维普资讯 http://www.cqvip.com

第21卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.2
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTAE MEDICINAE CHONGQING 1996

用融合蛋白在大肠杆菌中高表达百日咳杆菌毒素蛋白S_3亚基基因

临床生化教研室 尹一兵
美国洛克菲勒大学 H.Robert Masure

提 要 用多聚酶链反应(PCR)和基因重组技术通过百日咳毒素S_3亚基基因和高表达质粒pMAL-C构建了麦芽糖结合蛋白(MBP)和(S_3)亚基蛋白的融合基因，并在大肠杆菌中高效表达了(MBP-S_3)融合蛋白。该融合蛋白产率占细胞总蛋白含量的25%，并且能用蛋白酶因子Xa将融合蛋白切开，得到MBP(42KD)和S_3亚基蛋白(21.87KD)。该方法表达效率高，纯化过程简单，为基因工程技术生产该毒素提供了新的途径。

关键词 百日咳杆菌毒素S_3;大肠杆菌;融合蛋白
中图分类号 Q753

百日咳毒素(pretussis toxin PTX)是一种六面体蛋白[1]，它由A和B两个部份组成，A是S_1亚基蛋白(MW,26.026KD)能促使细胞内cAMP的增加，产生多种生物学活性[1]。B由S_2(21.925KD)，S_3(21.873KD)，S_4(12.059KD)和S_5(11.013KD)四种蛋白亚基共同组成，主要为S_1发挥作用提供细胞受体识别功能，使S_1能与宿主细胞膜相互作用，其中S_2和S_3对介导细菌粘附到宿主细胞上起重要作用，并且两者在结构上有很好的同源性[2~4]。用基因工程技术生产S_3毒素，不仅对进一步弄清这种毒素的粘附性质，而且对发展新一代百日咳杆菌疫苗都具有十分重要的意义。此研究是首次报道在大肠杆菌中用融合蛋白技术表达重组的百日咳毒素S_3蛋白。

1 材料及方法

1.1 菌种、试剂及仪器

大肠杆菌DH5a由Bethesda实验室提供，pMAL-C融合蛋白表达质粒，蛋白酶因子Xa，麦芽糖基亲和层析柱均购自New England Biolabs公司，各种工具酶分别购自New England Biolabs公司，Pharmacia公司和Promega公司。S_3亚基DNA模板和S_3亚基蛋白单克隆抗体由Elain.L.Tuomanen Lab提供。PCR仪器及Kit由CETUS公司购入，Phast system电泳系统由Pharmacia公司购入，DNA标准及SDS-PAGE低分子量蛋白标准由Bio-Rad公司购入。

1.2 PCR

首先合成一对用于扩增编码S_3基因的引物，此工作委托Oligos Etc.公司完成。引物1为5′CCGAATTCGTTGCGCCAGGCATCGTC3′该引物从S_3亚基蛋白的29aa开始，紧接蛋白酶因子Xa识别序列之后，引物的5′端有一个EcoR I酶切位点。引物2为5′CCGAATTCGTTGCGCCAGGCATCGTC3′该引物为S_3-C端编码序列的互补序列，含有Sal I酶切位点。所用模板为50ng经核酸序列分析鉴定的含有S_3插入片段的重组质粒，PCR反应体积为100μl，引物浓度为100pmol，Taq酶为0.75u，热循环扩增条件为95℃ 5min变性，94℃1min、55℃1min、72℃2 min，共30次循环，再

维普资讯 http://www.cqvip.com

72℃延伸7 min.取2μl PCR产物在0.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 扩增片段的克隆

将扩增产物用酚-氯仿抽提后分别用EcoR I及Sal I进行双酶切，并与同样经两种酶酶切过的表达载体pMAL-C进行连接。重组质粒再用EcoR I和Sal I消化，琼脂糖电泳证实插入片段已进入载体，再将重组的质粒纯化后转化DH5α宿主菌，在含有Amp的LB平板上(含X-gal)进行筛选，挑选出含有融合基因插入片段的转化菌落。

1.4 诱导表达

在37℃ LB液体培养基中生长已转化的E.coli当生长到细胞数约为2×10^8个细胞/ml(O.D.600=0.5)加入诱导剂IPTG(终浓度为0.5mmol/L)，继续生长2h收获细胞。

