

四环素-绿色荧光蛋白融合蛋白的构建及其活性测定

Construction and Characterization of TetR and GFP Fusion Protein

左 妍, 杨克迁*

ZUO Yan^{1,2} and YANG Ke-Qian^{1*}

1. 中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

1. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 将来源于水母的绿色荧光蛋白基因 (*gfp*) 和来源于 *E. coli* 转座子 Tn10 的四环素阻遏蛋白基因 (*tetR*) 共同构建到 *E. coli* 表达载体 pET-30a+ 上, 获得 TetR C-端与 GFP N-端融合蛋白。对经诱导表达并纯化后的融合蛋白 (TR::GFP) 进行荧光发射光谱分析表明, 该融合蛋白保留了 GFP 的荧光特性, 即在 395 nm 激发下, 可在 510 nm 附近有特征发射峰。在加入四环素后, 融合蛋白在 395 nm 激发下, 在 400 nm ~ 700 nm 范围内的发射光谱发生明显变化, 荧光强度普遍增加, 且以 510 nm 处最大发射峰增幅最大, 由原来 1.132 增至 2.214, 而四环素对相同浓度的 GFP 与 TetR 荧光影响不大, 结果表明该融合蛋白, 能感受外界四环素, 并产生一定的荧光变化。

关键词 绿色荧光蛋白 (GFP), 四环素阻遏蛋白 (TetR), 荧光光谱, 荧光强度, 融合蛋白, 四环素生物传感器

中图分类号 TQ93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0097-05

Abstract Tetracycline repressor gene (*tetR*) from *E. coli* transposon Tn10 was fused in frame with green fluorescent protein gene (*gfp*) from jellyfish *Aequorea Victoria* on an *E. coli* expression vector and the fusion protein (TR::GFP) was purified. The binding of TR::GFP with tetracycline (tc) was demonstrated by nitrocellulose filter binding assay. TR::GFP also maintained the fluorescence property of GFP. Most significantly, fluorescence emission intensity of TR::GFP increased by 2-fold in the presence of tc, from 1.132 to 2.214, while those of GFP and TetR showed little change under similar conditions. The results indicated TR::GFP possesses characteristics of a tetracycline biosensor.

Key words GFP, TetR, fluorescence spectrum, fluorescence intensity, fusion protein, tetracycline biosensor

近年来, 从水母 (jellyfish *Aequorea victoria*) 分离得到的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 由于其良好的荧光特性, 作为观察标记得到了广泛的应用。野生型 GFP 不需借助辅助因子, 在 395 nm 激发下可在 507 nm 处观察到明亮的绿色, 十分易于

检测, 荧光稳定, 表达宿主广泛, 在原核生物、真核生物都有相关文献报道^[1, 2]。GFP 可以做报道基因, 活体标记融合蛋白组分^[3, 4, 5]。另外, 基于 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 技术的 Ca²⁺ 生物传感器^[6]、及将 β 内酰胺酶基因 (β -lactamase, Bla)

Received: May 24, 2004; Accepted: June 18, 2004

This work was supported by CAS Innovation Program.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62653230; E-mail: yangkq@sun.im.ac.cn

中国科学院知识创新工程项目资助。

插入到 GFP 蛋白表面构建的 β 内酰胺酶阻遏蛋白 (β -lactamase-inhibitory protein, BLIP) 生物传感器^[7]等工作揭示 GFP 作为生物传感器的可能性。

四环素阻遏蛋白 (tetracycline repressor protein, TetR) 能在四环素 (tetracycline, tc) 诱导下, 严谨调控四环素抗性蛋白 (tetracycline resistance protein, TetA) 的表达。TetR 能与 tc 特异结合, 结合常数 3×10^9 L/mol; TetR-tc 复合体的晶体结构显示, TetR 在 Mg^{2+} 存在时 tc 诱导下, 构象产生明显变化: TetR 由 10 个 α -螺旋构成, 通常形成二聚体, N 端 $\alpha 1$ - $\alpha 3$ 构成了 HTH (helix-turn-helix) DNA 识别结构域, 通过它 TetR 与 tet operon 特异结合; tc 与 TetR 的诱导域结合后, 使得 TetR 发生整体构象变化, 导致 HTH 结构域不能进入 DNA 大沟, TetR 从 tet operon 上脱落, 转录得以进行^[8,9,10]。

