

大肠杆菌系列融合表达载体的构建

张飞飞,王瑞青,朱宇鹏,马 超,尚广东

(南京师范大学生命科学学院,江苏省微生物工程技术研究中心,江苏省微生物与功能基因组学重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 许多异源蛋白在大肠杆菌内的表达是以不可溶、无生物学活性的包涵体形式存在,这为蛋白质的功能研究带来困难.融合表达是提高蛋白可溶性的有效方案之一.为构建通用型融合表达载体,本研究将 5 种常见的融合标签即突变型麦芽糖结合蛋白(mMBP)、小分子泛素样修饰蛋白(SUMO)、翻译起始因子(IF2-I)、氮源利用物质 A(NusA)和谷胱甘肽转移酶(GST)以及 3 种伴侣蛋白(GroEL、DnaK 和 TF)分别克隆至 pET30a(+),构建了系列融合表达载体.这些载体含有相同的克隆位点以及位于融合标签羧基端的烟草蚀刻病毒蛋白酶(TEV)的酶切位点.N-乙酰-D-葡萄糖胺 2-异构酶基因 hRnBP 克隆到 mMBP 融合表达载体后,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 检测表明融合蛋白均得到了高效表达且几乎完全可溶,TEV 酶切获得了预期的带型.全细胞偶联生成 N-乙酰-D-神经氨酸实验发现 mMBP-hRnBP 的摩尔转化率较无 mMBP 标签的体系提高了近 60%,证明了融合表达载体中融合标签的适用性.新型的原核融合表达载体为蛋白的融合表达、分离纯化及功能研究提供了更多的选择.

[关键词] 融合表达载体,融合标签,伴侣蛋白,TEV,N-乙酰-D-葡萄糖胺 2-异构酶

[中图分类号]Q819 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2013)03-0097-06

Construction of *Escherichia Coli* Fusion Expression Vectors

Zhang Feifei, Wang Ruiqing, Zhu Yupeng, Ma Chao, Shang Guangdong

(Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Many heterologous proteins exhibit as insoluble, biologically inactive inclusion body form when overexpressed in *Escherichia coli*, thus hampering the functional study. Fusion expression is a practical means to achieve soluble expression. To obtain general fusion vectors, five fusion tags, including mutated maltose binding protein(mMBP), small ubiquitin-related modifier(SUMO), initiation factor 2-I(IF2-I), N utilization substance A(NusA) and glutathione S-transferase(GST); and three chaperones, including GroEL, DanK and TF were each cloned into pET30a(+), obtaining serial fusion expression vectors. These expression vectors share the same cloning sites with tobacco etch virus protease(TEV) digestion site engineered after carboxyl terminus of fusion tag. N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase gene hRnBP was cloned into mMBP fusion vector, after IPTG induction, SDS-PAGE analysis showed that high-level expression and nearly all soluble proteins were obtained. Expected digestion patterns were achieved after TEV digestions. Comparison between the coupled well cell biocatalysis of N-acetyl-D-neuraminic acid shows that the molar conversion rate of mMBP-hRnBP is nearly 60% higher than that of hRnBP, demonstrating the newly developed expression vectors have potential for the broad applications in protein expression, isolation and function investigation.

Key words: fusion expression vectors, fusion tag, chaperone, TEV, N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase

获得可溶性的蛋白组分是研究基因和蛋白的结构和功能的前提,以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为异源表达宿主时,只有较少的蛋白具有一定比例的可溶性,大多数蛋白特别是一些具有重要生物活性的细胞膜相关蛋白都是以不可溶、无生物活性的包涵体形式存在.虽然可采用强变性剂溶解包涵体并在体外复性的方法来得到有活性的蛋白,但存在步骤繁琐和复性效率低等问题.

