

应用分子伴侣共表达系统表达 *pfu* 基因及酶活性测定

张海军¹, 杨君^{2,3}, 刘晓光¹, 胡向阳^{2,3}

(1 江苏大学生命科学研究院, 镇江 江苏 212013; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204;

3 中国科学院青藏高原研究所昆明部, 云南 昆明 650204)

摘要: 将通过 In-fution 方法构建的 pET32a-*pfu* 质粒与可以促进可溶性表达的 HG-PGRO7 质粒一起转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 共表达, 以 pET32a-*pfu* 单独在 BL21 (DE3) 中表达作为对照。用热变性和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀去除部分杂蛋白, 再经 Ni-NAT 亲和层析柱纯化分离 *pfu* 蛋白, SDS-PAGE 检测结果表明目的蛋白大小约为 90 kD, 与预计的分子量大小一致。最后对其酶活性测定结果表明分子伴侣能够促进 *pfu* 基因表达, 并能够提高酶活性。

关键词: Pfu; 分子伴侣; 基因克隆; 载体构建; 原核表达; 蛋白纯化; 酶活测定

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 06-499-05

Expression and Enzyme Activity Assay of *pfu* with Molecular Chaperone

ZHANG Hai-Jun¹, YANG Jun^{2,3}, LIU Xiao-Guang¹, HU Xiang-Yang^{2,3**}

(1 Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2 Kunming Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 3 Institute of Tibetan Plateau

Research at Kunming, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Co-expressing the plasmid pET32a-*pfu* which was constructed using In-fution technique with chaperone plasmid HG-PGRO7 at the same time in *E. coli* . BL21 (DE3) . The expression system, which expressed *pfu* gene alone in *E. coli* . BL21 (DE3) , was used as control . Most of unnecessary proteins were exenterated by heat treatment and (NH₄)₂SO₄ precipitation . The purified fusion protein was obtained by the Ni chelating resin affinity chromatography . The SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the purified fusion protein was about 90 kD, conforming to the expected molecular mass of Pfu protein . The results of enzyme activity assay of *pfu* demonstrated that molecular chaperone was able to activate *pfu* gene expression and its enzyme activity .

Key word: Pfu; Molecular chaperone; Cloning; Construction of a Expression Vector; Prokaryotic expression; Protein purification; Enzyme activity assay

现今所使用的酶 (简称 Taq polymerase), 是于 1976 年从温泉中的细菌 (*Thermus aquaticus*) 分离出来的。它的特性就在于能耐高温, 是一个很理想的酶, 但它于 80 年代之后才被广泛运用。该酶没有 3 至 5 外切酶活性 (Barnes, 1994), 如

果发生脱氧核苷酸的错误掺入时, 这种酶没有校正能力, 不能很好地保证扩增产物的忠实性。

Pfu DNA Polymerase 简称 Pfu 酶, 是一种来源于嗜热菌 *Pyrococcus furiosus* 的高度热稳定的 DNA 聚合酶。由于 Pfu 酶有 3 至 5 的外切酶活性 (Takagi 等,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30871704)、中国科学院百人计划项目

通讯作者: Author for correspondence; E-mail: huxiangyang@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2009-09-14, 2009-11-14 接受发表

作者简介: 张海军 (1984-) 男, 07 级硕士研究生, 主要研究内容为生物防治。

1997), 出错率为 2.6×10^{-6} per nt per cycle, 仅为 Taq 酶的 1/10, 也低于一些其它的高保真 DNA 聚合酶例如 Vent、DeepVent、Pwo、Tli 等 (Li 等, 1998), 因此 Pfu 酶通常作为首选的高保真 DNA 聚合酶。

原核表达是分子生物学领域的一项重要技术, 常出现于生物工程中, 是指通过基因克隆技术, 将外源目的基因, 通过构建表达载体并导入表达菌株的方法, 使其在特定原核生物或细胞内表达。而在实际的操作中, 包涵体形成、酶活比较低等干扰因素 (Thomas 等, 1997), 为后续的研究工作带来障碍。一般认为, 导致表达蛋白形成包涵体或酶活较低的原因常是由于表达蛋白不能正确折叠形成正确的空间结构 (Thomas 等, 1997; Check 等, 1992)。最近的研究表明, 分子伴侣不仅可以防止蛋白质在折叠过程中形成聚集物或无活性结构, 提高正确折叠率, 而且还可能影响折叠路径 (王会峰, 2009)。