本文试图构建四环素绿色荧光蛋白生物传感器, 将能与四环素特异结合的四环素阻遏蛋白与绿色荧光蛋白构建融合蛋白, 利用 TetR 与 tc 的特异结合所产生的构象变化, 使之融合表达的 GFP 的荧光产生变化, 从而达到通过荧光变化来检测环境中四环素的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 为本实验室保存; 质粒 pGEM T-Easy 购自 Promega 公司, 质粒 pET-30a+、pGFP-R12 为本实验室保存; 质粒 pcDNA6/TR 为微生物所高光侠老师惠赠。

1.1.2 培养基: LB 培养基见分子克隆操作指南^[11]; 氨苄青霉素和卡那霉素使用浓度分别为 100 μ g/mL、50 μ g/mL。

1.1.3 酶和试剂: 各种 DNA 限制酶、T4 DNA 连接酶、小牛肠碱性磷酸酶购自 TaKaRa 公司; Taq DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒购自申工公司; 蛋白质分子量标准购自鼎国公司; NTA 树脂购自上海申能博采公司; His·Bind⁺ Columns 购自 Novagen 公司; X-Gal 购自 Promega 公司; PCR 引物由申工公司合成; 其它生化试剂购自 Sigma 等公司。

1.2 方法

1.2.1 *gfp* 的获得: 以 pGFP-R12 为模板, 由下列一对引物 GF5、GF6 扩增获得; 根据文献中^[12]的 *gfp* 序列设计扩增引物 GF5: 5'-CGC GGATCC GAAG-GAGATATACATATGAGT-3' (含 BamH I); GF6: 5'-CCC AAGCTT ATGCATGCCTGCAGGTCTCGACAT-3' (含

Hind III); PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 扩增得到约为 721 bp 大小 *gfp* 全长基因。

1.2.2 *tetR* 的获得: 以 pcDNA6/TR 为模板, 由下列一对引物 TR1, TR2 扩增获得, 除去了 *tetR* 的中止子; 根据文献^[13]中的 *tetR* 序列设计扩增引物 TR1: 5'-GC GGTACC ATGTCTAGATTAGATAAAAAG-3' (含 Kpn I); TR2: 5'-AA GGTACC ATAAGATCTGAATTCCCG-3' (含 Kpn I); PCR 反应: 与扩增 *gfp* 完全一致, 扩增得到约为 624 bp 大小 *tetR*。

1.2.3 表达载体的构建:

载体 pET-*gfp* 的构建: 用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 扩增产物 *gfp*, 连接到 pGEM T-Easy 上。提取重组质粒 pT-GFP, 酶切验证, 测序。将 BamH I 和 Hind III 酶切获得 *gfp* 回收, 再与经相同酶切的 pET-30a+ 连接, 转化 DH5 α , 从转化子中挑取含有重组质粒的克隆, 提取质粒 pET-*gfp*, 酶切鉴定。

载体 pET-Tr 的构建: 回收 PCR 扩增的 *tetR*, 连接到 pGEM T-Easy 上。提取重组质粒 pT-TR, 酶切验证, 测序。将 Kpn I 酶切获得 *tetR* 回收, 与经相同酶切的 pET-30a+ 连接, 转化 DH5 α ; 从转化子中挑取含有重组质粒的克隆, 提取质粒 pET-TR, 用 Kpn I 和 Xba I 酶切验证。

载体 pTG-K2 的构建: 用 Kpn I 酶切处理 pET-*gfp*, 回收约 6143 bp 片段; 用同样酶处理 pET-Tr, 回收 *tetR*, 连接, 转化 DH5 α , 挑取含有重组质粒克隆, 提取质粒, 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, Kpn I 单酶切验证, 最终测序。

