

- eds, *Genetic engineering* 4, New York: Plenum press, 1982: 57
- 3 Parker C S, Topol J. A *drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell*, 1984; **36**: 357
 - 4 Manley J L, Fire A, Samuels M *et al.* *In vitro* transcription whole-cell extract. *Methods in Enzymology*, 1983; **101**: 568
 - 5 Ernst B, John W L, Miriam S *et al.* The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor alpha gene and type I HIV. *Cell*, 1988; **53**: 827
 - 6 Lewin B. Commitment and activation at pol II promoters: a tail of protein-protein interactions. *Cell*, 1990; **61**(7): 1161

重组蛋白 G Fc 结合区单结构域的纯化及理化性质*

王园园 蔡仕英 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

关键词 蛋白 G, 重组蛋白 G Fc 结合区, PGFB-2 肽

蛋白 G 是存在于链球菌 C 群和 G 群胞膜上的一种分子量为 65kD 的膜蛋白, 完整的蛋白 G 分子主要由四部分组成, 其中第三部分能与许多动物的 IgG Fc 段特异结合^[1]。近年来, 蛋白 G 的应用研究已展示出广阔前景^[2-4], 它一方面可与多种标记物(如酶、放射性同位素、胶体金等)连接, 用于免疫分析; 另一方面, 可用作纯化单克隆抗体及多克隆抗体的亲和配基。但是有关蛋白 G 的空间结构及其与 IgG Fc 的结合机制均了解得很少, 我们首次利用 PCR 技术扩增出蛋白 G 中 IgG Fc 结合区单结构域基因片段^[5], 并在大肠杆菌中高效表达该多肽(简称 PGFB-2 肽), 由于该多肽分子量较小, 又具有与 IgG 结合的活性, 因此有利于用二维核磁、圆二色散等方法对其结构进行分析, 从而揭示出蛋白 G 与 IgG Fc 段结合的分子机制。本文就大肠杆菌表达的 PGFB-2 肽的纯化及理化性质进行了研究, 为蛋白 G 的应用和进行结构与功能关系的分析提供了材料。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂

大肠杆菌 RR1 (pBG2) 工程菌由本室构建^[5,11]其表达的 PGFB-2 肽含天然蛋白 G 的 C3 结构域, 并在其 C 端融合了载体质粒的 17 个氨基酸。Sephadex G50 为 Pharmacia 公司产品, 辣根过氧化物酶标的人 IgG 由本室卢秀桂老师提供。氨基酸序列分析试剂为进口产品, 其它常规试剂均为国产。

1.2 分析技术

1.2.1 以牛血清白蛋白为标准, 用染料结合法^[6]

测定蛋白质含量。

1.2.2 酶联免疫法测 PGFB-2 肽与 IgG 结合活性。将 PGFB-2 肽包被到酶联板上, 然后用 1% 牛血清白蛋白封闭, 再加酶标 IgG, 最后用邻苯二胺作底物显色, 测 A_{490} , P/N 值大于 2.1 为阳性。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 PAGE)^[7] 鉴定蛋白质纯度。电极缓冲液含 0.25mol/L Tris, 1.92 mol/L 甘氨酸 pH8.3。

1.2.4 用十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE^[7] 及蛋白质印迹(Western blot)测定蛋白质分子量^[8], 用电聚焦电泳(IEF)^[9]测定蛋白质的等电点。

1.2.5 用 Edmann 降解法^[10]测定氨基酸顺序。

1.3 纯化过程

1.3.1 细胞裂解液上清的制备

RR1 (pBG₂) 工程菌 30°C 培养过夜, 次日 5% 扩增培养至 $A_{600} = 0.5$ 左右, 提高温度至 42°C, 继续培养 4h, 诱导 PGFB-2 肽的表达, 然后收集菌体, 超声破碎, 12000g 离心 30min 取上清液。

1.3.2 Sephadex G50 柱层析

制备 Sephadex G50 层析柱 (2cm × 74cm), 用 0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH7.4 平衡, 上样后以平衡缓冲液洗脱, 紫外检测, 部分收集器收集样品。

2 结果与讨论

2.1 纯化结果

将大肠杆菌诱导表达的 PGFB-2 肽裂解液上清

* 属国家自然科学基金资助课题的一部分。

收稿日期: 1991-10-09 修回日期: 1992-03-23

上 Sephadex G50 柱,(每次上样量为 3ml 约 30mg 蛋白)用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.4 洗脱,紫外检测部分收集器收集分离样品,每管约 7ml,测定各收集管中的蛋白量及与 IgG 结合活性,并计算出比活,结果如图 1。从图中可以看出自第 4 管至第 7 管比活较

