

疏水性 ELP 基因设计与基因库构建

林衡^{1,2} 李军明² 张立超² 葛高顺² 许崇波^{2*} 胡学军^{2*}

(1. 大连大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622)

(2. 大连大学 医学院 辽宁 大连 116622)

摘要: 【目的】设计合成疏水性类弹性蛋白(Elastin-like polypeptide, ELP)基因, 建立 ELP 基因库。【方法】选择疏水性最强的异亮氨酸(Ile, I)(疏水参数: 4.5)取代 ELP 五肽重复序列单元(缬氨酸-脯氨酸-甘氨酸-客座氨基酸-甘氨酸, VPGXG)中客座残基 X。全基因合成一段含编码(VPGIG)₁₀ 序列, 上游含 *Dra* III 酶切位点、下游含 *Bgl* I 酶切位点的 ELP 单元。将 *Dra* III 和 *Bgl* I 设计为一对同尾酶(Isocaudarner), 利用这对同尾酶定向克隆(Recursive directional ligation, RDL)一系列不同拷贝数的 ELP 基因。为鉴定基因库有效性, 随机选取库中 ELP[I]₅₀ 基因进行蛋白表达、纯化并测定其相变温度(Inverse temperature transition, T_t)。【结果】建立了 ELP[I]_n (n=10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120)基因库。测定 ELP[I]₅₀ 的 T_t 为 24.3 °C。【结论】首次单独选用 Ile(I)作为 ELP 蛋白质标签中客座残基氨基酸, 增加了 ELP 中疏水性氨基酸的含量, 为进一步筛选出表达量高、 T_t 低、分子量小的 ELP 标签奠定基础。

关键词: 类弹性蛋白, 异亮氨酸, 同尾酶, 定向克隆

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)

*通讯作者: Tel: 86-411-87402744

✉: 许崇波: xuchongbo@dlu.edu.cn; 胡学军: huxuejun@dlu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-23; 接受日期: 2013-01-09

Design and construction of hydrophobic ELP genes library

LIN Heng^{1,2} LI Jun-Ming² ZHANG Li-Chao² GE Gao-Shun²
XU Chong-Bo^{2*} HU Xue-Jun^{2*}

(1. College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

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

Abstract: [Objective] To design and synthesis encoding hydrophobic ELP genes and construct ELP genes library. **[Methods]** The highest hydrophobic Ile(I) amino acid (hydrophobic parameters: 4.5) was chosen to replace the guest residues X of ELP pentapeptide repeat serial units building block (VPGXG)₁₀ and the encoding block fragment was synthesized, flanking with a *Dra* III and *Bgl* I sites at upstream and downstream respectively. The *Dra* III and *Bgl* I were designed as a pair of isocaudamer for recursive directional clone to construct the ELP genes library. To confirm that the ELP library was constructed properly, the ELP[I]₅₀ gene was randomly chosen to be expressed. The T_t of purified ELP[I]₅₀ was detected via turbidity changing at OD_{350} . **[Results]** The ELP genes library containing the ELP[I]_n (n=10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120) was successfully constructed. The library was confirmed by expression of ELP[I]₅₀ gene, protein purification by inverse transition cycling. The T_t of ELP[I]₅₀ was 24.3 °C. **[Conclusion]** In order to increase the number of hydrophobic amino acids in ELP, the Ile(I) was chosen as a guest amino acid, the foundation for further screening ELP tag was builded up to get proper recombinant tag with smaller molecular weight, high levels expression, and low phase transition temperature.

Keywords: Elastin-like protein, Ile, Isocaudamer, Recursive directional ligation

类弹性蛋白(Elastin-like polypeptide, ELP)是由五肽重复序列单元(VPGXG)人工合成的重组多肽, 其中客座残基 X 可以是除脯氨酸以外的任意一种氨基酸。n 代表 ELP 链中五肽重复次数, 一般在 20–330 之间^[1]。可以通过不同的方法, 人工合成不同长度的 ELP 基因片段^[2], 但是最常用的方法是定向克隆(Recursive directional ligation, RDL)^[3–4]。

