

基于 β -内酰胺酶的正向选择蛋白表达载体的构建

朱宇鹏 高九彩 赵碧玉 尚广东

(南京师范大学生命科学学院江苏省功能微生物与功能基因组学重点实验室 江苏 南京 210046)

[摘要] 外源基因的高效克隆表达是分子生物学和生物化学研究的关键技术,在同时克隆多个基因至表达载体时的高通量操作时尤其重要,常规的基因克隆操作常常存在着很高的载体背景干扰。本研究报道了一种改进型 β -内酰胺酶正向选择表达载体 pPAE 以及与麦芽糖结合蛋白融合的正向选择表达载体 pPAE-MBP。实验证明 pPAE 和 pPAE-MBP 的克隆效率均高达 100%,且目的蛋白均得到了有效的表达。pPAE 和 pPAE-MBP 有作为常规尤其是高通量蛋白表达载体来使用的潜力。

[关键词] 正选择 克隆载体 蛋白表达 麦芽糖结合蛋白 β -内酰胺酶

[中图分类号] Q819 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2011)03-0103-04

Construction of Positive-Selection Protein Expression Vectors Based on β -Lactamase

Zhu Yupeng ,Gao Jiucui ,Zhao Biyu ,Shang Guangdong

(Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics , School of Life Sciences ,
Nanjing Normal University , Nanjing 210046 , China)

Abstract: High efficient gene cloning is the key factor for molecular biology and biochemical research; it is especially important for the manipulations of cloning numerous genes simultaneously , such as the high throughput cloning. Classic cloning method usually involves high background. This paper reports the construction and applications of improved positive selection protein expression vectors of pPAE and pPAE-MBP , with latter the target protein is fused with maltose-binding protein upon protein expression. Experiments showed that both pPAE and pPAE-MBP exhibited 100% cloning efficiency and the target proteins expressed well. pPAE and pPAE-MBP can be used as protein expression vectors in general work especially in the high throughput protein expression research.

Key words: positive selection , cloning vector , protein expression , maltose-binding protein , β -lactamase

外源基因克隆至蛋白表达载体是蛋白表达和纯化的基础。常规的蛋白表达载体由于没有筛选标记,外源克隆至其多克隆位点常常有很高的背景(即未插入外源片段的原载体),即使采用碱性磷酸酯酶处理,其克隆效率也常常低于 50%。这些缺点在同时操作多个基因(如高通量蛋白表达)时尤为明显。

正选择克隆载体是一类通过抗生素或化合物等选择性压力对重组克隆进行直接筛选的载体^[1-3],它的最大优点是克隆效率,有时可达 100%。最近利用 β -内酰胺酶 C 端的最后一个密码子(色氨酸 290)是表达其氨基青霉素抗性所必需^[4]的特点,Haag 等^[5]报道了一种正选择蛋白表达载体 RHP-AmpS,其构建是通过 PCR 引入目的基因和编码色氨酸 290 的 TGG。RHP-AmpS 的克隆效率达 98%。使用 RHP-AmpS 的缺点在于其克隆策略是采用 II 型限制性内切酶 *BsaI* 酶切 PCR 的片段和以 *PreScission* 蛋白酶去除与目的蛋白融合表达的 N-端标签。但 *BsaI* 和 *PreScission* 蛋白酶均价格昂贵,这就增加了实验费用。

为降低成本,本研究构建了含色氨酸缺失的 β -内酰胺酶抗性基因(*bla*)的正选择蛋白表达载体 pPAE 以及目的基因可与 MBP(麦芽糖结合蛋白)融合表达的正选择蛋白表达载体 pPAE-MBP。二者均含 TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶的酶切位点,TEV 可在实验室自制且酶切专一性很好。MBP 由于可以大幅度地提

收稿日期: 2010-12-01.

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX091032674)。

通讯联系人:尚广东 副教授,研究方向:微生物药物的研发。E-mail: shanggd@hotmail.com

高目的蛋白的可溶性已成为使用的最为广泛的蛋白表达融合标签,MBP 也是常用的蛋白纯化的亲和标签^[8-9]. 克隆实验证明 pPAE 和 pPAE-MBP 的克隆效率均达 100% ,所克隆的大肠杆菌来源的神经氨酸醛缩酶基因^[10] 或人源肾素结合蛋白基因(表现为 N-乙酰葡萄糖胺异构酶活性)^[11] 均得到了很好的表达.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *Escherichia coli* MG1655 *E. coli* DH10B 和 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 均为实验室保存. 克隆有人源肾素结合蛋白基因的质粒 pKhRnBp 由美国 Virginia University 王计奎博士惠赠, 质粒 pBluescript KS(-) , pET30a(+) pLS970 pLS932 均为实验室保存.

