

# DNA 错配修复基因 *mutS* 的高效表达及表达产物活性鉴定

毕利军<sup>1,2</sup> 周亚凤<sup>1</sup> 邓教宇<sup>1</sup> 张先恩<sup>1\*</sup> 张成刚<sup>2</sup> Anthony E. G. Cass<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院武汉病毒所, 武汉 430071)

<sup>2</sup>(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

<sup>3</sup>(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology & Medicine, London, SW72AY, UK)

**摘要** 将 DNA 错配修复基因 *mutS* (2.56kb) 克隆于分泌型原核表达载体 pET32a(+) 上, 以 N 端融合 6 个组氨酸的形式在 *E. coli* AD494(DE3) 中进行了 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 分析证实有一与预期分子量相应的诱导表达条带, 其表达量占全菌蛋白质的 35% 左右, 且表达蛋白以可溶形式存在。利用固定化金属离子 ( $Ni^{2+}$ ) 配体亲和层析柱纯化目的蛋白, 其纯度为 90% 以上。与含有错配碱基 DNA 双链的结合反应证明该蛋白具有特异性识别、结合含有错配碱基 DNA 双链的生物活性。

**关键词** 错配修复基因 *mutS*, 表达, 纯化, 鉴定

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0536-05

DNA 错配修复 (Mismatch repair, MMR) 是细胞复制后的一种修复机制, 具有维持 DNA 复制保真度, 控制基因变异的作用。该系统首先是在原核生物大肠杆菌中发现的<sup>[1-4]</sup>, 随后在真核生物<sup>[5-7]</sup>及人类细胞中<sup>[8]</sup>也相继发现与错配修复密切相关的同源基因。近年来的大量研究表明, MMR 基因的突变或缺陷将导致复制后错配修复功能的丧失, 增加细胞自发突变的频率, 随着基因突变的不断放大积累, 使大量错误信息遍布于整个基因组, 最终导致肿瘤的发生<sup>[9-11]</sup>。MutS 蛋白是生物体内 MMR 系统的重要成分, 具有能单独识别、结合含有错配或未配对碱基核苷酸链的特性<sup>[3, 12, 13]</sup>, 是一种极具潜力的研究基因组多态性、检测及定位突变的工具蛋白<sup>[14]</sup>。本文在大肠杆菌中高效表达了 DNA 错配修复基因 *mutS*, 同时对表达产物进行生物活性鉴定, 为建立基于 MutS 蛋白的基因突变检测方法奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:** *E. coli* K-12 和 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存菌株。pGEM-T 载体购自 Promega 公司。*E. coli* AD494(DE3) 及表达载体 pET32a(+) 由胡勤

学博士馈赠。

**1.1.2 生化试剂:** DNA 聚合酶、限制酶及 T4 DNA 连接酶为 Takara 和 Sangon 公司产品。氨苄青霉素、卡那霉素、BSA(牛血清白蛋白)、IPTG(异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷)及 X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D 半乳糖苷)均购自 Sigma 公司。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。 $Ni^{2+}$ -NTA 树脂购自 Novogon 公司。寡核苷酸引物由上海生物工程有限公司合成。其他化学试剂均系国产分析纯试剂。

**1.1.3 培养基:** 大肠杆菌的培养、转化及蛋白的诱导表达均采用 LB 培养基。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 大肠杆菌基因组的提取:** 参考分子克隆。

**1.2.2 PCR 扩增 *mutS* 基因:** 从 GenBank 获得 *mutS* 基因全核苷酸序列, 使用 Primer 5.0 软件结合要扩增的 *mutS* 基因编码序列设计引物, 为便于后期的克隆与表达, 分别在上下游引物 5' 端添加了 EcoRI, HindIII 限制性酶切位点。上游引物: 5' GAATTCAT GAGTGCAATAGAAAATTTTCGAC 3', 下游引物: 5' AAGCTTTATTTTTATTGATTCGTCAGTTAT 3'。PCR 反应体系包括: 提取的基因组 DNA 为模板、适量的

