

## 以类弹性蛋白多肽为标签的表达质粒构建及其用于木聚糖酶的非色谱纯化

付晓平, 王文研, 张光亚\*

华侨大学化工学院生物工程与技术系, 厦门 361021

**摘要:** 【目的】旨在构建一个能以非色谱纯化目标蛋白的表达质粒, 使用自行设计的类弹性蛋白多肽 (ELPs) 作为非色谱纯化标签, 以纯化目标蛋白。该 ELPs 长度短, 对盐非常敏感。【方法】从头设计了木聚糖酶, 将其通过一段无规则卷曲同 ELPs 相连, 合成了编码上述序列的基因, 并构建重组表达载体 pET-22b-SoxB-M2-S-ELP, 转化至大肠杆菌 BLR (DE3) 中诱导表达, 采用可逆相变循环经高速离心纯化木聚糖酶, 并考察纯酶的酶学性质。【结果】成功构建了表达载体并表达, 在 pH = 7.0 时 0.5 mol/L 碳酸钠可使 ELPs 的相变温度降至 22°C。在上述条件下, 对木聚糖酶进行了非色谱纯化, 其纯化倍数为 3.2, 回收率为 21.2%, 纯度为 64.3%。经测定, 未连接 ELPs 的酶、粗酶及纯化酶学性质基本一致, 其最适温度为 60°C, 最适 pH 为 6.0, 最适反应时间为 30 min, 粗酶 70°C 保温 1 h 相对酶活仍有 50%, 为嗜热木聚糖酶, 与预期相符。【结论】ELPs 作为非色谱纯化标签纯化重组木聚糖酶具有操作简单、易于放大、成本较低的优势, 故所构建的重组质粒可望通用于分离多种重组蛋白, 具有较广泛的用途。

**关键词:** 类弹性蛋白多肽, 非色谱纯化, 相变温度, 木聚糖酶, 重组质粒, 从头设计

**中图分类号:** Q814    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0090-06

近年来商品酶的需求量不断增加, 应用亲和色谱法纯化商品酶的成本很高, 纯化所需成本约占总成本的 60% - 70%<sup>[1]</sup>, 且效率低, 难以放大到工业规模<sup>[2]</sup>。类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptides, ELPs) 是一种温敏型蛋白, 在过去 20 年被深入的研究<sup>[3]</sup>, 而国内的研究较少<sup>[4]</sup>。该多肽在低于相变温度 ( $T_c$ ) 的水溶液中高度可溶, 相反, 当温度高于该温度时, 该含水的多肽链结构就聚集成纳米级的颗粒, ELPs 的这种特殊性质, 已广泛应用于蛋白质纯化<sup>[5-11]</sup>。Lim 等人<sup>[2]</sup> 通过缩短 ELPs 的长

度提高目标蛋白 (Trx) 的产量, 用 1.5 mol/L NaCl 纯化, 得纯度为 50% 的 Trx。Baley A. Fong 等人<sup>[8]</sup> 用 ELP-intein 纯化标签, 0.4 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  纯化  $\beta$ -内酰胺酶和绿色荧光蛋白, 得到的纯度分别是 55% 和 25%。有研究者认为, 这种纯化方式将给重组蛋白的分离纯化带来革命性变化<sup>[12]</sup>。

然而, 至今为止 ELPs 为标签用来纯化重组酶的研究较少, 且多数使用高浓度的 NaCl 溶液诱发其相变。本文应用实验室设计的一新型 ELPs (即 ELP [KV<sub>8</sub>F-20]), ELP [KV<sub>8</sub>F-20], 是至今报道的

**基金项目:** 国家自然科学基金 (20806031); 福建省自然科学基金 (2007J0360); 华侨大学基本科研业务费专项基金 (JB-GJ1006); 福建省高校新世纪优秀人才支持计划 (07176C02)

\* 通信作者。Tel: +86-592-6162302; E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

