

yC₁₆基因在 *Escherichia coli*中的表达及表达产物的纯化

Expression of Gene yC₁₆ in *Escherichia coli* and Purification of the Gene Product

兰国宝

Lan Guobao

(广西海洋研究所 北海市长青东路 92号 536000)

(Guangxi Institute of Oceanology, 92 East Changqinglu, Beihai, Guangxi, 536000)

摘要 yC₁₆ (cDNA, 2.9kb) 是果蝇 yema基因的转录片段。为制备 yC₁₆编码蛋白作为免疫原, 本实验用 GST融合基因表达载体 pGEX-2T在 *Escherichia coli* 中合成该基因的蛋白, 并与谷胱苷肽 S-转移酶 (GST) 融合形成融合蛋白。结果由裂解细菌所得到的融合蛋白为水溶性, 并且可以在非变性的条件下, 通过亲和层析作用在固定化的谷胱苷肽上加以纯化, 然后再利用具有识别特异位点的蛋白水解酶——凝血酶或凝血因子 Xa的切割作用, 将融合蛋白中的 GST成分除掉。实验结果表明, 使用 pGEX载体合成克隆基因多肽, 是一种有效而可靠的方法, 步骤简单。

关键词 载体 pGEX 克隆基因 yC₁₆ 融合蛋白 纯化

中图分类号 Q 378

Abstract yC₁₆ (cDNA, 2.9kb), cloned in Bluescript IISK, is a transcript of yema nucleic acid gene of *Drosophila*. For preparation of the protein encoded by yC₁₆ as immunogen, pGEX-2T, the GST fusion gene expression vector^[2] was used to synthesize the protein in *E. coli* as fusion with the C-terminus of Sj26, a 26-kDa glutathione S-transferase (GST). The result showed that the fusion protein was soluble in aqueous solution and can be purified from crude bacterial lysate under non-denaturing conditions by affinity chromatography on immobilized glutathione, and further purification of the protein of yC₁₆ could be done by cleavage with site-specific protease, thrombin or blood coagulation factor Xa to remove the GST carrier. Experiment results suggests that using pGEX vectors to synthesize polypeptides from cloned genes is an efficient and reliable method with simple procedures.

Key words vector pGEX, cloned gene yC₁₆, fusion protein, purification

用克隆基因导入 *Escherichia coli* 细胞内进行诱导表达来生产大量的重组蛋白的方法, 已证明对蛋白质的纯化、定位及功能分析等都有极为重要的使用价值^[1]。因此, 到目前为止, 人们已发展了多种表达载体系统, 目的是提高表达水平及简化外源多肽的分离纯化程序^[2]。例如, 能与 *E. coli* 中的 β -半乳糖苷酶融合的多肽类的表达^[3], 可以通过基质的亲和作用或免疫亲和层析作用^[4], 从被裂解的细胞中分离出来。如果融合多肽像 trE 蛋白那样可溶的话^[5,6], 则可从被裂解的细菌可溶组分中得到分离纯化。再如能与葡萄球菌蛋白 A 产生融合的外源多肽, 可以通过亲和层析方法, 从 IgG-Sepharose 中分离出来^[7,8]。但是以上这些方法通常都伴随不利因素, 例如在纯化过程中, 使用灭活剂可能会改变所要纯化多肽的抗原特性及其功能活性, 亦即融合蛋白与 IgG 的结合就可能导致

免疫分析复杂化。还有另外的方法是, 设计富含精氨酸多肽的合成, 并利用其 C 末端进行离子交换层析而加以分离纯化^[9], 或者设计生产那些能分泌到细胞周质或培养基中的多肽, 通过细胞的分泌作用来实现分离纯化^[1]。但这些技术策略在使用上尚欠广泛性。

由 Donald B. Smith 和 Kevin S. Johnson 构建的, 以谷胱苷肽 S-转移酶 (GST) 为基础的 PGEX 载体系列^[10], 简化了外源多肽的纯化程序。这一载体系列能指导大多数真核多肽在 *E. coli* 中合成, 并与 Sj26 的 C 端融合, 即与 26kDa GST 融合。Sj26 是日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 编码的多肽, 在多数情况下融合多肽为可溶的, 可以在非变性的条件下在固定相的谷胱苷肽分子上进行亲和层析, 从细菌裂解粗液中分离出来。利用批次洗脱程序, 能在 2h 内平行纯化几种融合蛋白, 每毫升培养物产量达 15 μ g 以上。此外, 由于该载体已经工程化, 因而可以通过使用能识别特异位点的蛋白酶水解, 如凝血酶 (thrombin) 等,

