

利用串联亲和纯化技术分离大肠杆菌 GroEL 蛋白复合物

魏波^{1,2Δ} 廖翔^{2Δ} 周围² 王羽^{1,2} 李玉霞² 高原² 岳俊杰^{2*} 梁龙^{2*} 呼和巴特尔^{1*}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 军事医学科学院 生物工程研究所 北京 100071)

摘要: 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是一种重要的致病菌, 加深其致病机理的基础研究将为相关疫苗研究及疾病控制等提供新的思路 and 依据。串联亲和纯化(TAP)技术是最近发展的分离纯化天然状态蛋白质复合物进而研究蛋白质相互作用的新方法。用我们自己构建的原核表达串联亲和标签载体, 在大肠杆菌 O157:H7 中表达了标签融合蛋白 GroEL-TAP, 建立了非变性条件下制备蛋白复合物的方法, 并且对串联亲和纯化过程中的相关实验条件进行了探索和优化, 最终得到了高纯度的 GroEL-TAP 与天然 GroEL 形成的嵌合型多聚体复合物。这表明我们建立的串联亲和纯化技术能高度特异地纯化靶蛋白参与形成的复合物, 为后续寻找 O157:H7 中毒力蛋白参与形成的复合物奠定了实验基础。

关键词: 肠出血性大肠杆菌 O157:H7, 串联亲和纯化(TAP), 分子伴侣 GroEL

Application of tandem affinity purification technique for separation of GroEL complexes in *Escherichia coli*

WEI Bo^{1,2Δ} LIAO Xiang^{2Δ} ZHOU Wei² WANG Yu^{1,2} LI Yu-Xia² GAO Yuan²
YUE Jun-Jie^{2*} LIANG Long^{2*} HUHE Bateer^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is a kind of important pathogenic bacterium, and deeper studies of molecular pathogenesis will contribute better to related vaccine research and disease control. Tandem affinity purification (TAP) technique is a kind of new method which was recently developed and used to separate and purify native protein complexes and so on to study interactions be-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970122)

Δ 对本文贡献相同

* 通讯作者: Tel: 86-10-66948874; ✉ 岳俊杰: yue_junjie@126.com, 梁龙: LL@nic.bmi.ac.cn, 呼和巴特尔: hhbte@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-25; 接受日期: 2011-09-14

tween proteins. In this study, a prokaryotic TAP expression vector constructed by our laboratory was successfully used to express fusion protein GroEL-TAP in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. An efficient method for preparation of native protein complexes was developed and all experimental parameters of tandem affinity purification were optimized. The highly pure protein complexes composed of both tagged GroEL-TAP and natural GroEL were obtained with our expression and purification system. These results showed that our TAP system worked well to specifically purify protein complex participated with target protein in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. This study provided satisfactory experimental base for follow-on works on identifying virulence protein participated complexes.

Keywords: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, Tandem affinity purification (TAP), Chaperonin GroEL

随着蛋白质组学的发展, 蛋白质相互作用的研究成为阐释基因功能的重要手段。串联亲和纯化 (Tandem affinity purification, TAP) 是由 Rigaut 等^[1] 1999 年建立的, 在真核细胞中表达融合两种不同性质亲和标签的靶蛋白, 通过融合的标志进行两步亲和和层析分离纯化靶蛋白参与形成的复合物。其优点主要在于: 经过两步不同性质亲和层析得到的产物特异性高, 非特异吸附导致的假阳性率非常低。TAP 技术通常选择可在非变性条件下洗脱的标志, 用于分离纯化天然状态的复合物, 鉴定其蛋白组成, 研究蛋白间相互作用。2003 年 Gully D. 等^[2] 报道了分别利用 N 端 TAP 与 C 端 TAP 在 *E. coli* 中分离出与 ACP 相互作用的 MukB 与 Isc 蛋白, 表明 ACP 还存在未被发现的生理功能, 同时初步表明 TAP 技术在原核生物中应用的可行性。2005 年 Butland G. 等^[3] 利用 TAP 研究了大肠杆菌中保守蛋白与未知蛋白的相互作用网络。这些工作表明, 串联亲和纯化技术在原核生物的蛋白质相互作用中有很好的应用前景。

