

GST-EGF 融合蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化^{*}

李文清 徐柏年 朱 坚 罗进贤^{**}
(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要 将小鼠 EGF 基因克隆至谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合表达载体 pGEX-2T, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得高效表达, 融合蛋白 GST-mEGF 经 Sepharose 4B-GSH 亲和层析柱纯化和凝血酶消化获得有免疫活性的 mEGF, 表明 GST 融合基因表达系统不仅能提高表达产物的稳定性也有利于产物的纯化.

关键词 GST-EGF, 基因表达, 大肠杆菌

分类号 Q 78

表皮生长因子 (EGF) 是高等动物体内的一种多肽调节因子, 由 53 个氨基酸残基组成^[1], 能促进表皮、内皮细胞等多种细胞的生长, 增强 DNA 蛋白质的合成^[2,3]. 临床上可用以治疗皮肤创伤、烧伤、角膜损伤及消化性溃疡等. 人和小鼠的 EGF 有 39 个氨基酸相同, 2 个二硫键的位置也一样, 有交叉免疫反应, 竞争同一受体结合位点, 具有相同的生物活性^[4]. 由于其相对分子质量小, 表达蛋白往往不稳定, 采用谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 融合基因表达系统不仅可以提高表达产物的稳定性也有利于产物的纯化. 本文报道应用 pGEX-2T 表达系统实现小鼠 EGF (mEGF) 基因在大肠杆菌中的融合表达及表达产物的纯化.

1 材料与方法

(1) 菌株与质粒: 大肠杆菌 DH5 α 及 C600 为本室保存, 质粒 pBluescriptII SK 及 pGEX-2T 分别购自 Clontech 及 Pharmacia 公司, 质粒 pBluescriptII SK-EGF 含 mEGF cDNA, 为本室构建.

(2) 主要试剂: 限制酶 *Eco*RI, *Bam*HI, *Bcl*I, *Sma*I; T4 DNA 连接酶, Klenow 酶分别购自 GIBCO-BRL 及 Promega 公司. IPTG 低熔点琼脂糖、凝血酶及 mEGF 抗体为 Sigma 公司产品. Sepharose 4B-谷胱甘肽层析柱为 Pharmacia 公司产品.

(3) 质粒 DNA 的检测、纯化、酶切反应、酶切片段的回收和连接^[5].

(4) 大肠杆菌转化和重组体筛选^[5].

(5) mEGF-GST 融合蛋白在大肠杆菌中的表达: 接种大肠杆菌 DH5 α 单菌落于 5 mL

^{*} 广东省“八五”重点资助项目 ^{**} 通讯联系人

收稿日期: 1997-09-08 李文清, 女, 33 岁, 讲师

LB中, 37℃振荡培养过夜, 次日以 1%接种量转种于新鲜 LB中, 培养至 A值约为 0.5, 加入 IPTG至终浓度为 1 mmol/L进行诱导表达, 继续培养 4 h, 取 1 mL离心, 收集菌体, 悬浮于 40μL双蒸水中, 加入等体积的 2×上样液, 混匀后于 100℃加热 5 min, 取 20μL走 SDS-PAGE电泳.

(6) 表达产物的纯化: 菌体经 pH7.8的磷酸缓冲液 (PB)洗涤后用含 1%的 Triton X-100的 PB缓冲液悬浮, 超声波破碎细胞, 12 000 r/min离心, 上清置 4℃冰箱做直接亲和层析, 粗包涵体 (沉淀) 经纯化、裂解、复性后与细胞裂解上清一起, 经 Sepharose 4B-GSH亲和层析, 获得 GST-EGF融合蛋白. 融合蛋白经凝血酶消化得 EGF.

(7) 免疫印迹法检测表达产物: 电泳胶的转膜按 Sambrook的方法^[5], 免疫印迹的检测采用 Amersham公司的 ECLTM免疫印迹分析系统, 方法按 ECLTM免疫印迹手册进行.

