

· 论 著 ·

# 融合蛋白 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 表达质粒的构建及诱导条件优化

贺 艳, 颜宏利, 陆一鸣, 张 毅, 杨湘越, 孙树汉\*

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的:在大肠杆菌中高效表达融合基因 AnxB<sup>1</sup>ScuPA。方法:利用 PCR 技术扩增 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 的融合基因,克隆至原核表达载体 pET-28a;转化几种不同的宿主菌(感受态细菌 BL21、Rosetta、BL21-RIL),利用 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L)诱导蛋白表达,并对表达条件进行优化,根据凝胶扫描定量结果确定合适的宿主菌和诱导表达条件。结果:AnxB<sup>1</sup>ScuPA 在具有稀有密码子 tRNA 的宿主菌 BL21-RIL 表达量较其他宿主菌为高。在菌液生长至 D<sub>600</sub>=0.8 时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,诱导 0.5 h 后加入利福平至终浓度 150 μg/ml,可使蛋白 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 的表达量提高至菌体总蛋白的 36%。结论:通过选择具有稀有密码子 tRNA 的宿主菌 BL21-RIL 和优化诱导条件,使 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 在大肠杆菌中得到高效表达。

**[关键词]** 膜联蛋白亚家族;单链尿激酶融合基因;稀有密码子;表达;利福平

**[中图分类号]** Q 786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)11-1205-03

## Construction of AnxB<sup>1</sup>ScuPA expression vector and optimization of inducing conditions

HE Yan, YAN Hong-Li, LU Yi-Ming, ZHANG Yi, YANG Xiang-Yue, SUN Shu-Han\* (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To clone and highly express fusion gene AnxB<sup>1</sup>ScuPA in *E. coli*. **Methods:** The gene of AnxB<sup>1</sup>ScuPA was amplified by PCR and the product was inserted into plasmid pET<sup>28a</sup>. The recombinant plasmid pET<sup>28a</sup>-AnxB<sup>1</sup>ScuPA was transformed into 3 different competent *E. coli* strains: BL21, Rosetta and BL21-RIL. Recombinant protein AnxB<sup>1</sup>ScuPA was induced by IPTG. Several conditions, such as IPTG and rifampicin concentration were optimized. **Results:** The protein AnxB<sup>1</sup>ScuPA obtained high expression in *E. coli* BL21-RIL, which carried gene for the rare codon tRNA. When the cells grew into D<sub>600</sub>=0.8, IPTG was added to the final concentration of 0.4 mmol/L. After 0.5 h induction, rifampicin was added to the final concentration of 150 μg/ml. Under the above condition, the expression of AnxB<sup>1</sup>ScuPA could be as high as 36% of the total bacterial proteins. **Conclusion:** By selecting the *E. coli* strain and optimizing the inducing conditions, the recombinant protein AnxB<sup>1</sup>ScuPA can be highly expressed in *E. coli*.

**[KEY WORDS]** annexin subfamily; single-chain urokinase-type plasminogen activator; rare codon; expression; rifampicin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(11):1205-1207]

AnxB<sup>1</sup>是我室首次克隆到的一个新的膜联蛋白亚家族成员<sup>[1]</sup>,具有较强的抗凝血功能和血栓靶向性<sup>[2]</sup>。低相对分子质量单链尿激酶(ScuPA 32k)由尿激酶原的第 144~411 位氨基酸残基组成,含有尿激酶原的酶活性中心,具有同尿激酶原相似的溶栓效果,但对血栓的亲合力比尿激酶原差<sup>[3]</sup>。我们利用基因重组技术,得到了 AnxB<sup>1</sup>和 ScuPA 32k 的融合基因,并在 GST 表达系统中得到了高效表达<sup>[4]</sup>。为获得不含 GST 的蛋白 AnxB<sup>1</sup>ScuPA,本研究首先将编码 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 的基因插入 pET 28a 载体,利用 IPTG 进行诱导表达。但是,由于 ScuPA 32k 基因中含有一些大肠杆菌的稀有密码子<sup>[5]</sup>,如编码精氨酸的 AGG/AGA、编码亮氨酸的 CUA、编码异亮氨酸的 AUA 等,导致 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 融合蛋白的表达量不高。为此,我们将含有 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 融合基因的重组质粒转入能够表达稀有密码子的宿主菌,最

