

技术与方法

# HIV-1 Gag 蛋白在大肠杆菌表达系统中诱导和纯化条件的优化

傅晶晶, 孙静, 陈佩, 霍烛, 范文玲, 郝彦玲, 刘勇

中国疾病预防控制中心 性病艾滋病预防控制中心 传染病防治国家重点实验室, 北京 100050

**摘要:** 为探讨诱导温度对于 HIV-1 Gag 在大肠杆菌中表达产物状态以及尿素浓度对蛋白纯化效果的影响, 将 30°C 和 37°C 诱导表达的包涵体分别溶于不同浓度的尿素, 比较溶解性的差异, 并比较复性的不同。将 30°C 诱导的目的蛋白分别用 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素溶解后做层析分离, 比较两者的分离效果。结果发现, 与 37°C 相比, 30°C 诱导表达的蛋白能有效溶于低浓度尿素, 并且更容易复性。与 8 mol/L 尿素溶解相比, 30°C 诱导的包涵体用 2 mol/L 尿素溶解后通过凝胶过滤和离子交换层析纯化能得到更好的分离效果。这提示低温诱导的 Gag 包涵体中可能含有更多类似天然态构象的蛋白, 而低浓度尿素有利于保持包涵体中蛋白的天然态构象。从而为包涵体蛋白的诱导表达和分离纯化提供了参考。

**关键词:** HIV-1 Gag, 包涵体, 温度, 变性剂, 纯化

## Optimization of Induction and Purification of HIV-1 Gag Protein in *Escherichia coli* Expression System

Jingjing Fu, Jing Sun, Pei Chen, Zhu Huo, Yanling Hao, and Yong Liu

State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

**Abstract:** To investigate the effects of induction temperature on the expression product and the impact of urea concentration on the purification, HIV-1 Gag inclusion bodies from *E. coli* induced at 30°C (IB30) and 37°C (IB37) were dissolved with urea of different concentrations. The solubility and yield of refolding were compared. IB30 were dissolved with 2 mol/L and 8 mol/L urea, and then purified with chromatography. IB30 were found easier to be solubilized in low concentration of urea and easier to be refolded than IB37. Furthermore, compared to the IB30 dissolved in 8 mol/L urea, Gag protein solubilized in 2 mol/L urea was purified to higher purity with gel filtration (GF) and ion exchange (IEX) chromatography. Gag inclusion body induced at lower temperature may contain more protein with native-like or reversibly-denatured structures, and solubilization in the presence of low concentrations of urea can help to retain these structures. This study has provided new insights into the purification of proteins from inclusion bodies.

**Keywords:** HIV-1 Gag, inclusion body, temperature, denaturing agent, purification

**Received:** September 25, 2007; **Accepted:** October 23, 2007

**Supported by:** the National 863 Program(No. 2006AA03Z323), and Comprehensive International Program for Research On AIDS(CIPRA) which sponsored by U.S. National Institutes of Health (NIH) (No. 1 U19 AI51915-02).

**Corresponding author:** Yanling Hao. Tel: +86-10-67887758; Fax: +86-10-67887758; E-mail: hyluer@yahoo.com.cn;

Yong Liu. Tel: +86-10-67887758; Fax: +86-10-67887758; E-mail: yongliu@chinaids.org.cn

国家“863”资助项目 (No. 2006AA03Z323)和美国 NIH “中国综合性艾滋病研究项目” (No. 1 U19 AI51915-02)资助。

随着分子生物学在疫苗、药物、诊断以及各研究领域越来越广泛的应用,重组蛋白也正越来越多地应用于各领域。大肠杆菌由于具有操作简单、周期短、成本低、表达效率高等特点,成为目前应用最广泛的重组蛋白表达系统。

