

# 高效可溶性重组蛋白表达载体的构建

姜媛媛\*, 刘铭瑶\*, 任桂萍, 朱慧萌, 李德山

东北农业大学生命科学学院 生物制药教研室, 哈尔滨 150030

**摘要:** 本研究构建了两种高效表达可溶性重组蛋白的原核表达载体。一种载体由 HisSUMO 序列与 pET30a(+)载体连接而成 (命名为 *HisSUMO Express*), 表达的融合蛋白用 Ni-NTA 纯化, 用 SUMO 蛋白酶 I 切割后可获得不留任何残基的重组蛋白。SUMO-蛋白酶 I 价格较贵, 为减少表达蛋白的成本, 第二种载体即在 His-SUMO 和目的序列之间加入羟胺切割位点 (命名为 *HisSUMO Economic*)。在 *HisSUMO Economic* 中表达的融合蛋白用 Ni-NTA 纯化, 羟胺液切割后可获得仅留一个甘氨酸残基的重组蛋白。以在常规表达载体中难以表达的鼠源成纤维细胞生长因子-21 (mFGF-21) 为例, 经葡萄糖消耗实验检测其活性, 验证两种表达载体的效果。结果表明 mFGF-21 在两种载体中均获得了高效表达, 融合蛋白占菌体总蛋白的 40% 以上, Ni-NTA 纯化后的融合蛋白分别利用羟胺切割液和 SUMO 蛋白酶 I 切割, 纯化的 mFGF-21 成熟蛋白回收量约为 54 mg/L, 回收率约为 6%。经两种载体表达后的 mFGF-21 蛋白均具有生物学活性, 可促进脂肪细胞消耗葡萄糖, 为进一步研究提供了基础。

**关键词:** 鼠源 FGF-21, 高效表达载体, 羟胺切割

## Construction of expression vectors for efficient expression of soluble recombinant proteins

Yuanyuan Jiang\*, Mingyao Liu\*, Guiping Ren, Huimeng Zhu, and Deshan Li

College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** The aim of the study is to construct two vectors for efficient expression of soluble recombinant proteins. The first vector was constructed by cloning the HisSUMO fragment into an expression vector pET30a(+) to fuse with the gene of interest (designated as *HisSUMO Express*). The second vector was constructed in the same way, but with a hydroxylamine cleavage site between HisSUMO and the gene of interest for an economic purpose (designated as *HisSUMO Economic*). The mouse fibroblast growth factor-21(mFGF-21), which was difficult to express in routine-used expression vectors, was taken as an example to test the vectors. The results showed that the mFGF-21 was expressed at high level in both vectors. The Sumo/mFGF-21 fusion protein accounted for more than 40% of the total bacterial protein. The fusion protein was purified with Ni-TNA column, and the HisSUMO was removed by cleavage of the fusion protein with either hydroxylamine solution or SUMO protease I. The concentration of the purified mFGF-21 mature protein was 54 mg/L and the recovery rate was 6%. The purified proteins derived from either hydroxylamine or SUMO protease I cleavage could stimulate glucose up-take by adipocytes. These results indicated that both *HisSUMO Express* and *HisSUMO Economic* were useful expression vectors for efficient expression of soluble recombinant proteins.

**Received:** June 24, 2009; **Accepted:** November 3, 2009

**Supported by:** Key Technology Research and Development Program of Heilongjiang Science and Technology Bureau (No. 2006G0461-00).

**Corresponding author:** Deshan Li. Tel: +86-451-55190645; E-mail: Deshanli@163.com

\*These authors contributed equally to this study.

黑龙江省科技厅重点攻关项目 (No. 2006G0461-00) 资助。

**Keywords:** mouse FGF-21, high-level expressive vector, hydroxylamine cleave

在大肠杆菌中表达重组蛋白具有使用安全、操作简便、周期短且不存在病毒致癌基因污染等优点,是重组蛋白药物研究和生产中使用最广泛的表达系统<sup>[1-2]</sup>。其中关键的问题是选用合适的表达载体,现已建立的大肠杆菌表达系统有融合表达、非融合表达、分泌表达、带纯化标签的表达载体等,而融合表达载体又有 pET 系列、pTYB 及 pGEX 等。表达载体的类型虽多,但选择合适的、满足人们需求的表达载体却很难,如 pET 系列载体虽然应用较广泛,但对有些蛋白的表达却不是很理想。而其他一些融合蛋白表达系统蛋白表达量虽然很高,但多数表达的目的蛋白可溶性较差。这就要求寻找更多的高效稳定、可溶性较好的表达系统以满足不同类型基因的表达。

本研究室在表达鼠源成纤维细胞生长因子(FGF)-21 的过程中,发现在大肠杆菌中难以获得高效稳定的可溶性表达,其原因可能在于该蛋白在大肠杆菌中较易被蛋白酶降解。曾尝试了很多表达载体表达效果均不理想,如 pET 系列表达载体、pTYB-11 等表达系统对以上蛋白的表达量极低或者几乎不表达,pGEX6p-1 虽然表达量较高,但可溶性目的蛋白所占比例较小。

SUMO (Small ubiquitin-like modifier-1) 是一种小分子泛素样修饰蛋白,广泛存在于各种真核细胞中,参与调节细胞凋亡、信号转导、RNA 转录、蛋白的核质运输以及细胞周期等多种生理进程<sup>[3]</sup>。近年来,研究发现 SUMO 可以作为重组蛋白表达的融合标签和分子伴侣,具有抗蛋白酶水解、显著增加重组蛋白表达量以及促进靶蛋白正确折叠、提高可溶性等功能<sup>[4]</sup>。小分子泛素样修饰蛋白 (SUMO) 和泛素 (Ub) 在一级结构上只有 18% 的同源性,然而,两者的三级结构及其生物学功能却十分相似<sup>[5]</sup>,研究表明其作为重组蛋白的融合标签可以增加蛋白的稳定性。