**作者简介:** 付晓平 (1986 -), 女, 山东平度人, 硕士研究生, 研究方向为重组酶纯化。E-mail: 54maozhu@163.com

**收稿日期:** 2011-07-28; **修回日期:** 2011-10-28

最短的纯化标签, 对盐更敏感<sup>[13]</sup>。构建出 ELP [KV<sub>8</sub>F-20]-S 纯化标签, 即在 ELPs 和木聚糖酶<sup>[14]</sup>之间加入一段无特定二级结构的无规则氨基酸序列 (Coil), 防止 ELPs 对酶结构产生影响, 其中引入 *EcoR* I 和 *Bgl* I 标准酶切位点。经密码子优化后, 从头合成其全基因序列, 构建重组质粒。利用 ELPs 作为纯化标签, 可在室温, 低盐离子浓度纯化木聚糖酶。这种纯化条件更温和, 对设备要求低, 可极大降低纯化成本, 省时高效, 现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒与培养基:** 表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BLR (DE3) 与 pUC-19-ELPs 及修饰后的 pET-22b(+), pET-22b(+)-S 修饰目的是去掉原载体中组氨酸标签, 以便加入所构建的 ELPs 标签, 方便后续的非色谱纯化, 其过程为: 用序列 CATATGAGCAAAGGGCCGGCC TGGCCGTGATAAGAATTC 替换原始 pET-22b(+)-S 的 *Nde* I 与 *EcoR* I 酶切位点之间的序列。ELP [KV<sub>8</sub>F-20] 为本实验室保存提供。链霉菌中的木聚糖酶序列在 N 端做 5 个突变 T11Y, N12H, N13D, F15Y, 16F<sup>[14]</sup>, 即为 SoxB-M2。Coil 氨基酸序列为 (A G A G A G P E G)<sub>10</sub>, 该序列无特定二级结构, 文中表示为 S。SoxB-M2 和 Coil 均为全基因合成并测序成功, 基因合成及测序工作委托上海青兰生物科技有限公司完成。

**1.1.2 主要工具酶, 试剂及仪器:** 限制性内切酶 *Pf*IM I、*Bgl* I、*Nde* I、*EcoR* I、*Sfi* I 购自上海捷瑞生物工程有限公司, 蛋白质 Maker 及 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品, 桦木木聚糖酶于 Sigma 公司。

### 1.2 ELPs-S-木聚糖酶的原核表达载体构建

本文所涉及到的分子生物学技术、方法均参考文献 [15]。全基因合成 SoxB-M2-S-ELP, 用 *Nde* I 与 *Hind* III 酶切 SoxB-M2-S-ELP, 连接到 pUC19 上, 此克隆载体命名为 pUC19-SoxB-M2-S-ELP。用 *EcoR* I 与 *Hind* III 酶切 SoxB-M2-S-ELP, 连接到 pUC19 上, 此克隆载体命名为 pUC19-S-ELP。用 *Nde* I 与 *Hind* III 酶切 SoxB-M2-S-ELP, 连接到 pET-22b 上, 此克隆载体命名为 pET-22b(+)-SoxB-M2-S-ELP。ELPs 与木聚糖酶之间连有一段无规卷曲 S, 目的是

防止 ELPs 对木聚糖酶产生影响<sup>[16]</sup>。

### 1.3 ELPs-S-木聚糖酶基因的表达与纯化

含有 pET-22b(+)-SoxB-M2-S-ELP 重组质粒的 BLR 工程菌按 1:100 的接种量接种到含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 TB 培养基中, 37°C、200 r/min 培养至 *OD*<sub>600</sub> 为 0.8 时, 加入 IPTG 诱导 (终浓度为 1 mmol/L), 诱导 5 h, 4°C、 $8 \times 10^3$  r/min 离心 10 min, 收获菌体, 用预冷的 PBS 缓冲液 (pH 为 7.3) 重悬菌体, 之后置冰浴中超声破碎 (超声 2 s, 间隔 2 s, 工作次数 70 次)。

