

研究报告

重组人 BMP6 在大肠杆菌中可溶表达、纯化及活性分析

雷荣悦, 乔玉欢, 闫继东, 杨爽, 朱天慧

南开大学医学院分子遗传学实验室, 天津 300071

摘要: BMP6 是一种调节成骨细胞和成软骨细胞分化的骨诱导因子, 在修复各种骨缺损方面具有很好的应用潜力。有诱导活性的 BMP6 是多二硫键的二聚体蛋白, 疏水性极强容易聚集沉淀。为了在大肠杆菌中可溶表达具有生物活性的重组人 BMP6(rhBMP6), 构建了具有 TRX、GST、MBP、CBD 融合标签和 His₆ 标签的 rhBMP6 成熟肽原核表达载体, 调节诱导温度和 IPTG 浓度, 比较不同融合标签和诱导条件对目的蛋白表达量和溶解性的影响。结果表明, MBP 最能有效的增强 rhBMP6 的溶解性, 诱导条件对溶解性影响较小。大肠杆菌 BL21 *trxB*(DE3) 这种硫氧还蛋白还原酶缺陷菌株为 rhBMP6 二硫键在胞质中形成提供了合适的氧化还原环境。MBP 和 BL21 *trxB*(DE3) 相结合在细胞质中高效可溶表达出了 BMP6 融合蛋白二聚体。表达产物经亲和层析和凝胶排阻层析纯化后, 能诱导成肌细胞系 C2C12 向成骨细胞方向转化。

关键词: BMP6, MBP, BL21 *trxB*(DE3), 可溶性

Soluble Expression of Recombinant Human BMP6 in *Escherichia coli* and Its Purification and Bioassay *in Vitro*

Rongyue Lei, Yuhuan Qiao, Jidong Yan, Shuang Yang, and Tianhui Zhu

Laboratory of Medical Molecular Genetics, College of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: BMP6 is a potent protein for future treatment strategies of bone regeneration as it is a very important regulator of bone homeostasis. Active BMP6 is a dimer containing multidisulfide bonds and is a highly hydrophobic protein prone to aggregation. To obtain soluble and active BMP6 in *Escherichia coli*, we compared the effects of four N-terminal fusion tags (TRX, GST, MBP and CBD) and N-terminal His₆-tag. The expression and solubility were tested under the different conditions (expression hosts, temperatures and inducer concentrations). A series of experiments leads to the finding that the placement of MBP before the BMP6 is best in availing the soluble expression of the protein. Our study also demonstrates that in *E. coli* BL21*trxB*(DE3) cytoplasm, which is a thio-redoxin reductase mutant strain, soluble homodimeric BMP6 can be formed. The overexpressed MBP-BMP6 fusion protein is purified by chromatography, and shown to be functionally active.

Keywords: BMP6, MBP, BL21 *trxB*(DE3), solubility

BMPs(bone morphogenetic proteins) 是通过 Urist 等人的实验发现的, 他们将脱钙牛骨植入肌肉及皮下成功地诱导了异位成骨, 由此认为骨基质中

存在一种诱导骨形成的物质, 将其命名为骨形态发生蛋白(BMPs)^[1]。经过近 20 年的研究, 人们从人和动物骨组织、成骨肉瘤中相继分离和纯化出 21 种

Received: June 26, 2007; Accepted: August 16, 2007

Supported by: the Tianjin Natural Science Foundation (No. 05YFJMJC01800).

Corresponding author: Tianhui Zhu. Tel: +86-22-23509842; E-mail: zhuth@nankai.edu.cn

天津市自然科学基金资助 (No. 05YFJMJC01800)。

BMPs。BMPs 是一类结构和功能相似的多肽因子家族, 能够诱导血管周围游动的未分化间充质细胞向骨系细胞方向转化, 在骨骼(原位)或骨骼以外组织中(异位)产生新骨^[2,3]。BMPs 首先被合成包含 N 端疏水分泌性引导序列、中间区域的前肽和 C 端的成熟肽区域的前体蛋白, 通过 3 对链内二硫键一对链间二硫键形成同源或异源二聚体, 经过糖基化、酶切释放出成熟肽二聚体来发挥其生物学功能。

BMP6 是 BMPs 家族的一员, 基因定位于人第 6 条染色体上, cDNA 全长为 2943bp, 开放读码框为 1539 bp, 编码一个 513 氨基酸残基的多肽。蛋白水解酶的作用下产生含 140 个氨基酸残基的成熟肽, 相对分子量约为 15.6 kD, pI 为 8.6。作为一种骨诱导因子, BMP6 能启动软骨细胞成熟, 诱导间充质细胞向成软骨细胞方向分化, 是软骨细胞分化的一个自分泌刺激因子。与 BMPs 家族其他成员相比, BMP6 以软骨内和膜内成骨方式产生很强的骨诱导作用^[4,5]。BMP6 的生物学作用不仅限于骨的生成, 还参与心脏、肝脏、胰腺及小肠等多个器官的发育。

骨组织中 BMPs 含量低, 提取工艺复杂, 产物纯度有限, 难以适应科学研究和临床应用的需要; 真核表达系统制备产物活性相对较高, 但表达量低、生产成本低、周期长; 大肠杆菌是目前基因工程中应用最为广泛的宿主细胞, 可以以极高的水平表达外源蛋白, 但外源蛋白往往错误折叠以没有生物活性的包涵体形式存在, 必须将其经过变性复性的处理才有可能得到具有生物活性的目的蛋白, 工序繁琐而且最终的产率很低^[6]。在大肠杆菌中可溶表达 BMPs 一直是研究者的期望和挑战。