终使 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 融合蛋白得以高效表达,为进一步纯化和生物活性研究打下了基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pET 28a 和大肠杆菌 Top10 由本室保存;含膜联蛋白 AnxB<sup>1</sup>和低相对分子质量单链尿激酶融合基因的质粒 pGEX<sup>5T</sup>-anxB<sup>1</sup>-scuPA 由本室构建并保存<sup>[4]</sup>;大肠杆菌 BL21(DE3)(以下简称 BL21)、Rosetta<sup>TM</sup>(DE3)pLysS(以下简称 Rosetta)购自 Novagen 公司;菌株 BL21-CodonPlus<sup>TM</sup>-RIL(以下简称 BL21-RIL)由北京大学茹炳根教授

\* [基金项目] 国家自然科学基金(30271167);上海市优秀青年教师后备人才基金(03YQHB105)。

[作者简介] 贺 艳(1972-),女(汉族),实验师。

\* Corresponding author. E-mail: shsun888@hotmail.com

惠赠;各种限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;Pfu 高保真 DNA 聚合酶购自上海申能博彩公司;胶回收试剂盒为上海华舜公司产品;IPTG、氯霉素为 Sigma 公司产品;利福平购自长海医院药房。蛋白凝胶扫描定量采用美国 Alpha 公司的 Chemilmager<sup>TM</sup>5500 凝胶成像系统。

1.2 引物 利用 DNA tools 软件进行设计,上游引物 P1:5'-TGG AAT TCA TGG CCT ACT GTC GCT CCC-3';与 AnxB<sup>1</sup> 基因的 N 端序列一致,引入 *EcoR* I 酶切位点;下游引物 P2:5'-TTG TCG ACG CAG AGG GCC AGG CC-3';与低相对分子质量单链尿激酶的 C 末端序列互补,引入 *Sal* I 酶切位点。引物均由上海基康生物公司合成。

1.3 质粒 pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA 的构建 以质粒 pGEX<sup>5T</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA 为模板,常规 PCR 反应扩增 AnxB<sup>1</sup>scuPA 融合基因。反应体系 50 μl,引物 P1、P2 各 25 pmol,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L、Pfu 高保真 DNA 聚合酶 3 U。扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 90 s,共 25 个循环;循环结束后延伸 10 min。

PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,胶回收目的 DNA。回收产物经 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切,与同样用 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切的 pET-28a 载体连接。连接产物转化感受态细菌 Top<sup>10</sup>,以上操作参见文献[6]。

1.4 宿主菌对 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 基因表达的影响 将重组质粒 pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA 分别转化感受态细菌 BL21、Rosetta、BL21-RIL,得到重组大肠杆菌 BL21 (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA)、Rosetta (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA)、BL21-RIL (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA)。每个重组菌均挑取 3 个单克隆于 LB 培养液(含卡那霉素 50 μg/ml)中培养过夜,然后按 1:10 的比例转接到 3 ml 培养液中,37℃ 培养至  $D_{600}$  为 0.6~0.8,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 3 h,冰浴冷却菌液,取样测  $D_{600}$  (一般应为 1.6~2.0)。取 100 μl 菌液离心,加 10 μl TE 缓冲液和 10 μl 上样缓冲液悬浮沉淀,煮沸 5 min 后进行 10% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色后凝胶扫描鉴定表达结果。

1.5 诱导表达条件的优化 挑取重组大肠杆菌 BL21-RIL (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA) 单克隆于 5 ml LB 培养液(含卡那霉素 50 μg/ml)中培养过夜,按

