

Fc 段受体结合蛋白 (SPA-SPG) 基因克隆表达 及其在 IgG 纯化中的应用*

孟照辉^{1,2)}** 林 兵³⁾ 谢月辉⁴⁾ 张克勤¹⁾

(¹⁾ 云南大学生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地, 昆明 650091; ²⁾ 昆明医学院第一附属医院心内科, 昆明 650032;

³⁾ Bioclone Corporation Limited, San Diego 92126, USA; ⁴⁾ 昆明医学院计算机教学中心, 昆明 650031)

摘要 利用生物信息学, 遴选编码 SPA 及 SPG 蛋白的基因, 进行密码子优化, 将目的基因分割成互为重叠的小片段寡聚核苷酸链, 采用一步升温后 T4 DNA 连接酶连接的方法, 合成了编码 SPA 及 SPG 蛋白的融合基因. 将其克隆到 pSK 质粒进行扩增, 经测序、修正后再克隆到表达载体, 高效表达了带 His6 的融合蛋白——蛋白 AG. 将蛋白 AG 共价结合到表面带羧基的磁粒上, 形成蛋白 AG 磁粒复合物, 用此复合物可在 1 h 内从大鼠、小鼠、人、猕猴、马、羊及猪等常用实验动物血清中纯化 IgG.

关键词 融合基因合成, 蛋白 AG 磁粒, IgG 纯化

学科分类号 Q784

在后基因组时代, 研究的重点已转向蛋白质的结构和功能, 建立一套快速的高通量蛋白质纯化系统是非常必要的. 一些致病微生物能产生与 IgG 不变区 (Fc) 结合的蛋白质和多肽^[1], 其中研究最多的是 SPA 和 SPG 蛋白^[2,3], Guss 等^[4]发现, 它们之间具有互补性. 因此采用现代基因合成技术, 结合 SPA 及 SPG 蛋白的优点, 融合蛋白 AG 就能使它们的使用范围扩大. 将蛋白 AG 共价结合到表面带有羧基的磁粒表面形成“蛋白 AG 磁粒”, 用于 IgG 的纯化是有意义的. 该实验发现此复合物能从几种常用实验动物血清中快速分离、纯化 IgG.

1 材料与方法

1.1 材料

62 条寡聚核苷酸链和引物 A (5'-GAAAGGA-TCCCTGCGCAGCATGACGAAGCTCAGCAGAAT-3')、引物 B (5'-GAAAGTCGACTTATTCGGTAACAGTG-3', 下划线部分示 BamH I 和 Sal I 酶切位点) 由美国 IDT 公司合成; 限制性内切酶和 T4 连接酶从 NEB 公司购买; pfu 酶和 pSK 质粒从 Stratagene 公司购买; BL21DE3、pET-28a-c (+)、T7.Tag 单克隆抗体和二抗体从 Novagen 公司购买; 采用 Bio-Rad 公司生产的 Gene Pulser II Apparatus 和 Trans-Blot SD Cell 进行质粒转化和蛋白质膜转移; 用 Pekin-Elmer ABI Prism 377 DNA 进行测序; His 及羧化磁粒从美国 Bioclone 公司购买.

1.2 方法

1.2.1 目标蛋白: SPA (876 bp) 和 SPG (381 bp) 的氨基酸和基因序列来源于 GenBank, 编号为 U54636 和 X06173.

1.2.2 基因的设计: 编码 SPA (E, D, A, B, C) 基因的 5 个功能区域和编码 SPG (C₁, C₂) 基因的两个功能区域, 通过一段连接序列拼接为一个融合基因 (1 269 bp). 将目的基因人为地分为 40 个碱基一组, 以便人工合成寡聚核苷酸单链, 40 个碱基中有 20 个碱基与另一条的互补. 在基因构建中, 能与膜蛋白和血清蛋白结合的片段被剔除^[3], 根据 BL21DE3 的密码子使用频率参数, 进行了密码子优化^[5], 并设计了多个单一限制性酶切位点.