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是常见致病菌, 已知其致病机理跟一些毒力蛋白相关。本实验室致力于大肠杆菌 O157:H7 致病的分子机理研究, 为开展相关的毒力蛋白相互作用研究, 构建了在原核细胞表达的串联亲和纯化标签载体 pTAP。其中的标签分别为蛋白 G (Protein G, ProG) 和链亲和素结合肽 (Streptavidin-binding peptide, SBP), 标签之间含 2 个 TEV 酶特异的酶切位点^[4]; 此外, pTAP 载体还含有绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFPuv) 编

码序列, 作为检测融合蛋白是否成功表达的标志物^[5]。本实验以分子伴侣 GroEL 为靶蛋白, 成功地在大肠杆菌 O157:H7 中表达了 GroEL-TAP 融合蛋白, 对串联亲和纯化过程进行了详细优化, 最终得到 GroEL 形成的复合物, 不含任何杂蛋白。本文将详细讲述串联亲和纯化技术的建立和优化; 这些工作为后续以已知的毒力蛋白为靶蛋白, 寻找与之相互作用的新蛋白, 进而研究蛋白相互作用对毒力的影响提供了坚实的实验基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

质粒 pTAP 与 pGroEL-TAP 是由本实验室构建, 大肠杆菌 O157:H7 感受态由本实验室制备, IgG Sepharose 6 Fast Flow (IgG 琼脂糖珠) 及 Streptavidin Sepharose High Performance (链亲和素琼脂糖珠) 购自 GE Healthcare 公司, AcTEVTM Protease 购自 Invitrogen 公司, 蛋白酶抑制剂混合物 (pic) complete、EDTA-free 购自 Roche 公司, DNaseI 购自 Merck 公司, 溶菌酶购自 Sigma 公司, 彩色预染蛋白 Marker 购自 New England BioLabs 公司, Anti-GFPuv 单克隆抗体购自 R&D 公司, 辣根酶标记兔抗山羊 IgG 及辣根酶标记链亲和素 (SA-HRP) 购自中衫金桥公司, 常规生化试剂购自 Amresco、Merck、Sigma、Roche 等公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及 DNA 纯化试剂盒购自 TIANGEN 公司。

1.2 构建 pGroEL-TAP 表达载体

质粒 pTAP 的构建由本实验室前期工作构建完

成。用引物 F1 (5'-GGGGAATTCATGGCAGCTAAA GACGTA-3'), R1 (5'-GCATGCTTACATCATGCCGC CCATGCC-3')以 O157:H7 全基因组为模板扩增 *groEL* 基因序列,引物上下游分别引入限制性酶切位点 *EcoR* I、*Sph* I,对扩增片段通过双酶切、连接等反应构建到质粒 pTAP 上。

1.3 蛋白样品制备与串联亲和纯化

将转化了 pGroEL-TAP 融合表达质粒的 O157:H7 单菌落挑至 5 mL LB(氨苄抗性)培养基中,试管置摇床 37 °C、200 r/min 培养 10 h。按 1%的接种量转接到 200 mL 的 LB (氨苄抗性)培养基中,摇床 37 °C (200 r/min)培养至对数中期,OD 值为 1.0-1.5。4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体沉淀,用 5 mL 20%蔗糖重悬,转移到 50 mL 离心管中。再进行 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 5 mL 20%蔗糖重悬菌体;然后加入 0.5 mL 1 mol/L Tris (pH 8.0)+20 μL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)+100 μL 蛋白酶抑制剂混合物(每片溶于 400 μL 水中)+40 mg 溶菌酶,37 °C 温育 2.5 h。4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 收集菌体沉淀,以 1 mL 20%蔗糖溶液重悬,加入 50 mL 纯水靠渗透压休克使菌体裂解,再加入 1/8 片 pic+500 μL 1 mol/L MgCl₂+10 kU DNaseI,冰浴 0.5 h 以降核酸,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 收集上清;沉淀用 50 mL 的 0.2 mol/L NaCl+10 mmol/L Tris (pH 8.0)+100 μL 蛋白酶抑制剂混合物重悬,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 收集上清。将两次收集上清合并,得到初始蛋白样品。

