

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)04-0360-03

乙醇对结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的促进作用

杨军兰, 徐 焰, 苏明权, 郝晓柯, 于文彬 (第四军医大学西京医院检验科, 陕西 西安 710033)

Ethanol facilitates soluble expression of M_r 38 000 protein of mycobacterium tuberculosis in *E. coli*

YANG Jun-Lan, XU Yan, SU Ming-Quan, HAO Xiao-Ke, YU Wen-Bin

Department of Clinical Laboratories, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To increase the soluble expression of the recombinant M_r 38 000 protein by using ethanol. METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was employed to amplify the encoding gene of M_r 38 000 protein from mycobacterium tuberculosis H37Rv and the amplified fragment was ligated to plasmid pGEX-4T-2. After the expression vector was transformed into *E. coli* BL21, ethanol and IPTG were added to induce the expression of the GST-38 fusion protein. The molecular mass and expression form of the fusion protein was analyzed by SDS-PAGE and the activity of the protein was identified by western blotting. RESULTS: The expression vector was constructed successfully. There was about 18% of fusion protein in total cellular proteins of the *E. coli*. A little soluble protein could be identified in the absence of ethanol while soluble protein increase in the yield to 5-fold in the presence of ethanol. CONCLUSION: As a supplementation, ethanol can facilitate the soluble expression of the M_r 38 000 protein of mycobacterium tuberculosis in *E. coli*.

【Keywords】 mycobacterium tuberculosis; M_r 38 000 protein; fusion proteins; soluble proteins

【摘要】 目的: 探讨乙醇促进结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白的可溶性表达, 并获得可溶性的 M_r 38 000 重组蛋白。方法: 采用聚合酶链反应(PCR)从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组中扩增出 M_r 38 000 蛋白的编码基因, 用限制性内切酶消化后插入载体 pGEX-4T-2 中, 将重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 在乙醇添加剂存在下, 经 IPTG 诱导, 表达 GST-38 融合蛋白, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析融合蛋白的相对分子质量及表达形式, 免疫印迹法鉴定融合蛋白的活性。结果: 经 PCR 扩增后证实为 M_r 38 000 蛋白的基因, 成功构建了具有正确基

因序列的重组表达载体, 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达融合蛋白约占菌体总蛋白的 18%。在乙醇存在下, 可溶性目的蛋白的表达量约是无乙醇时的 5 倍。结论: 在原核表达中乙醇作为一种添加剂可以促进结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白在大肠杆菌 BL21 中的可溶性表达。

【关键词】 分枝杆菌; 结核; M_r 38 000 蛋白; 融合蛋白; 可溶性蛋白

【中图分类号】 R378 **【文献标识码】** A

0 引言

原核表达中, 重组蛋白常常是以包涵体的形式表达, 对包涵体进行变性、复性不仅操作烦琐, 而且重组蛋白的活性也往往受到影响。在以前的实验里, 也有人对结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白进行克隆表达, 但是所得到的通常仍是 M_r 38 000 蛋白的包涵体^[1]。研究^[2]表明, 通过在培养中加入乙醇, 能够抑制某些蛋白在表达时的聚集, 促进其正确折叠形成可溶的蛋白。我们利用乙醇作为添加剂在大肠杆菌中对结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白进行诱导表达, 得到了较高浓度的可溶性重组蛋白, 为研究其生物学特性和临床应用提供方便。

1 材料和方法

1.1 材料 MTB H37Rv 株, 大肠杆菌 BL21, pGEX-4T-2 质粒, 兔抗结核分枝杆菌血清均为本科提供; dNTPs, Taq DNA 聚合酶, T4 连接酶, BamHI, EcoRI, DNA 胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒购自 Vitagene 公司, 氯霉素批号为 L030619, 购自山东鲁抗医药股份公司, DNA Marker 和蛋白 Marker 购自大连宝生物工程有限公司, 乙醇为 A. R 级, 由开封化学试剂总厂生产, 羊抗兔 IgG 及辣根过氧化物酶购自武汉博士德生物制品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 根据基因库 MTB M_r 38 000 蛋白的基因序列, 设计特异性引物序列 P1: 5'-AGGG-GATCCGTGAAAATTCGTTTGCATACGCT, 含 BamHI 酶切位点和起始密码子; P2: 5'-GATGAATTCAGG-GAGGTTGCTGTCGCGTGGTG, 含 EcoRI 酶切位点和终止密码子。由上海生工生物技术服务有限公司合成。