1.2.3 基因合成: 取等体积的 64 条寡聚核苷酸链 (25 μmol/L) 混合并稀释至终浓度约 5 nmol/L, 置于 PCR 仪中, 75℃ 2 min, 在常温下用 T4 连接酶连接各 DNA 双链补齐的寡核苷酸片段.

1.2.4 克隆及测序: PCR 产物的酶切、电泳回收、酶切产物与载体的连接等基因操作参照文献 [6] 的方法进行. 质粒构建见图 1. 合成的基因用 BamH I 和 Sal I 酶切后连接到 pSK 质粒. 用电击

* 云南旺源生物科技有限公司资助项目.

** 通讯联系人. 清华大学生物科学与技术系结构生物学实验室, 北京 100084.

Tel: 13888252715, E-mail: mzhxyh@public.km.yn.cn

收稿日期: 2003-05-15, 接受日期: 2003-06-25

穿孔仪, 以 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω 进行电击, 将构建好的质粒转入 DH10B, 在含 100 mg/L 氨苄青霉素的培养基上筛选. 挑选几个阳性克隆分别在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 质粒抽提, 通过酶切初选含目的基因的质粒, 用 T3 和 T7 引物进行双向测序. 通过 PCR 纠正突变的碱基.

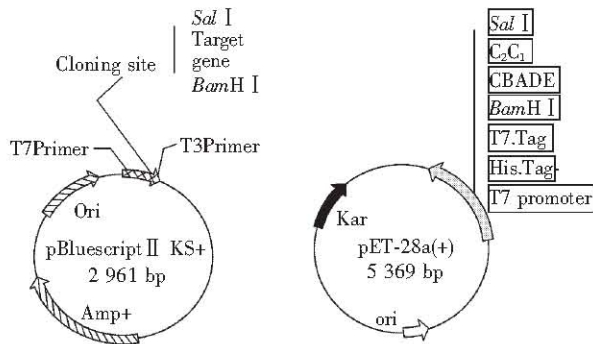


Fig. 1 The schematic diagram of construction of sequencing and expression vectors

1.2.5 蛋白 AG 的表达及纯化: 确认序列后, 用 A、B 两条末端引物对 pSK 质粒进行 PCR 扩增. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 25 个循环. PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切, 1% 琼脂糖胶电泳后胶回收连接到 pET-28a-c (+) 质粒. 用电击穿孔仪 (以 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω 进行电击) 将含目的基因的 pET-28a-c (+) 质粒转入 BL21DE3 进行表达. 在含 100 mg/L 卡那霉素的培养基上筛选, 挑选几个阳性克隆分别在含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 A_{600} 为 0.3 ~ 0.5, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导培养 5 h. 取 1.5 ml 细菌培养物, 离心收集菌体, 溶于 20 μ l 结合液中 (5 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9), 超声破壁, 离心后取上清液, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 5 ~ 10 min, 将上清液转移至新的离心管. 取 20 μ l His-tag 磁粒加到上清液中, 颠倒混匀. 室温下, 轻轻振荡 5 min. 将离心管插入磁座, 弃除上清液. 取 500 μ l 清洗液 (60 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 加到离心管中, 颠倒混匀磁力收集后, 弃除上清液. 重复清洗 2 次, 加入 20 μ l 洗脱液 (100 mmol/L EDTA, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 用枪头重悬磁粒, 室温下轻轻振荡 5 min.

将离心管插入磁座, 待磁粒完全吸附到管壁后, 将含蛋白质的上清液转到一新的离心管. 取 0.5 μ l 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹分析.

1.2.6 蛋白 AG 磁粒的制备: 蛋白 AG 可通过以下方法共价结合到表面带有羧基的磁粒 (从美国 Bioclone 公司购买) 表面^[7]. 将纯化的蛋白 AG 浓度调至 25 mg/L, 取 0.5 ml 羧化磁粒并用结合液 (0.01 mol/L K_2HPO_4 含 0.15 mol/L NaCl) 清洗磁粒 3 次, 将磁粒悬浮于等体积的结合液中, 取 1 ml 磁粒、1 ml 蛋白 AG 加入 400 μ l 偶联剂 (5.7% EDCI), 室温下轻轻摇动 24 h 后用结合液清洗 2 次, 用清洗液 (0.01 mol/L Tris 含 0.15 mol/L NaCl, 0.1% 牛血清蛋白, 0.001 mol/L EDTA 和 0.01% 叠氮化钠) 洗 1 次. 将磁粒蛋白复合物悬浮于清洗液并储藏于 4 $^{\circ}$ C.

