

ELP[I]₅₀ 标签在重组硫氧还蛋白分离纯化中的应用及 PEG 对其相变温度的影响

葛高顺 张立超 李军明 胡学军*

(大连大学 医学院 辽宁 大连 116622)

摘 要: 【目的】使用自行设计的类弹性蛋白(Elastin-like protein, ELP) ELP[I]₅₀ 作为非色谱纯化标签, 分离纯化重组硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx), 并研究聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)对 ELP[I]₅₀-Trx 相变温度(Inverse temperature transition, T_i)的影响。【方法】人工合成 Trx 基因, 将其亚克隆到自行构建的表达载体 pET28 编码 ELP[I]₅₀ 标签下游, 转入大肠杆菌 BLR(DE3)进行表达。融合蛋白表达后, 采用可逆相变循环(Inverse transition cycling, ITC)分离纯化, 并检测不同浓度 PEG 时的 T_i 值。【结果】成功表达、分离纯化出融合蛋白 ELP[I]₅₀-Trx, 检测出该蛋白浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, T_i 为 28.6 $^{\circ}\text{C}$; 而当 PEG 的浓度为 5%、10%、15%、20%时, T_i 分别降至 22.3 $^{\circ}\text{C}$ 、15.9 $^{\circ}\text{C}$ 、6 $^{\circ}\text{C}$ 、0 $^{\circ}\text{C}$ 。【结论】ELP[I]₅₀ 标签高效纯化重组蛋白具有操作简便、成本较低、易于扩大的优势, 而 PEG 能降低蛋白的 T_i 值, 进一步增强分离纯化效果, 扩大使用范围, 可望应用于分离纯化多种重组蛋白。

关键词: 类弹性蛋白标签, 硫氧还蛋白, 分离纯化, 聚乙二醇, 相变温度

The application of ELP[I]₅₀ tag for recombinant thioredoxin purification and PEG on the influence of the inverse temperature transition

GE Gao-Shun ZHANG Li-Chao LI Jun-Ming HU Xue-Jun*

(Medical College, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070822); 辽宁省教育厅高校科研计划项目(No. L2010015); 大连大学博士启动基金项目

*通讯作者: Tel: 86-411-87402744; ✉: huxuejun@dlu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-13; 接受日期: 2013-04-09

Abstract: [Objective] To use the self-designed ELP[I]₅₀ as the non-chromatographic purification tag, the recombinant Trx was purified, and the inverse temperature transition (T_i) of ELP[I]₅₀-Trx influenced by PEG was investigated. **[Methods]** The Trx gene was synthesised, and was subcloned into the modified pET28-ELP expression vector, and the expression vector was transformed into BLR(DE3). The fusion protein was expressed and purified via inverse transition cycling (ITC), then the T_i was tested under different concentration of PEG. **[Results]** ELP[I]₅₀-Trx fusion protein was successfully expressed and purified via ITC, T_i was 28.6 °C when ELP[I]₅₀-Trx is 25 µmol/L; the T_i was reduced down to 22.3 °C, 15.9 °C, 6 °C and 0 °C when PEG concentrations is 5%, 10%, 15%, 20% respective. **[Conclusion]** The ELP[I]₅₀ can perform as an efficient recombinant protein purification tag to scale up at low cost and easy to use, and PEG can reduce protein T_i to enhance the purification efficiency for enlarging the range of application. ELP could be applied to a variety of recombinant proteins purification.

Keywords: Elastin-like polypeptide tag, Thioredoxin, Purification, PEG, Inverse temperature transition

目前蛋白质的分离纯化主要根据该蛋白质的大小、溶解度、电荷量和对配体特异亲和力的不同选择最佳的方法,包括离心、盐析、电泳、离子交换层析和亲和层析等^[1],亲和层析(也称亲和色谱)已成为实验室分离纯化重组蛋白的主要方法^[2]。但该技术操作步骤较多,蛋白损失量较大,需要专业的仪器设备和特殊的树脂,成本高^[3]。因此,如何低成本、高效率的分离纯化重组蛋白,已成为制约其大规模生产的瓶颈。

