



F3 重组毒素的克隆表达及纯化

朱海兵, 黄 轶, 曾昭淳

重庆医科大学生物化学及分子生物学教研室, 重庆 400016

摘要 以 pEKH-F3 质粒为模板, PCR 扩增 F3 片段, 将 F3 插入克隆质粒 PQE80L, 转化大肠杆菌, 筛选, 获得含有 F3 的 PQE80L 重组载体的克隆。提取绿脓杆菌菌株染色体 DNA 为模板, PCR 扩增绿脓杆菌外毒素 A 催化区, PE40。然后将 PQE80-F3 和 PE40 重组, 得到表达 PQE80L-F3-PE40 载体。转化至大肠杆菌 DH5a, BL21, 表达融合蛋白 F3-PE40。结果显示, 大肠杆菌表达了融合蛋白 F3-PE40, 表达的融合蛋白量大概占菌体总体蛋白量的 20%。通过质粒提取、PCR 扩增构建 F3-PE40 表达载体转化大肠杆菌, 成功地表达了融合蛋白 F3-PE40, 为大规模表达、纯化 F3-PE40 的进一步功能奠定了基础。

关键词 融合基因; 克隆; 表达; 绿脓杆菌外毒素 A 催化区

中图分类号 R73

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)12-0019-04

The Cloning, Expression and Purification of F3 Recombinant Toxin

ZHU Haibing, HUANG Yi, ZENG Zhaochun

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract F3 is inserted into PQE80L carrier, after being amplified by PCR, with the plasmid pEKH-F3 as the template, to obtain PQE80L-F3 recombinated plasmid. With extracted pseudomonas aeruginosa strain chromosome DNA as the template, PE40, the pseudomonas aeruginosa exotoxin A catalysis area, is amplified by PCR. Then PQE80-F3 is recombinated with PE40, to obtain PQE80L-F3-PE40 carrier. The DH5a and BL21 are obtained by transformation. The results show that F3-PE40 fusion protein is expressed and the quantity of expressed fusion protein accounts for about 20% of the total bacterial proteins. Through extraction of plasmid, PCR amplification, and F3-PE40 construction, E. coli expression vector is obtained by transformation to successfully express the fusion protein F3-PE40, which lays a foundation for large-scale expression and purification of F3-PE40 for further functionality.

Keywords fusion gene; clone; expression; pseudomonas aeruginosa exotoxin A catalysis area

0 引言

绿脓杆菌外毒素 ETA 是单转移酶家族, 将 NAD⁺的 ADP-

核糖基转移至底物使其 ADP-核糖化^[1-3]。绿脓杆菌外毒素 ETA 分子量为 66.0 kD, 有以下几个不同的功能域: 区域 Ia(氨基酸序列 1~252), 识别和与受体结合的区域; 区域 Ib(氨基酸序列 365~484); 区域 II(氨基酸序 253~364), 区域 II 则被认为与移位有关, 即将毒素从细胞膜外转移至细胞内有关; 区域 III(氨基酸序列 405~613), 区域 III 加上区域 Ib 是其催化区域, 用来进行 ADP-核糖化作用。绿脓杆菌外毒素 A 可以催化真核细胞蛋白质合成的延长因子 eEF-2ADP 核糖基化, 致使其失活, 阻断真核细胞蛋白质的生物合成, 导致真核细胞的死亡^[2-3]。由于酶有强大的催化能力, 从理论上讲, 只要一个绿脓杆菌外毒素 ETA 分子进入真核细胞, 就足以导致细胞的死亡。

F3 肽是来自高迁移组蛋白 (High Mobility Group Protein, HMG)N2 的 31 个氨基酸片段^[4]。F3 肽的受体是新生血管内皮细胞和肿瘤细胞表面标志分子——核仁素, 而核仁素在正常细胞中只在核内表达, 只有当细胞恶化或在肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞中才表达于细胞表面^[5-6]。利用 F3 肽能与肿瘤细胞膜上的受体结合, 以 F3 肽作为载体, 把抗肿瘤药物或基因治疗的载体导向肿瘤或肿瘤内皮细胞, 实现肿瘤的靶向治疗。

