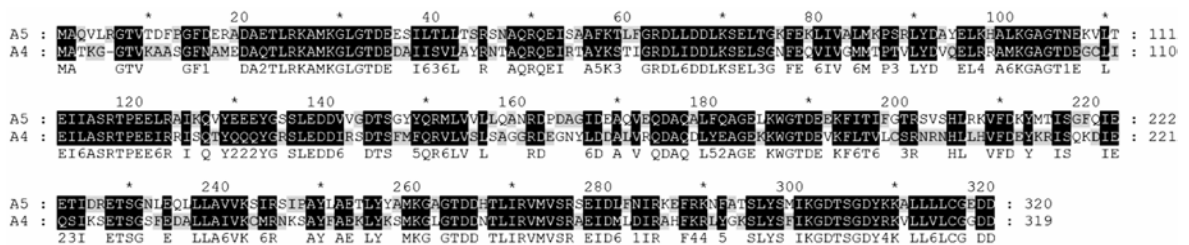


Figure 2 Alignment of amino acid sequences of annexin A4 and annexin A5

托泊昔购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 保存于本实验室。

**A4 cDNA 序列的扩增与克隆构建** 由于 A4 基因上游 50 bp 处含有 *Nco* I 酶切位点, 因此需利用引物对其进行同义突变。根据 A4 的 mRNA 序列 (XM\_011532805.1) 及突变位点设计 3 条引物 (表 1)。

Table 1 Primers of A4 PCR

Primer	Sequence (5'–3')
P1	catgccatgcgatggcaaccaaggagctactctcaaacgtcttcaggattcaatg ( <i>Nco</i> I)
P2	gcttcaggattcaatgcaatggaatgcc (c→a)
P3	cgcgatccatcatctcccacagagaacaacagctacttct ( <i>Bam</i> H I)

引物 P2 引入同义点突变 (下划线处), 引物 P3 删除终止密码子。

对正常培养的 A549 细胞进行收集, 使用总 RNA 提取试剂盒提取细胞的总 mRNA, 后用逆转录试剂盒进行逆转录, 最终得到 A549 cDNA。利用 Pyrobest DNA Polymerase (Takara) 进行 PCR 扩增, 首先通过引物 A4-P2 与 A4-P3 从 cDNA 中扩增出 A4 的非全长片段 A, 然后以片段 A 为模板, 通过引物 A4-P1 与 A4-P3 扩增出全长的 A4 片段 (图 3a)。

将全长的 A4 片段与 pET28a-EH 质粒经 *Nco* I 与 *Bam*H I 双酶切并纯化后进行连接, A4 的 C-末端与 EGFP 的 N-末端通过 Linker 蛋白连接, 设计出表达质粒 pET28a-A4-EGFP (图 3b)。重组表达质粒转化 Top10 感受态菌株, 涂布卡那抗性平板筛选阳性克隆, 菌落 PCR 鉴定后, 送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

