

Study on Chitosan-immobilized Cellulase. Chen Sheng, Huang Zhiyue, Liu Yanru (*Institute of Polymer Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China*).

Abstract Chitosan was obtained from crab shells by treating with HCl and NaOH. The conditions of cellulase immobilized on chitosan by glutaraldehyde were studied. The results indicated that the immobilized-cellulase prepared by 0.1 g dry chitosan cross-linking with 5%

glutaraldehyde and then combining with 4.0 mg cellulase showed higher cellulase activity and better activity recoveries (75%). And some characters of immobilized and native cellulases, such as optimum temperature Michaelis constant and the effect of ionic strength, stabilities to heat and repeat operation were studied and compared.

Key words chitosan, cellulase, immobilization, glutaraldehyde

肾炎致病原重组受体相关蛋白的表达及纯化^{*}

胡迎青 张卫苏 朱爱平 夏之银

(南通医学院分子生物学研究室, 南通 226001)

摘要 用 pGEX 载体系统体外构建了 Heymann 肾炎致病原受体相关蛋白 (RAP) 重组表达质粒, 经 IPTG 诱导, 该质粒表达的融合蛋白在大肠杆菌中得到了高效表达, 其表达量达 39.4%, 经 GST-Sephrose 4B 亲和层析, 得到了高度纯化, 其诱导产生的抗体经蛋白质印迹法分析证明能识别肾皮质天然抗原 44 ku 受体相关蛋白. RAP 表达及纯化的成功为研究致病原病理表型提供了有利条件.

关键词 受体相关蛋白, 表达, 纯化

大鼠 Heymann 肾炎 (HN) 在免疫组织化学、超微结构和临床症状上和人类膜性肾病酷似. 为探讨其免疫复合物沉积的机理及病理表型, 我们用克隆的受体相关蛋白 (RAP)-cDNA^[1] 构建了重组受体相关蛋白-谷胱甘肽转移酶融合蛋白 (GST-RAP) 表达载体, 在大肠杆菌中得到了高效表达. 其表达蛋白经亲和层析得到了高度纯化. 蛋白质印迹法分析证明, 针对融合蛋白的抗体可以和肾皮质天然抗原 44 ku 受体相关蛋白结合. 我们用 pGEX 载体系统在 DH5 α 菌株中成功地高效表达了 GST-RAP, 并对其方法作了些探索与比较, 寻找出最佳诱导时间. GST-RAP 高效表达成功为进一步研究 HN 致病原的病理表型提供了准备.

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

pGEX 载体购自 Pharmacia 公司, DH5 α 菌株购自 BRL 公司, RAP-cDNA 片段见文献[1].

1.2 主要试剂

异丙基硫代 β -D-半乳糖苷酶 (IPTG)、内切酶系列、T4 DNA 连接酶、琼脂糖购自 Promega 公司. GST-Sephrose 4B 层析柱购自 Sigma 公司.

1.3 重组融合蛋白 GST-RAP 的构建

提取 RAP5B1 质粒^[1], 用 EcoR I 酶切,

^{*}国家自然科学基金资助课题.

收稿日期: 1995-08-07, 修回日期: 1995-11-02

低熔点琼脂糖回收 RAP-cDNA 片段, 与同酶处理的 pGEX 质粒用 T4 DNA 连接酶连接, 转化入感受态的 DH5 α 中, 提取质粒、筛选阳性克隆株, 亚克隆后反复鉴定, 并用限制性内切酶图谱分析筛选插入方向正确表达的重组菌。

1.4 GST-RAP 融合蛋白的诱导

挑取经筛选的单克隆重组菌菌落, 3 ml LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜, 氨苄青霉素筛选, 并同时培养仅含 pGEX 载体的菌体作对照管, 取过夜培养菌, 用新鲜 LB-AMP 培养液 1:10 稀释培养至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.5$ 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L 进行诱导, 分别离心收集 0~7 h 菌液, 菌体用凝胶加样缓冲液在 100℃ 煮沸 3 min 后, 进行 SDS-PAGE, 分离胶和浓缩胶的浓度分别为 10% 和 5%。