上下游引物、dNTP 混合物、Pyrobest DNA 聚合酶。PCR 循环参数 :94℃ 变性 1.5 min , 50℃ 退火 1.5 min , 72℃ 延伸 3.0 min 进行 30 个循环反应 ,最后 72℃ 延伸 7 min。

**1.2.3 MutS 蛋白的诱导表达 :**将 *E. coli* AD494 (DE3) pET32a-*mutS* 和 *E. coli* AD494 (DE3) pET32a 分别接种于含氨苄青霉素 (100 μg/mL) 和卡那霉素 (60 μg/mL) 的 LB 培养基中 ,37℃ 培养过夜。次日 ,按 1% 接种量分别转接于 LB 培养基中 ,培养至  $OD_{600}$  在 0.4 ~ 0.6 之间 ,加 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L ,37℃ 继续诱导培养 3 ~ 5 h 后收集菌体待测。

**1.2.4 MutS 蛋白的亲和纯化 :**将含有重组质粒 pET32a-*mutS* 的表达菌株接种于 500mL LB 中做大量表达 ,离心收集诱导表达后的菌体 ,重悬于 50mL 缓冲液 A (5.0 mmol/L imidazole , 0.5mol/L NaCl , 20mmol/L Tris-HCl , pH 7.9) 中 ,超声破碎 ,13 000g × 30min 离心 ,上清上样于经缓冲液 A 平衡的  $Ni^{2+}$ -NTA 亲和层析柱 ,依次用缓冲液 A ,B (60 mmol/L imidazole , 0.5mol/L NaCl , 20mmol/L Tris-HCl , pH 7.9) ,C (1.0mol/L imidazole , 0.5mol/L NaCl , 20mmol/L Tris-HCl , pH 7.9) 洗脱。收集缓冲液 C 的洗脱物用透析液 D (50 mmol/L Tris-HCl , pH 7.2 , 100mmol/L KCl , 1.0mmol/L DTT , 1.0mmol/L EDTA) 充分透析 24h ,收集纯化蛋白。

**1.2.5 SDS-PAGE 分析蛋白纯度及分子量 :**10% 聚丙烯酰胺 ,考马斯亮蓝 R-250 染色 ,应用 Bio-Rad 公司的 Gel Doc2000 扫描系统分析蛋白的相对含量及分子量。

**1.2.6 MutS 蛋白浓度的测定 :**用 Bio-Rad 公司生产的蛋白质浓度测定试剂盒测定 ,以 BSA 作标准曲线。

**1.2.7 MutS 蛋白生物活性的鉴定 :**根据 MutS 蛋白能够识别、结合含有错配或未配对碱基 DNA 双链的特性 ,合成了以下 3 条寡核苷酸链 ,用来鉴定其生物活性。A :5' AATAGTTCTCAGGTTGACGGATCTGGACAC 3' ; B :5' GTGTCCAGATCCGTCGACCTGAGAACTATT 3' ; C :5' GTGTCCAGATCCGTC AACCTGAGAACTATT 3'。A :B 退火形成含有一个 G :T 错配的 DNA 双链 ,A :C 退火形成完全配对的 DNA 双链。MutS 蛋白与稀释后的错配 DNA 双链及完全配对 DNA 双链在缓冲液 E (20mmol/L Tris-HCl , pH 7.6 , 5.0 mmol/L  $MgCl_2$  , 0.1 mmol/L DTT , and 0.01 mmol/L EDTA) 中进行结合反应 ,冰上放置 30min 后 ,加入 50% 蔗糖 ,利用 10% 低离子强度聚丙烯酰胺凝胶电泳进行鉴定。具体操作为 100V 预电泳 90min 以上 ,

加样后 180V 电泳 90 ~ 120min ,EB 染色 30 ~ 45min 后紫外扫描分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 含 DNA 错配修复 *mutS* 基因表达载体的构建

