

简报

一步法提纯具有 β -半乳糖苷酶活性的杂交蛋白*

刘克义

(山东省寄生虫病防治研究所, 济宁)

A. SAUL

(澳大利亚昆士兰医学研究院)

在基因工程研究中,常把外源 DNA 插入到载体 β -半乳糖苷酶基因上,然后在大肠杆菌中扩增,以杂交蛋白的形式表达^[1-3]。然而,由于此种蛋白混有大肠杆菌菌体蛋白成分,不能直接应用,须进一步提纯。Agnes^[4] 和 Fowler 等^[5]曾报道该蛋白的提纯方法,但操作复杂,产量很低。我们用 DEAE-Sephacel 离子交换一步法提纯恶性疟原虫血期抗原基因所表达的杂交蛋白,获得满意结果。并与其他方法作了比较。

材料和方法

一、材料

DEAE-Sephacel 为 Pharmacia 公司产品;载体为细菌噬菌体 λ gt11^[6],受体菌为大肠杆菌 Y1090 R⁻M⁺ 变异株^[7];按标准方法建立基因组 DNA 库^[8];基因克隆筛选见另文报道(刘克义等,待发表)。

二、杂交蛋白粗制液的制备

将含有恶性疟原虫血期抗原基因的重组噬菌体 37℃ 下感染受体菌 Y1090, 20 分钟后,加入 1.5mol/L 的诱导物异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液, 37℃ 摇育 4—5 小时。至菌体裂解、溶液透明、释放出杂交蛋白时,收集并贮于 4℃。使用前将此液离心 10000r/min 5 分钟,取上清,按 10:1 的比例与 0.5mol/L 咪唑-HCl 混匀,并于室温下摇育处理 20 分钟。

三、离子交换步骤

将 DEAE-Sephacel 用 0.5mol/L 咪唑-HCl 缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟后,配成 50% 悬液。然后加入上述处理好的 10 倍量的蛋白液,混匀,室温轻轻摇育 2 小时。经 10000r/min 离心 5 分钟,去上清后,用 pH6.5、0.5mol/L 咪唑-HCl 和蒸馏水各洗沉淀一次,再换成 pH4.5、0.5mol/L 醋酸钠洗一次。并分别收集上清。

四、纯度鉴定

将各部分收集液经 SDS-PAGE^[9] (7.5% 分离胶、3% 浓缩胶)分离后,再进行硝酸银染色^[10],以鉴定提纯效果。

结 果

一、被提取物中杂交蛋白的证实

杂交蛋白粗制液经 SDS-PAGE, 硝酸银染色后,出现一条分子量高于 β -半乳糖苷酶 (116KD) 的明显蛋白带 (见图 1),而野生型噬菌体 λ gt 11 对照中未见此带。这表明,恶性疟原虫 DNA 片段已插在 λ gt 11 载体上编码 β -半乳糖苷酶的结构基因 Lac Z 内的特定定位点上,以杂交蛋白的形式表达出来。

二、离子交换法提纯效果

各部分洗脱收集液电泳后染色发现,仅在 pH4.5 的醋酸钠洗脱上清中出现预期的目的蛋白带,而其他部分未见此带 (详见图 2)。

三、电洗脱提纯的杂交蛋白

我们以电洗脱^[11]作为标准方法对离子交换法提纯效果作了鉴定。杂交蛋白粗制液经 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色^[12]、出现特异杂交蛋白带后,切下此带,

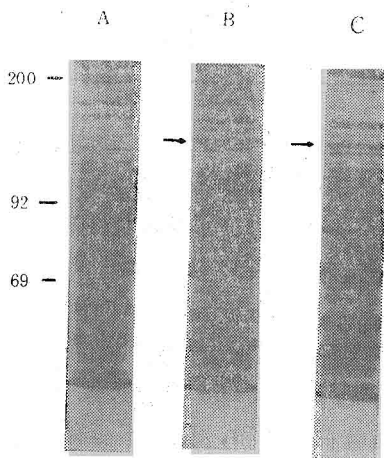


图 1 杂交蛋白粗制液电泳图谱

A. 野生型 λ gt11 B. 克隆株 CD₃A/9025/56

C. 克隆株 CD₃A/9025/60

(箭头所示为杂交蛋白,数字为分子量,单位 kD)

