

大肠杆菌膜蛋白的GFP-(His)₈融合蛋白的表达监测及应用IMAC和凝胶过滤两步纯化

D. Drew¹, M. Lerch¹, E. Kunji², D-J. Slotboom³, 和 J-W. de Gier¹

1 Center for Biomembrane Research, Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Stockholm, Sweden.

2 MRC Dunn Human Nutrition Unit, Combridge, UK.

3 Department of Biochemistry, University of Groningen, Groningen, the Netherlands.

大肠杆菌膜蛋白的GFP-(His)₈融合蛋白被过表达、溶解并纯化到均一程度。GFP标签可以实现从表达到纯化的所有步骤中直接监测蛋白质，而在蛋白质上表达的组氨酸标签有利于通过HisTrap™ HP层析柱上的固定化金属离子亲和层析(IMAC)吸附感兴趣的蛋白。

方法

融合在膜蛋白C-端的绿色荧光蛋白(GFP)十分有利于在它的过表达和分离过程中监测这种膜蛋白。融合蛋白上异常稳定的GFP标签能够被用于检测过表达时中全细胞内以及在溶解和纯化的溶液(检测限度: 10μg GFP/l)(1, 2)中带荧光的融合膜蛋白。GFP标签的荧光也能够在标准的SDS聚丙烯酰胺凝胶中被检测(检测限度: 每条蛋白条带5 ng GFP)(1), 这可以测定膜蛋白GFP融合蛋白的完整性并提供一种快速和通用的方案取代繁杂的膜蛋白免疫印迹。

在本研究中, 融合GFP的大肠杆菌膜黄素细胞色素YedZ(3)由pET28a+带组氨酸标签的质粒在大肠杆菌BL21(DE3)pLysS中过表达。采用固定化金属离子亲和层析(IMAC)和凝胶过滤相结合的方法纯化目标蛋白。被表达的蛋白含有一个(组氨酸)₈标签, 有利于通过HisTrap HP层析柱上的IMAC吸附。

YedZ-GFP-(His)₈融合蛋白的过表达

含有YedZ-TEV-GFP-(His)₈的大肠杆菌BL21(DE3)pLysS的1-l培养物按照以前的描述培养生长(1, 3)。用IPTG作为诱导剂诱导表达YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白, 分别在不同的时间点取样(0、1、2、3和4 h)。YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白的表达依靠全细胞荧光和胶内荧光监测(1)。全细胞荧光信号与胶内YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白的荧光信号(1)强度作图(图1)。

膜的分离和溶解

在诱导表达4 h后通过4 °C、6200 × g离心15分钟收获细胞。上清被轻轻倒掉后细胞用500 ml pH 7.4的冰预冷的PBS重悬。重悬细胞如上所述离心15分钟, 轻轻倒掉上清, 细胞沉淀用10 ml冰预冷的PBS重悬。随后添加AEBSF(终浓度1 mg/ml)、DNase(终浓度为20 – 100 units/ml)和氯化镁(终浓度1 mM), 细胞用弗氏细胞高压破碎仪在4 °C、以690 bar(10000 psi, 69 Mpa)至少破碎2次。未破碎细胞和其他碎片通过4 °C、24000 × g离心12分钟去除并收集含有膜的上清。上清如上所述再次离心以再次去除残留的细胞和碎片。澄清的上清4 °C、150,000 × g离心45分钟收集膜。用冰预冷的PBS重悬后, 膜进一步通过4 °C、150,000 × g离心45分钟收集。膜用PBS重悬为浓度大约3 mg蛋白/ml, 随后添加n-十二烷基-D-麦芽吡喃糖苷(DDM)使其终浓度为1% (w/v)。4 °C温和搅拌溶解1 h。未能溶解的物质通过4 °C 100,000 × g离心45分钟去除。收集上清并最后上样到5 ml的HisTrap HP层析柱。

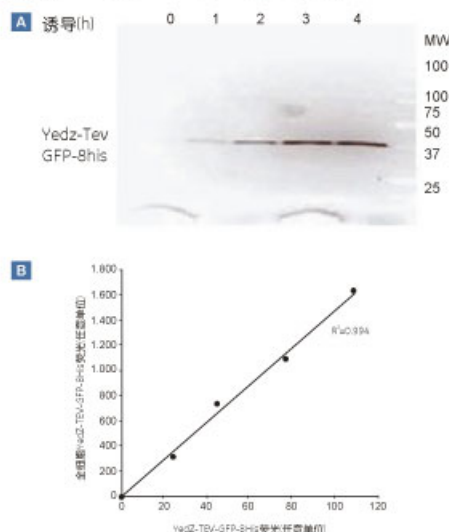


图1. 利用胶内/全细胞荧光监测YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白过表达。

(A) 用IPTG诱导从0 h到4 h的表达进展。

(B) 全细胞荧光(激发波长485 nm, 发射波长512 nm)与胶内YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白荧光信号强度关系图。

已经过Macmillan出版社Ltd允许改编:

Nature Methods 3, 303-313, 版权2006。

IMAC

层析柱: HisTrap HP, 5 ml

样品: 带有YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白的可溶性膜

上样: 2.5 mg/ml填料 (溶解后3 mg/ml)

