

高效原核表达载体 pBV220 的改造与应用

朱大兴¹, 王艳萍², 杨学勤³, 朱文², 陈小禾², 孙芝琳², 周清华^{1,2}

1 天津医科大学总医院肺部肿瘤外科, 天津市肺癌研究所, 天津 300052

2 四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室, 成都 610041

3 第三军医大学大坪医院肿瘤中心, 重庆 400042

摘要: 以高效原核表达载体 pBV220 为骨架载体, 应用单链寡核苷酸引物插入法在 pBV220 多克隆位点的下游插入了六聚组氨酸融合标签编码序列 (6 × His-Tag)、羟胺和凝血酶蛋白切割位点, 并增加了 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点和强终止密码子 TAA, 将此新质粒命名为 pBV223。以此载体表达的目的蛋白在羧基端 (C 端) 带有六聚组氨酸尾以利于通过固定化金属亲和和层析快速纯化目的蛋白, 酶切及核苷酸序列分析验证了我们的设计。将终止密码缺失突变的 *nm23-H1* cDNA 克隆入 pBV223 载体中, 在大肠杆菌 DH5 α 中成功地表达了 Nm23-H1 蛋白, 通过镍 (Ni) 亲和和层析一步即简单、快速地得到了纯化蛋白。我们所应用的单链寡核苷酸引物插入直接进行定向克隆的方法是迄今为止最简便的方法。

关键词: 纯化标签, 融合蛋白, *nm23-H1*

Construction and Application of a New Prokaryotic Expression Vector Derivative of pBV220

Daxing Zhu¹, Yanping Wang², Xueqin Yang³, Wen Zhu², Xiaohe Chen², Zhilin Sun², and Qinghua Zhou^{1,2}

1 Department of Lung Cancer Surgery, Lung Cancer Institute, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2 Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

3 Cancer Center, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: A single-stranded oligonucleotides containing a 6 histidine sequence, a hydroxylamine cleavage site, a thrombin cleavage site, and stop codon TAA were inserted into the polylinker's downstream of prokaryotic expression vector pBV220 between *Bam*HI and *Pst*I. The resultant vector is named pBV223. Proteins expressed in this vector will have a 6 histidine tail as affinity handy fused to their C terminus and can be quickly purified by one step immobilized metal affinity chromatography (IMAC). This plasmid is verified by restriction map and DNA sequencing. Subsequently, the metastasis suppressor gene *nm23-H1* cDNA (without the stop codon) was cloned into vector pBV223 in frame with the 6-histidine sequence, hydroxylamine and thrombin cleavage sites. The soluble nm23-H1 fusion protein was successfully induced in the bacterial DH5 α and easily purified with Ni chromatograph. These results indicated that the strategy to clone the single-stranded oligonucleotides directly into the restriction sites between *Bam*H I and *Pst* I in the pBV220 vector is the simplest and cost-effective method.

Keywords: affinity tag, fusion protein, *nm23-H1*

Received: August 2, 2007; **Accepted:** October 10, 2007

Supported by: the Key Project of National Natural Science Foundation of China (No. 30430300), and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20040610060).

Corresponding author: Qinghua Zhou. Tel/Fax: +86-22-60363013; E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn

研究受国家自然科学基金重点项目 (No. 30430300)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20040610060) 资助。

pBV220 原核表达载体是我国自主组建的一个温控型高效原核表达载体, 在国内得到了广泛的应用^[1]。张智清等构建的 pBV220 原核表达载体具有很多优点: 是温控型原核表达载体, 高拷贝数、大容量、强启动子及强转录终止子, 可在任何受体菌中诱导表达。*nm23-H1* 基因是第一个被发现的重要的肿瘤转移抑制基因, 迄今为止, 有关 *nm23-H1* 基因调控肿瘤侵袭转移的分子机制仍不清楚, 对 *nm23-H1* 进行原核表达和纯化以研究其生化活性对阐明其作用机制具有重要的意义^[2]。在预实验中, 我们将终止密码缺失突变的 *nm23-H1* 基因^[3]克隆入 pBV220 载体, 利用载体自身的强转录终止子也得到了产物的可溶性表达。但不利之处在于: (1) 其产物比完整的 *nm23-H1* 蛋白多了 19 个额外的氨基酸; (2) 表达产物不易纯化。因此, 我们想到了改造载体, 引入纯化标签-在羧基端(C)加入 6 聚组氨酸编码序列和终止密码子, 从而有利于 *nm23-H1* 基因的表达和纯化; 同时也为其他基因的表达与纯化探索新的表达途径。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌菌株 XL1-Blue、DH5 α 为本室保存, *nm23-H1* 基因终止密码缺失突变质粒 *PLXSN-nm23H1-EGFP* (*nm23-H1* 基因的终止密码 TGA 缺失突变为 GA, 与 *EGFP* 基因达到框架内融合, 成为

nm23-H1-EGFP 融合基因)为本室构建^[3], 原核表达质粒 pBV220 由张智清教授组建^[1]。

1.2 酶与主要试剂

限制性内切酶、DNA marker 和 DNA 连接试剂盒(DNA Ligation Kit Version 2)均购自宝生物工程有限公司(TaKaRa); UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒、UltraPure™PCR 产物纯化系统购自北京赛百盛公司; NI-NTA spin kits 蛋白纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 抗 nm23-H1 兔多克隆抗体(nm23-H1(C-20))购自美国 Santa Cruz 公司; 其他均为市售分析纯。

1.3 寡核苷酸引物的设计与合成

1.3.1 原核表达载体 pBV220 的改造策略

设计的基本策略是将人工合成的一对互补寡核苷酸引物插入到 pBV220 的 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点之间, 在羧基端(C)加入 6 × His-Tag 序列以利于蛋白的表达和纯化; 加入羧胺和凝血酶蛋白切割位点以利于融合标签的切除; 增加 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点以利于新质粒的鉴定及基因的克隆; 加入强终止密码子 TAA 以避免表达额外的氨基酸(见图 1)。由于 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切后在载体同一条链的 5'端和 3'端均产生粘性突出末端, 因此我们设想, 仅需一条寡核苷酸引物(5'端具有 *Bam*H I 粘性末端, 3'端具有 *Pst* I 粘性末端)与载体互补突出粘性末端配对连接, 即可形成缺刻的重组质粒, 转化细菌后可以在体内修复缺刻, 获得目的质粒。

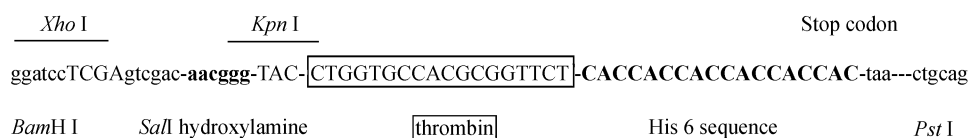


图 1 寡核苷酸引物设计图示

Fig. 1 The sequence map of the desired oligonucleotides

1.3.2 寡核苷酸引物的合成与纯化

(1) 5'端(*Bam*H I)、3'端(*Pst* I)粘性突出末端引物 (68 bp):

5'-gatcctcgagtcgacaacgggtacctggtgccacgcgggttctca
ccaccaccaccactaactgca-3'

(2) 互补的 5'凹端(*Pst* I)、3'凹端(*Bam*H I)引物(60 bp):

5'-gttagtggtggtggtggtgagaaccgcgtggcaccaggtac
ccgttgctgactcgag-3'

寡核苷酸引物的合成与纯化由北京赛百盛公司完成。

1.4 单链寡核苷酸引物插入法改造 pBV220 载体

1.4.1 pBV220 质粒 BamH I 和 Pst I 双酶切及回收纯化

用 *Bam*H I 和 *Pst* I 限制性内切酶双酶切 pBV220 质粒。采用北京赛百盛公司的 UltraPure™PCR 产物纯化系统回收纯化 pBV220 质粒双酶切片段，操作按说明书进行。

1.4.2 单链寡核苷酸引物插入法改造 pBV220 载体

TE 溶解 5'端(*Bam*H I)、3'端(*Pst* I)粘性突出末端引物(68 bp), 浓度 100 μ mol/L; 20°C 冻存。载体 pBV220 (*Bam*H I+*Pst* I 双酶切)与 68 bp 单链寡核苷酸引物连接。采用宝生物工程有限公司(TaKaRa)的 DNA 连接试剂盒进行质粒的连接转化。pBV220 (*Bam*H I+*Pst* I 双酶切): 单链寡核苷酸引物摩尔比=1:125 建立连接反应体系: pBV220 载体 6 μ L (0.16 pmol) + 单链寡核苷酸引物 0.2 μ L (20 pmol), 加入连接反应混合液 Solution I 6 μ L, 混匀后于 16°C 水浴中连接过夜。将反应混合液直接转化 100 μ L XL1-Blue 感受态细胞; 转化后将反应液涂布 LB-Amp 平板(Amp 150 μ g/mL), 推板至涂布均匀; 37°C 倒置培养 16~18 h, 随机挑选氨苄抗性克隆 3 个, 进行质粒抽提、鉴定, 操作按说明书进行。

1.4.3 pBV220 改造载体酶切鉴定

分别用 *Eco*R I、*Kpn* I、*Xho* I 内切酶酶切 pBV220 载体, *Eco*R I、*Kpn* I、*Xho* I、*Bam*H I、*Sal* I 内切酶酶切 pBV220 改造载体, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.4 pBV220 改造载体的测序鉴定

由宝生物工程有限公司 (TaKaRa)ABI PRISM377XL 测序仪完成。

1.5 目的蛋白的表达与纯化

1.5.1 目的蛋白的表达

*Eco*R I+*Bam*H I 双酶切 pLXSN-nm23H1-EGFP 质粒获得终止密码缺失突变的 *nm23-H1* 基因, 将其定向克隆入 pBV220 改造载体。30°C 过夜摇菌, 次日 1:50 转入 LB 培养液中培养至 OD 值 0.6; 立即转入 42°C 水浴箱中迅速升温, 然后转入摇床, 42°C 振荡培养 4 h; 收集细菌沉淀, 直接进行蛋白纯化或 -80°C 冻存备用。

1.5.2 目的蛋白的纯化

采用德国 Qiagen 公司的 NI-NTA spin kits 蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白, 可溶性分析显示 pBV223-nm23H1 为可溶性表达, 因此采用非变性条件下纯化方法, 操作按说明书进行。最后加入 200 μ L Elution buffer(50 mmol NaH_2PO_4 , 300 mmol NaCl, 300 mmol imidazole, pH 8.0)洗脱目的蛋白, 收集管中的液体即为目的蛋白, 取 10 μ L 作 SDS-PAGE 分析; -80°C 冻存。

1.6 Western blotting 鉴定

参照车国卫等的方法进行^[3]。

2 结果

2.1 pBV223 载体的构建与鉴定

以原核表达载体 pBV220 为骨架载体, 采用单链寡核苷酸引物插入法, 在 pBV220 多克隆位点的下游-*Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点之间插入了 6 \times His-Tag 编码序列、羧胺和凝血酶蛋白切割位点、*Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点及强终止密码子 TAA, 将此新质粒命名为 pBV223。

pBV220 载体和 pBV223 载体均可被 *Eco*R I 酶切, pBV220 载体不能被 *Kpn* I、*Xho* I 内切酶酶切, 而

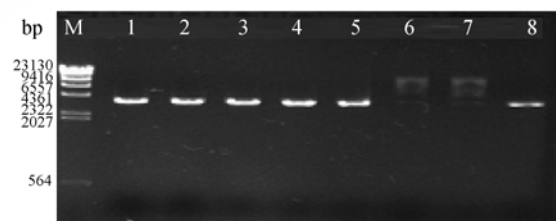


图2 pBV220 和 pBV223 酶切电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of plasmids of pBV220 and pBV223 digested by restrictive enzymes

M: marker λ -Hind III; 1~5: pBV223 digested by *Bam*H I, *Eco*R I, *Sal* I, *Kpn* I and *Xho* I; 6~8: pBV220 digested by *Kpn* I, *Xho* I and *Bam*H I

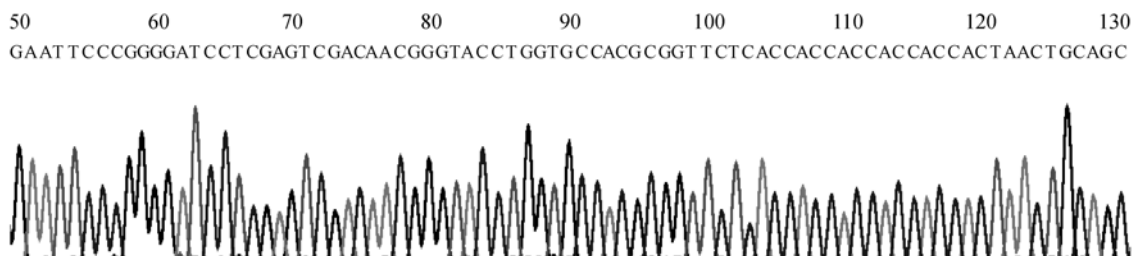


图3 质粒 pBV223 多克隆位点测序图

Fig. 3 Sequence map of the polylinker sites in pBV223 vector

pBV223 载体可以被 *Kpn* I、*Xho* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Sal* I 内切酶酶切, 说明和我们的设计完全一致(图 2)。DNA 测序证实, 碱基序列与设计序列完全一致(见图 3)。

2.2 nm23-H1 cDNA 在 pBV223 中的表达与纯化

将重组质粒 pBV223-nm23H1 转化进大肠杆菌 DH5 α , 温度诱导表达后, SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色检测可见在约 19.5 kD 处有诱导后的目的蛋白表达, 与理论预期值相符。取诱导后 4 h 的菌液, 超声破碎裂解, 离心后沉淀加与上清同样体积的 1 \times PBS 溶液, 分别电泳, 结果显示 pBV223-nm23H1 主要为可溶性表达。应用 Qiagen 公司的 NI-NTA spin kits 蛋白纯化试剂盒在非变性条件下对 Nm23-H1 进行蛋白纯化, 在 19.5 kD 处得到单一的蛋白条带, 未见明显杂带, 蛋白回收率为 23% (图 4)。Western blotting 采用兔抗人 Nm23-H1 多克隆抗体检测, 结果与预计大小相符, 且条带特异(图 5)。

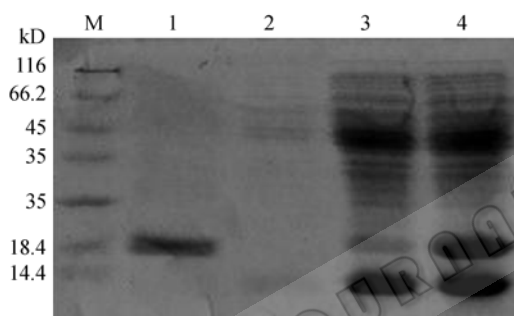


图 4 pBV223-nm23H1 非变性条件下纯化

Fig. 4 Purification of pBV223-nm23H1 under native condition

M: marker, 1: Elution, 2: first wash, 3: flow through, 4: before purification

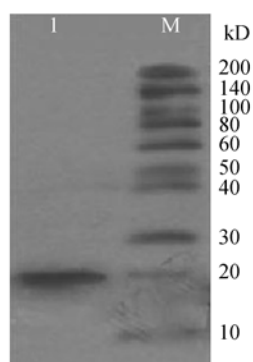


图 5 nm23-H1 原核表达蛋白的免疫印迹鉴定

Fig. 5 Identification of wild nm23-H1 protein by Western blotting

M: protein marker; 1: nm23-H1

3 讨论

pBV220 载体表达的是非融合蛋白, 其分离纯化比较困难。利用融合标签对蛋白质进行亲和层析是蛋白质分离纯化最有效的方法之一。多聚组氨酸标签由于其分子量小, 对目的蛋白的结构与功能影响小, 配体价廉易得, 与其他分子量大的蛋白质纯化标签相比更具优点而得到广泛应用^[4]。Ni 离子能特异的与表达的融合蛋白 N 端或 C 端的 6 聚组氨酸标签结合, 将融合蛋白吸附于柱上, 其它杂蛋白则不能吸附而首先被洗脱, 随后用含高浓度咪唑的洗脱液使融合蛋白与 Ni 离子解离最后被洗脱, 就可以简便、快速地得到纯化的融合蛋白。得到的含有 6 组氨酸标签的融合蛋白也可以通过其蛋白酶切位点得以切除进一步纯化。李福胜等^[5]采用互补寡核苷酸插入法在 pBV220 多克隆位点的上游插入了起始密码子和 6 聚组氨酸编码序列, 并将改造的新质粒命名为 pBV222, 以此载体表达的目的蛋白在 N-端带有 6 聚组氨酸尾以利于通过镍亲和层析快速纯化目的蛋白。通过 C-端融合表达目的蛋白也具有明显的优点: 可以利用基因本身的 ATG 作为起始密码子, 保证了蛋白天然的 N 末端, 这对于一些医药用的重组蛋白是相当重要的; 对终止密码缺失突变的目的基因可以直接克隆进行表达。这也是我们改造 pBV220 载体的初衷。表达 C-端融合序列时要特别注意的是: (1) 插入序列不含终止密码子; (2) 克隆保留正确的阅读框。

我们将人工合成的寡聚核苷酸插入到 pBV220 的 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点之间, 在羧基端(C)加入 6 聚组氨酸编码序列、羧胺和凝血酶蛋白切割位点、*Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点及强终止密码子 TAA, 将此新质粒命名为 pBV223。该载体除保留了母载体本身的优点外, 还具有如下特点: ① 其表达产物的羧基端携带有 6 聚组氨酸标签, 便于对表达产物的快速纯化; ② 同时引入了羧胺和凝血酶蛋白切割位点, 可以切除 6 组氨酸标签, 便于对表达蛋白进一步纯化。

Nm23-H1 蛋白由 152 个氨基酸组成, 分子量为 17 kD, 在物种进化中高度保守, 其分子量小且无糖基化问题, 因此在文献报道的大肠杆菌中均为可溶性表达^[6]。可溶性表达加融合标签是最佳的纯化策略。本实验所构建的蛋白为融合了 6 个组氨酸的

nm23H1-His 融合蛋白, 预测蛋白分子量为 19.5 kD, 实验结果与理论值相符。侯宇等^[7]利用 pBV220 原核表达载体, 以 DH5 α 为宿主在高温诱导下高效地表达 Nm23-H1 蛋白, 通过 DEAE 弱阴离子交换层析、Cibacron Blue 亲和层析结合高效液相色谱三步法纯化出了目的蛋白。其纯化过程繁琐、耗费较高, 且产物为打断二硫键的单体形式。我们将 nm23-H1 基因克隆入 pBV223 载体, 在大肠杆菌 DH5 α 中成功地表达了 Nm23-H1 蛋白, 通过镍亲和层析一步即简单、快速地得到了纯化蛋白。

在设计寡核苷酸引物对 pBV220 载体进行改造的过程中, 我们发现 BamHI 和 Pst I 双酶切 pBV220 载体后, 在载体同一条链的 5'端和 3'端均产生粘性突出末端。由于碱基之间具有配对结合力, 因此我们设想, 用一条 5'端和 3'端均为粘性突出末端的寡核苷酸引物与载体的互补突出粘性末端配对连接, 即可以形成缺刻的重组质粒; 此缺刻的重组质粒直接转化感受态细菌 XL1-Blue, 可以在体内修复缺刻, 形成完整的重组质粒。实验结果证实了我们的设想。查阅文献, 目前仅有两篇类似的研究报道。两位研究者的方法相对我们所用的方法都比较繁琐。Mounts 等^[8]的方法需要寡核苷酸引物 5'端的磷酸化; 寡核苷酸引物与载体连接后, 尚需 Klenow 酶补平缺口, 然后再转化细菌。Weiner 等^[9]的方法则需将酶切后的载体与 3 条短的接头连接, 以增加粘性末端的长度, 然后再将单链寡核苷酸引物与载体连接。而我们采用的方法则不需要寡核苷酸引物 5'端的磷酸化, 不需要增加粘性末端的长度, 不需要 Klenow 酶补平缺口, 直接将载体粘端-粘端互补的单链寡核苷酸引物与载体连接, 将连接反应混合物直接转化 XL1-blue 感受态细菌, 就可以得到目的克隆。我们所应用的克隆方法是目前为止最简便的方法。目前寡核苷酸引物的人工合成还比较昂贵, 尤其是长链寡核苷酸引物。而通过单链寡核苷酸引物直接进行克隆可以节约一半的费用, 同时还简化了实验流程。但上述方法仅适用于特殊的双酶切位点, 即双酶切后质粒载体同一条链的 5'端和 3'端均产生粘性突出末端。

致谢 感谢吉林大学姜艳芳老师馈赠 pBV220 原核表达质粒。

REFERENCES

- [1] Zhang ZQ, Yao LH, Hou YD. Construction and application of a high level expression vector containing P_{RP}L promoter. *Chinese Journal of Virology*, 1990, **6**(2): 111-116.
张智清, 姚立红, 侯云德. 含 PRPL 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报*, 1990, **6**(2): 111-116.
- [2] Kaetzel DM, Zhang Q, Yang M, *et al.* Potential roles of 3'-5' exonuclease activity of NM23-H1 in DNA repair and malignant progression. *J Bioenerg Biomembr*, 2006, **38**(3-4): 163-167.
- [3] Che GW, Zhou QH, Liu LX, *et al.* Construction and expression of eukaryotic expression vector bearing fusion gene of human nm23-H1 gene and EGFP gene. *J Med Postgraduates*, 2005, **18**(1): 1-3,7.
车国卫, 周清华, 刘伦旭, 等. nm23-H1-绿色荧光蛋白融合基因真核表达载体的构建和表达. *医学研究生学报*, 2005, **18**(1): 1-3,7.
- [4] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **60**: 523-533.
- [5] Li FS, Gong HY, Li YF, *et al.* Construction and application of a prokaryotic expression vector which expresses protein capable of quickly purified by IMAC. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, **13**(1): 42-46.
李福胜, 贡惠宇, 李玉富, 等. 表达产物可用 IMAC 快速纯化的原核表达载体的组建与应用. *生物工程学报*, 1997, **13**(1): 42-46.
- [6] Zhou QH, Yang XQ, Zhu DX, *et al.* Double mutant P96S/S120G of Nm23-H1 abrogates its NDPK activity and motility-suppressive ability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **356**(2): 348-353.
- [7] Hou Y, Zhao LG, Zhang MY, *et al.* Study on high-level expression and purification of nm23-H1/NDPK-A in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, **14**(6): 655-660.
侯宇, 赵利淦, 张美英, 等. Nm23-H1/NDPK-A 基因在大肠杆菌中的高效表达及产物纯化的研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **11**(16): 655-660.
- [8] Mounts P, Wu TC, Peden K. Method for cloning single-stranded oligonucleotides in a plasmid vector. *Biotechniques*, 1989, **7**(3): 356-359.
- [9] Michael P Weiner, Harold A Scheraga. A method for the cloning of unpurified single-stranded oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(17): 7113.