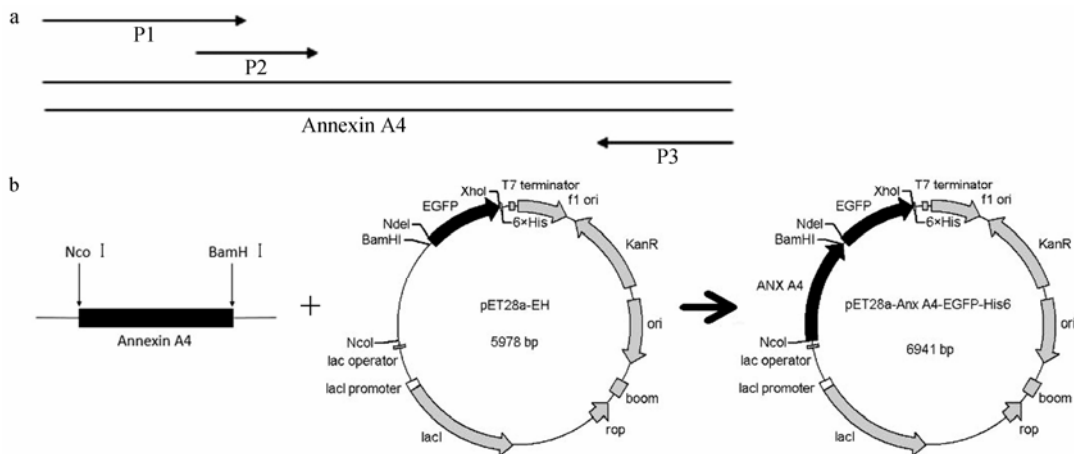
**重组 A4-EGFP 蛋白的表达分析** pET28a 质粒和 pET28a-A4-EGFP 质粒分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 分别挑取单克隆接种到 3 mL LB 液体培养基中 (包含  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素),  $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $37^\circ\text{C}$  振荡培养过夜后, 将含有 pET28a 质粒和 pET28a-A4-EGFP 质粒的过夜菌按 1 : 50 的比例转接到 3 mL LB 液体培养基中。 $37^\circ\text{C}$  振荡培养至  $\text{OD}_{600}$  值约为 0.6 时, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷诱导剂 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 至终浓度为  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$  诱导培养 5 h。 $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min, 收集菌体至 1.5 mL EP 管中。然后, 分别用 HEPES-NaCl 缓冲液 ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HEPES,  $140 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, pH 7.4) 1 mL 洗涤菌体, 再用 HEPES-NaCl 缓冲液

$800 \mu\text{L}$  重悬菌体, 对菌体重悬液进行超声 (超声 3 s/间隔 8 s, 共 5 min), 超声结束后, 对 pET28a-A4-EGFP 质粒的 BL21 (DE3) 菌体重悬液  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 将上清转移到 1.5 mL EP 管中, 沉淀用 HEPES-NaCl 缓冲液  $800 \mu\text{L}$  重悬保存, 对上述样品进行 SDS-PAGE 分析。

**亲和层析纯化 A4-EGFP** 将 5 mL 含有 pET28a-A4-EGFP 质粒的过夜活化菌转接至 500 mL LB 液体培养基 (含  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素) 中,  $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $37^\circ\text{C}$  振荡培养 3.5 h,  $\text{OD}_{600}$  值达到 0.6 后, 加入 IPTG 至终浓度为  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$  诱导培养 12 h。收集菌液,  $6000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 收集菌体。用 HEPES-NaCl 缓冲液 30 mL 重悬菌体, 超声破碎仪超声 (超声 3 s/间隔 8 s, 共 1 h)。超声后的菌液  $4^\circ\text{C}$ 、 $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 收集上清。

使用 NTA-Ni 亲和层析进行蛋白纯化, 镍柱使用前先用含  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑的 HEPES-NaCl 缓冲液进行平衡。上述样品中补加咪唑至终浓度  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜抽滤过后上样。用含有  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑的 HEPES-NaCl 缓冲液清洗未能结合在镍柱的杂蛋白, 含  $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑的 HEPES-NaCl 缓冲液洗脱目的蛋白, 收集最大吸收峰处的洗脱液。

使用离子交换层析 (DEAE 柱和 SP 柱) 进一步纯化 A4-EGFP。DEAE 柱使用前先用  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液进行平衡。上述上清使用  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜抽滤过后, 过 DEAE 柱。用含有  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱未能结合在 DEAE 柱的杂蛋白, 含  $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱目的蛋白, 收集最大吸收峰处的洗脱液。将洗脱液稀



**Figure 3** PCR amplification of A4 cDNA and construction of the expression plasmid. a: PCR amplification of A4 cDNA; b: Construction of the pET28a-A4-EGFP expression plasmid. The plasmid pET28a-EH was constructed by insertion of EGFP and (GS)<sub>4</sub> linker encoding sequence into pET28a. The expression plasmid pET28a-A4-EGFP was constructed by insertion of A4 encoding sequence between *Nco* I and *Bam*H I sites of pET28a-EH