1.2.7 IgG 的纯化: 吸取 30 μ l 蛋白 AG 磁粒, 分别加入 100 μ l 结合液 (57.7 mmol/L Na_2HPO_4 , 42.3 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 7.0) 和 50 μ l 的血清样本. 颠倒混匀, 4 $^{\circ}$ C 下轻轻地摇动 30 ~ 60 min, 使抗体充分地吸附在磁粒蛋白复合物表面上. 将离心管插回磁座, 磁力吸附 30 s, 弃除所有上清液. 加入 500 μ l 结合液, 磁力吸附 1 min, 弃除所有上清液, 并重复 2 次. 加入 50 μ l 洗脱液 (0.1 mol/L 柠檬酸钠, pH 2.5) 并充分重悬磁粒, 4 $^{\circ}$ C 下轻轻地摇动 10 min. 将离心管插入旺源磁座, 磁力吸附 1 min, 将含抗体的上清液转入新的离心管中. 分别取 0.3 μ l 血清, 0.9 μ l 纯化后的上清液, 5 μ l 含 IgG 的洗脱液进行 SDS-PAGE 分析.

2 结 果

2.1 重组表达质粒的鉴定

挑选阳性克隆, 进行测序, 仅发现两个碱基突变, 用 PCR 的方法给予纠正. 质粒抽提, *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 出现两条带, 位置与预测一样.

2.2 SPA 和 SPG 融合基因的表达

将质粒 pET-28a-c (+) 转化到大肠杆菌 BL21DE3, IPTG 诱导得到目的蛋白的表达. SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析结果见图 2, 从图 2 可以看到含有 pET-28a-c (+) 的细菌在诱导后表达了一条大小约为 47 ku 的蛋白质带, 该蛋白质能与 T7.Tag 单克隆抗体发生特异性反应, 表明它是被表达的蛋白 AG, 并保持其完整的融合形式.

2.3 SPA 和 SPG 融合蛋白的纯化与功能测定结果

挑选 pET-28a-c (+) 阳性克隆, 进行诱导表达, 取 1.5 ml 诱导液离心、收集菌体, 溶于结合液中, 超声破碎, 离心后取上清液, 4℃, 12 000 r/min 离心 5 ~ 10 min, 将上清液转移至新的离心管. 取 20 μl His-tag 磁粒纯化目标蛋白, SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析检测纯化样本, 结果显示 (图 2) 一条大小约为 47 ku 的融合表达蛋白带. 取 30 μl 蛋白 AG 磁粒, 分别加入 100 μl 结合液和 50 μl 的血清样本. 按上述方法纯化不同动物的 IgG, 进行 SDS-PAGE 分析. 结果显示 (图 3) 在纯化后的条带中, 出现一条与兔 IgG 标准样品分子质量同等的条带, 表明它是被纯化的 IgG. IgG 轻链也清晰可见, 并且不含血清蛋白, 其他杂蛋白含量也很少. 但对鸡血清无效.

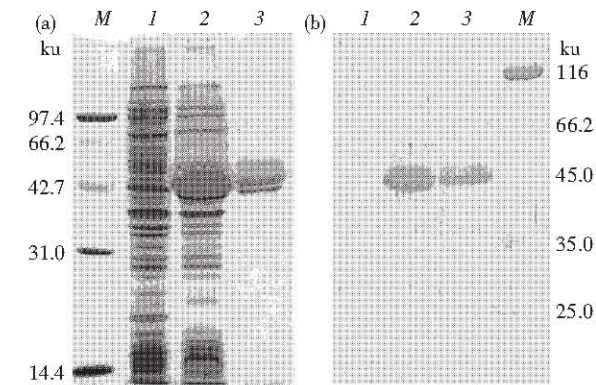


Fig. 2 Expression and purification of the MproteinAG in BL21DE3

(a) SDS-PAGE; (b) Western blot analysis using goat anti-mouse antibody. *M*: protein molecular mass marker. *I*: pellet of lysate of expressed bacteria before IPTG induction; 2: pellet of lysate of expressed bacteria with IPTG induction; 3: purified MproteinAG.