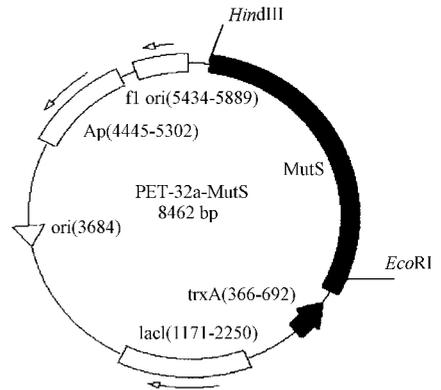


图 1 表达载体 pET32a-*mutS* 的结构

Fig. 1 Structure of the expression vector pET32a-*mutS*

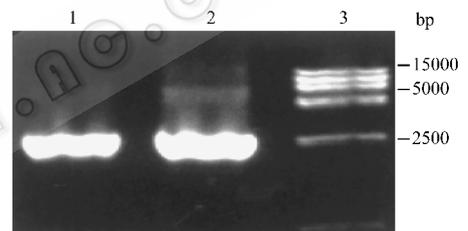


图 2 PCR 扩增结果凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1. PCR products from 1 μL genome of *E. coli* K-12 ;
2. PCR products from 3 μL genome of *E. coli* K-12 ;
3. DL-15000 DNA marker

含 DNA 错配修复 *mutS* 基因表达载体的结构如图 1。以 *E. coli* K-12 基因组为模板 ,利用引物 5' GAATTCATGAGTGCAATAGAAAATTTTCGAC 3' 和 5' AAGCTTTATTTTTATTTCGATTCGTCAGTTAT 3' 扩增两端分别加有 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切位点、大小为 2.56 kb 的完整 MutS 蛋白编码序列 (图 2)。PCR 产物加 polyA 并用试剂盒纯化后 ,以适当的比例与 T 载体混合 ,用 T4 DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* DH5α ,经蓝白斑筛选出阳性克隆菌 *E. coli* DH5α/pGEM-T-*mutS*。用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切 pGEM-T-*mutS* ,回收 *mutS* 基因 ,并将其与同样双酶切的 pET32a 连接 ,获得含 *mutS* 基因的大肠杆菌表达载体 pET32a-*mutS*。将重组质粒 pET32a-*mutS* 转化 *E. coli* DH5α ,经氨苄青霉素和卡那霉素抗性筛选出阳性克隆菌 *E. coli* DH5α/pET32a-*mutS* ,并用限制酶酶切和 PCR 分析对其进行鉴定 (图 3、图 4)。结果表明含有 *mutS* 基因

基因的表达载体已构建成功。

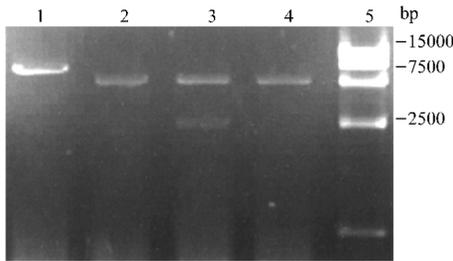


图3 重组质粒 pET32a-*mutS* 的酶切鉴定

Fig.3 Digestion assay of recombinant plasmid pET32a-*mutS*

1. pET32a-*mutS* digested with *EcoRI* ; 2. pET32a digested with *EcoRI* ;  
3. pET32a-*mutS* digested with *EcoRI* and *HindIII* ; 4. pET32a digested  
with *EcoRI* and *HindIII* 5. DL-15000 DNA marker

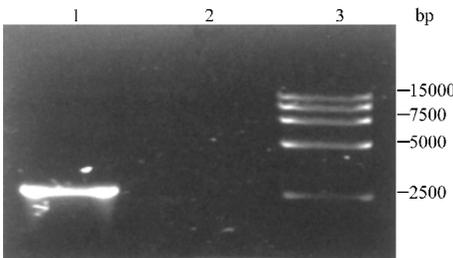


图4 重组质粒 pET32a-*mutS* PCR 鉴定结果凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1. PCR products from plasmid pET32a-*mutS* ;  
2. PCR products from plasmid pET32a ;  
3. DL-15000 DNA marker