释 5 倍后, 加入  $\text{CaCl}_2$  至终浓度  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜抽滤过后, 过 SP 柱。SP 柱使用前先用 Buffer B ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ) 平衡, 直至有游离  $\text{Ca}^{2+}$  流出。用含有  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、 $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  的 Tris-HCl 缓冲液洗脱未能结合在 SP 柱的杂蛋白, 含  $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱目的蛋白, 收集最大吸收峰处的洗脱液。用 Sephadex G-50 作为填料制作分子筛层析柱, 将缓冲液置换为 Hepes-NaCl 缓冲液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

**膜吸附纯化 A4-EGFP** 将 5 mL 含有 pET28a-A4-EGFP 质粒的过夜活化菌转接至 500 mL LB 液体培养基 (含  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素) 中,  $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $37^\circ\text{C}$  振荡培养 3.5 h,  $\text{OD}_{600}$  值约为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$  诱导培养 12 h。收集菌液,  $6000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 收集菌体。用  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 30 mL 重悬菌体, 加入  $\text{CaCl}_2$  至终浓度  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 超声破碎仪超声 (超声 3 s/间隔 8 s, 共 1 h)。超声后的菌液  $4^\circ\text{C}$ ,  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 收集沉淀。沉淀用 Buffer A ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA) 20 mL 重悬, 将溶液在磁力搅拌器上  $4^\circ\text{C}$  搅拌释放 30 min,  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 收集上清。

使用离子交换层析 (DEAE 柱和 SP 柱) 进行蛋白纯化, 方法同上。用 Sephadex G-50 作为填料制作分子筛层析柱, 将缓冲液置换为 Hepes-NaCl 缓冲液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

**A4-EGFP 的凋亡检测** Jurkat 淋巴瘤细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养, 每  $1\times 10^6$  细胞用 1 mL 终浓度  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  依托泊苷的培液诱导 14 h 后,  $1000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 收集细胞。每  $5\times 10^5$  细胞用 400  $\mu\text{L}$  Binding Buffer ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Hepes,  $140 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) 洗涤 2 次, 400  $\mu\text{L}$  Binding Buffer 重悬。加入 A4-EGFP, 使蛋白终浓度分别为 2、10、50、100、500 和  $1000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 室温下避光孵育 30 min。加入 PI ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 室温下避光孵育 5 min。经 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 流式细胞仪检测细胞的荧光强度。含同等浓度梯度的 A5-EGFP 和 EGFP 荧光蛋白的细胞作为对照。每组实验重复 3 次。

**数据处理** 采用 GraphPad 6 软件进行分析, 实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。

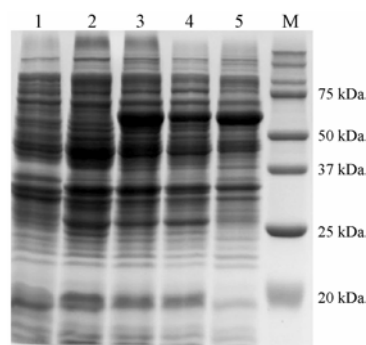
## 结果

### 1 表达载体的构建

根据 NCBI 中人源 A4 的 cDNA 序列设计引物, 以 A549 的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增出了 963 bp 的 A4 全长序列, 经过 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切连接插入载体 pET28a-EH 的 *Nco* I 和 *Bam*H I 位点之间, 构建了 C-末端带有 His-tag 的 A4-EGFP 融合蛋白表达质粒 (图 3)。菌落 PCR 鉴定及测序验证重组质粒中 A4-EGFP 的序列正确后, 转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3)。

