

# 人 EGF 受体 L2 结构域在大肠杆菌中表达、包涵体柱上复性及纯化 On-column Refolding and Purification of Human EGF Receptor L2 Domain Inclusion Body Overexpressed in *Escherichia coli*

徐丽慧<sup>1 2 3 4</sup> 洪 岸<sup>2 3 4</sup> 何贤辉<sup>1\*</sup>

XU Li-Hui<sup>1 2 3 4</sup> , HONG An<sup>2 3 4</sup> and HE Xian-Hui<sup>1\*</sup>

1. 暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室, 广州 510632

2. 暨南大学生物工程研究所, 广州 510632

3. 广东省生物工程药物重点实验室, 广州 510632

4. 教育部基因组药物工程研究中心, 广州 510632

1. Key Laboratory of Ministry of Education for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. Key Laboratory of Guangdong Province for Bioengineering Pharmaceuticals, Guangzhou 510632, China

4. Research Center of Ministry of Education for Genomic Pharmaceutical Bioengineering, Guangzhou 510632, China

**摘 要** 以 PCR 方法从克隆的 EGFR 胞外区 cDNA 中扩增编码 EGFR-L2 结构域的 DNA 片段, 在其 3' 端加入编码 His<sub>6</sub> 标签的序列, 与 pET-3c 连接构建 EGFR-L2 原核表达载体。该蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得高效表达, 免疫印迹分析表明表达产物全部以包涵体形式存在, 分步透析法和稀释法都不能获得可溶性复性产物, 而 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱上复性法不仅能够获得可溶性的 EGFR-L2 蛋白, 而且产物同时得到高度纯化, 纯度 > 95%。复性的 EGFR-L2 与其配基 EGF 具有特异性的结合活性, 但亲和力较低。这表明 His<sub>6</sub> 标签不但便于纯化目标蛋白, 而且可利用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱进行柱上复性, 适用于不易通过常规方法复性的重组蛋白的制备。

**关键词** 表皮生长因子受体, L2 结构域, 原核表达, 包涵体, 重折叠

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0597-07

**Abstract** The human epidermal growth factor receptor (EGFR) extracellular region (residues 1-621) consists of four subdomains, i. e. L1, S1, L2, and S2. The L2 domain (EGFR-L2) is composed of residues 311-479 and plays a major role in ligand-binding. Due to the high content of cysteine residues (42 cysteines) in the S1 and S2 domains, it is quite difficult to get a correctly refolded product of the complete EGFR extracellular domain. In contrast, only 4 cysteine residues are present in EGFR-L2 domain. The aim of the present study is to prepare a soluble EGFR-L2 domain from the recombinant protein inclusion body overexpressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). DNA fragment encoding EGFR-L2 containing a polyhistidine-tag at the carboxyl terminus was amplified by PCR from the cDNA of EGFR extracellular region, and was inserted into pET-3c to construct

Received: January 31, 2005; Accepted: April 20, 2005.

This work was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 30230350 and No. 30371651), National Special Grant of China (No. 2002AA2Z3344) and Special Grant of Guangdong Province (No. 2001A1090208).

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-20-85220679; E-mail hhexianhui\_jnu@126.com

国家自然科学基金重点 (No. 30230350 和 No. 30371651) 国家“十五”重大专项基金 (No. 2002AA2Z3344) 和广东省“十五”重大专项基金 (No. 2001A1090208) 资助项目。

the prokaryotic expression vector. The target protein was highly expressed in *E. coli* BL21( DE3 ) strain and was only present in the inclusion body as revealed by immunoblotting analysis. No soluble product could be refolded through dilution or stepwise dialysis strategies. However, on-column refolding of denatured EGFR-L2 bound to  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA produced a soluble one. Furthermore, the soluble EGFR-L2 was simultaneously purified to high purity ( >95% ) through eluting from the same  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA column with a linear imidazole gradient. The refolded EGFR-L2 had specific binding activity with the cognate ligand EGF, although its affinity was low. These results suggest that a polyhistidine-tag fused with a recombinant protein facilitate not only the purification but also the renaturation of the target product through on-column refolding. Besides, this refolding strategy may be suitable for the preparation of those recombinant proteins which are hard to refold through conventional approaches.