2 结果与讨论

2.1 含 GST-mEGF融合基因的重组质粒的构建

重组质粒的构建如图 1所示, 用 BamHI, EcoRI 双酶切质粒 pBluescript-EGF5, 用低熔点琼脂糖电泳回收含 mEGF编码区的 BamHI-EcoRI 小片段, 与经 BamHI、EcoRI 酶切的 pGEX-2T混合、连接. 连接产物转化 E.coli C600, 筛选 Amp^r转化子, 经质粒检测和 BamHI、EcoRI 双酶切电泳分析获得含 mEGF基因的表达质粒, 命名为 pGEX-2T-EGF. 从图 1可见插入的 mEGF基因片段的读码框与上游 GST的读码框相符, DNA序列分析结果也证明 mEGF基因与 GST基因连接处的 DNA序列是正确的.

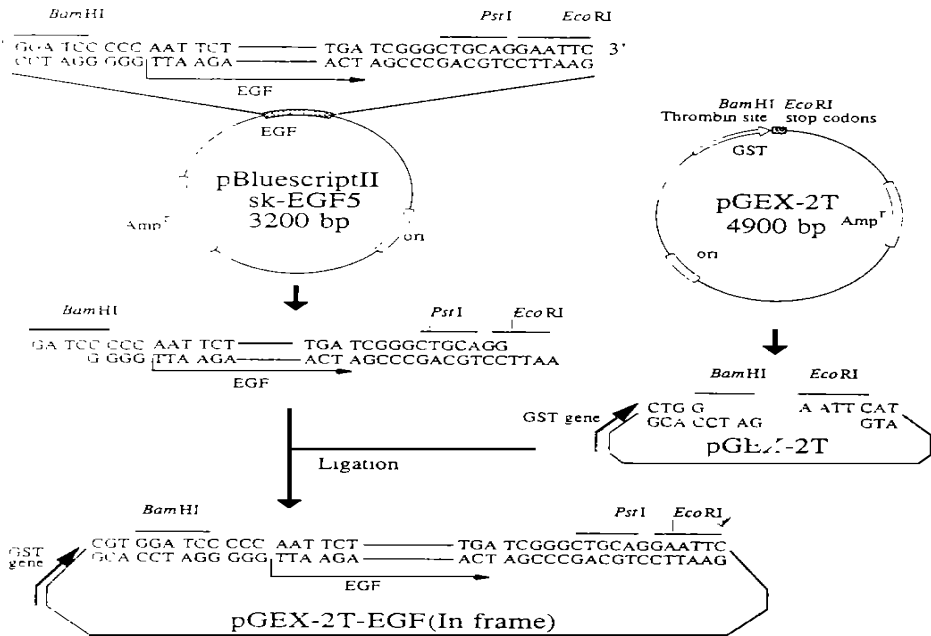


图 1 含 GST-mEGF 基因的表达载体的构建

Fig. 1 Construction of expression vector harboring the GST-mEGF gene

2.2 GST-mEGF融合基因在大肠杆菌中的表达

从大肠杆菌 C600(pGEX-2T-EGF)中提取质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,获得的 DH5 α (pGEX-2T-EGF)按材料与方法(5)中的方法表达 mEGF基因,用 SDS-PAGE进行分析.电泳结果显示,含 pGEX-2T-EGF的 DH5 α 经 IPTG诱导后出现 1条新的相对分子质量为 3.2×10^4 的蛋白带,不经诱导的不出现相对分子质量为 3.2×10^4 的带,而仅含载体 pGEX-2T 的 DH5 α 有 1条相对分子质量为 2.6×10^4 的浓带,此结果与理论推导大小一致(图 2a).

为估计基因的表达水平用 Ultro-Scan XL激光扫描仪对电泳凝胶进行激光扫描,根据扫描结果测算出表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 21%,经测定单位体积菌体蛋白总量后折算出 GST-mEGF融合蛋白的表达量为 115 mg/L.

SDS-PAGE凝胶转硝酸纤维素膜后用 ECLTM免疫印迹分析试剂盒检测,结果如图 2b,只有经 IPTG诱导的 DH5 α (pGEX-2T-EGF)样品才能与 mEGF抗体产生阳性反应,不经诱导和只含 pGEX-2T载体的样品均无反应.以上结果说明 GST-mEGF融合蛋白已在大肠杆菌获得高效表达,表达产物具有 mEGF的免疫活性.