本实验室自构建了 SUMO 蛋白融合表达系统,并获得了鼠源 FGF-21 (mFGF-21) 和多种重组蛋白的高效可溶性表达。该融合表达系统可根据自身实验需要设计引物,采用两种不同切割方式来获得所

需的成熟目的蛋白。一种方式是利用 SUMO 蛋白酶 I 切割,经 SUMO 蛋白酶 I 切割表达的融合蛋白可以获得纯度较高的成熟蛋白且不残留任何氨基酸残基,而且 SUMO 蛋白酶 I 的识别序列为 SUMO 蛋白的三级结构。但目前 SUMO 蛋白酶 I 在国内购买比较困难,而从国外邮购价格比较昂贵 (1000 U 约 4000 元人民币)。因此,本实验又设计了另外一种切割方式,即在 SUMO 融合表达系统中位于 SUMO 蛋白酶切位点之后引入了羟胺切割位点,利用化学切割方法获得成熟目的蛋白,这样可以大大降低蛋白纯化的成本,且切割后只残留一个小分子甘氨酸对蛋白活性并无影响。现以 mFGF-21 为例,介绍 SUMO 蛋白融合表达系统的构建及应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和受体菌

质粒 pMD18-T-mFGF-21 (pMD18-T 购自 TaKaRa 公司)、pMD18-T-His-SUMO (pMD18-T 购自 TaKaRa 公司)、受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株、BL21 菌株 (含 DE3)、Rosetta 菌株 (含 DE3)、pET-30a(+)载体由本实验室提供;小鼠成纤维细胞系 3T3-L1 购自 ATCC。

#### 1.1.2 酶和主要生化试剂

*Bsa* I、*Bam*HI 购自 New England BioLabs 公司;pMD18-T、dNTPs、其他限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;SUMO 蛋白酶 I 购自 Life Sensors 公司;IPTG (异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷)、溶菌酶、卡那霉素购自 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;Ni-NTA 琼脂糖颗粒购自 QIAGEN 公司;高糖 DMEM 培养基购自 Invitrogen Corporation;新生牛血清 (NCS)、优质胎牛血清 (FBS) 购自 Invitrogen Corporation;dexamethasone (Dex)、isobutyl methylxanthine (IBMX)、human recombinant insulin 购自 Sigma 公司;葡萄糖检测试剂盒购自四川迈克科技有限责任公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计

依据软件分析得到的成熟 mFGF-21 cDNA 序列

设计引物 P1、P2、P3, 将成熟 mFGF-21 和 HisSUMO 基因片段与 pET-30a(+) 载体连接。引物 P1 中含有 *Bsa* I 和 *Asc* I 酶切位点, 并且在 *Asc* I 酶切位点之后加入羟胺切割位点, P2 是从 TAA 开始 3' 端编码区内的序列, 其中设计 QQQQC 有 *Bam* H I 酶切位点, 使得 PCR 产物经过酶切后的粘性末端可以与 pET-30a(+) 载体相连。P3 中含有 *Bsa* I 酶切位点, 在此位点之后为 SUMO 蛋白酶 I 切割位点。构建后的载体根据需要分别用于表达两种融合蛋白: 一种表达可用于 SUMO 蛋白酶 I 切割的融合蛋白 (以 P3、P2 为引物); 另一种表达带有羟胺切割位点的融合蛋白 (以 P1、P2 为引物)。另外, 设计引物 P4、P5, P4 含有 *Nde* I 酶切位点, P5 含有 *Xho* I 酶切位点, P4、P5 为引物得到的 PCR 产物双酶切后连接至 pET-30a(+) 表达载体。引物均由 Invitrogen 公司合成。

P1(5'-3'): GAGGTAGAGACC GGCGCGCC AATGGT T

*Bsa* I      *Asc* I      羟胺切割位点

ACCCCATCCCTGACTCCAGCCCC;

P2(5'-3'): GCGGATCCTTAGGACGCATAGCTGGGG;

*Bam* H I

P3(5'-3'): GGTCTCAAGGTTACCCCATCCCTGACTCC

*Bsa* I      ↑SUMO 蛋白酶 I 切割位点

AGCCCC;

P4(5'-3'): GCGCATATGGCATACCCCATCCCTGAC;

*Nde* I

P5(5'-3'): CCGCTCGAGGGACGCATAGCTGGGG;

*Xho* I

### 1.2.2 融合蛋白表达系统的构建

pMD18-T-His-SUMO 质粒和 pET-30a(+) 分别用 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切, 回收酶切片段; 将以上两种回收产物利用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取重组质粒, 酶切鉴定阳性克隆即可获得 HisSUMO Express 表达载体。

以质粒 pMD18-T-mFGF-21<sup>[6]</sup> 为模板, 分别以 P1、P2 (获得的融合蛋白用于羟胺切割) 和 P3、P2 (获得的融合蛋白用于 SUMO 蛋白酶 I 切割) 为引物, 用 *rTaq* 酶进行 PCR 扩增, 反应体系为 50  $\mu$ L。扩增产物分别用 *Bsa* I 和 *Bam* H I 双酶切, 回收酶切