**Key words** epidermal growth factor receptor, L2 domain, prokaryotic expression, inclusion body, refolding

表皮生长因子( epidermal growth factor, EGF)受体( EGF receptor, EGFR)是跨膜受体酪氨酸激酶,介导 EGF 等生长因子的生物效应<sup>[1]</sup>,其功能失调与几乎所有癌细胞关键特征诸如自发性生长、侵蚀性、促血管生成和远距离转移等的出现有关<sup>[2]</sup>,约三分之一的人类肿瘤细胞中可检测到 EGFR 的过表达,这与患者对放化疗的敏感性及预后直接相关<sup>[3]</sup>。能够阻断 EGFR 功能的单抗的临床试验结果显示,无论单用或与化放疗联用,均表现出抗肿瘤疗效<sup>[4,5]</sup>。可见,EGFR 是一个有效的抗肿瘤治疗的重要靶点<sup>[2,3]</sup>。

人类 EGFR 由氨基端的胞外区( 621 个氨基酸残基)、单跨膜区( 23 个残基)和胞浆区( 542 个残基)等三部分组成,该受体的前体还包含 24 个残基的信号肽<sup>[6,7]</sup>。其胞外区可再分为 4 个亚结构域,从氨基端始依次为 L1、S1、L2 和 S2 结构域,其中 L 和 S 分别表示大和小结构域。L1 和 L2 为同源结构域,两者均为 EGF 等配基的结合部位<sup>[6-9]</sup>。EGFR 胞外区与其配基结合后,引发受体二聚化<sup>[1,7]</sup>,最终激活其胞浆区内酪氨酸激酶而诱发信号转导级联反应<sup>[1]</sup>。由于 EGFR 胞外区存在二个富含 Cys 残基的 S1 和 S2 结构域<sup>[6,7]</sup>,在大肠杆菌中很难获得正确折叠的可溶性产物。因此,我们构建了仅含 4 个 Cys 残基的 L2 结构域( EGFR-L2)的原核表达载体,在大肠杆菌中获得高效表达,并通过柱上复性获得了具有配基结合活性的可溶性 EGFR-L2 蛋白,为进一步研究其抗原性和制备特异性抗体等工作打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21( DE3)菌株和质粒 pET-3c 购自 Novagen;限制酶 *Nde* I 和 *Bam*H I、T4DNA 连接酶、高保真 DeepVent DNA Taq 聚合酶均为美国 New England Biolabs 产品;QIAquick Gel Extraction Kit

与 QIAprep Spin Miniprep Kit 为德国 QIAGEN 公司产品; $\text{Ni}^{2+}$ -NTA、预染蛋白分子量标准、小鼠抗 His<sub>6</sub> 单抗( C-term)购自 Invitrogen; NHS-Sepharose 4B 为 Pharmacia 产品;辣根过氧化物酶( HRP)标记兔抗小鼠 IgG 为北京中山产品;IPTG、咪唑、4-氯-1-萘酚、盐酸胍、尿素等均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 EGFR-L2 原核表达载体的构建** 前文<sup>[10]</sup>报道从人胎盘克隆编码 EGFR 胞外区的 cDNA ( GenBank 登录号为 AY698023 ),以此基因为模板,设计引物扩增编码 L2 结构域( 311-479 的 DNA 片段( 1002-1509 )。由于 1161 位存在 *Bam*H I 酶切位点,需要设计重叠引物将其突变( 编码的氨基酸不变 ),共设计 4 条引物, F1 :5'-A TAT CAT ATG AAA GTG TGT AAC GGA ATA GGT-3', R1 :5'-CAG TTC CTG TGG GTC CAG AGG AGG AGT-3', F2 :5'-CCT CCT CTG GAC CCA CAG GAA CTG GAT-3', R2 :5'-A ATA GGA TCC TTA ATG ATG ATG ATG ATG GCC TGT GGC CTT GCA GCT GTT-3' ( 引物由上海博亚 Bioasia 合成 ),其中 F1 引物含 *Nde* I 位点, R2 引物含 *Bam*H I 位点以及编码 His<sub>6</sub> 标签的序列。PCR 反应在 50  $\mu$ L 总体积中进行,以克隆的 EGFR 胞外区 cDNA 为模板,反应条件为在 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min 后开始循环,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 25 个循环后,于 37 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第一轮 2 个 PCR 反应,所用引物分别为 F1 + R1 和 F2 + R2, 然后以获得的 2 个 PCR 产物为模板,以 F1 + R2 为引物扩增编码 EGFR-L2 的全长序列,获得的 PCR 产物以 *Nde* I + *Bam*H I 双酶切并以 QIAquick Gel Extraction Kit 从凝胶中回收,与同样双酶切的 pET-3c 连接后,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,以碱裂解法从转化子中提取质粒,双酶切法筛选接入正确外源基因的转化子, QIAprep Spin Miniprep Kit 少量制备质粒,外源基因 EGFR-L2 的序列由上海博亚公司测