采用 ITC (Inverse transition cycling, 可逆相变循环)<sup>[17]</sup> 纯化, 即分装大肠杆菌破碎液, 4°C、 $12 \times 10^3$  r/min 离心 10 min, 取上清; 向上清液中添加不同浓度的盐,  $12 \times 10^3$  r/min 离心 10 min, 去上清; 向沉淀中加入预冷的 PBS 溶解沉淀, 冰浴 30 min 后, 4°C、 $12 \times 10^3$  r/min 离心 10 min; 收集上清液, 以上过程为一轮 ITC。SoxB-M2-S-ELP 的纯度与分子量通过 SDS-PAGE 验证。

### 1.4 ELPs-S-木聚糖酶相变温度测定

测定 ELP [KV<sub>8</sub>F-20]-木聚糖酶相变温度参考文献 [2], 即: ELPs-S-木聚糖酶的 PBS 溶液在波长为 350 nm 处的浊度, 升温速率为 1°C/min。相变温度为 *OD*<sub>350</sub> 最大值的一半时所对应的温度<sup>[2]</sup>。

### 1.5 ELPs-S-木聚糖酶的纯化及酶学性质测定

取未进行纯化的粗酶液及纯化后的酶液分别用缓冲液稀释一定倍数后考察其最适反应温度、反应时间、热稳定性、最适反应 pH 及酸碱稳定性。酶活测定方法参考文献 [14], 即采用 Biely 的 DNS 显色法测定酶活。以每分钟生成 1.0 μmol 木糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (IU), 比酶活为每毫升酶蛋白所含的活力单位 (IU/mL)。酶活力计算公式:

$$\text{酶活力 (IU/mL)} = W \times D_f \times 1000 / Mr \times t \times V$$

其中 *W*: 酶解反应产生的木糖量, mg; 1000: 将 mmol 转化成 μmol 所乘的系数; *D<sub>f</sub>*: 酶液的稀释度; *Mr*: 木糖的分子量, 150.13 mg/mmol; *V*: 待测酶液量, 0.2 mL; *t*: 反应时间, 30 min。

## 2 结果和分析

### 2.1 质粒 pET-22b(+)-SoxB-M2-S-ELPs 表达载体的构建

目的基因 SoxB-M2-S-ELP 的设计图见图 1, 在

目标酶基因 (SoxB)、无规则卷曲 (S) 及 ELPs 之间都加入了酶切位点, 以方便后续各种分子生物学操作。所设计的木聚糖酶结构如图 2-A 所示, 其 N 端和 C 端都在分子表面, 无规则卷曲及 ELPs 序列连接在该酶的 C 端。如图 2-B 所示, Coil 的序列有 90 个氨基酸, 无特定二级结构, 可有效防止 ELPs 在相变聚集过程中对木聚糖酶结构可能产生的不良影响<sup>[16]</sup>, 该序列经密码子优化后进行全基因合成, 表达载体和宿主菌分别为 pET-22b (+) 和 *E. coli* BLR (DE3)。将重组质粒 pET-22b-SoxB-M2-S-ELP 导入 *E. coli* BLR (DE3) 宿主菌中, 构建工程菌。

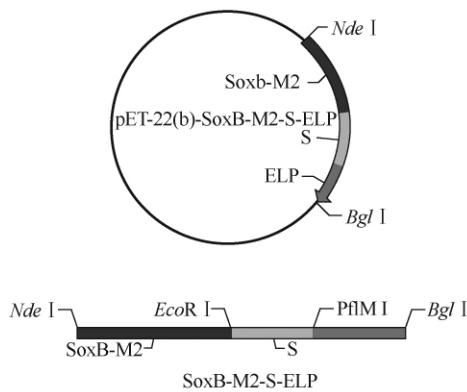


图 1 构建表达载体 pET-22b-SoxB-M2-S-ELP

Fig. 1 Expression plasmid pET-22b-SoxB-M2-S-ELP.

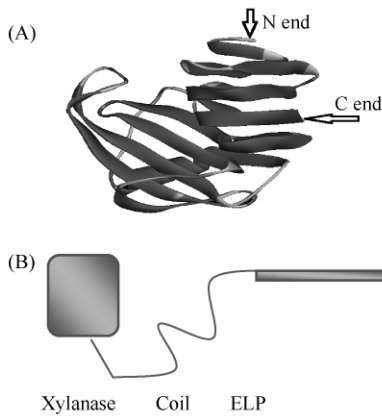


图 2 木聚糖酶的结构 (A) 和构建模型图 (B)

Fig. 2 Structure of xylanase and xylanase-S-ELPs building block. A: The homology model of xylanase. B: ELPs = ELP [KV<sub>8</sub>F-20]; Coil = (AGAGAGPEG)<sub>10</sub>.

