



恶性疟合成多肽抗原基因 在大肠杆菌中表达产物的分离纯化

陈仕荣 王昌才 钟雄林 胡亚芳 王启松*

(第一军医大学生物化学教研室 广州 510515)

我们用化学方法合成的两个恶性疟原虫杂合抗原基因,即 A 基因和 B 基因^(1,2),分别与表达载体 pWR450·1 重组并转化到大肠杆菌使其表达^(3,4)。经筛选获得了 pWR/A·7 和 pWR/B·164 两个表达较高的克隆菌(经扫描测定表达融合蛋白量分别为菌体总蛋白的 8.8% 和 11.0%)。又将 A 基因和 B 基因串连后与 pWR450·1 重组并转化到大肠杆菌 JM103 株,经筛选鉴定获得了上述两个基因串连的 pWR/AB·20 克隆菌(表达融合蛋白量为 35.8%)。为了进一步研究这 3 个克隆菌表达蛋白的免疫功能等活性,用 8.0mol/L 脲处理包涵体,离心沉淀上清液进行 DEAE-sephacel 柱层析,用 Tris 梯度缓冲液洗脱,但分离效果不好,而应用 PAGE 方法进行分离纯化,则可得到电泳纯、稳定又具有免疫原性的产物。

1 材料和方法

1.1 菌株

pWR/A·7, pWR/B·164, pWR/AB·20 克隆菌斜面培养物。

1.2 试剂

三羟甲基氨基甲烷(Tris),丙烯酰胺(国产),购于广州医药站化学试剂公司。亚甲双丙烯酰胺,十二烷基硫酸钠(SDS),购于上海化学试剂采购供应站(进口分装)。

1.3 克隆菌的培养

上述 3 个克隆菌斜面培养物,分别接种于 10ml LB 培养基(含 Ap 25μg/ml),37℃ 振荡培养过夜,转种于 400ml LB 培养液(含乳糖 5mg/ml, Ap 同上),再置 37℃ 振荡培养 20 小时左右收菌。

1.4 包涵体的制备

经预实验证明上述 3 个克隆菌表达产物都是以包涵体形式存在于胞浆中。文献^(5,6)报道,将上述克隆菌培养物,以 3 000 r/min 离心 15 分钟,倾出上清液,称重,按菌体湿重每克加入溶菌缓冲液(50mmol/L Tris·HCl, pH8.0, 25% 蔗糖, 0.5% NP40, 5mmol/L EDTA) 5ml, 溶菌酶 0.5mg/ml, 置室温 60 分钟, 4℃ 冰箱 3 小时左右, 超声破菌 30 秒 2—4 次。镜检菌体完全溶解后, 3000r/min 离心 15 分钟, 吸出上清液, 同量加入 50mmol/L Tris·HCl, pH8.0, 1.0mol/L 脲洗涤沉淀物, 10 000 r/min 离心 15 分钟(4℃)吸出上清液, 加入 TEN(10mmol/L Tris·HCl, pH8.0, 5mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl), 同上洗涤 2 次。最后沉淀物加入 TEN4—6ml 重悬, 即为包涵体悬液, 置 4℃ 冰箱备用。

1.5 包涵体蛋白的分离纯化

参考 Maniatis 等⁽⁷⁾方法, 采用含 SDS 的 4% 浓缩胶和 12% 分离胶垂直板状电泳。包涵体悬液加等量样品缓冲液(Tris 10g, β-巯基乙醇 1.0ml, 溴酚蓝 0.02g, SDS 0.4g, 甘油 2.0ml, 蒸馏水 7.0ml), 混匀后

* 上海复旦大学遗传所

本文于 1993 年 10 月 1 日收到。

水浴煮沸 15 分钟,置室温冷却后上样。凝胶板大小为 15cm×10cm×0.3cm,样品体积 1.5—2.0ml。上样后在甘氨酸-Tris 缓冲液(甘氨酸 14.4g, Tris 3.0g, SDS 1.0g, 蒸馏水加至 1000ml, pH8.0)中, 30—50mA 电泳 3—4 小时,取下凝胶,将凝胶边道对照切下进行考马斯亮蓝染色,其余凝胶密封湿盒内置 4℃冰箱,待染色凝胶出现蛋白带后,与凝胶板重合定位,横向切下需要的蛋白带凝胶区带,装入盛有灭菌的不含 SDS 的缓冲液的透析袋内,在电压 75V 下电泳 4.5 小时后洗脱,再反向电泳 50 秒,取出凝胶,用缓冲液冲洗袋壁,吸出洗脱液,即为分离纯化蛋白。

2 结果与讨论

2.1 包涵体的制备

一般 400ml 克隆菌培养液可制备 4—6ml 包涵体悬液。置 4℃冰箱保存 1—2 个月对表达蛋白的分离纯化不受影响。

2.2 包涵体蛋白的分离纯化及回收

3 个克隆菌分别进行分离纯化蛋白各 5 批次,经紫外分光光度计测定 A_{280nm} 值,按鲁子贤^[8]的方法计算回收蛋白量,结果见表 1。从表 1 看出用此法每次分离纯化可回收表达蛋白产物 1.2—4.9mg 以上,足够免疫动物之用。pWR/AB·20 克隆菌每次回收蛋白量较多,这可能是该克隆菌表达蛋白较高的缘故。

表 1 3 个克隆菌表达产物分离纯化结果

菌株	批次	上样品 (ml)	回收 A 值 (280nm)	回收体积 (ml)	回收量 a. (mg)	PAGE 检查
pWR/A·7	1	1.0	0.81	2.1	1.70	+
	2	1.0	0.51	4.0	2.04	+
	3	1.0	0.36	4.0	1.44	+
	4	1.0	0.66	3.0	1.98	+
	5	1.0	0.81	3.0	2.43	+
pWR/B·164	1	1.0	0.48	3.0	1.44	+
	2	1.0	0.66	3.0	1.98	+
	3	1.0	0.69	1.8	1.24	+
	4	1.0	0.63	2.3	1.45	+
	5	1.0	0.69	4.0	2.76	+
pWR/AB·20	1	0.8	0.93	4.0	3.72	+
	2	0.8	1.23	4.0	4.92	+
	3	0.8	0.68	4.0	2.72	+
	4	0.8	0.85	4.0	3.40	+
	5	0.8	0.95	4.5	4.27	+

a: 回收蛋白量(mg) = $A_{280} \times 1 \times$ 回收体积(ml)

2.3 pWR/A·7 包涵体的制备及其纯化蛋白

从图 1 可见 1—4 泳道基本上不含包涵体蛋白(箭头所示),说明通过上述方法处理可将包涵体与菌体大部分蛋白分离,也可从包涵体悬液(5、6 泳道)与克隆菌(9、10)对比看出,包涵体悬液中大部分已除去菌体蛋白。包涵体再经过 PAGE 分离纯化基本上只有一条蛋白带(7、8 泳道)。

2.4 pWR/AB·20 包涵体制备及其纯化蛋白

从图 2 上可见,包涵体悬液(A3)比克隆菌液(A1)的菌体蛋白明显减少,但在泳道前端却出现一条与包涵体蛋白量相当的蛋白带,这有待查明。包涵体经 PAGE 分离纯化蛋白后,在表达蛋白带的位置也只有一条蛋白带(B1、2,箭头所示),但在泳道前端也出现一条可疑蛋白带,这可能是纯化蛋白在 4℃保存一段时间后有些降解的缘故。

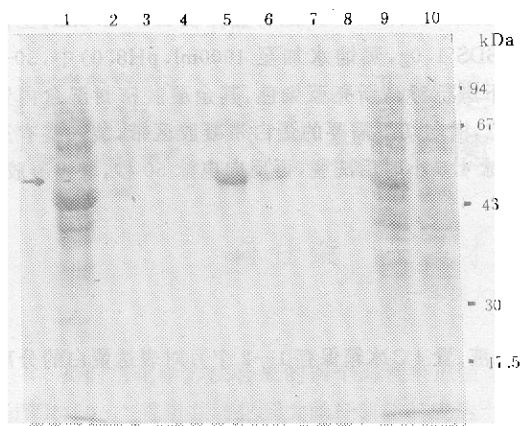


图 1 pWR/A·7 包涵体制备及其蛋白纯化

1. 破菌离心上清液, 2—4. 洗涤包涵体上清液, 5, 6. 包涵体悬液, 7, 8. 纯化蛋白, 9. pWR/A·7 克隆菌, 10. Lp-WR450·1 克隆菌.

2.5 包涵体及其纯化蛋白稳定性观察

从图 3 可见, pWR/A·7 (1, 2) 和 pWR/B·164 (4—8) 表达蛋白纯化后, 在 4℃ 分别保存 12—92 天和 10—44 天, 仍能检出蛋白带, 表明纯化蛋白是稳定的. 其包涵体 (3, 9), 分别保存 4 个月和 1 个月后仍能检出表达蛋白带, 但在表达蛋白带前端出现多条蛋白带, 这可能是包涵体在 4℃ 保存后有分解现象. 但不影响其蛋白分离纯化. 在 4 泳道没出现蛋白带是由于用硫酸铵沉淀丢失之故.

实验结果表明, 应用此法分离包涵体是比较简单可行的. 用 PAGE 纯化蛋白获得的纯度较高, 回收蛋白量也较满意. 但蛋白浓度较低, 经过浓缩或干燥后, 可使蛋白浓度达到 mg/ml 水平, 足够用于免疫动物或分析应用. 纯化蛋白溶液经复性后 4℃ 保存基本上是稳定的. 我们用此法纯化的蛋白免疫家兔, 其抗血清作琼脂双向扩散试验, ELISA 和原虫体外生长抑制试验, 证明有良好的免疫原性 (待发表), 与文献^[9]报道一致.



图 2 pWR/AB·20 包涵体制备及其纯化蛋白

A. 1. pWR/AB·20 克隆菌, 2. 洗涤包涵体上清液, 3. pWR/AB·20 包涵体悬液
B. 1, 2 均为纯化蛋白

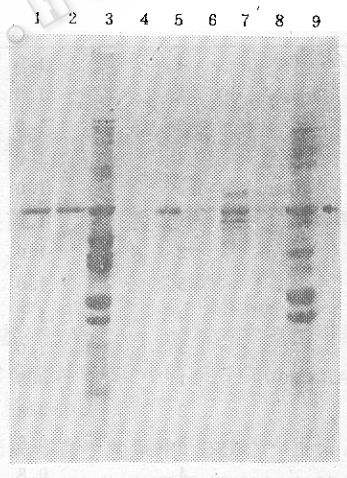


图 3 包涵体及其纯化蛋白稳定性观察

1, 2 和 4—8 分别为 pWR/A·7 和 pWR/B·164 纯化蛋白, 3 和 9 分别为 pWR/A·7 和 pWR/B·164 包涵体悬液

参 考 文 献

- [1] 钟雄林等. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 294.
- [2] 裴敏燕等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1992, 10(2): 82.
- [3] 马维芳等. 第一军医大学学报, 1991, 11(2): 109.
- [4] 陈仕荣等. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(1): 10.

- [5]Nielsen O T *et al.* J Immunology Methods, 1988, 111(1):1.
- [6]Sambrook J, Fritsch E F. Molecular Cloning, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p. 17—37.
- [7]Maniatis T, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 174—177.
- [8]鲁于贤主编. 蛋白质和酶学研究方法, 北京: 科学出版社, 1989, p. 1.
- [9]Woodrow C C, Levin M M. New Generation Vaccines, New York: Marcel Dekker Inc, 1990, p. 499—501.

Isolation and Purification of the Fused Protein Encoded by Synthetic Antigen Gene of Plasmodium Falciparum and Its Expression in *Escherichia coli*

Chen Shirong Wang Changcai Zhong Xionglin

Hu Yafang Wang Qisong*

(Department Biochemistry, First Military Medical University, Guangzhou 510515

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433) *

Abstract The fusion protein from synthesized plasmodium falciparum hybrid antigen gene expressed in *E. coli* was purified. The recombinants (pWR/A · 7, pWR/B · 164, pWR/AB · 20) grew in Luria broth medium with lactose. The bacteria were harvested by centrifugation and the pelleted cells were suspended in lysis buffer containing NP-40 and lysozyme and were treated by sonication and centrifugation. The fusion protein was isolated with SDS-PAGE and recovered by electrophoresis. One to four mg pure fusion protein can be obtained from 80—100 ml bacterial culture media. (Rabbits were immunized by the purified fusion protein and serologic assay has demonstrated with immunogenicity).

Key words Plasmodium falciparum, antigen gene expression, protein isolation and purification, polyacrylamide gel electrophoresis