将 GST 从融合链中切开,再以谷胱苷肽琼脂糖的吸附作用将 GST 及其他未被切割的融合肽加以去除。

Yema 是果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 染色体上的一个基因群 (Yema gene cluster) 由 Ounissa Ait-Ahmed 等人分离得到^[11,12],位于果蝇第 3 条染色体的右臂 3R-98F3-10 位置上。近年来的反复研究证明,该基因组影响和控制果蝇繁殖的早期胚胎发育^[13-16]。为了结合免疫学方法研究 yC6 基因 (cDNA, 为 Yema 基因组的一个转录片段,故称为 yC6) 的生物学功能,即其在果蝇早期胚胎发育的时空表达及翻译水平,本文进行了使用载体系列 pGEX 中的 pGEX-2T 来制备 yC6 的抗原多肽的研究实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 表达质粒

pGEX-2T, 以 *E. coli* BH10 扩增兼作重组质粒的转化细胞。

1.1.2 Yema 基因组 C6 片段 (简称 yC6)

2.9 kb (cDNA), 克隆在质粒 Bluescript II SK 上, 以 *E. coli* JM10 扩增。

1.1.3 主要工具酶

EcoRI, SmaI, DraI, 碱性磷酸酶, DNA 聚合酶 Klenow 片段, T4DNA 连接酶及凝血酶等。

1.2 方法

1.2.1 DNA 重组

分别用 EcoRI 及 SmaI 消化 pGEX-2T 用 SmaI 及 DraI 消化 Bluescript II SK, 以低熔点 (0.4%) 琼脂糖凝胶电泳回收 yC6 片段。为防止 pGEX-2T 环化, 当以 EcoRI 消化后, 用碱性磷酸酶去除掉 5' 末端磷酸基。由于 pGEX-2T 带有粘性末端, 因此在连接前需用 DNA 聚合酶 Klenow 片段处理, 填充末端缺口。连接反应取 50 ng yC6, 100 ng pGEX-2T, 2U T4DNA 连接酶, 20 μ L T₄ 缓冲液, 在 15 $^{\circ}$ C 下进行过夜反应。

1.2.2 转化

取 40 ng 经过夜连接反应的重组质粒与 150 μ L BH10 感受态细胞混合, 在冰上置 30 min, 再以 42 $^{\circ}$ C 热休克 15 min, 然后加入 LB 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C 下温育 40 min, 此时抗 ampicilline 基因得到表达。温育结束后, 将细胞平展于含有 50 μ g/mL ampicilline 的 LB 固体培养基上, 并以 37 $^{\circ}$ C 继续培养。用 minipreps 方法筛选菌落, 检出含有 C6 的重组体及其在 pGEX-2T 中的插入方向。

1.2.3 亲和法纯化融合多肽

按照 Donald. B. Smith 等人的方法, 对已转化而含有 pGEX-2T-C6 重组体的 *E. coli* 进行过夜预培养, 再以 1/10 比例稀释于 400 mL LB 中, 在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养。当 OD₆₀₀ 值达到 0.8~1.0 时, 加 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) 诱导 1 h~4 h 离心收集细胞, 重新溶解于 MTPBS 液中。MTPBS 液用量为培养基体积的 1/100 (即 4 mL), 低温下超声波破碎细胞, 然后加入终浓度为 1% TritonX-100, 4 $^{\circ}$ C 下 10 000 \times g 离心 5 min, 将上清液置于 50 mL 聚丙烯试管中, 再加 1 mL~2 mL 50% 谷胱苷肽琼脂糖微粒 (Sigma) (硫键), 室温下摇动混合, 吸收 20 min~30 min, 以 2 000 \times g 离心 15 min, 收集微粒, 并以 MTPBS 液洗涤 3 次, 每次 50 mL。融合蛋白是通过还原型谷胱苷肽的竞争作用加以洗脱的, 因此以微粒体积的还原型谷胱苷肽洗脱液 [50mM Tris·HCl (pH 值 8.0), 5 mM 还原型谷胱苷肽] 洗涤微粒 2 次, 每次浸洗 2 min~5 min。对用于吸附的微粒预先用 MTPBS 浸泡, 再以 MTPBS 液洗涤 2 次, 然后用 MTPBS 将微粒配制成 50% 的溶液 (v/v), 并在 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。为了减少已纯化融合蛋白受 *E. coli* 蛋白的污染, 可在吸收过程中加入 TritonX-100, 同时用超声波破碎细胞时尽量缩短时间。融合蛋白的产量, 用分光光度计于 280 nm 处测定, 以公式 $10 D_{280} = 0.5 \text{ mg/mL}$ 求得, 此公式为蛋白质浓度估计值, 其标准样品为小牛血清蛋白。