定。

**1.2.2 EGFR-L2 在 *E. coli* 中的表达及包涵体纯化:** 测序验证的 pET/EGFR-L2 质粒转化感受态 BL21(DE3) 细菌, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基, 37°C 振荡培养过夜, 然后以 1:100 接种于含 50 mg/L 氨苄青霉素和 30 mg/L 氯霉素的 LB 中, 37°C 振荡培养至  $A_{600\text{nm}} \approx 0.6 \sim 0.8$  时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 于 37°C 诱导 4 h, 离心收集菌体, 以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 1 mmol/L EDTA, 50 mg/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 及 10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇) 重悬, 在冰浴中以超声波破碎菌体, 离心后分别收集上清和沉淀, 其中沉淀部分(即包涵体)以 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇及 0.5% Triton X-100) 重悬并经超声处理洗涤 3 次, 然后再以不含 Triton X-100 的同一缓冲液洗涤 3 次, 获得初步纯化的包涵体 EGFR-L2, 以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析外源蛋白的表达。

**1.2.3 SDS-PAGE:** 参照 Laemmli 的方法进行, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%, 以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

**1.2.4 免疫印迹分析:** 样品以 15% SDS-PAGE 进行电泳, 然后以 15V 电压转移 16 h, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 膜以封闭液(Tris-buffered-saline, pH 7.5, 含 3% 小牛血清和 0.05% Tween 20)于 37°C 振荡封闭 30 min 后, 加入以封闭液稀释(1:2000)的小鼠抗 His<sub>6</sub> 抗体, 于 37°C 温育 2 h, 洗膜后加稀释(1:2000)的 HRP-山羊抗小鼠 IgG 于 37°C 温育 1 h, 洗去二抗后以 4-氯-1-萘酚底物溶液显色。

**1.2.5 EGFR-L2 的稀释法和分步透析法复性:** 初步纯化的包涵体 EGFR-L2 以 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0, 含 8 mol/L 脲和 1 mmol/L DTT) 溶解, 离心除去不溶物, 然后按前文[11]方法进行稀释复性, 稀释后蛋白终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 复性缓冲液为 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 400 mmol/L 精氨酸、5 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽、0.1 mmol/L PMSF), 复性产物经超滤浓缩后以 SDS-PAGE 分析。分步透析法复性按文献[12]方法进行, 蛋白终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 分步复性透析缓冲液中的盐酸胍浓度从 6 mol/L  $\rightarrow$  3 mol/L  $\rightarrow$  2 mol/L  $\rightarrow$  1 mol/L  $\rightarrow$  0.5 mol/L  $\rightarrow$  0 mol/L 依次降低。

**1.2.6 EGFR-L2 的柱上复性和纯化:** 初步纯化的包涵体 EGFR-L2 以 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 6 mol/L 盐酸胍、15 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇及 5 mmol/L 咪

唑) 溶解, 离心除去不溶物后, 样品上经同一缓冲液平衡的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱(柱床体积为 1 mL), 洗涤 5 个柱床体积, 然后以 5 个柱床体积的 8 mol/L 尿素缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 8 mol/L 尿素、500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑、0.1 mmol/L PMSF) 洗涤, 然后按线性梯度降低尿素浓度至 0(流速 0.5 mL/min, 总体积 30 mL) 使 EGFR-L2 在柱上复性, 最后以 20 ~ 500 mmol/L 的咪唑线性梯度洗脱已复性的 EGFR-L2 蛋白。分部收集洗脱峰, SDS-PAGE 分析复性产物。

**1.2.7 结合活性分析:** 以 ELISA 法检测结合活性, 简述如下: 以 100  $\mu\text{L}$  浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGF(溶于 PBS) 包被孔板, 经 200  $\mu\text{L}$  封闭液于 37°C 封闭 30 min, 加入 50  $\mu\text{L}$  不同浓度的 EGFR-L2(3 个复孔)于室温温育 3 h 后再于 4°C 放置过夜(18 h), 洗涤液洗 3 次后以 100  $\mu\text{L}$  小鼠抗 His<sub>6</sub> 抗体(1:2000)于室温温育 2 h, 然后加 100  $\mu\text{L}$  HRP-山羊抗小鼠 IgG(1:4000)于室温温育 2 h, 最后加 100  $\mu\text{L}$  邻苯二胺显色, 测 490nm 光吸收。EGFR-L2 与 EGF 的特异结合活性, 以包被 EGF 孔的  $A_{490\text{nm}}$  减去包被 PBS 对照孔的  $A_{490\text{nm}}$  的值表示。

## 2 结果

### 2.1 EGFR-L2 原核表达载体的构建及其鉴定

EGFR-L2 结构域的氨基酸残基序列为 311 ~ 479<sup>[6]</sup> 相应的 DNA 序列为 1002 ~ 1509 (AY698023), 由于 1161 位存在 BamH I 酶切位点, 因此必须将其突变后才能接入 pET-3c 中。在第一轮 PCR 反应中, 以克隆的 EGFR 胞外区 cDNA 为模板, 通过重叠引物突变该 BamH I 位点, 扩增出二条与预计大小(分别

