

CpTI 蛋白在大肠杆菌中的高效融合表达及其纯化与活性测定

杨丽琛² 常团结¹ 陈宛新¹ 杨晓光² 朱 祯^{1*}

¹(中国科学院遗传研究所植物遗传分子操作开放实验室 北京 100101)

²(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所卫生部微量元素营养重点实验室 北京 100050)

摘 要 豇豆胰蛋白酶抑制剂 (Cowpea Trypsin Inhibitor) 基因 (*CpTI*) 因其抗虫谱广及不易耐受等优点在植物基因工程中得到广泛应用。为进行遗传修饰食品 (Genetically modified foods, GMF) 中所含 *CpTI* 基因表达产物的安全性评价, 我们需要在体外微生物体系中获得大量的 *CpTI* 蛋白。采用 pGEX 融合蛋白表达系统, 将 *CpTI* 与 GST 的编码序列在大肠杆菌 BL21 中进行融合表达, 表达产物达到菌体总蛋白的 40%。经一步 Glutathione Sepharose 4B 亲和纯化, 融合蛋白 GST-*CpTI* 纯度达到 90% 以上。将 Thrombin 蛋白酶与融合蛋白过夜作用, 可获得切掉了 GST 标签的 *CpTI* 蛋白。活性测定显示 GST-*CpTI* 及 *CpTI* 蛋白均具有明显的胰蛋白酶抑制剂活性。用纯化的融合蛋白免疫家兔还可诱导产生高效价的抗体, 经 ELISA 检测抗体滴度 > 1:20000。Western Blotting 实验显示, 无论是菌体超声裂解后总蛋白中的 *CpTI* 蛋白或是经纯化后的 *CpTI* 蛋白均可与自制的抗体发生特异性结合。这为进一步进行 *CpTI* 蛋白的安全性评价工作奠定了良好基础。

关键词 豇豆胰蛋白酶抑制剂, 遗传修饰食品, 安全性评价, 融合表达, 活性测定
中图分类号 Q392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0063-06

豇豆胰蛋白酶抑制剂 (Cowpea Trypsin Inhibitor, *CpTI*) 是一种植源性的抗虫蛋白, 来源于有悠久食用历史的豇豆栽培品种加利福尼亚黑眼豆, 属丝氨酸蛋白酶抑制剂的一种^[1]。而农业害虫主要以丝氨酸蛋白酶进行蛋白质的消化, 若昆虫摄入 *CpTI* 后, 其蛋白消化酶的活性将受到抑制; 同时, 蛋白酶和蛋白酶抑制剂的复合物还可作为一个反馈信号抑制昆虫的进食, 最终使昆虫由于缺乏必需的营养而死亡^[2]。抗虫谱检测表明, *CpTI* 几乎对所有测试的主要农业害虫都有抑制作用, 包括大部分的鳞翅目害虫和部分鞘翅目害虫, 抗虫谱极广。由于它直接作用于昆虫的消化酶, 还具有不易产生耐受性的特点。因此它已成为目前除 B.t 毒蛋白外使用得最为广泛的抗虫蛋白^[3]。

在我国, 水稻是主要的粮食作物, 在国民经济中占有举足轻重的地位。以 1999 年为例, 我国稻谷总产量为 19848 万吨, 占我国粮食产量的 39%^[4]。但同时水稻也是遭受虫害最严重的粮食作物, 其中分