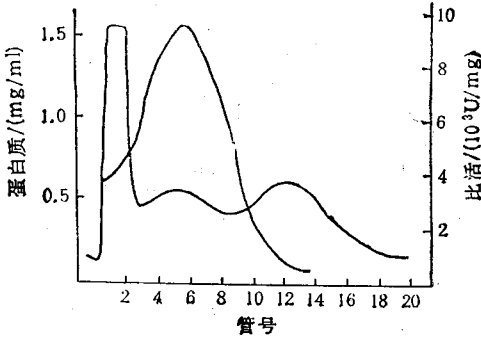


图1 PGFB-2 肽 Sephadex G50 柱层析洗脱图谱

高,表明 PGFB-2 肽的纯度提高。为了鉴定 PGFB-2 肽的纯度,我们又将各收集管中的样品进行 PAGE 分析,结果如图 2。

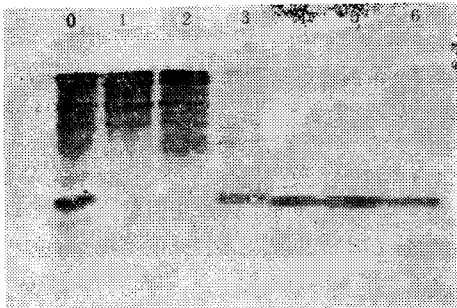


图2 15% PAGE 图谱

0. PGFB-2 肽细胞裂解液上清 1,2,3,4,5 及 6 分别为 Sephadex G50 柱收集相对应的各管

PGFB-2 肽比活提高的过程就是纯度提高的过程,其中第 4 管至第 7 管的纯度达电泳一条带水平。且蛋白质印迹结果显示该电泳带具有很好的与 IgG 结合活性(如图 3)。

Sephadex G50 分离范围在 1500—30000 之间,大肠杆菌的大部分蛋白分子量均在 10000 以上。由于工程菌表达的 PGFB-2 肽分子量在 10000 以下,且占菌体裂解上清液总蛋白的 20% 左右,所以用 Sephadex G50 作为层析分离介质,能使裂解液上清中的 PGFB-2 肽只经一步凝胶过滤即达电泳一条带纯度,比活提高约 5 倍,且这些数据是相互佐证的。

综上所述我们将纯化过程的结果列表 1。

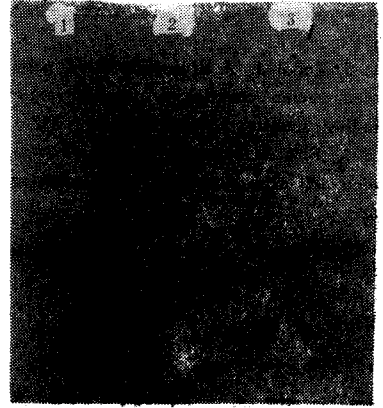


图3 蛋白质印迹结果

1. PGFB-2 肽细胞裂解液上清 2. RRI (PBV220) 裂解液上清(阴性对照) 3. Sephadex G50 收集的 4, 5,6,7 号管合并

表1 PGFB-2 肽的提纯过程

提纯步骤	总活性 /U	总蛋白 /mg	比活性 /U/mg	回收率 /%	提纯倍数
细胞裂解液上清	1.5×10^6	28.6	52632	100	1.0
Sephadex G50	2.8×10^5	1.0	280000	18.6	5.3

2.2 PGFB-2 肽的分子量及等电点

分子量及等电点是蛋白质的两个重要参数我们分别用 SDS-PAGE, IEF 对 PGFB-2 肽的分子量及等电点进行了测定,结果表明 PGFB-2 肽的分子量约为 8000, 与理论计算是一致的(如图 4)。等电点为 4.5, 表明其为一酸性蛋白(如图 5)

