

在大肠杆菌中高效表达重组 Protein A

蔡仕英¹ 刘亚霞¹ 强伯勤² 姚志建¹

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)¹

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)²

本文构建了高效表达质粒pPA-3, 其在大肠杆菌中表达的重组Protein A仅含天然Protein A的免疫球蛋白Fc段结合区, 表达量达菌体可溶蛋白的20%。SDS-PAGE及Western-blot结果显示, 重组Protein A的分子量有4种, 即33、32.2、29.5和28.6kDa, 其中33kDa与理论计算结果一致, 推测其它分子量可能是由于胞内蛋白酶降解所致。一步亲和层析即可将重组Protein A从细胞裂解上清液中纯化出来。火箭电泳及酶联免疫分析结果表明, 等蛋白量的该重组Protein A比天然Protein A能结合更多的免疫球蛋白。

关键词 重组Protein A; 高效表达; 大肠杆菌; 蛋白降解

金黄色葡萄球菌A蛋白(简称Protein A)是金黄色葡萄球菌膜表面的一种蛋白质^[1]。由于它能特异地与许多动物的免疫球蛋白Fc段结合, 因此受到人们的重视并被广泛地应用于免疫学及分子生物学等方面^[2-4]。但是天然Protein A是从致病性的金黄色葡萄球菌中提取的, 且来源及产量有限, 所以将Protein A基因克隆到大肠杆菌中表达是十分必要的。

天然Protein A分子按功能可分为3个部分, 第一部分为信号肽, 含36个氨基酸, 在蛋白质分泌中起作用; 第二部分为免疫球蛋白Fc段结合区, 共含291个氨基酸, 按顺序分E、D、A、B、C 5个结构域, 每个结构域都能与Fc段特异结合; 第三部分为胞壁结合区, 含182个氨基酸, 与金黄色葡萄球菌胞壁的肽聚糖共价结合^[5]。作为生物制剂的Protein A, 是由其分子中第二部分的作用决定的, 信号肽部分在蛋白的分泌过程中被剪切掉, 而约占分子的2/5大小的第三部分则与其在免疫学等方面的应用无关, 应该利用重组技术切除掉, 从而避免由此引起的一些非特异性结合, 保证重组Protein A能更特

异、有效地与Fc段结合。我们已从金黄色葡萄球菌Cowan 1株(CMCC26111)中克隆出Protein A基因片段, 并对其进行了序列分析^[6], 现在又在大肠杆菌中高效表达了重组Protein A。

材料与 方法

(一) 菌种与质粒

大肠杆菌(*E. coli* K12)DH5 α , JM103和RR1等菌株用作宿主菌。含Protein A基因片段的质粒pPA-1为本室构建^[6]。表达载体pBV220由中国预防医学科学院病毒学研究所张智清、侯云德教授赠送^[7]。

(二) DNA的制备

质粒DNA用碱变性裂解法抽提^[8]。DNA酶切片段用低熔点琼脂糖电泳回收。质粒转化按文献[8]进行。限制酶及T4 DNA连接酶均购自Boehringer Mannheim公司。

(三) 重组Protein A的检测

本文于1991年2月7日收到。

工作中得到王园园同志的支持和帮助, 特此致谢。

原位酶联筛选表达重组Protein A的阳性克隆,即将硝酸纤维膜直接贴到过夜生长菌落的琼脂培养基上,在适当的温度下继续培养1h后取下膜,吹干、用氯仿破菌、0.5%脱脂奶粉封闭,然后加入辣根过氧化物酶标记的人IgG,37℃孵育2h或4℃过夜,用1-氯萘酚作底物显色。用酶联免疫分析(简称ELISA)及火箭电泳测定重组Protein A量。

(四) SDS-PAGE及Western blotting

用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称SDS-PAGE)鉴定分析蛋白质的组成及纯度。用考马斯亮蓝染色,薄层扫描确定各条带的含量。