布广泛且为害严重的是: 二化螟、三化螟、大螟等鳞翅目害虫^[5]。因此, 培育具有抗虫能力的水稻新品种是控制水稻害虫的一条重要途径, 且可避免化学杀虫剂对生态环境的破坏。我们实验室已成功地将 *CpTI* 基因转化模式植物烟草, 并获得了高效抗虫转基因植株^[6]。此外, 我们对 *CpTI* 基因进行修饰得到 *SCK* 基因。修饰后的 *CpTI* 基因编码的蛋白除具有 *CpTI* 序列外, 尚含有 SKTI 的信号肽序列, 但进入内质网后即被切除, 形成的 *CpTI* 蛋白与野生型基本相同, 只是改变了在细胞内的定位方式, 从而增加了外源蛋白在受体植物中的积累水平^[7]。在此基础上, 我们以性能优越的籼稻恢复系进行了水稻的转化工作。实验证明转 *SCK* 基因水稻中 *CpTI* 蛋白含量明显提高, 并表现了优良的抗鳞翅目害虫的特性。与转 B.t 毒蛋白基因水稻相比, 转 *SCK* 基因水稻对二化螟具有更强的抗性。上述转 *SCK* 水稻品种已于 1998 年通过中国农业部批准进入环境释放 (批准文号 98B-01-19), 并于 2000 年春季在福建完成了小

收稿日期 2002-08-05, 修回日期 2002-10-27。

基金项目 国家重点基础研究发展计划“973”项目 (No. 2001CB109001 及 2001AA212041), 国家高技术研究发展计划“863”项目 (No. 2001AA212041 及 2001AA212291) 基金资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-64873490; Fax: 86-10-64852890; E-mail: zzh@genetics.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

区试种,同时已有科丰 1 号、科丰 2 号两个杂交组合参加了福建省本年度的中、晚稻区试。结果显示,上述转基因水稻品种田间抗虫效果显著,农艺性状优良,其研究水平已处于国内领先、国际先进水平。这些抗虫水稻品种如能进入商品化生产和推广将对我国水稻乃至整个粮食生产产生重大影响。

按照农业部《农业基因工程安全管理办法》规定,转基因农作物最终实现上市需要经过实验室、中间试验、环境释放和商品化生产四个阶段。目前,我们开发研制的转 SCK 水稻品种已经完成了前两个阶段,环境释放也已经进入了后期结果总结和数据整理阶段。在进行商品化生产之前尚需完成转基因水稻的食品安全性的评估工作。

对于转基因食品的安全性问题一直争议颇多,引起了各国政府、媒体及公众的关注。有关的国际组织和各国对此已陆续出台相关的管理办法、条例和法规。这是因为转基因作物食品是通过基因工程的方法,按照人的意图和目的而设计作物的性状,显然不同于传统的有性杂交方法所产生的作物。另外所操作基因可来源于任何生物,生物种(类)之间的界限完全打破。对出现的新组合和性状在不同遗传背景下的表达,对环境、人类的影响还缺乏足够的认识,有些甚至是一无所知。它们可能导致或衍生的一些社会、道德和伦理等方面的问题甚至会超出过去的想象。因此对其生态学风险和生物安全性的评价显得十分重要和必要^[8]。OECD(经合组织)1993 年提出了食品安全性评价的“实质等同性”(Substantial equivalence)原则^[9]。1995 年 WHO 将这一原则用于现代生物技术产品的植物食品的安全性评价。即生物技术产生的食品及食品成分是否与目前市场上销售的食物具有实质等同性,包括有无毒性,有无致敏性,以及营养成分上是否有改变等^[10]。

在这方面我们已对转 SCK 基因大米及其转化受体进行了营养成分及抗营养因子的比较分析,同时还进行包括大鼠、小鼠及小型猪等动物在内的各种毒理学试验,营养代谢生物利用实验及一些免疫致敏学方面的实验。目前尚未发现该转基因大米营养成分有任何不良的改变或毒性效应。此外,我们还需进一步在蛋白水平上对大米中所引入的目的基因表达蛋白进行直接的安全性评价及等同性分析,这些均需要获得大量的 CpTI 蛋白。但植物作为一种高等生物,其蛋白质的含量丰富、种类繁多、背景复杂,若直接从本源植物中提取含量极低的目的蛋白进行安全性评价实属不易,并会存在同工酶的干