本研究旨在通过与溶解性高的多肽序列融合表达来提高目的蛋白的表达量和改善目的蛋白的溶解性, 同时调整诱导温度和 IPTG 浓度, 分析诱导条件的改变对蛋白表达量和溶解性的影响, 筛选能高效可溶表达有生物活性的 rhBMP6 的表达载体和宿主菌, 并将表达产物进行纯化和生物活性的检测, 为进一步的研究及临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒, 菌株和细胞株

质粒 pGEX-BMP6, pET-15b-BMP6 由本室构建, pET-32a 由本室保存, pMAL-c2X, pMAL-p2X,

pTWIN1 购自 New England Biolabs。菌株 DH5 α 、XL1-blue、BL21(DE3)、BL21(DE3) 本室保存, TB1、ER2566 购自 New England Biolabs, LB 培养基。C2C12 细胞本室保存, 在 10% FBS 的 DMEM 中培养, 培养条件为 5% CO₂, 37℃。

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自大连宝生物公司, Xa 因子购自 New England Biolabs 公司, DNA 胶回收试剂盒、质粒制备试剂购自 OMEGA 公司, ECL Western Blot 检测试剂盒购自 Pharmacia 公司, Anti-BMP6 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, Anti-goat IgG-HRP 二抗购自美国 Promega, 碱性磷酸酶活性测定试剂盒、BSA、DOC、DTT、Glycine、Urea、TritonX-100、等购自 Sigma 公司, 透析袋、超滤膜、超滤管等购自美国 Millipore 公司, IPTG 购自 TaKaRa(大连)公司, Superdex-75 10/300GL 购自美国 GE Healthcare Inc, Amylose Resin 购自 New England Biolabs 公司。

1.3 表达载体的构建

提取人胎盘组织 mRNA, oligo(dT)₁₈ 反转产物作模板, PCR 扩增人 BMP6 成熟肽 DNA 片段(1299~1718 nt, GenBank accession No. NM001718), 反应产物按 DNA 胶回收试剂操作说明进行纯化回收, 构建 pGEX-BMP6, pET-15b-BMP6 重组质粒, 本室已完成。分别双酶切 pGEX-BMP6, pET-15b-BMP6 重组质粒, 获得 BMP6 成熟肽 cDNA 片段, 分离纯化后将其连接到 pET-32a, pMAL-c2X, pMAL-p2X, pTWIN1 载体上, 酶切鉴定重组质粒。

1.4 诱导表达和可溶性比较

重组质粒转化 *E. coli* 感受态细胞, 次日挑单菌落 37℃ 培养过夜, 第 3 d 按 1:100 放大至 200 mL 的 LB 培养基中, 在 OD₆₀₀ 值达到 0.5 左右时, 加不同浓度 IPTG, 不同的温度下诱导表达, 离心收集菌体细胞。按培养物: 裂解液=10:1 比例加入预冷的裂解液(50 mmol/L Tris-Cl; pH 7.4; 200 mmol/L NaCl; 0.5 mmol/L EDTA), 充分重悬细胞。20% 能量输出条件下, 冰浴中超声破碎细胞 20 次, 每次 40 s, 期间间隔 30 s, 观察细菌悬液外观由浊状变成透明状, 表示菌体基本破碎完全。4℃ 离心 12 000 r/min 30 min 菌体裂解物及裂解物上清和沉淀经 SDS-PAGE 电泳考马斯亮蓝染色, 比较诱导产生的目标产物存在于上清中还是沉淀中, 从而比较目标蛋白在各种不同的表达

表 1 大肠杆菌表达载体的构建

Table 1 Schematic representation of constructs cloned into various vectors for expression in *E. coli*

Recombinant plasmid	Restriction endonuclease	Fusion protein	Expression host	Fusion size (kD)	Characteristic
pGEX-5X-BMP6	<i>EcoR I/Xho I</i>	GST	DH5a	26	Glutathione, efficient translation initiation
pMAL-c2X-BMP6	<i>EcoR I/Xba I</i>	MBP	TB1	42	High-level expression, a one-step purification using MBP's affinity for maltose
pMAL-p2X-BMP6	<i>EcoR I/Xba I</i>	MBP	TB1	42	The signal peptide on pre-MBP directs fusion proteins to the periplasm allowing folding and disulfide bond formation
pET-15b-BMP6	<i>Nco I/Xho I</i>	6 ⁺ His	BL21(DE3)	2.4	Ni-NTA purification, small and easy to add
pET-32a-BMP6	<i>Nco I/Xho I</i>	TRX	BL21(DE3)	20	Efficient translation initiation, enhance solubility
pTWIN1-BMP6	<i>Nco I/Xho I</i>	CBD-Intein	ER2566	30	Chitin bead resin purification, pH- and temperature-dependent cleavage of the intein