本文通过分子克隆技术克隆出 Pfu 酶基因, 运用 In-fusion 技术成功构建 pET32a-*pfu* 重组质粒, 应用分子伴侣共表达系统在 BL21 (DE3) 表达菌株成功表达 *pfu* 基因, 并通过 Ni-NAT 亲和层析柱纯化分离 Pfu 酶, 并对其活性进行测定。目的是了解共表达分子伴侣能否提高编码基因的表达产量及表达蛋白的生物活性, 同时也为实验室制作实验用 Pfu 酶奠定基础。这种在原核表达中同时表达外源性活性工具酶和分子伴侣的尝试, 在国内还罕见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和质粒: 载体 pET32a、大肠杆菌 DH5a 本室保存, BL21 (DE3) 菌株 (TIANGEN 公司), HG-PGRO7 (HaiGene 公司)。

试剂和仪器: Pfu DNA 聚合酶、DNA Marker、质粒抽提试剂盒、DNAMarker、蛋白 Marker 及 CompETent Cell Preparation Lit (TaKaRa 公司)。梯度 PCR 仪 (PCYL200, 美国 Thermo 公司)。CloneEZIM Kit 聚合酶 (美国 genscript 公司); dNTP 及限制性内切酶 EcoRI (美国 Promega 公司); IPTG、氨苄青霉素 (amp)、氯霉素 (ahl) (上海生工生物工程有限公司); 丙烯酰胺、N, N-亚甲基双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵、考马斯亮蓝 G-250、DTT (Sigma 公司); Ni-NTA 亲和层析介质 (Qiagen 公司)。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 DDBJ 公布的 Pfu DNA 聚合酶的基因序列, 设计引物如下:

上游引物: attttagatgttgattacata

下游引物: ctaggatttttaaatgtaagcca

利用高保真 KOD 酶扩增出的片段与经过 EcoRI 酶切的 pET32a 构建重组载体。

1.2.2 基因克隆、pET32a-*pfu* 载体构建及鉴定 PCR 扩增条件为: PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 15 s、60 °C 15 s 及 72 °C 2 min, 循环 30 次, 末次循环 72 °C 10 min。取 3 μl 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶 (含 0.05% EB 染料) 上电泳, 在紫外灯下观察结果。PCR 扩增产物经纯化回收, 再通过 In-fusion 的方法与经过 EcoRI 酶切的 pET32a 载体连接, 连接产物转化至 DH5a 感受态菌中, amp 抗性筛选阳性克隆并进行 PCR 及 EcoRI 酶切鉴定。将阳性重组子用试剂盒提取质粒 DNA, 命名为 pET32a-*pfu*。

1.2.3 共表达载体构建 将分子伴侣 HG-PGRO7 在 42 °C 热激 60 s 转入 BL21 (DE3) 表达菌株, 加入 900 μl LB, 37 °C 培养 1 h, 吸取 100 μl 涂布于 ahl 平板, 挑取阳性克隆菌株 37 °C 培养过夜, 次日以 1:100 接种于含 ahl 的 20 ml LB 培养基中, 当 OD₆₀₀ 值达到 0.35 ~ 0.50 时, 用 CompETent Cell Preparation Lit 试剂盒将其制成感受态, 并将重组质粒 pET32a-*pfu* 进行转化, 用含有 ahl 及 amp 的平板筛选阳性克隆。将重组质粒 pET32a-*pfu* 直接转入 BL21 (DE3) 作为对照试验。

1.2.4 目的蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 电泳鉴定

挑选共表达菌株的阳性克隆以 1:100 接种于含 ahl 和 amp (只转入重组质粒 pET32a-*pfu* 只加 amp) 的 100 ml LB 培养基中, 37 °C 培养至菌液浓度至 OD₆₀₀ 值为 0.4 ~ 0.6 时, 用终浓度为 1 mmol L⁻¹ 的 IPTG 诱导, 未诱导菌作对照, 继续培养 4 h, 离心集菌, 用 10% SDS-PAGE 电泳观察蛋白表达情况。