该实验用 F3 肽和肿瘤与肿瘤内皮细胞表面标志分子——核仁素结合的特异性, 并利用 F3 肽作为载体与绿脓杆菌外毒素 A 催化区 (PE40) 连接^[7]。从而, 构建 F3-PE40 表达载体, 进行表达和纯化, 获得较纯的 F3-PE40 蛋白, 以便进一步研究其抗肿瘤的活性

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5a, BL21 (DE3), PQE80L 由本实验室保存。

收稿日期: 2009-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (C030404)

作者简介: 朱海兵, 研究方向为肿瘤生化, 电子信箱: hintio@126.com; 曾昭淳 (通信作者), 教授, 研究方向为肿瘤生化, 电子信箱: zengzc88@yahoo.com.cn

1.1.2 试剂

基因工程所用的各种试剂购于 TAKARA 公司和北京赛百胜生物技术有限公司。

1.1.3 仪器

DNA 热扩增仪 Gel Doc 100 型成像仪和基因工程所需设备。

1.2 方法

1.2.1 PQE80L-F3-PE40 载体构建和鉴定

含 F3 全长基因序列的 pEKH-F3 质粒的抽提。根据 F3 的序列长度进行引物设计：正向引物 P1:5'-CGCCCTGCG-GATCCAAAGATGAACCGCAACGTC-3' (*Bam*HI)，下游引物 P2: 5'-CGCTGCAG CTTCTTAGCCGCTGCTTTT-3' (*pst*II)。按如下条件，在 PCR 仪上扩增：94℃预变性 4 min;94℃变性 40 s, 63℃退火 40 s,72℃延伸 40 s,共 30 个循环;72℃总延伸 10 min;反应结束后，取 5 μL 产物在浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳，鉴定扩增出与预期相应大小的 DNA 片段后，进行 PCR 产物纯化。

用 *Bam*HI 和 *Pst*II 限制性内切酶双酶切 PCR-F3 回收产物和质粒 PQE80L,两者按比例混匀，在 T⁴DNA 连接酶作用下 4℃连接 24 h。转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，涂布于含氨苄青霉素的琼脂糖平板上，37℃培养过夜，以快速法提取质粒比较重组 DNA 分子量大小，进行初步鉴定，限制性内切酶、PCR 鉴定重组质粒，阳性克隆命名为 PQE80L-F3。

1.2.2 PQE80L-F3-PE40 表达载体的构建

根据 PE40 的全长序列设计引物：上游引物 5'-GCCTGCAG GGTGCGGAG TTTCTTGCGGAC-3' (*pst*II)，下游引物 5'-GCAAGCTT TGCTGGTTTACCTGG TTGACTG-3' (*Hind*III)，然后进行 PCR 扩增和纯化。*Hind*III 和 *Pst*II 双酶切 PQE80L-F3 和 PE40 扩增产物，直接过柱回收酶切 PCR 片段，按试剂盒操作。再通过连接反应构建 PQE80L-F3-PE40 载体。CaCl₂ 法制备大肠杆菌 DH5α 感受态细胞和连接产物转化感受态细胞。以快速法提取质粒比较重组 DNA 分子量大小，进行初步鉴定，限制性内切酶、PCR 鉴定重组质粒，阳性克隆命名为 PQE80L-F3-PE40。载体构建示意图见图 1。

1.2.3 PQE80L-F3-PE40 表达载体转化和在大肠杆菌中诱导表达条件的优化

诱导温度：挑取单菌落于 2 mL LB 液体培养基，37℃剧烈震荡过夜，按 1:100 稀释至 10 mL LB 液体培养基中，继续培养 3~4 h 至 OD₅₉₀ 为 0.7，加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1.0 mmol/L，分成 4 组，分别于 25℃、30℃、37℃、42℃继续培养 5 h；IPTG 的浓度：挑取单菌落于 2 mL LB 液体培养基，37℃剧烈震荡过夜，按 1:100 稀释至 10 mL LB 液体培养基中，继续培养 3~4 h 至 OD₅₉₀ 为 0.7，分成 6 组，加入 IPTG 分别至终浓度 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 mmol/L，37℃培养 5 h。诱导时间：挑取单菌落于 1 mL LB 液体培养基，37℃剧烈震荡过夜，按 1:100 稀释至 10 mL LB 液体培养基中，继续培养 3~4 h 至 OD₅₉₀ 为 0.7，加入 IPTG 至终浓度 1.0