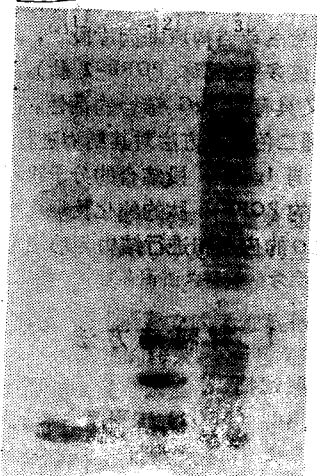


图4 SDS-PAGE 电泳结果

1. Sephadex G50 纯化产品 2. 分子量标准(自上而下, 17200,14600,8240,6380) 3. PGFB-2 肽细胞裂解液上清

2.3 测序分析

我们用 Edmann 降解法对纯化所得的 PGFB-2

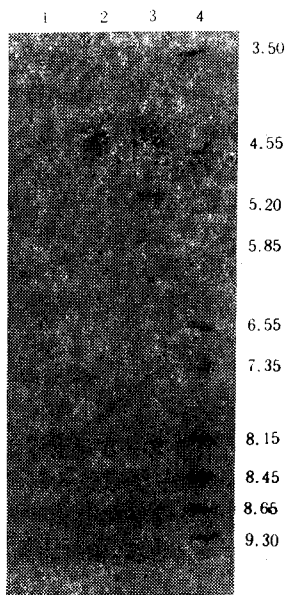


图5 等电聚焦电泳结果

1. PGFB-2 肽纯品 2,3. PGFB-2 肽不纯部分
4. 等电聚焦电泳标准等电点

肽N端的前四个氨基酸进行了序列分析,前四个氨基酸的顺序为甲硫氨酸、苏氨酸、苏氨酸、色氨酸,这与编码该多肽的基因片段的DNA序列分析结果完全一致^[11],从而也进一步证实了该多肽的纯度及正确性。

2.4 PGFB-2 肽对热、SDS 等的稳定性比较

蛋白质的稳定性是决定其应用前景的一个重要指标,PGFB-2 肽是由遗传工程构建的一种蛋白质,所以,有必要了解其稳定性如何。于是我们首先用热及SDS对PGFB-2肽进行处理,然后用免疫酶联法测定其与IgG结合活性,发现PGFB-2肽经100℃处理5min后其活性基本无变化,加入SDS后再煮沸15min,活性依然无明显下降,这表明PGFB-2肽是一较稳定的多肽,由此推测天然蛋白G中Fc结合区

结构域能形成一较稳定的结构。这与最近 Gronenborn 等^[12]报告的有关结果是一致的。

参 考 文 献

- 1 Guss B, Eliasson M, Olsson A *et al.* Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J*, 1986; 5: 1567
- 2 Bjorck L, Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, 1984; 133: 969
- 3 Reis K J, Ayoub E M, Boyle M D P. Streptococcal Fc receptors; Isolation and partial characterization of the receptor from a group C streptococcus. *J Immunol*, 1984; 132: 3091
- 4 Reis K J, von Mering G O, Karis M A *et al.* Enzyme-labeled type III bacterial Fc receptors, a versatile tracer for immunoassay. *J Immunol Methods*, 1988; 107: 273
- 5 蔡仕英,王园园,姚志建. PCR 扩增的 Protein G IgG-Fc 结合区单结构域基因片段的克隆. *中华流行病学杂志*, 1990; 11(特刊 6号): 100
- 6 郭燕捷,姚志建. 几种微量测定蛋白质新方法的比较. *生物化学与生物物理进展*, 1986; (4): 67
- 7 张龙翔,张庭芳,李令媛. *生物化学实验方法和技术*. 湖北: 湖北科学技术出版社, 1987; 112-118
- 8 Burnette W N. "Western blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 1981; 112: 195
- 9 周本正. *实用电泳及免疫电泳技术*. 湖北: 湖北科学技术出版社, 1988; 86, 104
- 10 Chang J Y, Brauer D, Wittmann Liebold B. Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethylaminoazobenzyl 4'-isothiocyanate phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Letter*, 1978; 93: 205
- 11 蔡仕英,王园园,姚志建. Protein G中Fc段结合区的结构分析. *中国科学B辑*, 1991; (12): 1284
- 12 Gronenborn A M, Filipula D R, Essig N E *et al.* A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. *Science*, 1991; 253: 675-661

(上接第 14 页)

- 16 Little C D, Nau M M, Cayney D N *et al.* Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*, 1983; 306: 194
- 17 Begley C G, Aplan P D, Davey M P *et al.* Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ -chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 2031
- 18 Mellentin J D, Smith S D, Cleary M L. Lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T-cell leukemia, codes for a protein with helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell*, 1989; 58: 77
- 19 Nourse J, Mellentin J D, Galili N *et al.* Chromosomal translocation t(1; 19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell*, 1990; 60: 935