

# 表达产物可用 IMAC 快速纯化的原核表达载体的组建与应用

李福胜 贡惠宇 李玉富 张智清 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所 病毒基因工程国家重点实验室 100052)

**摘 要** 以原核高效表达载体 pBV220 为骨架载体, 采用互补寡核苷酸插入法在 pBV220 多克隆位点的上游插入了起始密码子和 6 组氨酸编码序列, 将此新质粒命名为 pBV222, 以此载体表达的目的蛋白在 N-段带有 His<sub>6</sub> 尾以利于 IMAC 层析快速纯化目的蛋白, 酶切及核苷酸序列分析验证了我们的设计。将 IL-2 和 GM-CSF cDNA 克隆入 pBV222 载体中, 表达的目的蛋白与预期的分子量相同, 表达产物以包涵体的形式存在, 表达量比非融合蛋白有明显的提高, 且这种融合蛋白保留 GM-CSF 的生物学活性。表达菌体直接用 6mol/L 盐酸胍裂解或首先分离包涵体之后盐酸胍裂解, 上清直接 IMAC 层析, 以阶段性或线性 pH 梯度洗脱特异的目的蛋白, SDS-PAGE 分析蛋白纯度在 90% 以上。

**关键词** IMAC, GM-CSF, IL-2, 融合蛋白, 纯化标签

纯化标签(Fusion complement, purification tag, affinity handy)的运用是近些年发展起来的新的基因表达策略<sup>[1]</sup>, 它的运用极大地方便了对目的蛋白的纯化。纯化标签是指利用基因工程的方法技术, 对目的蛋白定点诱变引入特定的氨基酸或在其两端融合某种蛋白多肽, 之后以特异的固定化配体对目的蛋白快速纯化。目前常用的纯化标签有金葡菌 A 蛋白(SPA)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、多聚组氨酸序列(poly His)及  $\beta$ -半乳糖苷酶等<sup>[2,3]</sup>, 其中基于组氨酸与金属离子特异结合性的金属螯合层析具有特殊的诱人之处, 1975 年即发现蛋白质的组氨酸残基具有与金属离子结合的能力, 利用这种原理的层析称为固定化金属亲和层析(Immobilized metal affinity chromatography, IMAC)<sup>[4]</sup>。多聚组氨酸与 SPA 等分子量大的蛋白质纯化标签相比更具优点, 分子量小, 对目的蛋白的结构与功能影响小, 配体价廉易得。近年来随着基因工程技术的飞速进展重新引起人们的兴趣, 并将之应用于亲和层析。本文以 pBV220 质粒为基础载体, 在多克隆位点前面引入 6 聚组氨酸, 构建成功了 pBV222 表达载体, 并表达纯化了 IL-2 及 GM-CSF 融合蛋白, 为 GM-CSF 及其它基因的表达与纯化探索新的表达途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、JM109 及 pGEM3zf(+)均由本室提供, 原核高效表达质粒 pBV220 由本室张智清教授组建<sup>[5]</sup>。

本研究项目由国家“863”高科技计划资助。

本文于 1995 年 6 月 8 日收到。

## 1.2 酶与主要试剂

限制酶购自华美生物技术公司及友谊生物技术公司, T4DNA 连接酶购自美国 Promega 公司, Chelating Sepharose 4B FF 购自瑞典 Pharmacia LKB 公司。其它均为市售分析纯。

## 1.3 寡核苷酸的人工合成与纯化

在美国 ABI 公司 381A 型 DNA 合成仪上合成, 脱保护后溶于 TE Buffer, 在 Pharmacia 公司的 FPLC Mono Q 交换柱纯化。

## 1.4 互补寡核苷酸插入法<sup>[6]</sup>

将浓度  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的互补 Oligo 以等摩尔浓度混合后,  $100^{\circ}\text{C}$  加热 3min, 室温放置 10min 以上复性, 适当稀释后再用 T4DNA 多聚核苷酸激酶对 Oligo 磷酸化, 反应条件:  $50\text{mmol/L}$  Tris-HCl,  $\text{pH}7.6$ ,  $10\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1\text{mmol/L}$  ATP,  $1\text{mmol/L}$  DTT,  $37^{\circ}\text{C}$ , 30min, 载体酶切后低熔点琼脂糖法纯化, 将复性的互补 Oligo 与载体以 3:1 的比例混合, 连接转化, 筛选正确的克隆。