1.1.2 试剂和仪器

pfu 聚合酶和 PCR 引物购自上海生工公司; 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 和 DNA 胶回收试剂盒购自大连宝生物公司; 其余试剂均为分析纯. PCR 仪为 Bio-Rad 公司 PTC-200, 蛋白胶电泳仪为 Bio-Rad 公司 Mini-Protein II.

1.1.3 DNA 序列测定

由上海生工公司及华大基因科技股份有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 分子生物学常规操作

大肠杆菌培养, 感受态细胞的制备和 DNA 的转化, 质粒提取及鉴定, SDS-PAGE 等按手册^[12] 进行.

1.2.2 PCR 扩增

反应体系: 2.5 mmol/L dNTP, 1 μM 引物, 2.5 mmol/L MgCl₂, 20 ng 质粒作模板, 5 U pfu, 加 ddH₂O 至 50 μL. 95℃ 处理 5 min 后, 95℃ 45 s, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 30 个循环, 最后在 72℃ 延伸 10 min.

本研究所使用的 PCR 引物见表 1, 引物中酶切位点以下划线表示.

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence	Restriction enzyme site(s)
EA1	5'-GGGCTCGAGTTAC GATATCAGTGAGGCACCTATCTCAG-3'	<i>Xho</i> I <i>Eco</i> RV
EA2	5'-GGGGTCGACTTCAAATATGTATCCGCTCATG-3'	<i>Sal</i> I
AL1	5'-GACGGATCCATGGCAACGAATTACGTGGC-3'	<i>Bam</i> HI
AL2	5'-GATAAGCTTTACCCGCGCTCTTGCATCAAC-3'	<i>Hind</i> III
PN1	5'-GGGGGATCCATGGCAACGAATTACG-3'	<i>Bam</i> HI
PN2	5'-TAAGCATTTGTAATCACCCGCGCTCTTGCATCAAC-3'	<i>Bam</i> HI
PRN1	5'-GGGGGATCCATGGAGAAAGAGCGAGAGACTC-3'	
PRN2	5'-TAAGCATTTGTAATTATTCGCGCGCTCGGCAGGCG-3'	

1.2.3 蛋白表达

表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 后, 挑取单菌落接种至 3 mL 含有 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基, 37℃ 振荡培养过夜. 以 1/50(V/V) 的接种量转接于 10 mL 同样培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 培养 3 h(醛缩酶) 或 30℃ 培养 6 h(异构酶), 离心收集菌体, 超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析.

2 结果

2.1 pPAE 和 pPAE-MBP 的构建

pLS970 为本实验室构建的 pET30a(+) 的衍生载体, 其中去掉了凝血酶识别位点、S-tag 序列以及部分限制性内切酶序列, 加入了 TEV 的识别位点. 以 pBluescript KS(-) 为模板, EA1 和 EA2 为引物扩增出 0.9 kb C 端色氨酸密码子缺失的 bla 基因, 扩增片段以 *Xho*I 和 *Sal*I 双酶切后克隆至 pLS970 的 *Xho*I 位点, 挑选酶切方向正确的克隆命名为 pPAE. pPAE 的质粒图谱见图 1A.

pLS932 为含 MBP 基因和一段填充片段的 pET30a(+) 的衍生载体. 将之以 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 回收 1.1 kb 片段的 MBP 基因部分, 克隆至以同样酶切的 pPAE 中, 获得 pPAE-MBP(图 1B).