融合标签是指当与目的蛋白融合表达时可有效地促进后者表达并增加其可溶性的一类蛋白^[1],伴侣

收稿日期:2012-12-10.
基金项目:国家自然科学基金(NSFC81273412).
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

蛋白是指能够协助细胞内表达的蛋白折叠为正确的空间构型的一类蛋白,由于不可溶的蛋白常常是由于异常的翻译后折叠而得到非天然的构型,因此伴侣蛋白也可以增加异源表达蛋白的可溶性^[2].

麦芽糖结合蛋白(MBP)^[3]、小分子泛素样修饰蛋白(SUMO)^[4]、细菌翻译起始因子的 I 片段(IF2-I)^[5]、氮源利用物质 A(NusA)^[6]和谷胱甘肽转移酶(GST)^[7]是 5 种常见而有效的融合标签.最近的研究证明,MBP 的第 312 位丙氨酸突变为缬氨酸(A312V)和第 317 位异亮氨酸突变为缬氨酸(I317V)的突变型 MBP(mMBP)可增加与 Amylose 树脂之间的亲和力而有利于融合蛋白的亲纯化,收率可提高 10 倍以上,融合蛋白的可溶性组分也略有增加^[8].在伴侣蛋白中,GroEL、DnaK 和启动因子(TF)促进目的蛋白有效表达的作用最为明显^[9,10],而将伴侣蛋白和目的蛋白相融合的表达方式也较 2 个蛋白单独表达的操作更为简便^[11,12].

虽然有许多融合载体的报道,但这些载体绝大多数存在着商业化来源而不易获取以及克隆位点不一致而不便于选择不同的载体等问题.鉴于此,本研究选择了上述 5 种融合标签和 3 种伴侣蛋白构建了系列大肠杆菌融合表达载体,这些载体采用相同的克隆方式;融合蛋白的 N 端带有 6 个组氨酸标签(6His),因此可通过 Ni-NTA 亲和层析进行纯化;在融合标签(或伴侣蛋白)与克隆位点之间设计具有高度专一性的烟草蚀刻病毒蛋白酶(TEV)酶切位点,而有助于融合蛋白的分离^[13].

为检验所构建载体的适用性,我们选择在酶催化合成 N-乙酰-D-神经氨酸(Neu5Ac)中的 N-乙酰-D-葡萄糖胺 2-异构酶基因 hRnBP 进行实验,hRnBP 在无融合标签时的表达是完全以不可溶的形式存在,当 hRnBP 克隆至 mMBP 融合表达载体后,异源表达呈现完全的可溶性,TEV 酶切融合蛋白的带型与预期完全一致.偶联催化反应发现含融合标签表达载体的细胞的催化活性较无融合标签菌体的提高 60%,表明了这些融合表达载体的实用性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

E. coli MG1655, *E. coli* DH10B, *E. coli* BL21(DE3)和 *Saccharomyces cerevisiae* 为本实验保存的菌株. pET30a(+), pBluescript II KS(-), pGEX-4T-1, pSN101 为本实验室保存的质粒. TEV 基因由上海生工公司合成.

1.1.2 试剂和仪器

限制性内切酶、T4 连接酶、IPTG、Xgal、质粒提取和胶回收试剂盒以及 DNA 分子量标准购自大连宝生物公司;PCR 引物、pfu 聚合酶、蛋白质分子量标准、SDS、40% 丙烯酰胺溶液、氨苄青霉素和卡那霉素等购自上海生工公司. Ni-NTA 树脂购自 QIAGEN, Amylose 树脂购自 NEB. 其余试剂均为国产分析纯. PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 S1000,电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser[®].

1.1.3 DNA 测序

由南京思普金生物科技有限公司完成 DNA 测序.

1.2 方法

1.2.1 分子生物学常规操作

大肠杆菌的培养、感受态细胞的制备和 DNA 转化、质粒提取和酶切鉴定以及 PCR 扩增等实验按手册^[14]进行. 本研究所使用的 PCR 引物见表 1.