系统中的溶解性。通过电泳胶薄层扫描所显示的目标蛋白的量占菌体蛋白总量的百分数比较表达水平。

1.5 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

采用 Tris-Tricine 系统进行还原/非还原 SDS-PAGE 电泳。将经过不同条件处理后的蛋白溶液按常规进行电泳(120 V, 160 min)电泳完毕后考马斯亮蓝染色,蛋白质条带及其浓度通过 Univ 凝胶成像系统成像和 Unvi 分析系统扫描检测进行分析。SDS-PAGE 电泳结束后电转移到硝酸纤维素膜上,用含有 5%脱脂牛奶的 TBST 缓冲液封闭过夜。分别用一抗 anti-BMP6 多克隆抗体和带有辣根过氧化物酶的二抗 anti-goat IgG 孵育 2 h, 然后用 ECL 法进行曝光。

1.6 融合蛋白 MBP-BMP6 的纯化及 Factor Xa 酶切鉴定

目的蛋白 BMP6 与 MBP 融合表达, 因此可以被 Amylose 亲和柱吸附, 然后用麦芽糖洗脱。收集上清将其通过 0.45 μm 滤膜, 在 4 °C 条件下将其上样流经 Amylose 亲和柱, 用 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡柱子, 然后在上述缓冲液中加入 10 mmol/L 麦芽糖洗脱目的蛋白质。收集洗脱峰, 得到融合蛋白的初步纯化产物, 测定蛋白浓度并超滤浓缩。选用 Superdex-75 10/300GL 预装柱, 用起始缓冲液充分平衡。层析条件: 流速为 0.2 mL/min。上样体积为 1.5 mL, 洗涤两倍柱体积, 280 nm 检测蛋白峰。采用部分收集仪收集洗脱峰, 每管收集 1 mL, SDS-PAGE 检测收集蛋白。

由于在融合蛋白 MBP-BMP6: 连接处设计有 Factor Xa 的酶切位点, 所以可以用 Factor Xa 酶切融合蛋白得到 BMP6。Factor Xa 与融合蛋白 MBP-BMP6 以 0.5:100 的质量比混合, 4°C 摇晃酶切 48 h。

1.7 碱性磷酸酶的活性测定

有文献报导, 鼠成肌细胞系 C2C12 在 BMPs 的刺激培养下, 能够改变分化方向, 由成肌分化转变成成骨分化, 而碱性磷酸酶是成骨细胞的标志酶。C2C12 细胞接种于生长培养基 DMEM 中, 在 37 °C, 5%的 CO₂ 培养箱中培养。待细胞 80%~90%长满时, 添加不同浓度纯化样品继续刺激培养 5 d 后, MTT 法计数活细胞, 再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每孔加入 50 μL 碱性磷酸酶反应底物溶液, 室温孵育 20 min, 在 405 nm 波长测定 OD 值, 结果除以活细胞数以标准化结果, 每组样品取 6 个复孔的平均值, 并用 Microsoft Excel 做图分析。

2 结果

2.1 表达载体在不同诱导条件下表达及可溶性检测

外源蛋白表达速率过快是包涵体形成的因素之一, 一方面通过与亲水性的分子伴侣融合表达改善目的蛋白可溶性表达; 另一方面改善培养条件, 主要是降低两个重要参量: 温度和诱导强度, 降低诱导剂浓度和降低培养温度都可以降低目的蛋白的表达速率, 从而改善目的蛋白的可溶性表达。

GST 融合表达的蛋白约占菌体总蛋白 30%。经超声破碎细胞离心收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果发现上清中几乎没有 GST-BMP6 融合蛋白, 绝大部分以包涵体形式存在, 本室已完成^[7]。

BL21(DE3)/ pET-15b-BMP6 经不同 IPTG 浓度和诱导温度培养后, 作 SDS-PAGE 电泳。与未诱导菌比较出现一条明显的诱导蛋白带, 电泳胶薄层扫描显示所表达的目的蛋白约占菌体总蛋白的 10%, 并以包涵体形式存在。相比较, BL21(DE3)/ pET-32a-BMP6 诱导表达后融合蛋白表达量很大,

约占菌体总蛋白的 80%, 但也是以包涵体形式存在。改变诱导的时间和温度条件对于所诱导的目的蛋白的可溶性和产量没有什么变化(图 1)。

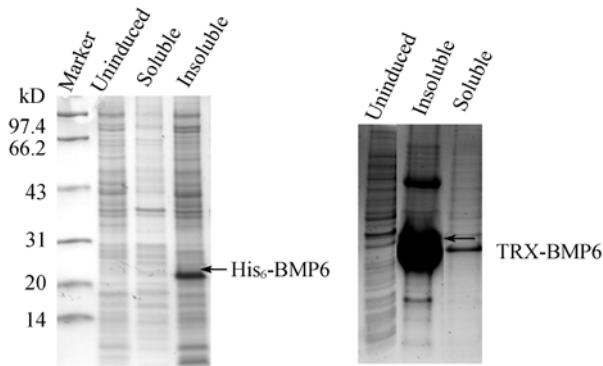


图 1 SDS-PAGE 分析 0.1 mmol/L IPTG 20 °C 条件下 pET-15b-BMP6、pET-32a-BMP6 转化 *E. coli* BL21(DE3) 表达蛋白的溶解性