## 1.5 目的蛋白的表达

$30^{\circ}\text{C}$  过夜摇菌, 次日 1:50 转入 LB 中摇至  $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.7$ , 升温至  $42^{\circ}\text{C}$  表达 4~6h, 收集细菌, 加入 5~10 倍体积的裂解缓冲液中 ( $6\text{mmol/L}$  盐酸胍,  $20\text{mmol/L}$  LPBS,  $\text{pH}8.0$ ),  $4^{\circ}\text{C}$  过夜,  $17000\text{r/min}$  离心 15min, 上清直接 IMAC 层析纯化。或收集菌体后超声破碎, 以裂解缓冲液裂解包涵体。

## 1.6 IMAC

IMAC 层析柱的准备:  $10\text{ml}$  Chelating sepharose 4B FF 预处理后装柱, 分别用 5 倍体积的  $0.2\text{mol/L}$  NaOH, 超纯水洗柱, 5 倍体积的  $0.2\text{mol/L}$   $\text{NiSO}_4$  缓慢通过柱子, 以 5 倍以上体积的裂解细菌缓冲液平衡。层析方法 I: 细菌裂解上清液直接上柱,  $6\text{mol/L}$  盐酸胍,  $20\text{mmol/L}$  PBS,  $\text{pH}5.7$  缓冲液洗脱液脱杂蛋白,  $6\text{mol/L}$  盐酸胍,  $20\text{mmol/L}$  PBS,  $\text{pH}4.8$  缓冲液洗脱目的蛋白, 洗脱的蛋白过夜透析后 SDS-PAGE 分析; 方法 II: 包涵体裂解上清液上柱。继以  $6\text{mol/L}$  盐酸胍,  $20\text{mmol/L}$  PBS,  $\text{pH}8.0 \sim 4.0$  的线性梯度洗脱蛋白<sup>[7]</sup>。

## 1.7 SDS-PAGE

按常规方法进行。

## 1.8 核苷酸序列测定

采用 Sanger 的链末端终止法和双链测序系统, 用荧光染料标记法在 ABI 公司自动测序仪上测定克隆片段的核苷酸序列。

## 1.9 生物学活性测定

以 MTT 法在 TF-1 细胞上测定 GM-CSF 的生物学活性<sup>[8]</sup>。

# 2 结 果

## 2.1 pBV222 载体的组建与鉴定

设计的基本策略是将人工合成的一对互补寡核苷酸插入到 pBV220 的 EcoRI 与 BamHI 之间, 封闭原有的 EcoRI 酶切位点, 加入起始密码子 ATG 及 6 组氨酸编码序列。

后移 EcoRI 位点,并增加 XhoI 酶切位点以利于新质粒的鉴定。合成的寡核苷酸序列分别为:

(1)5' AATTAAATGCATCATCACCATCATCACGAATCTCTGAG 3'

(2)5' GATCCTCGAGAATTCGTGATGATGGTGATGATGCATTT 3'

在密码子和碱基的选择上考虑到以下的因素:优化 SD 序列周围序列,选择适当的密码子以减小 mRNA5'端二级结构的可能性,有可能增加目的蛋白的表达量。质粒多克隆位点的序列见图 1。

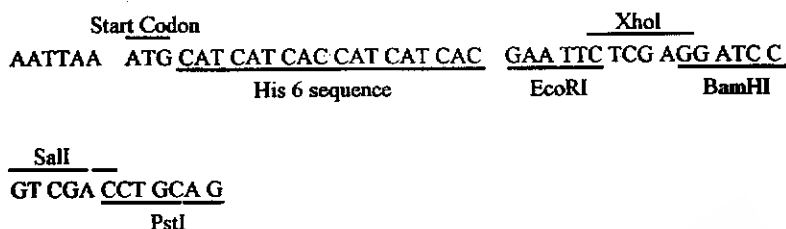


图 1 质粒 pBV222 的编码起始区及多克隆位点

Fig.1 The sequence in translation starting region and the polylinker sites in pBV222 vector

酶切鉴定证实引入了新的 XhoI 酶切位点,并且重新恢复了 EcoRI 和 BamHI 位点(图 2),多克隆位点位于 His6 编码区的后面,大多数基因可按正确的读码框架粘端插入表达融合蛋白,此外,EcoRI, XhoI 及 BamHI 补平后可产生三种不同的读码框架,便于不同读码框架基因的融合表达。核苷酸序列测定也证实了我们的设计。