但是,在大肠杆菌中过量表达的外源蛋白常会发生聚集,最终形成不可溶的包涵体。目前尚未证实蛋白质分子量、疏水性和折叠途径与包涵体形成有直接联系,但可以预测含有二硫键的蛋白容易形成包涵体,因为细菌细胞内的还原性环境能阻止二硫键的形成<sup>[1]</sup>。包涵体由于含有高纯度的目的蛋白,所以较容易进行初步纯化。但是由于溶解包涵体的变性剂的存在,使得包涵体蛋白不容易通过层析法进行精纯,而且在层析过程蛋白很容易沉淀在柱中。通常包涵体蛋白必须经过变性、复性才能获得生物学功能,而这种在体外环境中进行的变性和复性,由于缺乏造成重组蛋白质在复性过程中所需的酶和分子而很容易形成难再溶解的蛋白质聚集体<sup>[2]</sup>,使以包涵体形式存在的高效表达产物大部分成为“看得见,拿不到”的废品。如何解决包涵体的纯化和复性成为生物制品的瓶颈问题。

目前,有很多方法可以尝试解决或改善包涵体的问题,包括降低表达温度、使用分子伴侣、改变表达载体、改变离子强度等<sup>[3]</sup>。其中降低培养温度是减少包涵体形成的最常用的方法。较低的生长温度降低了无活性聚集体形成的速率和疏水相互作用,从而可减少包涵体的形成或降低包涵体中线性蛋白的含量<sup>[4]</sup>。

Gag 蛋白由 HIV-1 的 gag 基因编码,是病毒的主要结构蛋白。几乎每个阶段的 HIV 感染者体内都能检出抗 Gag 蛋白的抗体,因此 Gag 对于 HIV 感染的诊断非常重要。另外,由于 Gag 能够诱导广泛交叉反应的体液和细胞免疫反应,是目前研究中的几乎所有 HIV 疫苗的主要组分。我们通过降低表达温度使 Gag 包涵体可以在低浓度变性剂下得到充分溶解,从而降低了复性和纯化的难度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒及菌株

表达 HIV-1 中国株 CN54 Gag 抗原的质粒 pTHGAG 由本室构建。大肠杆菌菌株 BL21Codonplus

购自 Invitrogen 公司。

#### 1.1.2 试剂和培养基

异丙基-B-D-硫代半乳糖苷(IPTG)为 Merck 公司产品。酵母提取物和蛋白胨均为 Oxoid 公司产品,低分子量蛋白标准 LMW 和层析填料是 GE Healthcare 公司产品,其余为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生长曲线测定

将质粒 pTHGAG 转化大肠杆菌 BL21 codonplus 感受态细胞,克隆鉴定正确后接种于 5 mL 含氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基中,过夜培养后以 4%接种于含 Amp 的 LB 培养基中,37°C 振荡培养 6 h,每隔 30 min 取样测定  $OD_{600}$ ,绘制生长曲线。

#### 1.2.2 诱导温度对蛋白表达的影响

将筛选后的表达菌株接种入 5 mL 含 Amp 的 LB 培养基,37°C 过夜培养。培养物以 4%分别接种于 3 瓶 500 mL 含 Amp 的 LB 培养基中,37°C 振荡培养 3.5 h 后,分别于 25°C、30°C 和 37°C IPTG 诱导培养。25°C 和 30°C 诱导表达 10 h,37°C 诱导表达 5 h 后取样,SDS-PAGE 分析表达量。离心收集菌体,高压匀浆破碎后离心,SDS-PAGE 分析目的蛋白表达量及在上清和沉淀中的分布。

#### 1.2.3 包涵体在尿素中的溶解性差别

将 30°C 和 37°C 下诱导表达的菌体分别高压匀浆破碎,分别用洗涤缓冲液(pH 8.0, 20 mmol/L Tris · Cl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100)洗涤 2 遍。用双蒸水将洗涤后的两种包涵体分别悬起,分装到 8 个 Eppendorf 管中,离心去上清,分别以含 1~8 mol/L 尿素的溶解液(pH 9.0, 20 mmol/L Tris · Cl)悬起,吹打均匀,室温放置 30 min,12 000r/min 离心 15 min,取上清,测蛋白浓度。