ELP 具有温度诱导的可逆相变性质, 并且 ELP 融合蛋白仍然具有这种特性^[5]。当溶液温度低于 T_t 时, ELP 以随机的单体形式溶于水溶液中。

若温度高于 T_t , ELP 呈聚集态并从水溶液中析出; 相变过程是完全可逆的, 所以当温度恢复到 T_t 以下时, ELP 又会重新溶解^[6–10]。多次可逆相变循环(Inverse transition cycling, ITC)之后, 就可以从蛋白混合液中选择性地分离出 ELP 融合蛋白。这种非色谱分离纯化重组蛋白方法, 具有技术简单、成本低廉、节省时间、易于扩大等优点^[11]。

现有的 ELP 标签分子量较大, T_t 较高(45 °C 左右), 均不是重组蛋白分离纯化标签的首选。本研究根据 ELP 特性: 在一定范围内疏水性氨基酸含量越高, T_t 越低^[1]; ELP 链长不同, T_t 不同。分析

了 20 种常见氨基酸的疏水参数, 选择了疏水性最强的 Ile(I)取代 X, 通过增加 ELP 中疏水性氨基酸的含量, 降低 T_i 。定向克隆 ELP[I]_n (n=10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120) 基因, 建立了 ELP 基因库, 为筛选表达量高、 T_i 低、分子量小的 ELP 标签奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Xba* I、*Bam*H I、*Bgl* I、

Xho I、*Nco* I、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、碱性磷酸酶(BAP)、DL2000 DNA Marker 及 IPTG, TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Dra* III、1 kb DNA Ladder、PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas 公司; DNA KB Ladder, GenScript 公司; AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, Axygen Biosciences 公司; *Taq* DNA 聚合酶、Tryptone、Yeast Extract、氯化钠、琼脂粉、氯霉素、硫酸卡那霉素, 生工生物工程(上海)有限公司; DYY-6C 型电泳仪、DYCP-31E 型电泳槽, 北京市六一仪器厂; TC-512 型 PCR 仪, 比比科技(英国)有限公司;

表 1 菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒名称 Strains and plasmids	特性 Characteristic	来源 Source
<i>E. coli</i> JM109	Host of plasmids	TaKaRa
<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Host of plasmids	Novagen
pAK400	Cloning vector, Cm ^r	苏黎大学 Plueckthun A.教授惠赠
pPICZB	Carrying a cloned segment of required, Zeocin ^r	Invitrogen
pET28(+)	Expression vector, Kan ^r	Novagen
pUC57/ELP[I] ₁₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₁₀ , Amp ^r	GenScript
pAK400/406	Cloning vector, Cm ^r	This study
pAK400LH	Cloning vector, Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₁₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₁₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₂₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₂₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₃₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₃₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₄₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₄₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₅₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₅₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₆₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₆₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₇₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₇₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₈₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₈₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₉₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₉₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₁₀₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₁₀₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₁₁₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₁₁₀ , Cm ^r	This study
pAK400LH/ELP[I] ₁₂₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₁₂₀ , Cm ^r	This study
pET28(+)/ELP[I] ₅₀	Cloning and sequencing vector, carrying ELP[I] ₅₀ , Kan ^r	This study

FR-110 型紫外分析装置, 上海复日科技有限公司; UVP GDS-8000 紫外凝胶成像系统, 美国 UVP 公司; Gel Doc™ EZ imager 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; Multiskan GO 酶标仪, Thermo 公司; 引物委托生工生物工程(上海)有限公司合成, HAP 纯化。

1.3 克隆载体 pAK400LH 的构建

由于载体 pAK400 上含有两个 *Dra* III 酶切位点, 第一个存在于 *Xba* I 和 *Bam*H I 之间, 不会影响克隆工作; 第二个存在于 *Xba* I 和 *Bam*H I 外侧, 会影响克隆工作。本实验采用片段替换与点突变的方法, 删除载体 pAK400 上的 *Dra* III 酶切位点, 便于进行后续的定向克隆工作。