1.5 亲和层析纯化 GST-RAP 融合蛋白

照上述方法扩大培养 500 ml 菌液, 诱导 4 h 收集菌体, 用原体积 1% 预冷 MTPBS (150 mmol/L NaCl、16 mmol/L Na_2HPO_4 、4 mmol/L NaH_2PO_4 pH7.3) 悬浮菌体, 加入终浓度 1 g/L 溶菌酶、冰浴静置 30 min, 加入含 1% Triton X-100 和 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟的抽提液抽提, 用灭菌注射器通过 7 号、6 号和 5 号针尖反复抽吸至半透明, 4℃ 离心 10 000 g, 15 min。上清液加入用 MTPBS 溶胀过夜的谷胱甘肽琼脂糖 (GST-Sephrose 4B) 混合, 4℃ 振荡吸附过夜, 500 g 离心 5 min, 用 MTPBS 轻洗 3 次后上柱, 用含 5 mmol/L 还原谷胱甘肽 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 分别收集 1~6 ml 洗脱液, 各取 2 μl 加入 SDS-PAGE 加样缓冲液, 100℃ 煮沸 3 min 后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马氏亮蓝染色, 低分子标准蛋白作标准定性观察结果。

1.6 GST-RAP 表达量的测定

取经诱导的培养菌体加入等体积的 2 $\times$ 加样缓冲液, 煮沸 5 min 后用 10% SDS-PAGE 电泳, 染色后用岛津 CS-930 薄层扫描仪扫描。

1.7 抗 GST-RAP 抗体的诱导

将纯化的 GST-RAP 蛋白免疫新西兰兔, 免疫抗原的制备及抗体的诱导方法参照文献

[2] 进行。

1.8 蛋白质印迹分析

鼠肾小管刷状缘膜抗原 (FXIA) 提取按文献 [3] 进行, 将 SDS-PAGE 凝胶分离的 FXIA 电转移到硝酸纤维素膜, 封阻剂封闭过夜, 用抗 GST-RAP 抗血清及碱性磷酸酶系统进行蛋白质印迹分析, 具体操作参照文献 [4] 进行。

2 结 果

2.1 不同诱导时间融合蛋白的表达

电泳凝胶染色后在 66 ku 处出现浓染带, 0~3 h 随诱导时间延长, 蛋白带逐渐加深、增宽, 4~7 h 蛋白带的深度变化不明显 (图 1)。

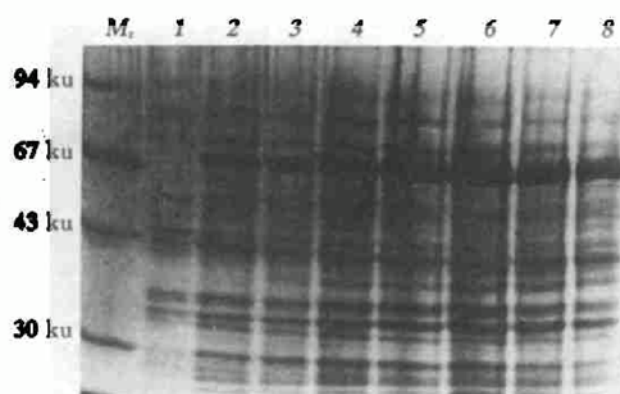


图 1 不同诱导时间融合蛋白的表达量分析

1~8: 0~7 h.

2.2 GST-RAP 纯化产物分析

纯化前 GST-RAP 阳性克隆在 66 ku 处出现浓染带 (C), 阴性克隆 GST 对照在 26 ku

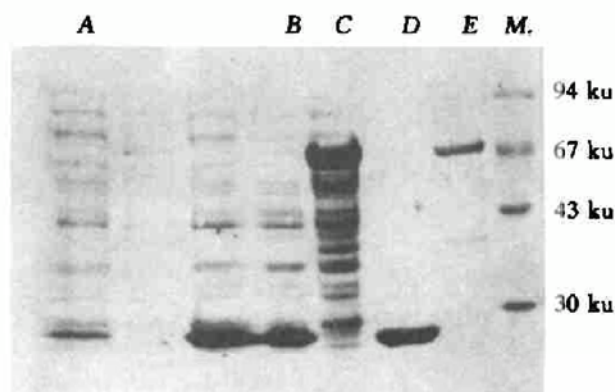


图 2 表达产物分析及纯化

处出现浓染蛋白条带 (B), 纯化后的 GST-RAP 阳性克隆 (E) 及阴性克隆对照 (D) 只出现单一浓带, 吸附后的上清 (A) 对应处浓带明显减退, 吸附较完全. M_r 为低分子标准蛋白 (图 2).