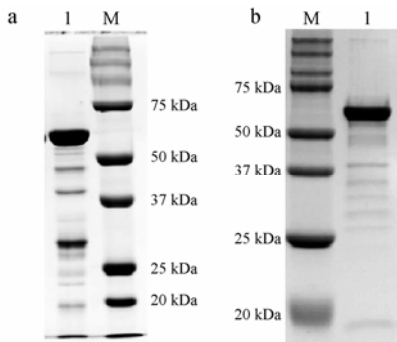
### 2 A4-EGFP 的纯化

将构建成功的重组质粒 pET28a-A4-EGFP 转化 BL21 (DE3) 后经 IPTG 诱导, 通过 SDS-PAGE 分析发现在 65 kDa 左右有目的蛋白表达, 与融合蛋白的理论分子质量一致, 目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 40%, 占可溶性蛋白比例达 45%, 而空载质粒与未诱导的重组质粒在相应的分子质量未出现明显蛋白条带 (图 4)。



**Figure 4** SDS-PAGE analysis of A4-EGFP expression. Lane 1: Total crude protein of bacteria containing pET28a vector, IPTG induction; Lane 2: Total crude protein of bacteria containing pET28a-A4-EGFP, no induction; Lane 3: Total crude protein of bacteria containing pET28a-A4-EGFP, IPTG induction; Lane 4: Supernatant of lysate of bacteria containing pET28a-A4-EGFP, IPTG induction; Lane 5: Pellet of lysate of bacteria containing pET28a-A4-EGFP, IPTG induction; M: Protein markers

A4-EGFP 融合蛋白成功表达后, 为了便于蛋白质纯化, 首先借助于其 C-末端的 His-tag, 选用 Ni 亲和层析纯化 A4-EGFP, 再经两步离子交换层析纯化后, 最终纯化产率为  $47.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 纯度为 80% (图 5a)。鉴于亲和层析成本较高、目的蛋白损失较多且纯度不理想, 本研究又依据膜联蛋白可钙依赖性结合磷脂膜的特性, 设计了另一种纯化方法, 借助细菌细胞膜为吸附介质, 使 A4-EGFP 特异性吸附于细胞膜上, 同样再经两步离子交换层析纯化目的蛋白 (图 5b), 最终纯度达 90%, 产率为  $75.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与 Ni 亲和层析



**Figure 5** Analysis of recombinant A4-EGFP purified by different methods. a: SDS-PAGE analysis of recombinant A4-EGFP purified by Ni affinity chromatography; b: SDS-PAGE analysis of recombinant A4-EGFP purified by membrane adsorption purification

纯化相比,膜吸附纯化法成功提高了 A4-EGFP 的纯度与得率。

### 3 A4-EGFP 融合蛋白的凋亡检测分析

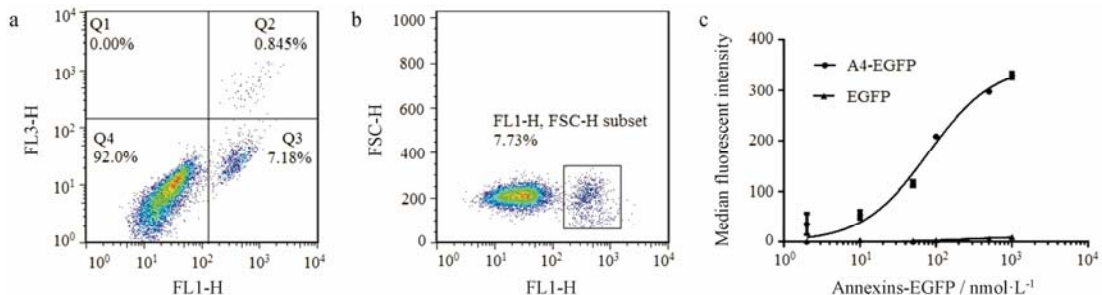
将纯化得到的 A4-EGFP 利用流式细胞术观察其与凋亡细胞的结合情况。设置不同的浓度梯度,对细胞进行分群,圈选 A4-EGFP 标记的早期凋亡细胞群(图 6a, b)。对 A4-EGFP 标记的早期凋亡细胞表面的平均荧光强度进行分析,发现与 EGFP 对照组相比, A4-EGFP 融合蛋白标记的细胞平均荧光强度有明显的增加,且平均荧光强度随着 A4-EGFP 浓度的增加而增加,说明纯化得到的 A4-EGFP 可与细胞膜上 PS 发生特异结合,能够有效标记凋亡细胞(图 6c)。