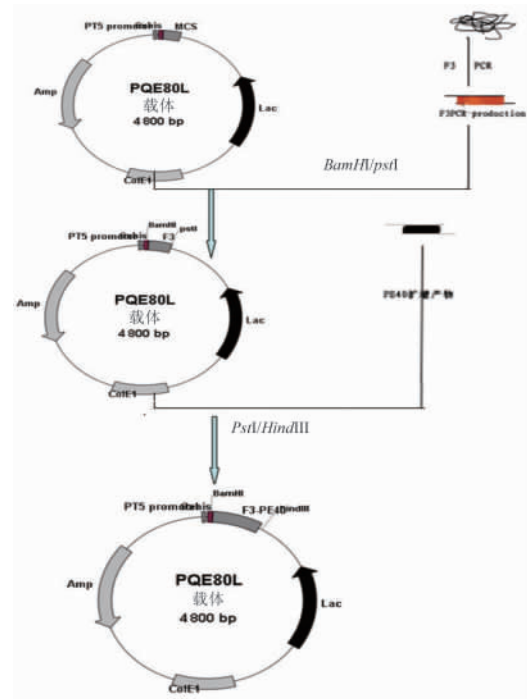


图 1 载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of vector construction

mmol/L，分成 6 组，分别于 30℃继续培养 1、2、3、4、5、6 h 分别收集 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中，8 000 r/min 离心 10 min，加 100 μL SDS 蛋白电泳缓冲液，混匀，煮沸 5 min，取 20 μL 诱导菌液和 5 μL 蛋白质标准分子量样品液进行 15% SDS-PAGE 电泳，以未经 IPTG 诱导的菌液作对照，考马斯亮蓝染色，用 RAD 软件分析 F3-PE40 蛋白质含量。

1.2.4 变性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

配制 15% 的分离胶（去离子水 2.3 mL，30% 丙烯酰胺 5 mL，1.5 mol/L Tris (pH 8.8) 2.5 mL，10% SDS 0.1 mL，10% 过硫酸铵 0.1 mL，TEMED 5 μL）和 5% 浓缩胶（去离子水 3 mL 30% 丙烯酰胺 0.5 mL，1.0 mol/L Tris (pH 6.8) 0.38 mL，10% SDS 0.03 mL，10% 过硫酸铵 0.03 mL，TEMED 3 μL）。分离胶一般放置 1 h，浓缩胶一般放置 0.5 h 或 1 h 左右，然后取去胶条，将其放入电泳槽中。取 20 μL 的样品加入加样孔中，加样时要让加样吸头随着样品进入孔中慢慢上移，以免样品溢出，影响样品含量。然后插上电源，电泳（恒压 60 V，大概 17 mA 左右），当溴酚蓝指示剂进入分离胶后调电压到 75~80 V，大概电泳 150~170 min，差不多到底部时停止电泳，取出凝胶，在左上角划去小凝胶，然后放入固定液中 0.5 h（缓慢摇）。再取出凝胶，放入 2% R250 染色液中 40~50 min（缓慢摇），再放入脱色液中缓慢摇 30 min，倒去脱色液，然后再加脱色液缓慢摇 1 h，再倒去脱色液、再加脱色液、再缓慢摇，过夜。

1.2.5 F3 重组毒素表达载体在大肠杆菌中大量表达

分别接种单菌落于 10 mL LB 液体培养基中（含 100 mg/L 氨苄青霉素），37℃剧烈震荡过夜，按 1:100 稀释接种于 500 mL LB 液体培养基中（含 100 mg/L 氨苄青霉素），37℃培养至