片段; 将 HisSUMO Express 表达载体分别用 *Bsa* I 和 *Bam* H I 双酶切, 回收酶切载体片段, 将酶切回收后的两种 mFGF-21 PCR 产物分别与 HisSUMO Express 载体回收产物利用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 分别提取两种重组质粒, *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定阳性克隆, 并将两种阳性克隆进行测序。

pET30a(+) 载体和质粒 pMD18-T-mFGF-21 分别用 *Nde* I、*Xho* I 双酶切, 回收酶切片段, 制备带有相匹配粘性末端的线性 DNA。将胶回收后的目的片段 mFGF-21 与原核表达载体 pET30a(+) 用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接后的产物转化至 BL21 感受态菌中, 提取重组质粒后分别用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定和重组质粒的 PCR 鉴定。阳性重组质粒命名为 pET-30a(+)-mFGF-21。

### 1.2.3 目的基因在大肠杆菌中的表达及融合蛋白的纯化

将含有正确序列的重组质粒 HisSUMO Express-mFGF-21 (无羟胺切割位点)、重组质粒 HisSUMO Economic-mFGF-21 (含有羟胺切割位点) 和重组质粒 pET-30a(+)-mFGF-21 分别转化至表达菌株 Rosetta。转化后的单菌落分别接种至 5 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 h, 以 1:100 接种于 500 mL 含卡那霉素 (50 mg/mL) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h,  $A_{600}=0.3\sim0.6$  时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行诱导, 诱导 3 h 后分别取少量菌体及未诱导的对照样品进行 12% SDS-PAGE<sup>[7]</sup> 电泳, 并确定表达的目的蛋白占菌体总蛋白的百分比。其余收获的菌体进行超声破碎后离心<sup>[8]</sup>, 分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。菌体经超声破碎后离心, 上清经 Ni-NTA 柱亲和层析, 用杂蛋白洗脱液 (30 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) 洗去杂蛋白后, 用洗脱液 (250 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) 洗脱融合蛋白, 收集洗脱的第一、二峰。分别取两种融合蛋白各 5  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.2.4 融合蛋白的切割

将用于羟胺切割的融合蛋白 (浓度为 1 mg/mL)

浓缩 5 倍, 分别以体积比为 1:1、1:2、1:3、1:4 加入 2×羟胺切割液<sup>[9]</sup> (2.0 mol/L 盐酸羟胺, 0.2 mol/L Ches, 在 45℃ 条件下调节 pH 值至 9.5), 45℃ 反应 4 h 后将各体系加入 PBS 至蛋白浓缩前体积, 取样进行 15% SDS-PAGE 检测, 分析最佳羟胺切割液浓度。同时将方法 1.2.3 收集的 SUMO-mFGF-21 融合蛋白 (浓度为 1 mg/mL) 经 PBS 透析 24 h 后, 以每 10 μg 融合蛋白: 1U SUMO 蛋白酶 I 的比例加入 SUMO 蛋白酶 I<sup>[10]</sup>, DTT 终浓度为 2 mmol/L, 4℃ 切割过夜, 并取样进行 15% SDS-PAGE 检测。

### 1.2.5 成熟蛋白的纯化

羟胺切割后产物经 PBS 缓冲液透析以除去切割液, 再经 Ni-NTA 颗粒亲和层析, 收集唯一的洗脱峰, 即为 mFGF-21 成熟目的蛋白, 用洗脱液 (250 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) 洗脱 Ni-NTA 颗粒结合的小泛素相关修饰物蛋白, 15% SDS-PAGE 电泳检测。将 SUMO 蛋白酶切割后的产物也通过 Ni-NTA 颗粒亲和层析进行纯化, 具体纯化方法同上。经 HPLC 检测蛋白纯度, 纯度大于 95% 的目的蛋白用于后续实验。

### 1.2.6 鼠源 FGF-21 的免疫活性检测

本实验一抗为实验室自制兔抗人 FGF-21 抗体, HRP 标记的二抗为鼠抗兔抗体, 购自 R&D 公司。将上述步骤 1.2.5 中所得的 mFGF-21 成熟蛋白、小泛素相关修饰物及 BSA 对照样品进行 Western blotting 分析。首先将样品进行 15% SDS-PAGE 电泳, 转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 的脱脂奶粉封闭, 然后将膜用相应一抗 4℃ 孵育过夜约 12 h, 二抗室温孵育 2 h 后, 洗涤, 加入化学发光底物 SuperSignal 检测试剂 (PIERCE), 暗室 X 光片暗匣曝光、显影。

### 1.2.7 3T3-L1 脂肪细胞的分化

3T3-L1 小鼠成纤维细胞以  $2.5 \times 10^4$  的密度接种细胞于 12 孔板中, 在含 10% 新生小牛血清 NCS (Invitrogen Corporation) 的高糖 DMEM 培养基中, 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养, 待细胞长至接触抑制时, 用含 10% 胎牛血清 FBS、0.25 μmol/L 地塞米松 (Dex)、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX)、5 μg/mL 重组人胰岛素的 DMEM 培养基分化 48 h 后, 撤去 Dex、IBMX, 用重组人胰岛素再

继续分化 48 h, 此后用含 10% FBS 的 DMEM 的培养基继续培养 10 d, 每两天换一次液直到细胞完成分化, 90% 以上的细胞表现出脂肪细胞特征。

### 1.2.8 FGF-21 对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢作用的测定

将分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞饥饿处理 12 h 后, 用不同浓度的成熟 mFGF-21 蛋白刺激细胞, 温育 24 h 后, 取上清培养基利用葡萄糖氧化酶法测定培养基中的葡萄糖含量<sup>[11]</sup>。同时设未经 mFGF-21 处理的细胞对照组, 以未接种细胞空白复孔的糖含量均值相减, 算出各孔细胞的葡萄糖消耗量。

