

金黄色葡萄球菌核酸酶 A 基因在大肠杆菌中的高效表达

静国忠 刘利军 刘志革 周波 邹强

(中国科学院生物物理研究所,北京 100101)

摘要 这篇文章报道了金黄色葡萄球菌核酸酶 A 的克隆和在温控启动子 P_{rPL} 调控下在 *E. coli* 中的高效表达。SDS-PAGE 分析表明,核酸酶 A 的含量可占 *E. coli* 细胞总蛋白含量的 60%。经有效的增溶和复性处理后,重组酶具有与天然酶相同的活力,N-末端氨基酸分析的结果指出,fMet 在转译后被加工去除;对重组 SNaseA 在构象上的同一性也通过 Phenyl-Superose 疏水柱层析进行了分析。

关键词 金黄色葡萄球菌核酸酶,高效表达,构象同一性

金黄色葡萄球菌核酸酶 A (Staphylococcal nuclease A, 以下简称为 SNaseA) 是金黄色葡萄球菌的一种外泌蛋白,整个分子由 149 个氨基酸残基组成,分子内无硫-硫桥,也不含半胱氨酸,是一个研究蛋白质折叠的好材料。Takahara^[1]和 Shortle^[2]等曾分别利用 ompA 和 phoA 信号肽构建了分泌表达载体生产 SNaseA,其表达量只占细胞总蛋白量的 10% 左右。为了得到足够量的酶蛋白用于蛋白质折叠的研究,利用 P_{rPL} 启动子在 *E. coli* 细胞内高效表达了 SNaseA,并通过 Phenyl-Superose 疏水柱层析对在不同复性条件下重组 SNaseA 在构象上的同一性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli DH5 α (supE44 Δ LacU169 (Φ 80LacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) 作为本研究的受体菌。pBV221 为 pBV220^[3] 的衍生质粒,由张智清博士惠赠。pBVS-1^[4] 含有 SNaseA 基因编码顺序,作为 PCR 扩增模板,由本实验室组建。pTZ18U 和 pTZ19U 购自 Bio-Rad 公司。pFOG405^[2] 是 SNaseA 分泌表达载体,Dr. Shortle 惠赠。

1.2 DNA 遗传工程操作

限制酶和 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs,各种酶反应条件按厂家说明书进行。质粒的分离、重组及转化按 Sambrook 等人^[5] 的方法进行。DNA 顺序分析按 Pharmacia 的 T7 DNA 多聚酶顺序分析试剂盒所提供的方法进行。

1.3 多聚酶链反应(PCR)

pBVS-1 作为 PCR 扩增模板;一对 PCR 引物用 ABI 381A DNA 合成仪合成,经 15% 聚丙烯酰胺凝胶(含 7mol/L 尿素)分离纯化。5'-引物 PcA, 30mer, 5'-CTCCCATG-GCAACTTCAACTAAAAAATTAC-3'(引物的 5'-端含有 NcoI 酶切点 CCATGG 及

CTC 突出); 3'-引物 PcB, 27mer, 5'-GGGTCGACTTATTGACCTGAATCAGCG-3'(引物的 5'-端含有 SalI 酶切位点 GTCGAC 及 GG 突出)。PCR 反应总体积为 100 μ l, 含 10mmol/L Tris-HCl, pH7.9(25 $^{\circ}$ C), 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂·6H₂O, 0.01% 明胶(w/v)和 0.1% TritonX-100, 50 μ mol/L dNTPS, 5ng pBVS-1 模板 DNA, 引物 PcA、PcB 浓度各为 0.2 μ mol/L, 2 单位的 Taq DNA 多聚酶(Promega)。整个反应为 30 个循环(95 $^{\circ}$ C/30 秒, 50 $^{\circ}$ C/30 秒, 71 $^{\circ}$ C/90 秒)。PCR 产物经氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA)中备用。

