

柱上切除 GST 标签制备幽门螺杆菌 Lpp20 蛋白*

姜茵, 王小平, 何殿殿, 李妍

摘要:目的 表达幽门螺杆菌 Lpp20-GST 融合蛋白, 获取切除 GST 标签的重组蛋白。方法 采用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导重组表达质粒 Lpp20/pGEX-4T-1 在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中表达, 收集菌体并采用反复冻融、溶菌酶裂解及超声破菌 3 种细胞破碎方法, 表达产物在谷胱甘肽琼脂糖树脂 4B 柱上纯化, 利用凝血酶切除 GST 标签, 用鼠抗 Lpp20 单克隆抗体进行纯化产物 western blot 鉴定。结果 高效表达出 Lpp20-GST 融合蛋白, 相对分子质量约为 4.5 kDa, 产物以部分可溶性形式表达, 凝血酶成功切除 GST 标签, 纯化产物能被鼠抗 Lpp20 单克隆抗体识别。结论 凝血酶柱上切除 GST 标签获得目的蛋白。

关键词: 幽门螺杆菌; Lpp20; 凝血酶; 纯化; GST 标签; 纯化

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)07-0987-03

Preparation of Lpp20-GST fusion protein of *Helicobacter pylori* with thrombin-cleavage of GST tag on column

JIANG Yin, WANG Xiao-ping, HE Dian-dian, et al (Biotherapy Institute, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To express Lpp20-GST fusion protein with glutathione-S-transferase (GST) fusion gene expression system and the cleavage of GST-tag on glutathione sepharose 4B column using thrombin. **Methods** The recombinant expression plasmid Lpp20/pGEX4T-1 was induced in *E. coli* BL21(DE3) by isopropylthio β -D-galactoside (IPTG) and the bacterial sediment was lysed by repeating freezing and thawing, lysozyme lysis and ultrasonic wave. The soluble supernatant was loaded on glutathione sepharose 4B column and GST-tag was cleaved on column using thrombin. Purified Lpp20 was proved by mouse anti-Lpp20 monoclonal antibody (mAb) with western blot. **Results** The fusion protein Lpp20-GST was partly expressed in soluble form with relative molecular mass of 45 kDa. Thrombin cleaved GST-tag on column and purified Lpp20 was recognized by mouse anti-Lpp20 mAb. **Conclusion** Target protein can be obtained by thrombin-cleavage of GST-tag on column.

Key words: *Helicobacter pylori*; Lpp20; thrombin; GST tag; purification

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) Lpp20 蛋白是定位于细菌外膜上的一种高度保守的脂蛋白, 是激发免疫反应的主要成分^[1-4]。Lpp20 蛋白阳性与 *H. pylori* 感染、胃癌以及胃癌高发人群具有密切的相关性^[5-6]。研究表明, 用磷酸盐缓冲液从 *H. pylori* 外膜上洗脱下这种膜蛋白, 并经口免疫小鼠, 能诱导出特异性的 IgG 抗体的产生, 将这种抗体的杂交瘤细胞回输到小鼠体内后, 能明显减少细菌的感染量^[1]。研究提示, Lpp20 是 *H. pylori* 的一种比较理想的疫苗候选抗原。为了进一步研究 Lpp20 抗原的功能, 本研究在前期研究基础上^[7], 采用异丙基硫代半乳糖苷 (isopropylthio β -D-galactoside, IPTG) 诱导表达 Lpp20-谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 融合蛋白^[8], 并利用凝血酶 (thrombin) 经谷胱甘肽琼脂糖树脂 (glutathi-

one sepharose) 4B 柱上切除 GST 标签, 以获得重组 Lpp20 蛋白。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 质粒与菌株: 大肠埃希菌 BL21 (DE3) 和载体 pGEX-4T-1 (南方医科大学生物技术学院生物治疗研究所); Lpp20/pGEX-4T-1 重组表达质粒 (通讯作者构建)^[7]。(2) 试剂: 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、 β -巯基乙醇、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG (华美生物工程公司); 溶菌酶 (美国 Amresco 公司); Triton X-100 (美国 Sigma 公司); 低相对分子质量蛋白 marker (日本 Takara 公司); 谷胱甘肽琼脂糖树脂 (glutathione sepharose) 4B (英国 GE Healthcare 公司)、凝血酶 (英国 GE Healthcare 公司); 还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, 美国 Novagen 公司); BCA 蛋白检测试剂盒 (上海碧云天公司); 鼠抗 Lpp20 单克隆抗体 (通讯作者制备)^[7]; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Lpp20-GST 融合蛋白诱导表达 将重组

* 基金项目: 国家自然科学基金 (31070119); 广东省自然科学基金 (S2011010006070)

作者单位: 南方医科大学生物技术学院生物治疗研究所, 广东广州 510515

作者简介: 姜茵 (1988-), 女, 北京人, 本科在读, 研究方向: 生物技术。(王小平为本文并列第一作者)

通讯作者: 李妍, E-mail: liyan_nys@hotmail.com

表达质粒 Lpp20/pGEX - 4T - 1 转化大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态, 37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落, 接种至含氨苄西林(100 μg/mL) 的 LB 培养液中, 220 r/min 30 °C 振荡培养过夜, 次日按 1% 接种到 LB 培养液(100 μg/mL) 中, 220 r/min 30 °C 振荡培养, 至吸光度 (A)₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8 时, 加入 1 mol/L 的 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续诱导表达 4 h, 4 °C 5 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 采用 12% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 分析 Lpp20 - GST 融合蛋白表达条带; 用诱导前菌体作为对照。

1.2.2 Lpp20 - GST 融合蛋白表达形式分析 收集菌体称重并反复冻融; 然后按 10 mL/1 g 沉淀加磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.3) 重悬菌体, 同时按 10 mg/1 g 菌体加溶菌酶, 并按 1:1 000 加入 β-巯基乙醇, 室温搅拌 1 h。再进行超声破菌, 冰浴操作, 15 s/5 s, 全程 15 min, 35 °C 400 W。4 °C 12 000 r/min, 离心 30 min, 分别收集破碎上清和沉淀, 采用 12% SDS - PAGE 分析 Lpp20 - GST 融合蛋白表达形式。

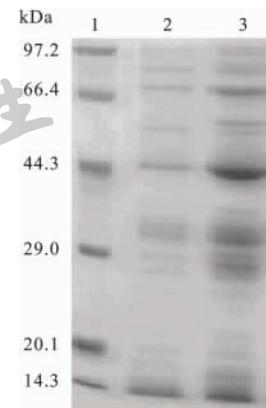
1.2.3 凝血酶柱子上切除融合蛋白 GST 标签 将 Lpp20 - GST 融合蛋白可溶性表达产物即超声破碎上清经 0.45 μm 的过滤器过滤, 利用谷胱甘肽琼脂糖树脂 4B 进行亲和层析纯化, 用 Bio - Rad 层析仪监测。装载 5 mL 谷胱甘肽琼脂糖树脂 4B 于层析柱上, 用 10 个柱床容积的 PBS(pH 7.3) 平衡柱子, 上样速度 1 mL/min, 再用 PBS 洗杂。加载凝血酶(thrombin) 混和液(80 U thrombin + 920 μL PBS/mL 层析介质) 到层析柱上, 密封柱子, 室温孵育 16 h, 用 3 个柱床容积的 PBS(pH 7.3) 洗涤柱子, 为避免标签蛋白被稀释, 用不同管收集洗脱液并用 12% SDS - PAGE 分析。GST 将继续结合在谷胱甘肽琼脂糖树脂 4B, 用 5 柱床容积的洗脱缓冲液(50 mmol/L 的 Tris - HCl, 10 mmol/L 的还原型谷胱甘肽, pH 8.0) 洗脱, 当在 280 nm 处有蛋白吸收峰时, 收集洗脱液, 进行 12% SDS - PAGE 分析。

1.2.4 Western blot 鉴定 Lpp20 蛋白 采用 western blot 法对切除 GST 的 Lpp20 蛋白进行鉴定。将 GST 蛋白、Lpp20 - GST 融合蛋白及 Lpp20 蛋白(500 ng) 经 12% SDS - PAGE 分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 以 5 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入鼠抗 Lpp20 单克隆抗体^[7](效价 1:500) 封膜, 室温下缓摇 1 h, Tris-HCl 缓冲盐溶液 + Tween (TBST, 25 mmol/L Tris-HCl, 137 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 0.7 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MgCl, pH 7.4) 洗膜 3 次, 10 min/次, 再加入辣根过氧化物酶(horse - redish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠 IgG

(效价 1:5 000), 室温下缓摇 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次 5 min/次, 增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 显色反应, 将膜放入夹板中, 在暗室中将 X 光片覆盖在膜上, 曝光 1 min。

2 结果

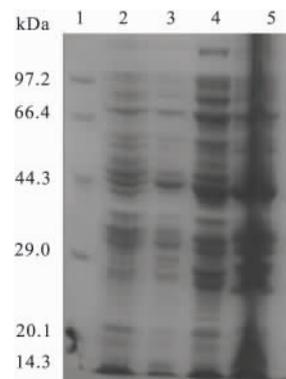
2.1 Lpp20 - GST 融合蛋白表达(图 1) SDS - PAGE 分析结果可见, 在相对分子质量约 45 kDa 处有蛋白条带的表达。GST 标签蛋白相对分子质量约为 26 kDa, Lpp20 目的蛋白预期表达分子质量约为 19 kDa, 表达结果与预期融合蛋白大小一致^[7]。



注: 1: protein marker; 2: Lpp20/pGEX - 4T - 1 诱导前; 3: Lpp20/pGEX - 4T - 1 诱导后。

图 1 Lpp20 - GST 融合蛋白的诱导表达

2.2 Lpp20 - GST 融合蛋白表达形式(图 2) SDS - PAGE 分析结果可见, 反复冻融的融合蛋白表达产物, 经溶菌酶裂解和超声破菌后, 在上清和沉淀中均有分布, 表明融合蛋白以部分可溶性形式表达, 部分以包涵体的形式表达。

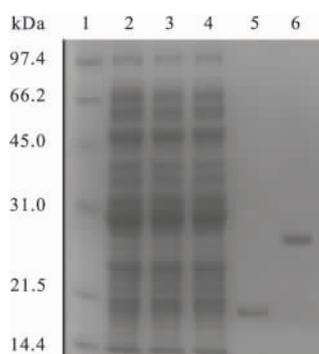


注: 1: protein marker; 2: Lpp20/pGEX - 4T - 1 诱导前; 3: Lpp20/pGEX - 4T - 1 诱导后; 4: 超声破菌后上清; 5: 超声破菌后沉淀。

图 2 Lpp20 - GST 融合蛋白的表达形式

2.3 Lpp20 - GST 融合蛋白纯化及其 GST 标签的切除(图 3) 选用融合蛋白可溶性表达产物经谷胱甘肽琼脂糖树脂 4B 柱纯化。纯化色谱图可见上样、超声破碎上清峰、凝血酶孵育后洗脱峰和还原型谷

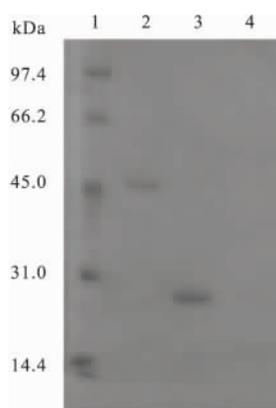
胱甘肽洗脱液洗脱峰。凝血酶孵育后消化下的目的蛋白 Lpp20 大小约为 19 kDa, 还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱下结合在柱子上的 GST 大小约为 26 kDa。



注: 1: protein marker; 2: 超声裂解液上清; 3: 穿透峰; 4: 洗杂峰; 5: 纯化的 Lpp20; 6: GST。

图 3 纯化的 Lpp20 - GST 融合蛋白及切除 GST 标签后 Lpp20 目的蛋白

2.4 Lpp20 目的蛋白鉴定(图 4) Western blot 结果可见,鼠抗 Lpp20 单克隆抗体与 Lpp20 蛋白和 GST - Lpp20 融合蛋白反应,而与 GST 蛋白不反应,表明凝血酶柱上切割 GST 标签后成功获得目的蛋白 Lpp20。



注: 1: protein marker; 2: Lpp20 - GST 融合蛋白; 3: Lpp20 蛋白; 4: GST 蛋白。

图 4 Western blot 分析切割 GST 标签后的 Lpp20 蛋白

3 讨论

本研究结果显示,对大肠埃希菌细胞破碎联合使用反复冻融法、溶菌酶法和超声破碎法 3 种方法,可达到比较好的破碎效果,使融合蛋白 Lpp20 - GST 在上清和沉淀中均有表达。GST 标签蛋白相

对分子质量约为 26 kDa, Lpp20 目的蛋白预期表达分子质量约为 19 kDa, 表达结果与预期融合蛋白大小一致^[7]。Western blot 结果可见,鼠抗 Lpp20 单克隆抗体与 Lpp20 蛋白和 GST - Lpp20 融合蛋白反应,而与 GST 蛋白不反应,表明凝血酶柱上切割 GST 标签后成功获得目的蛋白 Lpp20。

结果还显示,经谷胱甘肽琼脂糖树脂 4B 纯化后,在相对分子质量 45 kDa 和 26 kDa 附近出现 2 条条带,原因可能与 GST 系统的泄漏表达有关。

对于 GST 标签的切除,可以选择体外利用凝血酶从洗脱的融合蛋白上切除 GST 标签,也可以选择利用凝血酶在柱上直接切除融合蛋白的 GST 标签。本课题曾利用前一种方法得到了 Lpp20 蛋白^[9],但此方法要求的裂解条件要非常优化,因为蛋白酶用量、温度和完全降解的孵化时间因融合蛋白的不同而不同。在本研究中又试图尝试了后一种方法,同样得到了目的蛋白,并且此方法简单易行。

参考文献

- [1] Keenan J, Oliaro J, Domigan N, et al. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate [J]. *Infect Immun* 2000, 68 (6): 3337 - 3343.
- [2] Keenan J, Neal S, Allardyce R, et al. Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection [J]. *Vaccine* 2002, 20(23 - 24): 2981 - 2988.
- [3] Keenan JI, Rijpkema SG, Durrani Z, et al. Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, 36(3): 199 - 205.
- [4] Bakos N, Fekete B, Prohaszka Z, et al. High prevalence of IgG and IgA antibodies to 19-kDa *Helicobacter pylori*-associated lipoprotein in chronic urticaria [J]. *Allergy* 2003, 58(7): 663 - 667.
- [5] Shiesh SC, Sheu BS, Yang HB, et al. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of *H. pylori* is related to clinical outcome of *H. pylori* infection in Taiwan [J]. *Dig Dis Sci* 2000, 45(4): 781 - 788.
- [6] Konturek PC, Konturek SJ, Starzyska T, et al. *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2000, 14(10): 1311 - 1318.
- [7] Li Y, Ning YS, Wang YD, et al. Production of mouse monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori* Lpp20 and mapping the antigenic epitope by phage display library [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 325(1 - 2): 1 - 8.
- [8] 汪雪峰, 王克霞, 陈琳, 等. 球形幽门螺杆菌 vacA 基因表达质粒构建及表达 [J]. *中国公共卫生* 2007, 23(7): 834 - 836.
- [9] 姜茵, 奚月, 王小平, 等. 幽门螺杆菌 Lpp20 融合蛋白的表达、标签切除及鉴定 [J]. *生物技术* 2011, 21(4): 22 - 26.

收稿日期: 2011-03-17

(孔繁学编辑 郭薇校对)