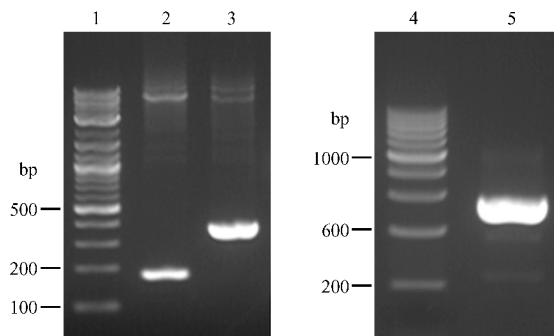


图1 PCR 扩增的 EGFR-L2 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳分析  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis analyses of PCR amplified DNA fragment encoding EGFR-L2

1:100 bp DNA ladder; 2,3:1<sup>st</sup> round PCR products; 4:200 bp DNA

为 184 bp 和 388 bp)相符的 DNA 片段(图 1, lanes 2, 3)。以此二片段为模板进行第二轮 PCR 反应,获得预计大小(548 bp)的片段(图 1, lane 5),该片段经酶切后,与 pET-3c 连接,转化 DH5 $\alpha$ ,筛选接入正确大小外源片段的阳性克隆(图 2, lane 3),经测序验证插入序列为正确编码 EGFR-L2 的基因,含起始密码 ATG 3'端含编码 His<sub>6</sub> 的序列。获得的表达载体称 pET/EGFR-L2。

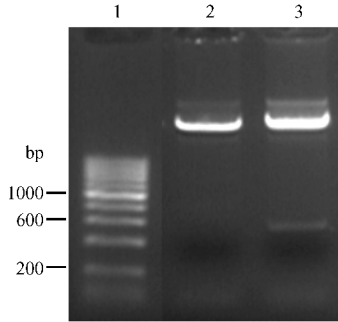


图 2 EGFR-L2 原核表达载体的双酶切鉴定

Fig. 2 Double restriction enzyme digestion of the prokaryotic expression vector for EGFR-L2

1 : 200 bp DNA ladder ; 2 : pET-3c/Nde I + BamH I ;  
3 : pET/EGFR-L2/Nde I + BamH I .

## 2.2 EGFR-L2 在 *E. coli* 中表达分析

以 pET/EGFR-L2 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株,得到含重组质粒的基因工程菌。SDS-PAGE 分析表明,该工程菌在 37°C 经 IPTG 诱导 4 h 后,分子质量为 19.6 kD 的外源蛋白约占菌体总蛋白的 15% (图 3A, lane 3),该外源蛋白分子量与 EGFR-L2 的理论分子量一致。菌体破碎后分为上清和沉淀,重组蛋白以包涵体形式存在于沉淀部分(图 3A, lane 5),上清中无明显的重组蛋白(图 3A, lane 4),免疫印迹分析证实 19.6 kD 的外源蛋白为带有 His<sub>6</sub> 标签的目标蛋白 EGFR-L2,并且该蛋白完全存在于包涵体中,上清中检测不到该蛋白(图 3B, lane 4),包涵体经洗涤后获得初步纯化的 EGFR-L2 蛋白(图 4, lane 1)。

## 2.3 稀释法和分步透析法复性 EGFR-L2

由于表达的 EGFR-L2 全部存在于包涵体中,因此只有通过复性才能获得可溶性的 EGFR-L2 蛋白。利用稀释法在含有 0.4 mol/L 精氨酸和谷胱甘肽氧化还原系统中对表达的 EGFR-L2 蛋白进行重折叠,在复性后的超滤浓缩过程中,绝大部分重组蛋白都发生沉淀,最后浓缩的上清液仅留下微量的可溶性产物(图 4, lane 2),说明稀释法不适合 EGFR-L2 的复性。另外,利用盐酸胍浓度逐步降低的分步透析

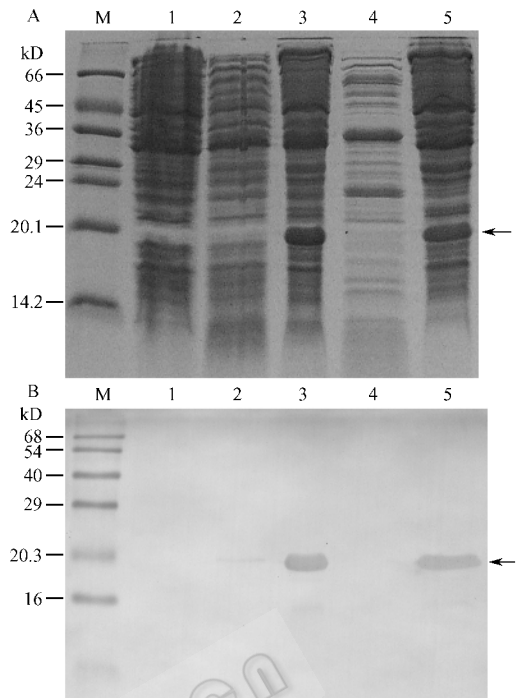


图 3 大肠杆菌中表达的 EGFR-L2 的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

Fig. 3 SDS-PAGE and immunoblotting analyses of EGFR-L2 expressed in *E. coli* BL21(DE3)