类弹性蛋白(Elastin-like protein, ELP) ELP[I]₅₀ 是一种新型非色谱纯化标签^[4-5],具有可逆相变循环(Inverse transition cycling, ITC)^[6-8]特性,ELP 融合蛋白同样保持这种特性^[3,8]。因此,ELP 能用于重组蛋白的分离纯化,并具有廉价、高效、容易扩大等优点,存在巨大潜在应用价值^[9]。而聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)是一种由环氧乙烷聚合而成的惰性物质,具有维持蛋白构象和保护蛋白活性的作用。用于蛋白分离纯化时,不仅能达到较强的纯化效果,还避免了盐离子很强的腐蚀性。故近年来广泛用于蛋白的分离纯化^[10]。

硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)是一种具有氧化还原活性的耐热蛋白,常用于融合蛋白表达系统,并能使插入基因得到稳定、高效的表达^[11]。本文应用实验室设计的一新型 ELP[I]₅₀ 标签,融合、表达 Trx,得到分离纯化后的融合蛋白 ELP[I]₅₀-Trx,并检测 PEG 对 ELP[I]₅₀-Trx 的 T_i 影响。为利用 ELP[I]₅₀ 作为重组蛋白纯化标签,有效进行蛋白分离纯化提供了重要依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和基因

E. coli JM109 购自 TaKaRa 公司; *E. coli* BLR(DE3)、表达载体 pET28/ELP[I]₅₀ 为本实验室保存提供; Trx 基因委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 主要工具酶和试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、DL2000 DNA Marker, TaKaRa 公司; 1 kb DNA Ladder、PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas 公司; 硫酸卡那霉素(Kan), 生工生物工程(上海)有限公司; 质粒提取和 DNA 凝

胶回收试剂盒, Invitrogen 公司产品。

1.3 Trx 基因的构建及合成

根据 GenBank (Q9X2T1.1) 数据库中 Trx 序列, 在其两端设计融合 *EcoR* I 和 *Hind* III 的酶切位点, 以便于后期克隆和检测。将设计的重组基因序列委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 连接在载体 pUC57 上, 命名为 PUC57/Trx。

1.4 表达载体 pET28/ELP[I]₅₀-Trx 的构建及合成

应用实验室保存的重组表达载体 pET28/ELP[I]₅₀ (即先通过 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切 ELP[I]₅₀ 与表达载体 pET28, 连接、转化、培养后提取的阳性重组质粒) 和合成的质粒 PUC57/Trx, 通过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 将重组表达载体的大片段和合成质粒的小片段切胶回收后连接, 转化至 *E. coli* JM109, 用 LB/Kan (50 mg/L) 平板筛选阳性克隆, 挑单菌落接种后提取重组质粒, 进行酶切检测。委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。检测阳性的重组质粒命名为 pET28/ELP[I]₅₀-Trx。

1.5 ELP[I]₅₀-Trx 的诱导表达

经鉴定阳性的 pET28/ELP[I]₅₀-Trx 电击转化入表达宿主菌 *E. coli* BLR(DE3), 用 LB/Kan (50 mg/L) 平板筛选出阳性单克隆后, 接种于 LB/Kan (50 mg/L) 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1:100 的比例转接于 500 mL 新鲜 LB/Kan (50 mg/L) 液体培养基中, 37 °C 振荡培养约 1 h 至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 °C 诱导约 3 h 后离心收集菌体细胞。用 50 mmol/L PBS (pH 8.0) 重悬后进行冰浴超声破碎, 取样进行 SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

1.6 ELP[I]₅₀-Trx 的分离纯化

进行 ITC 纯化: 即分装破碎菌液, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清; 加入 DNase

(DNA 酶) 至终浓度为 50 mg/L, 冰浴 20 min, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清入新管; 向上清液中添加 NaCl 至终浓度为 2 mol/L, 36 °C 水浴 20 min 后, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加入 20 mL 预冷的 PBS 重悬沉淀, 冰浴 20 min 后, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清入新管, 此过程为一轮 ITC。重复第 3 次时用 5 mL 预冷的 PBS 重悬沉淀, 得到 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测。

1.7 ELP[I]₅₀-Trx 的蛋白定量与相变温度测定

用干燥称量法定量 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液: 即先将 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液取 1 mL 加入 1.5 mL 离心管(高压并 60 °C 干燥至重量不变为止)中。60 °C 干燥 12 h, 称重(至重量不变为止), 计算出样品净重。用 PBS 将 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液稀释成浓度为 25 μ mol/L, 按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 以 1 °C 为梯度用酶标仪(Multiskan GO)测定从 0 °C 到 40 °C 纯蛋白液在 350 nm 处的吸光度值, 升温速率为 1 °C/5 min。T_i 为 OD_{350} 是最大吸光值一半时的温度^[3]。