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of soluble and insoluble protein fractions of pET-15b-BMP6, pET-32a-BMP6 obtained from *E. coli* BL21(DE3) with 0.1 mmol/L IPTG at 20 °C

pMAL-p2X-BMP6 转化 *E. coli* TB1 分别在 20°C、37°C 下, 不同浓度的 IPTG 诱导表达。由图看到, 在其它条件一定的情况下 20°C 诱导表达的目标蛋白比 37°C 条件下多; 融合蛋白量并不随 IPTG 浓度的增大而增多, 0.3 mmol/L 时诱导量就达到最大(图 2, lane 4)。电泳胶薄层扫描显示融合蛋白约占菌体总蛋白 5%。超声破碎细胞离心分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果发现大部分 MBP-BMP6 融合蛋白存在于上清中(图 3)。

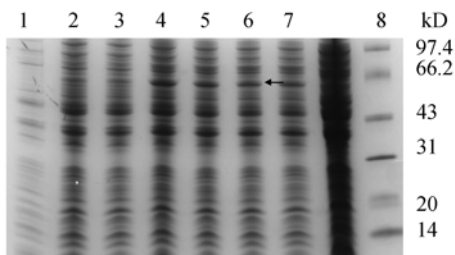


图 2 诱导温度和 IPTG 浓度对 pMAL-p2X-BMP6/TB1 表达融合蛋白的影响

Fig. 2 Influence of induction temperature, inducer concentration on the expression of soluble MBP-BMP6 from the pMAL-p2X-BMP6 in TB1

1: cell extract of uninduced; 2,3 (37°C, IPTG 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L): cell extract of *E. coli* induced; 4,5,6,7(20°C, IPTG 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.5 mmol/L): cell extract of *E. coli* induced; 8: molecular weight markers

由于 pMAL-p2X-BMP6 载体表达得到的 MBP-

BMP6 融合蛋白含量不高, 我们将 pMAL-c2X-BMP6 转化 TB1, SDS-PAGE 电泳结果看到与未诱导菌比较, 在分子量约 57 kD 处出现一条明显的诱导蛋白带, 同预期 MBP-BMP6 融合蛋白大小一致。电泳胶薄层扫描显示所表达的新蛋白约占菌体总蛋白 30%, 大部分 MBP-BMP6 融合蛋白存在于上清中(图 4)。

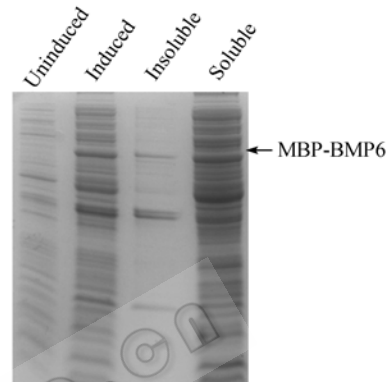


图 3 SDS-PAGE 分析 pMAL-p2X-BMP6 表达融合蛋白 MBP-BMP6 的溶解性

Fig. 3 Analysis of MBP-BMP6 fusion protein expression from the pMAL-p2X-BMP6 using SDS-PAGE

1: cell extract of uninduced *E. coli*; 2: cell extract of *E. coli* after inducing the expression of MBP-BMP6 with IPTG 0.3 mmol/L at 20°C. 3: insoluble fraction of the *E. coli* broken with sonication; 4: soluble fraction of sonicated *E. coli*

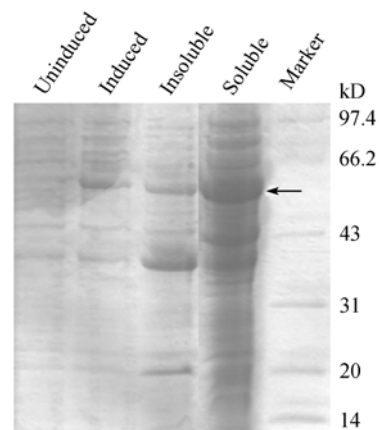


图 4 0.3 mmol/L IPTG 30°C pMAL-c2X-BMP6/TB1 诱导表达 MBP-BMP6 融合蛋白

Fig. 4 Expression of the recombinant MBP-BMP6 from the pMAL-c2X-BMP6 with 0.3 mmol/L IPTG at 30°C in TB1

pTWIN1-BMP6/ER2566 分别在 20°C、30°C、37°C 下, IPTG 浓度分别是 0.3 mmol/L, 0.1 mmol/L 诱导表达。如图 5 所示, 在不同诱导条件下得到的目标蛋白都是以包涵体形式存在。随着诱导温度的

降低诱导表达的融合蛋白的表达量明显也随之降低, 而相同温度下 IPTG 浓度的改变对蛋白的表达量影响不大; 诱导条件的改变对融合蛋白的可溶性改变不大。

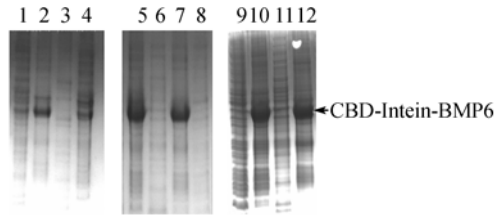


图 5 诱导温度和 IPTG 浓度对 pTWIN1-BMP6/ER2566 表达融合蛋白的影响

Fig. 5 Influence of induction temperature, IPTG concentration on the expression of CBD-Intein-BMP6 from the pTWIN1-BMP6 in ER2566