(A) SDS-PAGE (15%); (B) Immunoblotting with anti-His<sub>6</sub> antibody  
M : MW marker ; 1 : BL21(DE3) (pET-3c) induced with IPTG for 4 h ;  
2 : BL21(DE3) (pET/EGFR-L2) before IPTG induction ; 3 : BL21(DE3)  
(pET/EGFR-L2) induced with IPTG for 4 h ; 4 : supernatant of BL21  
(DE3) (pET/EGFR-L2) bacterial lysate ; 5 : pellet of BL21(DE3)  
(pET/EGFR-L2) bacterial lysate.

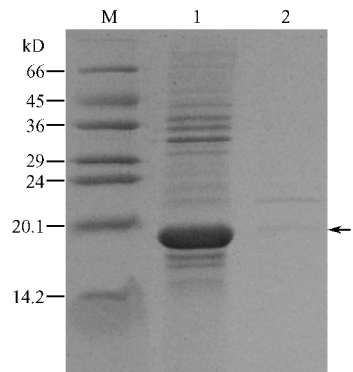


图 4 初步纯化的包涵体 EGFR-L2 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE (15%) analysis of EGFR-L2

in the purified inclusion body

M : MW marker ; 1 : washed inclusion body ; 2 : product from dilution refolding.

法复性也没能获得可溶性产物(结果未显示)。

## 2.4 重组 EGFR-L2 柱上复性和纯化

表达的 EGFR-L2 在羧基端含 His<sub>6</sub> 标签,因此我

们考虑利用  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和柱分离目标蛋白,同时尝试以柱上复性法获得可溶性 EGFR-L2 蛋白。在变性条件下,EGFR-L2 能与 Ni-NTA 有效结合(图 5)。通过逐渐降低尿素浓度实现对目标蛋白的柱上复性,然后以 0.5 mol/L 的咪唑洗脱获得已复性的可溶性 EGFR-L2(图 5, lane 4)。典型的柱上复性及咪唑梯度洗脱结果如图 6, SDS-PAGE 和免疫印迹分析都

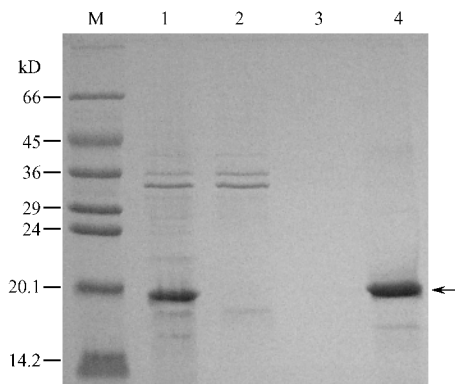


图 5  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱层析洗脱峰的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 Analyses of the peaks from  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA chromatography with SDS-PAGE (15%)

M: MW marker; 1: solubilized product from inclusion body; 2: breakthrough of Ni-NTA column (peak I in Fig. 6); 3: peak II in Fig. 6; 4: eluted EGFR-L2 with 0.5 mol/L imidazole.

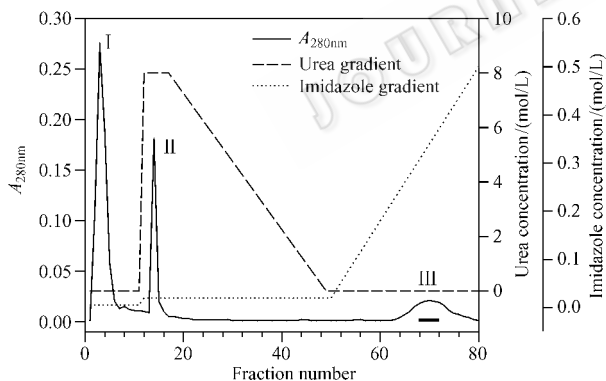


图 6 以  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和柱进行柱上复性和纯化重组 EGFR-L2 的层析图

Fig.6 On-column refolding and purification of recombinant EGFR-L2 with  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA column

The column was equilibrated with 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) containing 6 mol/L guanidine hydrochloride, 15 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol and 5 mmol/L imidazole. The sample dissolved in the same buffer was loaded onto the column and refolded during a linear 8 ~ 0 mol/L urea gradient. The refolded sample was subsequently eluted with 0 ~ 500 mmol/L imidazole linear gradient at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions of 1 mL were collected. Bar indicates the pooled fractions.