1.2.5 Pfu 酶的纯化 将菌体悬浮于 5 ml 的 TAQA 缓冲液与 5 ml TAQB 缓冲液中, 冰浴中超声波破菌。上清液在 75 °C 水浴保温 30 min, 12 000 r min⁻¹ 离心 20 min 去除沉淀, 向上清液中加入 (NH₄)₂SO₄ 至 70% 饱和度, 4 °C 静置 2 h, 12 000 r min⁻¹ 离心 20 min, 收集沉淀。将沉淀溶解于 10 ml PB 缓冲液中, Ni-NTA 亲和层析柱用 20 mmol L⁻¹ 的 PB 缓冲液平衡后, 样品以 0.4 ml min⁻¹ 的速度上 Ni 柱。先用 5 mmol L⁻¹ 咪唑的 PB 缓冲液洗脱杂蛋白, 然后直接用含 50 mmol L⁻¹ 咪唑的 PB 缓冲液洗脱目的蛋白, 然后用 TAQC 缓冲液透析过夜, 纯化效果用 SDS-PAGE 电泳检测, PCR 扩增检测酶活。

1.2.6 Pfu 酶活的测定 以 1 μl 纯化后的 *pfu* 酶及 TaKaRa 公司的酶 1 U 在相同条件下分别进行 PCR 扩增, 测定透析后的样品酶活。

2 结果

2.1 *pfu* 基因 PCR 扩增及 pET 32a-*pfu* 载体的酶切鉴定

pfu 基因编码序列长 2.3 kb, 如图 1 第 1 条带所示; 第 2、3 条带分别为阴性、阳性对照, 第 4 条为重组质粒 pET 32a-*pfu* 的质粒 PCR; 第 5 条带为重组质粒经 *Eco*RI 酶切后的鉴定结果。因 *pfu* 基因编码序列长 2.3 kb, 在 1 kb 处有 *Eco*RI 酶切位点, 所以酶切结果分别为 1 kb 和 1.3 kb 的两条带, 结果与分析一致。

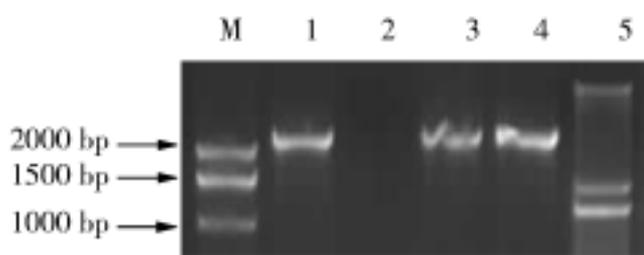


图 1 PCR 扩增 *pfu* 基因, pET 32a-*pfu* 质粒 PCR, pET 32a-*pfu* 酶切鉴定

M . Marker DL2000; 1 . 为 PCR 产物; 2 . 为阴性对照; 3 . 为阳性对照; 4 . 为 pET32a-*pfu* 质粒 PCR; 5 . 为 pET32a-*pfu* *Eco*RI 酶切

Fig . 1 PCR amplification of *pfu* gene, The PCR products of plasmid pET32a-*pfu*, the identification of enzyme digestion test for pET32a-*pfu*

M . Marker DL2000; 1 . PCR product; 2 . The negative control; 3 . The positive control; 4 . The PCR products of plasmid pET32a-*pfu*; 5 . pET32a-*pfu* digested by *Eco*RI

2.2 *pfu* 在 BL21 (DE3) 表达菌株中的表达

重组蛋白 N 端含有 $6 \times \text{his}$ 多肽标签, 经 DNAMAN 预测其分子质量约为 90 kD。SDS-PAGE 显示诱导组比未诱导组多一目的条带, 位于蛋白质分子质量标准 90 kD, 说明融合蛋白表达成功。

由图 2 可知当 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 单独表达时, 加 IPTG 诱导与对照比较可得目的条带 (1, 2 总蛋白); 由第 3, 4, 5, 6 条带可以看出, 在诱导后上清与沉淀中均有表达。图 3 为分子伴侣 HG-PGRO7 与 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 原核共表达。由第 4 和 6 条带可知目的条带在上清与沉淀均有表达。图 2 和图 3 的第 2 条带对比可得加分子伴侣共表达目的条带总产量比 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 单独表达量要高。图 2 和图 3 的第 4 条带比较可知在上清中共表达比单独表达的量明显高。由第 6 条带比较可得, 在沉淀中显示共表达也比单独表达量要高。