1.2.4 重组蛋白在 *E. coli* BL21 中表达: GFP、TetR、TR::GFP 的表达: 将质粒 pET-*gfp*、pET-Tr 和 pTG-K2 转化至 BL21 (DE3) 中, 挑取阳性克隆接种到含卡那霉素的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 第二天按 2% 接种量接种于新鲜的含卡那霉素的 LB 中, 继续培养到菌液 OD_{600} 达到 0.6 ~ 1.0 时, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导, 30 $^{\circ}$ C 培养 5 ~ 6 h 后, 6000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 将菌体用蒸馏水重悬, 用超声波破碎菌体, 离心取上清用 SDS-PAGE 分析表达产物。

1.2.5 TetR、GFP 及 TR::GFP 的纯化:

菌体培养: 将含有质粒 pET-Tr, pET-*gfp* 和 pTG-K2 的 BL21 (DE3) 的单克隆, 接种到含卡那霉素的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 第二天按 2% 接种量转接于 400 mL 的含卡那霉素的 LB 中, 继续培养到菌液 OD_{600} 达到 0.5 ~ 0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导,

30℃培养 5~6 h 后, 10 000 × g 离心 10 min 收集菌体, 用预冷的 NTA-0 buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5 mol/L NaCl, 10% Glycerol) 重悬菌体 (5 mL NTA-0 buffer/100 mL 菌液), 加入终浓度分别为 1 mmol/L PMSF, 0.2 mg/mL 溶菌酶, 混匀, 冰上放置 30 min, 冰上超声波破碎细胞, 加入 10% Triton X-100, 使 Triton 的终浓度为 0.05%, 充分混匀, 冰上放置 15 min, 冰上超声破碎细胞; 加入 1 mol/L MgCl₂, 使其终浓度为 1 mmol/L, 混匀, 加入终浓度为 10 μg/mL 的 DNase I, 混匀, 室温放置 10 min; 15 000 × g, 4℃ 离心 20 min 取上清, 经 0.45 micron 滤膜过滤, 除去杂质。

过柱纯化: 利用 His·Bind 试剂盒纯化, 依据非变性条件下抽提 His-Tag 蛋白质的步骤: 1) 将 NTA 树脂装入合适的层析柱, 用 10 倍 NTA 体积的 NTA-0 buffer 平衡柱子; 2) 将经过上述步骤处理的样品过柱, 流速控制在 15 mL/h, 待流尽后, 用 5 倍 NTA 体积的 NTA-0 buffer 洗, 流速为 30 mL/h; 3) 分别用 5 倍 NTA 体积的 NTA-20, NTA-40, NTA-60, NTA-80, NTA-100, NTA-200, NTA-1000 buffer 洗脱, 流速控制在 15 mL/h, 收集洗脱液; 4) SDS-PAGE 分析蛋白纯化结果 [NTA-X 表示含有 X mmol/L 的咪唑 (imidazole)]^[14]。

透析: 将纯化的蛋白透析处理, 透析缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂), 收集经透析处理的纯化蛋白 GFP、TetR、TR::GFP, 并用 Bradford 法测定蛋白浓度^[15]。

1.2.6 蛋白性质研究:

硝酸纤维膜结合实验^[16]: 在 100 μL 结合缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0; 20 mmol/L MgCl₂; 200 mmol/L NaCl; 6 mmol/L 巯基乙醇; 0.1 mmol/L EDTA, 50 μg BSA) 中, 加入 120 μL tc (2.6 mg/mL) 及 100 μL TR::GFP, 混匀, 37℃ 放置 15 min, 混合液用 0.48 μmol/L 硝酸纤维膜过滤, 用冰冷的 1 mL 洗脱缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0; 20 mmol/L MgCl₂; 200 mmol/L NaCl; 6 mmol/L 巯基乙醇; 0.1 mmol/L EDTA) 洗膜 3 次, 收集洗脱液, 在 373 nm 处用 LKB Ultrospec[®] II Spectrophotometer 检测 tc 紫外吸收。

蛋白的荧光检测^[17]: 荧光缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl pH 7.5; 10 mmol/L NaCl; 10 mmol/L MgCl₂), 加入 tc (终浓度为 0.185 μmol/L) 和蛋白样品 (终浓度 0.133 μmol/L), 用荧光缓冲液定容至 1.5 mL, 混合 10s 后, 20℃ 用 F-2500 FL Spectropho-

meter 检测荧光变化。在 395 nm 激发, 记录了 400 nm~700 nm 的发射光谱。

2 结果及分析

2.1 片段克隆与表达载体构建

为了构建融和蛋白的需要及基因操作的方便, 选择了不同的引物对从载体 pcDNA6/TR、pGFP-R12 分别扩增出 *tetR* (除去其 C 末端终止子)、*gfp*, 测序分析序列正确。

表达载体 pET-TR、pET-GFP、pTG-K2 的成功构建经酶切验证和测序证实。

2.2 融和蛋白在 *E. coli* BL21 中的表达、亲和纯化及其 SDS-PAGE 检测

2.2.1 GFP、TetR 和 TR::GFP 表达: 对 GFP、TetR 和 TR::GFP 经过不同诱导时间表达, 分析蛋白表达情况表明 TetR、GFP 和 TR::GFP 在 30℃ 经 IPTG 诱导表达 5 h 后表达量增加不明显, TetR 和 TR::GFP 分别以可溶性蛋白和包涵体两种形式存在, GFP 多以可溶性蛋白存在 (图 1)。

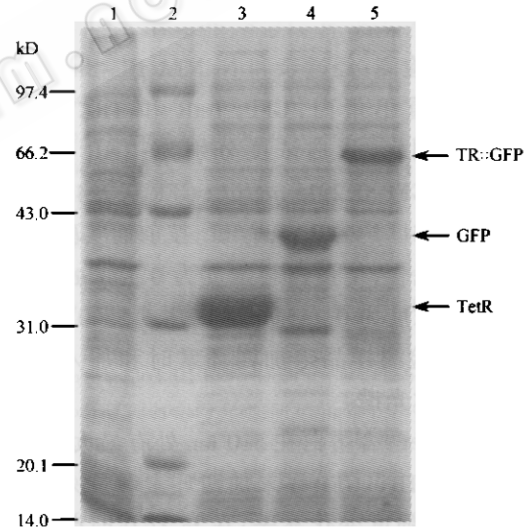


图 1 重组蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression in *E. coli*

Protein samples were prepared as described in the method section.

1: pET-30a+; 2: molecular weight marker; 3: pET-TR; 4: pET-GFP; 5: pTG-K2.

2.2.2 重组蛋白亲和纯化及 SDS-PAGE 检测: 在构建表达载体时, GFP、TetR 和 TR::GFP 的 N 端引入了 6 个组氨酸标签, 可以利用 Ni-NTA 树脂亲和纯化。纯化的目的蛋白纯度达到 90% 以上 (图 2)。

2.3 融合蛋白性质研究

2.3.1 硝酸纤维膜结合实验: 样品中不加入

TR::GFP,而其它成分一样,97%的tc通过硝酸纤维素膜;样品中加入一定量TR::GFP,只有约60%的tc通过硝酸纤维素膜,初步说明TR::GFP能与tc结合,使得一部分的tc与蛋白一起截留在硝酸纤维素膜上。

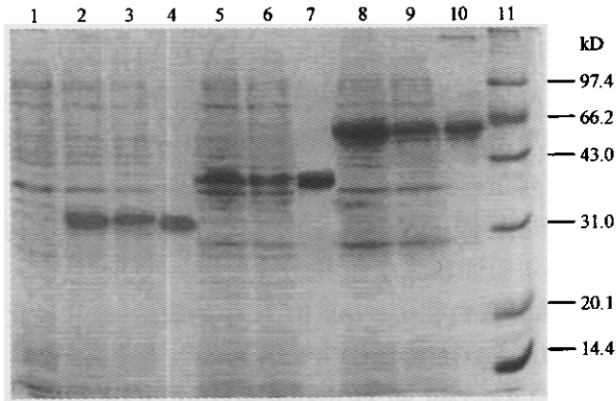


图2 重组蛋白纯化的SDS-PAGE检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins purified by His-Bind columns

1: pET-30a+; 2: pET-TR; 3: the supernatant of pET-TR induced; 4: purified TetR; 5: pET-GFP; 6: the supernatant of pET-GFP induced; 7: purified GFP; 8: pTG-K2; 9: the supernatant of pTG-K2 induced; 10: purified TR::GFP; 11: molecular weight marker.