1.4 超速离心浓缩初始蛋白样品

将 100 mL 初始蛋白样品进行超速离心,离心条件设为:4 °C、100 000×g 离心 1 h,弃上清,沉淀用 1 mL 水重悬,再用 4 °C、10 000×g 离心 30 min 去除不溶性沉淀,收集上清为浓缩后的蛋白样品。用 Western 印迹检测浓缩前后样品的浓度,参照常规 Western 印迹方法进行的操作^[6]。

1.5 串联亲和纯化

将 100 mL 初始蛋白样品或者 1 mL 超离浓缩的样品与 0.5 mL IgG 琼脂糖珠于 4 °C 孵育 6 h,然后离心收集琼脂糖珠;用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris pH 8.0; 2 mmol/L EDTA pH 8.0)清洗 3 次,然后用

16 °C TEV 酶切割洗脱 10 h。TEV 洗脱上清加入链亲和素琼脂糖珠结合 6 h,清洗 3 次,用 10 mmol/L 生物素洗脱。通过 SDS-PAGE 电泳和用 Anti-GFPuv 单克隆抗体或辣根酶标记链亲和素(SA-HRP)进行免疫印迹检测靶蛋白纯化的效果观察。将最终纯化产物经 SDS-PAGE 电泳分离得到的蛋白条带进行 MALDI 质谱鉴定。

2 结果与分析

2.1 构建 pGroEL-TAP 表达载体

首先用引物 F1、R1 从 O157:H7 全基因组中扩增 *groEL* 基因,*groEL* 基因的理论值为 1 647 bp,从图 1A 可见,扩增片段大小与理论值相符。将扩增片段用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。将 *groEL* 基因扩增片段回收产物与 pTAP 载体分别进行 *EcoR* I、*Sph* I 双酶切,pTAP 载体的酶切产物理论值约为 3 500 bp,从图 1B 可见,pTAP 质粒经过酶切后产物与理论值相符,因此将 pTAP 质粒酶切产物进行琼脂糖凝胶回收。*groEL* 基因扩增片段的双酶切产物直接用 DNA 纯化试剂盒纯化。将 *groEL* 基因通过酶切、连接,构建到 pTAP 载体上,通过测序验证完全正确,成功构建 pGroEL-TAP 表达载体。

2.2 超速离心浓缩蛋白样品提高纯化效率

由 200 mL 菌液制备得到的 100 mL 初始蛋白样品体积大浓度低,与体积仅为 0.5 mL 的 IgG 琼脂糖珠混合后蛋白和琼脂糖珠的浓度都很低,使得标签蛋白与琼脂糖珠的结合效率很低。因此我们考虑将蛋白样品浓缩后再结合琼脂糖珠进行纯化。先尝试了用超滤膜进行离心过滤浓缩,发现过滤速度极慢,费时费力。然后尝试通过超速离心将蛋白复合物直接沉淀,再用小体积溶液重新溶解实现浓缩。我们将 100 mL 初始样品通过超速离心浓缩 100 倍至 1 mL,浓缩样品稀释 50 倍后相当于 2×初始样品;从图 2A 可见,浓缩样品 50 倍稀释后含的靶蛋白量与初始样品的相当,表明超速离心将至少一半的靶蛋白沉淀下来,样品损失不超过 50%,在可接受范围内。然后我们比较初始样品与浓缩样品进行纯化的效率(图 2B),发现浓缩样品经纯化得到的靶蛋白的量明显提高。由此可见,通过超速离心将样品浓

缩后再进行串联亲和纯化可以提高纯化效率。

2.3 TEV 酶的酶切条件优化

影响亲和纯化效率的关键在于两方面, 一是亲和和吸附的特异性与亲和力, 二是洗脱效率。前者主要在于实验设计时选择合适的亲和标签与纯化介质, 后者则取决于实验操作中对洗脱条件的优化。本实验两步亲和纯化分别是用 TEV 酶切将 ProG 标签切除释放出靶蛋白, 以及用生物素置换与链亲和