证实第 III 峰(图 6)即为可溶性 EGFR-L2 蛋白(图 7, lane 2;图中 EGFR-L2 的位置稍有差异,可能原因是盐浓度不同和边缘效应造成的),并且咪唑线性梯度洗脱获得的 EGFR-L2(图 7, lane 2)纯度在 95% 以上,高于以 0.5 mol/L 咪唑直接洗脱的产物(图 5, lane 4)。这表明柱上复性法通过一步亲和柱层析就能得到高度纯化的可溶性 EGFR-L2,得率一般在 15% 左右。

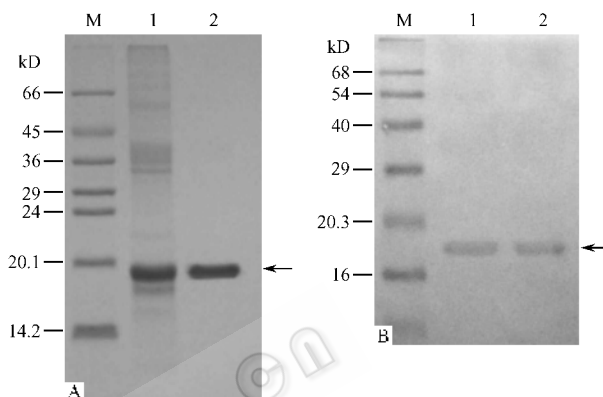


图 7 复性和纯化的 EGFR-L2 的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

Fig.7 Analyses of refolded and purified EGFR-L2 with SDS-PAGE and immunoblotting

(A) SDS-PAGE (15%); (B) Immunoblotting with anti-His<sub>6</sub> antibody.

M: MW marker; 1: washed inclusion body; 2: refolded and purified EGFR-L2 (peak III in Fig. 6).

## 2.5 复性 EGFR-L2 与 EGF 的结合活性分析

然而,获得的可溶性 EGFR-L2 在通过 EGF-Sepharose 4B 亲和柱时,全部随上样液流出,没有显示出与 EGF 的结合活性;同样,以 ELISA 法检测,EGFR-L2 与 EGF 的温育时间为室温 2 h 时不能检测到 EGFR-L2 与 EGF 的特异性结合,推测可能 EGFR-

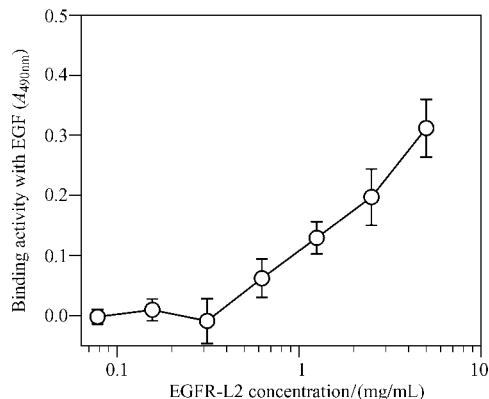


图 8 EGFR-L2 与 EGF 的特异性结合活性分析

Fig.8 Analyses of the specific binding activity of EGFR-L2 with EGF

L2 与其配基的结合活性较弱,为此,延长其与配基的温育时间(室温 3 h 并 4℃ 过夜),结果显示在 EGFR-L2 浓度为 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上时,可以观察到明显的特异性结合活性,并且随 EGFR-L2 浓度提高结合程度也随之升高(图 8)。

### 3 讨论

在真核细胞中表达人源蛋白具有不少优点,但利用原核表达系统仍然是一种重要的有效方法,原因是原核表达系统具有简便、快速、高效等优势,然而,大肠杆菌中高效表达的人源蛋白往往导致不溶性的聚集物即包涵体的产生<sup>[13]</sup>。虽然包涵体在分离纯化等方面具有明显优势,但将其从变性状态复性为正确折叠的产物仍是一大难题。目前常用的包涵体复性方法有三类:稀释法、透析法和层析柱上复性法<sup>[13,14]</sup>。稀释法是小规模包涵体复性最常用的方法,其最大优点是简单,大多数蛋白通过在复性缓冲液中添加小分子化合物及氧化还原系统,可获得正确折叠的产物<sup>[13]</sup>。透析法也属于较为简便的复性法,但效果常不理想<sup>[13]</sup>。我们利用稀释法<sup>[10]</sup>和分步透析法<sup>[11]</sup>对 EGFR-L2 包涵体进行复性,发现这两种方法均无法获得可溶性产物,原因可能是该重组蛋白具有较强的疏水性<sup>[7,15]</sup>,在复性过程中容易发生聚集而沉淀。这说明 EGFR-L2 是一种不易正确折叠的蛋白,可能需要通过能阻止其聚集的复性法才能获得正确折叠的可溶性产物。

