

新载体 pET-DB 对带有 His-tag 的仓鼠二氢叶酸还原酶的高效表达与纯化*

朱志勇^{1,2)} 谭波^{1,2)} 张文河²⁾ 张洪杰²⁾**

(¹⁾北京师范大学生物化学与分子生物学系, 北京 100875; ²⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 报道了带有 His-tag 的仓鼠二氢叶酸还原酶基因的克隆和在 DB 序列增强下 T7 启动子调控该基因在大肠杆菌中的可溶性高效表达, SDS-PAGE 分析表明, 带有 His-tag 的仓鼠二氢叶酸还原酶的含量可占大肠杆菌细胞总蛋白质含量的 46%。该酶的纯化可用常规的金属络合树脂一步纯化至 SDS-PAGE 一条带, 经凝血酶切去 His-tag 的仓鼠二氢叶酸还原酶与用等电聚焦法获得的无 His-tag 的酶有相同的酶活性。

关键词 蛋白质表达, 二氢叶酸还原酶, pET-DB 载体, His-tag

学科分类号 Q786

二氢叶酸还原酶 (DHFR) 是不含二硫键的单体酶, 在辅酶 NADPH 的参与下, 催化 7,8-二氢叶酸 (DHF) 还原成 5,6,7,8-四氢叶酸 (THF)。THF 作为一碳单位的载体参与体内多种生物合成, 因而 DHFR 对于生物体的新陈代谢具有极为重要的作用, 是肿瘤化疗、抗感染化疗和抗疟疾治疗的重要的药物作用靶点。DHFR 在生物体内的表达量通常很低, 因而不含底物酶的提取、纯化大多采用氨甲蝶呤标记的树脂进行亲和层析, 再经等电聚焦电泳分离脱去底物得到^[1], 造成酶制备的成本高, 且每次电泳可获得纯蛋白的量受到限制。虽然不同来源的二氢叶酸还原酶已经在多种表达体系中获得了成功表达, 但酶的纯化仍多采用亲和层析的方法, 因而限制了对该酶理化性质的深入研究。有报道含仓鼠 DHFR 基因的 pBVS-2 质粒在大肠杆菌中经热诱导, 细胞反复冻溶法处理后, 经一步分子筛层析就可得到纯蛋白质^[2,3], 但由于有大量的核酸及相近分子质量的蛋白质干扰, 每次所能得到的蛋白量也非常低。近年来, 人们开始尝试用带有 His-tag 的 DHFR 基因通过强有力的 pET 表达载体对该酶进行表达和纯化^[4,5], 遗憾的是 DHFR 的表达量仍很低。

与此同时, 中国科学院生物物理研究所静国忠研究员对 pET-30a (+) 表达载体进行了改造, 在 T7 启动子的 SD 序列后增加了一个含 6 个 His 的 DB 序列, 构成了一个新的高效表达体系 pET-DB^[6]。为此我们尝试用此载体对仓鼠 DHFR 进行表达和纯化, 结果表明带有 His-tag 的仓鼠 DHFR 基因可在大肠杆菌中可溶性高表达, 所表达的蛋白质可用镍络合树脂纯化, 显著缩短了酶纯化的周

期, 提高了酶的产率。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

E. coli DH5 α 及 *E. coli* BL21 (DE3) 作为本研究的受体菌, 含有仓鼠 DHFR 基因的热诱导表达载体 pBVS-2 及新载体 pET-DB 均由静国忠研究员惠赠。

1.2 DNA 操作

PCR 引物 1 为 5' GCAGCCATATGGTTCGACCGCTGAAC 3', 含 *Nco* I 酶切位点; 引物 2 为 5' GG GTCGACTTAGCCTTCTCTCATAGAC 3', 含 *Sal* I 酶切位点。该引物的合成及新构建质粒的测序均由上海生工公司完成。*Pfu*ase、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自上海生工公司。各种酶反应条件均按厂家说明书进行。质粒的分离, 重组及转化按 Sambrook 等^[7]的方法进行。

1.3 细菌的培养、诱导及表达产物分析

分别含有 pET-DB-DHFR 和 pET28a-DHFR 质粒的大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 在 37°C 的 LB 培养基 (100 U/ml 的卡那霉素) 中培养过夜, 培养液 50 倍稀释至 50 ml 相同的培养基中, 37°C 培养至 $A_{600} = 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 4 h 后, 离心收集菌体。含有不带 His-tag pBVS-2 质粒的大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 在 LB 培养基 (50 U/ml 氨苄青霉素) 30°C 培养过夜, 培养液 50

* 教育部留学回国人员科研启动基金 (No. 039) 和中国科学院生物物理研究所所长基金资助项目 (No. 25)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64837257, Fax: 010-62022206

E-mail: hongjiezhang@yahoo.com

收稿日期: 2004-01-12, 接受日期: 2004-02-25

倍稀释至 50 ml 相同的培养基中, 30℃ 培养至 $A_{600} = 0.6$, 升高温度至 42℃, 继续培养 4 h 后, 离心收集菌体. 将表达蛋白的菌体悬浮于 5 ml 50 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH = 7.5) 中, 超声破碎, 100 000 g 离心, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 丙烯酰胺的浓度为 15%, 并用考马斯亮蓝染色.

1.4 DHFR 酶的纯化和活性分析

本实验所用的仓鼠二氢叶酸还原酶, 是从带有 His-tag 的 pET-DB-DHFR 表达质粒的大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 工程菌中分离纯化所得. 工程菌 (1 L) 按常规方法培养至 $A_{600} = 0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 4 h 后, 离心收集菌体. 将菌体悬浮于 50 ml 含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH 7.5)、10 mmol/L β -巯基乙醇的缓冲液中, 超声、离心, 上清液经镍络合树脂亲和吸附、洗涤后, 再用含 200 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱. 所获得的 His-tag 的 DHFR 经凝血酶酶解过夜, 用镍络合树脂除去仍带有 His-tag 的 DHFR. 上述酶经硫酸铵沉淀, G-75 凝胶柱层析得到纯蛋白质,

纯度经 SDS-PAGE 电泳检查为 1 条带.

DHFR 酶的活力按 Mathews^[8] 的方法在 25℃ 下用岛津 2501 分光光度计测定. 测活体系中含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH 7.5)、10 mmol/L β -巯基乙醇、0.1 mmol/L DHF, 0.1 mmol/L NADPH 和 0.7 mg/L DHFR (DHF 含量不少于 90%, NADPH 含量不少于 97%, 均为 Sigma 公司产品), 总体积为 1.2 ml. 向测活体系中加入酶, 启动 DHFR 催化的反应. 酶的活力定义为每分钟转化 1 μ mol 的 DHF 和 NADPH 成 THF 和 NADP 所需酶的量. 紫外吸收在 340 nm 处的变化用来计算的酶活力, 其转化系数 $\Delta\epsilon$ 为 12 300 L/mol.

2 结果与讨论

2.1 带有 His-tag 仓鼠 DHFR 基因表达载体的构建

Jing 等^[2] 已成功地构建了含仓鼠 DHFR 基因的热诱导表达质粒 pBVS-2, 并在大肠杆菌的 DH5 α 株中实现了中等程度的表达. 为了验证新构建的表达载体 pET-DB 是否具有广泛的适用性, 是否能提

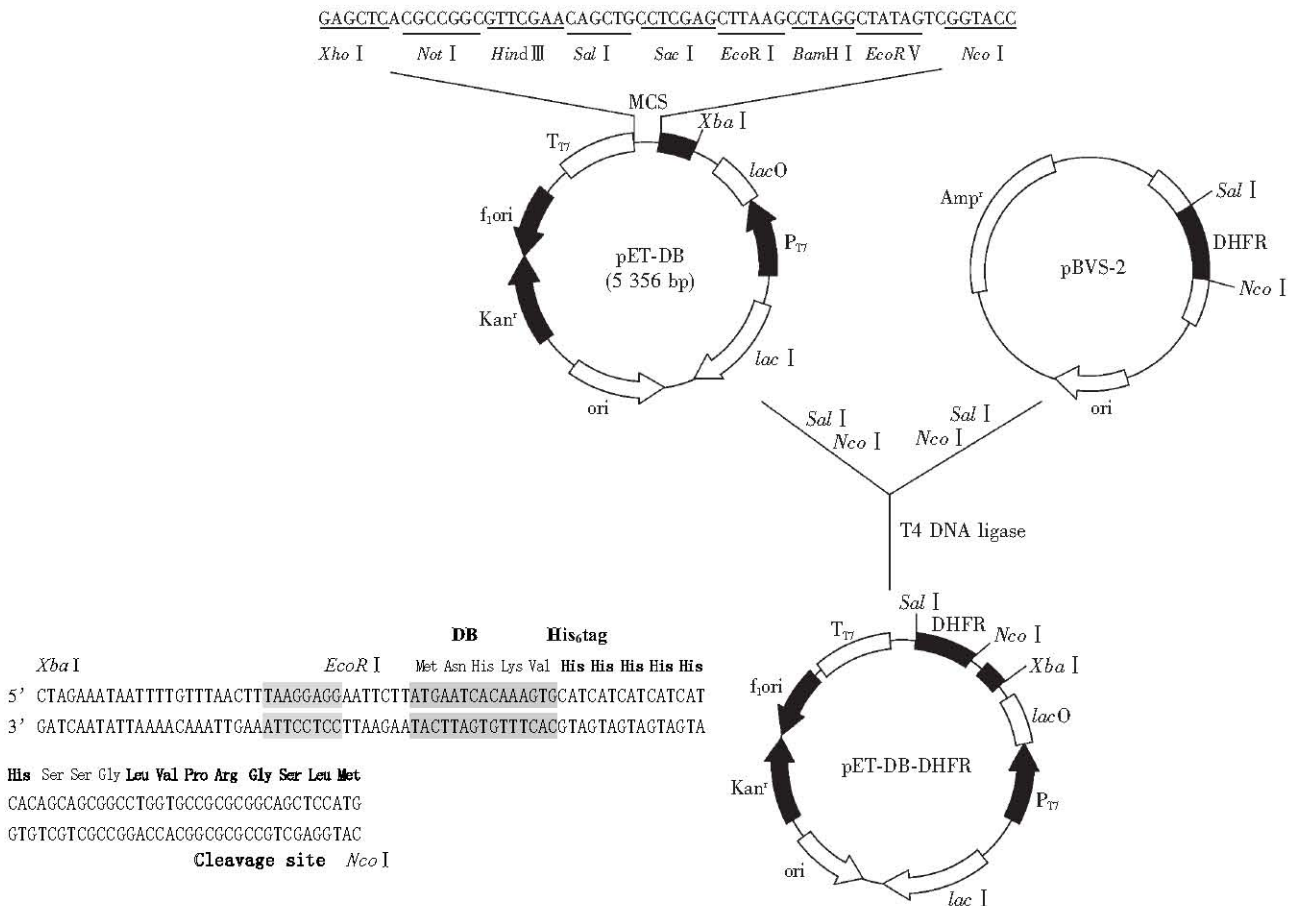


Fig. 1 Construction of the pET-DB-DHFR plasmid

高 DHFR 的表达量, 我们构建了含有仓鼠 DHFR 基因的 pET-DB 表达质粒. pBVS-2 用 *Nco* I 和 *Sal* I 酶解后, 经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离出 570 bp 左右的 *Nco* I -*Sal* I DNA 片段, 此片段含有为仓鼠 DHFR 编码的 DNA 序列 (558 bp) 及其 3' 非编码区序列. 当将此 *Nco* I -*Sal* I DNA 片段插入到 pET-DB 载体上的相同限制酶切位点后, 即产生 pET-DB-DHFR 表达质粒 (图 1). 为仓鼠 DHFR 编码的基因被插入到 T7 启动子的下游. 起始密码 ATG 与一长的 SD 序列之间距离是 7 bp, 此 SD 序列有 8 个碱基与 16 S rRNA 3' 端序列互补. 除了 pET 载体具有的各种特征外, 起始密码 ATG 及其随后的 12 碱基序列构成了 DNA 转录的另一个下游信号——DB 序列, 其在提高外源蛋白质的合成方面具有重要作用^[6]. 为了方便蛋白质的纯化, 在 DB 序列之后 pET-DB 载体还设计了 6 个 His 和一个凝血酶酶切位点.

为了便于与文献 [4, 5] 比较, 我们还构建了含有 His-tag 的 pET28a-DHFR 表达体系. 在仓鼠 DHFR 的 N 端设计了含 *Nde* I 酶切位点的引物 1, 在 C 端设计了含 *Sal* I 酶切位点的引物 2, 以 pBVS-2 质粒为模板进行 PCR, 所得 PCR 产物用 *Nde* I 和 *Sal* I 酶解后, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离出约 560 bp 左右的 *Nde* I -*Sal* I DNA 片段, 此片段含仓鼠 DHFR 的 186 个氨基酸残基编码序列及其 3' 非编码区序列. 当将此 *Nde* I -*Sal* I 片段插入到 pET28a 上的相同酶切位点后, 即产生 pET28a-DHFR 质粒. 经测序核实 DHFR 的氨基酸序列正确. 上述表达体系在 DHFR 的 N 端添加了 19 个氨基酸残基, 形成了带有 His-tag 的仓鼠 pET28a-DHFR 表达质粒.

2.2 带有 His-tag 的 DHFR 的可溶性高效表达

与广泛使用的强有力的蛋白质表达载体 pET 相比, 过去已经证实 pET-DB 载体可以显著提高金葡菌核酸酶、鸡肌腺苷酸激酶、细胞凋亡相关蛋白 TFAR19 等在大肠杆菌中的表达. 图 2 显示了含有仓鼠 DHFR 的 pET-DB-DHFR 和 pET28a-DHFR 质粒, 分别在 *E. coli* BL21 (DE3) 缺陷株中经 IPTG 诱导 4 h 后, 细胞全裂解液在 15% SDS-PAGE 上的电泳结果. 激光分光光度计扫描定量指出, 在 pET-DB-DHFR 表达体系中所表达的带有 His-tag 的 DHFR 量, 可占大肠杆菌细胞总蛋白量的 46%, 表明外源蛋白质得到了高效表达. 相比之下, pET-DHFR 表达体系中所表达的带有 His-tag 的 DHFR

量, 仅占大肠杆菌细胞总蛋白量的 3%. 作为对照, 图 2 还显示了热诱导质粒 pBVS-2 对不含 His-tag 的仓鼠 DHFR 的表达效果, DHFR 占细胞总蛋白质的 24%. 上述结果进一步支持了 DB 序列具有增强蛋白质表达作用的假说, 并表明 pET-DB 载体可能是一个比 pET 载体更有效, 更具有普遍性的蛋白质高效表达载体.

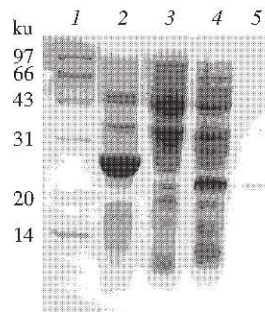


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression of Chinese hamster dihydrofolate reductase by using different vectors

1: Molecular markers containing the proteins with molecular mass of 14, 20, 31, 43, 66 and 97 ku; 2: pET-DB-DHFR; 3: pET28a (+) -DHFR; 4: pBVS-2; 5: Pure Chinese hamster dihydrofolate reductase.

2.3 带有 His-tag 的 DHFR 的快速纯化

由于 pET-DB-DHFR 表达的蛋白质带有 6 个 His, 因而该蛋白质的纯化非常简便. 利用常规的镍树脂亲和层析, 并用含 200 mmol/L 咪唑的

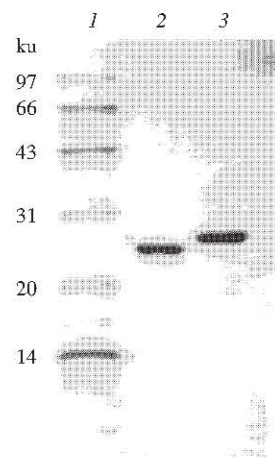


Fig. 3 Purification and thrombin cleavage of His₆-tagged dihydrofolate reductase

1: Molecular markers containing the proteins with molecular mass of 14, 20, 31, 43, 66 and 97 ku; 2: Sample after thrombin cleavage at 4°C overnight, showing the fusion partner is completely removed under the conditions described in the text; 3: His₆-tagged dihydrofolate reductase sample from the main peak of the metal-chelating affinity chromatography.

50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 洗脱该酶。为避免浓度过高的 DHFR 发生沉淀, 用不含咪唑的洗脱液直接稀释新洗脱下的酶至 0.5 g/L 左右。将上述样品加入 20 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L MgCl₂ 和 20 U 的凝血酶, 对含有相同钙镁离子浓度的 Tris-HCl 缓冲液 4°C 透析过夜。为了除去残余的带有 His-tag 的 DHFR, 上述样品再用活化好的镍树脂处理一次, 流出液用 95% 的硫酸铵沉淀。将沉淀的蛋白质溶于少量的 Tris-HCl 缓冲液并经过 G75 凝胶层析即得纯的仓鼠 DHFR。15% SDS-PAGE 显示一条带 (图 3), A₂₈₀/A₂₆₀ 为 1.8, 酶的比活为 8 U/mg, 与用等电聚焦电泳法纯化的 DHFR 具有同样的比活力 (表 1)。

Table 1 Enzyme activity of Chinese Hamster dihydrofolate reductase obtained by different methods

Method	Activity/U
DHFR (by IEF purification)	7.3
Histag-deleted DHFR	8.0

利用 pET-DB-DHFR 表达系统每升细菌培养液可纯化 40 mg 左右的蛋白质, 大大提高了酶的产率, 为进一步研究该酶的理化性质提供了物质基础。

致谢 感谢静国忠研究员和魏群教授对本工作的支持和帮助。

参 考 文 献

- 1 范映辛, 吴嘉炜, 周筠梅. 二氢叶酸还原酶结合底物的去除. 生物物理与生物化学进展, 1996, **23** (5): 463~466
Fan Y X, Wu J W, Zhou J M. Prog Biochem Biophys, 1996, **23** (5): 463~466
- 2 Fan Y X, Wang B, Jing G Z. Soluble expression in *Escherichia coli*, one-step purification, and characterization of Chinese Hamster dihydrofolate reductase. Protein Expression and Purification, 1997, **9** (2): 246~252
- 3 吴嘉炜, 范映辛, 静国忠, 等. 中华仓鼠二氢叶酸还原酶的酶学性质研究. 生物物理学报, 1997, **13** (1): 11~18
Wu J W, Fan Y X, Jing G Z, et al. Acta Biophys Sin, 1997, **13** (1): 11~18
- 4 Arai M, Maki K, Takahashi H, et al. Testing the relationship between foldability and the early folding events of dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*. J Mol Biol, 2003, **328** (1): 273~288
- 5 Tai N, Ding Y, Schmitz J C, et al. Identification of critical amino acid residues on human dihydrofolate reductase protein that mediate RNA recognition. Nucleic Acids Res, 2002, **30** (20): 4481~4488
- 6 Zhang X L, Guo P, Jing G Z. A vector with the downstream box of the initiation codon can highly enhance protein expression in *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 2003, **25** (4): 755~760
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 34~143
- 8 Mathews C K. Methods Enzymol. 1963, **6** (48): 364~366

High Level Soluble Expression and Purification of The His-tagged Chinese Hamster Dihydrofolate Reductase in *E. coli* Using a Newly Engineered pET-DB Vector *

ZHU Zhi-Yong^{1,2)}, TAN Bo^{1,2)}, ZHANG Wen-He²⁾, ZHANG Hong-Jie²⁾**

⁽¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

⁽²⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract His-tagged Chinese hamster dihydrofolate reductase (DHFR) expression in pET vector system has been reported very low. A newly modified pET protein expression vector, pET-DB, was utilized to overexpress of it in soluble form. The amount of DHFR reaches to 46% of the total protein in *E. coli* cells. This His-tagged DHFR could be purified routinely by Ni-NTA agarose resin and the His-tag could be removed by thrombin easily. This engineered DHFR has the same enzyme activity as the enzyme without His-tag obtained by iso-electrophoresis.

Key words protein expression, dihydrofolate reductase, pET-DB vector, His-tag

* This work was supported by Ministry of Education of China for returned overseas Chinese scholars (039) and Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences (025).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64837257, Fax: 86-10-62022206, E-mail: hongjiezhang@yahoo.com

Received: January 12, 2004 Accepted: February 25, 2004