1.8 PEG8000 对 ELP[I]₅₀-Trx 相变温度影响的测定

配制 PEG8000 至终体积分数为 5%、10%、15%、20%, 用 PBS 将 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液稀释至终浓度为 25 μ mol/L。按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 以 1 °C 为梯度用酶标仪测定从 0 °C–40 °C 蛋白溶液在 350 nm 处的吸光度值。得到不同浓度的 PEG8000 对终浓度为 25 μ mol/L 的 ELP[I]₅₀-Trx 相变温度的影响。

2 结果

2.1 pET28/ELP[I]₅₀-Trx 双酶切鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pET28/ELP[I]₅₀-Trx。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 表明在约 423 bp 处都可见目的条带

(图 1)。测序结果也与 GenBank (Q9X2T1.1)数据库中 Trx 序列完全一致,说明构建合成的目的基因 Trx 成功正确插入到 pET28/ELP[I]₅₀ 的表达载体上。

2.2 ELP[I]₅₀-Trx 的表达与纯化

将含重组质粒 pET28/ELP[I]₅₀-Trx 的 BLR(DE3)菌株经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳检测结果(图 2), 显示携带重组质粒 pET28/ELP[I]₅₀-Trx 的表达菌株在分子量为 43 kD 处产生一条特异蛋白条带, 而对照未诱导菌株中无此相应蛋白条带, 说明目的蛋白获得了成功表达。超声破碎后, 通过三轮 ITC 纯化的纯蛋白液进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 2)和 Western blot 检测(图 3)。

2.3 ELP[I]₅₀-Trx 的蛋白定量和相变温度的测定

干燥称量法定量 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液浓度。用 PBS 将 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白液稀释成 25 μmol/L 浓度, 按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 以 1 °C 为梯度用酶标仪测定从 0 °C-40 °C 蛋白溶液在

350 nm 处的吸光度值, 升温速率为 1 °C/5 min。当某个温度下 OD₃₅₀ 是最大吸光度的差值的一半时, 该温度为 T_i。实验结果表明 ELP[I]₅₀-Trx 的

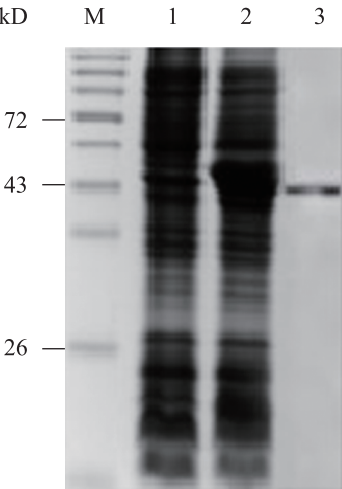


图 2 SDS-PAGE 电泳检测 ELP[I]₅₀-Trx 的表达与纯化
Fig. 2 Expression and purification of the ELP[I]₅₀-Trx by SDS-PAGE
注: M: Prestained protein marker; 1: 诱导前总蛋白; 2: 诱导后总蛋白; 3: 经三轮 ITC 得到的 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白。
Note: M: Prestained protein marker; 1: Total proteins before induction; 2: Total proteins after induction; 3: The purified ELP[I]₅₀-Trx after three rounds ITC.

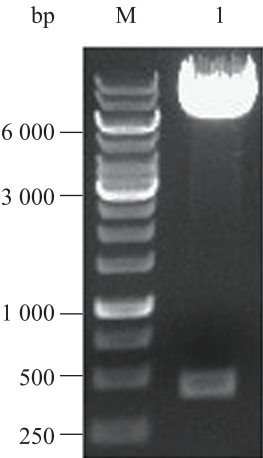


图 1 EcoR I /Hind III 双酶切鉴定 pET28/ELP[I]₅₀-Trx
Fig. 1 EcoR I /Hind III double digestion verify pET28/ELP[I]₅₀-Trx
注: M: 1 kb DNA marker; 1: EcoR I /Hind III 双酶切 pET28/ELP[I]₅₀-Trx。
Note: M: 1 kb DNA marker; 1: EcoR I /Hind III double digestion pET28/ELP[I]₅₀-Trx.

