

文章编号: 1000-7423(2011)-05-0399-03

## 一种获得高纯度包涵体蛋白的简便方法

刘榕, 钟沁萍, 蒋明森, 董惠芬\*

**【摘要】** 以日本血吸虫 *SjBMP* 基因部分编码序列构建 *SjBMP-pET-28a(+)* 重组原核表达质粒, 并转化至大肠埃希菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 进行原核表达。将经过鉴定的目的蛋白 r*SjBMP* 以包涵体形式表达的诱导菌样通过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose 亲和纯化和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 切胶再纯化。用该纯化蛋白制备免疫血清, 用蛋白质印迹 (Western blotting) 检测其免疫反应性。结果显示, 经  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose 亲和纯化和 SDS-PAGE 切胶再纯化, 获得高纯度的目的蛋白, 回收率 > 11.0%。用该纯化蛋白免疫家兔制备免疫血清, 获得的血清效价高于 1:1 280; Western blotting 检测结果表明, 用该免疫血清去识别表达的重组蛋白, 出现特异的单一条带, 表明该纯化蛋白仍保持其抗原性, 可用于免疫学相关实验研究。因此, SDS-PAGE 切胶纯化后电渗、透析回收是纯化重组包涵体蛋白有效、简便的方法。

**【关键词】** 重组蛋白; 原核表达; 包涵体; 纯化

中图分类号: R383.24

文献标识码: B

## An Easy Way to Purify the Inclusion Body Protein with High Purity from Prokaryotic Expression Cells

LIU Rong, ZHONG Qin-ping, JIANG Ming-sen, DONG Hui-fen\*

(Department of Human Parasitology, School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**【Abstract】** To clone partial ORF of *SjBMP* and to construct the recombinant *SjBMP-pET-28a(+)* plasmids, and then to transform them into the competent cells *E. coli* BL21 (DE3), finally a positive clone was used to be induced by IPTG. The bacterial aggregates with target protein expressed as inclusion bodies were purified by the methods of  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity purification under denaturation condition and SDS-PAGE gel extraction. The purified protein was used to immune rabbits and make antiserum against the *SjBMP*, and the antiserum were then used to identify the r*SjBMP* by Western blotting. The target protein obtained by  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose affinity purification was not pure with unspecific proteins, but the protein further purified by SDS-PAGE gel extraction and the dialysis bag horizontal electrophoresis was quite pure, and the recovery rate was more than 11.0%. Meanwhile, Western blotting was used to identify the recombinant *SjBMP* protein by antiserum, only a specific single strip appeared, which suggested the protein purified by this method kept its antigenicity, and could be used for common immunological studies. Therefore, the SDS-PAGE gel extraction combining with electroosmosis and dialysis recycling are good and easy to purify the inclusion body proteins.

**【Key words】** Recombinant protein; Prokaryotic expression; Inclusion body; Purification

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30872202) and PhD Independent Research Fund of Wuhan University (No. 57)

\* Corresponding author, Email: hfdong@whu.edu.cn

在分子生物学研究中, 大肠埃希菌表达系统以其操作简单、生长快、成本低和产量高等优点, 常被用于外源蛋白质的诱导表达。在此过程中, 经常遇到的问题之一是获得的表达产物以不溶和无活性的包涵体形式存在, 因此, 要得到高纯度的目的蛋白则需要进一步分离和纯化。目前, 常用的重组蛋白纯化方法是借助在重组目的蛋白上添加特定的标签, 如六聚组氨酸标签 (6×His tag)、谷胱甘肽转移酶标签 (GST tag) 等, 通过亲

和层析的方法分离纯化目的蛋白。但通过这种方法得到的纯化蛋白通常混有一部分杂蛋白。当需要高纯度的蛋白制品时, 就必须通过其他方法进一步纯化。在实验过程中, 作者总结出的一套能够获得高纯度的原核表达包涵体蛋白的简便方法, 介绍如下。