Western blotting: SDS-PAGE后,将需转印的样品胶切下,用低电压高电流将蛋白质从胶中转印到硝酸纤维膜上,0.5%脱脂奶粉封闭,酶标染色。

(五) 重组Protein A的制备

重组Protein A阳性菌株于LB培养基中30℃培养过夜,次日扩大培养至 $OD_{600nm} = 0.5$ 左右升温至42℃进行热诱导,然后收集菌体,超声破碎,离心取上清液,上清液直接用连接有人IgG的Sepharese 4B柱进行亲和层析,即可得重组Protein A。

结 果 与 讨 论

(一) 高效表达质粒pPA-3的构建

外源基因在大肠杆菌中的表达受许多因素的影响,其中首要的两个因素是基因的转录与翻译。天然Protein A是金黄色葡萄球菌表达的一种蛋白质,它带有能被大肠杆菌识别的启动子区、核糖体结合位点及翻译起始密码^[6,8],这些为Protein A的表达提供了有利条件。但是Protein A

基因自身的启动子强度有限,限制了Protein A在大肠杆菌中的表达量。为了实现Protein A在大肠杆菌中的高效表达,我们首先着手提高Protein A基因的转录水平。于是用限制酶EcoRI、TaqI将带自身启动子、核糖体结合位点及编码信号肽和5个IgG Fc段结合区结构域的Protein A基因片段(1.6kb)从pPA-1质粒^[8]中分离出来,定向重组到含cIts857基因及rrnBT₁T₂转录终止子的pBV220质粒的P_RP_L双启动子下游,构成一个由多启动子串联转录表达重组Protein A的质粒pPA-3(如图1)。转化大肠杆菌后,用原位酶联筛选出阳性克隆。酶切鉴定结果表明阳性克隆中重组Protein A基因片段的插入位置及方向均与设计一致。

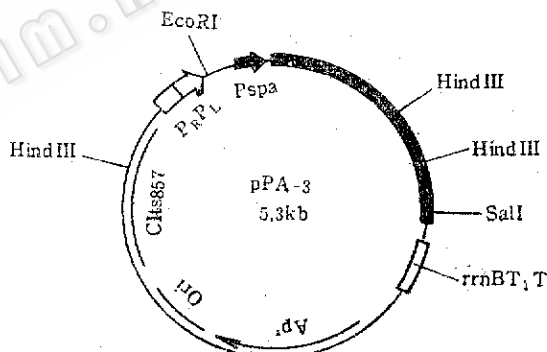


图1 高效表达质粒pPA-3的结构

Fig.1 Structure of high expression plasmid pPA-3.

黑色粗线为重组Protein A基因片段

The broad segment represents the recombinant protein A gene fragment

(二) 重组Protein A 在大肠杆菌中的表达

我们已对Protein A基因的结构进行了序列分析^[8],由此可推测出pPA-3质粒在大肠杆菌中表达的重组Protein A的氨基酸顺序(如图2)共含329个氨基酸;当由36个氨基酸组成的信号肽被剪切后,其分子量应为32.9kDa。SDS-PAGE及

Western blotting结果显示pPA-3质粒在DH5 α 受体菌中,经热诱导后所表达的重组Protein A约占菌体可溶蛋白的20%,其分子量有4种,其中主要的两种是33kDa和29.5kDa(如图3)。33kDa与理论推测的去信号肽的重组Protein A的分子量(32.9kDa)是一致的,而其它3种分子量均

```

      S      -30      -1-E      20
      MGGNNYSIR/LGWGIASVTLGTLIGGVTPAANAACGHEAQQNAFYQVLMNPNLADQR
      40      100      140      180
      NGPTQKDDPSQSANVLGEAGLNDSPAPRADAQQNFKNDQQAFAFYEILNMFNLNDQR
      NGPTQLKDDPSQSANVLGEAGLNDSPAPRADAQQNFKNDQQAFAFYEILNMFNLNDQR
      160      200      240      280
      QSLKQDPQSANLLAEAKGLNSQAFPIADNFKNKQQAFAFYEILHLPNLNEEQNGFQSLK
      LDPSQSANLLAEAKGLNSQAFPIADNFKNKQQAFAFYEILHLPNLNEEQNGFQSLK
      260      300
      PQTGGGRHRRVVDLQSFCEGG
      the possible protease cleavage site
  