2.3.2 荧光检测:经过亲和Ni-NTA His-Binding column纯化的重组蛋白,GFP,TetR和TR::GFP经Brandford法测定,蛋白浓度分别为:TetR 0.021795 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; TR::GFP 0.2915 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; GFP 0.7941 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。四环素母液浓度约为2.6 mg/mL,按前面实验方法描述取一定量混合,使蛋白终浓度为0.133 $\mu\text{mol}/\text{L}$,所加四环素终浓度为0.185 $\mu\text{mol}/\text{L}$,用F-2500 FL Spectrophotometer检测样品未加四环素时和加入四环素时的荧光发射光谱。

TR::GFP融合蛋白在510 nm处有最大发射峰,与GFP一致;TR::GFP在未加四环素和加入四环素情况下,荧光强度变化显著:在tc存在时荧光强度普遍增大,在510 nm由未加四环素时的荧光强度1.132增至2.214,增幅为95.6% (图3 A)。

相同条件下四环素和TetR混合样品用F-2500 FL Spectrophotometer检测,经395 nm激发,在510 nm处没有发射峰。单独四环素(0.185 $\mu\text{mol}/\text{L}$)或TetR样品做荧光检测,在400~700 nm范围内没有发射峰。GFP样品荧光检测,在510 nm出现强的发射峰,加入四环素,GFP的荧光强度影响不大,略微变小,但幅度不大(图3 B)。

数据表明TR::GFP作为一个整体,对四环素产生一定的感受效应。

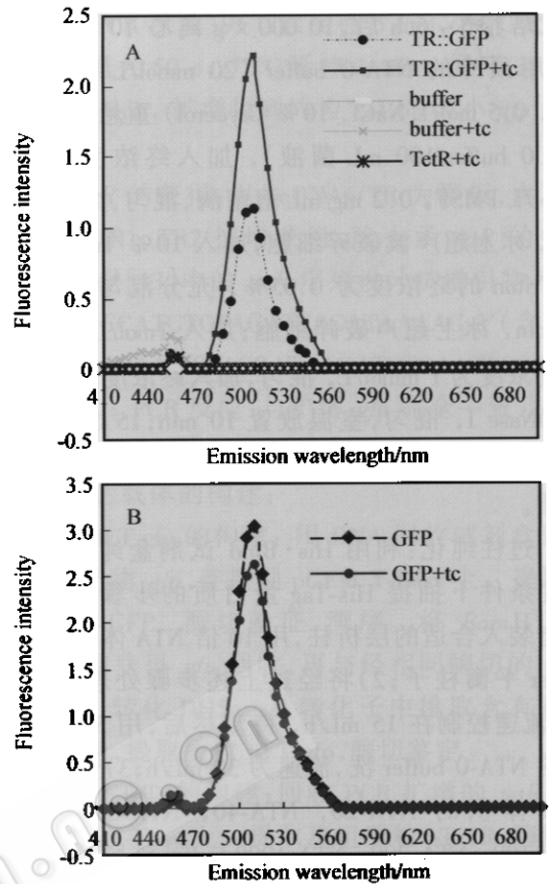


图3 重组蛋白在不同条件下的荧光变化

Fig. 3 Fluorescence spectra of recombinant proteins under different conditions

A: fluorescence spectra of samples; B: fluorescence spectra of GFP.