1.2.4 yC6 蛋白的纯化

为了去掉融合多肽中的 GST 成分, 在已洗脱的融合蛋白溶液中加入 1/500~1/100 凝血酶, 于 25 $^{\circ}$ C 下温育 1 h (凝血酶溶液: 在 50 μ L 含有 50 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ 溶液中加入 100 ng~500 ng 凝血酶), 再利用谷胱苷肽琼脂糖的吸附作用, 吸附掉 GST 携带者及未裂解的融合蛋白, 留下的为纯外源蛋白 (多肽)。

1.2.5 转化体的筛选

以 2 mL 培养物离心后重新溶于 300 μ L MTPBS 液中, 经超声波破碎细胞及离心处理后, 将上澄液与 50 μ L 50% 谷胱苷肽琼脂糖微粒混合, 以 $3 \times 1 \text{ mL}$ MTPBS 洗涤, 并将微粒置于 100 μ L 样品缓冲液中煮沸, 继之进行 0.1% SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 用 0.05% 考马斯绿染色, 找出具有融合表达转化体。

2 结果与讨论

2.1 质粒与外源基因融合的构建

融合基因 Sj26-C6 的构建过程及结果见图 1 所选用的工具酶有以下作用; 以 SmaI 消化 yC6 的起始端, 则第一个氨基酸密码 CCG 中 CC 两个核苷酸被

切除掉,剩下 G;以同种酶消化 pGEX-2T载体,则脯氨酸密码 CCG中的 G被切除掉,剩下 CC以这两个末端相连接时,既恢复了 Sma I位点,又使融合点的氨基酸密码不变。用 Dra I消化 yC₆的末端,则亮氨酸密码 TTA中的 A被切除掉,剩下 TT;以 EcoRI消化 pGEX-2T,则甘氨酸密码 GGA中的 GG两核苷酸被切除掉,剩下 A,以这两端相连接正好构成编码异亮氨酸的密码。这样, yC₆除了末端最后一个氨基酸密码改变外,其余的编码序列均保持原状。虽然 Ecor I酶切产生一个粘性末端,但通过以 Klenow片段酶处理后,其缩入的3'端单链缺口被填平,结果可与 Sma I及 Dra I这两个平头末端相连接。尽管这种基因融合构建法得到 yC₆在 pGEX-2T中两个亚克隆方向的重组体,但由于有一个亚克隆方向恢复了 Sma I位点,因此转化后,可以用 minipreps配合酶切及电泳分析,检出带有目的亚克隆方向的转化体。