OD₅₉₀ 约为 0.7, 加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L, 37℃ 诱导表达 5 h, 8 000 r/min, 10 min 离心收集菌体。

1.2.6 蛋白质初纯品的制备

由于表达产物有 6xhis 组氨酸标签, 故表达产物可以通过 Ni-NTA 琼脂糖树脂纯化, 也可以按 Ni-NTA 纯化试剂盒操作。

取 150 mL 细菌培养物沉淀 10 mL 1×binding buffer without denaturant, 重悬沉淀, 超声破碎菌体后, 离心收集包涵体, 弃上清。加 2% Triton 和 2 mol/L 尿素洗涤包涵体洗涤, 重复上述步骤 3~4 次。用 1 mL 的包涵体裂解缓冲液 I (50 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 8 mmol/L 尿素), 冰上放置 1 h 和 9 倍体积的包涵体裂解缓冲液 II (50 mmol/L KH₂PO₄ (pH 10.7), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT) 冰上放置 30 min 溶解包涵体, 离心, 取上清。用 1×binding buffer with urea 平衡柱子时调节流速, 控制在每小时 10 柱体积的流速, 直至液面下降到柱面。将过滤后的包涵体溶解液上柱, 用 10 倍柱体积 1×Binding buffer with urea (0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, pH 7.9) 和 6 倍柱体积 1×wash buffer with urea (0.5 mol/L NaCl, 60 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, pH 7.9) 依次洗柱。最后用 1×Eluting Buffer with urea (0.5 mol/L NaCl, 1 mol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, pH 7.9) 洗脱, 每次 1 mL 洗脱和收集, 在每管中取 10 μL 上样, 电泳鉴定洗脱峰, 收集洗脱峰, 然后做 SDS-PAGE 分析。

2 讨论和结论

2.1 F3-PE40 克隆表达载体鉴定

克隆的 F3-PE40 载体通过测序和酶切鉴定, 测序结果和 F3-PE40 序列基本一致。同时把 F3-PE40 对重组质粒进行双酶切或同步酶切, 琼脂糖电泳显示在 700 bp 处有一条带; 而在非酶切重组质粒和单酶切重组质粒中无此带 (图 2)。

2.2 PQE80L-F3-PE40 表达产物的鉴定

PQE80L-表达产物的鉴定: 转化后的大肠杆菌经 IPTG 诱导后, 菌体总蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示在 27 kD 处有一条新带, 而未经 IPTG 诱导的菌中未发现有此带。SDS-PAGE 图经扫描显示, 该蛋白的表达量约占菌体总蛋白量的 20%。随后用不同 IPTG 浓度 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 mmol/L), 不同时间 (1、2、3、4、5、6 h) 和不同温度 (25、30、37、42℃), 对表达的条件进行优化, 结果显示在 0.6 mmol/L (IPTG 浓度) 诱导 5 h 时, F3-PE40 表达量最大, 而在不同的温度下表达量没有明显差异 (图 3)。

2.3 F3 重组毒素纯化蛋白的制备

通过诱导表达, 结果表明, 蛋白质表达产物以包涵体形式进行表达, 通过洗涤包涵体, 洗涤后的包涵体经尿素变性、亲和纯化和透析复性后, 得到纯化蛋白质分子量 27 kD 的含量大约是 90% (图 4)。

绿脓杆菌能分泌多种具有致病性产物, 外毒素 A 是重要

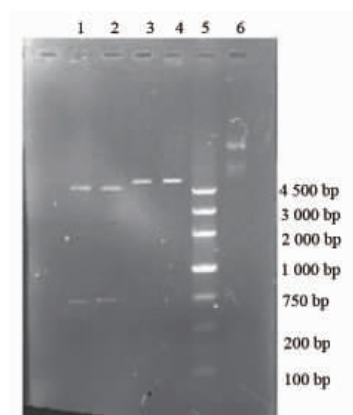


图 2 重组 PQE80L-F3-PE40 质粒酶切鉴定
Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid PQE80L-F3-PE40 digested by *Bam*HI/*Hind*III