1,3 (20°C, IPTG 0.3 mmol/L, 0.1 mmol/L): soluble fraction of sonicated cells; 2,4: insoluble fraction; 5,7(30°C, IPTG 0.3 mmol/L, 0.1 mmol/L): soluble fraction of sonicated cells; 6, 8: insoluble fraction; 9,11(37°C, IPTG 0.3 mmol/L, 0.1 mmol/L): soluble fraction of sonicated cells; 10, 12: insoluble fraction

表 2 六种融合蛋白在不同诱导条件下表达水平和溶解性比较

Table 2 Expression and solubility levels of rhBMP6 when expressed as six different gene fusions under different induction conditions

Recombinant plasmid	Temperature /°C	IPTG concentration /(mmol/L)	Expression level	Solubility level
pGEX-5X-BMP6	37	0.3	++	0
	20	0.3	+	0
pET-15b-BMP6	30	0.3	+	0
	37	0.3	+	0
	20	0.1	+++	+
	20	0.3	+++	0
pET-32a-BMP6	30	0.1	+++	0
	30	0.3	+++	0
	37	0.1	+++	0
	20	0.3	+++	0
pTWIN1-BMP6	30	0.1	++	0
	30	0.3	++	0
	37	0.1	+++	0
	37	0.3	+++	0
	20	0.3	+	+++
	20	0.5	+	+++
pMAL-p2X-BMP6	37	1.0	+	+++
	37	1.5	+	+++
	37	0.3	0	0
pMAL-c2X-BMP6	37	0.5	0	0
	30	0.3	++	+++

Expression levels given as: +++=strongest band on SDS-PAGE gel; ++=among the strongest bands, +=visible band. Solubility levels given as: +++=majority in soluble fraction, ++=minority in soluble fraction but among the strongest bands, +=visible band, 0=nothing in soluble fraction

以上对 6 个表达系统的 BMP6 表达情况比较表明: pMAL-c2X-BMP6 表达载体可以获得高表达且

溶解性好的融合蛋白。pMAL-p2X-BMP6 表达的融合蛋白溶解性较好, 但与细胞质表达相比, 周质表达的水平要低得多。pET-32a-BMP6, pTWIN1-BMP6 载体蛋白表达量都很可观, 都是以包涵体的形式存在, 降低诱导温度和诱导剂浓度, 对融合蛋白的可溶性改变不大。由此说明, 在增加表达产物的可溶性方面, 融合标签的作用是最主要的。一般来说, 随着诱导温度或诱导剂浓度降低, 蛋白表达量也会降低而蛋白溶解性将会提高, 但也有例外。如 pMAL-p2X-BMP6 载体, 20°C 诱导表达的目标蛋白要比 37°C 条件下多, 而对于 pET-15b-BMP6 来说, 诱导条件的改变, 对目标蛋白表达无论是从表达量还是溶解性来看都没有较大的改变。

2.2 MBP-BMP6 融合蛋白纯化及 Western blot 鉴定
上清液经过 Amylose 亲和层析柱, 用 Elution Buffer 洗脱收集洗脱峰, 如图 6 所示, 可见一明显单一洗脱峰, SDS-PAGE 电泳如图 7。

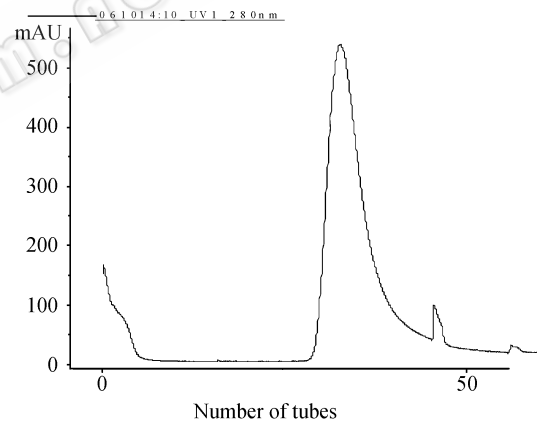


图 6 Amylose 亲和纯化 MBP-BMP6 融合蛋白的洗脱图
Fig. 6 Elution profile of MBP-BMP6 fusion protein from Amylase resin with maltose

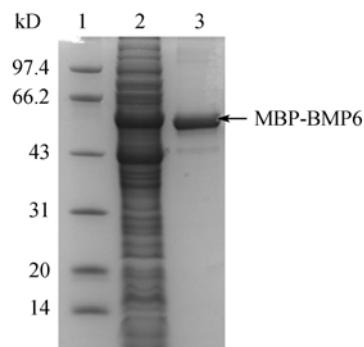


图 7 Amylose 亲和层析纯化 MBP-BMP6 电泳分析
Fig. 7 Analysis of MBP-BMP6 fusion protein from amylose resin
1: molecular weight markers; 2: soluble fraction of sonicated cells; 3: purified fusion protein from amylose resin

亲和层析柱吸附融合蛋白特异性很强, 但仍有少量杂蛋白, 将该亲和产物再经过 Superdex-75 10/300GL 凝胶过滤分离(图 8), 去掉了降解或者是内源性表达的 MBP 产物, SDS-PAGE 分析表明, 纯度达到 95% 以上(图 9)。Western blot 显示在分子量约 58 kD 处有一明显条带, 再一次证实了诱导 MBP-BMP6 融合蛋白的正确表达。