#### 1.2.4 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素中溶解的包涵体复性的差别

将等量 30°C 诱导的包涵体分别溶于 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素中,离心取等量上清于透析袋中做复性。2 mol/L 尿素溶解液的复性外液是含 1 mol/L 尿素的复性液(pH 9.0, 50 mmol/L Tris · Cl, 1 mmol/L DTT),8 mol/L 尿素溶解液的复性外液是含 7 mol/L 尿素的复性液。4°C 搅拌放置 2 h 后,2 mol/L 尿素溶解液的外液换成不含尿素的复性液,8 mol/L 尿素溶解液的外液换成含 6 mol/L 尿素的复性液,然后每过

2 h 依次换成含 5~1 mol/L 尿素的复性液。最后两种溶解液都用不含尿素的复性液透析 2 遍。分别取复性好的样品 4°C 和 -20°C 过夜。每个步骤取样, 离心, 测上清中蛋白含量。

### 1.2.5 层析纯化

#### 1) 凝胶过滤层析

分别把 30°C 下诱导的包涵体洗涤并用含 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素的 A 液(pH 9.0, 50 mmol/L Tris · Cl, 20 mmol/L NaCl)溶解后用 0.45 μm 的滤膜过滤。2 mol/L 尿素溶解的样品上样于含 2 mol/L 尿素的 A 液平衡好的 Sephacyl S-200 柱, 8 mol/L 尿素溶解的样品用含 8 mol/L 尿素的 A 液平衡好的 Sephacyl 200 柱。分别用含有 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素的 A 液做流动项, 流速 0.3 mL/min, 分步收集样品后做 SDS-PAGE 分析。

#### 2) 离子交换层析

收集 2 mol/L 尿素样品凝胶过滤后较纯的部分合并, 加样于用含 2 mol/L 尿素的溶液 A 平衡好的 DEAE Sepharose 柱中。用 5 倍含 2 mol/L 尿素的溶液 A 平衡后, 用溶液 B (pH 9.0, 50 mmol Tris · Cl, 1 mol/L NaCl, 2 mol/L urea) 进行线性洗脱, 分步收集样品后做 SDS-PAGE 分析并与诱导表达后的重组菌体一起做 Western blotting 检测, 用转化空载体的菌体相同条件诱导后做阴性对照样品。

## 2 结果

### 2.1 生长曲线的测定

根据表达克隆的生长状况, 绘制在三角瓶中的生长曲线(见图 1), 确定其对数生长期在 1.5~5 h 之间, 在此期间诱导比较好。我们选择试管转接三角瓶后 3.5 h 开始诱导。

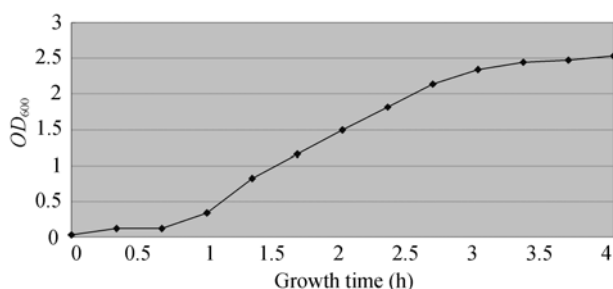


图 1 表达菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of expression strain

### 2.2 诱导温度对蛋白表达的影响

将表达菌株分别于 25°C、30°C 和 37°C 加 IPTG 诱导表达。根据以往的经验, 25°C 和 30°C 诱导表达 10 h, 37°C 诱导表达 5 h 后取样, SDS-PAGE 分析(见图 2)发现, 30°C 诱导表达 10 h 和 37°C 诱导表达 5 h 表达量差别不大, 而 25°C 诱导 10 h 后表达量依然很低。菌体破碎后发现, 30°C 和 37°C 下诱导的目的蛋白大部分都以包涵体形式存在, 上清中只有很少的目的蛋白。