1.4 表达产物的分析

含有 pBVS-2 质粒的 *E. coli* 隔夜培养物, 按 1:50 稀释转入 LB 培养液, 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5—0.6 后, 42 $^{\circ}$ C 诱导 5 小时, 将从 1.5ml 培养液中所得到的菌体悬浮于 0.2ml 的 Laemmli 缓冲液⁽⁶⁾中, 100 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟后离心(15 000r/min, 10 分钟), 取 35 μ l 的上清在 15% SDS-PAGE 进行电泳分析⁽⁷⁾, 蛋白质经考马斯亮蓝 R250 染色、脱色后用 LKB 激光光密度计扫描定量。SNaseA 基因在 *E. coli* 中的表达, 进一步用 Western blot 来确证。碱性磷酸酶免疫测试系统(Promega)被用于此项测试。全细胞蛋白经 SDS-PAGE 分离后转至硝基纤维素膜上, 免疫测试按 Promega 提供的方法进行。抗 SNaseA 多克隆抗体按静国忠等的方法⁽⁸⁾制备。

1.5 SNaseA 的纯化及活力测定

含有 pBVS-2 质粒的 *E. coli* 的培养与诱导如上所述。菌体悬浮于 1/10 原培养液体积的细胞裂解液(6mol/L urea-50mmol/L Tris-HCl, pH9.2, 1mmol/L EDTA-0.2 mol/L NaCl)中, 冰浴保温 30 分钟后离心(12 000 \times g, 15 分钟)取上清, 上清经等体积 100% 冷乙醇沉淀(-20 $^{\circ}$ C, 1—2 小时), 弃去沉淀后, 上清再用二倍体积的冷乙醇沉淀(-20 $^{\circ}$ C, 2 小时), 离心收集沉淀作为部分纯化的 SNaseA。经第二次乙醇沉淀后的 SNaseA 的纯度可达 80%。为进一步纯化, 将部分纯化的 SNaseA 溶于 UTE 缓冲液(6mol/L urea, 50mmol/L Tris-HCl, pH9.2, 1mmol/L EDTA)中, 于 4 $^{\circ}$ C 对去离子水充分透析、复性, 离心(12 000 \times g, 15 分钟)弃去沉淀后, 上清加入等体积的 2mol/L Tris-HCl, pH10.5, 5mmol/L EDTA, 再加入上述总体积 1/10 体积的 1mol/L Hepes 使溶液 pH 为 9.2, 最后按 Shortle 方法⁽²⁾经 Bio-Rex70 离子交换树脂柱(2.6 \times 15cm, Bio-Rad)进行 1-2 次层析纯化。

SNaseA 的活力测定按 Cuatrecasas 等人⁽⁹⁾的方法进行。测活溶液为 25mmol/L Tris-HCl, pH8.8, 10mmol/L CaCl₂, 50 μ g/ml 变性鲑精 DNA, 反应温度为 30 $^{\circ}$ C。测活在 1cm 光径的石英比色杯中进行, 加酶后用岛津 UV250 紫外分光光度计监测反应体系在 260nm 处吸光度增加, 每分钟引起吸光度变化为 1 的酶量定义为一个活力单位。

1.6 N-末端的分析

SNaseA N-末端的分析按手工固相 Edman 降解法⁽¹⁰⁾进行。为保证实验的准确性, 经 Bio-Rex70 纯化的 SNaseA 进一步用 pharmacia FPLC MonoS HR 5/5 柱纯化。100—200 μ g 的 FPLC 纯化的 SNaseA 被共价连接到 Polybrene(Sigma)后, 按标准液相 Edman 降解法进行。N-末端产物用硅胶薄层层析来鉴定。

1.7 SNaseA 构象同一性的检测

复性后的 SNaseA 在构象上是否同一, 是通过在 Pharmacia 的 Phenyl-Superose

HR5/5 上所进行的疏水柱层析(Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)进行检测。经 Bio-Rex70 纯化的 SNaseA 溶于缓冲液 A (50mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.0, 1.7mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 终浓度为 1mg/ml 经 0.2 μm 滤膜过滤后, 50 μl 样品上到同样缓冲液平衡的 Phenyl-Superose HR5/5 柱上, 蛋白通过 B 缓冲液 (50mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0) 在室温下进行线性梯度 (0—100%) 洗脱, 洗脱体积为 15ml, 流速为 0.5ml/min, 洗脱峰用 280nm 的吸收进行监测。