### 2.2 ELPs-S-木聚糖酶的非色谱纯化条件的选择

盐离子类型及浓度和溶液的 pH 值是影响 ELPs 发生相变的重要因素, 需要在非色谱纯化过程中着重考察。首先, 考察了盐离子类型及浓度对相变温

度的影响。分别在破壁离心后的粗酶液中加入 1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.8 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.5 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.8 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 测定其相变温度, 结果如图 3 A, 由图可知, 0.5 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可使 ELP 在 22°C 下发生相变, 0.8 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 0.8 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可使 ELP 在 11°C 和 8°C 下发生相变, 低温下即可发生相变。图 3 B 可知影响相变温度顺序为 K<sup>+</sup> < Na<sup>+</sup>, 这种差异与文献<sup>[13]</sup>报道的纯 ELPs 相变顺序一致。这也证明了以 ELP [KV<sub>8</sub>F-20] 作为纯化标签, 使用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液诱发其相变可能效果更好。粗酶液中分别加入等体积 0.8 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mol/L NaCl, 0.8 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 经一轮 ITC 纯化木聚糖酶, 其结果见表 1, 0.8 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 纯化倍数最高, 但回收率偏低; 3 mol/L NaCl 回收率最高, 但纯化倍数相对较低; 而 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 纯化倍数及回收率都相对较好。综合考虑相变温度及纯化倍数和回收率, 可认为选用 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 效果最好, 其操作过程可在室温下进行, 避免对溶液进行加热和冷却。

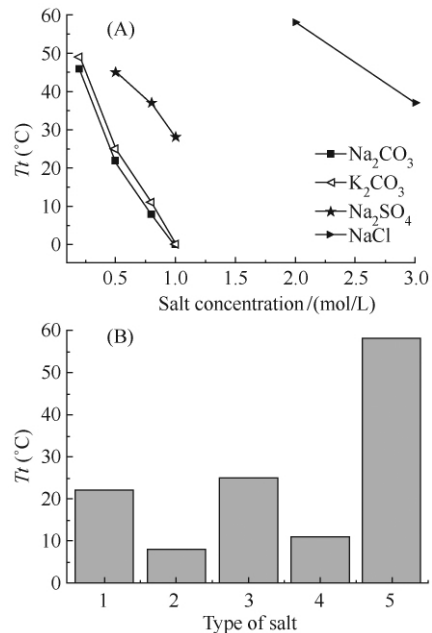


图 3 四种盐离子对相变温度的影响

Fig. 3 Four kinds of salt ions on the phase transition temperature. A: Transition temperature vs salt concentration curves for four sulfates with ELP [KV<sub>8</sub>F-20]. B: Transition temperature histogram of Carbonate ion. 1. with 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2. with 0.8 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 3. with 0.5 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 4. with 0.8 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 5. CK.

表 1 不同盐离子纯化效果比较

Table 1 Comparison of purification with different salt

ITC Purification	EA (U/mL)	PC (mg/mL)	SA (U/mL)	Purification Fold	Recovery Rate/%
Crude Xylanase	54.2	28.98	1.87	1	100
0.8 mol/L K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7.24	0.89	8.17	4.36	13.36
0.8 mol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.76	1.84	5.29	2.83	18.02
3 mol/L NaCl	12.55	3.45	3.64	1.94	23.15
0.5 mol/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11.48	1.94	5.92	3.16	21.19
Xylanase (without ELPs)	80.3	31.74	2.53		

EA: Enzyme activity, PC: Protein concentration, SA: Specific activity.