素琼脂糖珠结合的 SBP 标签。我们对这两个步骤分别进行了优化。

TEV 酶在 4 °C–37 °C 范围都有活性, 为了降低蛋白质降解风险, 需要在保证酶切效率的前提下采用相对低的温度。我们比较了 16 °C 酶切不同时间的效果, 由图 3 可见, 16 °C 酶切 10 h 比 4 h 得到的产物量明显高, 即 10 h 比 4 h 酶切更充分。因此选择 TEV 酶 16 °C 酶切 10 h 作为后续实验的标准参数。

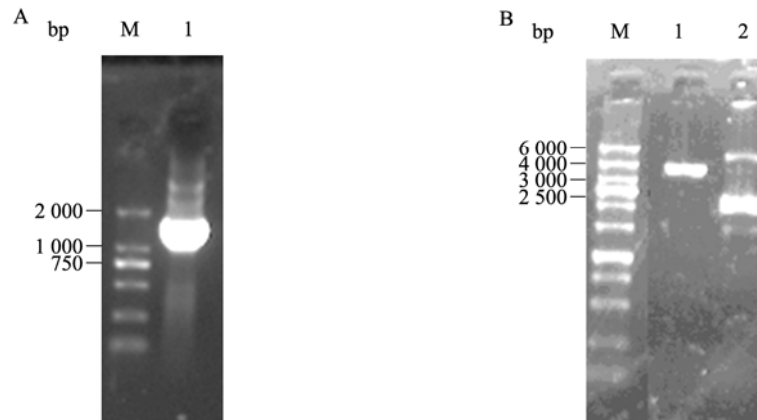


图 1 *groEL* 基因 PCR 扩增电泳图及 pTAP 质粒双酶切电泳图

Fig. 1 Agarosegel electrophoresis of *groEL* gene PCR products and agarosegel electrophoresis of pTAP double digestion

注: A: *groEL* 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳 M: DL2000 DNA marker; 1: *groEL* 基因 PCR 产物。B: pTAP 质粒经 *EcoR* I/*Sph* I 双酶切电泳图 M: DL2000 DNA marker; 1: pTAP 质粒经过酶切后产物; 2: pTAP 质粒本身。

Note: A: Agarosegel electrophoresis of *groEL* gene PCR products; M: DL2000 DNA marker; 1: PCR products of *groEL* gene. B: Agarosegel electrophoresis of pTAP double digestion by *EcoR* I/ *Sph* I; M: DL2000 DNA marker; 1: pTAP double digestion products; 2: pTAP plasmid.

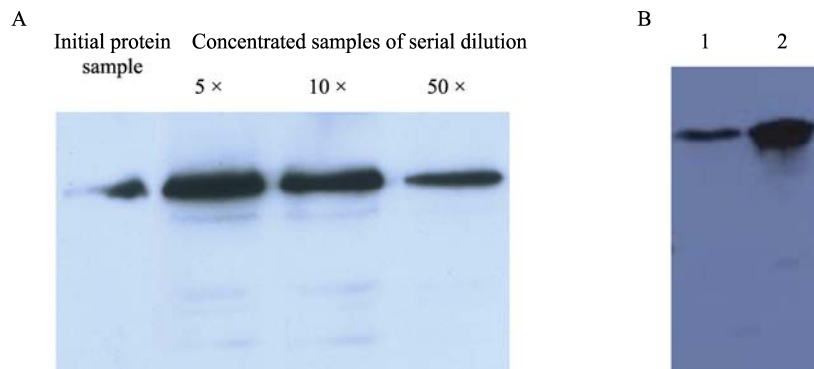


图 2 免疫印迹检测超速离心浓缩蛋白的效果和浓缩前后纯化效率的差异

Fig. 2 Western blotting comparison of samples before/after concentration and of efficiencies of purification when initial and concentrated samples applied

注: A: 初始蛋白样品和超离浓缩后不同稀释倍数的蛋白样品, 用抗 GFP 单克隆抗体进行免疫印迹。B: 1: 初始样品经 IgG 琼脂糖珠纯化的产物; 2: 超离浓缩样品经 IgG 琼脂糖珠纯化的产物; 用 SA-HRP 进行免疫印迹。

Note: A: Initial protein sample and concentrated samples with differential dilution; anti-GFP monoclonal antibodies were used. B: 1: purified product of initial sample by IgG Sepharose; 2: purified product of concentrated sample by IgG Sepharose; SA-HRP were used for Western blotting.