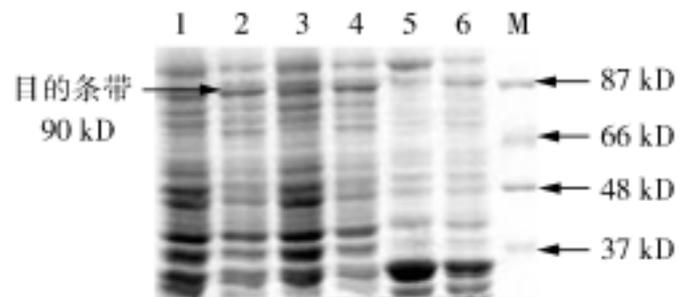


图 2 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 中单独表达

1 . 对照总蛋白; 2 . 诱导总蛋白; 3 . 对照上清; 4 . 诱导上清; 5 . 对照沉淀; 6 . 诱导沉淀; M . Marker

Fig . 2 The individual expression of pET32a-*pfu* gene in BL21 (DE3)

1 . The control of total protein; 2 . The induced total protein; 3 . The control of upper; 4 . The induced upper; 5 . The control of precipitation; 6 . The induced precipitation; M . Marker

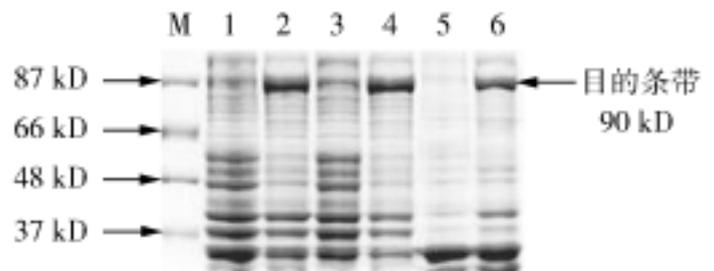


图 3 HG-PGRO7 与 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 原核共表达

M . Marker; 1 . 对照总蛋白; 2 . 诱导总蛋白; 3 . 对照上清; 4 . 诱导上清; 5 . 对照沉淀; 6 . 诱导沉淀

Fig . 3 The Prokaryotic co-expression of HG-PGRO7 and pET32a-*pfu* in BL21 (DE3)

M . Marker; 1 . The control of total protein; 2 . The induced total protein; 3 . The control of upper; 4 . The induced upper; 5 . The control of precipitation; 6 . The induced precipitation

2.3 纯化

由图 4 与图 5 可知目的条带纯化的条带很单一, 说明纯化的效果很好, 没有其他的杂蛋白的污染。

2.4 酶活检测

由图 6 第 4 和第 6 条带可知, pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 中单独表达与共表达的阳性对照纯化后得到的 *pfu* 酶均有活性, 但是与第 2 条带 (TaKaRa 公司购买的酶做阳性对照) 对比可得第

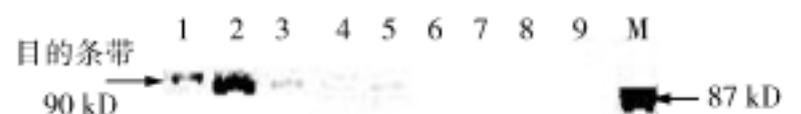


图 4 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 中单独表达纯化

1 ~ 9 为纯化的目的条带; M 为 Marker

Fig . 4 The purified band of individual expression of pET32a-*pfu* in BL21 (DE3)

1 - 9 the target purification band; M marker

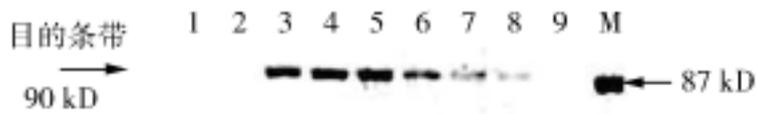


图5 HG-PGRO7 与 pET32a-*pfu* BL21 (DE3) 原核共表达纯化
1~9 为纯化的目的条带; M 为 Marker

Fig. 5 The purified band of the Prokaryotic co-expression
of HG-PGRO7 and pET32a-*pfu* in BL21 (DE3)
1-9 the target purification band; M marker