* 本课题由世界卫生组织奖学金资助完成。

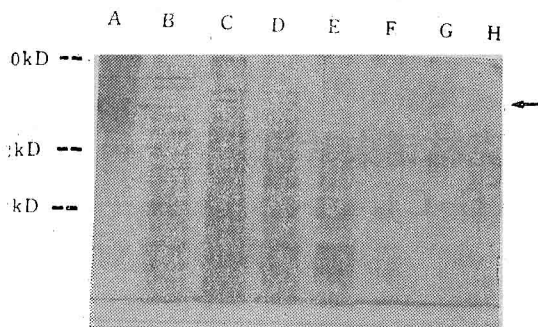


图2 离子交换纯化蛋白电泳图谱

A. 野生型 β -半乳糖苷酶 B. 野生型 λ gt11 C. 克隆株 CD₃A/9025/56 D. 克隆株 CD₃A/9025/60 E. PH6.5, 0.5mol/L 咪唑-HCl 洗涤上清 F. 同 E, 但电泳时样品中加入 SDS G. pH4.5、0.5mol/L 醋酸钠洗涤上清 H. 同 G, 但电泳时样品中加入 SDS

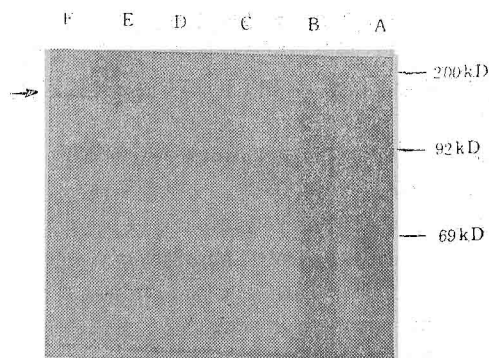


图3 电洗脱蛋白电泳图谱

A. 野生型 λ gt11 B. 克隆株 CD₃A/9025/60 C、D、E、F 分别为 1、2、3、4 部分上清

置电洗脱槽上将蛋白从胶上洗下,再通过电泳鉴定洗脱效果。图3显示了电洗脱的结果。由图可见,只第四部分洗脱液出现单一特异蛋白带。表明电洗脱方法可靠。与图2相比,证明离子交换法可行。

四、与常规蛋白提纯法比较

为进一步确定离子交换一步法的实用价值,我们用常规法进行实验并作了比较。一是将粗制液用50%硫酸铵沉淀后,再用 Sephacyl S-200 凝胶柱过滤;二是用恶性疟病人免疫血清和兔抗 β -半乳糖苷酶免疫血清,通过 Protein A-Sepharose 4B 亲和免疫沉淀法进行杂交蛋白提纯。其效果均不如本文所述方法理想。

讨 论

重组 DNA 所表达的杂交蛋白,因含有目的基因

外成分,必须经提纯后方可使用。关于其提纯方法,国外虽有报道^[4,5],但操作繁复,产量低。本研究证明,硫酸铵沉淀-凝胶过滤法,不仅需层析仪和收集器,且受菌液中菌体蛋白的影响,特异性差。免疫沉淀法虽可弥补其不足,但该法需事先制备抗融合多肽的特异抗体,也有缺点。尽管电洗脱法被公认为提取高纯度蛋白的最佳方法,但由于复杂、费时,产量甚微,需特殊洗脱仪和滤膜,使用价值也不大。然而,用离子交换一步法,根据杂交蛋白可和 DEAE 紧密结合的特性^[13]和 β -半乳糖苷酶的等电点 (pI) 为 5.2 的特点,调整洗脱液的 pH 在其等电点左右,通过离心、洗涤,直接纯化出恶性疟原虫基因与噬菌体 λ gt 11 编码的 β -半乳糖苷酶基因重组后所表达的杂交蛋白。与其他方法相比,本法简便、快速、经济、特异、稳定、不需特殊仪器设备,适于大批量提纯,值得推广。此种提纯蛋白,可用来免疫动物,获得单特异的多克隆抗体,用此抗体可分离微生物体中感兴趣的自然蛋白^[14]。此种提纯蛋白,还可直接用于氨基酸序列分析,根据此序列信息,又可进行多肽抗原的合成。

参 考 文 献

- [1] David, J. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3787.
- [2] Müller-Hill, B. et al.: *Nature*, 1974, 249, 561.
- [3] Casadaban, M. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 1980, 143, 971.
- [4] Agnes Ullmann.: *Gene*, 1984, 29, 27.
- [5] Fowler, A. V. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 14354.
- [6] Young, R. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 1194.
- [7] Young, R. A. et al.: *Science*, 1983, 222, 778.
- [8] Maniatis, T. et al.: *Cell*, 1978, 15, 687.
- [9] Laemmli, U. K.: *Nature*, 1970, 227, 680.
- [10] Merrill, C. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 4335.
- [11] Brown, A. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 1980, 103, 184.
- [12] Weber, K. and Osborn, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406.
- [13] Zabin, I. and Fowler, A. V.: in *the Operon*, eds, Miller, J.-H. and Reznikoff, W. S., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1978, 88—121.
- [14] Shuman, H. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 168.

【本文于 1988 年 7 月 8 日收到】