不同 pH 对相变温度的影响如图 4 所示, 由图可知, 相比盐离子类型及浓度, pH 对相变温度的影响较小。在 pH 5-7 范围, pH 升高,  $T_i$  下降, 而 pH 8 的  $T_i$  反而升高, 猜测可能是受融合的木聚糖酶影响, 这可从木聚糖酶的最适 pH 跟 pH 稳定性推测, 该酶是嗜酸性酶, 在 pH 8 可能带正电降低疏水作用,  $T_i$  升高, 也可能是木聚糖酶变性对其造成影响。有文献报道类弹性蛋白 Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, VPGXG), Xaa 被酸性或碱性氨基酸残基取代后, ELPs 的特性会受到 pH 的影响, 因此可通过调节溶液 pH 来改变 ELPs 的  $T_i$  [18]。本文的 ELPs, Xaa 是碱性氨基酸-赖氨酸残基, 理论上随着 pH 升高, 赖氨酸残基 R 基不带电, 疏水作用增强, 会下降。实验结果如图 4 说明 ELP [KV<sub>8</sub>F-20] 可以在较广的 pH 范围内纯化酶。综上, 选择 0.5 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 在 pH 为 7 的条件下对木聚糖酶进行非色谱纯化。为了进一步考察 ELPs 的纯化效果, 将经一轮纯化出的木聚糖酶稀释一定倍数后进行凝胶电泳分析, 如图 5。最终, 使用 0.8 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、3 mol/L NaCl 纯化目标蛋白的纯度经 BandScan 软件分析, 纯度分别是 63.2%、64.3%、45.2%, 所得纯度以 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 最高。

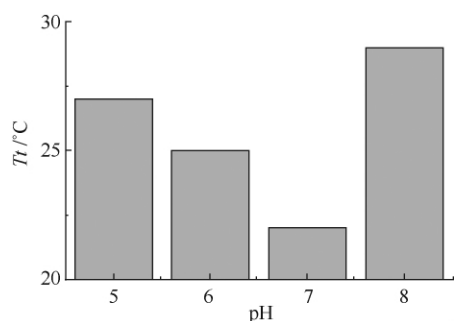


图 4 不同 pH 对相变温度的影响

Fig. 4 The effect of pH (5-8) on the phase transition temperature.

### 2.3 粗酶及纯化酶酶学性质

实验测定的粗酶及纯酶的最适反应温度是 60°C; 50°C - 70°C 温度范围内相对酶活仍可保持 87.6% 以上, 最适反应 pH 6.0; 反应时间 30 min; 酶

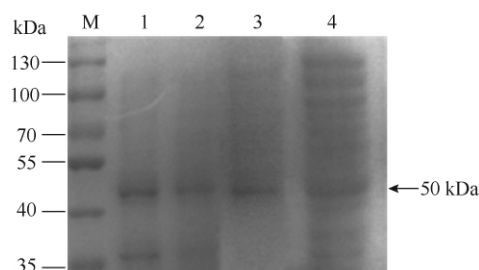


图 5 融合蛋白 ELPs-Xylanase 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE of analysis of ELP-Xylanase fusion protein. M. protein molecular marker; 4. cell-free extract; 3. purified fusion protein of first ITC purification of 3 mol/L NaCl; 2. purified fusion protein of first ITC purification of 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1. purified fusion protein of first ITC purification of 0.8 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

液保温 1 h 后, pH 6 时酶活最高, 50°C 左右的酶活较稳定, 随着温度升高, 纯酶酶活 70°C 急剧下降, 80°C 的粗酶相对酶活为 21%, 见表 2。酶学性质与预期基本一致, 该酶属于嗜热木聚糖酶 [14]。由于反应体系不同, 会略有偏差。由表 2 可知, 连接有 ELPs 的木聚糖酶和未连接 ELPs 的木聚糖酶酶学性质基本一致, 因 ELPs 是重复序列, 在表达过程中一些密码子利用疲劳, 造成表达量下降, 故连接 ELPs 的酶活稍低。但酶稳定性方面, 未连接 ELPs 的稳定性较差, 可能由于 60°C 反应条件下 ELPs 处于相变聚集状态, 将酶包裹因而稳定性较好。因此, ELPs 作为纯化标签经 ITC 纯化后酶学性质基本不变, 说明 ELPs 对酶结构及活性影响较小, 可直接用于后续的催化反应。相关研究 ELPs 去除的方法目前效果较好的有两种, (1) 酶解法, 即在目标蛋白与 ELPs 之间插入含酶切位点的序列, 但酶解法成本高、反应时间长 (>10 h)、且这些酶本身不可避免地混入目标蛋白中, 需在裂解后附加层析分离除去, 使纯化工艺复杂化 [7]。(2) 目标蛋白与 ELPs 间插入具有自剪切活性的 intein, 但用于纯化的 intein 种类较少, 且自发裂解的可控性较弱 [8]。综上所述, ELPs 对酶结构影响很小, 且去除 ELPs 耗时, 成本增加, 故保留 ELPs 应为更好的选择。