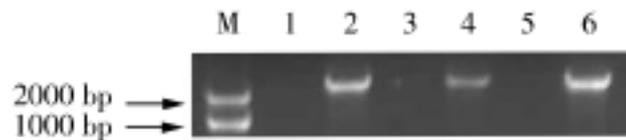


图6 Pfu 酶活测定

M. Marker; 1. 为 TaKaRa 酶阴性对照; 2. 为 TaKaRa 酶阳性对照;
3. 为 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 中单独表达阴性对照;
4. 为 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 中单独表达阳性对照;
5. 为共表达阴性对照; 6. 为共表达的阳性对照

Fig. 6 Enzyme Activity Assa of Pfu

M. marker; 1. the negative control of takara enzyme; 2. the positive
control of takara enzyme; 3. the negative control of the individual
expression of pET32a-*pfu* in BL21 (DE3); 4. the positive control
of the individual expression of pET32a-*pfu* in BL21 (DE3);
5. the negative control of the Prokaryotic co-expression;
6. the positive control of the Prokaryotic co-expression

6 条带的亮度与第 2 条相差不大, 但是比 4 条有很大差异, 说明由分子伴侣一起共表达得到的 Pfu 酶活性远高于 pET32a-*pfu* 在 BL21 (DE3) 直接表达得到的 Pfu 酶。

3 讨论

3.1 BL21 (DE3) 表达菌存在的缺陷

BL21 (DE3) 表达菌存在的较为突出的缺陷是被表达的外源蛋白质经常不能形成正确的空间结构 (Hoffmann and Rinas, 2004)。尽管蛋白质的折叠是一个自发过程, 但由于蛋白过表达过程中存在动力学屏障, 即蛋白质翻译的速率超过了新合成蛋白质折叠的能力, 因此产生了部分折叠蛋白质或折叠中间产物 (Check 等, 1992)。它们有着疏水的表面, 易于自身结合, 构成了包涵体形成的基础 (Villaverde and Carrio, 2003)。包涵体蛋白质虽易于纯化, 但要进行复性才能得到正确折叠的功能蛋白质 (Kurganov and Topchieva, 1998)。复性过程一般复杂低效 (通常效率低于 10%), 且代价昂贵, 因此开发能够直接表达正

确折叠的可溶性功能蛋白的表达系统非常有必要。

3.2 共表达系统改良原核表达

实际上蛋白质折叠的过程是折叠中间态的正确途径与错误途径相互竞争的过程 (Van den Berg 等, 1999; 章林溪, 2006)。大量研究表明, 分子伴侣在蛋白质正确折叠实现过程中起了关键作用 (Zhou, 2004)。分子伴侣主要由三个高度保守的蛋白质家族组成, 这三个家族的成员广泛分布于原核和真核细胞中。分子伴侣在新生肽的折叠和组装成蛋白过程中, 能识别与稳定多肽链的部分折叠的构象, 从而参与新生肽链的折叠与装配 (蒋自立, 2007; 章林溪, 2006)。分子伴侣在蛋白质折叠过程中防止多肽链形成聚集物或无活性结构, 提高正确折叠率 (Friedel and Shea, 2004)。

本研究中, 当共表达分子伴侣时, SDS-PAGE 胶结果显示, 与单独表达目的蛋白比较时都有目的条带, 但是从总蛋白和上清蛋白中可以显而易见的是, 共表达分子伴侣时目的蛋白的表达量明显提高。从而说明分子伴侣能够促进蛋白质的正确的折叠, 另一个方面还降低了包涵体的积累。但是在共表达分子伴侣与单独表达的沉淀相比, 共表达的沉淀还是有大量的积累, 这说明应用的表达系统仍需改进, 或者是考虑应用其他表达系统, 或者可以尝试其他的分子伴侣或者是增加共表达的分子伴侣的种类。

Pfu 酶活测定的结果显示, 共表达的目的蛋白活性比单独表达的目的蛋白的活性有很大的提高, 可能是由于在单位目的蛋白中, 结构正确的可溶性蛋白比例增加。由此可以推论, 分子伴侣共表达体系有助于获得天然构象的有活性的蛋白。对于某些在通常情况下, 目的蛋白以包涵体形式存在, 如果需要对于这种情况加以改进, 共同表达分子伴侣不失为一种可供选择的方法。但是, 需要注意的是, 已知分子伴侣并不总能辅助蛋白折叠减少聚集, 而且很难预测哪种分子伴侣会辅助某一特定蛋白的折叠, 因此需要尝试共表达多种分子伴侣以提高成功表达的可能性。

