

蔗糖浓度对渗透休克法提取细胞周质重组蛋白的影响

郭建华 (西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆 402460)

摘要 [目的]研究不同蔗糖浓度的高渗液对渗透休克法(Osmotic Shock)提取细胞周质蛋白的影响。[方法]将已经构建好的含FbpA基因的表达质粒转化到EC感受态细胞中,分别在20%、30%、40%和50%的蔗糖高渗液条件下用Osmotic Shock纯化蛋白,SDS-PAGE电泳检测蛋白。[结果]30%和40%的蔗糖高渗液能得到浓度更高的重组蛋白,而用20%和50%的蔗糖高渗液提取蛋白产量较低。[结论]30%和40%的蔗糖高渗液能提高Osmotic Shock法提取细胞周质重组蛋白产量。

关键词 蔗糖;渗透休克;细胞周质;重组蛋白

中图分类号 S188+.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)04-0147-02

Effect of Sucrose Concentration on Periplasm Recombination Protein Extracted by Osmotic Shock

GUO Jian-hua (Department of Veterinary Medicine, Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460)

Abstract [Objective] To study the effect of hypertonic solutions with different sucrose concentrations on periplasm protein extracted by Osmotic Shock method. [Method] The constructed vector with FbpA gene was transformed to EC competent cell. The recombination proteins were extracted by Osmotic Shock method with 20%, 30%, 40% and 50% sucrose respectively. The protein was detected by SDS-PAGE electrophoresis. [Result] The result showed that using 30% and 40% sucrose hypertonic solutions could receive more recombination proteins, while 20% and 50% sucrose solutions received fewer protein. [Conclusion] 30% and 40% sucrose hypertonic solutions could increase the production of periplasm recombination protein extracted by Osmotic Shock.

Key words Sucrose; Osmotic Shock; Periplasm; Recombination protein

由于大肠杆菌遗传背景清楚,操作简单,便于进行大规模培养等,因此常用于表达基因工程的重组蛋白,其在医药、农业等行业的应用非常广泛,但目标重组蛋白的提取、纯化往往耗时费力,产量低且成本高昂,有时需要用到专业、昂贵的仪器和设备,如细胞破碎仪、亲和层析柱等,或者需要用到昂贵的试剂,如Nickel等,其操作繁琐,蛋白产量也受影响^[1]。

细胞周质(Periplasm)是位于革兰氏阴性细菌内膜和外膜之间的结构,其氧化环境有利于蛋白的折叠,所以其蛋白纯化也比较简单。研究表明,用渗透休克法(Osmotic Shock)可以比较简单地提取位于细胞周质中的蛋白。Osmotic Shock纯化蛋白的原理是首先利用高浓度蔗糖溶液造成高渗透压让细胞收缩,然后用低浓度的硫酸镁处理细胞,可以诱导在细胞周质的蛋白释放,其成本低廉,操作简单快速,为基因工程中蛋白纯化提供了一条新思路。文献多报道所使用的蔗糖浓度是20%,但不是所有的蛋白在20%的蔗糖浓度下都可以得到高质量的重组蛋白。铁结合蛋白(Ferric-binding protein, FbpA)是位于革兰氏阴性菌细胞周质中、与铁代谢密切相关的蛋白,其分子量在37 ku左右^[2-3]。该研究利用已经构建的带有FbpA蛋白的T7启动子表达质粒,转化到EC感受态细胞,通过改变不同浓度的蔗糖,研究其对Osmotic Shock纯化蛋白产量的影响,探索Osmotic Shock提纯蛋白的最佳试验条件,为今后开发以FbpA蛋白为前导序列引导融合蛋白进入细胞周质,进而纯化蛋白提供资料。

1 材料与方

1.1 载体与感受态细胞 该试验的载体是已经构建好的T7启动子系统,启动子后面是EcoR I和BamH I酶切位点,接着

是连续8个组氨酸标签,TEV酶水解位点,FbpA基因,Hind III酶切位点,FbpA基因是927个碱基。表达产物包括组氨酸标签、TEV酶水解位点以及FbpA基因,约43 ku。质粒的结构如图1所示。感受态细胞是EC大肠杆菌菌株。