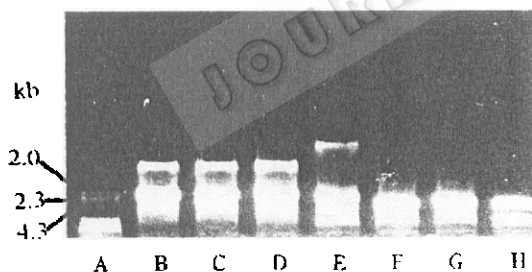


图 2 质粒 pBV222 的内切酶分析

Fig.2 Restriction map of pBV222 vector

A:λDNA HindIII marker, B:BglII + EcoRI

C:BglII + BamHI,

d:BglII + XhoI

E:HindIII,

F:Sall

G:PstI,

H:BglII

## 2.2 GM-CSF 与 IL-2 cDNA 在 pBV222 中的表达与纯化

EcoRI, BamHI 双酶切 pBV220/GM-CSF 和 pBV220/IL-2 质粒,低熔点琼脂糖法回收小片段,分别插入到 pBV222 质粒的相应酶切位点间,插入的基因读码框架是正确的,并且在 His6 与 GM-CSF 间多出了 3 个氨基酸,两个由 EcoRI 酶切点编码,另一个为甲硫氨酸。常规筛选阳性克隆,转化大肠杆菌 DH5α 菌株,表达后 SDS-PAGE 分析有明显的预计大小分子量的表达蛋白带,表达量明显高于在 pBV220 中的表达,占菌体总蛋白的 30% 左右(在 pBV220 表达量

为 15%)。表达的 His6-GM-CSF 及 His6-IL-2 蛋白以包涵体的形式存在,首先我们采用了 6mol/L 盐酸胍裂解菌体,阶段性 pH 梯度洗脱 His6-IL2 蛋白的策略,pH4.8 的蛋白峰 SDS-PAGE 分析 His6-IL2 蛋白的纯度仅有 60%~70%,原因可能与洗脱条件未理想化有

关,柱床体积,洗脱流速,温度及洗脱方式都会影响层析行为,继之我们采用分离包涵体,线性 pH 梯度的纯化策略,获得了纯度很高的 His6-GMCSF 融合蛋白(图 3,图 4)。

TF-1 依赖细胞株活性检测表明,GM-CSF-His6 蛋白仍保留天然蛋白的生物学活性,GM-CSF 活性达  $3.5 \times 10^8$  u/L,根据表达量推测,融合蛋白具有天然分子完全的生物学活性。

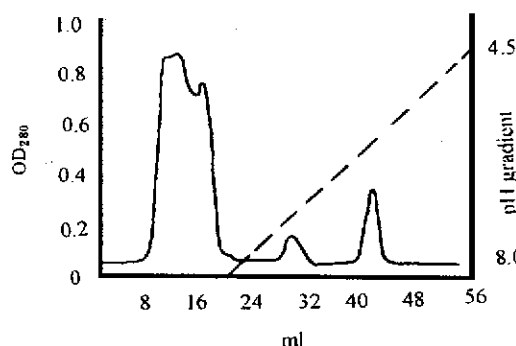


图 3 His6-GM-CSF 蛋白 IMAC 层析图

Fig.3 Chromatography of His6-GM-CSF IMAC

Column: Chelating Sepharose 4B FF 8mm  $\times$  30mm

Flow rate: 1ml/min

Buffer A: 6mol/L Gu. HCl, 20mmol/L PBS, pH8.0

Buffer B: 6mol/L Gu. HCl, 20mmol/L PBS, pH4.5

Gradient: 100% A to 100% B in 30min.

Peak I: Flow through

Peak II: Bacteria protein

Peak III: His6-GM-CSF

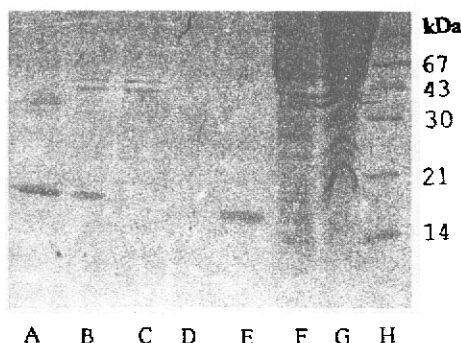


图 4 IMAC 层析的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE Analysis of IMAC result

A: After purification of His6-IL2

B: Inclusion body of His6-IL2

C: Flow-through of His6-IL2

D: Peak I of His6-GM-CSF

E: After purification of His6-GM-CSF

F: Flow-through of His6-GM-CSF

G: Inclusion body of His6-GM-CSF

H: Protein marker

### 3 讨 论

生物药物下游加工的困难是造成这类药物价格昂贵的主要原因,往往占药物开发总成本的 80% 以上。因此,采用基因工程技术简化下游加工的步骤,具有重大的实用和经济效益。pBV220 载体是我室自行组建的一个原核高效表达载体,它具有质粒小、表达量高的特点,从问世以来在国内获得了广泛的应用,据统计在大肠杆菌中表达有重大经济价值的细胞因子时,国内 80% 以上采用的是这个质粒。因此,我们的思路是在这个载体的基础上,采用纯化标签技术,组建一个新型的、适用性强的高效表达载体。