2.3 GST-RAP 蛋白表达量测定结果

GST-RAP 蛋白 SDS-PAGE 胶经薄层扫描分析蛋白表达量占大肠杆菌总蛋白量的 39.4%, 其扫描图见图 3.

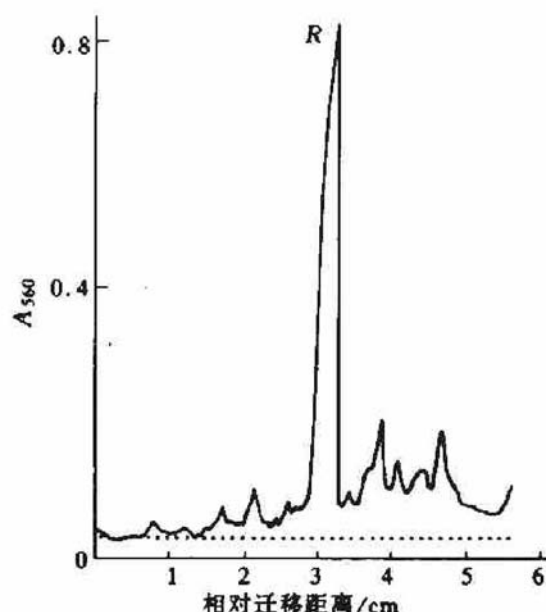


图 3 GST-RAP 蛋白条带 SDS-PAGE 薄层扫描图

R: GST-RAP 蛋白. 纵坐标为各蛋白质的相对含量 (A_{560}).

2.4 蛋白质印迹分析结果

双扩法测免疫抗血清效价达 1:64, 图 4

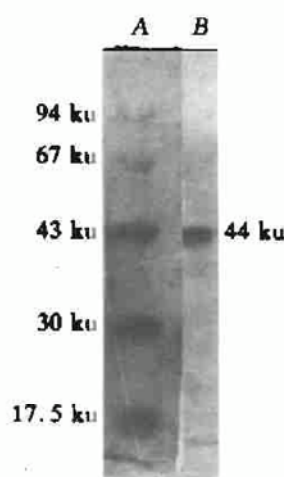


图 4 GST-RAP 免疫抗血清蛋白质印迹分析

A: 分子量标准; B: 抗 RAP-抗血清.

显示了蛋白质免疫印迹分析的结果: 仅 44 ku 处出现杂交带, 正常兔血清对照分析未见杂交带, 表明免疫制备的 GST-RAP 抗血清识别致病原 44 ku 受体相关蛋白天然抗原.

3 讨 论

用 pGEX 载体构建重组质粒, 该系统在大肠杆菌内表达外源性多肽, 在 IPTG 诱导下可产生含量丰富的重组融合蛋白, pGEX 载体编码谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 基因, 合成 26 ku 的多肽产物, 构建的重组 GST-RAP 融合蛋白经电泳分析在近 66 ku 处出现浓染蛋白带, 由此可推算出其诱导产生的外源性多肽与插入子编码蛋白大小基本相符.