扰。而将目标基因的 cDNA 克隆到体外大肠杆菌表达系统中进行高效表达,再从该系统中纯化出目的蛋白的方法较为简便易行,在技术及机理研究方面均较为成熟。因此本研究中,我们采用 pGEX 融合表达系统,将 CpTI 蛋白与 GST 进行融合表达和亲和纯化,得到了纯化的抗虫蛋白。同时我们还对表达产物的活性、免疫原性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 DH5 α 由本室保存, BL21 由北京大学医学部分子免疫室惠赠。质粒表达载体 pGEX4T-1 及克隆有 CpTI 基因的质粒 pUC Ω CpTI 均由本室保存。

工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司,兔抗 GST-CpTI 的免疫血清由作者自制,羊抗兔 IgG/HRP 购自中山生物工程公司。显色底物 TMB Stabilized Substrate for HRP 购自 Promega 公司。Glutathione Sepharose 4B 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白表达质粒的构建:用 Sma I 酶切 pUC Ω CpTI 载体,回收的 CpTI 片段经 Promega 公司 WizardTM PCR 回收系统回收纯化。同时对 pGEX4T-1 载体用 Sma I 进行单酶切,并经去磷酸化处理。用 T4 DNA Ligase 对两者进行连接,构建重组表达载体 pGEX4T-CpTI。对重组体进行酶切鉴定,并经 pGEX 通用引物测序验证。

1.2.2 GST-CpTI 融合蛋白的诱导表达及可溶性分析:将 pGEX4T-CpTI 重组质粒转化 *E. coli* 菌株 BL21,挑取阳性克隆接种于含 Amp 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,第二天以 2% 接种量接入新鲜的 LB 培养基(Amp)中,继续培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度 0.1mmol/L,37 $^{\circ}$ C 继续培养 3~4h。收集菌体用适当体积的超声裂解液(如 PBS)重悬,冰浴下超声破菌,留出少量样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。离心分离上清和沉淀,各取适量超声后菌体总蛋白、上清及沉淀重悬液与等体积的 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液混合,沸水浴中煮 5min 后上样,进行 SDS-PAGE,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,电泳缓冲液采用 Tris-甘氨酸系统。并与未诱导的空载体及重组体质粒载体进行对照。在此基础上收集不同诱导时间后的菌体进行 SDS-PAGE,观测诱导表达所需的最佳时间。

1.2.3 融合蛋白的纯化及柱上切割:取 1.33mL

75% 的 Glutathione Sephrose 4B 凝胶介质装入 5mL 柱体积的空层析柱中,可得到柱床体积为 1mL 的亲层析柱。用 10mL PBS 洗涤柱子除去凝胶上所带的乙醇保护剂,再用 3mL PBS 对柱子进行预平衡。收集诱导表达后菌体进行超声破菌,加入 10% Triton X-100 至终浓度为 1% 并混匀。离心除去不溶性成分和未裂解的细胞。上清用 0.45 μ m 滤膜过滤,上载于预平衡好的层析柱中,弃流出液。用 5~10mL PBS 洗脱非特异性吸附在柱上的蛋白,直至洗出液在 280nm 波长下检测不再含有蛋白为止。用 5mL 洗脱液(10 mmol/L 还原型谷胱甘肽,50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)洗脱吸附在凝胶上的 GST-CpTI 融合蛋白。融合蛋白产量可用 280nm 波长下的光吸收进行估计, $A_{280} = 0.5 \text{ mg/mL}$ 。

对需切掉 GST 标签的融合蛋白,同上方法过柱,并经 PBS 进行非特异性的洗脱后,加入混合好的切割缓冲液(按 1u thrombin 100 μ g 融合蛋白 in PBS),封口膜封好后放入 22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 摇床上进行轻微的震荡切割,6h 后收集经柱流出的切割缓冲液,其中含已切掉 GST 的 CpTI 蛋白。还可用适当体积的 PBS 洗下滞留在柱上的 CpTI,至流出液经 280nm 波长下检测不再含有蛋白为止。