### 2.3 包涵体在尿素中的溶解性差别

将 30°C 和 37°C 下诱导表达的菌体分别高压匀浆破碎, 分别用洗涤缓冲液洗涤后, 用含 1~8 mol/L 尿素的溶解液溶解, 测上清中的蛋白浓度。结果发现, 30°C 诱导的包涵体在 2 mol/L 尿素中就得到很好的溶解, 而 37°C 下诱导的包涵体直到 6 mol/L 尿素才大部分被溶解(见图 3)。

### 2.4 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素中溶解的包涵体复性的差别

将等量 30°C 诱导的包涵体分别溶于 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素中, 以梯度浓度尿素透析复性。复性好的样品 4°C 和 -20°C 过夜。每个步骤取样, 离心, 测上清中蛋白含量, 以复性前的浓度为起点, 计算每一步的蛋白回收率。从结果可以看出, 2 mol/L 尿素溶解的包涵体蛋白复性后回收率较高, 而且比较稳定(即使冻融后回收率仍有 65%)。而 8 mol/L 尿素溶解的蛋白复性后回收率只有 30%, 冻融后有更多蛋白丢失。见表 1。

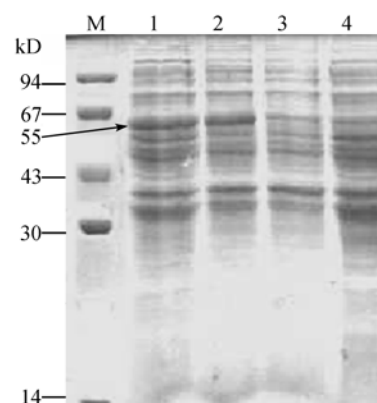


图 2 不同温度下 Gag 的诱导表达

Fig. 2 Gag induced expression at different temperature

M: LMW protein marker; 1: gag induced at 37°C for 5 h; 2: Gag induced at 30°C for 10 h; 3: gag induced at 25°C for 10 h; 4: negative control induced at 37°C for 5 h; the arrow indicated the target protein

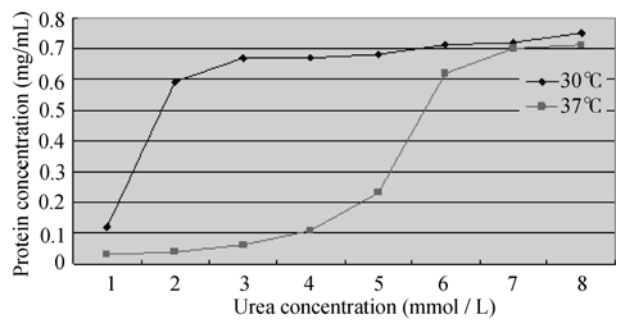


图 3 30°C 和 37°C 下诱导的包涵体在不同浓度尿素中的溶解性

Fig. 3 Solubility of inclusion body induced at 30°C and 37°C with different concentration of urea

表 1 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素中溶解的包涵体复性  
Table 1 Refolding of inclusion body in 2 mol/L and 8 mol/L urea

Urea concentration (mol/L)	Sample 1* Step yield (%)	Sample 2* Step yield (%)
8	—	100
7	—	96
6	—	95
5	—	88
4	—	76
3	—	71
2	100	68
1	93	51
0	78	30
0(4°C overnight)	77	29
0(-20°C overnight)	65	20

\* sample 1: inclusion body dissolved with 2 mol/L urea; sample 2: inclusion body dissolved with 8 mol/L urea.