1.3.1 片段替换: *Xba* I /*Bam*H I 双酶切载体 pAK400 与质粒 pPICZB。双酶切质粒 pPICZB 得到大小为 406 bp 的目的片段, 在 T4 DNA 连接酶作用下将目的基因与载体片段连接, 连接产物转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞, 通过 LB/Cm (34 mg/L) 平板筛选阳性克隆, 得到重组质粒 pAK400/406。对重组质粒 pAK400/406 进行 *Xba* I /*Bam*H I 双酶切鉴定; 选择阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.3.2 点突变: *Dra* III 单酶切得到线性化 pAK400/406, 露出 3'-端突出的粘末端, 利用 T4 DNA 聚合酶的 3'→5' DNA 外切酶活性将末端削平, 使线性 DNA 片段末端平滑化。在 T4 DNA 连接酶作用下进行自身连接, 连接产物转化入

E. coli JM109 感受态细胞, 得到重组质粒 pAK400LH。对重组质粒 pAK400LH 进行 *Dra* III 单酶切鉴定和测序鉴定。

1.4 ELP 单元的设计与基因合成

分析了 20 种常见氨基酸的疏水参数, 选择了疏水性最强的 Ile(I) (疏水参数: 4.5) 取代 ELP 五肽重复序列单元(VPGXG)中的客座残基 X, 通过增加 ELP 中疏水性氨基酸的含量, 降低 T_i 。委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成一段含 (VPGIG)₁₀ 序列的 ELP 单元, 连接在载体 pUC57 上, 即 pUC57/ELP[I]₁₀, 并转化入 *E. coli* TOP10 感受态细胞。其中 ELP 单元所含的酶切位点见图 1。

1.5 ELP 基因库的构建

1.5.1 pAK400LH/ELP[I]₁₀ 的克隆: *Xba* I /*Bam*H I 双酶切质粒 pUC57/ELP[I]₁₀ 与克隆载体 pAK400LH, 在 T4 DNA 连接酶作用下将目的基因与载体片段进行连接, 连接产物转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞, 通过抗性的 LB/Cm (34 mg/L) 平板筛选阳性克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₁₀。

1.5.2 pAK400LH/ELP[I]₂₀ 的克隆: *Dra* III/*Bgl* I 双酶切 pAK400LH/ELP[I]₁₀, 得到目的基因 ELP[I]₁₀; *Bgl* I 单酶切得到线性化 pAK400LH/ELP[I]₁₀, 为防止线性 DNA 自身环化, 用碱性磷酸酶(BAP)去除载体 DNA 片段的 5'-末端磷酸基。在 T4 DNA 连接酶作用下将目的基因与载体片段连接, 连接产物转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₂₀。在 *Taq* DNA

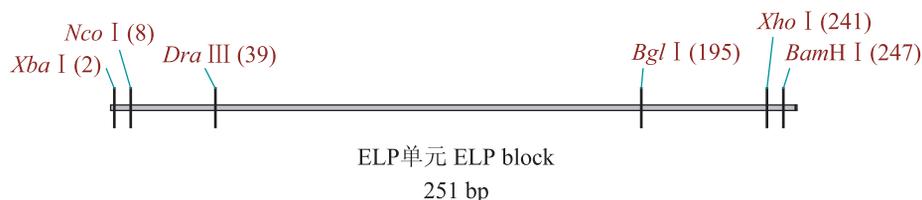


图 1 类弹性蛋白单元

Fig. 1 ELP block

聚合酶作用下, 利用引物 pAK400LH-F (5'-CTC GTATGTTGTGTGGAATTG-3') 和 pAK400LH-R (5'-CGCTTAATGCGCCGCTACAG-3') 进行菌落 PCR 鉴定, 初步筛选阳性转化子。

1.5.3 pAK400LH/ELP[I]_n (n=30、40、50、60、70、80、90、100、110、120)的克隆: 利用 1.5.2 的方法分别完成 ELP[I]₁₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₂₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₃₀; ELP[I]₂₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₂₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₄₀; ELP[I]₃₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₂₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₅₀; ELP[I]₄₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₂₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₆₀; ELP[I]₄₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₃₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₇₀; ELP[I]₅₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₃₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₈₀; ELP[I]₅₀ 向 pAK400LH/

ELP[I]₄₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₉₀; ELP[I]₆₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₄₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₁₀₀; ELP[I]₅₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₆₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₁₁₀; ELP[I]₆₀ 向 pAK400LH/ELP[I]₆₀ 克隆, 得到重组质粒 pAK400LH/ELP[I]₁₂₀; 对重组质粒分别进行菌落 PCR 筛选、酶切鉴定和测序鉴定。定向克隆示意图见图 2。