1.5 分离纯化及鉴定

分离纯化按New England Biolabs公司提供的方法进行[6]，首先在4000×g低温离心10min，沉淀的细胞在悬浮后超声破碎，用麦芽糖基亲和层析柱(Amylose resin)除去杂蛋白，得到的融合蛋白再用蛋白酶因子Xa将其切为MBP(42KD)和S_3亚基蛋白(21.87KD)鉴定用8-25%SDS-PAGE电泳取4μl样品按Phamacia公司的Phast电泳仪说明书进行[7]。

2 结果

见图1。用引物1和引物2扩增出分子量接近600bp的DNA片段，与编码S_3活性区域的DNA大小一致，该片段插入pMAL-C质粒后，转化宿主菌，获得3株重组质粒的阳性克隆菌。重组质粒经EcoR I 和Sal I 消化，插入的S_3DNA片段可被消化切下，符合原先的设计。将上述阳性质粒转化宿主表达菌之后，可诱导出一分子量接近63.8KD的融合蛋白(MBP-S_3)(图2)，其中融合蛋白的产率约占细胞蛋白总量的25%，蛋白经纯化后用Factor-Xa将其切开，用8-25%SDS-PAGE电泳分别得到与MBP(42KD)和S_3(21.87KD)相同的两个片段(图3)，再经转移电泳Western-blotting(抗体为抗S_3单克隆抗体)实验显示，21.87KD片段可与S_3亚基蛋白抗体发生反应。

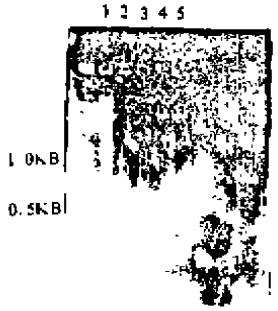


图1 0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR扩增的百日咳杆菌毒素S_3亚基基因及用E.coR I和Sal I消化的pMAL-C、pMAL-P质粒。
1.DNA标准品。
2.PCR扩增的S_3亚基基因。
3.0.5KB PCR阳性对照。
4.用E.coR I 和Sal I 酶切后的pMAL-C质粒。
5.用E.coR I 和Sal I 酶切后的pMAL-P质粒。

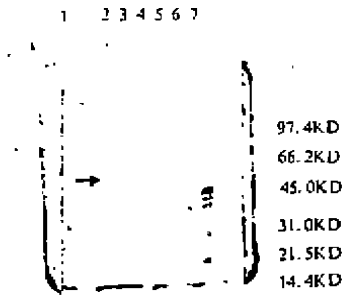


图2 E.coli 表达融合蛋白后细胞提取液的SDS-pAGE图谱。
1.低分子量蛋白质标准品。
2.诱导表达后的大肠杆菌细胞提取液 16#。
3.诱导表达后的大肠杆菌细胞提取液 18#。
4.诱导表达后的大肠杆菌细胞提取液 32#。
5.诱导表达后的大肠杆菌细胞提取液 35#。
6.诱导表达后的大肠杆菌细胞提取液 41#。
7.低分子量蛋白质标准品。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图3 用SDS-PAGE鉴定经部分纯化的MBP-S_3融合蛋白和经Factor-Xa酶切后的S_3亚基蛋白.
1.用Factor-Xa酶切60min后.
2.用Factor-Xa酶切0min后.
3.低分子量蛋白质标准品.
4.用Factor-Xa酶切45min后.
4.用Factor-Xa酶切30min后.

3 讨论

在工程菌中直接表达PTX亚基蛋白基因往往不稳定，而且产量不高，纯化十分困难[8]，用融合蛋白技术在大肠杆菌中表达克隆化基因在研究蛋白定位及功能分析方面都极有价值。而融合蛋白既可大量生产，又易于纯化，还可以诱发抗体反应[9]。我们采用的pMAL-C表达质粒有一个编码麦芽糖结合蛋白(MBP)的malE基因，该基因的信号序列已被切去，所以产生胞浆表达[10,11]。为了防止所表达的蛋白质被细胞内的蛋白酶降解，另外使表达产物能按照恰当的方式折叠并分泌出有一定活性的蛋白质，我们曾用一种在大肠杆菌细胞的外周质中进行表达的质粒(pMAL-P)来表达S_3亚基(未发表的数据)，但未检出合适大小的融合蛋白，这可能是由于分泌肽在外周膜被信号肽酶在不恰当的位置被切割[8,12,13]。

pMAL-C表达质粒基因的上游是很强的启动子，它可以产生高水平的表达。实验结果显示它的蛋白产率可占细胞总蛋白的25%。在malE基因的下游有多个酶切位点，允许克隆的基因插在malE基因的下游，产生MBP和S_3亚基的融合蛋白，由于S_3亚基蛋白紧密地偶联在MBP上可以使S_3亚基蛋白得到更稳定的表达，减少了在大肠杆菌细胞内的过度降解[9]。另外在malE基因与S_3亚基基因之间编码有一个特异的蛋白酶因子Xa的识别位点，使产生的融合蛋白63.8KD能被蛋白酶因子Xa切开，得到MBP(42KD)和S_3(21.78KD)两种蛋白，很容易经麦芽糖的亲和层析柱纯化之后得到S_3亚基蛋白。我们的初步纯化没有经过包涵体的溶解和再折叠过程，但融合蛋白仍可与麦芽糖基结合，并且被蛋白酶因子Xa切开，由此得到的S_3亚基蛋白可与单克隆抗体反应。为了确定这种表达蛋白的生物学活性，需要进一步纯化包涵体完成功能实验。

参考文献

1. Uim KT,et al.Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:3129
2. Noglmollk TM,et al.Biochemistry 1983;21:5516
3. Locht C,et al.Science 1986;232:1258
4. Capian C,et al.FEBS Lett 1986;204:336
5. Nicasia A,et al.Proc Ncal Sci USA 1986;83:4631
6. New England Biolabs,Inc.,Protein Fusion and Purification System,Directions for expression and purification of proteins from cloned genes 1991;1
7. Pharmacia.LKB Biotechnology,Inc.,Phastlmage users manual,Protein blotting development technique file .220;SDS-PAGE separation technique file .110
8. Burnette WN,et al.Biotechnol 1988;6:699
9. Samvrook J,et al.Cold spring Harbor Labo-

维普资讯 http://www.cqvip.com

ratory Press,1989;17(1):822
10. Guan C,et al.Gene 1987;67:21
11. MainaCV,et al.Gene 1988;74:365
12. Talmadge K,et al.Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:3988
13. Gray GL,et al Gene 1985;39:247

(收稿日期 1995-11-16)

HIGH LEVEL EXPRESSION *Bordetella Pertussis* TOXIN S_3 SUBUNIT BY THE FUSING PROTEIN TECHNIQUE IN *Escherichia Coli*

Yin Yibing,et al

Dept.of Clinical Biochemistry

Using Polymerase Chain Reaction (PCR) and recombinant DNA techniques, a fusing gene vector including maltose binding protein (MBP) and pertussis toxin S_3 (PTX-S_3) subunit protein is constructed by PTX-S_3 gene and a high level expression plasmid pMAL-C. High level expression of the fusing protein may be produced by the fusing plasmid in E.coli, the fusing protein (MW,63.87KD)yield is about 25% in the whole cell protein.MBP(MW,42KD) and PTX-S_3(MW,21.87KD)may be obtained by cutting the fusing protein with the factor-Xa.The method have a high level expression and simple purification process, which will be a very useful road to contribute and produce PTX-S_3 in E.coli.

KEY WORDS Bordetella pertussis toxin S_3 subunit; Escherichia coli; Fusing protein

(上接第116页)

参 考 文 献

1 李廷玉.等.国外医学妇幼保健分册 1990;1:19
2 李廷玉.等.营养学报.1995;17(1):1
3 Mejia LA,et al J Nutr 1979;109:129
4 李津婴.等.营养学报.1988;10(4):319
5 Amime E.K,et al.J Nutr,1970;100:1033
6 潘华珍.等.生物膜与疾病 医学新知识丛书(5).人民卫生出版社出版 1986;14
7 李津婴.等.国外医学分子生物学分册 1987;9(1);37
8 P.van hoogevest,et al,Biochimical et Biophysica Acta 1984;777:241
9 Mahant L.et al.J Nutr,1976;106;1817

(收稿日期 1995-11-16)

OBSERVAITON ON THE MORPHOLOGY OF RED BLOOD CELL WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPE IN VITAMIN A DEFICIENT RATS

Qu Ping,et al

Children Hospital

The morphology of circulating red blood cell(RBC) with Vitamin A deficient (VAD) rats was detected by scanning electron microscope.The results showed that the RBC of VAD rats were small,often tear-drop or spindle shaped,acanthotic and uniformly stained spherocytes lacked the biconcave translucent center of control cells.The results suggest that abnormal shape of RBC will be caused by VAD.It is probably one of the mechanisms of anemia caused by VAD.

KEY WORDS Vitamin A deficiency;The shape of RBC;Scanning electron microscope