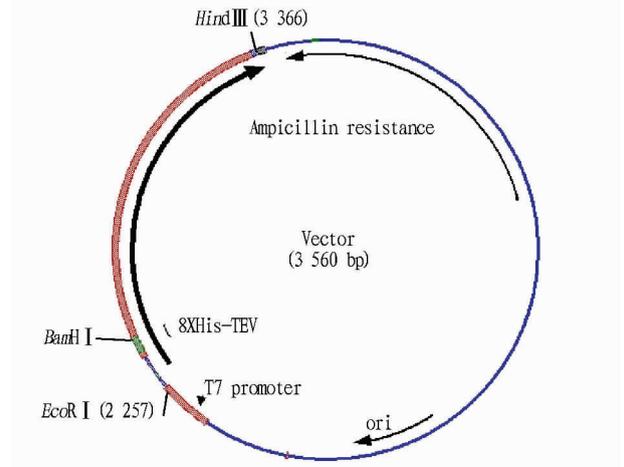


图1 构建的质粒结构

Fig.1 The constructed plasmid structure

1.2 试剂 高渗溶液:将适量蔗糖溶解于pH 8.0的30 mmol/L Tris溶液中,分别配制成含有20%、30%、40%、50%蔗糖的高渗溶液。低渗溶液:5 mmol/L MgSO₄溶液。表达大肠杆菌培养基:转化菌株的培养基按照参考文献[4]进行,该培养基是Studier FW开发的一种免异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、可自动诱导的用于重组蛋白表达的专用培养基。

1.3 方法

1.3.1 质粒载体的转化与菌株培养。取实验室保存的、经过纯化的高质量质粒载体2 μL(约500 ng)加到在冰上融化的60 μL的EC感受态细胞中,用加样枪吹打混匀,置于冰上30 min后,42℃水浴中热休克2 min,然后再置于冰上3 min,

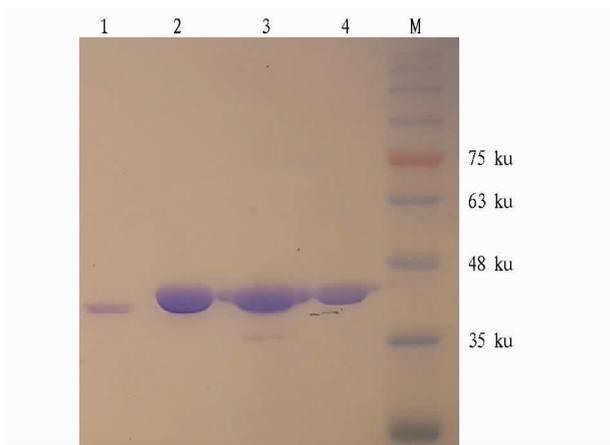
加入 LB 液体培养基 1 mL, 37 °C 摇床中以 180 r/min 振荡培养 90 min 后, 加入含有 80 mL 表达用培养液的三角瓶中, 180 r/min 振荡培养 16 ~ 24 h。

1.3.2 Osmotic Shock 纯化蛋白。将 80 mL 培养物充分混匀, 以每管 20 mL 分装于 50 mL 离心管中, 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min, 收集菌株, 倒去上层培养基, 4 管分别加入 10 mL 含有 20%、30%、40% 和 50% 蔗糖的高渗溶液, 用吸管反复吹吸菌体, 使菌体充分打散, 室温摇晃 10 min 后, 在 4 °C 中 4 000 r/min 离心 30 min, 迅速倒去上清, 将离心管倒置于纸巾中, 彻底吸干多余的高渗溶液后, 迅速加入 1.5 mL 5 mmol/L 的低渗 MgSO₄ 溶液, 用吸管反复吹吸沉淀, 打散菌体, 然后置于冰上 20 min 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 30 min, 小心吸取上清至 1.5 mL 离心管中, 即为 Osmotic Shock 蛋白溶液。

1.3.3 电泳与染色。将前面 4 种蔗糖浓度下提取得到 15 μL 的蛋白溶液与 15 μL 蛋白上样缓冲液混合, 上样 SDS-PAGE, 160 V 电泳 60 min, 考马斯亮蓝染色 5 min, 脱色液洗脱背景, 照相分析结果。