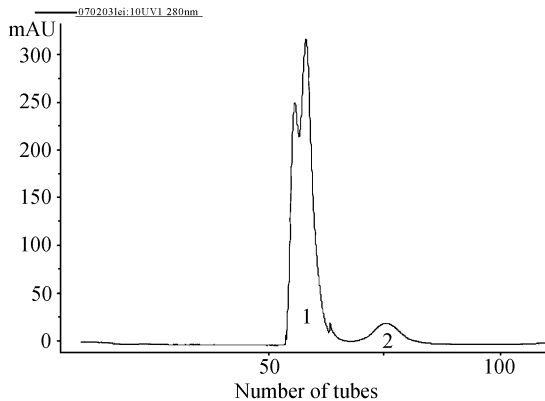


图 8 Superdex-75 10/300GL 凝胶层析蛋白洗脱图

Fig. 8 Superdex-75 10/300GL chromatography

1: the purified fusion protein; 2: MBP and degradation products

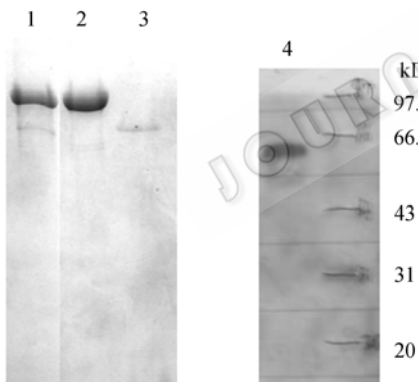


图 9 Superdex-75 10/300GL 凝胶层析纯化后 MBP-BMP6 电泳分析及 Western blot 鉴定

Fig. 9 Analysis of final purified fusion protein from Superdex-75 10/300GL chromatography using SDS-PAGE.

1: the affinity column elution contained predominantly MBP-BMP6 fusion protein and MBP; 2: the first peak fraction resulting contained MBP-BMP6 fusion protein; 3: the second peak fraction contained MBP; 4: Western blot analysis of MBP-BMP6

2.3 MBP-BMP6 融合蛋白二聚体的形成及三种宿主菌表达 MBP-BMP6 的比较

BMP6 成熟肽由二硫键连接形成同源二聚体或异源二聚体来发挥其生物功能。细菌细胞质是还原状态的空间, 不利于二硫键的形成。BMP6 和 MBP 融合表达提高溶解性, 但是并没有形成有生物活性

的构象。因此, 有必要创造一些有助于折叠的条件来完善 MBP 的作用。将 pMAL-c2X-BMP6 转化三种大肠杆菌宿主菌 XL1-blue、TB1、BL21*trxB*(DE3), 比较不同宿主菌对融合蛋白 MBP-BMP6 表达及纯化的影响。

MBP-BMP6 在 XL1-blue、TB1 两种宿主菌中的表达没有明显不同, 表达量和溶解性都相当, 但是在随后的 Amylose 亲和纯化时 TB1 表达的融合蛋白和亲和树脂结合的量要远远大于 XL1-blue 表达的 MBP-BMP6。表明蛋白纯化的效率与宿主菌的选择有很大的关系, 不同的宿主菌表达产生的蛋白折叠状态有可能不同, 导致构象不同, 因此和亲和层析柱结合的能力就有差异。

MBP-BMP6 在 TB1、BL21*trxB*(DE3)两种宿主菌中的表达就有明显不同。BL21*trxB*(DE3)是一种硫氧还蛋白还原酶突变的菌株, 有利于胞质中二硫键的形成, 为具有二硫键的外源蛋白质在大肠杆菌中正确的折叠提供了有效的环境。BL21*trxB*(DE3)表达的融合蛋白 MBP-BMP6 有二聚体形式出现, 相比较 TB1 表达的融合蛋白几乎都是以单体的形式存在(图 10)。

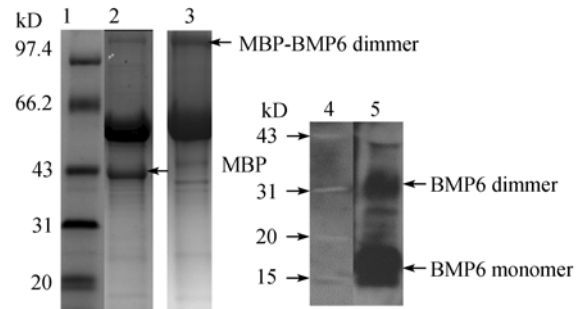


图 10 TB1 和 BL21*trxB*(DE3)表达的 MBP-BMP6 亲和纯化后电泳分析

Fig. 10 Soluble fusion protein expressed in TB1 and BL21*trxB*(DE3) from the affinity column elution.

1: molecular weight markers; 2: fusion protein expressed into TB1; 3: fusion protein expressed in BL21*trxB*(DE3); 4: molecular weight markers; 5: SDS-PAGE followed by Western blot analysis with an anti-BMP6 of MBP-BMP6 in BL21*trxB*(DE3) after digesting by Factor Xa

从图 10 中我们也可以观察到, TB1 表达的蛋白在 MBP 附近(MW 42.5 kD)有一条蛋白带, 可能源于融合蛋白的表达中止或融合蛋白的降解, 在以往的实验中试图减少 MBP 比较困难。然而, BL21*trxB*(DE3)的蛋白在 MBP 位置处蛋白条带不