1.2.4 纯化蛋白的活性测定 :CpTI 抑制活力测定参照 Erlanger 的方法进行^[11],测定融合蛋白及切开的 CpTI 蛋白的胰蛋白酶抑制剂活力。将不同量的样品与 5 μ g 胰蛋白酶(Trypsin)在 50mmol/L Tris-HCl (含 10mmol/L Ca²⁺, pH8.0)中保温 60min,取出 100 μ L 加入 25 $^{\circ}$ C 预平衡的底物缓冲液 0.5mmol/L L-BA_NPA 中反应 30min,加入终体积 5%(V/V)的冰乙酸终止反应。以不含胰蛋白酶的反应管为空白管,不加样品的反应管为标准管,测 OD₄₁₀。胰蛋白酶的剩余活力 = 样品的 OD₄₁₀/标准的 OD₄₁₀。胰蛋白酶抑制剂活力 = 1 - 酶的剩余活力。

1.2.5 纯化蛋白的免疫原性测定 :将融合蛋白 GST-CpTI 溶液用生理盐水配制成浓度约 1mg/mL。取两只新西兰雄性成年大白兔,分 4 次注射,每只家兔每次用量为 300~500 μ g,0、2、4 周各免疫 1 次,第 3 次免疫后 7 天耳静脉采血,进行血清抗体滴度的测定。若达到要求在第 10 天从耳静脉进行加强免疫,6 周时取全血,分离血清,分装成小份 -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.6 融合蛋白抗血清的鉴定 :

ELISA 检测抗血清滴度:用纯化的融合蛋白抗原以 200ng 包被酶标板,以未免疫前的抗血清为阴

性对照,分别检测两只家兔抗血清的效价,方法参考文献[12]。

Western Blotting 检测 :样品经 SDS-PAGE 电泳后用 Bio-Rad 公司的电转仪将蛋白转至硝酸纤维素膜上。一抗为作者用 GST-CpTI 蛋白制备的兔 IgG;二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG。具体的实验操作参考分子克隆^[13]。

2 结果

2.1 重组克隆的构建与鉴定

重组表达载体 pGEX4T-CpTI 的构建过程见图 1。重组质粒经 EcoRV (3300bp, 1900bp) λ Sma I (290bp, 4970bp) λ NcoRI (5259bp) λ NcoRI /Pst I (1258bp 4000bp) 酶切均获得了与预期大小相符的片断,测序结果进一步表明,插入的 CpTI 基因序列完全正确,插入位点和中间连接区也与设计相符,保证了 GST 与 CpTI 的一致读框,并带有正确的 Thrombin 切割识别序列(Leu Val Pro Arg \downarrow Gly Ser)。

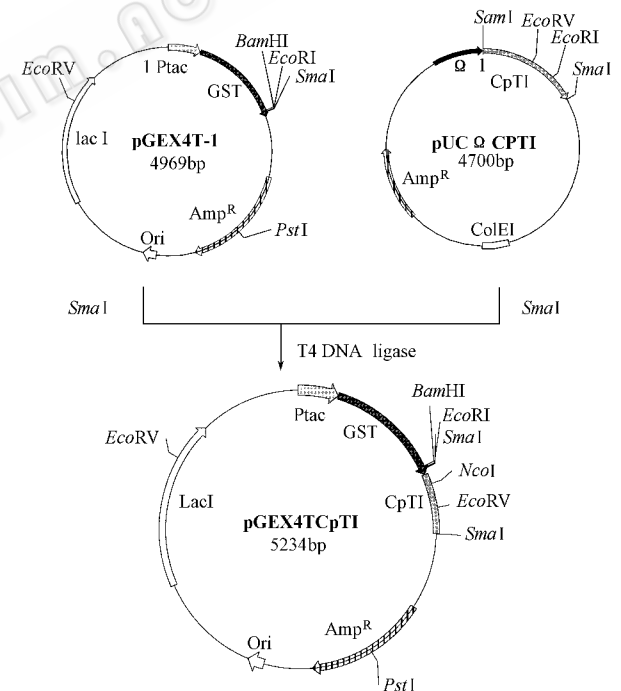


图 1 重组质粒 pGEX4T-CpTI 的构建过程

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pGEX4T-CpTI

2.2 GST-CpTI 在 E. coli BL21 中的表达

将 pGEX4T-CpTI 重组体经 IPTG 诱导后,收集菌体进行 SDS-PAGE,结果与未诱导的阴性对照相比有明显的融合蛋白表达带,分子量约为 37kD,与理论值相符,经薄层层析扫描显示表达蛋白约占菌体蛋白的 40%。表达后的菌体经超声破碎后,分别取上

清和沉淀电泳,结果表明融合蛋白主要以可溶的形式存在于上清中(见图2泳道5),且表达量在诱导3h后达到峰值(见图3泳道3)。

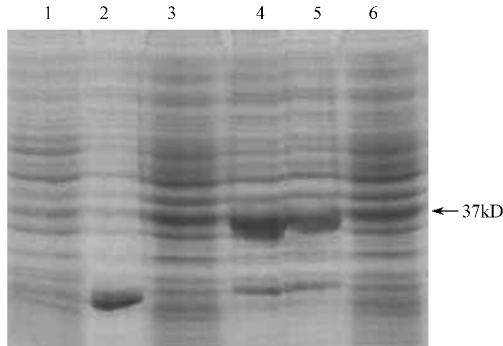


图2 重组蛋白的可溶性分析(箭头所示为表达带)

Fig.2 Solubility analysis of GST-CpTI fusion protein

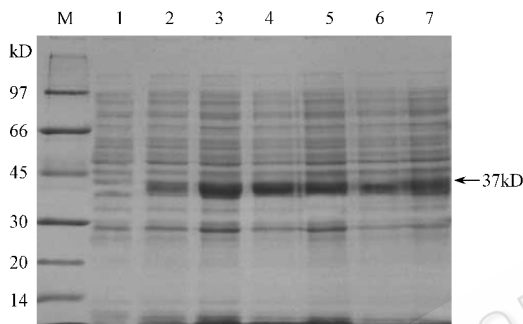


图3 GST-CpTI融合蛋白在 *E. coli* BL21 中不同诱导时间的表达检测(箭头所示为表达带)

Fig.3 Expression of GST-CpTI fusion protein in *E. coli* BL21 at different times after induction

2.3 融合蛋白的亲纯化及柱上切割

由于融合蛋白的N端融合有GST蛋白,它是载体pGEX4T-1上所携带的。GST蛋白的存在可使融合蛋白方便地利用亲和层析进行纯化。纯化获得的融合蛋白GST-CpTI经SDS-PAGE检查,只有一条约37kD的蛋白带,经薄层层析扫描纯度可达95%以上(见图4的1~3泳道)。融合蛋白经Thrombin Protease进行6h的柱上酶切后,收集酶切液进行SDS-PAGE,可见在约10kD大小处有单一特异的CpTI蛋白条带(见图4的4~5泳道)。

2.4 纯化蛋白的胰蛋白酶活性测定

经与标准品胰蛋白酶Trypsin反应,融合蛋白及切开的CpTI蛋白均具有明显的胰蛋白酶抑制剂活性。其抑制活力随着融合蛋白含量的增加而递增,基本成一种线性关系(见图5)。表明用菌体上清纯化出的重组蛋白很好地保留了CpTI蛋白的生物学活性。

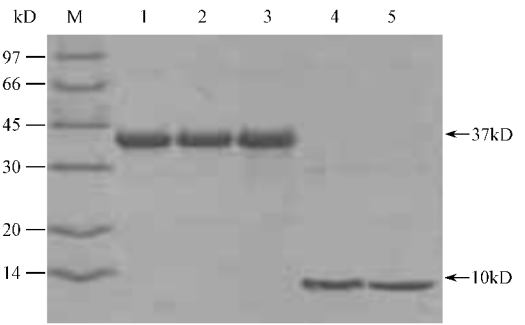


图4 纯化蛋白的SDA-PAGE

Fig.4 GST-CpTI purified by Glutathione Sepharose 4B

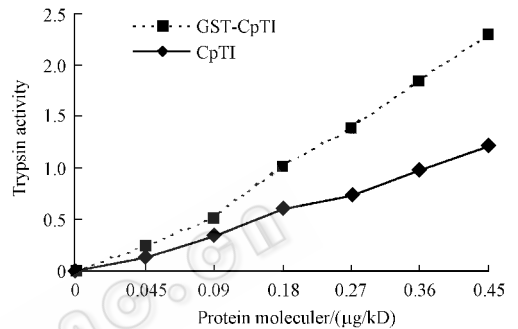


图5 CpTI胰蛋白酶抑制剂活性测定

Fig.5 CpTI trypsin inhibition activity

2.5 融合蛋白免疫原性的ELISA检测结果

用纯化的GST-CpTI免疫家兔,经3次免疫后取少量血清用ELISA进行抗体滴度的测定。以免疫前的家兔血清为阴性对照,将待测血清及对照均进行倍比稀释,加入包被有抗原的酶标板中,并与羊抗兔IgG反应,显色后测定其450 nm处的光吸收值。以 OD_{450} 大于相应稀释度的阴性对照 OD 值两倍以上者为阳性。测定结果两只家兔的抗血清效价均达到1:20000。

2.6 纯化蛋白的Western Blotting检测

将诱导表达前、后的重组体菌体总蛋白及纯化出的融合蛋白GST-CpTI,切割后的CpTI蛋白经SDS-PAGE后(见图6-A),电转至硝酸纤维素膜上,用兔抗融合蛋白的多抗进行Western blotting杂交分析(见图6-B)。结果显示兔抗血清与菌体中及过柱纯化出的融合蛋白在约37kD处形成了特异的抗原-抗体反应条带,而与切开后的CpTI蛋白亦有特异结合(约10kD处),证实了抗血清的特异性。

3 讨论

为进行转SCK基因水稻中CpTI蛋白的安全性评价,我们首先需要在体外建立合适的大肠杆菌表达系统,以获得足量的抗虫CpTI蛋白。在我们的实

验中,采用的是刘春明^[14]从豇豆的 cDNA 中扩增出的片段,它含有由 80 多个氨基酸编码的 CpTI 成熟

蛋白,并在 5'端有一段 27 个氨基酸的引导肽序列,但不包含 CpTI cDNA 的 5'及 3'非编码区。

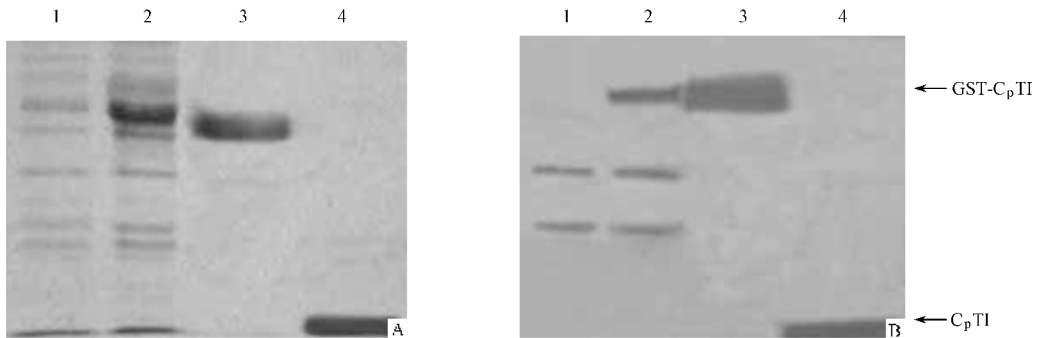


图 6 GST-CpTI Western Blotting 分析(箭头所示为表达带)

Fig.6 Western Blotting analysis of GST-CpTI

A. SDS-PAGE ; B. Western blotting

在实验室早期的工作中,曾分别构建了 CpTI 的 3 个大肠杆菌表达载体 pBVCpTI2213, pBVCpTI2201 和 pET-CpTI,其中前两者中 CpTI 基因处于 P_RP_L 启动子及 *cI ts857* 热诱导表达系统的调控之下。在 pET-CpTI 中, CpTI 受控于 T7 RNA 聚合酶调控的 T7 噬菌体 ϕ 10 启动子, IPTG 诱导宿主 T7 RNA 聚合酶的表达,进而启动 P ϕ 10 控制下的 CpTI 的转录。但 3 个表达菌诱导后进行 SDS-PAGE 均检测不到表达产物,并且诱导表达对宿主细胞有致死作用^[15]。推测可能是由于 CpTI 在大肠杆菌中的表达强烈干扰了宿主细胞的正常生理功能,从而造成了细胞死亡。

因此在本实验中我们考虑进行融合表达,一方面融合蛋白本身并不影响 CpTI 的活性,又减少了对细胞的毒副作用;另一方面由于天然的 CpTI 蛋白仅有 80 多个氨基酸,分子量太小,相应的免疫原性较低。进行融合后蛋白的分子量加大,解决了 CpTI 本身分子量太小,免疫动物制备抗体时免疫原性较小的弊端。

pGEX 表达系统^[16]是目前广泛使用的一种融合蛋白体系,可用于表达和纯化用作免疫原和生化、生物制剂的多肽,或用于构建 cDNA 表达文库。每个 pGEX 载体都有一个编码谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的开放阅读框,其后是单一的限制性内切酶位点,然后是相应于该阅读框的终止密码子。它带有的 GST 部分本身的免疫原性不强,但却可利用它与 Glutathione Sepharose 4B 的特异结合进行亲和纯化。每个载体中的克隆位点都可相应于各自不同的读码框架。因此我们首先需要选择恰好能使外源多肽及 GST 得以符合读框表达的载体。据此原理我们选择了 pGEX4T-1 载体,它上面还带有位点特异性的

Thrombin 凝血酶的切割识别序列,可在必要时用于去掉融合的 GST 标签。

在转基因食品(GMF)中除了要对目的基因表达蛋白进行安全性评价外,为保护消费者利益,便于消费者选择,还必须发展相应的检测手段,对 GMF 中的外源蛋白进行定性及定量标识^[8]。且有证据表明,外源抗虫基因在植物中的表达水平与抗虫性呈正相关性,例如在转 CpTI 基因的烟草中,随着 CpTI 表达量的增加,相应的抗虫能力也提高^[11]。目前,修饰后的 CpTI 基因 SCK 已转入棉花、玉米和叶菜类蔬菜等多种粮食和经济作物中,以提高这些作物的抗虫性。因此本实验制备的具有良好生物学活性及免疫原性的 CpTI 纯蛋白为今后进一步制备高特异性的单克隆抗体,用于获取 GMF 中的 CpTI 蛋白进行实质等同性分析,或用于进行 CpTI 蛋白及其修饰蛋白在 GMF 中的定性、定量检测等打下了良好的基础。尤其是可推广利用 ELISA 方法,简便、灵敏、特异的对大批量转基因植株中目的蛋白的稳定表达状况及表达水平进行测定。这些均是转基因作物安全性评价不可或缺的环节。目前有关的工作正在进行中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hilder V A, Barker R F, Samour R A *et al.* Protein and cDNA sequences of Bowman-Birk protein inhibitor from the cowpea. *Plant Mol Biol*, 1989, **13**: 701 - 710
- [2] Ryan C V. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defense against herbivores. *Bioassay*, 1989, **10**: 20 - 24
- [3] Hilder V A, Angharad M R G, Donald B. Genetic engineering of

- neering of Crop Plants. Ed by G. W. Lyceft & D. Grierson (1990). Burreworths. London, 51 - 66
- [4] Chinese bureau of statistics.《Chinese Statistics Abstract -2000》, Chinese statistics publishing company 2000 ,pp.98
- [5] Chinese Paddy , edited by XIONG Z M(熊振民) ,CAI H F(蔡洪法) . Chinese agrotechnical publishing company , 1992 , pp.20 - 26
- [6] LIU C M(刘春明) ,ZHU Z(朱桢) ,ZHOU Z I(周兆澜) *et al.* The obtaining of transgenic tobacco with Cowpea Trypsin Inhibitor gene. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* ,1992 ,18 :1694 - 1697
- [7] ZHU Z(朱桢) . The orientation of target proteins in plant cells. *Plants Physiological Communication(植物生理学通讯)* ,1995 ,31 (1) :65 - 70
- [8] JIA S R(贾士荣) .The environmental and food safety of genetically modified plant. *Progress of Biology Engineering(生物工程进展)* , 1997 ,17(6) 37 - 42
- [9] OECD ,Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology : Concepts and principles. OECD , Paris , 1993
- [10] WHO. Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology , Report of a WHO workshop. World Health organization , Geneva , WHO/FUN/FOS/ 95.1 ,1995
- [11] Erlanger B F , Kokowsky N , Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 1961 ,95 271 - 278
- [12] Van Regenmortel MH. Which value of antigenic valency should be used in antibody avidity calculations with multivalent antigens ? *Mol Immunol* 1988 ,25(6) :565 - 567
- [13] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory Manual 2nd , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , pp.888 - 897
- [14] LIU C M(刘春明) ,ZHU Z(朱桢) ,ZHOU Z I(周兆澜) . Cloning and expression of Cowpea Trypsin Inhibitor cDNA in *E. coli* . *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)* ,1993 ,9 :152 - 157
- [15] CHEN R(陈荣) . Studies on expression of proteinase inhibitor genes in *E. coli* (Master thesis) . Institute of Genetics , Chinese Academy of Science ,1995
- [16] Donald B S , Kevin S J. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* , 1988 ,67 31 - 40

Fusion Expression , Purification and Bioactivity Assay of CpTI in *Escherichia coli*

YANG Li-Chen² CHANG Tuan-Jie¹ CHEN Wan-Xin¹ YANG Xiao-Guang² ZHU Zhen¹

¹(Plant Genetic Manipulation Laboratory , Institute of Genetics , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

²(Key Laboratory of Trace Element Nutrition of the Ministry of Health China , Institute of Nutrition and Food Safety , Chinese Center for Diseases Control and Prevention , Beijing 100050 , China)

Abstract CpTI(Cowpea Trypsin Inhibitor) is a widely used insect resistance gene in the plant genetic engineering for its high insecticidal activity and the minimal ability of the insects to evolve resistance to it. To facilitate the safety assessment of genetically modified foods (GMFs) with CpTI protein , we need to produce gram quantities of this protein in microbes. With the pGEX fusion expression system , we expressed the GST-CpTI protein in *E. coli* BL21 , which accounted for approximately 40% of germ proteins. By Glutathione Sephrose 4B affinity chromatography , GST-CpTI was obtained with the purity up to 90% . Overnight incubate the fusion proteins with Thrombin protease , we got the CpTI proteins cleavage of GST tag. Both of the GST-CpTI and CpTI proteins showed notable trypsin inhibitor activity. Immunization of rabbits with purified fusion protein generated high titer antibodies (> 20000) , measuring by ELISA. Western Blotting also showed specific Ag-Ab binding band between the antiserum and the CpTI proteins no matter in the whole supersonic germ proteins or purified from the column. All these made a good ground for the further safety assessment of CpTI protein.

Key words CpTI , GMFs , safety evaluation , fusion expression , trypsin inhibitor activity

Received : 08-05-2002

This work was supported by Grant from " 863 " National High Technology Research & Development Program of China(No. 2001AA212041 and 2001AA212291) and " 973 " Major State Basic Research Development Program of China(No. 2001CB109001 and 2001AA212041) .

* Corresponding author. Tel : 86-10-64873490 ; Fax : 86-10-64852890 ; E-mail : zzhu@genetics.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>