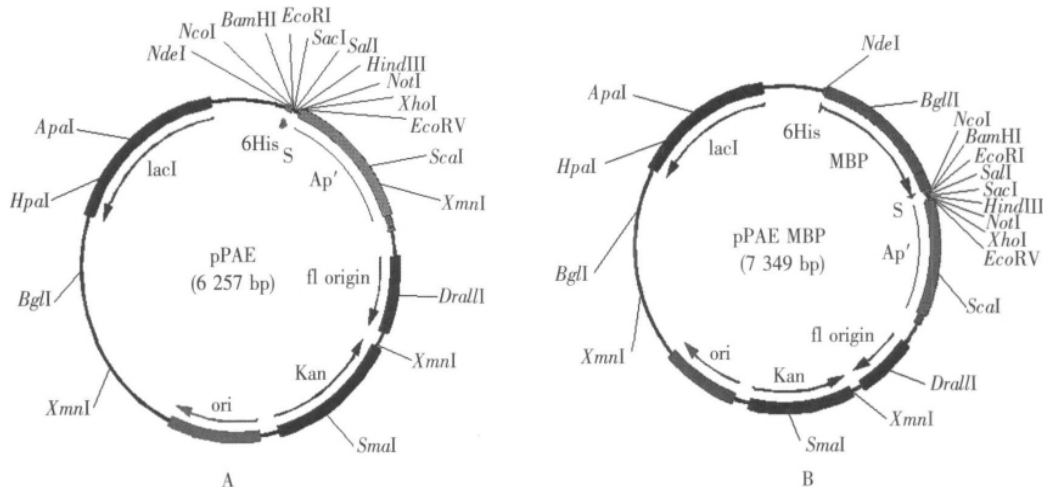
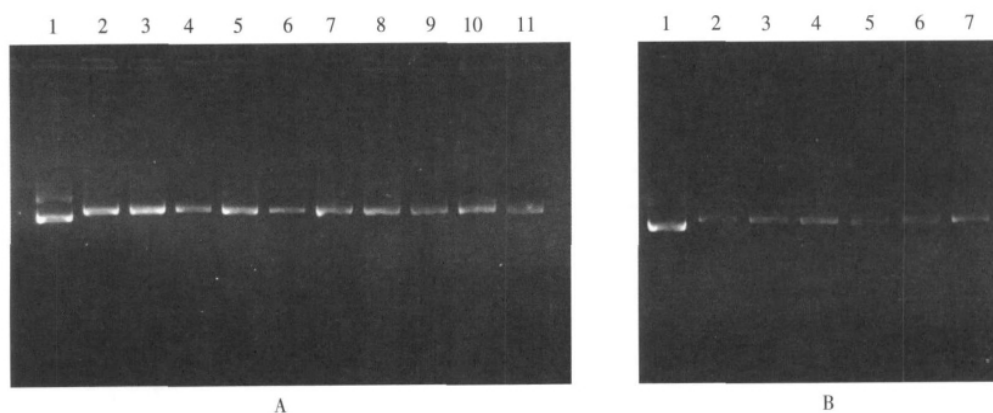


图 1 pPAE(A)和 pPAE-MBP(B)的质粒图谱
Fig.1 Restriction maps of pPAE(A) and pPAE-MBP(B)

抗性水平检测发现 *E. coli* DH10B/pPAE 及 *E. coli* DH10B/pPAE-MBP 在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的培养基上完全不能生长, 而 *E. coli* DH10B/pBluescript KS(-) 生长良好, 表明克隆在 pPAE 和 pPAE-MBP 之上的 *bla* 基因由于色氨酸密码子缺失而失活.

2.2 pPAE 和 pPAE-MBP 克隆效率的检测

以 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板, AL1 和 AL2 为引物扩增出 0.9kb 的大肠杆菌醛缩酶基因 *nanA*. *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后, 克隆至 pET30a(+) 相同位点获得 pLS122. 以 pLS122 为模板, PN1 和 PN2 为引物扩增 *nanA*, 以 *Bam*HI 酶切后与以 *Bam*HI 和 *Eco*RV 双酶切的 pPAE 相连. 在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体平板上进行筛选. 随机挑取 10 个菌落, 提取质粒, 电泳检测. 结果显示 10 个质粒均为重组克隆, 克隆效率为 100%. 质粒电泳结果见图 2A, 所得重组质粒命名为 pPAE-*nanA*.



A:1.空载 pPAE 质粒 6.2 kb; 2-11.随机挑取的 10 个 pPAE-*nanA* 重组克隆 7.1 kb; B:1.空载 pPAE-MBP 质粒 7.3 kb; 2-7.随机挑取的 6 个 pPAE-MBP-hRnBP 重组克隆 8.5 kb

图 2 两种重组子质粒的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.2 Agarose electrophoresis of recombinant clones

pKhRnBp 以 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后, 将 1.2 kb 的人源肾素结合蛋白基因 *hRnBP* 克隆至 pET30a(+) 相同位点获得 pLS314. 以 pLS314 为模板, PRN1 和 PRN2 为引物扩增出 1.2kb 的 *hRnBP* 基因, 以 *Bam*HI 酶切后与以 *Bam*HI 和 *Eco*RV 双酶切的 pPAE-MBP 相连. 在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体平板上进行筛选. 随机挑取 6 个菌落, 提取质粒, 电泳检测. 结果显示 6 个质粒均为重组克隆, 克隆效率也为 100%. 质粒电泳结果见图 2B. 所得重组质粒命名为 pPAE-MBP-hRnBP.

2.3 克隆至 pPAE 和 pPAE-MBP 的外源基因的高效表达

分别挑取一个测序正确的 pPAE-nanA 和 pPAE-MBP-hRnBP 转化 BL21 (DE3) pLysS, 所得菌株经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3 所示. nanA 和 hRnBP 所表达的蛋白分别为 34.7 kDa 和 89.8 kDa, 两个基因所表达的蛋白大小与理论值相符, 且表现出很高的可溶性组份. BandScan 软件分析可溶性组份所占总蛋白的比例分别为 37.8% 和 47.6%.