1.2.2 系列融合表达载体的构建

以 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板,ME1-ME2 和 ME3-ME4 为引物分别扩增得到 1.0 kb 和 0.17 kb 的片段.2 个片段合并为模板,以 ME1-ME4 为引物通过重叠延伸 PCR(OE-PCR)得到 1.3 kb 的 MBP 片段.为了后续克隆方便,其中 *Nco* I 酶切位点 CCATGG 突变为 CTATGG,但其编码的苏氨酸保持不变. MBP 片段经 *Xba* I -*Bam* H I 酶切克隆至 pBluescript II KS(-),随后和从 pSN101 以 *Bam* H I -*Hind* III 酶切得到的 1.5 kb 填充片段通过三片段法克隆至表达载体 pET30a(+)的 *Nde* I -*Hind* III 位点,获得重组质粒 pLS902.以 pLS902 为模板,分别以 ME5-ME6 和 ME7-ME8 为引物,PCR 扩增得到 0.6 kb 和 0.3 kb 的片段,2 片段合并为模板,以 ME5-ME8 为引物,OE-PCR 得到 0.9 kb 的 mMBP 片段.将 mMBP 克隆至 pBluescript II KS(-),测

序确认其含有 A312V 和 I317V 的双突变后, *Bgl* II -*Eco*R I 酶切的 mMBP 片段置换 pLS902 中的相应部分而获得 mMBP 融合表达载体 pLS912.

表 1 本研究所使用的寡核苷酸引物
Table 1 Oligonucleotides used for this study

名称	序列(5'-3')	酶切位点
ME1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTG	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
ME2	TCTGGGCGTTTTCCATAGTGGCGGCAATACGTGGATCTTTC	
ME3	GTATTGCCGCCACTATGGA ^{AAACGCCCAGAAAGGTGAAAT}	<i>Bam</i> H I , <i>Nco</i> I
ME4	AAAGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCACTCTGCGCGTCTTTCAGGGC	
ME5	GGGAAAGCTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAAC	<i>Hind</i> III
ME6	GTTTTCCATAGTGGCGGCAAACAGTGGATCTTTCACCAACTCTTCCTCGTAAGACTTC	
ME7	GAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAGATCCACGTGTTGCCGCCACTATGGAAAAAC	<i>Bam</i> H I
ME8	GGACGAATTCCAAGACGTGGTCGAC	
ME9	GGG <u>TCTAGACATATG</u> GAAGAAGGTAAACTGGTAATCTG	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
SU1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACATGTCGGACTCAGAAGTCAATC	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
SU2	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCCATACGTAGCACCAATCTGTTTC	<i>Bam</i> H I , <i>Nco</i> I
IFE1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ATACATGACAGATGTAACGATTA ^{AAAAAC}	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
IFE2	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCCACTTTGTCTTTTTCGCAGC	<i>Bam</i> H I , <i>Nco</i> I
NE1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACGTATCCAATGAAAAGGCGCTACC	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
NE2	GCGATATCCATAGTGTGTTTATCTTCATCCACCACGATAG	
NE3	GGATGAAGATAAACACACTATGGATATCGCCGTGTAAGCCGGTAAC	<i>Bam</i> H I , <i>Nco</i> I
NE4	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCTGTCACCGAACCAGCAAATATTAC	
GE1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACATGTC ^{CCCTATACTAGGTTATTG}	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
GE2	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCTTTTGAGGATGGTCGCCACCAC	<i>Bam</i> H I , <i>Nco</i> I
GBM1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACATGGCAGCTAAAGACGTA ^{AAAATTC}	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
GBM2	GTTACTTTGGTTGGATCGAGGATACCCATGTCGATC	
GBM3	GATCGACATGGGTATCCTCGATCCAACCAAAGTAAC	<i>Bam</i> H I
GBM4	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCTAAGTCAGCTGCATCGTTTTCGG	
DNM1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACATGGGTAAATAATTGGTATC	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
DNM2	CATCACACCGCCCATAGTTTCGATACCCAG	
DNM3	CTGGGTATCGAAACTATGGGCGGTGTGATG	<i>Bam</i> H I
DNM4	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCTTCAAATTCAGCGTCGACAACATC	
TGC1	GGG <u>TCTAGACATATGCACCATCATCATCATC</u> ACATGCAAGTTTCAGTTGAAACC	<i>Xba</i> I , <i>Nde</i> I
TGC2	GGGGGATCCCATGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCCGCGCTGCTGGTTCATCAGCTC	<i>Bam</i> H I

注:酶切位点以下划线表示,所引入的突变位点以粗体表示.