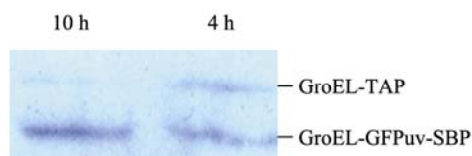


图3 免疫印迹检测 TEV 酶切 4 h 和 10 h 的差异
Fig. 3 Comparison of efficiency of different cleavage time by Western blotting

注: 分别于 TEV 酶 16 °C 酶切 4 h 和 10 h 后取样进行电泳, 用 SA-HRP 检测酶切产物。

Note: Samples were analyzed by electrophoresis and Western blotting with SA-HRP after digestion at 16 °C for 4 h or 10 h.

2.4 链亲和素琼脂糖珠洗脱条件的优化

生物素与 SBP 竞争结合链亲和素, 且生物素的亲和力比 SBP 高一个数量级, 因此可以用生物素溶液特异性洗脱结合在链亲和素琼脂糖珠上的 SBP, 温和地释放含 SBP 标签的靶蛋白复合物。有文献用 1 mmol/L 生物素洗脱链亲和素琼脂糖珠^[7]。考虑到生物素的洗脱原理是竞争性结合, 理论上生物素的浓度越高洗脱效果越好。我们比较了 10 mmol/L (饱和浓度) 和 1 mmol/L 生物素洗脱链亲和素琼脂糖珠的效率, 发现 10 mmol/L 生物素的洗脱效率比

1 mmol/L 高得多(图 4)。因此选择 10 mmol/L 生物素作为进行链亲和素琼脂糖珠洗脱的标准参数。

2.5 伴侣素 GroEL 蛋白的串联亲和纯化

将转化了 GroEL-TAP (GroEL-GFPuv-SBP-TEV-ProG) 融合表达质粒的 O157:H7 培养至对数中晚期, 裂解细菌提取蛋白复合物, 用超速离心浓缩后按上述优化过的条件进行串联亲和纯化。用转化了空质粒 pTAP 的 O157:H7 作为空白对照。纯化产物用 SDS-PAGE 电泳分离分析, 结果见图 5, 空白对照样品不含任何蛋白条带, 实验样品中有 3 个蛋白条带; 将它们切取进行胶内酶切和 MALDI 质谱鉴定。MALDI TOF MS 分析结果表明 3 条蛋白条带的酶解产物中均存在与 GroEL 理论酶解产物相对应的多肽(由图 6 可见)。根据分子量计算, 符号*所指蛋白分子量计算结果与天然的 GroEL 蛋白(57 kD)的分子量相对应, 其上面的一条带可能是天然 GroEL 的某种修饰的蛋白形式; 符号 Δ 所指蛋白的分子量计算结果与融合蛋白 GroEL-GFP-SBP (85 kD) 的分子量相对应。纯化产物中之所以含有天然的 GroEL, 是因