2 结果与讨论

2.1 PCR 和 SNaseA 表达质粒的组建

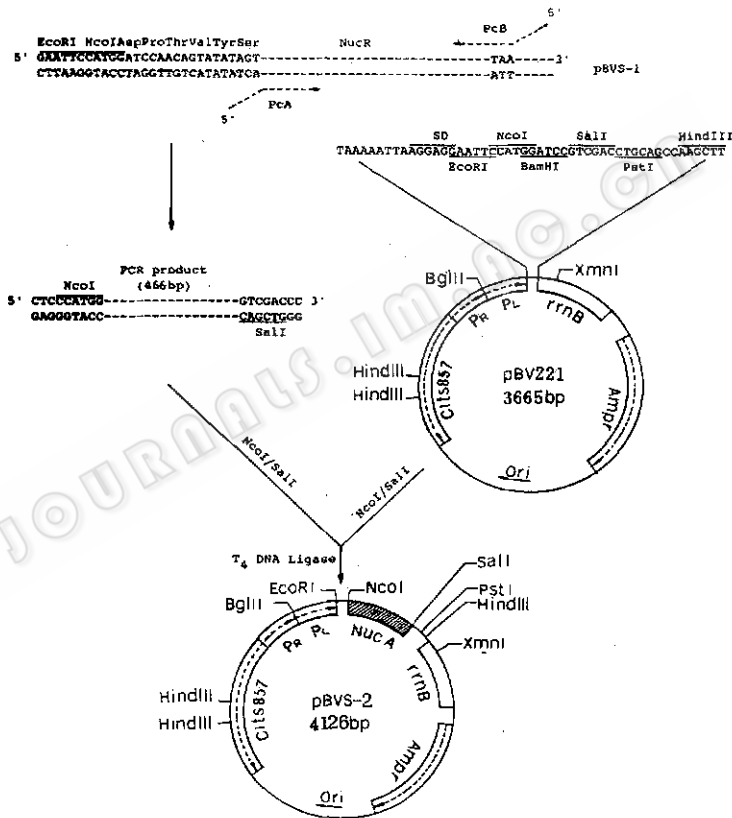


图1 SNaseA 表达载体 pBVS-2 的组建

Fig. 1 Construction of the plasmid pBVS-2 for expression of SNaseA (rrnB, rrnBT, T₂)

如前所述,在 PCR 引物的设计中,分别将带有 CTC 和 GG 突出的 NcoI 和 SalI 限制酶位点引入到引物 PcA 和 PcB 的 5'-端,这一设计保证了 PCR 产物能被 NcoI/SalI 有效酶解。经 NcoI/SalI 酶解的 PCR 产物插入到 pBV221 的 NcoI/SalI 位点,产生新的重组体 pBVS-2(图 1)。阳性转化子经氨苄平板,重组质粒的快速鉴定法^[11]及限制酶酶切图谱初步确定。pBVS-2 经 EcoRI/SalI 酶解后,含 SNaseA 的 EcoRI-SalI 片段分别重组入 pTZ19U 和 pTZ18U 进行 DNA 测序。DNA 顺序分析的结果指出,通过 PCR 所得到的为

SNaseA 编码的全部核苷酸顺序是正确的,整个基因处于正确的阅读框架中。起始密码子 ATG 与核糖体结合位点(SD)之间的距离为 6 个碱基。SNaseA 基因处于温控串联启动子 P_{RPL} 的调控之下,而强转录终止子 $rrnBT_1T_2$ 位于 SNaseA 基因的下流。由于此表达质粒上含有为温度敏感的阻遏蛋白 cI 编码的基因 cI857,所以 pBVS-2 可以被转化入不含有 cI857 阻遏蛋白基因的大肠杆菌受体细胞,进行 SNaseA 基因的表达。