以 *S. cerevisiae* 基因组 DNA 为模板, SU1-SU2 为引物扩增得到 0.4 kb 的 SUMO 片段,克隆至 pBluescript II KS(-),随之和 1.5 kb 的填充片段采用上述相同的克隆方式克隆至 pET30a(+),获得 SUMO 融合表达载体 pLS922.

IF2-I 和 NusA 片段均来源于 MG1655 基因组. IF2-I 融合表达载体 pLS942 是以 IFE1 和 IFE2 为引物扩增得到 0.6 kb 的 IF2 片段,采用相同的克隆方式得到. NusA 融合表达载体 pLS952 是分别以 NE1-NE2 和 NE3-NE4 为引物,扩增得到 0.9 kb 和 0.7 kb 片段,2 个片段合并为模板,以 NE1-NE4 为引物,OE-PCR 扩增得到 1.5 kb 的 NusA 片段,NusA 中的 *Nco* I 位点 CCATGG 突变为 CTATGG,但其编码的苏氨酸保持不变.

GST 融合表达载体 pLS962 是以 pGEX-4T-1 为模板,GE1-GE2 为引物扩增得到 0.7 kb 的 GST 片段,同法克隆.

伴侣蛋白基因均来源于 MG1655 基因组. 分别以 GBM1-GBM2 和 GBM3-GBM4 为引物,扩增出 1.5 kb、0.13 kb 的片段,2 个片段合并为模板,以 GBM1-GBM4 为引物,OE-PCR 扩增得到 1.6 kb 的 GroEL 片段,其中 *Bam*H I 位点 GGATCC 突变为 CGATCC,但其编码的亮氨酸保持不变. 分别以 DNM1-DNM2 和 DNM3-DNM4 为引物,PCR 扩增得到 1.2 kb 和 0.7 kb 的 DNA 片段,2 个片段合并为模板,以 DNM1-DNM4 为引

物,OE-PCR 扩增得到 1.9 kb 的 DnaK 片段,其中 *Nco* I 位点 CCATGG 突变为 CTATGG,但其编码的苏氨酸保持不变.1.3 kb 的 TF 片段是以 TGC1 和 TGC2 为引物扩增得到.采用上述克隆策略,分别得到 GroEL 融合表达载体 pLS1120,DnaK 融合表达载体 pLS1121 和 TF 融合表达载体 pLS1128. 本研究的克隆宿主菌为 DH10B,所有重组克隆均经酶切和测序鉴定.

1.2.3 异源基因的克隆和融合表达

合成的 TEV 基因克隆至 pLS912 中得到 pLS972, hRnBP 基因(王计奎博士惠赠)分别克隆至 pET30a(+)和 pLS912 获得 pLS1806 和 pLS1807. 转化异源表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3),单菌落于 3 mL 含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中过夜培养,以 1:50 转接入 10 mL 相同培养基中,37 ℃ 培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.8 时,然后加入 1 mmol/L IPTG 于 30 ℃ 诱导 6 h,离心收集菌体,超声破碎后,SDS-PAGE 观察融合蛋白的表达.