很明显。有研究表明, 蛋白折叠正确或者开始正确折叠就不容易产生降解, 而目的蛋白翻译中断或者折叠成不正确的构象就易于被降解。

另一重要的现象就是相比 TB1 表达蛋白, BL21 *trxB*(DE3)表达的融合蛋白稳定性大大增强。来自 TB1 的 MBP-BMP6 在 4℃ 放置超过 72 h 会发生聚集现象。对其分别进行还原和非还原 SDS-PAGE 分析, 在非还原状态下大分子量的物质聚集在胶的上端(图 11), 说明 MBP-BMP6 的稳定性很差, 蛋白质这种聚集现象给下一步的纯化带来很大的障碍。而 BL21 *trxB*(DE3)表达的融合蛋白聚集沉淀的现象有明显的改善, 在 4℃ 放置超过一周也看不到有明显的丝状聚集。

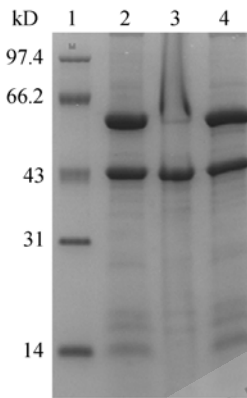


图 11 TB1 来源的融合蛋白稳定性和溶解性分析

Fig. 11 Stability and solubility analysis of fusion protein from TB1 using SDS-PAGE.

1: molecular weight marker; 2: fusion protein from the affinity column recently; 3: fusion protein for a week without DTT; 4: fusion protein for a week with DTT

从结果可以看出, 将 pMAL-c2X-BMP6 和 BL21 *trxB*(DE3)菌株组合有助于 MBP-BMP6 正确的折叠, 避免了融合蛋白的降解和聚集沉淀。

表 3 200mL pMAL-c2X-BMP6/BL21 *trxB*(DE3)菌液 MBP-BMP6 纯化效率

Table 3 Purification of the recombinant MBP-BMP6 from the pMAL-c2X-BMP6 in BL21 *trxB*(DE3) grown in 200mL LB/AMP

Purification step	Total Volumn/mL	MBP-BMP6 mass/mg	Recovery /%	MBP-BMP6 purity/%
The supernatant after sonication	20	20	100	30
Amylose affinity	10	6	30	70
Superdex-75 10/300GL chromatography	34	3	15	> 96

2.4 BL21 *trxB*(DE3), TB1 表达的 MBP-BMP6 生物活性的比较

结果显示, BL21 *trxB*(DE3)表达的 MBP-BMP6 刺激后 C2C12 细胞中碱性磷酸酶活有明显升高, 且表现出明显的剂量依赖型, 当蛋白浓度达到 1200 ng/mL 时, 碱性磷酸酶活性是 TB1 来源融合蛋白的四倍, 这表明其具有一定的生物学活性, 而 TB1 来源的融合蛋白刺激的细胞碱性磷酸酶活性却没有变化。

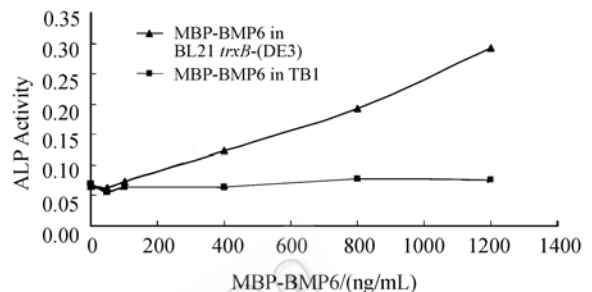


图 12 BL21 *trxB*(DE3)和 TB1 来源 MBP-BMP6 的生物活性比较

Fig. 12 Biological activity of purified MBP-BMP6 from BL21 *trxB*(DE3) and TB1 tested by the induction of alkaline phosphatase activity in C2C12 cells

3 讨论

利用基因工程技术获得目的蛋白无疑是比较理想的手段, 人们采用了各种手段来尝试 BMPs 的可溶性表达, 但在大肠杆菌中表达无一例外的形成不溶聚合体, 且复性效率不高。包涵体的形成主要是蛋白高水平表达的结果, 即合成速度太快, 以至于没有足够的时间进行折叠; 含二硫键较多的重组蛋白而言, 细胞质内的还原环境不利于二硫键的形成; 重组蛋白在大肠杆菌中表达时, 缺乏一些蛋白折叠过程中所需要的酶和辅助因子, 如折叠酶和分子伴侣等, 是包涵体形成的又一原因。

融合标签技术是 20 世纪末兴起的一种基于报告基因的重组 DNA 技术, 在重组蛋白质的纯化、目的蛋白质的检测和定向固定、体内生物事件的可视化、提高重组蛋白质的产量和增强重组蛋白质的可溶性及稳定性等方面有很大的应用价值^[8-10]。本研究通过比较 BMP6 跟不同标签融合表达的情况, 得出 MBP 提高 rhBMP6 溶解性的作用比 GST、TRX 等都强; 降低诱导温度和诱导剂的浓度, 对融合蛋白的可溶性改变不大。由此说明, 在增加表达产物的可溶性方面, 融合标签的作用是最首要的, 培养条件的影响是其次的。对于 MBP 的作用机制有研究