2.2 SNaseA 在 *E. coli* 中的高效表达

图 2 的结果指出,SNaseA 在大肠杆菌中得到高效表达,激光光密度计扫描定量指出,菌体内 SNaseA 的含量可占细胞总蛋白量的 60% 以上。在摇瓶培养的条件下,经 1—2 次 Bio-Rex70 柱层析后,从 1 升培养液中可得 70—90mg 的 SNaseA,经考马斯亮蓝染色后,在 SDS-PAGE 上呈单一的蛋白带。图 3 给出免疫测试的结果,重组的 SNaseA 同抗 SNaseA 的抗体产生特异性的免疫反应,进一步确证了 SNaseA 在大肠杆菌中的表达。SNaseA 是一种小球菌 DNA-RNA 水解酶,在细胞内表达很可能对宿主细胞造成危害。然而,由于 SNaseA 基因在强温控启动子调控下高效表达,其表达产物以包含体的形式存在,这就避免了在表达过程中 SNaseA 对宿主细胞可能产生的危害。在 SNaseA 的纯化过程中,我们用含 6mol/L 尿素的裂解液直接对菌体进行裂解处理,使包括大肠杆菌蛋白水解酶在内的蛋白质处于变性状态,并通过第一次等体积冷乙醇的沉淀,去除了绝大部分杂蛋白,由此也大大减少了 SNaseA 在进一步纯化过程中被蛋白水解酶降解的可能性。经纯化后的 SNaseA 的比活力同天然酶的活力相当,可达 2061u/毫克蛋白。

2.3 重组 SNaseA 复性及构象均一性研究

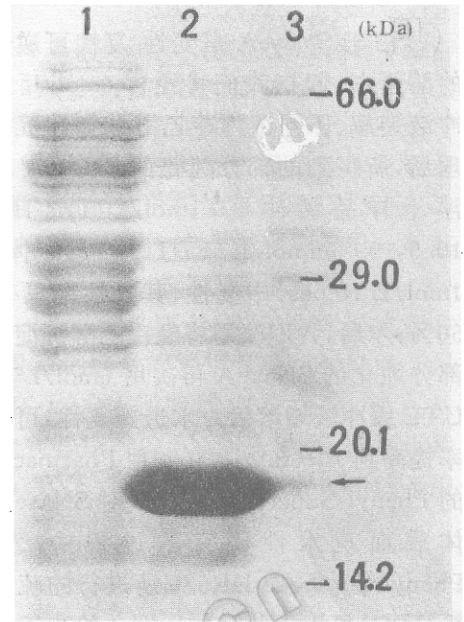


图 2 SNaseA 表达的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 Analysis of protein extract from *E. coli* harboring pBV221 (lane 1), and pBVS-2 (lane 2) respectively. Protein molecular weight marker in kDa (Lane 3). Arrow indicated SNaseA.

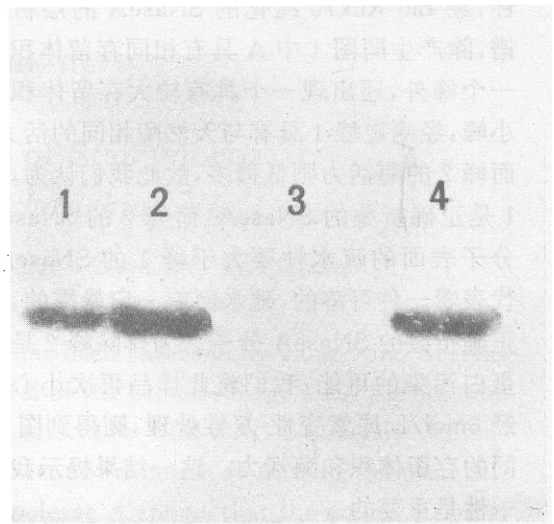


图 3 SNaseA 表达的免疫印迹分析
Fig. 3 Immunoblot identification of SNaseA expression in *E. coli*
1. Standard SNaseA; 2. and 4. Total cellular protein from *E. coli* harboring pBVS-2; 3. Total cellular protein from *E. coli* harboring pBV221