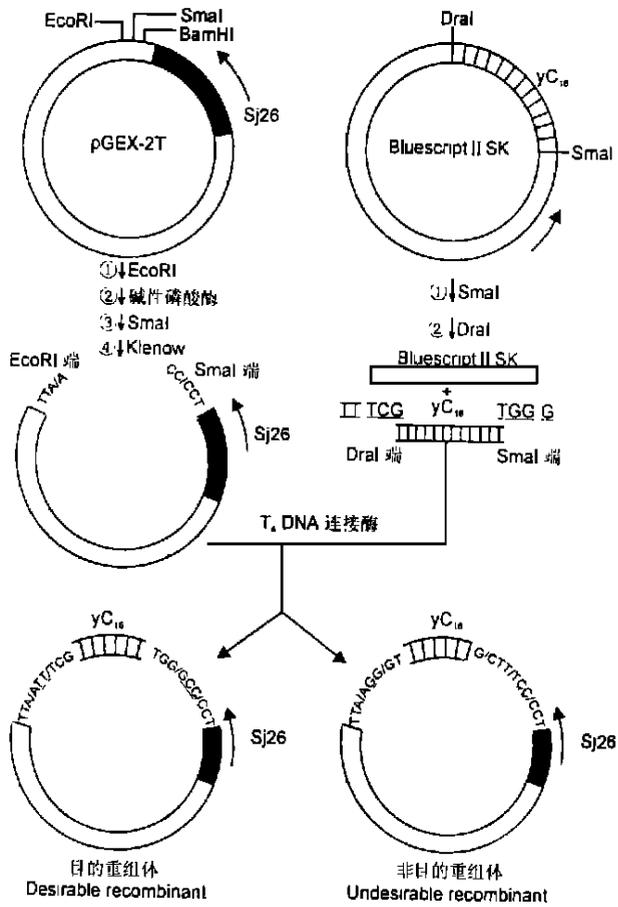


图1 Sj26-C₆融合基因的构建

Fig. 1 The construction of fusion gene Sj26-C₆

2.2 yC₆与 Sj26的融合表达

yC₆与 Sj26融合后,预期合成分子量为 96kDa的融合多肽,其中由 Sj26编码的 GST为 26kDa(图2),由 yC₆编码的多肽为 70kDa。用 1 mM IPTG 诱导 pGEX-2T-C₆转化体后,在 SDS凝胶电泳带谱上可

以找到 96kDa的新增带,与预期的结果完全一致(图3)。通过在不同诱导时间取样分析,结果以诱导 4 h 为最佳诱导时间。另外,在诱导试验中还发现,如果将 IPTG 的浓度提高到 3 mM~ 4 mM 时,则会得到更粗的融合多肽电泳带(图3)。由此可见,提高 IPTG 浓度可使融合基因 Sj26-C₆的合成表达得到进一步提高。

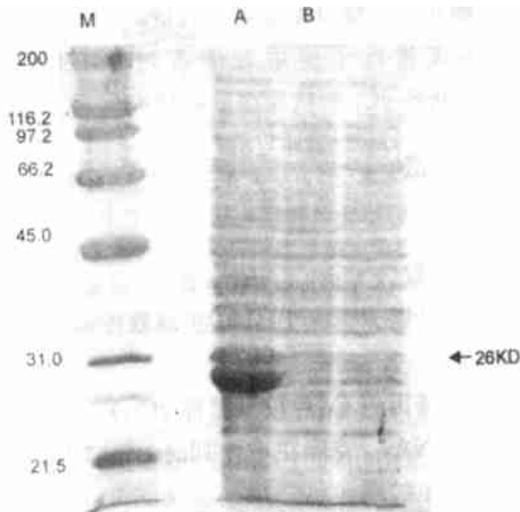


图2 pGEX-2T在 E. coli 中表达 GST

Fig. 2 Expression of GST in *E. coli* transformed with pGEX-2T

A: 加 0.1 mM IPTG 诱导; B 未诱导; M 标准分子量标记。A: Induction by adding IPTG to 0.1 mM; B Non-induction; M: Markers.

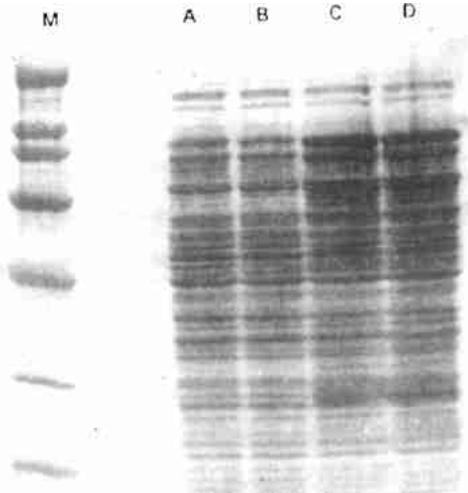


图3 pGEX-2T-C₆在 E. coli 中表达合成融合蛋白,以不同浓度的 IPTG 诱导取得的结果

Fig. 3 Expression of fusion protein in *E. coli* transformed with pGEX-2T-C₆, induced in different concentrations of IPTG

A: 1 mM; B 2 mM; C 3 mM; D 4 mM; M 标准分子量标记 markers.