缓冲液A: PBS, 0.1% DDM, pH 7.4

缓冲液B: 含有500 mM咪唑的缓冲液A。

洗涤: 4%缓冲液B超过20CV, 4-25%缓冲液B超过20CV

洗脱: 50%缓冲液B

流速: 上样0.3 – 0.5 ml/min, 洗脱1 ml/min

系统: ÄKTAprime

凝胶过滤

层析柱: Tricorn Superdex 200 10/30 GL

样品: 从HisTrap HP柱的洗脱组分

上样: 0.5 ml

缓冲液: PBS, 0.1% DDM, pH 7.4

流速: 0.4 ml/min

系统: ÄKTAprime

应用IMAC和凝胶过滤的两步纯化

YedZ-TEV-GFP-(His)₈融合蛋白使用IMAC进行纯化(图2)。在上样到层析柱之前, 终浓度为10 mM的咪唑被添加到溶解的膜中。纯化的过程使用胶内荧光和考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE 检测。

如图2A所示, 从IMAC步骤洗脱分离的组分被收集。组分D被浓缩后再上样到Tricorn Superdex 200 10/30 GL层析柱中进行第二步的凝胶过滤纯化(图2B)。D、E和F的收集峰应用SDS-PAGE进行分析, 结果表明直接经IMAC纯化之后, 纯化的目标蛋白是均一的组分, 已有效地从杂质中分离出来(D泳道, 图2C)。

如SDS-PAGE结果所示, 图2B中的峰E不含有任何的蛋白(E泳道, 图2C), 但很可能含有去垢剂和/或脂质体。从凝胶过滤得到的组分F含有纯化的膜蛋白-GFP-(His)₈(F泳道, 图2C)。图3显示在紫外光下纯化的膜蛋白-GFP-(His)₈。

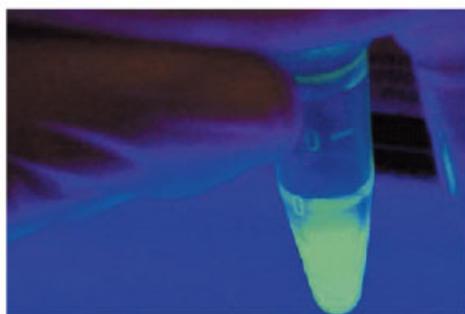


图3. 在紫外光下看到的纯化的膜蛋白-GFP-(His)₈

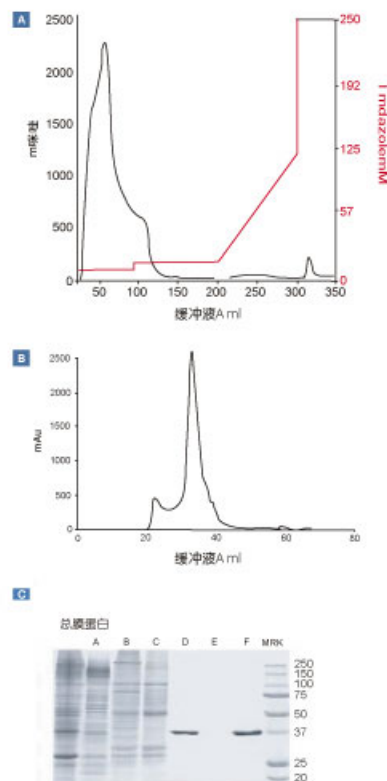


图2. 对纯化自大肠杆菌培养物中的可溶性膜中的大肠杆菌YedZ-TEV-GFP-(His)₈的两步纯化。从(A)IMAC得到的组分D在(B)凝胶过滤中进一步纯化。(C)选择组分的SDS-PAGE分析显示目标蛋白的纯度。从HisTrap HP层析柱得到的组分D实际上是均一组分。

结论

一个以组氨酸标记的大肠杆菌细胞质膜蛋白GFP-(His)₈融合蛋白YedZ-GFP-(His)₈被过表达, 去垢剂DDM溶解, 并且经过IMAC和凝胶过滤两步纯化再结合SDS-PAGE分析得到了纯组分。

膜蛋白的过表达和纯化一般比较困难。这个研究表明通过膜蛋白-GFP-(His)₈融合, 可以在蛋白质的过表达、增溶和纯化的所有步骤中采用荧光方法进行监测。(His)₈的标记可以很容易纯化溶解的融合蛋白得到纯组分。

订购信息

产品	货号
HisTrap HP (5 × 5ml)	17-5248-02
Tricorn Superdex 200 10/300 GL 层析柱	17-5175-01
ÄKTAprime plus 层析系统 ¹	11-0013-13

¹ ÄKTAprime层析系统现已更新为 ÄKTAprime plus层析系统

参考文献

- Drew D. et al. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nature Methods* 3, 303-313 (2006).
- Kawate, T. and Gaudaux, E. Fluorescence-detection screening of integral membrane proteins. *Structure* 14, 673-681 (2006).
- Drew D, et al. Ascalable, GFP-based pipeline for membrane protein overexpression screening and purification, *Protein Sci*, 14, 2011-2017 (2005).