由于 SNaseA 是变性-复性可逆性很强的酶蛋白,起初我们将经含 6mol/L 尿素缓冲液裂解、不同浓度冷乙醇选择性沉淀等处理后,所得到的部分纯化的 SNaseA 直接悬浮于样品缓冲液 (1mol/L Tris-HCl, pH 10.5, 2.5mmol/L EDTA, 1/10 体积的 1mol/L HEPES) 中复性,其复性率只有 40—50%;尔后,我们改用将经冷乙醇沉淀得到的部分纯化的 SNaseA 再次用 6mol/L 尿素的 UTE 缓冲液增溶后对水透析复性,可使复性率提高到 70—80%。在利用 Pharmacia 生产的 Phenyl-Superose HR5/5 对 SNaseA 突变体表面疏水性研究的过程中,发现用 Phenyl-Superose HR5/5 所进行的疏水柱层析(HIC)可用于此目的。图 4 给出不同复性条件下的 SNaseA 在 Phenyl-Superose HR5/5 上的层析图。图 4 中 B 是 *E. coli* 细胞内表达的 SNaseA 包含体,经 6mol/L 尿素裂解、冷乙醇沉淀后直接悬浮于样品缓冲液中复性,经 Bio-Rex70 纯化的 SNaseA 的层析图谱,除产生同图 4 中 A 具有相同存留体积的一个峰外,还出现一个具有较大存留体积的小峰,经测定峰 1 具有与天然酶相同的活力,而峰 2 的酶活力则低得多,故此我们认为,峰 1 是正确折叠的 SNaseA,而峰 2 的 SNaseA 分子表面的疏水性要大于峰 1 的 SNaseA,代表着一种可溶的,疏水面有一定暴露的,未正确折叠的 SNaseA 分子。为排除峰 2 是杂蛋白污染的可能,我们将此样品再次小心地经 6mol/L 尿素变性-复性处理,则得到图 4 中 C,此蛋白峰在 HIC 上具有同图 4 中 A 相同的存留体积和酶活力。这一结果提示我们选择适当的复性条件对保证重组蛋白构象同一性是重要的。

2.4 N-末端氨基酸分析及 SNaseA 在 *E. coli* 中的加工

为了确定在 SNaseA N-末端的甲酰甲硫氨酸残基在表达过程中是否已被 *E. coli* 的甲硫氨酸氨基肽酶加工去除,我们对重组的 SNaseA 的 N-末端氨基酸进行了分析。实验结果指出,丙氨酸是 SNaseA N-末端唯一的氨基酸残基,而第二个残基为丝氨酸。这一结果同 DNA 序列分析的结果相一致。这意味着处于 SNaseA 的 N-末端的甲酰甲硫氨酸残基完全为 *E. coli* 中的甲酰甲硫氨酸氨基肽酶加工去除。

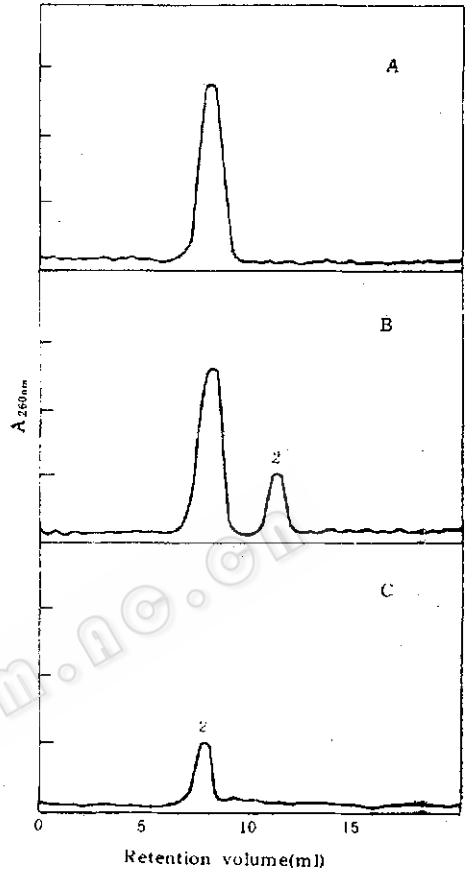


图 4 SNaseA 在 Phenyl-Superose HR5/5 疏水柱上的构象均一性分析

Fig. 4 Conformational analysis of renatured SNaseA on Phenyl-Superose HR5/5 column