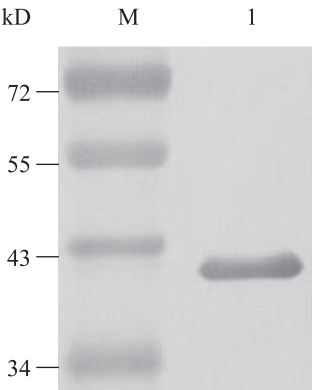


图 3 Western blot 电泳检测 ELP[I]₅₀-Trx 的表达与纯化
Fig. 3 Expression and purification of the ELP[I]₅₀-Trx by Western blot
注: M: Prestained protein marker; 1: 经三轮 ITC 得到的 ELP[I]₅₀-Trx 纯蛋白。
Note: M: Prestained protein marker; 1: The purified ELP[I]₅₀-Trx after three rounds ITC.

T_i 为 28.6 °C (图 4)。

2.4 PEG8000 对 ELP[I]50-Trx 相变温度影响的测定

图 5 所示 PEG8000 浓度为 5%、10%、15%、20% 时, 使终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 ELP[I]₅₀-Trx 其 T_i 由 28.6 °C 依次降为 22.3 °C、15.9 °C、6 °C、0 °C。

3 讨论

ELP 五肽重复序列单元(VPGXG)中客座氨基

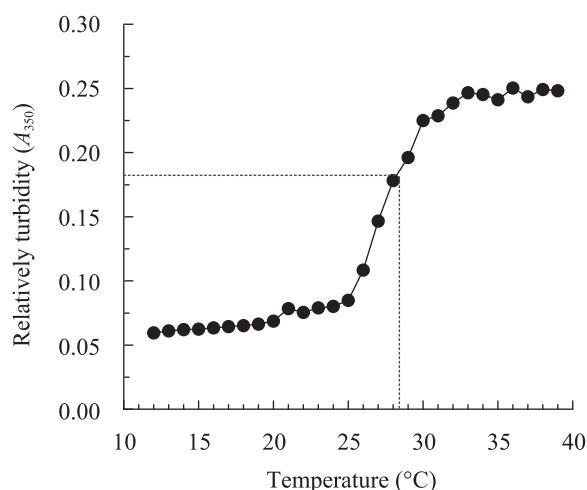


图 4 含 25 $\mu\text{mol/L}$ ELP[I]50-Trx 的 PBS 溶液浑浊度和温度的关系

Fig. 4 Turbidity profiles for 25 $\mu\text{mol/L}$ ELP[I]50-Trx concentration in PBS

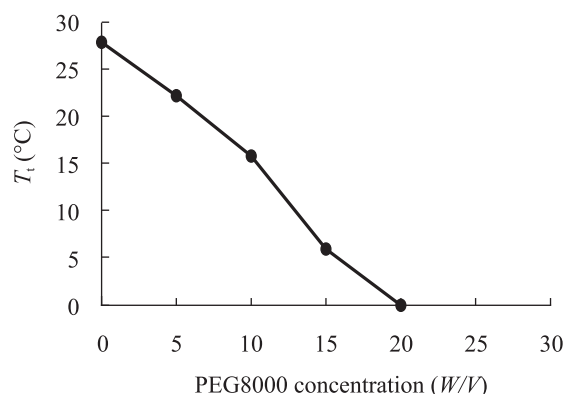


图 5 不同浓度的 PEG8000 对 ELP[I]50-Trx 相变温度的影响

Fig. 5 The influence of the T_i under different concentrations of PEG8000

酸 X 残基疏水性越强, T_i 越低^[12], 本文使用实验室自行设计的疏水性较强的 Ile(I)为 X 残基的 ELP[I]; 并依据目的蛋白大小, 选择由 50 个五肽重复序列单元(VPGIG)组成的 ELP[I]₅₀ 作为纯化标签。基于 ELP 标签的 ITC 分离纯化技术与亲和色谱相比具有操作简便快捷、蛋白损失少、成本低, 易扩大等优点。而 T_i 较高时, 妨碍了蛋白的有效分离纯化, 现阶段通过添加盐离子降低 T_i 是最常用的方法。但在进行扩大生产时高浓度盐离子会腐蚀设备^[13], 而 PEG 不仅能达到硫酸铵较强的沉淀效果, 降低了融合蛋白的 T_i , 促进蛋白的有效分离纯化, 扩大使用范围, 还避免了盐离子的腐蚀, 对 ELP 及其融合蛋白分离纯化具有重要意义。

本研究应用 ELP[I]₅₀ 作为非色谱纯化标签, 分离纯化融合蛋白 ELP[I]₅₀-Trx, 并检测了不同浓度的 PEG8000 对 ELP[I]50-Trx 的 T_i 的影响, 证明 PEG8000 明显降低了 T_i 。这为低成本、高效率的分离纯化重组蛋白提供了切实可行的方法。

参考文献

- [1] 王子佳, 李红梅, 弓爱君, 等. 蛋白质分离纯化方法研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(8): 8-11.
- [2] Nilsson J, Stahl S, Lundeberg J, et al. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins[J]. Protein Expression and Purification, 1997, 11(1): 1-16.
- [3] Lim DW, Trabbic-Carlson K, Mackay JA, et al. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(5): 1417-1427.
- [4] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags[J]. Nature Methods, 2005, 2(9): 659-662.
- [5] Shi C, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split

- intein system for non-chromatographic recombinant protein purification[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 829–835.
- [6] Urry DW. Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1992, 57(1): 23–57.
- [7] Urry DW. Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics[J]. Journal of Protein Chemistry, 1988, 7(1): 1–34.
- [8] Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(11): 1112–1115.
- [9] Meyer DE, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A. Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin[J]. Biotechnology Progress, 2001, 17(4): 720–728.
- [10] Coelho DF, Silveira E, Pessoa Junior A, et al. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate)[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(2): 185–192.
- [11] 刘飞, 刘崑, 金伯泉, 等. 抗细菌硫氧化还原蛋白 Thioredoxin 单克隆抗体的制备鉴定及初步应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(3): 221–224.
- [12] Urry DW, Luan CH, Parker TM, et al. Temperature of polypeptide inverse temperature transition depends on mean residue hydrophobicity[J]. Journal of the American Chemical Society, 1991, 113(11): 4346–4348.
- [13] 黄凯宗, 李晶晶, 李巍, 等. 类弹性蛋白多肽的从头设计, 非色谱纯化及盐效应[J]. 生物工程学报, 2011, 27(4): 653–658.

科技信息摘录

研究发现植物可通过地下真菌互相交流

据外国媒体 5 月 14 日报道, 英国一项新研究发现, 植物能通过地下真菌网络发出预警信号, 警告昆虫即将来袭。

这项研究由英国阿伯丁大学、詹姆斯·赫顿研究所和洛桑研究所研究人员共同完成。研究发现, 植物可通过真菌向与其网络相联的其他植物传递蚜虫入侵的警告信号, 接收到信号的植物可发出化学信号, 抵制蚜虫并且吸引蚜虫的天敌黄蜂。

此前的研究发现, 植物能通过空气来传达类似的警告信息。新研究称, 植物通过一种名叫“菌根”的真菌相互联系。“菌根真菌从植物那里获取‘光合作用的产物’, 它们也必须为植物做点什么。”洛桑研究所的约翰·皮克特对英国广播公司(BBC)说。

“我们过去认为菌根从根系和土壤中吸收营养, 但现在我们看到了它们的另一个进化功能, 即通过有效传递信号回报植物。”

阿伯丁大学的大卫·约翰逊补充道: “以往我们对生态系统的认识中并没有考虑植物可通过这种方式互相联系。这对我们理解生物之间如何相互影响有着重大的启示意义。”

与此相反, 未与真菌网络相连的植物在遭受攻击后没有发出警告信号。在研究过程中, 这些植物还被套上了袋子, 以确保它们不会通过空气传递信号。

皮克特称, 这个发现非常有益, 如农场可以用真菌作为农作物的预警系统。理论上, 可以在农作物附近种植一株植物“舍身取义”, 它一旦受到昆虫攻击, 就会迅速通过真菌网络警告其他农作物, 让它们有时间组织防御。

——摘自《科学网》2013/5/21

<http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2013/5/277907.shtml>

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>