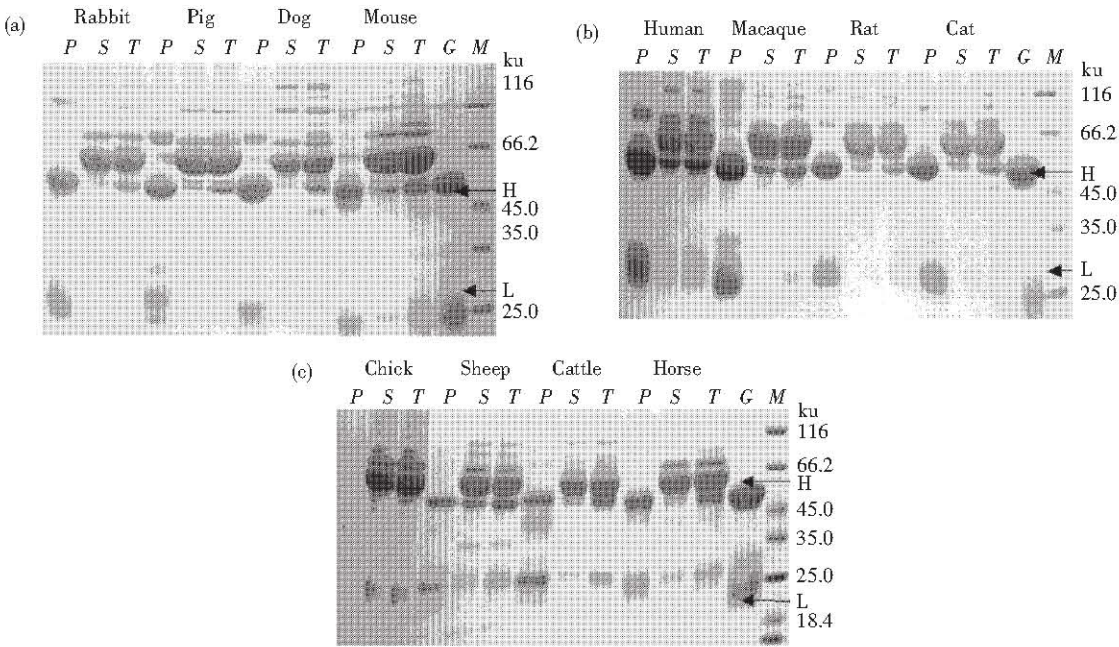


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purification of IgG from different blood serum of mammals with MproteinAG magnetic particles

M: protein molecular mass marker; *T*: total protein of blood serum; *S*: supernate after purification; *P*: purification of IgG with MproteinAG magnetic particles; *G*: rabbit IgG obtained from Sigma; *H*: heavy chain of IgG; *L*: light chain of IgG.

3 讨 论

本文采用化学和酶促合成相结合的方法合成编码 SPA 及 SPG 融合基因的全序列. 在一个阳性克隆中仅发现两个突变点, 比其他实验报道低

50%^[8]. 该实验采用的寡聚核苷酸链长度比其他实验要短^[9,10], 有以下优点: 在溶解状态形成二级结构的可能性和人工合成时碱基发生错误的几率要小; 它们可作为引物以检测重新合成的基因序列; 在特定的限制性酶切位点内, 可用带突变点的寡聚