1.6 基因库有效性鉴定

1.6.1 重组表达质粒 pET28(+)/ELP[I]₅₀ 的构建: 为了鉴定建库基因的读码框正确、基因完整、可以正确表达, 随机选取库中 ELP[I]₅₀ 基因在 *Nco* I / *Xho* I 位点克隆到表达载体 pET28(+)上, 得到重组质粒 pET28(+)/ELP[I]₅₀。

1.6.2 重组质粒鉴定: 以上所构建的重组质粒均经过相应的限制性内切酶酶切及测序鉴定。

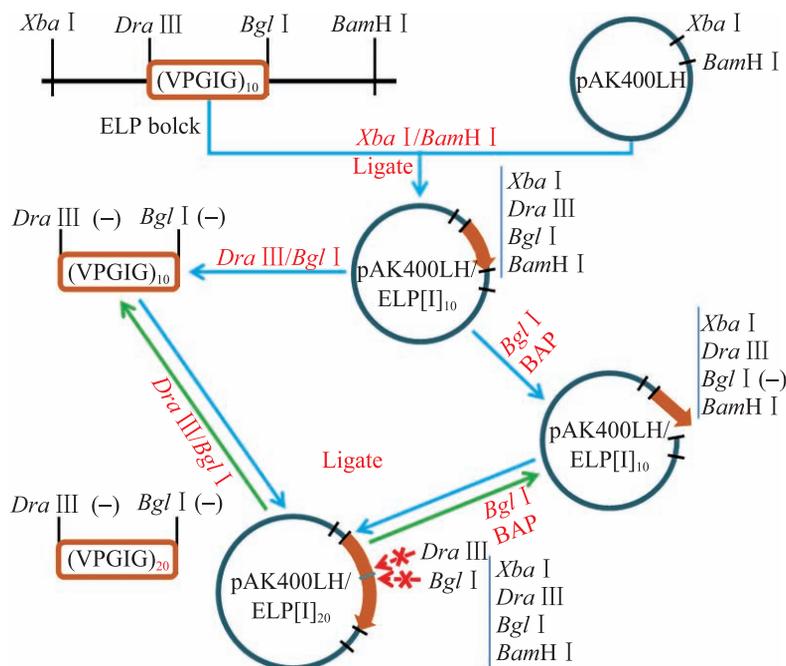


图 2 ELP 基因定向克隆示意图

Fig. 2 Schematic of cloning of ELP genes via RDL

注: - : 被相对应的酶切。

Note: - : The corresponding cleavage.

1.6.3 ELP[I]₅₀ 表达与纯化: 将 pET28(+)/ELP[I]₅₀ 转化入 *E. coli* BLR (DE3) 感受态细胞, 在 LB/Kan (50 mg/L) 平板挑取单菌落接种到 5 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜。然后按 1% 的接种量转至 250 mL 新鲜的 LB 培养基中, 当 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 °C 诱导 3 h。3 600 r/min 离心 6 min 收集菌体, 用预冷的 PBS 洗菌体一次, 再重悬于 PBS 中, 置冰浴中超声破碎, 利用 ITC 技术纯化蛋白, 取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.4 ELP[I]₅₀ 蛋白定量与相变温度测定: 用干燥称重法定蛋白浓度。 T_t 为 OD_{350} 最大值的一半时所对应的温度^[12]。测出 16 °C–32 °C ELP[I]₅₀ 终浓度为 25 μ mol/L 的 PBS 溶液在波长为 350 nm 处的浊度, 升温速率为 1 °C/10 min。