同时设置了同等浓度梯度的 A5-EGFP 进行流式检测,并对 A4-EGFP 和 A5-EGFP 与细胞膜上 PS 亲和力加以定量分析。最终得出 A4-EGFP 与 PS 的亲和力为  $79.58 \pm 11.68 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 同样得到 A5-EGFP 与 PS 的亲和力为  $33.45 \pm 2.15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。虽然 A4-EGFP 与 PS 的亲和力稍低于 A5-EGFP, 但同属纳摩尔级, 且属于同一个数量级, 说明 A4-EGFP 同样可用于凋亡检测。

## 讨论

研究发现 PS 与许多疾病相关,如高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL) 中的 PS 与动脉粥样硬化心血管疾病紧密相关,对 HDL 的多种功能有重要影响<sup>[26]</sup>,且 PS 暴露可促进败血症中的促凝活性<sup>[27]</sup>,因此膜联蛋白依赖于其结合 PS 的功能,具有良好的药物开发前景。A4 是膜联蛋白家族的重要成员之一,含有 4 个膜联蛋白重复结构域,每个结构域上有一个钙结合位点,使 A4 可以钙依赖的方式与磷脂相互作用。A4 在体内的广泛分布及其高度保守性证明它在体内具有重要的生理功能。由于膜联蛋白的功能与其结合磷脂双层的能力紧密相关,而针对 A4 结合 PS 的体外研究还较少,并且目前已有的 A4 大多是从动物组织中分离提纯,这种方法可得到纯度较高的蛋白,但得率很低,且方法比较繁琐,阻碍了 A4 的结构与功能研究。因此,获得大量高纯度的 A4 是开展 A4 功能研究的基础。

为了评价 A4 与细胞膜上 PS 的结合能力,本研究构建了 A4-EGFP 融合蛋白表达质粒,在融合蛋白的 C-末端加入 His-tag 以便后期纯化。经过 IPTG 诱导,成功实现了 A4-EGFP 在大肠杆菌中的高水平表达,表达总量占菌体蛋白的 40% 左右,并且可溶性表达比例较高。在 A4-EGFP 成功表达后,选用不同的纯化方法,对 A4-EGFP 的纯化进行了探讨。首先依据 A4-EGFP 融合蛋白 C-末端的 His-tag, 选用 Ni 亲和层析进行 A4-EGFP 的纯化,得到了纯度为 80% 的蛋白。后续又充分结合 A4 可在  $\text{Ca}^{2+}$  存在条件下与磷脂膜可逆结合的特性,选用膜吸附的纯化方法,借助细菌细胞膜为吸附介质,使蛋白吸附在质膜上,提高目的蛋白的纯度至 90%, 实现了高纯度 A4-EGFP 的分离纯化。利用纯化得到的 A4-EGFP 进行凋亡检测,结果显示 A4-EGFP 可以有效标记早期凋亡细胞,证明所纯化的 A4-EGFP 具有与 PS 结合的生物活性和功



**Figure 6** Evaluation of apoptotic detection ability of A4-EGFP by flow cytometry. a: Diagrammatic dot-plot of apoptotic cells labeled with A4-EGFP; b: Diagrammatic dot-plot of flow cytometric measurement of apoptotic cells; c: Analysis of median fluorescence intensity of A4-EGFP binding to apoptotic cells

能, 且其与 PS 的亲合力达  $79.58 \pm 11.68 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与 A5-EGFP 和 PS 的亲合力同属一个数量级, 表明其可有效进行细胞凋亡检测。

本文成功实现了 A4-EGFP 在原核体系中的可溶性高效表达, 提供了大量的高纯度 A4-EGFP 蛋白, 研究了其与凋亡细胞表面 PS 结合的性能, 为进一步研究 A4 的功能与潜在应用奠定了基础。