2 结果与分析

从图 2 可以看出, 各浓度蔗糖高渗液均能提取出蛋白质, 出现的蛋白分子量在 35 ku ~ 48 ku, 符合预期的片段大小。说明 FbpA 蛋白作为在细胞周质的蛋白, 可以通过 Osmotic Shock 被很好地提取出来。



注: 1~4 分别是 20%、30%、40% 和 50% 蔗糖高渗液提取出的 FbpA 蛋白, 5 是 Marker

Note: 1-4 are FbpA protein extracted by 20%, 30%, 40% and 50% sucrose hypertonic solutions respectively, 5 is Marker

图 2 不同蔗糖浓度提取 FbpA 重组蛋白电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of FbpA recombinant protein extracted by different concentration sucrose

4 种蔗糖浓度下, 通过 Osmotic Shock 均能观察到重组蛋白, 从图 2 可以看出, 在 30%、40% 的蔗糖浓度下, 蛋白产量最高, 而蔗糖浓度为 20% 时, 蛋白产量偏低, 当蔗糖浓度达 50% 时, 蛋白产量下降。

3 讨论

用大肠杆菌表达的重组蛋白可以在细菌的细胞质中或者分泌到细胞周质中, 也可以分泌到细胞外面。在细胞质中的蛋白, 常以包涵体 (Inclusion bodies) 的形式存在, 让蛋白不能正确折叠, 且破碎细胞常用到昂贵的裂解酶或专门的细胞破碎仪等复杂设备。而分泌到细胞外的蛋白需要很长的前导序列, 增加了蛋白表达的难度。笔者研究了大肠杆菌表达周质蛋白, 简化提取纯化步骤, 并研究了 Osmotic Shock 法提取蛋白最佳的蔗糖浓度^[5]。从该研究来看, Osmotic Shock 法提取大肠杆菌细胞周质的蛋白, 可以得到纯度和浓度都较高的重组蛋白, 整个试验流程只需要 2 ~ 3 h, 且不需要昂贵的仪器、设备和试剂。

从已有的文献报道来看, 多数使用的蔗糖浓度是 20%。从该研究来看, 提高蔗糖浓度可以进一步提高产量, 但不是对所有蛋白都如此, 因此在用 Osmotic Shock 法纯化蛋白时, 可以对所提取的蛋白进行蔗糖浓度试验条件的优化研究中, 对于由 FbpA 介导的细胞周质蛋白, 可以把 Osmotic Shock 的蔗糖浓度提高到 40%。

Osmotic Shock 只适用于细胞周质的蛋白; 对于在细胞质里面的蛋白是不起作用的; 对于细胞质的蛋白, 可以用一些细胞周质蛋白的前导序列, 帮助细胞质蛋白进入细胞周质, 再用 Osmotic Shock 方法进一步释放, 这样可以节约蛋白纯化的时间与成本, 提高蛋白的产量^[6]。

参考文献

- [1] STEINER D, FORRER P, STUMPP M T, et al. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display[J]. *Nature biotechnology*, 2006, 24(7): 823-831.
- [2] FERREIRÓS C, CRIADO T M, GÓMEZ J A, et al. The neisserial 37 kDa ferric binding protein (FbpA)[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999, 123(1): 1-7.
- [3] WANG S P, OGATA M, HORITA S, et al. A novel model of ferric ion coordination by the periplasmic ferric ion-binding subunit FbpA of an ABC-type ion transport from *Thermus thermophilus* HB8[J]. *Acta Cryst*, 2012, 70(1): 196-202.
- [4] STUDIER F W. Protein production by auto-induction in high-density shaking culture[J]. *Protein Expr Purif*, 2005, 41(1): 207-234.
- [5] ZHOU Y Z, LIU P, GAN Y, et al. Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering[J]. *Microbial cell factories*, 2016, 15: 47.
- [6] PAAL M, HEEL T, SCHNEIDER R, et al. A novel Ecotin-Ubiquitin-Tag (ECUT) for efficient, soluble peptide production in the periplasm of *Escherichia coli*[J]. *Microbial cell factories*, 2009, 8: 7-15.