2 结果与分析

2.1 克隆载体 pAK400LH 的构建

本实验将 *Dra* III/*Bgl* I 设计为一对同尾酶, 进行 ELP 片段的定向克隆。首先利用 *Xba* I/*Bam*H I 将(VPGIG)₁₀ 亚克隆到克隆载体。由于载体 pAK400 上含有两个 *Dra* III 酶切位点, 第一个存在于 *Xba* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点之间, 不会影响下步实验; 第二个存在于两个酶切位点外侧, 将影响下一步的克隆工作。*Dra* III 单酶切载体 pAK400, 得到大小为 285 bp 的片段。为了去除第二个 *Dra* III 酶切位点, 本实验对原载体 pAK400 进行修饰, 构建了克隆载体 pAK400LH。首先进行片段替换, 利用 *Xba* I 和 *Bam*H I, 选择质粒 pPICZB, 对载体 pAK400 进行第一步修饰, 移除第一个 *Dra* III 酶切位点, 得到重组质粒 pAK400/406 (图 3); 对重组质粒 pAK400/406 上含有一个 *Dra* III 酶切位点进行封闭, *Dra* III 单酶切 pAK400/406 使其线性化, 利用 T4 DNA 聚合酶的 3'→5' DNA 外切酶活性, 将 3'-端突出的

粘末端削平, 成功构建了克隆载体 pAK400LH (图 4)。

2.2 ELP 单元的设计与基因合成

根据已经发表的数据 ELP 中疏水性氨基酸含量、链长、不同种类的盐离子、不同浓度的盐离子、聚乙二醇等, 都会不同程度的降低 ELP 的 T_t 。本实验从 ELP 疏水性氨基酸含量上降低 T_t 。选用疏水性最强的 Ile(I) 取代 ELP 五肽重复序列单元(VPGXG)中的客座残基 X, 设计了一段含

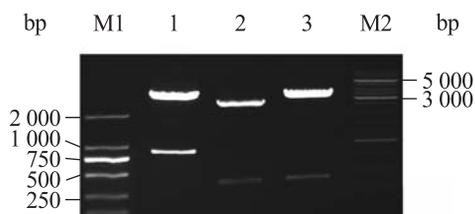


图 3 pAK400/406 克隆载体构建

Fig. 3 Construction of the vector of pAK400/406

注: M1: DL2000 DNA marker; 1: *Xba* I/*Bam*H I 双酶切 pAK400; 2: *Xba* I/*Bam*H I 双酶切 pPICZB; 3: *Xba* I/*Bam*H I 双酶切 pAK400/406; M2: 1 kb DNA ladder.

Note: M1: DL2000 DNA marker; 1: *Xba* I/*Bam*H I double digested pAK400; 2: *Xba* I/*Bam*H I double digested pPICZB; 3: *Xba* I/*Bam*H I double digested pAK400/406; M2: 1 kb DNA ladder.

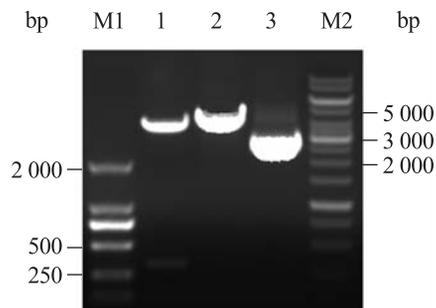


图 4 pAK400LH 定向克隆载体构建

Fig. 4 The construction of RDL cloning vector pAK400LH

注: M1: DL2000 DNA marker; 1: *Dra* III 单酶切 pAK400; 2: *Dra* III 单酶切 pAK400/406; 3: *Dra* III 单酶切 pAK400LH; M2: 1 kb DNA ladder.

Note: M1: DL2000 DNA marker; 1: The *Dra* III single digested pAK400; 2: The *Dra* III single digested pAK400/406; 3: The *Dra* III single digested pAK400LH; M2: 1 kb DNA ladder.

(VPGIG)₁₀ 序列的 ELP 单元。ELP 单元上游含 *Xba* I 和 *Dra* III 两个酶切位点, 下游含 *Bgl* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点。根据 *Dra* III 和 *Bgl* I 可以自主设计的性质, 将其设计为一对同尾酶, 确保定向克隆 ELP 单元, 具体识别位点序列见图 5。

2.3 ELP 基因库的构建

利用 *Dra* III 和 *Bgl* I 进行 ELP[I]_n 定向克隆。目的基因用 *Dra* III/*Bgl* I 双酶切得到, 载体片段用 *Bgl* I 单酶切并用碱性磷酸酶(BAP)去除 5'-末端磷酸基得到。在 T4 DNA 连接酶作用下将目的基因与载体片段进行连接。当 *Dra* III 酶切露出的粘性末端与 *Bgl* I 酶切露出的粘性末端连接时, 由于两个酶切位点的回文序列均被破坏, 所以连

Dra III recognition sites

5'...CACNNN↓GTG...3' Designed as 5'...CACGGC↓GTG...3'
3'...GTGNNNCAC...5' 3'...GTG↑CCGCAC...5'

Bgl I recognition sites

5'...GCCNNNNNGGC...5' Designed as 5'...GCCGGC↓GGGC...3'
3'...CGNNNNNCCG...3' 3'...CGG↑CCGCCG...5'

图 5 同尾酶位点示意图

Fig. 5 Demonstration of isocaudarner enzyme sites Recognition sites

注: N: 任意碱基。

Note: N: Any base.