## References

- [1] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking  $\text{Ca}^{2+}$  signalling to membrane dynamics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 449–461.
- [2] Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 2623–2642.
- [3] Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2631–2639.
- [4] Kietselaer BL, Reutelingsperger CP, Heidendal GA, et al. Noninvasive detection of plaque instability with use of radio-labeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1472–1473.
- [5] Kartachova M, Haas RL, Olmos RA, et al. *In vivo* imaging of apoptosis by  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response [J]. *Radiother Oncol*, 2004, 72: 333–339.
- [6] Kratz H, Haeckel A, Michel R, et al. Straightforward thiol-mediated protein labelling with DTPA: synthesis of a highly active  $^{111}\text{In}$ -annexin A5-DTPA tracer [J]. *EJNMMI Res*, 2012, 2: 17.
- [7] Yagle KJ, Eary JF, Tait JF, et al. Evaluation of  $^{18}\text{F}$ -annexin V as a PET imaging agent in an animal model of apoptosis [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46: 658–666.
- [8] Dumont EA, Hofstra L, van Heerde WL, et al. Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion – measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model [J]. *Circulation*, 2000, 102: 1564–1568.
- [9] Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Petrovsky A, et al. Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy [J]. *Neoplasia*, 2003, 5: 187–192.
- [10] Petrovsky A, Schellenberger E, Josephson L, et al. Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 1936–1942.
- [11] Prinzen L, Miserus RJ, Dirksen A, et al. Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using annexin A5-functionalized quantum dots [J]. *Nano Lett*, 2007, 7: 93–100.
- [12] van Tilborg GA, Vucic E, Strijkers GJ, et al. Annexin A5-functionalized bimodal nanoparticles for MRI and fluorescence imaging of atherosclerotic plaques [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, 21: 1794–1803.
- [13] Sosnovik DE, Schellenberger EA, Nahrendorf M, et al. Magnetic resonance imaging of cardiomyocyte apoptosis with a novel magneto-optical nanoparticle [J]. *Magn Reson Med*, 2005, 54: 718–724.
- [14] Schellenberger EA, Sosnovik D, Weissleder R, et al. Magneto/optical annexin V, a multimodal protein [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15: 1062–1067.
- [15] Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Högemann D, et al. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI [J]. *Mol Imaging*, 2002, 1: 102–107.
- [16] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 331–371.
- [17] Tu D, Ma X, Zhao H, et al. Cloning and expression of SgCYP450-4 from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 614–622.
- [18] Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression [J]. *J Pathol*, 2008, 216: 131–140.
- [19] Kaetzel MA, Chan HC, Dubinsky WP, et al. A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 5297–5302.
- [20] Benz J, Hofmann A. Annexins: from structure to function [J]. *Biol Chem*, 1997, 378: 177–183.
- [21] Choi CH, Sung CO, Kim HJ, et al. Overexpression of annexin A4 is associated with chemoresistance in papillary serous adenocarcinoma of the ovary [J]. *Hum Pathol*, 2013, 44: 1017–1023.
- [22] Chen W, Chen L, Cai Z, et al. Overexpression of annexin A4 indicates poor prognosis and promotes tumor metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37: 9343–9355.
- [23] Arii Y, Butsusihita K, Fukuoka SI. Role of calcium-binding sites in calcium-dependent membrane association of annexin A4 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79: 978–985.
- [24] Morimoto A, Serada S, Enomoto T, et al. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner [J]. *Oncotarget*, 2014, 5: 7776–7787.
- [25] Wang J, He L, Chen D, et al. Quantitative analysis of annexin V-membrane interaction by flow cytometry [J]. *Eur Biophys J*, 2015, 44: 325–336.
- [26] Darabi M, Kontush A. Can phosphatidylserine enhance atheroprotective activities of high-density lipoprotein? [J]. *Biochimie*, 2016, 120: 81–86.
- [27] Zhang Y, Meng H, Ma R, et al. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through phosphatidylserine exposure [J]. *Shock*, 2016, 45: 299–307.