核苷酸链代替原有的,使蛋白质的功能研究更简单、快速.从图2,3中可看出,融合蛋白得到高效表达,并且对小鼠、马、羊、和狗的IgG亲和力与其他动物的相比没有明显差别,蛋白A和蛋白G的功能得到了互补^[2,3],提示目的蛋白在功能上保持完整,可为后继实验提供足够的蛋白质.蛋白AG磁粒作为一种亲和载体可从人、马、羊、狗、兔、小鼠、大鼠、猕猴、牛、猫、猪的血清中快速分离纯化出IgG,而杂蛋白含量较少.该方法简单、省时、价廉,与传统方法比较有很大的优势^[10].由于鸡的IgY不结合细菌的Fc结合蛋白,因此该方法不适用于纯化鸡抗体.如果蛋白AG结合的是IgG单克隆抗体,就可使用IgG单克隆抗体蛋白AG磁粒复合体进行免疫化学的分析,快速纯化、提取目标蛋白质和分离细胞.相信该方法有可能会被广泛应用于蛋白质的研究中.

参 考 文 献

- 1 Boyle M P D, Reis K J. Bacterial Fc receptor. *Biotechnology*, 1987, **5**: 697 ~ 7032
- 2 Tashiro M, Montelione G T. Structures of bacterial immunoglobulin-

- binding domains and their complexes with immunoglobulins. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, **5** (4): 471 ~ 481
- 3 Sjobring U, Bjorck L, Kastern W. Protein G genes: structure and distribution of IgG-binding and albumin-binding domains. *Mol Microbiol*, 1989, **3** (3): 319 ~ 327
 - 4 Guss B, Eliasson M, Olsson A, *et al.* Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein. *EMBO J*, 1986, **5** (7): 1567 ~ 1575
 - 5 Makrides S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1996, **60** (3): 512 ~ 538
 - 6 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞得曼 J G, 等. 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 430 ~ 436
 - 7 Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, *et al.* Translated by Yan Z Y, Wang H L. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd. Beijing: Science Press, 1998. 430 ~ 436
 - 7 Kvalheim G, Fodstad O, Pihl A, *et al.* Elimination of B-lymphoma cells from human bone marrow: model experiments using monodisperse magnetic particles coated with primary monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 1987, **47** (3): 846 ~ 851
 - 8 Casimiro D R, Wright P E, Dyson H J. PCR-based gene synthesis and protein NMR spectroscopy. *Structure*, 1997, **5**: 1407 ~ 1412
 - 9 Stemmer W P, Cramer A, Ha K D, *et al.* Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxynucleotides. *Gene*, 1995, **164** (1): 49 ~ 53
 - 10 Prodromou C, Pearl L H. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng*, 1992, **5** (8): 827 ~ 829

Cloning and Expression of Fused Fc-binding Protein (SPA-SPG) and Its Application in Purification of IgG*

MENG Zhao-Hui^{1,2)} **, LIN Bing³⁾, XIE Yue-Hui⁴⁾, ZHANG Ke-Qin¹⁾

⁽¹⁾ Key Laboratory of Conservation and Utilization for Bio-resource, Yunnan University, Kunming 650091, China;

⁽²⁾ Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China;

⁽³⁾ Bioclone Corporation Limited, San Diego 92126, USA;

⁽⁴⁾ Computer Science Teaching Center, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract Using a bioinformatical approach, a hybrid gene encoding the Fc-binding domains of both SPA and SPG (1 269 bp) was designed and synthesized. The sequence was designed by substitution of high-usage codons for low-usage ones of *Escherichia coli*. A total of 64 oligonucleotides were assembled in a single-step, in which T4 DNA ligase ligated DNA fragments from a pool of overlapping oligonucleotides. The synthetic gene was cloned to pSK vector. After sequencing and remending, the gene was expressed using the expression vector pET-28a-c (+). A band of 47 ku was detected with Western blot analysis. The protein so called MproteinAG has been covalently conjugated to the carboxyl-terminated magnetic particles. With the MproteinAG magnetic particles, IgG from blood serum of rabbit, pig, dog, mouse, human, macaque, rat, cat, sheep, cattle, horse can be purified in one hour.

Key words hybrid gene synthesis, MproteinAG magnetic particles, IgG purification

* This work was supported by Yunnan Wangyuan Biotech CO., LTD.

** Corresponding author. Laboratory of structural Biology, School of Life Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China.

Tel: 86-13888252715, E-mail: mzhxyh@public.km.yn.cn

Received: May 15, 2003 Accepted: June 25, 2003