```

图2 重组Protein A的氨基酸序列

Fig.2 Amino acid sequence of recombinant protein A

S、E、D、A、B、C分别标明了信号肽及5个Fc结合区结构的起始位置,箭头所指为一个可能的蛋白酶切位点

The starting residues of regions S,E,D,A,B and C are indicated. A possible protease cleavage site is proposed and indicated by arrow

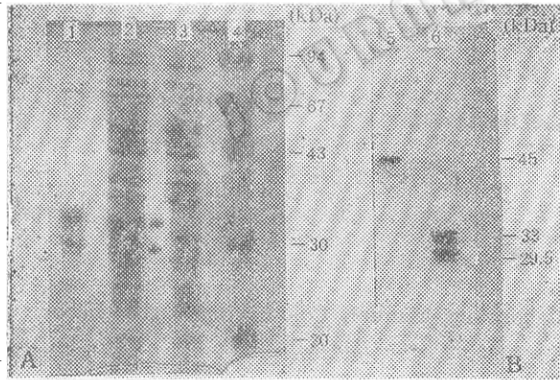


图3 重组Protein A的SDS-PAGE(A)和 Western blotting(B)的结果

Fig.3 SDS-PAGE of recombinant Protein A (A) and Western-blotting of Protein A (B)

1. Recombinant Protein A purified by IgG-Sepharose 4B affinity from DH5 α strain 2. Lysis supernatant of DH5 α (pPA-3); 3. Lysis supernatant of DH5 α (pBV220)(control); 4. Molecular weight standards; 5. Native protein A; 6. Recombinant Protein A expressed by pH5 α

较33kDa小,推测可能是由于重组Protein A在菌体内被蛋白酶降解的缘故。为了观察重组Protein A的这种降解现象是否有一定规律性,我们又将pPA-3质粒分别转至JM103和RR1等受体菌中诱导表达,结果(如图4)显示不同受体菌中分子量为33kDa的重组Protein A的比例不等。如诱导表达3h时, DH5 α 及JM103所表达的重组Protein A分别有50%和30%的分子其分子量为33kDa,而RR1表达的重组Protein A 90%的分子量小于30kDa;而且随着诱导表达时间的延长, 33kDa以下的重组Protein A分子的比例提高。这表明重组Protein A的多分子量形式是由于菌体内蛋白酶降解所致,同时还说明外源基因产物在蛋白酶较少的DH5 α 受体菌中比在蛋白酶较多的RR1受体菌中稳定。Hel-lebust等也报道过重组Protein A在大肠杆菌中的降解问题,认为其重组Protein A的C末端有一外膜蛋白酶 OmpT 的剪切识别位点,所以致使重组Protein A被限制性降解,当这一位点被取消后,则降解现象消失^[9]。根据被降解的重组Protein A的分子量大小推算, 29.5kDa的重组Protein A分子可能是被蛋白酶在33kDa分子的C末端从图2中箭头所指(即Asp-Gly)及其附近的位置剪切所致。但遗憾的是在大肠杆菌中尚未发现识别这一位点的蛋白酶。

(三) 重组Protein A 与人IgG 结合能力的评价

用偶联有人IgG的Sepharose 4B柱直接将诱导表达的重组Protein A细胞裂解上清进行一步亲和层析,即可得重组Protein A纯品(如图3中1)。取等质量的重组Protein A纯品和天然Protein A纯品(购自Serva公司)稀释到相同倍数包被到酶联板上,用辣根过氧化物酶标记的人