2.5 层析纯化

2.5.1 凝胶过滤层析

30°C 下诱导的包涵体洗涤并用含 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素的缓冲液溶解后分别上样于 Sephacyl S-200 柱, 结果发现, 2 mol/L 尿素溶解的样品目的蛋白峰与杂蛋白峰分离得较好(见图 4)。SDS-PAGE 分析也表明, 2 mol/L 尿素溶解的样品比 8 mol/L 尿素溶解的蛋白分离得好, 而且 8 mol/L 尿素溶解的样品上柱后目的蛋白明显减少(见图 5、图 6)。

2.5.2 离子交换层析

收集凝胶过滤后较纯的部分样品 7#, 8#, 9#合并, 加样于 DEAE Sepharose 柱中。可以看到低浓度尿素下, 目的蛋白和与之大小相近的杂蛋白都得到有效分离, 以前因构象接近而无法分离的蛋白带也得到很好的分离(图 7、8)。Western blotting 结果表明, 最终纯化产物为目的蛋白(图 9)。

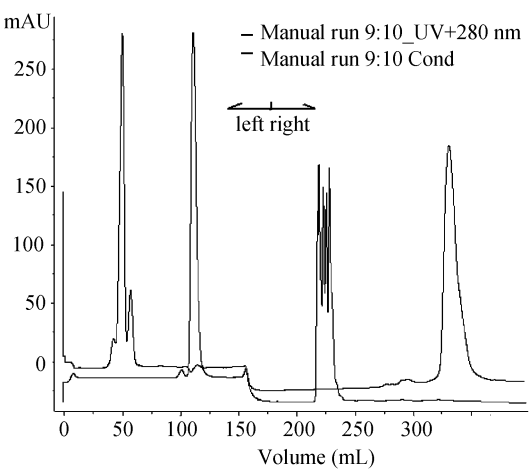


图 4 不同尿素浓度下的包涵体蛋白的凝胶过滤层析图谱

Fig. 4 GF chromatogram for inclusion body protein with different concentration of urea

Left: GF chromatogram for protein in 2 mol/L urea; Right: GF chromatogram for protein in 8 mol/L urea

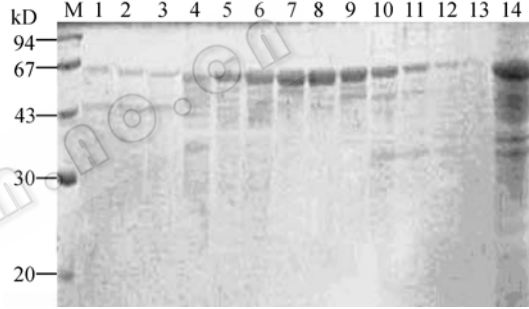


图 5 2 mol/L 尿素溶解样品经凝胶过滤层析纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of the sample dissolved by 2 mol/L urea after GF chromatography

M: LMW protein marker; 1~13: fractions of GF chromatography with the sample dissolved by 2 mol/L urea; 14: sample dissolved by 2 mol/L urea before GF chromatography

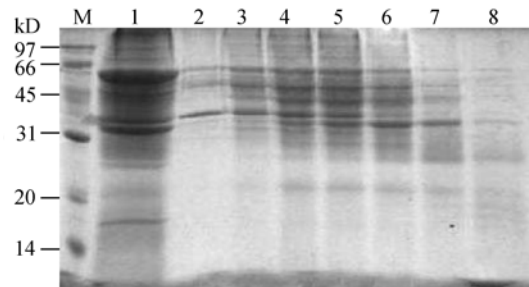


图 6 8 mol/L 尿素溶解样品经凝胶过滤层析纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 6 SDS-PAGE of the sample dissolved by 8 mol/L urea after GF chromatography

M: LMW protein marker; 1: sample dissolved by 8 mol/L urea before GF chromatography; 2~8: fractions of GF chromatography with the sample dissolved by 8 mol/L urea