3.3 Pfu 酶活影响因素

本研究将 *pfu* 基因克隆到 pET32a 载体中, 成功表达了 N 端带有 6×His 纯化标签的 DNA 聚

合酶, 首先利用热变性和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀去除大部分杂蛋白, 然后将粗酶液用 Ni-NAT 亲和层析柱纯化, 得到纯度高的酶, 并且具有很高的活性。

Pfu 酶和其他生物酶一样, 其催化效率和速度受诸多因素的影响。但是研究报道 His 标签不影响酶的活性 (景建洲等, 2008)。其他的因素, 如缓冲液为聚合酶提供 PCR 过程中可能的、适宜的反应环境, 是 PCR 反应成败的关键之一, 其中 pH 和 Mg^{2+} 浓度又是缓冲液中两个至关重要的因素。本实验利用 TaKaRa Pfu 酶的反应条件来进行酶活测试, 结果可得共表达的 Pfu 酶的活性, 相同单位下, 扩增的量略少于对照。说明 Pfu 酶纯化以及 PCR 扩增的条件还要进一步的改进, 以最大限度的提高酶的活性。

总之, 本实验成功地利用共表达载体表达了活性相对比较高的 Pfu 酶, 与 TaKaRa 公司 Pfu 酶扩增性能相当, 可以用于实验室一般性保真性实验与分析以节约科研成本。

【参 考 文 献】

- Barnes WM, 1994 . PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates [J] . *PNAS*, 91 (6): 2216—2220
- Check JH, Dietterich C, Nowroozi K *et al.*, 1992 . Comparison of various therapies for the luteinized unruptured follicle syndrome [J] . *International Journal of Fertility*, 37 (1): 33—40
- Friedel M, Shea JE, 2004 . Self-assembly of peptides into a beta-barrel motif [J] . *Journal of Chemical Physics*, 120 (12): 5809—5823
- Hoffmann F, Rinas U, 2004 . Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J] . *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 89: 143—161
- Jiang ZZ (蒋自立), 2007 . The Role of Molecular Chaperone in Protein Folding [J] . *Journal of Qiannan Normal College of Nationalities* (黔南民族师范学院学报), 3: 27—30
- Jing JZ (景建洲), Jiang FG (江风阁), Li ZY (李振勇) *et al.*, 2008 . Expression and the optimization of amplification parameters of recombinant pfu DNA polymerase [J] . *Chemical Reagents* (化学试剂), 30 (9): 641—645
- Kurganov BI, Topchieva IN, 1998 . Artificial chaperone-assisted refolding of proteins [J] . *Biochemistry (Mosc)*, 63 (4): 413—419
- Li B, Gu C, Zhao JD, 1998 . Molecular cloning and expression of *pfu* DNA polymerase gene and its application in long distance PCR [J] . *Chinese Science Bulletin*, 43 (10): 863—868
- Takagi M, Nishioka M, Kakahara H *et al.*, 1997 . Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR [J] . *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (11): 4504—4510
- Thomas JG, Ayling A, Baneyx F, 1997 . Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli* . To fold or to refold [J] . *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66 (3): 197—238
- Van den Berg B, Ellis RJ, Dobson CM, 1999 . Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation [J] . *The EMBO Journal*, 18 (24): 6927—6933
- Villaverde A, Carrio MM, 2003 . Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies [J] . *Biotechnology Letters*, 25 (17): 1385—1395
- Wang HF (王会峰), 2009 . Progress on molecular chaperone and its role in protein folding [J] . *Progress in Modern Biomedicine* (现代生物医学进展), 9 (4): 746—748
- Zhang LX (章林溪), 2006 . A study of protein conformations and folding behavior [J] . *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)* (浙江师范大学学报 (自然科学版)), 29 (1): 1—10
- Zhou HX, 2004 . Protein folding and binding in confined spaces and in crowded solutions [J] . *Journal of Molecular Recognition*, 17 (5): 368—375