层析柱上复性法正是一种能有效限制蛋白质重折叠过程中发生聚集作用的方法,该方法一般是将变性蛋白可逆吸附至固定化金属离子亲和层析介质(IMAC)或离子交换树脂上,然后降低变性剂浓度诱导蛋白质重折叠<sup>[14]</sup>。在层析过程中进行复性是一种极具前景的复性法,因为该方法易于自动化,并且在复性的同时可进行纯化<sup>[14]</sup>。IMAC 为带有 His<sub>6</sub> 标签的工程化蛋白的复性和纯化相结合开创新途径,His<sub>6</sub> 标签在高浓度变性剂存在下能与固定化镍离子结合,结合于柱上的蛋白在变性剂浓度降低过程复性,然后增加咪唑浓度或降低 pH 值将复性蛋白从柱上洗脱。该方法对于一些疏水性强的蛋白如膜蛋白的复性效果较好<sup>[16]</sup>。本研究中,稀释法和分步透析法均无法获得可溶性产物的 EGFR-L2 包涵体蛋白,通过 IMAC 柱上重折叠获得较高得率的可溶性产物,并且产物同时得到高度纯化。这一结果再次证明了 IMAC 柱上复性法在较难复性蛋白的重折叠中的应用价值,可应用于各种不溶性表达产物尤其

是疏水性较强的重组蛋白的复性<sup>[16]</sup>。

晶体结构分析<sup>[6,7]</sup>表明,EGFR 的 L1 和 L2 结构域形成“钳状”结构,两者均与同一 EGF 分子有大面积直接接触,推测单独 L2 结构域与 EGF 的结合力可能并不强,虽然对 EGFR 有限蛋白酶解片段与配基结合特性的分析表明 L2 结构域具有与 TGF $\alpha$  的结合活性<sup>[9]</sup>。但这些都是利用哺乳动物细胞中表达的 EGFR 胞外区产物的研究结果<sup>[6,8,9]</sup>,目前未见原核表达的可溶性 EGFR 的配体结合区具有配基结合活性的报道,即使以可溶性形式表达于原核细胞的 EGFR 同源分子 HER-2/neu 的胞外配体结合区 2 蛋白也未见结合活性报道<sup>[17]</sup>,这些结果都提示,糖基化修饰可能在配体结合过程中发挥重要作用,没有糖基化的原核表达产物可能与 EGF 的结合活性较弱甚至没有结合活性。我们开始在用常规 ELISA 方法分析时没有检测到 EGFR-L2 与 EGF 具有特异性结合活性,推测该受体片段与 EGF 的结合活性较弱,为此,通过延长其与 EGF 的温育时间以提高检测的灵敏度,结果能够检测到 EGFR-L2 与 EGF 的特异性结合,但是这种特异性结合活性较低。该结果说明原核表达的 L2 结构域与 EGF 间确实有较弱的结合活性。

总之,我们构建的原核表达载体在大肠杆菌中高效表达 EGFR-L2 蛋白,并利用 His<sub>6</sub> 标签建立了有效的 IMAC 柱上复性和纯化相结合的包涵体重折叠方案,获得了高度纯化并具有配基结合活性的可溶性 EGFR-L2 蛋白,可用于分析其抗原性和制备特异性抗体等研究工作。这些结果说明,His<sub>6</sub> 标签不仅便于纯化目标蛋白,而且可利用 IMAC 柱进行柱上复性,适用于不易通过常规方法复性的重组蛋白的制备。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 2002, **110**(6): 669–672
- [2] Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *Eur J Cancer*, 2001, **37**(S4): S16–22
- [3] Grünwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**(12): 851–867
- [4] Cunningham D, Humblet Y, Siena S *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, **351**(4): 337–345
- [5] Saltz LB, Metropoulos NJ, Loehrer Sr PJ *et al.* Phase II trial of Cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*, 2004, **22**(7):

- [ 6 ] Garrett TP, McKern NM, Lou M *et al.* Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 2002, **110**( 6 ): 763 - 773
- [ 7 ] Ogiso H, Ishitani R, Nureki O *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 2002, **110**( 6 ): 775 - 787
- [ 8 ] Kim JH, Saito K, Yokoyama S. Chimeric receptor analyses of the interactions of the ectodomains of ErbB-1 with epidermal growth factor and of those of ErbB-4 with neuregulin. *Eur J Biochem*, 2002, **269**( 9 ): 2323 - 2329
- [ 9 ] Elleman TC, Domagala T, McKern NM *et al.* Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain. *Biochemistry*, 2001, **40**( 30 ): 8930 - 8939
- [ 10 ] Xu LH( 徐丽慧 ), Hong A( 洪岸 ), He XH( 何贤辉 ). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human EGF receptor extracellular domain. *Journal of Jinan University( Natural Science & Medicine Edition )* ( 暨南大学学报·自然科学与医学版 ), 2005 **26**( 2 ): 168 - 173
- [ 11 ] He XH( 何贤辉 ), Xu LH( 徐丽慧 ), Liu Y( 刘毅 ) *et al.* Preparation and characterization of HLA-A\* 0201 monomer and tetramer loaded with HCMV antigenic peptide. *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ), 2004 **20**( 3 ): 282 - 388
- [ 12 ] Sinacola JR, Robinson AS. Rapid refolding and polishing of single-chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif*, 2002, **26**( 2 ): 301 - 308
- [ 13 ] Rudolph R, Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J*, 1996, **10**( 1 ): 49 - 56
- [ 14 ] Li M, Su ZG, Janson JC. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr Purif*, 2004, **33**( 1 ): 1 - 10
- [ 15 ] Ward CW, Garrett TP. The relationship between the L1 and L2 domains of the insulin and epidermal growth factor receptors and leucine-rich repeat modules. *BMC Bioinformatics*, 2001, **2**( 1 ): 4 [ <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/2/4> ]
- [ 16 ] Rogl H, Kosemund K, Kuhlbrandt W *et al.* Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett*, 1998, **432**( 1 - 2 ): 21 - 26
- [ 17 ] Xu M( 徐明 ), Guo N( 郭宁 ), Hu MR( 胡美茹 ) *et al.* Soluble expression and purification of HER-2/neu extracellular receptor ligand domain. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* ( 中国生物化学和分子生物学报 ), 2004 **20**( 2 ): 171 - 175

## 用生物技术发掘新能源或替代能源

随着经济建设的飞速发展,能源短缺已成为世界各国关注的焦点。作为重要能源之一的石油,更是因其不可再生性和资源的有限,使得原油价格的些微浮动,都能在国际能源、甚至政治层面掀起不小的波澜。因此,发掘新能源或替代能源,将是未来解决能源问题的一个必然方向,也是科学家应该关注的重大课题。

从生物技术的角度来说,利用微生物开采石油、提高石油产率或实现二次、三次采油,都已经获得共识并正在开展中,而生产石油及其替代物,近来也得到重视,并不断有相关报道。这里仅关注三点:1)微藻生产石油:微藻也是微生物世界的重要成员,有报道说,从培养的微型单胞藻或单胞绿藻中获得了石油,其石油含量占藻体细胞干重的 25% ~ 50%。实际上石油积蓄在细胞间隙之中,理论值为 70% ~ 80%,说明微型单胞藻是一类潜在的微生物资源。有的国家据此建立了“单胞藻农场”,每年每公顷培养的单胞藻,按 35% 干物质产碳氢化合物(石油)计,可得 60 吨石油燃料。该技术的优点是:排除了因石油使用释放的温室气体 CO<sub>2</sub>(因为单胞藻行光合作用固定 CO<sub>2</sub> 合成自己所需要的有机物);藻体生物本身可以得到再利用,生产有高附加值的产品如保健品、药品、化妆品等。这方面日本和法国的科学家做了大量的工作。2)细菌生产石油:有报道指出,发现一些极端微生物,如从地下盐水层环境中分离到的两种细菌(全红色红色细菌和透明状晶体细菌),它们如同光合细菌那样能吸收 CO<sub>2</sub>,并将其转化成液态碳氢化合物,这为利用这类细菌开发“生物石油”提供了可能。3)人造石油:就是模拟原油在过去几百万年地下形成的过程原理,人工合成。这需要仿生学、化学、微生物学等很多学科、技术的结合。德国吉森大学的研究人员,尝试了将动物骨粉和污水过滤后的淤泥混在一起放在密闭反应器中,在无氧条件下完成这些原料的转化过程,1 吨动物肉骨粉可制造 250 升原油,从而实现了有机废料变石油的梦想。但这种方法相当复杂,需要走的路还很遥远,还有多方面的试验需要完成,如与天然石油比较其效力及稳定性如何,细菌制造碳氢化合物(拟石油)的内部分子结构及其功能,它们受何种酶基因控制及合成碳氢化合物所需分子生态条件等等。

总之,能源短缺是全世界都必须面对的一个重大课题,研究开发替代洁净能源,发掘新能源是非常必要的。相信生物技术会发挥其优势,作出应有的贡献。

(柯 为)