## 2.2 *mutS* 基因的表达和产物纯化

提取质粒 pET32a-*mutS* 转化到 *E. coli* AD494 (DE3) 得到重组表达菌株 AD494 (DE3) /pET32a-*mutS* 将其于 500 mL LB 中培养 4h 后,加入终浓度为 1.0mmol/L 的 IPTG 诱导 5h,离心收集菌体进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析,结果在 108kD 处有一表达带,蛋白大小与预期相符(图 5),对照菌则几乎无该对应蛋白。利用过渡态金属离子  $Ni^{2+}$  与重组蛋白 MutS 的多聚组氨酸的高亲和力进行重组蛋白的纯化。将菌体重悬于 50mL 缓冲液 A 中,超声波破碎,13 000g × 30min 离心取上清。上清上样于经缓冲液 A 平衡的  $Ni^{2+}$ -NTA 亲和层析柱,依次用缓冲液 A, B, C 洗脱。在缓冲体系 A 中 His6-MutS 与  $Ni^{2+}$  充分结合。缓冲液 B 中一定浓度的咪唑能除去杂蛋白。缓冲液 C 中的高浓度咪唑能将目的蛋白洗脱下来,收集缓冲液 C 的洗脱物即为纯化蛋白溶液。蛋白溶液经透析液 D 充分透析 24h 后,超滤浓缩,紫外分析结果表明目的蛋白的纯度在 90% 以上(图 6)。

## 2.3 *mutS* 基因表达产物生物活性检测

*mutS* 基因表达产物生物活性的鉴定是根据

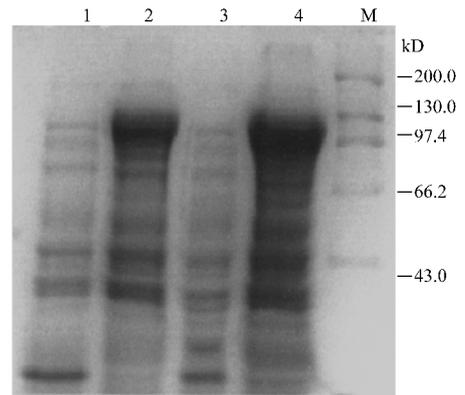


图5 *mutS* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE of crude protein extract

1 and 3. The crude protein extract of AD494 (DE3) /pET32a after induction for 3h and 5h respectively ; 2 and 4. The expressed products of AD494 (DE3) /pET32a-*mutS* after induction for 3h and 5h respectively ;  
M. HMW marker

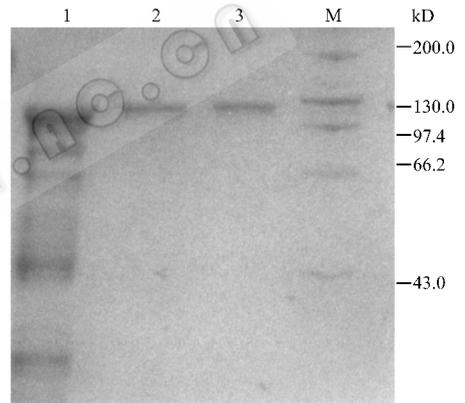


图6 纯化后的 MutS 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE of purified MutS protein

1. The product before purifying ; 2 and 3. Purified MutS protein ;  
M. HMW marker

MutS 蛋白能够特异性识别、结合含有错配或未配对碱基异源双链的特性来实现的。本研究通过 MutS 蛋白与正常配对 DNA 双链和含错配碱基 DNA 双链结合的对比如实验及 MutS 蛋白和 BSA 分别与含错配碱基 DNA 双链结合的对比如实验来鉴定 MutS 蛋白特有的生物活性。