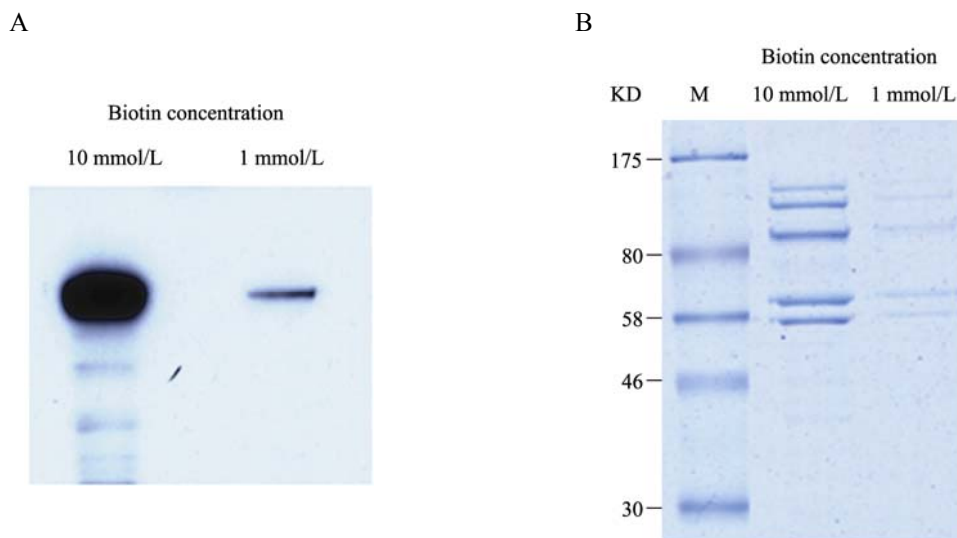


图4 免疫印迹与 SDS-PAGE 电泳检测不同浓度生物素洗脱链亲和素琼脂糖珠的效率

Fig. 4 Western blotting and SDS-PAGE analysis of elution effects of 10 mmol/L and 1 mmol/L biotin on tagged proteins bound on Streptavidin Sepharose

注: A: 免疫印迹检测 10 mmol/L 和 1 mmol/L 生物素洗脱结合在链亲和素琼脂糖珠上的标签蛋白的效率。B: SDS-PAGE 电泳检测 10 mmol/L 和 1 mmol/L 生物素洗脱结合在链亲和素琼脂糖珠上的标签蛋白的效率, 凝胶用考马斯亮蓝 G-250 染色。

Note: A: Western blotting analysis of eluted proteins with SA-HRP. B: SDS PAGE analysis of eluted proteins, stained with Coomassie Brilliant blue G-250.

为在大肠杆菌自身的 *groEL* 基因仍正常表达, 而且生理状态下 GroEL 是以多聚体的形式存在^[8]。此结果表明 TAP 标签没有破坏 GroEL 多聚体的形成, 带标签的 GroEL 可以和天然的 GroEL 形成嵌合型多聚体复合物; 同时表明本文建立的样品提取和串联亲和纯化方法得到的是天然状态复合物。

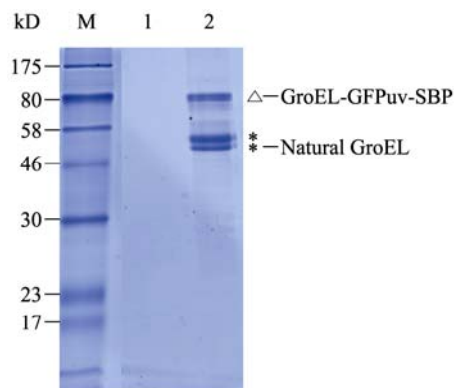


图 5 GroEL-TAP 的串联亲和纯化产物的电泳图

Fig. 5 SDS PAGE analysis of tandem affinity purification products of samples containing tagged protein GroEL-TAP

注: M: 预染蛋白分子量 Marker; 1: 空载体对照样品的 TAP 产物; 2: 含 GroEL-TAP 样品的 TAP 产物. 凝胶用考马斯亮蓝 G-250 染色.

Note: M: prestained molecular weight marker; 1: TAP product of sample from control (expressing blank vector); 2: TAP product of sample containing GroEL-TAP. Stained with Coomassie Brilliant blue G-250.

3 讨论

由于 TAP 技术可以得到高纯度的、近似生理条件下的蛋白质复合物, 在蛋白质相互作用研究中的应用正越来越多。本实验室构建了原核表达的串联亲和标签载体, 用来寻找诱饵蛋白参与形成的复合物, 并且对串联亲和纯化过程中的相关实验条件进行了探索和优化。

分离纯化复合物的关键之一是用温和的、非变性的方法裂解细胞并提取蛋白复合物, 因为变性条件(比如强变性剂和超声等强烈的物理作用)会导致复合物解离。为此我们采用了溶菌酶消化细胞壁, 渗透压休克的方法裂解细菌制备复合物样品。然后对串联亲和纯化过程的关键参数进行了逐一优化。首先是发现在大体积、低浓度的蛋白样品中诱饵蛋白与琼脂糖珠的结合效率很低。于是我们通过超速离心对样品进行沉淀浓缩, 大大提高了诱饵蛋白与琼脂糖珠的结合效率, 进而提高了最终纯化产物的量。然后对串联亲和纯化第一步的洗脱条件即 TEV 酶酶切进行了摸索, 确定了 16 °C/10 h 为适合的 TEV 酶酶切条件。其次考察了对第二步洗脱条件即生物素浓度进行了优化, 确定用 10 mmol/L 的生物素比文献报道的 1 mmol/L 的洗脱效率高。最