1.2.2 结核杆菌 H37Rv 株基因组 DNA 的提取 取适量 MTB H37Rv 株培养菌加入到 100 μ L 蛋白酶 K 裂解液中, 置于 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 灭活

收稿日期 2004-09-03; 修回日期 2004-10-20

通讯作者 郝晓柯. Email. HXKG@163.com

作者简介 杨军兰(1977-), 女(汉族), 江苏省淮安市人, 硕士生(导师 郝晓柯). Tel. (029) 81911522 Email. orchid7788@hotmail.com

蛋白酶 K 10 000 g 离心 1 min ,取上清 ,用酚 - 氯仿抽提 ,无水乙醇沉淀 ,溶于 100 μ L 水中备用。

1.2.3 M_r 38 000 蛋白基因的扩增与克隆 以 MTB H37Rv 基因组 DNA 为模板 ,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR ,循环参数为 94 $^{\circ}$ C 5 min ,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s ,60 $^{\circ}$ C 复性 30 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min ,共 30 个循环 ,末次循环 72 $^{\circ}$ C 自动延伸 10 min ,扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测纯度。胶回收试剂盒回收目的条带 ,将其与质粒 pGEX-4T-2 同时用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 ,按 6:1 的比例混匀 ,T4 连接酶连接 ,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。从长出菌落的含氨苄青霉素的 2 \times YT 培养平板上挑选 2 个菌落分别接种到 5 mL 含氨苄青霉素 2 \times YT 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10 h ,用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA ,进行双酶切 ,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定 ,同时以 DNA Marker 为参照 ,将阳性克隆送上海生工生物技术服务有限公司测序。

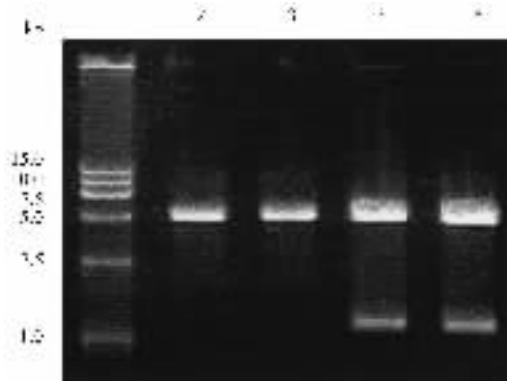
1.2.4 重组质粒的初步诱导表达及鉴定 取含重组克隆的培养液 50 μ L 接种于 5 mL 的含氨苄青霉素的 2 \times YT 液体培养基 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜 ,然后从中取 1 mL 接种到 100 mL 新鲜含氨苄青霉素的 2 \times YT 液体培养基 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h 至 A_{600nm} 约为 0.6 ,在 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L ,1 mmol/L ,分别于 37 $^{\circ}$ C ,30 $^{\circ}$ C 条件下继续培养 5 h ,12% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ,观察结果 ,并通过凝胶薄层扫描测定其表达量。重新 SDS-PAGE 电泳后的凝胶直接电转移 1 h 至硝酸纤维素膜 ,用小牛血清封闭 2 h ,加入抗结核分枝杆菌的多克隆抗体作用 2 h ,用 TTBS 缓冲液冲洗 ,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作用 1 h ,以 DAB 显色观察结果。

1.2.5 重组蛋白的可溶性表达 取过夜培养的含重组克隆的培养液 10 mL 接种到 1 L 新鲜含氨苄青霉素的 2 \times YT 液体培养基 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600nm} 约为 0.6 ,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L ,然后将其倒在 5 个培养瓶中 ,每瓶 200 mL 的培养菌 ,分别加入乙醇浓度为体积分数 0 ,0.01 ,0.02 ,0.03 ,0.04 ,30 $^{\circ}$ C 条件下继续振荡培养 5 h ,4 $^{\circ}$ C 8000 g 离心集菌 ,用 PBS 缓冲液洗 1 次 ,重悬后冰浴中超声破碎 30 s \times 6 次 ,12 000 g 离心 30 min ,对上清和沉淀分别进行 12% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ,鉴定重组蛋白的表达形式 ,并通过凝胶薄层扫描测定其表达量。

2 结果

2.1 目的基因的扩增 应用上述合成的两种引物 ,以结核分枝杆菌 H37Rv37 基因组 DNA 为模板 ,获得目的 DNA 片段 ,与在基因库中查到的结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白的基因大小基本一致约为 1150 bp。