多数情况下, 溶原菌内的融合蛋白呈溶解状态, 在非变性条件下可得到分离和提纯, 吸附原理是通过谷胱甘肽琼脂糖上的酶底物基团与呈溶解状态的 GST 在弱碱性条件下共价结合而滞留, 再通过还原型谷胱甘肽进行氧化还原反应, 将其解离而洗脱, 洗脱高峰主要集中在 2 ml 时, 如果融合蛋白是非可溶性的, 这种纯化就难以进行, 在大肠杆菌中表达外源性多肽常表现为非可溶性的, 但大多数 GST 融合蛋白是可溶性的, 就为纯化提供了很大方便. 有些不溶性的融合蛋白可增加一些条件排除其很强的疏水性, 以提高在水溶液中的稳定性. 比如将非可溶性蛋白溶解在含 1% Triton X-100、1% Tween-20、10 mmol/L 二硫苏糖醇 (或 0.03% SDS) 中, 可不破坏其与谷胱甘肽琼脂亲和能力而得以纯化.

我们用不同的菌株和载体对表达量进行了比较, 结果发现用 pGEX 载体系统明显优于噬菌体载体系统在 Y_{1090} 中的表达. pGEX 载体系统在 DH5 α 株中的表达量几倍于 JM105 株中的表达量. 诱导剂 IPTG 在 0.1 mmol/L 时就达到较好的效果, 其蛋白的诱导初始时随时间延长蛋白产量明显上升, 在 3~4 h 时已近饱和, 再增加诱导时间蛋白产量增加不明显. 一般诱导 4 h 足以达到高表达.

本研究诱导的外源融合蛋白得到了高效表

达, 扫描分析其表达量占大肠杆菌总蛋白的 39.4%, 经层析纯化每毫升培养液可得到 10~15 μg 纯化的 GST-RAP, 其诱导产生的抗体经蛋白质印迹分析能特异地识别 HN 肾炎致病病原 44 ku 受体相关蛋白天然抗原, RAP 蛋白在大肠杆菌中高效表达及纯化的成功为研究 HN 肾炎致病病原的病理性表型提供了有利条件. 为进一步探讨膜性肾病的形成机理打下了很好的基础.

参 考 文 献

- 1 张卫苏, 朱爱萍, 刘运义. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994; 14 (4): 267
- 2 Kerjaschki D, Ullrich R, Diem K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 11179
- 3 Orlando R, Kerjaschki D, Kurihara H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 6698
- 4 Sambrook J E, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor, 1992: 47~227

Expression and Purification of Recombinant Receptor-associated Protein (RAP) of the Heymann Nephritis Pathogenic Epitope. Hu

Yingqing, Zhang Weisu, Zhu Aiping, Xia Zhiyin (*Laboratory of Molecular Biology, Nantong Medical College, Nantong 226001, China*).

Abstract A recombinant expression plasmid was constructed by inserting the cDNA encoding mature receptor-associated protein (RAP) into pGEX vector. High level intracellular expression of the RAP gene was observed in the DH5 α bacteria transformed with the recombinant pGEX vector after IPTG induction. The abundant GST fusion protein constituted 39.4% the total cellular protein. The fusion proteins were purified from bacterial lysates by using GST-Sepharose 4B affinity chromatography. The Western blot analysis showed that the rabbit anti-RAP anti-serum recognized an apparent mass of 44 ku band from rat kidney microvillar protein. The high level expression and rapid purification of RAP-GST fusions was discussed.

Key words receptor-associated protein, expression, purification

栝楼核糖核酸酶在 RNA 序列分析中的应用*

赵 晁 华 陵

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 栝楼核糖核酸酶 (RNase TCS) 对 U 碱基具有高度的专一性, 在无脲、pH 3.5、50℃ 时, 它几乎都在 -Np $\downarrow$ U- 处裂解 RNA. 它与 RNase T1, U $_2$ 和有限的碱水解一起, 可用于直接的酶法 RNA 序列分析.

关键词 栝楼, 栝楼核糖核酸酶, RNA 序列分析

迄今, 在各种各样的生物体中, 已分离出许多具有不同特异性的核糖核酸酶, 由于它们具有某些特异性地切断底物的专一性, 一些核糖核酸酶在分子生物学研究中已成为很有用的工具酶. 对它们本身的结构和功能, 及其与核酸的相互作用已有不少研究. 从高等植物中分

离到的核糖核酸酶至今虽然尚为数不多, 但在这方面的研究也已开展.

酶法测定 RNA 序列方法, 是利用几种核

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-07-03, 修回日期: 1995-09-26