1.2.4 融合蛋白的纯化

采用 Amylose 亲和层析分离 mMBP 融合蛋白. 收集诱导表达菌体,用上样缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA,pH 8.0)重悬,置于冰上超声破碎,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清. 用 10 倍柱体积的缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,0.2 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA)平衡 Amylose 树脂,加入菌液上清与树脂于 4 ℃ 结合 1 h,然后用 10 倍柱体积的缓冲液 A 洗涤树脂 3 次,最后用洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,0.2 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,10 mmol/L 麦芽糖)洗脱融合蛋白. 采用 Ni-NTA 树脂纯化 TEV 蛋白. 同上菌体裂解和收集上清,加至用裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑)洗涤和平衡后的树脂,结合 1 h,然后用洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,40 mmol/L 咪唑)洗涤树脂 3 次,最后用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑)洗脱 2 次获得目的蛋白. 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 分析后,以 Bradford 方法测定含量. 加甘油至终浓度 20%,−80 ℃ 保存.

1.2.5 融合蛋白的 TEV 酶切

50 μL 体系,TEV 和融合蛋白的摩尔比为 1:30,30 ℃ 过夜酶切,SDS-PAGE 电泳分析.

1.2.6 Neu5Ac 的全细胞偶联催化

分别将异构酶菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pLS1806、*E. coli* BL21(DE3)/pLS1807 和醛缩酶表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pLS122(待发表)诱导基因表达,离心收集菌体后,按 1:100 悬浮至 50 mmol/L 10 mL Tis. Cl(pH 8.0). 反应体系:50 mmol/L Tis. Cl(pH 8.0),1.2 mol/L 葡萄糖胺,0.8 mol/L 丙酮酸钠,10 mmol/L MgCl₂,异构酶和醛缩酶全细胞分别为 1 mL,于 37 ℃ 进行反应,分别于 12 h 和 36 h 取样测定 Neu5Ac 的含量.

1.2.7 Neu5Ac 的含量测定

采用高效液相法,分析条件为:Bio-Rad Aminex 87H 酸性糖基柱,柱温 65 ℃,流动相为 6 mmol/L H₂SO₄,流速为 0.6 mL/min. Neu5Ac 的保留时间为 9.87 min. 通过和标准品(Sigma-Aldrich,USA)峰面积的比较来计算样品的含量.

2 结果与分析

2.1 双标签融合表达载体的构建

为简化异源基因的克隆和增加蛋白的可溶性表达,本研究将系列融合标签和伴侣蛋白基因与一个 1.5 kb 的填充片段(Stuffer)克隆至表达载体 pET30a(+),获得了系列大肠杆菌异源融合表达载体. 在融合标签(或伴侣蛋白基因)和填充片段之间引入 TEV 酶切位点(ENLYFQ↓G)的碱基序列,具体的实验步骤见“方法”部分,系列载体的结构示意图如图 1 所示.

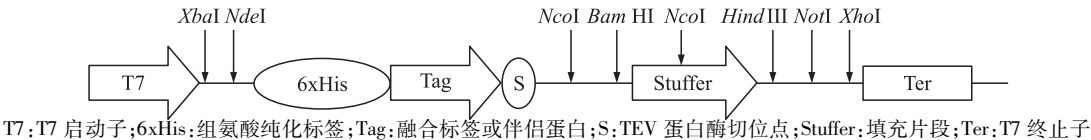


图 1 融合表达载体的结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of the fusion expression vector

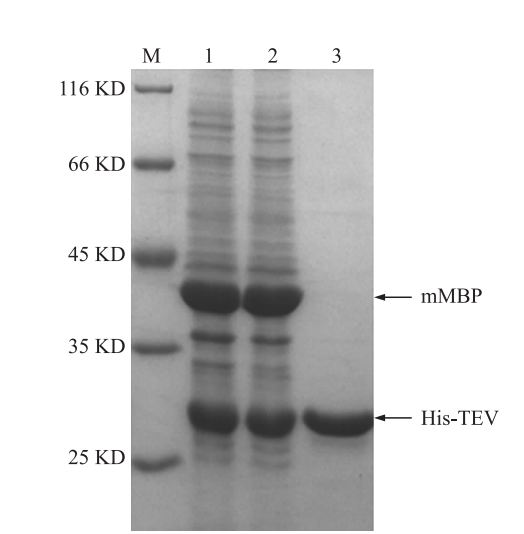
2.2 TEV 蛋白的表达和纯化

mMBP-TEV 融合蛋白表达后,于 mMBP 和 TEV 之间的 TEV 酶切位点切割此融合蛋白(即发生细胞内剪切)而释放 TEV. S-PAGE 结果显示,经 IPTG 诱导表达的菌株获得了分子量为 41.7 kD 和 27.8 kD 的表达条带,分别对应 mMBP 标签和 TEV 蛋白,与预期大小相符,TEV 最终表达和纯化结果如图 2 所示.