注: 泳道 1~2—PQE80L-F3-PE40 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切结果; 泳道 3—PQE80L-F3-PE40 *Bam*HI 酶切结果; 泳道 4—PQE80L-F3-PE40 *Hind*III 酶切结果; 泳道 5—对照; 泳道 6—未酶切的 PQE80L-F3-PE40。

Notes: Lane 1~2: PQE80L-F3-PE40 digested by *Bam*HI/*Hind*III; Lane 3: PQE80L-F3-PE40 digested by *Bam*HI; Lane 4: PQE80L-F3-PE40 digested by *Hind*III; Lane 5: DNA maker; Lane 6: PQE80L-F3-PE40 without being digested.

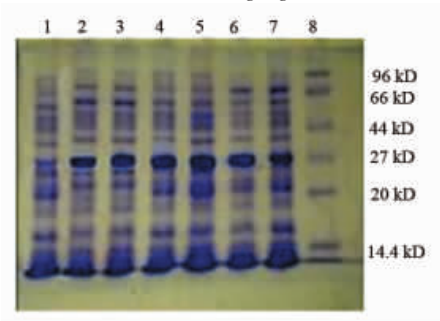


图 3 不同浓度下 PQE80L-F3-PE40 的表达
Fig. 3 Expression of PQE80L-F3-PE40 in different concentrations by SDS-PAGE

注: 泳道 1—未经 IPTG 诱导; 泳道 2~7—经 IPTG 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 mmol/mL 不同浓度诱导下的 PQE80L-F3-PE40 的表达; 泳道 8—标准蛋白质分子量。

Notes: Lane 1: PQE80L-F3-PE40 without induction; Lane 2~7: 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 mmol/mL PQE80L-F3-PE40 induction; Lane 8: protein molecular weight.

的致病性和致死性物质, 它进入真核细胞后, 催化 eEF2 的 ADP-核糖化。ADP-核糖化后 eEF2 没有活性, 真核细胞蛋白质合成受到抑制而死亡^[3]。绿脓杆菌外毒素 A 催化 eEF2 的 ADP-核糖化, 其催化域的结构如图 5。

文献报道把绿脓杆菌外毒素 A 的催化域 PE40 从毒素分离出来后, 它仍然保持对底物进行 ADP-核糖修饰的功能。这样就可以把具有导向功能的肽与之相连, 构成一个靶向的

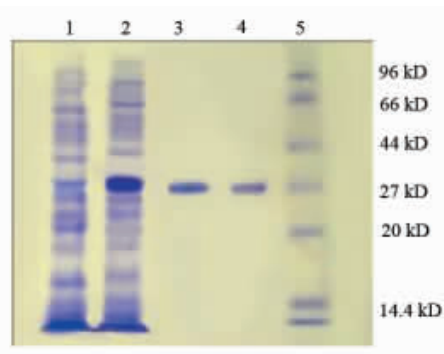


图 4 PQE80L-F3-PE40 的表达纯化

Fig. 4 Expression of PQE80L-F3-PE40 and its purification by SDS-PAGE

注:泳道 1—未经 IPTG 诱导;泳道 2—经 IPTG 诱导 PQE80L-F3-PE40 的表达;泳道 3~4—F3-PE40 蛋白的纯化;泳道 5—蛋白质标准分子量。

Notes: Lane 1: PQE80L-F3-PE40 without induction; Lane 2: PQE80L-F3-PE40 inductions; Lane 3~4: PQE80L-F3-PE40 purification; Lane 5: protein molecular weight.

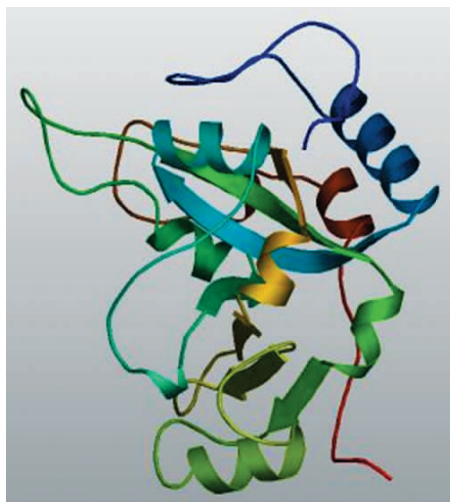


图 5 绿脓杆菌外毒素 A 催化域的结构

Fig. 5 Structure of pseudomonas exotoxin A catalytic domain

杀死细胞的系统,尤其是对杀死肿瘤细胞的靶向治疗系统具有很重要的意义。

PQE80L 是一种高效原核表达载体,其表达的目的蛋白的 N 端有 6 个组氨酸标签以便于纯化和检测。该试验经 PCR 扩增、限制性酶切位点引入、载体和表达菌的选取,最终选择了 PQE80L 作为原核表达载体。其目的是使表达菌经诱导能产生与预期片段一致的蛋白质产物,为了融合蛋白仍然保持 PE40 的催化功能,所以我们在目的蛋白的 N-端柔性连接了具有肿瘤靶向并具有内在化作用的 F3 肽,构建 F3-PE40 表达载体^[7]。而根据绿脓杆菌毒素 PE40(Ib+III)的空间结构(图 5),F3 肽与 PE40 的连接可以是 F3-PE40,也可以是 PE40-

F3,不需要连接。因为 F3-PE40 的 ADP-核糖化酶的活性在 Ib 羧基侧和 III,因而 Ib 的氨基侧的几个氨基酸残基就可起连接的作用。这种特殊的柔性连接能够保证融合蛋白中 F3 片段和 PE40 各自都保持其正确的空间构象和生物学活性。在进行诱导表达过程中发现,经 IPTG 诱导,菌体量稍微减少,这可能是表达产物对宿主菌在一定程度上有杀伤力。同时表达的 F3-PE40 蛋白,经鉴定正确后,进行大量诱导表达。表达的 F3-PE40 以包涵体形式存在。通过洗涤包涵体溶解包涵体,经 Ni-NTA 层析得到了目的蛋白。本研究通过蛋白质工程方法得到重组蛋白,该方法简便、产量高、稳定性好,为进一步获得大规模的蛋白质纯化和功能奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] Domenighini M, Rappuoli R. Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 21(4): 667-674.
- [2] Yates S P, Merrill A R. A catalytic loop within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A modulates its transferase activity [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (37): 35029-35036.
- [3] Yates S A S P, Merrill A R. Insight into the catalytic mechanism of *pseudomonas aeruginosa* exotoxin A[J]. *Biochem*, 2002, 277(48): 46669-46675.
- [4] Porkka K, Laakkonen P, Hoffman J A, et al. A fragment of the HMG2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7444-7449.
- [5] Christian S, Pilch J, Akerman M E, et al. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels [J]. *J Cell Biology*, 2003, 63(4): 871-878.
- [6] Grinstein E, Shan Y, Karawajew L, et al. Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(31): 22223-22235.
- [7] 毕美霞, 杨渝珍, 舒平, 等. IL-2 重组毒素的克隆、表达及对 IL-2R⁺淋巴细胞的特异性细胞毒效应[J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 16(3): 1-4.

Bi Meixia, Yang Yuzhen, Shu Ping, et al. *Chinese Journal of Immunology*, 2002, 16(3): 1-4.

(责任编辑 王芷)

《科技导报》“科技工作者建议”征稿

“科技工作者建议”栏目专门刊登科技工作者近期提出的、与科学技术相关的工作意见和建议。科技建议应着眼于科技研究、发展、应用、政策等领域的实际问题,要求有明确、具体的内容,方法上尽量具有可操作性。文字应简洁明了,非特别重大的建议以 500 字左右为宜,特别重要的建议不超过 2 200 字。请注明建议人姓名、单位。欢迎国内外科技工作者及各级科协、学会投稿。栏目责任编辑:宁方刚;投稿邮箱:nfg@cast.org.cn