2.3 yC₆基因蛋白质的纯化结果

用超声波破碎法处理细胞后,经离心即可从水溶相中得融合多肽,再用 50% 谷胱甘肽琼脂糖微粒吸附水溶相中的融合多肽,即可容易地通过洗涤去除掉水

溶相中的其他成分。之后再通过还原型谷胱苷肽竞争作用洗脱吸附相中的融合肽。这种纯化方法不但时间短、效率高,而且产物纯度也高,还省了要通过检测才知道是否有 *E. coli* 蛋白污染的麻烦 (图 4),由亮

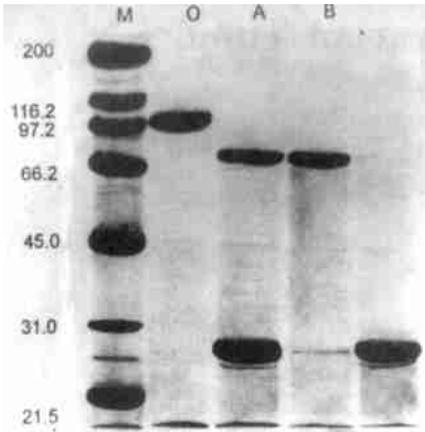


图 4 γC_{16} 编码的蛋白质的纯化

Fig. 4 Purification of the protein encoded by γC_{16}

A 用凝血酶切割融合蛋白; B γC_{16} 编码的蛋白; G GST; M 标准分子量; F 由融合基因 Sj26- C_{16} 编码的融合蛋白. A: Coelution of fusion protein with thrombin; B: The pure protein encoded by γC_{16} ; G: GST; M: Markers; F: Fusion protein encoded by fusion gene Sj26- C_{16} .

争洗脱得到的融合多肽,加入 1/500 的凝血酶温育 30 min,融合肽即被切成两段,一段为外源多肽,另一段为 GST 多肽。通过再一次的琼脂糖微粒吸附作用,最终使抽提液中留下纯度极高外源多肽产物 (图 4)。但是,在融合蛋白纯化过程伴随轻微的降解现象,即便使用了 TritonX-100 这样的去污剂,仍然无法避免。用 pGEX-2T 制备 Yema 基因组 C_{14} 片段 (1.2kDa) 编码的多肽时,就没有降解现象 (Michele Delaage, 1992, 个人交流,资料未发表),这可能与 C_{16} 片段过长、分子量过大有关。另外,琼脂糖微粒的大小也影响到吸附效果。所以当碰到吸附效果不佳时,应选择适当的琼脂糖,并根据具体情况对吸附时间作适当地调整。

3 结语

pGEX-2T 载体能简化以 *E. coli* 系统表达合成的外源多肽纯化过程,所表达的多肽能与 Sj26 的 C-末端融合,并能在非变性条件下,于固定化的谷胱苷肽分子上进行亲和层析加以纯化。

由于在 Sj26 的 C-末端引入了被凝血酶和 Xa 因子识别的酶切位点,所以 GST 可以通过纯化后从融合肽中去除掉。

载体含有超表达功能的 lac 阻遏蛋白的等位基因 lac I^l,所以在加入 IPTG 进行合成诱导之前,由强

启动子 tac 引导 GST 融合蛋白的合成被高效抑制,而不管 *E. coli* 寄主中 lac I 的状态如何。这一特点及其所提供的框架转换克隆位点、高水平表达效果、简易的纯化方法及 GST 融合多肽的高效特异切割作用,均使我们方便地利用它构建和分析 cDNA 表达文库,也可以作为肽类化学合成上的一种代用方法,经济方便。

致谢

本研究于法国国家科学研究中心马赛 Luminy 大学遗传及细胞生物学研究实验室 (Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaires, CNRS, Centre Universitaire Marseille-Luminy, France) 进行,所使用的材料及设备均由该实验室提供,并得到 Ounissa Ait-Ahmed 博士、Michele Thomas-Delaage 研究员及导师 Roland Rosset 教授的指导,值此一并致谢。