接后的新序列不能被两个酶识别。新构建的重组质粒只含有一个 *Dra* III 识别位点, 一个 *Bgl* I 识别位点, 继续下步克隆; 由于每一个高拷贝的 ELP[I]_n (30 ≤ n ≤ 120) 的合成, 可以选用两个低拷贝 ELP 基因由多种组合方法合成。为了克隆方便, 节省时间, 我们选择了最快得到的目的基因和载体, 按照材料方法 1.5.3 中的设计组合方式克隆, 在最短的时间内构建了 ELP 基因库。ELP 基因库 *Xba* I/*Bam*H I 双酶切鉴定结果见图 6。

2.4 基因库有效性鉴定

2.4.1 重组表达质粒 pET28(+)/ELP[I]₅₀ 的构建: *Nco* I/*Xho* I 双酶切鉴定 pET28(+)/ELP[I]₅₀ (图 7), 结合测序结果, 表明表达载体构建正确。由于建库基因是相同模式构建, 证明建库基因表达框是正确的。

2.4.2 ELP[I]₅₀ 表达、纯化及相变温度: 经 3 轮 ITC 纯化蛋白。SDS-PAGE 分析表明经 3 轮 ITC 纯化得到了 ELP[I]₅₀ 纯蛋白; Gel Doc™ EZ imager 凝胶成像系统分析表明, 纯度高达 95% (图 8)。说明 ELP[I]₅₀ 基因正确表达, 并且表达的蛋白对温度敏感。经测定, ELP[I]₅₀ 在 25 μmol/L 时 T_i 为 24.3 °C (图 9)。

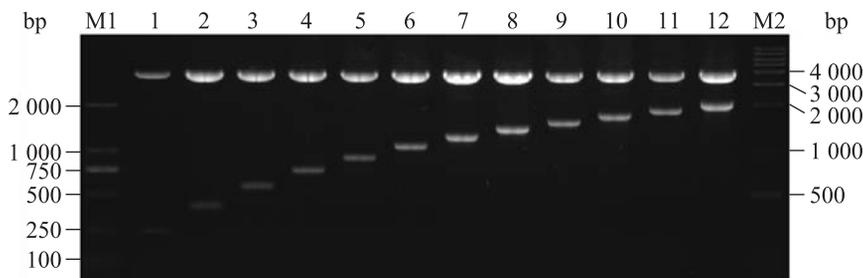


图 6 ELP 基因库 *Xba* I/*Bam*H I 双酶切鉴定

Fig. 6 *Xba* I/*Bam*H I double digestion verify ELP[I]_n

注: M1: DL2000 DNA marker; M2: DNA KB marker; 1-12: *Xba* I/*Bam*H I 双酶切 pAK400LH/ELP[I]_n (n=10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120)。

Note: M1: DL2000 DNA marker; M2: DNA KB marker; 1-12: *Xba* I/*Bam*H I double digested pAK400LH/ELP[I]_n (n=10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120)。

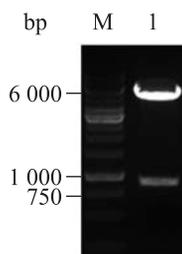


图7 *Nco* I /*Xho* I 双酶切鉴定 pET28(+)/ELP[I]₅₀
Fig. 7 *Nco* I /*Xho* I double digestion verify pET28(+)/ELP[I]₅₀

注: M: 1 kb DNA ladder; 1: *Nco* I /*Xho* I 双酶切 pET28(+)/ELP[I]₅₀.

Note: M: 1 kb DNA ladder; 1: *Nco* I /*Xho* I double digested pET28(+)/ELP[I]₅₀.

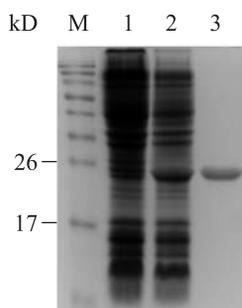


图8 ELP[I]₅₀ 的表达与纯化

Fig. 8 Expression and purification of the ELP[I]₅₀

注: M: Prestained protein ladder; 1: 诱导前总蛋白; 2: 诱导后总蛋白; 3: 经3轮ITC得到的ELP[I]₅₀纯蛋白。

Note: M: Prestained protein ladder; 1: Total proteins before induction; 2: Total proteins after induction; 3: The purified ELP[I]₅₀ after three rounds ITC.

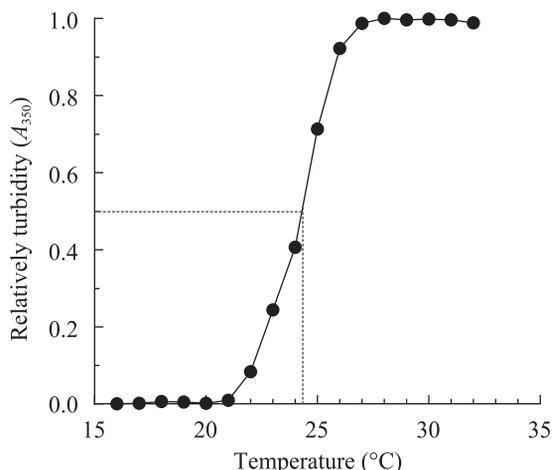


图9 含 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 ELP[I]₅₀ PBS 溶液的浑浊度与温度关系

Fig. 9 Turbidity profiles for 25 $\mu\text{mol/L}$ ELP[I]₅₀ concentration in PBS

3 讨论

ELP 作为标签已经成为重组蛋白分离纯化研究热点课题^[4]。现有的 ELP 标签分子量较大(至少 $n=60$, 才能使具有合理的 T_i)^[3], T_i 较高(45 °C 左右), 容易引起靶蛋白失活, 还需要进一步对 ELP 标签进行优化, 提高 ELP 标签的适用范围。选择正确的 ELP 标签对目的蛋白分离纯化条件和效率至关重要。为此我们构建了 ELP[I]_n ($n=10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120$) 组成的基因库。

通过随机选择库中 ELP[I]₅₀ 基因表达结果表明, 所构建的 ELP 基因库基因读码框正确、基因完整、可以正确表达, 所构建的基因库可以用于进一步筛选 ELP 标签。

本研究选择 Ile(I) 作为客座残基氨基酸。首先通过增加 ELP 中疏水性氨基酸含量, 降低 T_i 。通过 ELP[I]₅₀ 蛋白 T_i 测定研究表明, 在分子量相当的情况下, 我们设计的 ELP[I] 基因所表达的 ELP 蛋白 T_i 明显降低。研究表明, ELP 融合蛋白仍然保持相变特性, 可用于重组蛋白分离纯化^[13]。本基因库包含 ELP[I]_n ($n=10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120$), 为优化 ELP 标签奠定基础。

参考文献

- [1] Meyer DE, Chilkoti A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 846-851.
- [2] Chen TH, Bae Y, Furgeson DY. Intelligent biosynthetic nanobiomaterials (IBNs) for hyperthermic gene delivery[J]. *Pharmaceutical Research*, 2008, 25(3): 683-691.
- [3] Meyer DE, Chilkoti A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the

- elastin-like polypeptide system[J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 357–367.
- [4] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(9): 659–661.
- [5] Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(11): 1112–1115.
- [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. Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101(51): 11007–11028.
- [8] 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.
- [9] Trabbic-Carlson K, Meyer DE, Liu L, et al. Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity?[J]. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 2004, 17(1): 57–66.
- [10] 黄凯宗, 王文研, 张光亚. 类弹性蛋白多肽及其在生物医学材料的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(5): 128–132.
- [11] Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins[M]. *Current Protocols in Protein Science*, 2010: 1–6.
- [12] 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): 1417–1424.
- [13] Christensen T, Amiram M, Dagher S, et al. Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins[J]. *Protein Science*, 2009, 18(7): 1377–1387.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。