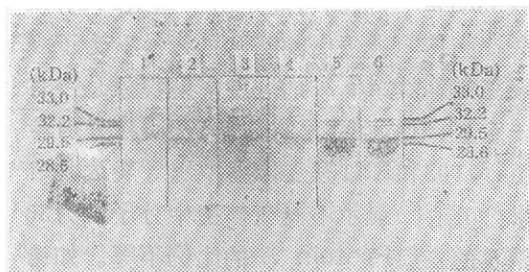


图 4 不同受体菌表达的重组Protein A的 Western blotting结果。

Fig.4 Western blotting of recombinant Protein A in different hosts

The molecular weights of recombinant protein A are indicated. Lane 1—6, recombinant protein A expressed in DH5 α , JM103 or RR1 strains at 3h or 6h respectively

IgG进行ELISA检测,结果显示重组Protein A比天然 Protein A 具有更强的与人IgG结合的能力(如图5)。同时火箭电泳结果也证实了这一结论(结果未显示)。可见等蛋白量的重组 Protein A 比天然 Protein A能结合更多的IgG。这是由于重组Protein A含有天然Protein A 的 5 个IgG Fc结合区结构域,而删除了其分子

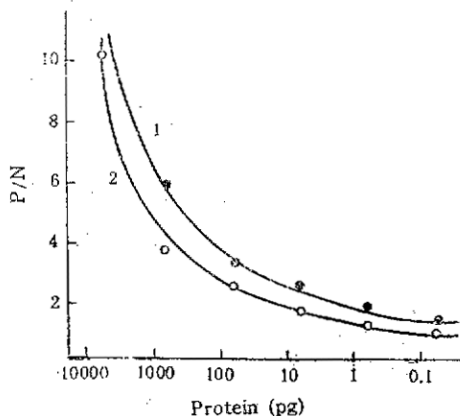


图 5 重组Protein A及天然Protein A与人IgG结合的P/N值。

Fig.5 P/N rate of Protein A binding to human IgG by ELISA

1. Recombinant Protein A;
2. Native Protein A.

中的胞壁结合区,从而在蛋白量相等的条件下,重组 Protein A 的分子数比天然 Protein A 的分子数多,故表现出比天然 Protein A能结合更多的IgG。

参 考 文 献

- [1] Forsgren A. and Sjoquist J.: *J. Immunol.*, 97:822,1966.
- [2] Langoue I. J.: *J. Immunol. Meth.*, 51:3,1982.
- [3] Bansal S. C., et al.: *Cancer*, 42:1,1978.
- [4] Nilsson B., et al.: *EMBO J.*, 4:1075,1985.
- [5] Uhlen M., et al.: *J. Biol. Chem.*, 259:1695,1984.
- [6] 蔡仕英等: 生物化学杂志, 待发表。
- [7] 张智清等: 病毒学报, 6:111,1990.
- [8] Maniatis T., et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 85—205,1982.
- [9] Hellebust H. et al.: *J. Biotech.*, 12:275,1989.

High Level Expression of Recombinant Protein A in *Escherichia coli*

Cai Shiying¹ Liu Yaxia¹ Qiang Boqin² Yao Zhijian¹

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)¹

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)²

A high expression plasmid pPA-3 was constructed, which yielded up to 20% of soluble cell proteins as recombinant protein A in *E. coli* DH5 α strain by heat shock induction. The recombinant protein A only contained the five IgG Fc part binding domains of native protein A. The molecular weight of recombinant protein A expressed in *E. coli* was determined to be 33, 32.2, 29.5 and 28.6 kDa by SDS-PAGE and Western blotting. The diversity of molecular weight may be due to proteolysis, and a possible cleavage site is proposed. Some of the protein was purified with solid human IgG by one-step affinity chromatography. The reactivity of the protein was compared with native protein A. The results shown that the protein could bind more IgG than native Protein A in equal quantities of proteins.

Key words

Recombinant Protein A; high level expression; *E. coli*; proteolysis