将 MutS 蛋白分别与等量含错配碱基 DNA 双链 (3μg/mL) 和正常配对 DNA 双链 (3μg/mL) 进行结合反应,结果如图 7 所示。MutS 蛋白与含错配碱基 DNA 双链和正常配对 DNA 双链的结合差异很大。当 MutS 蛋白浓度为 0.3 mg/mL 时,它与正常配对的 DNA 双链几乎无结合,而与含有错配碱基的 DNA 双链有明显结合现象。当 MutS 蛋白浓度增加至 0.5mg/mL 时,含有错配碱基的 DNA 双链则几乎完

全被结合。

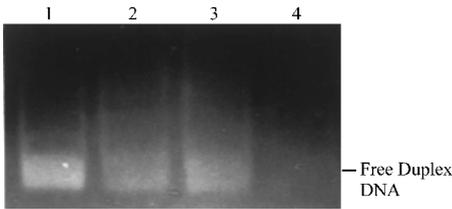


图7 MutS 蛋白与错配 DNA 和配对 DNA 结合的比较

Fig.7 Comparison of MutS binding activity between mismatch DNA and paired DNA

1. 0.3 mg/mL of MutS binding to paired DNA ; 2. 0.3mg/mL of MutS binding to impaired DNA ; 3. 0.5 mg/mL of MutS binding to paired DNA ; 4. 0.5mg/mL of MutS binding to impaired DNA

将等浓度 MutS 蛋白和 BSA 分别与含有错配碱基 DNA 双链(  $3\mu\text{g}/\text{mL}$  )及正常配对 DNA 双链(  $3\mu\text{g}/\text{mL}$  )进行结合反应 结果见图 8。MutS 蛋白和 BSA 浓度为  $0.5\text{mg}/\text{mL}$  时 ,MutS 蛋白与含有错配碱基 DNA 双链完全结合但不与正常配对的 DNA 双链结合 ,而 BSA 则与含有错配碱基 DNA 和正常配对 DNA 均无明显结合现象。以上结果表明 ,MutS 蛋白与含错配碱基 DNA 双链的结合是高度特异的。

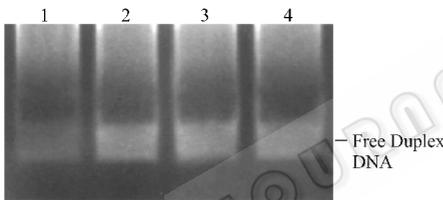


图8 MutS 蛋白与 BSA 和 DNA 结合的比较

Fig.8 Comparison of binding activity between MutS and BSA binding to DNA

1. MutS binding to mismatch DNA 2. MutS binding to paired DNA ; 3. BSA binding to mismatch DNA 4. BSA binding to paired DNA

为获得 MutS 蛋白与含有错配碱基 DNA 双链的最佳结合条件 ,本研究还对 MutS 蛋白浓度和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 MutS 蛋白与含有错配碱基的 DNA 双链结合效果的影响进行了深入探讨。

在含有错配碱基的双链 DNA(  $3\mu\text{g}/\text{mL}$  )溶液中分别加入浓度为  $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.3\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.4\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.6\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.7\text{mg}/\text{mL}$  的 MutS 蛋白溶液进行结合反应。结果( 图 9 )表明 ,随着 MutS 蛋白浓度的增加 ,未被结合的 DNA 双链越来越少 ,蛋白浓度增加到一定值(  $0.5\text{mg}/\text{mL}$  )时 ,含有错配碱基的核酸链可被完全结合。

$\text{Mg}^{2+}$  浓度对 MutS 蛋白结合活性的影响见图 10。在 MutS 蛋白与含有错配碱基 DNA(  $3\mu\text{g}/\text{mL}$  )双