每个浓度至少设 3 个独立的重复组, 并运用统计学分析实验结果。数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间计量资料比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增产物鉴定

以质粒 pMD18-T-mFGF-21 为模板, 分别以 P1、P2 和 P3、P2 为引物进行 PCR 扩增, 产物为 600 bp 左右, 与预期大小相符 (图 1)。

### 2.2 融合表达载体的构建

将胶回收的 mFGF-21 基因序列和带有羟胺切割位点的 mFGF-21 序列分别与线性化的 HisSUMO Express 表达载体连接。重组表达载体经 *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定后, 分别获得产物为 912 bp (SUMO 序列/目的序列) 和 926 bp (SUMO 序列/羟胺切割位点/目的序列) 的清晰条带, 与预期一致 (图 2)。

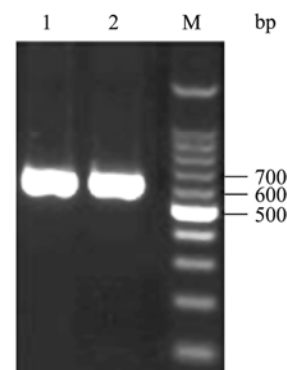


图 1 鼠源 FGF-21 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of the mouse FGF-21. 1: PCR products with the primer P1 and P2; 2: PCR products with the primer P3 and P2; M: 100 bp DNA ladder.

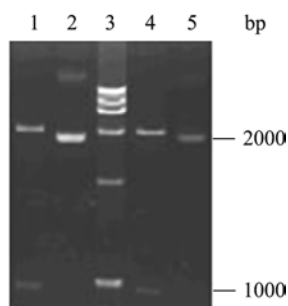


图 2 重组表达质粒 HisSUMO Express-mFGF-21 和 HisSUMO Economic-mFGF-21 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme identification of the recombinant plasmid HisSUMO Express-mFGF-21 and HisSUMO Economic-mFGF-21. 1: HisSUMO Express-mFGF-21/*Xba* I+*Bam*H I (without hydroxylamine cleavage site); 2: HisSUMO Express-mFGF-21 (without hydroxylamine cleavage site); 3: DNA marker DL15000; 4: recombinant plasmid HisSUMO Economic-mFGF-21/*Xba* I+*Bam*H I (containing hydroxylamine cleavage site); 5: recombinant plasmid HisSUMO Economic-mFGF-21 (containing hydroxylamine cleavage site).

DNA 测序结果表明该重组载体中 HisSUMO 序列以正确的读码框插入至 T7 启动子下游, 目的片段 mFGF-21 和带有羟胺切割位点的 mFGF-21 序列均以正确的读码框插入至 SUMO 序列下游。HisSUMO Express 和 HisSUMO Economic 表达载体的构建如图 3 所示。

取阳性重组质粒 pET-30a-mFGF-21, 分别用限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 进行双酶切鉴定和重组质粒的 PCR 鉴定。用限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 进行双酶切, 获得两个片段, 分别为约 5300 bp 的 pET-30a(+) 载体片段和约 550 bp 的 mFGF-21 目的基因片段。以 P4 和 P5 为引物、pET-30a-mFGF-21 为模板进行 PCR 鉴定, 在约 550 bp 处有一目的带, 与预期插入片段大小 (561 bp) 相符 (图 4), 确认阳性重组质粒 pET-30a-mFGF-21 构建成功 (图 5)。

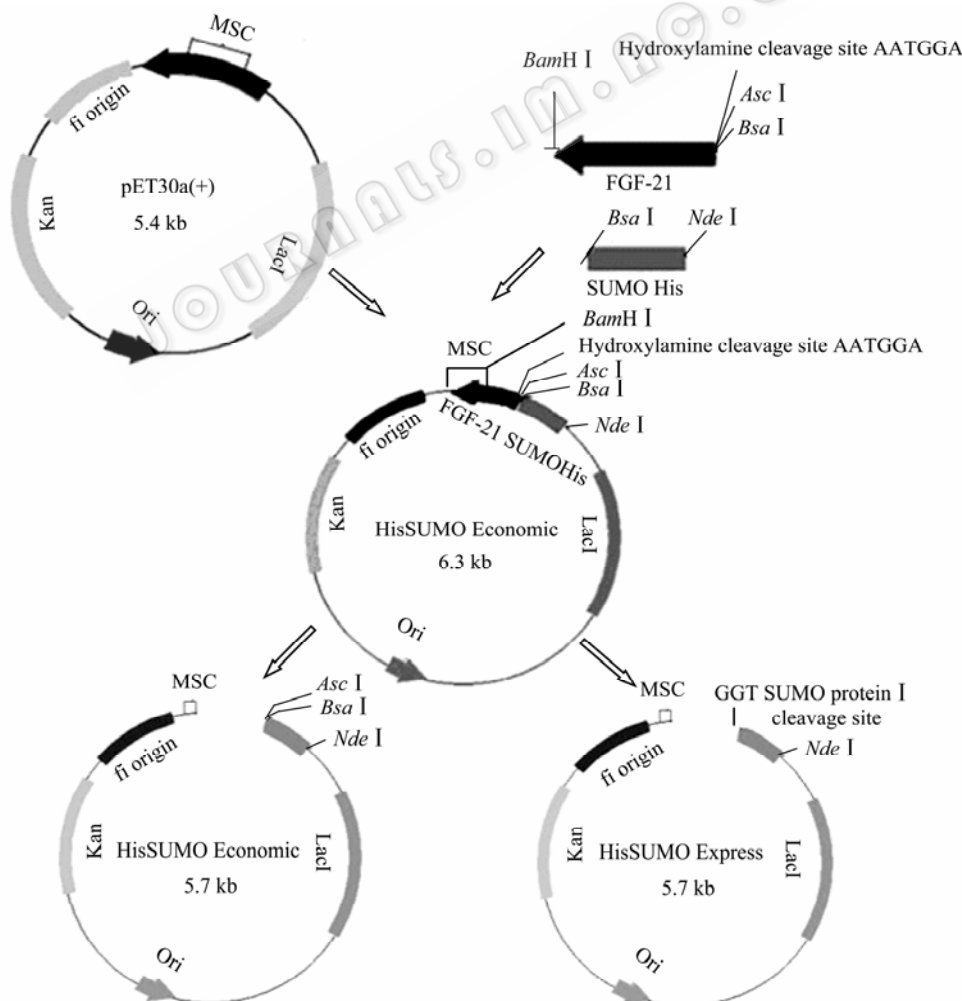


图 3 表达载体 HisSUMO Express 和 HisSUMO Economic 构建图谱

Fig. 3 Construction of HisSUMO Expression and HisSUMO Economic.

### 2.3 SUMO-mFGF-21 融合蛋白的表达及纯化

将含有重组质粒 HisSUMO Express-mFGF-21 (无羟胺切割位点)、重组质粒 HisSUMO Economic-mFGF-21 (含有羟胺切割位点)、pET-30a(+)-mFGF-21 的 Rosetta 菌株接种后诱导,加入 IPTG 诱导 3 h 后取样进行电泳分析,结果显示 pET-30a(+)-mFGF-21 系统未能表达 mFGF-21,而融合蛋白在 SUMO 体系中表达量较高,且均为可溶性蛋白(图 6),纯化后的 SUMO-mFGF-21 融合蛋白上样量为 5  $\mu$ L (浓度约为 1 mg/mL),其分子量约为 44 000 Da (图 7)。融合蛋白经蛋白薄层扫描计算融合蛋白的表达量,如图 8 所示,可见经 HisSUMO Express 系统表达 mFGF-21 重组蛋白占宿主细胞中总蛋白质的 40%,而 HisSUMO Economic 系统表达的 mFGF-21 重组蛋白占宿主细胞中总蛋白质的 43.17%。

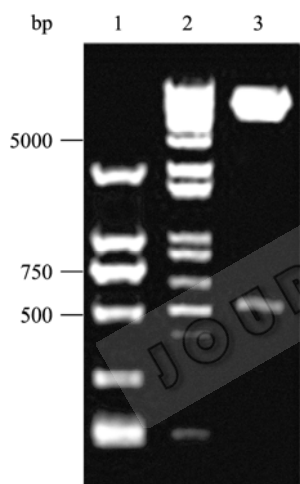


图 4 重组质粒 pET-30a-mFGF-21 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pET-30a-mFGF-21 by enzyme digestion. 1: DNA marker DL2000; 2: 1 kb Plus DNA ladder; 3: recombinant plasmid pET-30a-mFGF-21 digested with *Nde* I and *Xho* I.

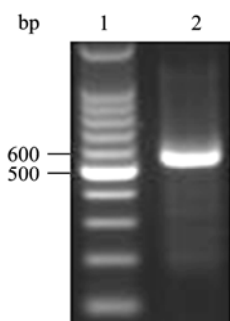


图 5 重组质粒 pET-30a-mFGF-21 的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of the positive plasmid of pET-30a-mFGF-21 by PCR. 1: 100 bp DNA marker; 2: PCR products with the primer P4 and P5.

### 2.4 融合蛋白的切割情况分析

融合蛋白经不同浓度羟胺切割液切割,并与蛋白酶切割作对比。蛋白 (1 mg/mL) 与羟胺切割液体积比为 1:4 时蛋白切割效率较高,结果如图 9 所示。而蛋白酶价格昂贵,盐酸羟胺则比较经济,可以通过提高羟胺浓度来提高切割效果。

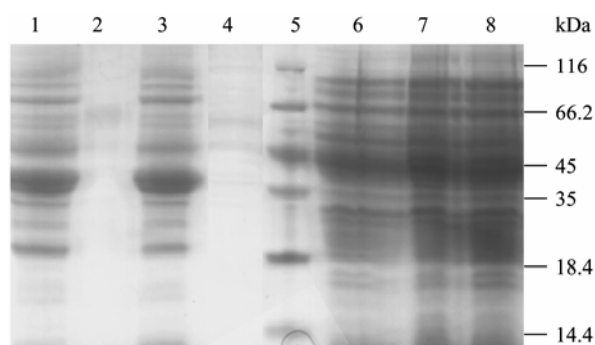


图 6 HisSUMO Express 和 HisSUMO Economic 表达载体介导的鼠源 FGF-21 蛋白的表达

Fig. 6 Expression of mFGF-21 in *E. coli* mediated by HisSUMO Express and HisSUMO Economic. 1: supernatant of Rosetta cells harboring HisSUMO Express-mFGF-21 (without hydroxylamine cleavage site) 3 hours after IPTG induction; 2: precipitate of Rosetta cells harboring HisSUMO Express-mFGF-21 without IPTG induction (without hydroxylamine cleavage site); 3: supernatant of Rosetta cells harboring HisSUMO Economic-mFGF-21 3 hours after IPTG induction (containing hydroxylamine cleavage site); 4: precipitate of Rosetta cells Harboring HisSUMO Economic-mFGF-21 without IPTG induction (containing hydroxylamine cleavage site); 5: protein molecular mass marker; 6: Rosetta cells harboring HisSUMO Economic-mFGF-21 expression vector (containing hydroxylamine cleavage site) without IPTG induction; 7: lysates of Rosetta cells harboring recombinant pET-30a(+)-mFGF-21 expression vector 3 hours after IPTG induction; 8: lysates of Rosetta cells harboring recombinant pET-30a(+)-mFGF-21 expression vector without IPTG induction.

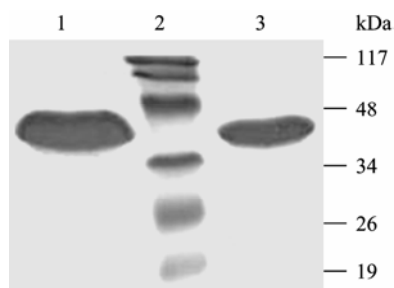


图 7 SUMO-mFGF-21 的纯化

Fig. 7 Purification of SUMO-mFGF-21. 1: SUMO-mFGF-21 protein (without hydroxylamine cleavage site); 2: protein marker; 3: SUMO-mFGF-21 protein (containing hydroxylamine cleavage site).

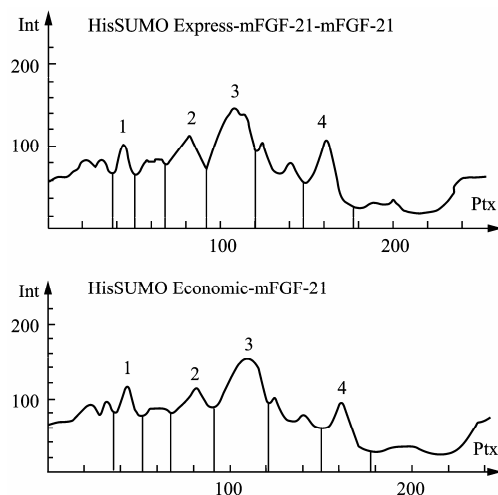


图 8 诱导菌总蛋白、His-SUMO-FGF-21 重组蛋白的薄层扫描图

Fig. 8 Laminar scanning figure of protein content of the positive bacterium.

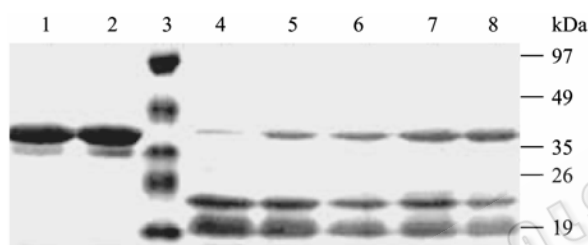


图 9 SUMO-mFGF-21 融合蛋白经羟胺切割后的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of SUMO-mFGF-21 fusion protein after cleaved by hydroxylamine. 1: SUMO-mFGF-21 protein before cleavage (without hydroxylamine cleavage site); 2: SUMO-mFGF-21 protein before cleavage (containing hydroxylamine cleavage site); 3: protein marker; 4: the products of SUMO-mFGF-21 fusion protein after cleaved by SUMO protease I (without hydroxylamine cleavage site); 5: the products cleaved by hydroxylamine with the ratio of the fusion protein and hydroxylamine solution is 1:4; 6: the products cleaved by hydroxylamine with the ratio of the fusion protein and hydroxylamine solution is 1:3; 7: the products cleaved by hydroxylamine with the ratio of the fusion protein and hydroxylamine solution is 1:2; 8: the products cleaved by hydroxylamine with the ratio of the fusion protein and hydroxylamine solution is 1:1.

## 2.5 成熟蛋白纯化产物

将 SUMO 融合蛋白经羟胺切割后的产物置于 PBS 缓冲液中透析 24 h, 再经 Ni-NTA 颗粒亲和层析, 收集唯一的洗脱峰, 即为 mFGF-21 成熟蛋白, 15% SDS-PAGE 电泳检测 (图 10)。纯化的 mFGF-21 成熟蛋白回收量约为 54 mg/L, 成熟蛋白回收率约为 6%。

## 2.6 mFGF-21 的免疫活性检测分析

通过软件比对鼠源 FGF-21 与人源 FGF-21 的氨基酸序列可知两者的同源性达 80.66%, 表明兔抗人全长 FGF-21 抗体可与 mFGF-21 发生很强的交叉反应, 因此可用兔抗人 FGF-21 抗体作为 1 抗检测 mFGF-21。Western blotting 试验中 1 号泳道加入 1  $\mu$ g BSA 作为阴性对照, 2 号泳道加入 1  $\mu$ g SUMO-mFGF-21 融合蛋白 (含羟胺切割位点), 3 号泳道加入 10 ng 纯化的 mFGF-21 蛋白作为待检物。Western blotting 结果分析表明, 2、3 号泳道的蛋白与抗人 FGF-21 抗体发生反应, 该条带分别为 SUMO-mFGF-21 融合蛋白和 mFGF-21。证明抗人 FGF-21 抗体与鼠 FGF-21 反应的特异性, 且所纯化的蛋白为成熟 mFGF-21, 如图 11 所示。

## 2.7 3T3-L1 脂肪细胞的分化

小鼠成纤维细胞 3T3-L1 形成单层后, 用脂肪细胞分化液 I (5 mg/L 重组人胰岛素, 0.25  $\mu$ mol/L 地塞米松, 0.5 mmol/L IBMX, 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基) 诱导分化 48 h, 再用脂肪细胞分化液 II (5 mg/L

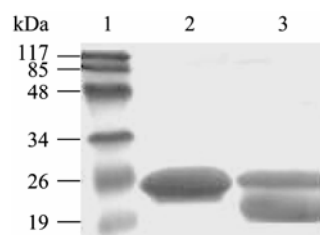


图 10 SDS-PAGE 电泳分析纯化的成熟鼠源 FGF-21

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of purified mouse FGF-21. 1: protein marker; 2: purified mouse FGF-21; 3: the products of SUMO-mFGF-21 fusion protein after cleaved by hydroxylamine.

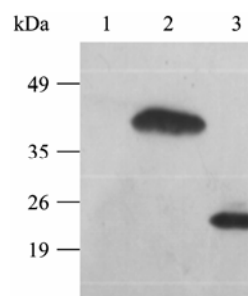


图 11 鼠源 FGF-21 的 Western blotting 分析

Fig. 11 Characterization of the mouse FGF-21 by Western blotting. 1: BSA; 2: SUMO-mouse FGF-21; 3: mouse FGF-21.

重组人胰岛素, 10%胎牛血清的 DMEM 培养基) 继续诱导 48 h, 此后用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基继续维持, 每两天换一次液, 分化 14 d 后, 分化率可达 90%以上的细胞用于葡萄糖吸收试验, 如图 12 所示, 左图为未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞, 细胞呈成纤维状, 右图为分化成熟的脂肪细胞, 细胞内有大量的脂滴积聚, 表现出明显的脂肪细胞特征。

## 2.8 鼠 FGF-21 对脂肪细胞中葡萄糖吸收的影响

用培养基稀释分别经羟胺和 SUMO 蛋白酶 I 切割后的成熟 mFGF-21, 使其终浓度分别为 0.1、1、10、100、1000 nmol/L。用以上浓度的 mFGF-21 处理小鼠 3T3-L1 脂肪细胞, 24 h 后取上清培养基经微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄糖含量, 统计学分析结果显示, 细胞对葡萄糖的摄取利用显著增加, 与未经任何处理的对照组相比, 残存在培养基中的葡萄糖含量明显减少 (两样本比较的  $t$  检验,  $P<0.05$  差异显著,  $P<0.001$  差异极显著)。未经处理的空白对照组中, 小鼠 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗率只有 44.61%, 而经 mFGF-21 (SUMO 蛋白酶 I 切割) 作用的脂肪细胞葡萄糖消耗率显著增加, 在浓度为 0.1 nmol/L 时可达到 50.78%, 并且随着 mFGF-21 浓度的增加, 细胞葡萄糖消耗率显著增加, 呈剂量依赖关系, 在浓度为 1000 nmol/L 时高达 80.66%, 比未处理空白对照增加近 40%, 而羟胺切割后的 mFGF-21 处理 3T3-L1 脂肪细胞也能达到相同的结果, 处理后的细胞葡萄糖消耗率显著增加, 并呈剂量依赖性关系, 如图 13 所示。可见, 两种切割方式获得的 mFGF-21 均具有促进脂肪细胞消耗葡萄糖的生物学功能。

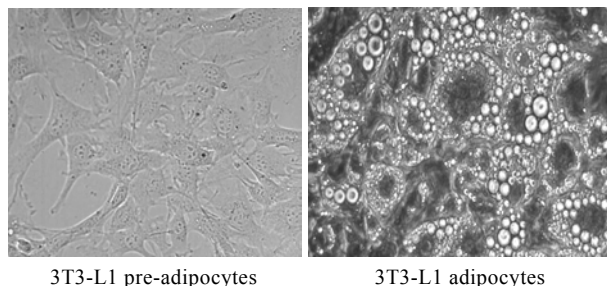


图 12 3T3-L1 前体脂肪细胞分化图 (400×)  
Fig. 12 Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes (400×).

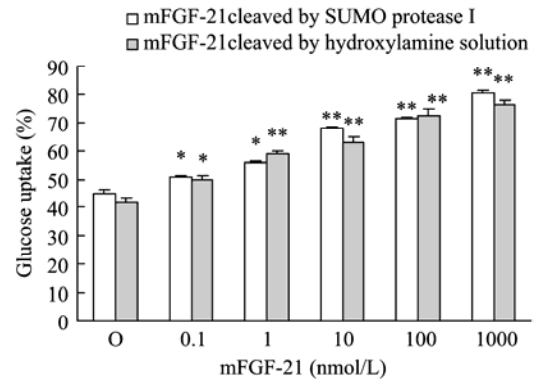


图 13 鼠源 FGF-21 作用后 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖的消耗曲线

Fig. 13 Glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with mouse FGF-21. The values ( $\pm$  SE) shown are the average of at least 3 independent measurements. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$  compared with no stimulated control.

## 3 讨论

本实验室成功构建了 HisSUMO Express 和 HisSUMO Economic 两个表达系统, 并分别利用这两种系统成功地表达和纯化了 mFGF-21, 利用 SUMO 蛋白酶 I 或羟胺切割液切割均能获得具有活性的目的蛋白。由于 SUMO 蛋白酶 I 和 SUMO 蛋白引入了多聚组氨酸, 可以与 Ni-NTA 琼脂糖颗粒结合, 因此可以利用 Ni-NTA 亲和层析分离出有活性的成熟蛋白。

先前的大量实验表明, FGF-21 在大肠杆菌中难以获得高效可溶性表达, 最初笔者使用 pET 系列和 pTYB 表达系统, 但目的蛋白表达量极低。而通过分子伴侣进行融合表达 (如 pGEX 表达系统), 尽管可以提高蛋白的表达量以及成熟蛋白的收获率, 但多数融合蛋白是以包涵体的形式表达, 复性比较困难, 在此过程中也摸索了很多诱导条件, 但表达效果均不理想 (数据未显示)。

SUMO 近年来被发现可用作分子伴侣来增加外源蛋白的稳定性和可溶性, 其作用机理可能是 SUMO 蛋白作为一个高度疏水的核心为目的蛋白的折叠提供成核位点<sup>[8-10]</sup>, 促进蛋白间的相互作用并使其正确折叠, 最终增强了融合蛋白的可溶性<sup>[10]</sup>。诱导时间对于融合蛋白 SUMO-mFGF-21 的表达量影响较大, 诱导 3 h、4 h、5 h 时蛋白表达量较高, 当诱导过夜时融合蛋白含量较少, 推测可能被菌体内的蛋白酶所降



解。为避免纯化时杂蛋白含量较高, 本实验选择了诱导 2 h, 制备获得了纯度较高的融合蛋白。

本实验所构建的融合表达载体可根据需要选择融合蛋白切割方式, 该融合蛋白在利用 SUMO 蛋白酶 I 进行切割时可保证无氨基酸残留, 切割后, 成熟的 mFGF-21 有明显促进 3T3-L1 脂肪细胞吸收葡萄糖的活性。但 SUMO 蛋白酶 I 价格比较昂贵, 并且在国内购买比较困难。在此基础上我们又构建了比较经济实用的、用盐酸羟胺来切割融合蛋白的表达体系, 据资料显示羟胺切割位点在蛋白中存在较少, 经软件分析成熟 mFGF-21 氨基酸序列内无羟胺切割位点。本实验构建载体时在 SUMO 和 mFGF-21 之间加入羟胺切割位点, 且通过摸索切割液浓度可以选择最适合的比例切割, 以达到较高的切割效率。羟胺切割后只在氨基端残留一个小分子甘氨酸, 经实验证明并不影响蛋白活性。羟胺切割纯化的成熟 mFGF-21 具有促进脂肪细胞吸收葡萄糖的作用, 并呈剂量依赖性。此外, 除了 mFGF-21 以外, 本实验室还利用 HisSUMO Express 和 HisSUMO Economic 表达系统成功地表达了人源 FGF-21、人源 IL-1 $\beta$ <sup>[12-14]</sup>、IL-17、TNF $\alpha$  等蛋白, 所得蛋白均为可溶性, 约占宿主细胞总蛋白的 40% 左右, 并且获得的蛋白均具有生物学活性。由此可见, 本实验所构建的 2 个表达系统均可以高效表达可溶性目的蛋白, 既可用 SUMO 蛋白酶 I 切割, 又可以通过比较经济的化学切割方法纯化成熟蛋白, 而且化学切割方法经济可行比较适合我国国情, 该载体的构建是蛋白表达纯化领域中表达载体的一个重要改进, 为生物技术领域中重组蛋白的研究和应用提供了有用的工具。

## REFERENCES

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(5): 411-421.
- [2] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Micobiol Rev*, 1996, **60**(3): 512-538.
- [3] Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, *et al.* Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci*, 2006, **15**(1): 182-189.
- [4] Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, *et al.* SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif*, 2005, **43**(1): 1-9.
- [5] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhov OA, *et al.* SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*, 2004, **5**(1/2): 75-86.
- [6] Jiang YY, Liu MY, Li DS, *et al.* Cloning, expression and purification of mouse fibroblast growth factor-21 and its function in adipocyte glucose metabolism. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 157-164.  
姜媛媛, 刘铭瑶, 李德山, 等. 鼠源成纤维细胞生长因子-21 对脂肪细胞糖代谢的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 157-164.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Manutus T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 880-898.
- [8] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* *Short protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. Boston: John Wiley & Sons Inc, 1992: 652-658.
- [9] Zuo X, Mattern MR, Tan R, *et al.* Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. *Protein Expr Purif*, 2005, **42**(1): 100-110.
- [10] Mossessova ES. *Molecular Analysis of Ulp1 Protease and Its Substrate, the Ubiquitin-Likemodifier SUMO*. Durham: Bell Howell Information and Learning Company, 2001: 21-22.
- [11] Yang GZ, Gao XP, Yan JF, *et al.* Establishment of GOD-POD assay in a minimal way and application to glucose metabolism of 3T3-L1 adipocyte and HepG2 cell *in vitro*. *Sichuan J Anatomy*, 2003, **11**(1): 12-15.  
杨桂枝, 高小平, 晏菊芳, 等. GOD-POD 法微量测定方法的建立及其在 3T3-L1 脂肪细胞和 HepG2 细胞糖摄取中的应用. *四川解剖学杂志*, 2003, **11**(1): 12-15.
- [12] Ren GP, Hou YT, Jiang YY, *et al.* Efficient expression of soluble human FGF-21 and its glucose regulation activity. *Acta Pharm Sin*, 2009, **44**(5): 548-552.  
任桂萍, 侯玉婷, 姜媛媛, 等. 人源 FGF-21 的高效可溶性表达及其调节血糖功能的初步研究. *药学报*, 2009, **44**(5): 548-552.
- [13] Li JN, Liu MY, Hou YT, *et al.* Human fibroblast growth factor-21 regulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, **25**(6): 556-562.  
李晋南, 刘铭瑶, 侯玉婷, 等. 人源 FGF-21 在脂肪细胞糖代谢中的作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, **25**(6): 556-562.
- [14] Jiang YY, Yin CK, Li JN, *et al.* Efficient expression of several recombinant proteins by pSUMO expression vector. *J Northeast Agri Univ*, 2008, **39**(10): 57-62.  
姜媛媛, 尹成凯, 李晋南, 等. 利用 SUMO 融合系统高效表达可溶性重组蛋白的研究. *东北农业大学学报*, 2008, **39**(10): 57-62.