表 2 木聚糖酶粗酶及纯酶酶学性质

Table 2 Properties of crude Xylanase and PureXylanase

Type of Xylanase	OT <sup>a</sup> (°C)	Optimum pH	OT <sup>b</sup> (min)	RAL (%)		Relative activity left (%) pH			
				50°C	60°C	6	7	8	9
Crude Xylanase	60	6	30	100	83.11	100	69.08	46.62	5.18
Pure Xylanase	60	6	30	100	76.39	100	54.3	42.2	6.03
Xylanase (without ELPs)	60	6	30	100	64.4	100	56.42	38.21	4.03

OT<sup>a</sup>: Optimum temperature, OT<sup>b</sup>: Optimum time, RAL: Relative activity left

### 3 小结

本文使用迄今为止最短的 ELPs (20 个重复, 9 kDa), 较低的盐离子浓度 (0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 7) 即可使回收率达 21%, 纯度 64%, 且可以在较广的 pH 范围内纯化酶。相比最常使用的高浓度 NaCl 纯化方法, 其所得目标酶的纯度优于多数实验报道结果<sup>[2,8]</sup>。E. coli 中构建的 ELPs-S 纯化标签, 具有如下优势: (1) 含 EcoRI 和 BglII 标准酶切位点, 可构建任一新含重组蛋白基因的表达质粒, 以纯化目标蛋白, 通用性较强; (2) 极短的 ELP [KV<sub>8</sub>F-20] 由于所包含的重复基因片段数较少, 不容易造成密码子使用疲劳而对目标蛋白表达量产生不利影响; (3) 纯化条件更加温和, 可在低盐 (0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)、常温 (22°C) 及中性 (pH = 7) 条件下进行; (4) 较其它 ELPs 纯化标签, coil 的加入可防止 ELPs 对目标蛋白结构产生不利影响; (5) 采用 ITC 纯化蛋白速度快, 方法简单, 无需加热冷却, 只需几次离心步骤, 成本低。鉴于以上优势, 采用 ELPs-S 标签纯化蛋白质, 因其温和的条件更易放大到工业规模。

尽管如此, 本文所得的纯化倍数及回收率仍有不少提升的空间, 除了进一步优化纯化步骤外, 增加 ELPs 的长度可使得 T<sub>i</sub> 降低<sup>[19]</sup>, 同时较长的 ELPs 序列也可望分离分子量更大的目标蛋白。因为当 ELPs 与目标蛋白分子量相差很大时, 仅靠 ELPs 的聚集有时无法将目标蛋白分离出来, 这可以通过进一步构建不同长度的 ELPs-S 纯化标签, 以满足纯化各种分子量的目标蛋白的需要。