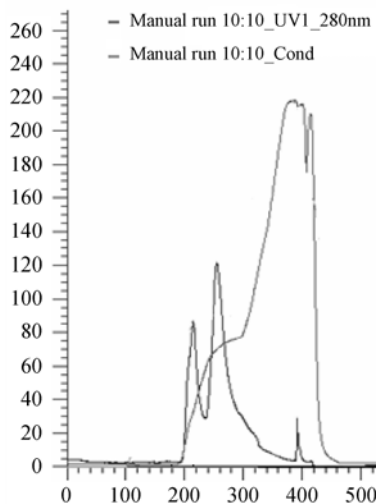


图7 2 mol/L 尿素溶解样品的离子交换层析图谱

Fig. 7 IE chromatogram of the sample dissolved by 2 mol/L urea

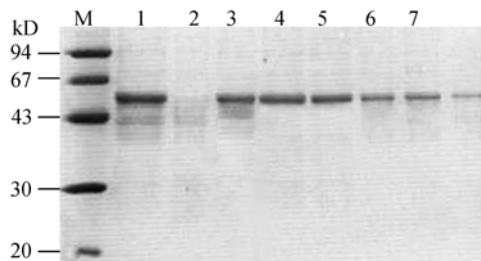


图8 2 mol/L 尿素溶解样品经离子交换层析纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 8 SDS-PAGE of the sample dissolved by 2 mol/L urea after IE chromatography

M: LMW protein marker; 1: sample dissolved by 2 mol/L urea before IE chromatography; 2: flow Through fraction; 3: the first elution fraction; 4~8: the second elution fractions

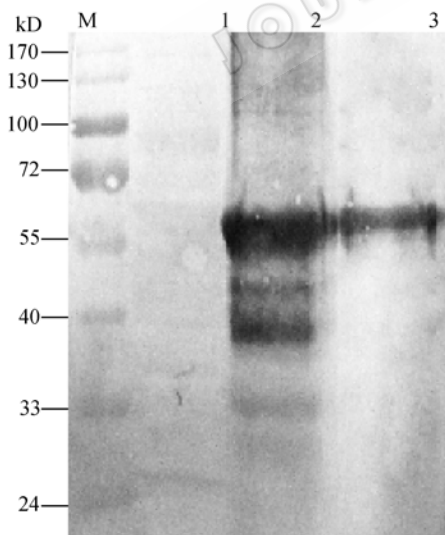


图9 表达和纯化的 Gag 蛋白 Western blotting 检测

Fig. 9 Western blotting assay with recombinant Gag in *E. coli* and after purification

M: prestained protein marker; 1: *E. coli* transformed with empty vector and induced with IPTG; 2: recombinant strain induced with IPTG; 3: recombinant Gag after purification

### 3 讨论

诱导时菌体密度的高低是影响目的蛋白的表达水平的重要因素之一,一般诱导时期在菌体的对数生长期或对数中后期。根据工程菌在摇瓶培养时的生长曲线,确定在试管过夜培养物转接三角瓶后 1.5~5 h 是该菌的对数生长期,我们选择转接后 3.5 h 开始诱导表达。在对不同诱导时间蛋白表达的多次实验结果显示,30°C 诱导 10 h, 37°C 诱导 5 h 表达量比较高,如果接着诱导虽然目的蛋白量在增加,细菌蛋白也在增加。

在对不同诱导温度下表达的蛋白进行比较发现,在较低的温度<sup>[6,7]</sup>。25°C 诱导表达时表达量比较低,而 30°C 和 37°C 表达量差别不大。虽然不同温度下诱导的蛋白都主要以包涵体的形式存在,但 30°C 诱导的包涵体能有效地溶解于低浓度的尿素,而 37°C 诱导的包涵体在 7~8 mol/L 尿素中才能得到彻底溶解。

HIV-1 Gag 蛋白由于自身结构的原因容易形成包涵体,在我们尝试过的多数原核表达系统中都以包涵体的形式表达<sup>[5]</sup>。包涵体蛋白的粗纯比较容易,但在尝试通过层析使蛋白进一步纯化时却遇到很多困难。凝胶过滤和离子交换都无法使目的蛋白和杂蛋白有效分离,而且在层析过程溶解的蛋白由于不稳定常会沉淀在层析柱中,使得大部分蛋白丢失。