2.2 目的基因的克隆及序列分析 从转化后的大肠杆菌中提取质粒双酶切 ,切出 1150 bp 的目的基因片段和 pGEX-4T-2 质粒 4970 bp 的片段 ,而空质粒对照只得到一条 4970 bp 的片段 (Fig 1)。阳性克隆经美国 ABI-377 测序仪双向测序 ,插入载体 pGEX-4T-2 的基因序列与基因库中的结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白基因完全一致。将重组质粒命名为 pGEX-38。

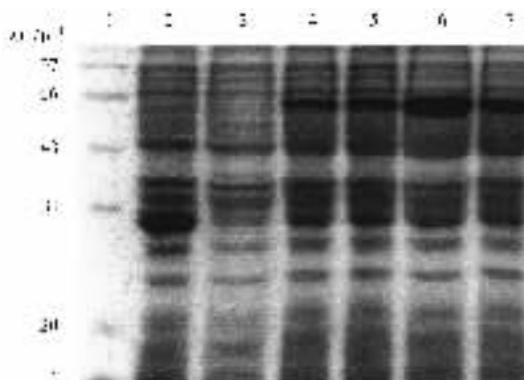


1 : DNA ladder ; 2 3 : Vector pGEX-4T-2 digested with *Bam*HI/*Eco*RI ; 4 5 : Recombinant vector pGEX-38 digested with *Bam*HI/*Eco*RI.

Fig 1 Identification of recombinant vector pGEX-38 by enzyme digestion

图 1 重组质粒 pGEX-38 的酶切鉴定

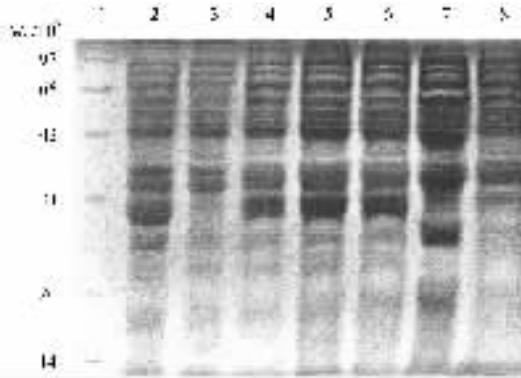
2.3 重组质粒的初步表达及其鉴定 重组质粒 pGEX-38 转化大肠杆菌 ,不同条件下诱导培养 ,SDS-PAGE 电泳结果显示 :在 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L ,30 $^{\circ}$ C 条件下融合蛋白的表达量最高 ,凝胶薄层扫描测定融合蛋白可占到菌体总蛋白的 18% (Fig 2)。免疫印迹实验发现在相对分子量约 M_r 63 000 处有一条显色带 ,表明此表达产物能与抗 MTB 多克隆抗体发生特异性结合。



1 : Protein marker ; 2 : Expression of vector pGEX-4T-2 GST protein ; 3 : Expression of GST-38 fusion protein without IPTG ; 4 - 7 : Expression of GST-38 fusion protein in IPTG 0.5 mmol/L 37 $^{\circ}$ C ; in IPTG 1 mmol/L , 37 $^{\circ}$ C ; in IPTG 0.5 mmol/L 30 $^{\circ}$ C ; in IPTG 1 mmol/L 30 $^{\circ}$ C respectively.

Fig 2 Optimization of expression of GST-38 fusion protein
图 2 GST- M_r 38 000 融合蛋白表达条件的优化

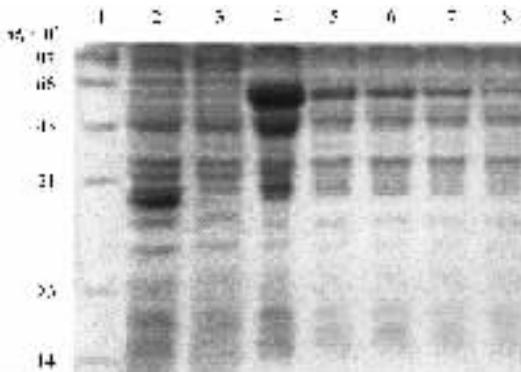
2.4 重组蛋白的可溶性表达 不同乙醇浓度时,培养液经诱导表达,SDS-PAGE电泳结果显示:在乙醇体积分数为0时,重组蛋白有少量可溶表达,0.03时可溶表达的量最高(Fig 3),凝胶薄层扫描测定其表达量约是无乙醇时的5倍。随着可溶蛋白的增加,包涵体的量逐渐减少(Fig 4)。



1: Protein marker; 2: Expression of vector pGEX-4T-2 GST protein; 3: Expression of GST-38 fusion protein without IPTG; 4: Expression of GST-38 fusion protein without ethanol; 5, 6, 7, 8: Soluble expression of GST-38 fusion protein in 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ethanol respectively.