参考文献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 2 Sassenfeld H M, Brewer S J. A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. Bio/Technology, 1984, 2: 76-81.
- 3 Marston A O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Bilchem J, 1986, 240: 1-12.
- 4 Rütther U, Müller-Hill B. Easy identification of cDNA clones. EMBO J, 1983, 2: 1791-1794.
- 5 Germino J, Bastia D. Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site-specific proteolysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 4692-4696.
- 6 Young R A, Davis R W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc Natl Acad Sci, USA, 1983, 80: 1194-1198.
- 7 Stanley K K, Luño J P. Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins. EMBO J, 1984, 3: 1429-1434.
- 8 Lowenadler B, Nilson B, Abrahmsen L et al. Production of specific antibodies against Protein A Fusion proteins. EMBO J, 1986, 5: 2393-2398.
- 9 Nilsson B, Abrahmsen L, Uhlen M. Immobilization and purification of enzymes with staphylococcal protein A gene fusion vectors. EMBO J, 1985, 4: 1075-1080.
- 10 Donald B. Smith, Kevin S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as Fusion

(下转第 129 页 Continue on page 129)

表1 加速破坏实验数据

Table 1 Initial-uniform breaking velocity test data

恒温时间 Thermostatic time t_i (h)	温度 Temperature T_i (K)	绿原酸含量 C_{i1} Chlorogenic acid content (%)	黄芩甙含量 C_{i2} Baicalin content (%)
1	363	93.93	89.08
2	358	94.61	90.96
3	353	95.03	91.87
4	348	95.30	90.53
5	343	96.55	93.35
6	338	97.89	96.32
7	333	99.12	98.26
8	328	99.66	99.28
9	323	99.76	99.75

3 讨论

金银花和黄芩是银黄微型灌肠剂中的主要药物,绿原酸是金银花中比较明确的有效成分之一,黄芩甙是黄芩中比较明确的有效成分之一,因此本文以绿原酸和黄芩甙的含量变化为指标

待测组分与杂质在本文色谱条件下达到良好的分离效果,所得回归方程满意.表明,应用高效液相色谱法测定银黄微型灌肠剂中主要成分绿原酸和黄芩甙的含量变化是可行的

采用初均速法测定的绿原酸和黄芩甙活化能数据与文献 [4 报道 27.4 Kcal/mol 27.0Kcal /mol相近,表明预测的有效期可作为控制该制剂质量标准的一个参考数据.

参考文献

- 徐凯建,张慧君,吴琳华等.双黄连气雾剂稳定性研究.中国中药杂志, 1992, 17 (3): 157.
- 庞贻慧,鲁纯素.药物稳定性预测方法的简化——初均速法.药学学报, 1982, 17 (3): 207.
- 韩修林,何雁,姚松林.计算机在研究银黄注射液稳定性中的应用.中成药, 1994, 16 (11): 51.
- 吕方军,蓝琪田,罗国安.薄层扫描法预测银黄注射液的稳定性.中草药, 1988, 19 (10): 17.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)

(上接第 12 页 Continue from page 123)

- with glutathione S-transferase. Gene, 1989, 67: 31-40.
- Ounissa Ait-Ahmed, Michèle Thomas-Cavallin, Roland Rosset. Isolation and characterization of a region of the *Drosophila* genome which contains a cluster of differentially expressed maternal gene (yema gene region). Dev Biology, 1987, 122: 153-162.
 - Ounissa AIT-AHMED, Ruth GRIFFIN-SHEA, Christine VOLA et al. Isolation of developmentally regulated genes in *Drosophila melanogaster*. Biology of the Cell, 1988, 62: 57-64.
 - Roland Rosset, Michèle Thomas-Cavallin, Ounissa Ait-Ahmed. Anals Soc ent Fr (N S), 1988, 24 (4): 407-411.
 - Ounissa Ait-Ahmed, Bernard Bellon, Michèle Capri et

al. The yema nuclein- α : a new *Drosophila* DNA binding protein specific for the oocyte nucleus. Mechanisms of Development, 1992, 37: 69-80.

- Christine Joblet, Ounissa Ait-Ahmed. A straightforward and reliable method for the determination of the polarity of transcription units: application to the study of the *Drosophila* yema gene cluster, Methods in Molecular and Cellular Biology, 1990, 2: 44-51.
- Ounissa Ait-Ahmed, Michèle Thomas-Cavallin, Christine Joblet et al. Expression in the central nervous system of a subset of the yema maternally acting genes during *Drosophila* embryogenesis. Postembryonic expression extends to imaginal discs and spermatocytes. Cell Differentiation and Development, 1990, 31: 53-65.

(责任编辑: 蒋汉明 黎贞崇)