2.3 mMBP 融合蛋白的表达,分离纯化和 TEV 酶切

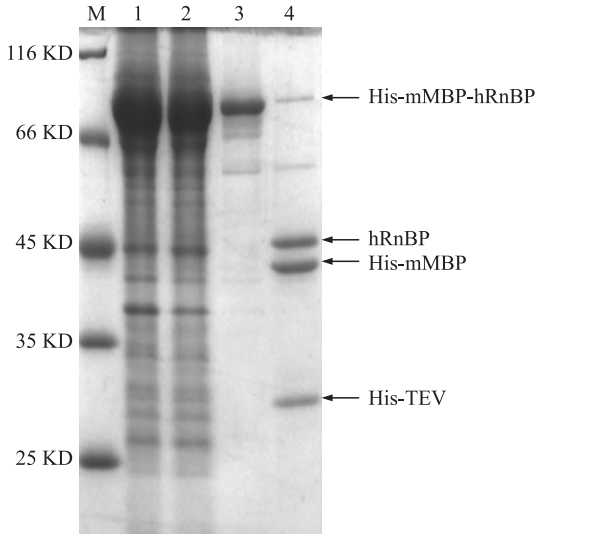
异构酶是酶法催化合成神经氨酸的关键步骤,高效表达的异构酶将有助于神经氨酸的催化工艺的优化. 尽管尝试了许多方法,如温度、培养基、诱导剂的浓度梯度等参数,hRnBP 所表达的蛋白几乎完全不可溶. 而将之克隆至本研究所构建的载体进行 mMBP 与 hRnBP 融合表达后发现,mMBP-hRnBP 高效表达,且几乎以完全可溶性的形式存在.

融合蛋白以 Amylose 亲和层析纯化后,SDS-PAGE 检测纯度达到电泳纯度(>90%). TEV 酶切后,mMBP 标签和目的蛋白得到了很好的分离. 其中 His-MBP 的大小为 41.7 kD,目的蛋白的 hRnBP 大小为 48.1 kD,均与预期大小一致. mMBP-hRnBP 融合蛋白的表达,分离纯化和 TEV 酶切结果如图 3 所示.



M: 蛋白分子量标准;1:总蛋白;2:可溶性蛋白;
3: Ni-NTA 纯化的 TEV

图2 融合蛋白 mMBP-TEV 的表达和 TEV 的纯化
Fig.2 mMBP-TEV fusion protein expression and TEV purification



M: 蛋白分子量标准;1:总蛋白;2:可溶性蛋白;3: Amylose 纯化的融合蛋白;4: TEV 酶切产物,目的条带以箭头表示

图3 融合蛋白 mMBP-hRnBP 的表达、纯化及 TEV 酶切
Fig.3 Expression, purification and TEV digestion of mMBP-hRnBP fusion protein

2.4 Neu5Ac 的偶联催化

分别将表达融合和非融合异构酶 hRnBP 和醛缩酶的细胞进行酶法偶联催化形成 Neu5Ac 的活性测定,以高效液相分析 Neu5Ac 摩尔转化率的结果见表 2.

表 2 N-乙酰-D-神经氨酸转化率比较
Table 2 Neu5Ac molar conversion rate(%) comparison

菌株	12 h	36 h
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLS1806+ <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLS122	2.6	5.2
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLS1807+ <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLS122	3.9	8.2

由此可见,融合表达的 MBP-hRnBP 较未融合状态的 MBP 在 12 h 的产率提高了 50%,而在 36 h 的产率提高了 60%.