3 讨论

用蛋白质工程构建分子水平生物传感器,是将具有譬如光学或电化学信号传导机制功能的基团直接整合到能与某物质特异结合的蛋白上,从而获得能特异性检测该物质的生物感受器。这项技术的最终目标是建立简单、通用的检测方法。但是把好的信号传导机制与特异的结合位点有机结合十分困难^[18]。GFP具有优良的光学信号传导机制,产生的荧光信号易于检测,不仅可以通过简单视觉观察,还可以借助FACS (fluorescence-activated cell sorting) 实现高通量筛选和体外微量反应板检测^[19]。

国外已有成功的基于GFP生物传感器的报道^[7],它是将能与BLIP特异结合的Bla插入到GFP的172-173氨基酸残基间,融合表达GFP::Bla,从而构建成能感应一定浓度范围BLIP的生物传感器。考虑到TetR蛋白N端与C端间距较大,不呈现紧密的球形蛋白空间结构,在GFP 172-173氨基酸残基插入该蛋白而不影响GFP的结构和功能存在较大

的风险,所以本文尝试先将 TetR 的 C 端与 GFP 的 N 端构建融合蛋白,这种选择主要是考虑到 GFP 的 N 端序列作为它 β -CAN 结构的固有序列,对 GFP 折叠是必须的并能保护荧光生色基团,而且通常 GFP 的 N 端融合不会影响 GFP 和与之融合的蛋白功能。将构建好的 TR::GFP 在大肠杆菌 BL21(DE3) 诱导表达、纯化并检测蛋白的荧光性质,以单独的 GFP, TetR 作为对照,结果显示 TR::GFP 既具有能与四环素结合的特性,又具有野生型 GFP 独特的荧光,更为重要的,它对一定量的四环素敏感,并研究了不同浓度的四环素对它的滴定效应,结构显示 TR::GFP 的荧光强度能随着四环素浓度的增加而发生相应的改变,但效果不明显(数据未发表)。这些初步说明 TR::GFP 具备了四环素生物传感器的潜能,为我们进行下一步工作奠定了基础。如何解释添加定量的四环素能引起融合蛋白荧光强度的改变,仍需要在蛋白晶体结构、蛋白构象等方面进一步深入研究。

虽然本文构建的 TR::GFP 可以借助荧光仪检测与四环素结合所产生的荧光变化,但离实际应用还有很大距离,需要进一步研究它对其它四环素是否有特异性检测能力;另外它还有检测信号较弱、不易捕捉的问题;荧光检测易受到环境因素的影响。这些都需要我们在已有基础上通过定点突变或构建易错 PCR 融合蛋白库,从中筛选出信号放大的融合蛋白等方法进一步改进,以构建更好的能够实际应用的生物传感器。

致谢 感谢王胜兰博士、伍晓斌博士在实验中给予的指导和帮助,感谢清华大学周海梦老师允许使用 F-2500 FL Spectrophotometer。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Cubitt AB, Heim R, Adams SR *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**: 448 - 455
- [2] Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509 - 544
- [3] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**: 802 - 805
- [4] Stauber RH, Horic K, Carney P *et al.* Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biol Techniques*, 1998, **24**: 462 - 471
- [5] Gura T. Structure of gene-tag protein solved. *Science*, 1996, **273**: 1336 - 1336
- [6] Miyawaki A, Llopis J, Heim R *et al.* Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, **388**: 882 - 887
- [7] Doi N, Yanagawa H. Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution. *FEBS Letters*, 1999, **453**: 305 - 307
- [8] Hinrichs W, Kisker C, Duvel M. Structure of the tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science*, 1994, **264**: 418 - 420
- [9] Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol*, 1996, **165**: 359 - 369
- [10] Hillen W, Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, 1994, **48**: 345 - 369
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [12] Niedz RP, Sussman MR, Satterlee JS. Green fluorescent protein: An *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep*, 1995, **14**: 403 - 406
- [13] Postle K, Nguyen TT, Bertrand KP. Nucleotide sequence of the repressor gene of the Tn10 tetracycline resistance determinant. *Nuc Acids Res*, 1984, **12**: 4849 - 4863
- [14] Novagen His tag purification and detection tools. *Instruction Manual*
- [15] Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*, 1985, **151**: 369 - 374
- [16] Hillen W, Klock G, Kaffenberger I *et al.* Purification of the tet repressor and tet operator from the transposon Tn10 and characterization of their interaction. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 6605 - 6613
- [17] Takahashi M, Altschmid L, Hillen W. Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer. *J Mol Biol*, 1986, **187**: 341 - 348
- [18] Hellinga HW, Marvin JS. Protein engineering and the development of generic biosensors. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**: 183 - 189
- [19] Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 1998, **394**: 192 - 195