图 2 GST-mEGF在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 Expression GST-mEGF in *E. coli*

(a) SDS-PAGE电泳; (b) 免疫印迹法分析. 1相对分子质量对照; 2 DH5 α (pGEX-2T-EGF), 不诱导; 3 DH5 α (pGEX-2T-EGF), 诱导; 4 DH5 α (pGEX-2T), 诱导

2.3 表达产物的纯化和凝血酶消化

将 DH5 α (pGEX-2T-EGF) 培养于 500 mL LB中经 IPTG诱导表达后用超声波破碎菌体,包涵体纯化.裂解.复性后与细胞裂解上清液一起上 Sepharose 4B-GSH亲和层析柱纯化,层析柱用 5 倍体积的 5 mmol/L的 GSH洗脱.图 3a的电泳显示纯化情况.经过复性的 GST-mEGF经 Sepharose 4B-GSH柱层析后在电泳图上显示单一的带.纯化的 GST-mEGF在室温下用凝血酶消化 18 h可获得相对分子质量约 6×10^3 的 mEGF(图 3b).重组的 mEGF与抗 mEGF呈阳性反应,表明它具有免疫活性.

大肠杆菌的表达产物主要是不溶性的包涵体,纯化比较困难,采用 GST-mEGF融合基因表达系统,不仅能克服 EGF相对分子质量小不够稳定的问题,也有利于产物的纯化. GST-EGF融合蛋白复性后经 GST-GSH亲和层析柱层析后在电泳上出现单一的带,纯度在 95%以上,包涵体经裂解.复性和亲和层析后回收率在 18%以上,以上结果说明,采用 pGEX-2T融合基因系统不仅可以高效表达重组的 mEGF而且可通过亲和层析快速有效的纯化融合蛋白,获得电泳纯的 mEGF.对小分子的多肽类产物, GST融合基因表达系统是

一种值得推广的表达系统.

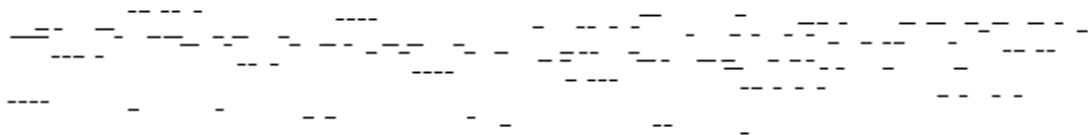


图 3 GST-mEGF 纯化及凝血酶消化产物的凝胶电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of GST-mEGF purification and thrombin digested product

(a) SDS ($d=12\%$) 凝胶电泳. 1 裂解液; 2 GST-mEGF 包涵体; 3 纯化包涵体; 4 复性产物; 5 Sepharose 4B-GSH 亲和层析产物; 6 相对分子质量对照. (b) mEGF 的 SDS ($d=15\%$) 凝胶电泳. 1 相对分子质量对照; 2 纯化后的 GST-mEGF; 3 凝血酶消化产物

参 考 文 献

- 1 Taylor, Mitchell W M, Cohen S, et al. Epidermal growth factor—physical and chemical properties. J Biol Chem, 1972, 247: 5928~ 5934
- 2 Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem, 1990, 265: 7709~ 7712
- 3 Cross M, Dexter M. Growth factor in development, transformation and tumorigenesis. Cell, 1990, 64: 271~ 280
- 4 Clare J J, Romanos M A, Rayment F B. Production of mouse epidermal growth factor in yeast high level secretion using pichia pastoris strain containing multiple gene copies. Gene, 1991, 105: 205~ 212
- 5 Sambrook J, Fritsch E T, Maniatis T. Molecular cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1~ 50

Expression of GST-EGF Fusion Protein in *E. coli* and Its Purification

Li Wenqing* Xu Bainian Zhu Jian Luo Jinxian

Abstract Epidermal growth factor (EGF) enhances the growth of various cell types and has wide clinical applications. EGF gene has been expressed in *E. coli* but its expressed product is usually unstable because of its low molecular weight. In this study, mouse EGF gene was cloned into GST gene fusion vector pGEX-2T. The resultant plasmid pGEX-2T-EGF was used to transform *E. coli* DH5 α , where the GST-EGF fusion protein was expressed efficiently. After purification with Sepharose 4B-GSH affinity column and digestion with thrombin, immunoactive mEGF was obtained, indicating that the GST fusion gene system is not only able to increase the gene product stability but also helpful to product purification.

Keywords GST-EGF, gene expression, *E. coli*

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China