照 1:20 的比例转接到 25 支 3 ml 培养液中 37℃ 培养。分别就诱导时菌液的浓度、诱导剂 IPTG 的量、诱导时间、是否添加氯霉素和利福平等条件进行优化,根据 SDS-PAGE 凝胶扫描的结果,选择表达量最大的诱导条件作为最优条件。

## 2 结果

2.1 原核表达质粒 pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA 的鉴定 PCR 产物经 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切后,克隆至 pET<sup>28a</sup> 载体。挑取阳性克隆扩增培养,抽提质粒后利用 *EcoR* I / *Sal* I 酶切,结果在 1.9 kb 和 5.4 kb 的位置各切出一条带,分别与融合基因 AnxB<sup>1</sup>ScuPA (1 845 bp) 和 pET<sup>28a</sup> 载体 (5 369 bp) 的实际大小相符。对酶切鉴定正确的质粒委托上海申友生物技术公司进行测序,没有发现突变,构建的重组质粒命名为 pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA。

2.2 宿主菌对表达的影响 将上述阳性重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21<sup>212</sup>、Rosetta、BL21-RIL,按照 1.3 所提供的诱导条件进行表达,结果见图 1。在相同的诱导条件下,3 种宿主菌中均能在相对分子质量为 64 000 处出现 1 条新的条带,与 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 的理论相对分子质量相符,说明 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 在 3 种宿主菌中均能得到表达。但是表达量存在明显差异,其中 BL21 (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA) 诱导后表达条带最弱, Rosetta (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA) 稍强, BL21-RIL (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA) 的表达量最大。

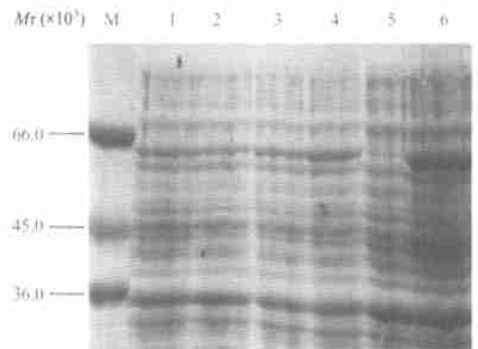


图 1 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 在不同宿主菌中的表达  
Fig 1 Expression of AnxB<sup>1</sup>ScuPA in different *E. coli* strains

M: Protein marker; 1, 3, 5: Total bacterial samples of BL21 (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA), Rosetta (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA), BL21-RIL (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA) before induction; 2, 4, 6: Total uninduced bacterial samples of BL21 (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA), Rosetta (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA), BL21-RIL (pET<sup>28a</sup>-anxB<sup>1</sup>scuPA) after induction

2.3 诱导表达条件的优化 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L, 在菌液的  $D_{600}$  分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 时进行诱导, 结果发现菌液  $D_{600} = 0.8$  时诱导表达量最大。在菌液  $D_{600} = 0.8$  时, 分别加入 IPTG 至终浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 结果发现 IPTG 浓度在 0.4 mmol/L 时达到最大表达, 表达量可占菌体总蛋白的 22% (图 2)。

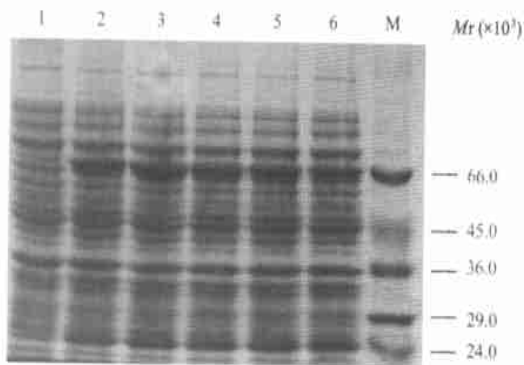


图 2 不同 IPTG 浓度对 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 表达的影响

Fig 2 Expression of AnxB<sup>1</sup>ScuPA under different IPTG concentrations

1: Total bacterial samples of BL21-RIL (pET28a-anxB<sup>1</sup>scuPA) before induced; 2-6: Total bacterial samples of BL21-RIL (pET28a-anxB<sup>1</sup>scuPA) after induced by 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L IPTG; M: Protein marker