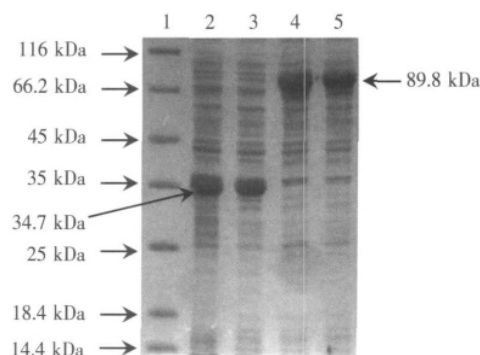
3 讨论

高效率克隆是基因和蛋白功能研究的重要基础, 尤其是同时对多个基因进行操作的高通量实验的保证. 在 Haag 等^[5]研究的基础上, 本研究利用 β -内酰胺酶抗性基因 C 端色氨酸密码子的必需性构建了正选择蛋白表达载体 pPAE 和 pPAE-MBP, 后者含有应用的最为广泛的兼具融合和亲和标签特征的 MBP. 与 Haag 等^[5]开发的载体相比, 这两个质粒的克隆操作更为简捷, TEV 也远较 PreScission 蛋白酶价廉. 与其他常用的表达载体相比, pPAE 和 pPAE-MBP 有下列明显的优点: (1) 通过氨苄青霉素抗性来筛选重组子, 克隆效率很高; (2) 只需一个限制性内切酶进行处理, 保证了目的片段都是以正确的方向插入; (3) NdeI-BamHI 酶切位点之间的序列可被其他融合标签所取代而构建不同的融合表达载体; (4) 多克隆位点前加了 6 个组氨酸标签和 TEV 酶切位点. 前者可保证融合蛋白采用最常用的 Ni^{2+} -NTA 来进行亲和纯化, 后者可使得纯化的蛋白通过 TEV 酶切而去除融合标签. 选择 TEV 酶切优点在于酶切的专一性强、反应条件要求不高、效率高, TEV 另外一个显著的优点是可在实验室自制, 这就大大地减少了总体费用; (5) 目的基因和 bla 基因的转录方向相反, 且有各自的终止密码子, 避免了通读现象的发生. PAE 和 pPAE-MBP 克隆的高重组率和酶的高可溶性表达表明了它们可得到有效的使用.

[参考文献]

- [1] Dean D. A plasmid cloning vector for the direct selection of strains carrying recombinant plasmids[J]. Gene, 1981, 15(1): 99-102.
- [2] Kast P. pKSS-a second-generation general purpose cloning vector for efficient positive selection of recombinant clones[J]. Gene, 1994, 138(1/2): 109-114.
- [3] Choi Y J, Wang T T, Lee B H. Positive selection vectors[J]. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(3): 225-344.
- [4] Huang W, Petrosino J, Hirsch M, et al. Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity[J]. J Mol Biol, 1996, 258(4): 688-703.
- [5] Haag A F, Ostermeier C. Positive-selection vector for direct protein expression[J]. Biotechniques, 2009, 46(6): 453-457.
- [6] Blommel P G, Fox B G. A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease[J]. Protein Expr Purif, 2007, 55(1): 53-68.
- [7] Rachel B, Kapust R B, Tozser J, et al. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency[J]. Protein Eng, 2001, 14(12): 993-1000.
- [8] Nallamsetty S, Waugh D S. A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag[J]. Nat Protoc, 2007, 2(2): 383-391.
- [9] Waugh D S. Making the most of affinity tags[J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(6): 316-320.
- [10] Mahmoudian M, Noble D, Drake C S, et al. An efficient process for production of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic acid aldolase[J]. Enzyme Microb Technol, 1997, 20(5): 393-400.
- [11] Takahashi S, Kumagai M, Shindo S, et al. Renin inhibits N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (renin-binding protein)[J]. J Biochem, 2000, 128(6): 951-956.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 16-34.

[责任编辑:黄敏]



1.蛋白分子量标准(kDa);2. *E.coli* BL21 (DE3)pLysS/pPAE-nanA 表达的总蛋白;3. *E.coli* BL21(DE3)pLysS/pPAE-nanA 表达的可溶性蛋白;4. *E.coli* BL21 (DE3)pLysS/pPAE-MBP-hRnBP 表达的总蛋白;5.*E.coli* BL21 (DE3)pLysS/pPAE-MBP-hRnBP 表达的可溶性蛋白

图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析重组蛋白

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins