

克服大肠杆菌中表达 GST 融合蛋白的困难

M. Saluta and P.A. Bell

GE Healthcare Life sciences, Piscataway, NJ, USA.

要获得可溶的、完整的GST融合蛋白,就需要对多种因素进行优化。本文中我们主要针对表达 GST- 荧光素酶融合蛋白(GST-Luciferase fusion protein)过程中选择合适的宿主菌、生长温度、诱导时的菌密度以及诱导的时间等问题进行了讨论。文中所给出的实验案例表明,对于表达这种融合蛋白,在 28°C下生长的大肠杆菌 BL21比其他菌株和别的生长条件下所得到的结果都要好。

引言

在大肠杆菌中表达获得大量的目的蛋白质,可用于各种研究,其中包括抗体和疫苗的生产、分子免疫学以及结构、生物化学和细胞生物学的研究。在表达和纯化重组蛋白质时,使用的比较广泛的一个体系就是谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合系统⁽¹⁾。GST基因融合系统(GST Gene Fusion System)为我们在大肠杆菌中表达、纯化和检测谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白提供了一套完整的实验方案。虽然在大肠杆菌中生产制备重组融合蛋白的方法已经很成熟了,但仍然可能会有许多因素阻碍我们成功地生产和纯化全长的、可溶性的融合蛋白⁽²⁾。以下是一些有关解决这些障碍问题的方针,其中包括选择合适的克隆与表达宿主菌、检测菌的生长条件以及优化可溶性表达的方案等。

克隆与转化

克隆到pGEX载体中的插入片段的表达受到IPTG诱导的tac启动子的控制。所有的pGEX载体都受一种内源lacI_q基因的调控。这种lacI_q基因的表达产物是一种阻遏蛋白,它结合在tac启动子的操作子区以阻止蛋白质的表达,直到IPTG诱导后才能解除这种阻遏效应,这样就可以对插入片段的过量表达进行严谨地控制。

在诱导条件下,pGEX载体具有高效表达融合蛋白质的能力。然而,即使在非诱导条件下,由lac启动子引发的,位于lacI_q基因3'-端和tac启动子之间插入片段的本底表达["遗漏"表达("leaky" expression)],会干扰我们对含有正确方向插入片段的克隆的筛选。如果插入片段对宿主是有毒性的,那么这种现象就会一直存在。我们可以通过利用代谢产物的协同作用,比如在培养基中添加葡萄糖,来最大程度地减少这种由lac启动子

引发的本底表达。在培养基中含有2%葡萄糖的情况下,代谢物抑制效应直能够影响由lac启动子引发的本底表达,而不影响在IPTG诱导由tac启动子控制的表达。因此,为了最大程度地减少本底表达所带来的影响,我们推荐在细胞转化、菌种保存以及过夜培养细胞种子过程中都应该在培养基中添加葡萄糖。

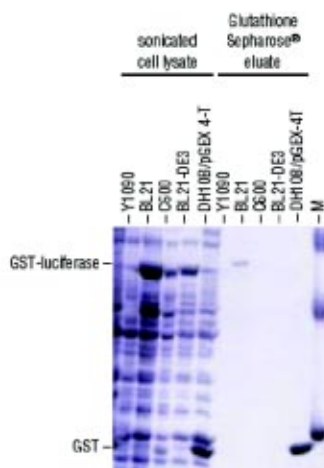


图1. 宿主菌株和融合蛋白的可溶性。将含有一个荧光素酶基因插入片段 pGEX-4T 载体转入到各种大肠杆菌中。然后将菌液按标准方法培养、诱导和裂解⁽¹⁰⁾。用谷胱甘肽 Sepharose 4B 纯化融合蛋白。实验中以转化有 pGEX-4T 的大肠杆菌 DH10B 作为 GST 表达的对照。

M = 分子量参比物。

宿主菌

虽然有许多种大肠杆菌宿主菌都可以用来对pGEX载体进行克隆和表达,但是有一些经过特殊改造的菌株更适合表达融合蛋白质,而且特别适于表达全长的融合蛋白。菌株中有一些已知的细胞质蛋白酶基因产物,如 Lon, OmpT, DefP 或 HtpR; 缺失这些基因的宿主菌可以降低由宿主细胞内蛋白酶降解的影响,从而有利于融合蛋白的表达⁽³⁻⁶⁾。大肠杆菌 BL21 就是这种宿主菌中的一例, BL21 细胞中缺失了 Lon 和 OmpT 蛋白酶的产物。在有些情况下,宿主菌还可以帮助提高完整可溶性蛋白质的产率。图1显示的是对几种宿主菌在可溶组分中完整GST融合蛋白表达能力分析结果。结果表明,对于这种特定的重组表达载体,在所检测的菌株中, BL21 是唯一一种能够以可溶和完整形式表达这种融合蛋白的菌株。

提高可溶性表达

在大肠杆菌中大量表达外源的融合蛋白会导致形成一种称之为包含体的不溶性产物。包含体指的是一种由沉淀物凝集而成的物质，其主要成分是由细胞表达的融合蛋白和 RNA 形成的复合物，这使得绝大多数变性剂都不能影响它⁽⁷⁾。有一些蛋白质以可溶的形式表达时会不稳定，虽然以包含体的形式表达可以用来纯化这种有活性的蛋白质。但是，溶解和重折叠这些融合蛋白的过程中存在着很多变数，从而使活性蛋白质的产率往往不高。另外的方法就是对各种影响细菌生长的因素进行研究改善，这些影响因素或者是单独起作用或者是相互之间在联合发挥作用。对它们的改善可以在可溶组分中得到更高产率的非降解的融合蛋白质。它们包括：

- 将细菌的生长温度降低到 20 至 30°C 之间；
- 缩短诱导的时间；
- 在比较高的菌密度进行较短时间的诱导；
- 加强通气。

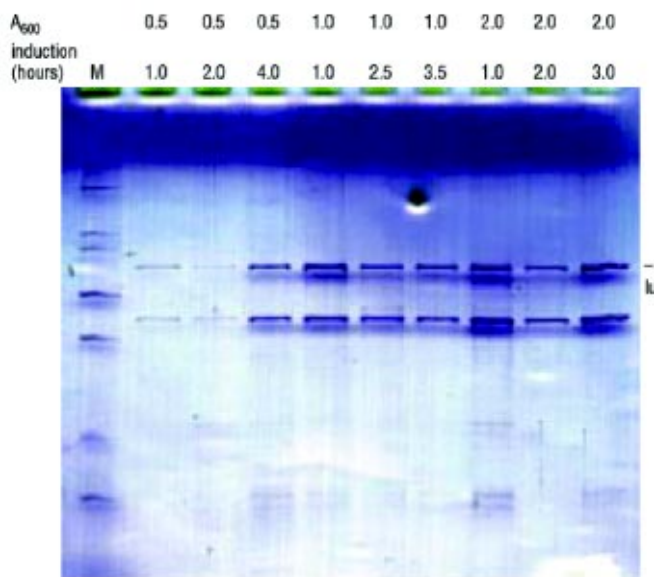


图 2. 在 37°C 条件下 GST- 荧光素酶的表达。用 0.1M 的 IPTG 诱导转化有 pGEX-4T-luc 的大肠杆菌 BL21，诱导时的菌密度和诱导时间如图所示。将收集的菌体用超声法裂解，然后用 Glutathione Sepharose 4B 纯化融合蛋白⁽¹⁰⁾。

M= 分子量标准参照。

图 2 和 3 展示了温度对 GST 融合蛋白的可溶性和降解情况的影响。在两组实验中，菌液都是用 0.1M 的 IPTG 分别诱导不同的时间，而诱导时的菌密度在不断提高。在 37°C 的生长条件下（图 2），在所有菌密度范围内和诱导条件下的可溶性完整融合蛋白的产率都受到了损失——约有 50% 的融合蛋白被降解了。然而，当把生长温度降低到 28°C 以后（图 3），在检测范围内的所有

菌密度和诱导时间条件下的可溶性完整融合蛋白的产率都有相当大的提高。一般情况下，在比较低的细胞密度 ($A_{600}=0.5$) 时诱导，通常会有比较高产率的可溶形式融合蛋白。同时也要注意的，在有些情况下，让细胞生长到一个比较高的密度（大于一个 A_{600} 单位）而不用 IPTG 诱导也可能有益于表达可溶性融合蛋白。尽管采用这种方法的产率较低，但可以得到更多的完整的融合蛋白（图 3 的最后一条带）。

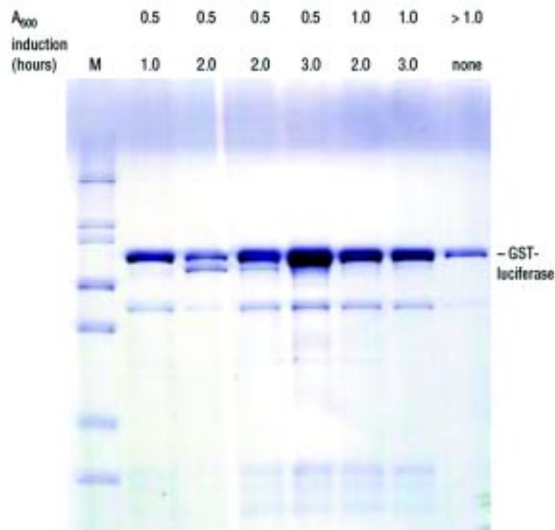


图 3. 在 28°C 条件下 GST- 荧光素酶的表达。用 0.1M 的 IPTG 诱导转化有 pGEX-4T-luc 的大肠杆菌 BL21，诱导时的菌密度和诱导时间如图所示。收集的菌体用超声法裂解，然后用 Glutathione Sepharose 4B 纯化融合蛋白⁽¹⁰⁾。

M= 标准分子量参照。

图 3 同样显示出我们所能观察到的过度超声裂解所带来的影响。过度的超声裂解会导致大肠杆菌宿主蛋白质的共纯化现象，同时也会导致融合蛋白的变性和破碎⁽¹⁾。在此图中，第三和第四条带 ($A_{600}=0.5$ ，诱导时间为 2.0 小时) 的样品是在相同生长条件下所收集的菌体的裂解物。但第三条带中所收集的细胞是经过过度超声裂解的，结果导致较多的目的产物被打碎。DnaK 是经常与 GST 融合蛋白共纯化的宿主蛋白之一。我们可以在经过 Glutathione SepharoseTM 4B 的纯化后，利用离子交换层析方法把 DnaK 从 GST 融合蛋白中分离出去⁽⁹⁾。

融合蛋白的可溶性

提高融合蛋白可溶性的另外一种方法是在收集菌体以后裂解细胞的阶段联合加入 Triton X-100 和 N- 十二烷基肌氨酸钠。Frangione 和 Neel 在 1993 年发表的文章中详细讲述了这种方法⁽⁸⁾。这种方法包括在超声