表明,它是作为一种分子伴侣来阻止融合蛋白的折叠中间肽之间聚集沉淀。新生的融合蛋白存在一种折叠中间体的形式即标签部分已经折叠正确,而目的蛋白部分还没有折叠完全,接下来有两条途径,如果目的蛋白接下来能折叠成其天然的构象,那么整个融合蛋白就会呈现可溶的天然的结构;另一种情况是如果目的蛋白不能折叠成天然构象,目的蛋白之间就会相互聚集形成包涵体。折叠中间体的命运在很大程度上取决于其在细胞中的浓度,浓度低就不容易聚集沉淀。对于 MBP 融合蛋白,折叠中间体可以通过 MBP 和目的蛋白之间的相互作用重新排列成另一种形式-Seuestered Intermediate。MBP 是一个较大分子量的蛋白,可以将目的蛋白紧紧包裹起来,有效地阻止它们之间聚集。此外,MBP 使外源蛋白通过交联的直链淀粉树脂的亲层析柱快速纯化,为进一步研究和检测打下基础。

对于含二硫键的蛋白质而言,二硫键是它们最终折叠产物的永久特征,在蛋白质的结构和活性方面起着重要的作用。大肠杆菌胞质为还原环境,不利于二硫键的稳定形成,因此在胞质内生成的蛋白往往不能形成正确的二硫键,导致蛋白的功能和活性很低。BMP6 和 MBP 融合后可以提高溶解性,但是并没有形成有生物活性的构象,必须创造一些有助于折叠的条件来完善 MBP 的作用。在研究中,我们进行了一系列体外氧化折叠的实验,包括加入不同比例氧化型和还原型谷胱甘肽、加入不同浓度的促溶剂盐酸胍和尿素、在不同的 pH 和温度下,都没有获得理想的折叠状态;高度氧化大肠杆菌的周质腔具有形成二硫键一切条件,大肠杆菌蛋白质二硫键的形成大多都是在周质腔内完成的^[11]。我们构建表达载体 pMAL-p2X-BMP6,它较 pMAL-c2X 多一段编码信号肽基因,可以将融合蛋白运送到细胞周质腔中,但实验结果表明周质腔表达蛋白质表达量很少再加之周质腔中还含有很多蛋白质水解酶,分泌的完整蛋白量很少,大多数蛋白被水解。大肠杆菌胞质中并非没有催化二硫键形成的能力,缺乏二硫键形成是由于有一套机制(Thioredoxin 系统)破坏二硫键的形成从而维持胞内还原态,这主要是硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin reductase, TrxB)的作用^[12]。大肠杆菌 BL21 *trxB*(DE3)是一种硫氧还蛋白还原酶缺陷菌株,为 rhBMP-6 二硫键的形成提供了合适的氧化还原环境。

本研究中我们将表达载体 pMAL-c2X-BMP6 转化大肠杆菌 BL21 *trxB*(DE3),成功地在细胞质中表达出可溶的且具有二聚体结构的成熟肽,然后经亲

和层析和凝胶过滤纯化,获得一定纯度的重组蛋白,并对其诱导成骨活性进行初步的分析。同时,我们对 pMAL-c2X-BMP6 表达载体在三种大肠杆菌 XL1-blue、TB1、BL21 *trxB*(DE3)中表达情况进行了比较,由此看出宿主菌的选择对蛋白质的生成状态的影响很大,直接关系到蛋白质的折叠构象和功能。因此,对于每一类蛋白有不少表达系统都可以表达产生,选择最适的表达系统包括表达载体和宿主菌是很至关重要的。

REFERENCES

- [1] Urist MR. Bone:formation by autoinduction. *Science*, 1965, **150**(698): 893-899.
- [2] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, *et al.* Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*, 1988, **242** (4885): 1528-1534.
- [3] Wang EA, Rosen V, Bauduy M, *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**: 2220-2224.
- [4] Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, *et al.* Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation *in vivo*. *The Journal of Cell Biology*, 1994, **126**(6): 1595-1609.
- [5] Gitelman SE, Kirk M, Ye JQ, *et al.* Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. *Cell Growth & Differentiation*, 1995, **6**(7): 827-836.
- [6] Yang JH, Yang S, Zhao L, *et al.* Expression and purification rhBMP6 fusion protein in *E. coli*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2003, **36**(1): 91-96.
阳菊华, 杨爽, 赵丽, 等. rhBMP-6 的表达和纯化. 南开大学学报, 2003, **36**(1): 91-96.
- [7] Yang JH, Zhao L, Yang S, *et al.* Expression of recombinant human BMP6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay *in vitro*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, **19**(5): 556-560.
阳菊华, 赵丽, 杨爽, 等. 重组人骨形成发生蛋白-6 的表达、纯化和活性分析. 生物工程学报, 2003, **19**(5): 556-560.
- [8] Planson AG, Guijarro JI. Assistance of maltose binding protein to the *in vivo* folding of the disulfide-rich C-terminal fragment from plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2003, **42**(3): 13202-13211.
- [9] Vallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, *et al.* A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, 1993, **11**(2): 187-193.
- [10] Holly EH, John EH. Expression of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* and purification using a self-cleavable affinity tag. *Protein Expression and Purification*, 2002, **26**(2): 243-248.
- [11] De Sutter K, Remaut E, Fiers W. Disulphide bridge formation in the periplasm of *Escherichia coli* b-Lactamase: Human IgG3 hinge fusions as a model system. *Molecular Microbiology*, 1992, **6**(15): 2201-2208.
- [12] Derman AI, Prinz WA, Belin D. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 1993, **262**(1): 1744-1747.