3 讨论

本研究构建了 mMBP、SUMO、IF2- I、NusA 和 GST 等 5 种标签以及 GroEL、DnaK 和 TF 等 3 种伴侣蛋白的融合表达载体. 这些载体均有相同的结构:5'端的克隆位点为 *Nco* I 和 *Bam*H I,3'端的克隆位点为 *Hind* III、*Not* I 和 *Xho* I. *Nco* I 与 *Afl* III、*Bsa* I 为同尾酶;*Bam*H I 与 *Bgl* II、*Bcl* I、*Mbo* I 为同尾酶;*Xho* I 和

Sal I 为同尾酶. 如果目的基因中含有载体上的克隆位点的话,可以设计同尾酶的酶切位点进行克隆. 故原理上来说,几乎任何外源基因都可以克隆至这些载体. 填充片段中含有一个 *Nco* I 位点,这样以 *Nco* I 克隆外源基因时,可酶切得到2个片段,更易于载体的分离. 所构建的载体含有相同的克隆位点这一特点,也便于在不同载体之间进行转换而尝试不同的融合标签.

此系列载体仍保留了 pET30a(+) 表达载体上的6个组氨酸纯化标签,融合蛋白可通过 Ni-NTA 亲和层析来纯化, mMBP 和 GST 这2个标签的融合蛋白还可采用亲和树脂和 Ni-NTA 亲和层析相结合的方式纯化目的蛋白. 在融合标签的羧基端设计了 TEV 蛋白酶切位点用于分离融合标签和目的蛋白. TEV 酶切去除融合标签后的目的蛋白可通过 Ni-NTA 亲和层析,在流出液中获得. TEV 蛋白具有识别特异性强、切除效率高、反应条件温和、在多种蛋白酶抑制剂的溶液中仍保持活性、在高浓度储存液也不会发生特异性降解等优点,已成为最为常用的蛋白切割酶. 本研究所使用的为自制的 TEV,且表现出与 Invitrogen 公司的 AcTEV 酶相似的活性.

mMBP 和人源基因 hRnBP 的融合表达, TEV 酶切以及酶法偶联催化提示了本研究所构建的系列融合表达载体的实用性. 异构酶基因的高表达和活性的提高也为神经氨酸的酶法催化合成的研究奠定了基础.

[参考文献]

- [1] Waugh D S. Making the most of affinity tags[J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(6): 316–320.
- [2] Houry W A. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm[J]. Curr Protein Pept Sci, 2001, 2(3): 227–244.
- [3] Guana C, Lib P, Riggs P D, et al. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein[J]. Gene, 1988, 67(1): 21–30.
- [4] Marblestone J G, Edavettal S C, Lim Y, et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO[J]. Protein Sci, 2006, 15(1): 182–189.
- [5] Sorensen H P, Sperling-Petersen H U, Mortensen K K. A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin[J]. Protein Expr Purif, 2003, 32(2): 252–259.
- [6] De Marco V, Stier G, Blandin S, et al. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(3): 766–771.
- [7] Wu X, Oppermann U. High-level expression and rapid purification of rare-codon genes from hyperthermophilic archaea by the GST gene fusion system[J]. J Chromatogr B, 2003, 786(1): 177–185.
- [8] Walker I H, Hsieh P, Riggs P D. Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(1): 187–197.
- [9] Kyratsous C A, Silverstein S J, DeLong C R, et al. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Gene, 2009, 440(1/2): 9–15.
- [10] Deuerling E, Schulze-Specking A, Tomoyasu T, et al. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins[J]. Nature, 1999, 400(6745): 693–696.
- [11] Thapa A, Shahnawaz M, Karki P, et al. Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins[J]. Biotechniques, 2008, 44(6): 787–796.
- [12] Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, et al. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(3): 884–889.
- [13] Kapust R B, Tozser J, Fox J D, 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.
- [14] 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]