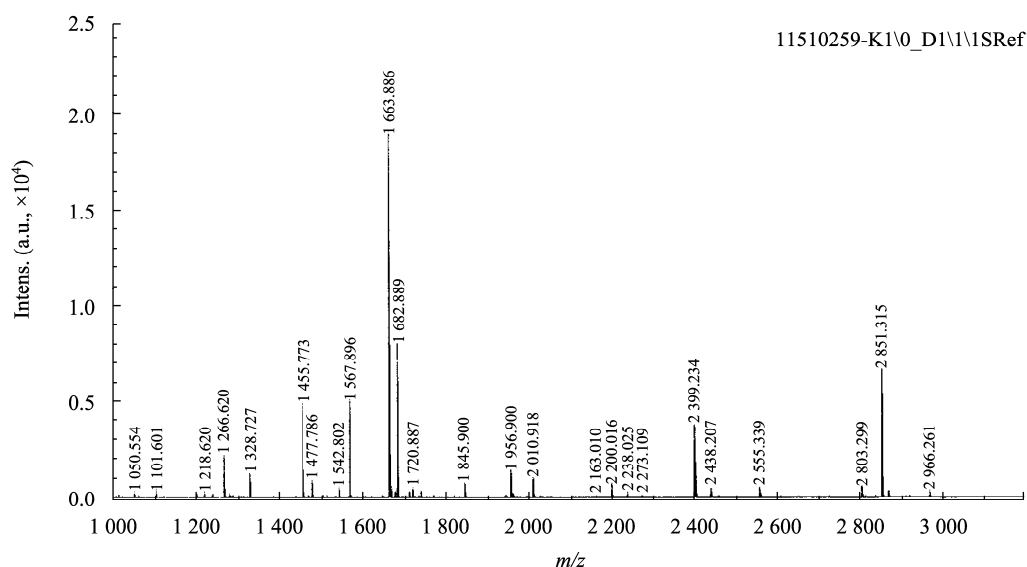


图 6 GroEL 蛋白的 MALDI 质谱图
Fig. 6 MALDI-TOF-MS spectrum of GroEL

后,用本文建立的方法纯化了在大肠杆菌 O157:H7 中表达的标签融合蛋白 GroEL-TAP 参与形成的复合物,得到了带标签的 GroEL 与天然 GroEL 形成的嵌合型多聚体复合物。最终的纯化产物中不含任何杂蛋白,而且以只表达 TAP 标签的空载体作为对照进行纯化产物中没有任何蛋白,这表明纯化的特异性非常好。

综合上述结果,我们成功建立了完整的串联亲和纯化技术。用我们构建的载体可以表达融合了串联亲和和标签的靶蛋白,以温和的方法制备蛋白质复合物样品,并通过串联亲和纯化得到高纯度的靶蛋白参与形成的复合物。这为我们后续寻找致病病毒蛋白参与形成的复合物奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 1030-1032.
- [2] Gully D, Moinier D, Loiseau L, et al. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification[J]. *FEBS Lett*, 2003, 548(1/3): 90-96.
- [3] Butland G, Peregrín-Alvarez JM, Li J, et al. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2005, 433(7025): 531-537.
- [4] Xu XL, Song Y, Li YH, et al. The tandem affinity purification method: an efficient system for protein complex purification and protein interaction identification[J]. *Protein Expr Purif*, 2010, 72(2): 149-156.
- [5] Meima ME, Weening KE, Schaap P. Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium*[J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(2): 283-288.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 1723-1726.
- [7] Bürckstümmer T, Bennett KL, Preradovic A, et al. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells[J]. *Nat Methods*, 2006, 3(12): 1013-1019.
- [8] Xu Z, Sigler PB. GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine[J]. *J Struct Biol*, 1998, 124(2/3): 129-141.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下,希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写 s , 不用 *SD*。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 *S E*。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希腊文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。