### 1 材料与与方法

1.1 主要试剂与仪器 丙烯酰胺 (Acrylamide) 购自美国 Amresco 公司, N,N'-甲叉双丙烯酰胺 (N,N'-Methylenebisacrylamide, MBA) 购自美国 Sanland Chemical 公司,  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose 购自美国 QIAGEN 公司, 亲和层析柱购自美国 Clontech 公司, ELISA 96 孔板购自美国 Corning 公司, 辣根过氧化物酶标记

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30872202), 武汉大学博士研究生自主科研基金 (No. 57)

作者单位: 武汉大学基础医学院人体寄生虫学教研室, 武汉 430071

\* 通讯作者, E-mail: hfdong@whu.edu.cn

的羊抗兔 IgG (HRP-IgG) 购自美国 Thermo SCIENTIFIC 公司。rSjBMP-pET-28a(+) 重组原核表达质粒为作者构建, rSjBMP 重组蛋白是 SjBMP 开放阅读框的第 2 017~2 784 bp 编码产物, 加上载体序列后编码产物为 305 aa, 相对分子质量 ( $M_r$ ) 为 35 320。作者已成功将 rSjBMP-pET-28a(+) 重组质粒转化至大肠埃希菌 (*E. coli*) BL21 (DE3), 并诱导出目的蛋白。经鉴定, rSjBMP 重组蛋白主要以包涵体形式表达于胞内 (未发表文献)。

以下缓冲液参照美国 QIAGEN 公司的表达与纯化手册的试剂配方经修改后自行配制: 缓冲液 A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 100  $\mu$ g/ml 溶菌酶(lysozyme), 10  $\mu$ g/ml 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I), 0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100), 4  $^{\circ}$ C 保存; 缓冲液 B: 20 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 150 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100; 缓冲液 C: 20 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 150 mmol/L NaCl, 2 mol/L 尿素 (Urea); 缓冲液 D: 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 100 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mol/L Urea, 0.5% Triton X-100, 10 mmol/L 咪唑; 缓冲液 E: 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 100 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mol/L Urea, 0.5% Triton X-100, 20 mmol/L 咪唑; 缓冲液 F: 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 100 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mol/L Urea, 0.5% Triton X-100, 300 mmol/L 咪唑。

酶联免疫检测仪 (DG5033A 型) 为南京华东电子集团医疗设备有限责任公司产品, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白质垂直电泳系统、蛋白质印迹 (Western blotting) 转移电泳系统和小型核酸水平电泳系统 (JY600C, JY-SC22; JY600C, JY-ZY5; JY600, JY-SP-A) 为北京君意东方电泳设备有限公司产品, 凝胶成像系统 (JS-680B) 为上海培清科技有限公司产品。

**1.2 包涵体的分离** 取 2 L 成功诱导表达的含重组 rSjBMP 包涵体的菌液离心后获得的菌体, 参照美国 QIAGEN 公司的表达与纯化手册, 进行目的蛋白包涵体的分离与纯化。每克菌体湿重加 5 ml 细菌裂解液缓冲液 A, 混匀后 37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min~1 h 进行裂解。将裂解液于 4  $^{\circ}$ C 14 000 $\times$ g 离心 20 min, 弃上清, 用缓冲液 B、C 各重悬洗涤沉淀一次, 即得粗制包涵体。

**1.3 包涵体的纯化** 将粗制包涵体用 50 ml 缓冲液 D 溶解, 4  $^{\circ}$ C 放置过夜后, 4  $^{\circ}$ C 14 000 $\times$ g 离心 20 min, 收集上清, 用 5 ml 含 2%SDS 的缓冲液 D 将仍未溶解的沉淀再次溶解后离心收集上清。取 2~3 ml 的 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose, 用 10 ml 去离子水洗涤 3~5 次, 4 ml 缓冲液 D 平衡 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose。将溶解的包涵体与平衡好的 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose 混合, 4  $^{\circ}$ C 200 r/min 摇荡过夜。将混合液室温静置 30 min, 去上清, 再移至亲和层析柱中, 待其自然沉降填好。用约 50 ml 缓冲液 E 缓慢洗涤 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose, 以去除非特异性结合的杂蛋白, 并取最后的洗涤液 20  $\mu$ l 备用。

向层析柱缓慢加入约 20 ml 洗脱液缓冲液 F, 收集洗脱液, 取上述洗涤液和洗脱液各 20  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 分析。将收集洗脱液装入处理好的透析袋, 于磷酸缓冲液 (PBS) 中透析后将透析袋放入聚乙二醇中浓缩蛋白质, 用 5 ml 8 mol/L 尿素溶液溶解洗出透析袋内目的蛋白, 紫外吸收法测目的蛋白洗脱液含量。将浓缩的蛋白质液进行大孔 SDS-PAGE 分离纯化(凝胶在 250 mmol/L KCl 溶液中显影 5~10 min), 切下乳白色含目

的蛋白的条带<sup>[1]</sup>, 进行透析袋水平电泳回收蛋白, 再次透析、浓缩目的蛋白。取 20  $\mu$ l 目的蛋白回收液进行 SDS-PAGE 分析, 测量其 A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub> 值, 按照公式 C = (1.55A<sub>260</sub> - 0.76A<sub>280</sub>)  $\times$  稀释倍数, 计算浓度, 再计算目的蛋白再纯化回收率。

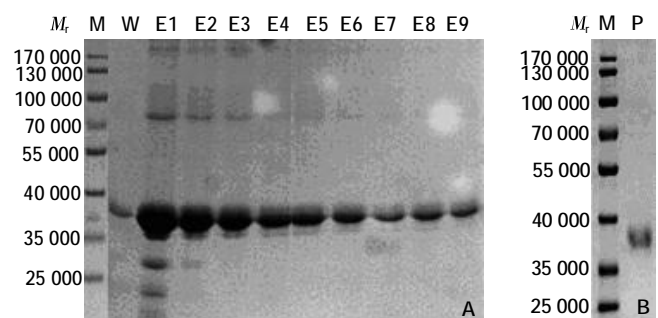
**1.4 纯化蛋白的抗原性检测**<sup>[24]</sup> 用纯化的 rSjBMP 蛋白混合完全福氏佐剂 1 mg/kg 免疫家兔 (购自武汉大学动物实验中心) 制备抗血清, 对照组用等量溶剂 8 mol/L 尿素溶液与佐剂混合免疫家兔。2 周后, 等剂量蛋白质与不完全福氏佐剂 1:1 混合乳化加强免疫 1 次, 对照组用溶剂代替蛋白质; 1 周后加强免疫第 2 次, 于末次免疫后 1 周, 采耳缘血<sup>[5]</sup>, ELISA 检测血清效价<sup>[6]</sup>, 免疫血清和对照血清依次做 5 个梯度稀释: 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1 280, P/N (阳性/阴性) 吸光度 A<sub>490</sub> 比值大于 2.1 判为阳性。血清效价合格后取免疫全血收集血清。Western blotting 定性检测抗原抗体结合的能力和特异性, 一抗为制备的免疫兔血清, 二抗为羊抗兔 HRP-IgG。

## 2 结果

**2.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化目的蛋白** 用 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose 亲和层析纯化的方法获得的目的蛋白制品纯度不高, 混有部分杂蛋白。最后的洗涤流出液 (W 泳道) 中, 已经几乎没有非特异性蛋白质, 只有少量被洗涤下来的目的蛋白; 收集的前几管洗脱液中除主要含有大量目的蛋白外, 还有少量杂蛋白 (如 E1~E9 泳道), 随着洗脱过程的继续, 洗脱液中目的蛋白的含量不断减少, 杂蛋白也逐渐消失 (图 1A)。

将上述蛋白洗脱液经透析浓缩后用 5 ml 8 mol/L 尿素溶液洗脱溶解, 总蛋白浓度为 16.50 mg/ml, 则目的蛋白含量低于 82.50 mg。

**2.2 SDS-PAGE 切胶再纯化** P 泳道样品条带表明经 SDS-PAGE 切胶再纯化的蛋白制品只含有目的蛋白。测得目的蛋白的浓度为 1.82 mg/ml, 其含量为 9.1 mg。目的蛋白的再纯化回收率 > 11.0% (图 1B)。



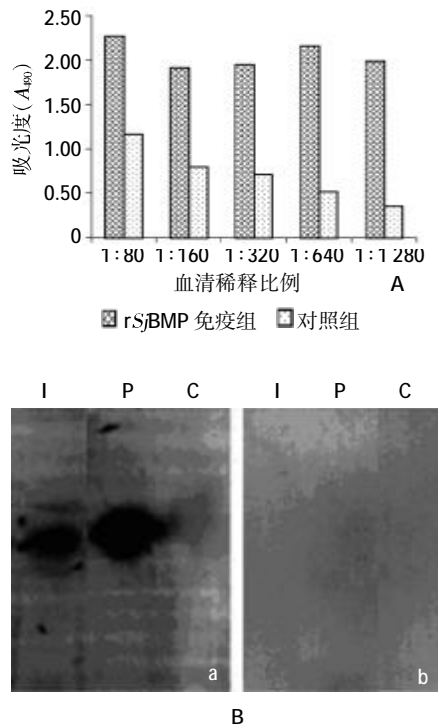
W: 洗涤液; E1-E9: 洗脱液; P: 再纯化样品。  
A: 经 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化的目的蛋白 SDS-PAGE 图; B: 纯化蛋白经切胶再纯化和透析袋水平电泳回收的 SDS-PAGE 图

图 1 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和纯化目的蛋白的 SDS-PAGE 图

## 2.3 纯化蛋白的抗原性检测

**2.3.1 ELISA 检测效价** 血清效价 > 1:1 280, 表明该纯化重组蛋白仍具有抗原性 (图 2A)。

**2.3.2 Western blotting 检测抗原抗体的识别** 在诱导表达和纯化的样品中均出现唯一的特异条带, 空白对照和阴性对照均未出现相应条带 (图 2B)。



I: 诱导菌液裂解样品; P: 纯化蛋白样品; C: 空白对照 (空载体诱导的菌样)。A: Elisa 检测抗 rSjBMP 免疫血清效价; B: Western blotting 检测抗原抗体识别。a: 一抗为免疫兔血清; b: 一抗为健康兔血清。

图 2 纯化蛋白的免疫反应性检测

### 3 讨论

本方法先通过 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose 亲和层析对目的蛋白进行纯化, 然后在变性条件下通过调节 pH 分别进行洗涤和洗脱改为采用不同咪唑浓度进行洗涤和洗脱。这就避免了调节 pH 过程的烦琐, 不需要精密的 pH 计。经此法获得的目的蛋白纯化制品中含有部分非特异性杂蛋白, 这与许学年等<sup>[4]</sup>、余茜等<sup>[7]</sup>的研究结果相似。占艺等<sup>[9]</sup>认为需求量大而纯度要求不是很高的重组蛋白质可以使用多组氨酸 (如 6×His) 或 GST 标签进行纯化, 换言之, 使用 6×His 标签纯化的重组蛋白中通常会混有非特异性结合的杂蛋白。本文介绍的方法在经 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose 亲和纯化的基础上, 再进行 SDS-PAGE 切胶纯化并经透析袋水平电泳进行电洗脱回收, 即可获得高纯度的目的蛋白。该方法不但可以完全去除与目的蛋白大小不同的杂蛋白, 还可以大大降低与目的蛋白大小相当的杂蛋白的影响, 后者也是本方法在于在江等<sup>[1]</sup>研究的改进之处。但是, 由于纯化过程中经两次透析浓缩、洗脱溶解, 使得目的蛋白损失量较大, 最后的再纯化回收率较低 (>11.0%)。因此, 本方法适用于表达量较大的蛋白质的纯化。钟政荣等<sup>[9]</sup>比较了直接切胶纯化和柱层析纯化日本血吸虫抗原 Sj14-3-3 两种方法, 得出前者的回收率是后者的 3 倍。因此, 当没有与重组蛋白分子大小相当的杂蛋白存在时, 建议采取直接切胶纯化和电洗脱的方法获得纯化的目的蛋白, 不仅回收率高, 而且操作简单、经济。不过, 本方法主要用于纯化以包涵体形式表达的重组蛋白质, 获得的蛋白质不具有其原有的结构和生物学活性, 因此, 该方法不适用于纯化需要保

持活性的重组蛋白质。

用本法纯化获得的蛋白免疫家兔成功制备了抗血清, 该血清分别与诱导表达的菌液裂解样品和纯化蛋白进行 Western blotting, 结果显示两者能够特异性地识别与结合, 表明本方法制备的纯化蛋白仍然保持其抗原性, 用其制备的免疫血清也能够满足相关免疫学实验要求。另外, 本实验室的其他实验人员采用本文介绍的方法进行了日本血吸虫腺苷激酶-1 (SjAK-1) 重组原核表达包涵体蛋白的纯化, 并用其成功制备了免疫血清和用于相关免疫学实验, 均取得了理想结果 (未发表文献), 提示本法稳定可靠。

### 参 考 文 献

- [1] Yu ZJ, Ma XE, Zhou JH. A modified method for purification of inclusion bodies proteins in gel slices[J]. Biotechnology, 2007, 17(3): 46-48. (in Chinese)  
(于在江, 马学恩, 周建华. 切胶纯化表达蛋白包涵体的可行性分析[J]. 生物技术, 2007, 17(3): 46-48.)
- [2] Su MQ, Yue QH, Zhou P, et al. Preparation and antigenicity assay of recombinant proteins of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2006, 27(11): 987-990. (in Chinese)  
(苏明权, 岳乔红, 周萍, 等. 结核分枝杆菌重组蛋白的制备及抗原性分析[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(11): 987-990.)
- [3] Peng HJ, Chen XG, Li H, et al. Expression, identification, purification and immune reactivity of the proteasome activator PA28 subunit of Schistosoma japonicum[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(3): 183-185. (in Chinese)  
(彭鸿娟, 陈晓光, 李华, 等. 日本血吸虫 PA28 亚单位蛋白的表达与鉴定、纯化及免疫反应性的评价[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(3): 183-185.)
- [4] Xu XN, Zhou Y, Dong YT, et al. Cloning, expression of PPMP antigen genes of Clonorchis sinensis and immunogenic identification of the recombinant proteins [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2010, 28(6): 401-405. (in Chinese)  
(许学年, 周岩, 董玉婷, 等. 华支睾吸虫 PPMP 型抗原基因的克隆、表达与免疫原性鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(6): 401-405.)
- [5] Tang HB, Kong LJ. Laboratory Animal Science[M]. Hubei: Hubei People's Press, 2006: 287-289. (in Chinese)  
(汤宏斌, 孔利佳. 实验动物学[M]. 湖北: 湖北人民出版社, 2006: 287-289.)
- [6] John MW. The ELISA Guidebook[M]. 2nd ed. New York: Humana Press, 2009: 1-574.
- [7] She Q, Xu L, He YL, et al. Prokaryotic expression and purification of PPE68 protein of Mycobacterium tuberculosis[J]. Chin J Biological, 2010, 23(12): 1295-1298. (in Chinese)  
(余茜, 徐蕾, 何永林, 等. 结核分枝杆菌 PPE68 蛋白的原核表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(12): 1295-1298.)
- [8] Zhan Y, Zhang JZ, Wang LF. Choosing of affinity tags for recombinant proteins and application progress of tandem affinity purification[J]. Modern Biomed Prog, 2009, 9(9): 1757-1760. (in Chinese)  
(占艺, 张金钟, 王丽芬. 重组蛋白质亲和和标签的选择与串联亲和纯化的应用进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(9): 1757-1760.)
- [9] Zhong ZR, Shen JL, Hu YS, et al. Purification and identification of recombinant Schistosoma japonicum 14-3-3 protein[J]. Chin J Biological, 2007, 2(6): 454-456. (in Chinese)  
(钟政荣, 沈继龙, 胡元生, 等. 重组日本血吸虫 14-3-3 蛋白的纯化和鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 2(6): 454-456.)

(收稿日期: 2011-03-02 编辑: 张争艳, 高石)