2.4 利福平对 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 表达的影响 诱导时的菌液  $D_{600} = 0.8$ , IPTG 浓度为 0.4 mmol/L, 利福平均在诱导 0.5 h 后加入, 终浓度为 0~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果发现, 加利福平可以明显提高表达量, 终浓度为 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时可以获得最大程度的表达, 凝胶扫描的结果显示, 此时重组蛋白 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 的表达量占菌体总蛋白的 36%。

### 3 讨论

许多真核基因常常很难在大肠杆菌中获得高效表达, 其原因之一是真核基因中含有许多大肠杆菌的稀有密码子。尿激酶原基因中含有很多大肠杆菌的稀有密码子, 如精氨酸密码子 (AGG、AGA) 和异亮氨酸密码子 (AUA), 因此在原核表达系统中表达量一直很低, 一般不超过菌体总蛋白的 10%。本研究构建的质粒 pET28a-anxB<sup>1</sup>scuPA 转入 BL21 宿主菌, 诱导后表达条带不明显。BL21-Codon-PlusTM-RIL 菌株由于整合了编码 tRNAs (精氨酸、异亮氨酸、亮氨酸) 的基因, 增加了大肠杆菌识别稀有密码子的能力, 有效克服了蛋白翻译中稀有密

码子的限制。实验结果表明, 利用 BL21-Codon-PlusTM-RIL 菌株作为宿主菌表达 AnxB<sup>1</sup>ScuPA, 表达量可以明显得到提高。

外源基因在大肠杆菌中的表达受多种因素影响, 因此对不同的基因必须对诱导条件进行优化, 才能获得最大程度的表达。BL21-RIL 菌株具有氯霉素抗性。有研究认为, 氯霉素抗性的质粒加入利福平可以增加质粒的拷贝数, 从而增加蛋白的表达量。因此, 我们对表达诱导的条件分别进行了优化, 最终选择的诱导表达条件为: 在菌液  $D_{600}$  为 0.8 时加入 IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 进行诱导, 诱导 0.5 h 后加利福平至终浓度为 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 诱导表达 4 h 后收菌。至此, 我们通过宿主菌的选择和诱导条件的优化, 使融合蛋白 AnxB<sup>1</sup>ScuPA 的表达量提高到菌体总蛋白的 30% 以上, 为进一步纯化和生物活性研究奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] Yan HL, Sun SH, Chen RW, et al. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 119(1): 1-5.
- [2] 张毅, 陈蕊雯, 孙树汉. 一种新的钙依赖性磷脂结合蛋白——Annexin 32 对血凝及血栓形成的影响 [J]. *中国科学 (C 辑)*, 2002, 32(2): 172-176.  
Zhang Y, Chen RW, Sun SH. The influence of Annexin<sup>32</sup>, a new  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipid-binding protein, on coagulation time and thrombosis [J]. *Sci China C*, 2002, 45(2): 186-190.
- [3] Stump DC, Lijnen HR, Collen D. Purification and characterizations of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(36): 17120-17126.
- [4] 颜宏利, 孙树汉, 陈蕊雯, 等. 膜联蛋白 32 与低分子量单链尿激酶融合基因的构建及高效表达 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23(4): 378-380.  
Yan HL, Sun SH, Chen RW, et al. Construction and expression of a low relative molecular mass single-chain urokinase-type plasminogen activator (ScuPA<sup>32k</sup>) and annexin 32 [J]. *Dier Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2002, 23(4): 378-380.
- [5] Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous protein in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6(5): 494-500.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 34-60.

[收稿日期] 2004-03-08

[修回日期] 2004-08-30

[本文编辑] 尹 茶