如前所述,有多种多样的纯化标签可以选择,其中多聚组氨酸具有显著的优点,因为 IMAC 层析稳定,价格低廉,结合蛋白容量大(10~50mg/ml 蛋白质),既适合于分析性的,也适合于蛋白质的大规模分析纯化。在基因工程技术上也是容易实现的,可在 PCR 引物内引入 His 的编码区,或用互补 Oligo 法插入载体,构建表达蛋白氨基端带多聚 His 的通用载体。因为后一种方法易于实现,构建的表达载体通用性强而采用之。组氨酸在一般蛋白质中为稀有氨基酸,引入连续的 6 个组氨酸具有很高的特异性。His6 尾与金属离子有很强的结合能力,与  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 结合的 KD 值达  $0.7 \times 10^{-6}$  M,即使在 6mol/L 盐酸胍

存在的条件下也能稳定的结合,因此,特别适合于对包涵体的纯化。His6 则对目的蛋白的结构与功能影响甚少,通常生物学活性得以保持,不经去除 His6 尾可直接研究目的蛋白的生物学活性。

基因工程药物不允许携带 His6 序列,因此,在用于人体前必需去除这段序列。可选用化学或酶的方法切割去除,N-端融合的 His6 可用羧肽酶 A 去除,但难以去除干净,最好的方法是在载体上设置固定的切割位点,但潜在的问题是可能在目的基因的内部也有相同的序列存在,引起对蛋白质的非特异性切割。为此,我们建议在对特定蛋白质序列分析的基础上引入合适的切割位点,例如 GM-CSF N-端有数个脯氨酸,在脯氨酸前面加上一个天门冬氨酸形成可以甲酸/乙酸的切割识别位点(在两个氨基酸之间切割),融合蛋白切割后不带任何外来序列,这种方法有一定的通用性,因大多数蛋白质的 N 端或 C 端的部分序列对其生物学活性不是必须的<sup>[9]</sup>,可以利用某些氨基酸产生特定的位点,以更为干净的方式去除 His6 尾。未切开的融合蛋白和脱落的 His6 尾可用二次 IMAC 层析的方法去除<sup>[11]</sup>。利用 pBV222 载体表达 His6 融合蛋白的另一个用途是将目的蛋白固定化于 IMAC 介质上,比之传统的蛋白固定化方法具有明显的优点,它是通过 His6 尾结合于介质上的,因而对蛋白的结构与功能影响甚少,这方面的用途将会越来越广泛。

## 参 考 文 献

- [1] Flaschel E, Below M. *Biotech Adv*, 1993, 11:31~78.
- [2] Sassenfeld H M. *Trends Biotechnol*, 1990, 8:88~93.
- [3] Janknecht R, Martynott G, Lou J *et al.* *J Biol Chem*, 1991, 21:13804~13810.
- [4] Hochuli E J. *Chromatogr*, 1988, 444:293~302.
- [5] 张智清,路秀华,姚立红等. *病毒学报*, 1993, 9(2):136~143.
- [6] Hochuli E, Bannwarth W, Dobeli H *et al.* *Bio/Technology*, 1988, 11:1321~1325.
- [7] Gentz R, Chen C H, Rosen C A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:821~824.
- [8] 张智清,姚立红,侯云德等. *病毒学报*, 1990, 6(2):111~116.
- [9] Shanafelt A B, Johnson K E, Kastelein R A *et al.* *J Biol Chem*, 1991, 21:13804~13810.

## Construction and Application of A Prokaryotic Expression Vector which Expresses Protein Capable of Quickly Purified by IMAC

Li Fusheng Gong Huiyu Li Yufu Zhang Zhiqing Hou Yunde

(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering,  
Institute of Virology, CAPM, Beijing 100052)

**Abstract** One pair of complementary oligo nucleotide encoding 6 histidine are inserted into the polylinker's upstream of prokaryotic high expression vector pBV220. The resultant vector is named pBV220. Proteins expressed in this vector will have a 6 histidine tail as affinity handy fused to their N-terminus and can quickly purified by one step immobilized metal affinity chromatography (IMAC). This plasmid is verified by restriction map and DNA sequencing. When GM-CSF and IL-2 cDNA cloned into pBV222, expressed proteins in the inclusion body have the predicted molecular weight and the biological activity. The expressed bacteria is dissolved by 6mol/L Gu. HCl and the supernant is directly loaded to IMAC. IL-2 and GM-CSF fusion proteins are eluted by pH gradient, at last over 90% purity is achieved.

**Key words** IMAC, GM-CSF, IL-2, fusion protein, affinity tag