

经验交流

一种改进的融合蛋白亲和层析纯化方法*

廉德君 许根俊

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 用马铃薯淀粉柱可以直接分离麦芽糖结合蛋白-乳酸脱氢酶辅酶结合结构域融合蛋白, 并得到满意的结果. 它提纯的程度和吸附量都和商品交联直链淀粉亲和层析柱相比拟, 但是成本却要低很多, 而且从市场上买来的马铃薯淀粉就可以应用. 它可以成为大规模生产的一种工艺路线.

关键词 麦芽糖结合蛋白, 融合蛋白, 亲和层析, 马铃薯淀粉

学科分类号 Q5.58

随着基因工程技术的发展, 通过重组 DNA 方法大量获得目的蛋白或多肽已成为一项常规的实验室操作, 在大规模工业生产中也被广泛应用. 基因融合表达系统具有表达产率高、适用性广、表达产物纯化方便等特点, 特别适用于小分子蛋白和多肽的表达纯化; 一些结构复杂的蛋白质结构与功能关系研究也常应用这一系统. 麦芽糖结合蛋白融合表达纯化系统是 1988 年发展的一个蛋白融合表达纯化系统^[1], 已经商品化, 目前广为采用. 该系统采用的亲和层析固定相是交联直链淀粉, 其应用寿命有限且价格昂贵, 限制了这一系统的应用. 我们采用马铃薯淀粉取代交联直链淀粉作为亲和层析固定相, 用来纯化麦芽糖结合蛋白与大鼠乳酸脱氢酶辅酶结合结构域融合蛋白, 获得了满意的效果.

1 材料和方法

1.1 材料

马铃薯淀粉为上海公私合营泰来化工厂产品. 交联直链淀粉 (amylose) 为 New England Biolabs 产品. 重组的融合表达质粒 pMAL-LND 由本实验室构建^[2], 大肠杆菌菌种 TG1 由陈常庆研究员提供. 兔抗麦芽糖结合蛋白多抗为本实验室制备. 羊抗兔 IgG 由张组传研

究员提供. 所用的化学试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 麦芽糖结合蛋白-乳酸脱氢酶辅酶结合结构域融合蛋白 (MBP-LND) 的初抽液的制备: 将含有表达质粒 pMAL-LND^[2] 的菌接种于 LB/AP 液体培养基中, 37℃ 过夜, 再以 1% 接种量接种于 500 ml 如上培养基中, 37℃ 剧烈摇动培养, 至 A_{600} 达 0.5 后, 加入异丙基 β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 到终浓度 0.1 mmol/L, 37℃ 摇动培养 4 h. 取 1 ml 培养液用于 SDS-PAGE 鉴定表达情况. 培养液 5000 r/min 离心收集菌体, 加入 50 ml 亲和层析上柱缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 巯基乙醇), 超声破菌, 18 000 r/min 离心, 上清为初抽液.

1.2.2 亲和层析: 表达产物初抽液直接上马铃薯淀粉亲和层析柱 (1.8 cm × 10 cm) 与交联直链淀粉亲和层析柱. 用上样缓冲液洗杂蛋白到 $A_{280} < 0.01$, 再用含 10 mmol/L 的麦芽糖的上样缓冲液洗脱. 洗脱产物用于 SDS-PAGE 鉴定纯化情况.

1.2.3 蛋白质印迹分析实验: 荧光标记的羊

* 国家自然科学基金重点项目资助 (39230100).

收稿日期: 1997-05-13, 修回日期: 1997-07-16

抗兔 IgG 按文献 [3] 进行. 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳条带电转移到硝纤膜上, 用兔抗麦芽糖结合蛋白多抗和荧光标记的羊抗兔 IgG 作免疫交叉反应, 然后在紫外灯下观察结果.

1.2.4 蛋白质定量: 采用 Bradford 方法^[4], 以 BSA 为标准蛋白.

3 结果与讨论

MBP-LND 为麦芽糖结合蛋白与乳酸脱氢酶辅酶结合结构域的融合蛋白, 其 N 端 370 个氨基酸残基为大肠杆菌麦芽糖结合蛋白 (MBP). 美国新英格兰实验室利用 MBP 作为亲和层析 “Tag” 发展了用交联直链淀粉作为亲和层析柱的融合蛋白亲和层析纯化系统. 我们利用支链淀粉 (马铃薯淀粉) 作为亲和层析材料, 取得了与交联直链淀粉同样的效果. 图 1 为两种亲和层析材料一步纯化融合蛋白 MBP-LND 的 SDS-PAGE 电泳结果. 分析表明马铃薯淀粉具有与交联直链淀粉作为亲和层析柱同样的纯化效率. 其蛋白质吸附量也与之相似 (约 2 g/L).

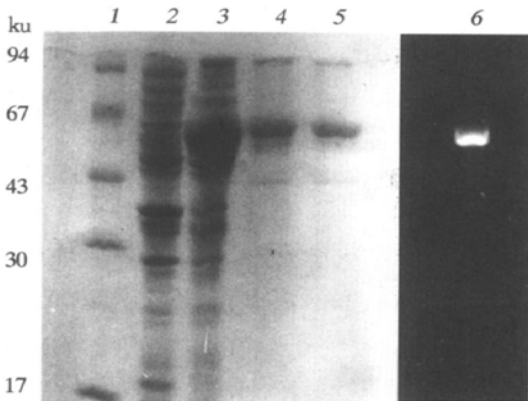


图 1 亲和层析的融合蛋白的鉴定

1: 分子量标准蛋白; 2: 包含 pMAL-LND 质粒的 TG1 的粗抽液; 3: 表达的 MBP-LND 粗抽液; 4: 用交联直链淀粉柱亲和层析纯化的 MBP-LND; 5: 用马铃薯淀粉的亲和层析纯化的 MBP-LND; 6: 蛋白质印迹分析 MBP-LND 的结果.

我们这一方法主要是利用麦芽糖结合蛋白

的亲合性质, 因此原则上可以适用于任何的麦芽糖结合蛋白的融合蛋白. 通过重组 DNA 方法获得目的蛋白与多肽, 十分重要的一步是表达产物的分离纯化. 融合表达亲和层析方法为这一问题提供了简单的解决方法. 要获得大量的重组蛋白, 特别是大规模生产时, 使用与具有与国外商品交联直链淀粉亲和层析柱相近的纯化效率, 而成本则小得多的马铃薯支链淀粉有较大的优越性, 它也成为大规模生产的一种工艺路线.

参 考 文 献

- 1 Maina C V, Riggs P D, Grandea III G *et al.* An *Escherichia coli*. vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-bind protein. *Gene*, 1988, **74** (1): 365~ 373
- 2 熊舜斌, 廉德君, 林旭伟等. 大鼠乳酸脱氢酶辅酶结合结构域的克隆及表达. *科学通报*, 1998, **43** (6): 732~ 736
- 3 Der Balian G P, Kameda N, Rowley G L. Fluorescein labeling of Fab' while preserving single thiol. *Anal Biochem*, 1988, **173** (1): 59~ 63
- 4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~ 254

An Improved Affinity Chromatography System for the Purification of Engineered Maltose-binding Protein Fused Product. LIAN De-jun, XU Gen-jun (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract A method for the purification of expressed maltose binding protein fused protein by using potato starch instead of cross-linked amylose have been developed. The advantage is much cheaper than amylose resin. The commercial available potato starch could be directly use for purification. It provides a process for industrial purification in a larger scale.

Key words maltose binding protein, fused protein, affinity chromatography, potato starch