包涵体蛋白在变性剂作用下,为可溶性伸展态,在降低变性剂浓度或去除时,就会自发的从变性的热不稳定状态向热稳定状态转变,形成具有生物活性的天然结构<sup>[6,7]</sup>。而大量研究表明,包涵体中存在天然态的二级结构<sup>[1,8]</sup>。我们发现,30°C 诱导的 Gag 包涵体比 37°C 诱导下的包涵体能更有效的溶于低浓度尿素。这提示,虽然在低温诱导条件下 Gag 仍以包涵体存在,但此种包涵体内可能含有更多接近天然态构象的蛋白。

研究表明,用低浓度的尿素溶解包涵体有助于保持包涵体中存在的具有天然态二级结构的蛋白,进而提高活性蛋白的收率<sup>[1,9,10]</sup>。30°C 诱导表达的包涵体蛋白分别溶于 2 mol/L 和 8 mol/L 尿素进行复性,发现 2 mol/L 尿素溶解的蛋白有 78% 被成功回收,即使反复冻融后,回收率仍有 65%。而

8 mol/L 尿素溶解的蛋白复性后只剩 30%的蛋白,而冻融后又有更多蛋白沉淀。这初步证实了我们的假设,即 2 mol/L 的尿素较好地保存了包涵体中类似天然状态的蛋白结构,从而使接下来的复性更容易,而且回收率更高。上述现象的一种可能的解释是,当尿素浓度在 2 mol/L 附近或更低时,包涵体的溶解可能不完全由变性所致,尿素可能充当了一种破坏分子间疏水性相互作用的物理介质,从而使被溶解的蛋白质依然具备正确的二级结构<sup>[1]</sup>。

层析结果再次验证了上述假设。在本研究中,与 8 mol/L 尿素溶解的蛋白相比,2 mol/L 尿素溶解的蛋白在两种层析中都得到更有效的分离。而且以 2 mol/L 尿素溶解的蛋白在两种层析过程都未发现明显的蛋白沉积在层析柱中的情况。这提示低浓度尿素有利于保持天然构象,从而在后期分离中使蛋白在溶液中保持稳定,并有助于目的蛋白与杂蛋白的有效分离。

## REFERENCES

- [1] Ashok K Patra, Mukhopadhyay R, Mukhija R, *et al.* Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2000, **18**: 182–192.
- [2] Luo M Guan YX, Yao SJ, *et al.* Study on disulfide bond formation protein A in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(1): 7–15.  
罗曼, 关怡新, 姚善泾. 大肠杆菌二硫键形成蛋白 A(DsbA)研究进展. *生物工程学报*, 2007, **23**(1): 7–15.
- [3] Zhou Y, Zhang Q, Yin CC, *et al.* Coexpression of chaperon SecB and human lymphotoxin in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, **13**(4): 433–436.  
周颖, 张青, 殷长传. 分子伴侣 SecB 基因和人淋巴毒素基因在大肠杆菌中的共表达. *生物工程学报*, 1997, **13**(4): 433–436.
- [4] Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein refolding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*, 1996, **5**(3): 517–523.
- [5] Wang DY, Liu Y, Hao YL, *et al.* Expression, purification and identification of Gag P55 and P24 recombinant protein of HIV21 strain CN54. *Chin J Blood Transfusion*, 2004, **17**(1): 1–4.  
王道毅, 刘勇, 郝彦玲. HIV-1 CN54 Gag p55 和 p24 蛋白的高效表达、纯化和鉴定. *中国输血杂志*, 2004, **17**(1): 1–4.
- [6] Yeh Sih, Rousseau D. Folding intermediates in cytochrome c. *Natu Stru Biol*, 1998, **5**(3): 222–228.
- [7] Bruria Funkenstein, Yanai Rebhan. Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: Facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. *Protein Expression and Purification*, 2007, **54**(1): 54–65.
- [8] Przybycien TM, Dunn JP, Valax P, *et al.* Secondary structure characterization of b-lactamase inclusion bodies. *Protein Eng*, 1994, **7**: 131–136.
- [9] Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, *et al.* Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**: 722–728.
- [10] Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, *J Biosci Bioeng*, 2005, **99**(4): 303–310.