### 参考文献

- [1] 李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及其应用. 生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology), 2006, 22 (4): 523-527.
- [2] Lim DW, Trabbic-Carlson K, MacKay JA, Chilkoti A. Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides. Biomacromolecules, 2007, 8 (5): 1417-1424.
- [3] Ghoorchian A, Cole JT, Holland NB. Thermoreversible micelle formation using a three-armed star elastin-like polypeptide. Macromolecules, 2010, 43 (9): 4340-4345.
- [4] 胡凡, 柯涛, 李鑫, 惠丰立, 徐丽, 马向东, 马立新. 类弹性蛋白 ELPs 融合表达在抗菌肽分离纯化中的应用. 分子细胞生物学报 (Journal of Molecular Cell Biology), 2008, 41 (3): 233-237.
- [5] Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. Nature Methods, 2005, 2 (9): 659-662.
- [6] Christensen T, Trabbic-Carlson K, Liu W, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins from E. coli at low expression levels by inverse transition cycling. Analytical Biochemistry, 2007, 360 (1): 166-168.
- [7] Floss DM, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Quendler H, Rademacher T, Stoger E, Scheller J, Fischer R, Conrad U. Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus neutralizing antibody. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7 (9): 899-913.
- [8] Fong BA, Wu WY, Wood DW. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. Protein Expression and Purification, 2009, 66 (2): 198-202.
- [9] Joensuu JJ, Brown KD, Conley AJ, Clavijo A, Menassa R, Brandle JE. Expression and purification of an anti-Foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants. Transgenic Research, 2009, 18 (5): 685-696.
- [10] Kim JY, O'Malley S, Mulchandani A, Chen W. Genetically engineered elastin-protein A fusion as a universal platform for homogeneous, phase-separation immunoassay. Analytical Chemistry, 2005, 77 (8): 2318-2322.
- [11] Lin M, Rose-John S, Grtzinger J, Conrad U, Scheller J. Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: purification via inverse transition cycling. Biochemical Journal, 2006, 398 (3): 577-583.

- [12] Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28 (1) : 37-45.
- [13] 黄凯宗, 李晶晶, 李巍, 葛慧华, 王文研, 张光亚. 类弹性蛋白多肽的从头设计、非色谱纯化及盐效应. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2011, 27 (4) : 653-658.
- [14] Zhang S, Kai Z, Chen XZ, Chu X, Sun F, Dong ZY. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase. *Biochemical and Research Communications*, 2010, 395 (2) : 200-206.
- [15] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- [16] Wheeldon IR, Campbell E, Banta S. A chimeric fusion protein engineered with disparate functionalities—enzymatic activity and self-assembly. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 392 (1) : 129-142.
- [17] Meyer DE, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A. Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin. *Biotechnology Progress*, 2001, 17 (4) : 720-728.
- [18] MacKay JA, Callahan DJ, FitzGerald KN, Chilkoti A. Quantitative model of the phase behavior of recombinant pH-responsive elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, 2010, 11 (11) : 2873-2879.
- [19] Urry D, Trapani T, Prasad K. Phase-structure transitions of the elastin polypeptide-water system within the framework of composition-temperature studies. *Biopolymers*, 1985, 24 (12) : 2345-2356.

## Construction of an expression vector with elastin-like polypeptide tag to purify xylanase

Xiaoping Fu, Wenyan Wang, Guangya Zhang\*

Department of Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

**Abstract:** [Objective] This paper reports the purification of xylanase using the shortest, sensitive ELP [KV<sub>8</sub>F-20]. [Methods] We designed a thermophilic xylanase gene, and recombined it with the ELP *via* a random coil sequence to generate the vector pET-22b-SoxB-M2-S-ELP. The expressed xylanase was purified by inverse transition cycling through high-speed centrifugation, and then we characterized the purified xylanase. [Results] The phase transition temperature of the ELPs dropped to 22°C with 0.5 mol/L sodium carbonate (pH = 7). Under this condition, SoxB-M2-S-ELP was purified by 3.16 folds after centrifugation. The recovery rate was 21.2%, and purity of the xylanase was 64.3%. [Conclusion] Elastin-like polypeptide as a purification tag to purify recombinant proteins is simple, fast, gentle and cheaper. The expression vector we constructed here might be a very useful and reliable tool to purify many other target proteins.

**Keywords:** elastin-like polypeptide, purification tag, inverse temperature transition, xylanase, expression vector, *De novo* design

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (20806031), by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2009J01030), by the Research Foundation for Advanced Talents of Huaqiao University (10BS220) and by the Program for New Century Excellent Talents in Universities of Fujian Province (07176C02)

\* Corresponding author. Tel: +86-592-6162302; E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

Received: 28 July 2011 / Revised: 28 October 2011