Fig 3 Soluble expression of GST-38 protein in different concentrations of ethanol

图3 不同乙醇浓度 GST- M_r 38 000 融合蛋白的可溶性表达



1: Protein marker; 2: Expression of vector pGEX-4T-2 GST protein; 3: Expression of GST-38 fusion protein without IPTG; 4: Expression of GST-38 fusion protein without ethanol; 5, 6, 7, 8: Inclusion bodies of GST-38 fusion protein in 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ethanol respectively.

Fig 4 Inclusion bodies of GST-38 fusion protein in different concentrations of ethanol

图4 不同乙醇浓度 GST- M_r 38 000 融合蛋白的包涵体

3 讨论

自从折叠辅助蛋白被发现以来,如:分子伴侣和折叠酶,利用它们和重组蛋白共同表达可以期望得到更多可溶的、有活性的重组蛋白。大肠杆菌的几种分子伴侣和折叠酶,如 DnaK-DnaJ-GrpE 和 GroEL-GroES 已经被证明可以促进重组蛋白的正确折叠,得到

可溶性的蛋白^[3-6]。乙醇是大肠杆菌热休克反应最强的诱导剂之一,它在转录水平刺激 danKJ 基因上调,通过诱导 DnaK 和 DnaJ 蛋白的表达促进重组蛋白可溶性表达^[7]。

在本实验中,我们在表达结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白时加入乙醇,同时利用较低的生长温度和丰富的培养基对 M_r 38 000 蛋白进行诱导表达,结果显示 M_r 38 000 蛋白的可溶性表达量明显增加,而相同条件下无乙醇的培养物中 M_r 38 000 蛋白基本都是以包涵体形式存在。这说明乙醇促进了 M_r 38 000 蛋白的可溶性表达。Thomas 等^[2]报道利用乙醇来提高重组蛋白的可溶性表达,但是并不是所有的蛋白的表达都会被此上调,我们的实验结果证实结核分枝杆菌 M_r 38 000 蛋白是一种可以被乙醇上调的可溶性表达蛋白。但由于乙醇浓度过高时能够抑制细菌生长,在实验中我们也证实乙醇浓度最好不要超过培养体积的 3%。尽管目前乙醇确切的作用机制有待进一步研究,但是我们利用它得到可溶性的 M_r 38 000 蛋白,这在很大程度上保证了得到有活性的 M_r 38 000 蛋白,并为将来的临床应用奠定了良好的基础。

【参考文献】

- [1] 何秀云,庄玉辉,张晓刚,等.结核分枝杆菌 38 000 蛋白质抗原在大肠杆菌中的高效表达[J].中国结核和呼吸杂志,1999,22(3): 138-141.
He XY, Zhuang YH, Zhang XG, et al. High expression of mycobacterium tuberculosis 38 000 protein antigen in *E. coli* [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis* 1999, 22(3): 138-141.
- [2] Thomas JG, Baneyx F. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif* 1997, 11(3): 289-296.
- [3] Kohda J, Endo Y, Okumura N, et al. Improvement of productivity of active form of glutamate racemase in *E. coli* by coexpression of folding accessory proteins [J]. *Biochem Eng J* 2002, 10(1): 39-45.
- [4] Haslbeck M, Schuster I, Grallert H. GroE-dependent expression and purification of pig heart mitochondrial citrate synthase in *E. coli* [J]. *J Chromatogr B* 2003, 786(1): 127-136.
- [5] Lee KH, Kim HS, Jeong HS, et al. Chaperonin GroESL mediates the protein folding of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase in *E. coli* [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 298(2): 216-224.
- [6] Zmijewski MA, Macario AJL, Lipin'ska B. Functional similarities and differences of an Archaeal Hsp70 (DnaK) stress protein compared with its homologue from the bacterium *E. coli* [J]. *J Mol Biol*, 2004, 336(2): 539-549.
- [7] Okamoto-Kainuma A, Wang Y, Fukaya M, et al. Cloning and characterization of the dnaKJ operon in *Acetobacter aceti* [J]. *J Biosci Bioeng* 2004, 97(5): 339-342.