A: native SNaseA; B: renatured SNaseA in sample buffer; C: renatured SNaseA after treatment of 6mol/L urea

高效的转录和转译起始是利用基因工程手段获得大量重组蛋白质的必要条件。在本实验中 SNaseA 基因的转录是在强温控启动子 $P_{R}P_L$ 的调控下完成的,而处于 SNaseA 基因下游的强转录终止子 $rrnBT_1T_2$ 使得此载体-宿主系统高度稳定。如图 1 所示,SD 顺序处于富 dA/dT 的区域,这一结构特点避免了 mRNA 在此区域内产生妨碍核糖体有效结合的二级结构。近来,我们对 SNaseA 基因编码顺序的二级结构分析结果指出,在 SNaseA 基因编码顺序,特别是其 5'-区域缺少明显的二级结构,这一结构特点有利于 SNaseA 基因的有效转录和转译。

表达产物的稳定积累是获得大量重组蛋白的又一个必要的条件,以包含体形式存在于 *E. coli* 细胞质中的 SNaseA 十分稳定,这为我们得到足够量的重组 SNaseA 提供了保证。近来的实验结果表明,不仅完整的 SNaseA 在 *E. coli* 强胞质中很稳定,就连从 SNaseA C-末端缺失掉 97 个氨基酸残基的,由 52 个残基组成的 SNaseA 去 C-末端小片段也可在 *E. coli* 细胞中稳定积累。上述的结果指出,pBVS-2-DH5 α 载体与宿主系统不但为 SNaseA 完整基因,而且也为 SNaseA 不同长度的肽段表达提供了一个有效的体系。

参 考 文 献

- [1]Takahara M *et al.* J Bio Chem,1985,260: 2670—2674.
- [2]Shor tle D. Cell Biochem,1986,30: 281—289.
- [3]张智清等. 病毒学报,1990,6: 111—116.
- [4]Jing G Z *et al.* J Biotech,1992,22: 271—282.
- [5]Sambrook J *et al.* Molecular Cloning; A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y. 1989.
- [6]Laemmli U K. Nature,1970,227: 680—685.
- [7]Blackshear P J. Methods Enzymol,1984,104: 237—255.
- [8]静国忠等. 遗传学报,1981,8: 241—251.
- [9]Cuatrecasas P *et al.* J Biol Chem,1967,242: 1541—1547.
- [10]徐秀璋. 蛋白质顺序分析技术,北京: 科学出版社,1988,p111—119.
- [11]彭秀玲等. 基因工程实验技术,长沙: 湖南科学技术出版社,1987.

High Level Expression of Staphylococcal Nuclease A in *Escherichia coli*

Jing Guozhong Liu Lijun Liu Zhige Zhou Bo Zou Qiang

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Abstract The staphylococcal nuclease A gene has been successfully cloned and overexpressed in *E. coli* under the transcriptional control of the bacteriophage $\lambda P_{R}P_L$ promoters regulated by the temperature sensitive repressors. The SDS-PAGE analysis demonstrates that the nuclease A is produced to the extent of as much as 60% of the total cellular protein. The N-terminal analysis of the nuclease A shows that the amino terminal formyl methionine residue of the enzyme is precisely processed. The recombinant nuclease A with full activity is finally obtained after appropriate solubilization-denaturation and renaturation. The conformational identity of the renatured SNaseA in different conditions is also studied by using Hydrophobic Interaction Chromatography on a phenyl-superose HR5/5 column.

Key words Staphylococcal nuclease A, high level expression, conformational identity