链的结合反应体系中 ,调整  $\text{Mg}^{2+}$  浓度依次为  $2\text{mmol}/\text{L}$ 、 $3\text{mmol}/\text{L}$ 、 $4\text{mmol}/\text{L}$ 、 $5\text{mmol}/\text{L}$ 、 $6\text{mmol}/\text{L}$ 、 $7\text{mmol}/\text{L}$ 。结果表明 ,随着  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加 ,MutS 蛋白与含有错配碱基 DNA 双链的结合增强 ,当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度增加到  $5\text{mmol}/\text{L}$  后 ,二者的结合不再增加或者增加很少。

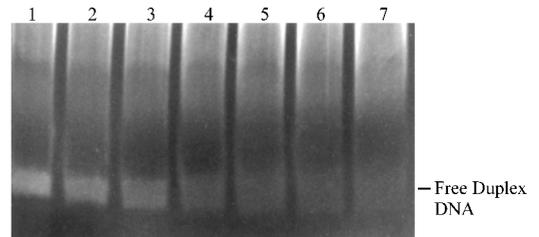


图9 不同浓度的蛋白质结合活性比较

Fig.9 Comparison of binding activity of protein with different concentration

1 ~ 7. Concentration of MutS is  $0.1\text{mg}/\text{mL}$  ,  $0.2\text{mg}/\text{mL}$  ,  $0.3\text{mg}/\text{mL}$  ,  $0.4\text{mg}/\text{mL}$  ,  $0.5\text{mg}/\text{mL}$  ,  $0.6\text{mg}/\text{mL}$  ,  $0.7\text{mg}/\text{mL}$  respectively

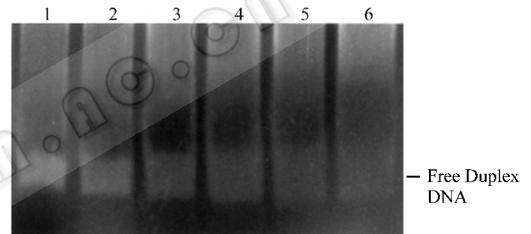


图10  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 MutS 蛋白结合活性的影响

Fig.10 Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  concentration on MutS binding activity

1 ~ 6. Concentration of  $\text{Mg}^{2+}$  is  $2\text{mmol}/\text{L}$  ,  $3\text{mmol}/\text{L}$  ,  $4\text{mmol}/\text{L}$  ,  $5\text{mmol}/\text{L}$  ,  $6\text{mmol}/\text{L}$  ,  $7\text{mmol}/\text{L}$  respectively

### 3 讨 论

根据 DNA 错配修复 MutS 蛋白结构与功能上的高度保守性 ,通过 PCR 和 DNA 重组构建了大肠杆菌 DNA 错配修复基因 *mutS* 的原核表达载体 ,获得重组菌 *E. coli* AD494( DE3 )pET32a-*mutS* ,利用含 T7 启动子的表达载体 pET32a 和整合有 T7 基因的宿主菌 AD494( DE3 )对目的蛋白进行表达。在 IPTG 诱导条件下 ,宿主菌表达 T7 RNA 聚合酶 ,识别表达载体上的 T7 启动子 ,从而转录目的基因。由于 T7 RNA 聚合酶活性很强 ,转录效率是大肠杆菌 RNA 聚合酶的 5 倍。因此构建表达载体时 ,首先转化不含 T7 基因的 *E. coli* DH5 $\alpha$  ,鉴定正确后转化表达宿主菌 *E. coli* AD494( DE3 ) ,以防止未诱导的细胞中少量存在的 T7 RNA 聚合酶诱导目的蛋白的表达 ,对宿主细胞产生毒性作用。表达的目的蛋白 N 端融合了硫氧还蛋白和 His6。和硫氧还蛋白的融合 ,可防止表

达产物形成包涵体,和 His<sub>6</sub> 的融合,便于利用它与过渡态金属离子 Ni<sup>2+</sup> 高亲和力结合的特性,通过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂对 His<sub>6</sub>-MutS 融合蛋白直接一步纯化,大大简化了纯化的步骤。经鉴定 Trix-His<sub>6</sub>-MutS 融合蛋白仍具有 MutS 蛋白的生物活性,表明在 N-端融合其它肽段并没有对 MutS 蛋白的生物活性造成不利影响。这与 Obmolova G 等<sup>[15]</sup>报道的 MutS 蛋白功能区分布一致,也为以后对 MutS 蛋白进一步修饰和分子改造提供了理论依据。

在进行 MutS 蛋白与错配 DNA 的结合活性检测时发现,被 MutS 蛋白结合的 DNA 双链与等量的自由 DNA 双链相比,荧光强度相对较弱。这种现象可能是因为发生结合反应的部分 DNA 双链碱基,由于 MutS 蛋白的保护使 EB 不能嵌入到 DNA 内部,因而与未发生结合反应的 DNA 双链相比显示的荧光强度较弱。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**: 101 ~ 33
- [ 2 ] Lahue R S, Au K G, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 1989, **245**: 160 ~ 164
- [ 3 ] Au K G, Welsh K, Modrich P. Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 12142 ~ 12148
- [ 4 ] Su S S, Modrich P. *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 5057 ~ 5061
- [ 5 ] Alani E. The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form

- a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 5604 ~ 5615
- [ 6 ] Alani E, Sokolsky T, Studamire B *et al.* Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p: role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 2436 ~ 2447
- [ 7 ] Studamire B, Quach T, Alani E. *Saccharomyces cerevisiae* Msh2p and Msh6p ATPase activities are both required during mismatch repair. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 7590 ~ 7601
- [ 8 ] Gradia S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell*, 1997, **91**: 995 ~ 1005
- [ 9 ] Drummond J T, Li G M, Longley M J *et al.* Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, 1995, **268**: 1909 ~ 1912
- [ 10 ] Aaltonen L A, Peltomaki P, Leach F S *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 1993, **260**: 812 ~ 816
- [ 11 ] Smith J, Modrich P. Mutation detection with MutH, MutL, and MutS mismatch repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 4374 ~ 4379
- [ 12 ] Su S S, Lahue R S, Au K G *et al.* Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 6829 ~ 6835
- [ 13 ] Welsh K M, Lu A L, Clark S *et al.* Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutH gene product. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 15624 ~ 15629
- [ 14 ] Peltomaki P, Aaltonen L A, Sistonen P *et al.* Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*, 1993, **260**: 810 ~ 812
- [ 15 ] Obmolova G, Ban C, Hsieh P *et al.* Structure Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, 2000, **407**: 703 ~ 710

## High Expression and Identification of DNA Mismatch Repair Gene *mutS* in *Escherichia coli*

BI Li-Jun<sup>1,2</sup> ZHOU Ya-Feng<sup>1</sup> DENG Jiao-Yu<sup>1</sup> ZHANG Xian-En<sup>1\*</sup> ZHANG Cheng-Gang<sup>2</sup> Anthony E G Cass<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

<sup>2</sup>(Shenyang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015, China)

<sup>3</sup>(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology & Medicine, London, SW72AY, UK)

**Abstract** DNA mismatch repair gene *mutS* (2.56kb) was PCR modified and cloned into a secretive prokaryotic expression vector pET32a(+) which carries a N-terminal His<sub>6</sub> tag and thioredoxin sequence. MutS protein was expressed with high level after IPTG induction using the strain *E. coli* AD494(DE3). SDS-PAGE revealed that the expected protein with a molecular weight of 108kD which is about 35% of the total bacterial proteins is almost soluble. The expected protein was purified directly by immobilized metal (Ni<sup>2+</sup>) chelation affinity chromatography and the purity is over 90%. MutS protein activity verified using mismatch DNA showed that the expression product can recognize and bind to base-pair mismatch specifically.

**Key words** mismatch repair gene *mutS*, expression, purified, verify

Received: 04-12-2002

This work was supported by Grant from Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-06-01).

\* Corresponding author. Tel: 86-27-8764192; Fax: 86-27-87641492; E-mail: xianen.zhang@pentium.whuov.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn