

不同蛋白标签对 LMO2 融合蛋白沉淀实验的影响

袁伟, 孙伟, 杨爽, 闫继东, 翟春利, 杜君, 王兆琦, 安迪, 朱天慧

南开大学医学院分子遗传研究室, 天津 300071

摘要: 融合蛋白沉淀技术是一种用来研究蛋白质相互作用的新的体外实验技术, 通常利用蛋白亲和标签与探针蛋白融合表达来钓取未知相互作用蛋白或验证已知蛋白间的相互作用, 其中以谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标签最为常用。LMO2(由 LIM only 缩写得名, 也称 Ttg-2 或 Rbtn2)是一种小分子量难溶蛋白。利用原核系统分别表达了含有 GST 和麦芽糖结合蛋白(MBP)两种标签的 LMO2 融合蛋白, 发现 GST-LMO2 融合蛋白以包涵体的形式表达, 而 MBP-LMO2 融合蛋白则能够以可溶形式表达, 而且 MBP-LMO2 的表达量明显高于 GST-LMO2 融合蛋白。将可溶性的 MBP-LMO2 融合蛋白和复性后的 GST-LMO2 融合蛋白分别用于钓取 K562 细胞中 LMO2 的结合蛋白, 结果显示二者都可以结合 K562 细胞中内源性的 GATA1 蛋白, 而 MBP-LMO2 融合蛋白捕获的 GATA1 蛋白明显多于复性后的 GST-LMO2 融合蛋白。这一结果提示, 在研究一些分子量小、疏水性强的蛋白质时改变标签蛋白可能是一种有益的尝试。

关键词: 蛋白质沉淀技术, 谷胱甘肽巯基转移酶, 麦芽糖结合蛋白, LMO2

Effect of Different Tags on Pulldown Assays Implemented by LMO2 Fusion Protein

Wei Yuan, Wei Sun, Shuang Yang, Jidong Yan, Chunli Zhai, Jun Du, Zhaoqi Wang, Di An, and Tianhui Zhu

Laboratory of Molecular Genetics, College of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Pulldown assay is an in vitro method for studies of protein-protein interactions, in which tagged proteins are usually expressed as the bait to enrich other proteins that could bind to them. In this technology, the GST tag is broadest used for its modest size and hydrophilic property. In most cases, the GST tag could increase the hydrophilicity of the fusion protein and help to avoid the formation of inclusion bodies. However, in the other few cases, the target protein may be strongly hydrophobic or have complicated structures that were hard to fold and assemble in correct conformations without chaperons, and even the existence of GST tag could not make them soluble. These proteins were always expressed as inclusion bodies and had no functions. LMO2 was a small molecular weight and insoluble protein, in this study, GST system and MBP system were used to express GST-LMO2 and MBP-LMO2 fusion proteins, respectively. We found that GST-LMO2 fusion protein was expressed as inclusion bodies whereas MBP-LMO2 fusion protein was expressed in soluble form. Moreover, the production rate of MBP-LMO2 was also much higher than GST-LMO2. Then MBP-LMO2 fusion proteins and renatured GST-LMO2 fusion proteins were used as bait in pulldown assay to study the interaction between LMO2 and endogenous GATA1 in K562 cells. Western blot analyses showed that both of these proteins could bind to endogenous GATA1 in K562 cells, but recovered GATA1 protein by MBP-LMO2 fusion protein was much more than GST-LMO2 fusion protein. These results suggest that using of MBP system is a helpful attempt in the case of studying small molecular weight, strong hydrophobic proteins.

Keywords: pulldown assay, GST, MBP, LMO2

Received: September 11, 2007; **Accepted:** October 18, 2007

Supported by: the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30771054).

Corresponding author: Tianhui Zhu. Tel: +86-22-23505501; Fax: +86-22-23505501; E-mail: zhuth@nankai.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30771054)资助。

蛋白质相互作用存在于机体每个细胞的生命活动过程中,从 DNA 的复制、转录、翻译到细胞的代谢过程、信号传导以及细胞周期的调控,蛋白质相互作用都在其中发挥核心作用。蛋白质间相互作用的研究作为了解蛋白质生物功能的重要手段,已经成为蛋白质组学中最主要的研究内容之一^[1,2]。

融合蛋白沉淀技术是一种行之有效的研究蛋白质相互作用的体外实验技术,常用于大规模筛选新的相互作用蛋白、确定相互作用结构域以及验证已知蛋白间的相互作用^[3-5]。该技术通常利用蛋白亲和标签与探针蛋白融合表达来钓取相互作用蛋白。目前常用的蛋白标签有谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标签、六聚组氨酸(His₆)标签、硫氧还蛋白(Trx)标签等。其中 GST 标签是目前应用最为广泛的亲和标签,相应的融合蛋白沉淀技术被称为 GST 沉淀技术(GST pulldown),主要是通过探针蛋白与 GST 标签的融合表达,利用 GST 与谷胱甘肽交联树脂 Sepharose-4B 的亲合性,从细胞抽提物中分离纯化出与探针蛋白相互结合的蛋白质。GST 标签通常能够增加蛋白质的可溶性,但对于一些蛋白质,尤其是自身较难溶的蛋白质,通过该系统表达的融合蛋白也往往以不溶的包涵体形式存在,而溶解复性后的融合蛋白通常没有活性或活性很低,给后续的沉淀实验带来很大的困难。

与 GST 沉淀技术原理相似,与麦芽糖结合蛋白(MBP)标签融合的探针蛋白也可以通过交联直链淀粉亲和树脂(amylose resin)纯化出相互作用的蛋白质,我们称之为 MBP 沉淀技术(MBP pulldown)。MBP 蛋白亲水性很高,常用于目标蛋白的可溶表达,有研究表明 MBP 标签在改善蛋白质溶解性、促进蛋白质正确折叠方面比其余几种标签都要有效^[6]。但关于 MBP 沉淀技术在检测蛋白质间相互作用中的应用以及与 GST 沉淀技术的比较研究,目前尚未见报道。本文分别表达了 GST-LMO2 融合蛋白和 MBP-LMO2 融合蛋白,利用 GST 沉淀技术和 MBP 沉淀技术证明了 LMO2 与 K562 细胞中内源性的 GATA1 蛋白的相互作用,并对两种技术的优缺点进行了比较,为融合蛋白沉淀技术的应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人髓样白血病细胞系 K562、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。RPMI1640 及胎牛血清购自 Gibco 公司。原核表达载体 pMAL-c2x 和 amylose resin 购自 New England Biolabs 公司。原核表达载体 pGEX-5X-1 和 Glutathione Sepharose 4B 凝胶购自 Pharmacia Biotech Co 公司。IPTG 和考马斯亮蓝 R250 购自 TaKaRa 公司。GATA-1、LMO2 特异性抗体购自 Santa Cruz 公司,二抗购自 Promega 公司,ECL Western Blot 检测试剂盒购自 Pharmacia 公司。带有 LMO2 基因不同编码模式的模板质粒(pcDNA-6B-LMO2)为本实验室自制。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

将 LMO2 的编码区片段从模板质粒切下,以正确读框与原核表达载体 pGEX-5X-1、pMAL-c2x 连接构建原核表达质粒 pGEX-5X-1-LMO2 和 pMAL-c2x-LMO2。

1.2.2 GST-LMO2 和 MBP-LMO2 的诱导表达

将原核表达质粒 pGEX-5X-1-LMO2 和 pMAL-c2x-LMO2 分别转化到 DH5 α 中,涂布于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 培养皿中,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑单菌落培养,当 OD_{600} =0.4~0.6,转入大瓶培养,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 约为 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,30 $^{\circ}$ C 诱导培养 6 h。收集诱导菌,按 10:1 的比例加入细胞裂解液 STE buffer(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 5% Glycerol),超声破碎,离心收集上清液及沉淀,取适量进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色。

1.2.3 融合蛋白 GST-LMO2 的纯化

纯化按 Pharmacia Biotech Co 公司说明书进行。将包涵体溶解于含 0.3% SKL 的 PBS 缓冲液中,过滤后经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析进行纯化,用 PBS 缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析过夜除去 SKL。

1.2.4 融合蛋白 MBP-LMO2-C 的纯化

纯化按 New England Biolabs 公司说明书进行。将过滤后的细菌上清液上样到 amylose resin 凝胶柱上,用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9,

0.2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 洗去非特异结合的蛋白质, 然后用 12 个柱床体积的缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Maltose)洗脱融合蛋白, 流速 1.5 mL/min。对洗脱得到的蛋白质用 PBS 缓冲液, 4°C 透析除去麦芽糖。纯化后融合蛋白取 0.5 μ g 进行 10% SDS-PAGE, Western blotting 验证其表达。

1.2.5 沉淀实验

利用 mRIPA(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、5% DOC、10 μ g/mL Aprotinin、10 μ g/mL Leupeptin、1 mmol/L PMSF)法裂解 1×10^8 K562 细胞提取细胞蛋白。将等量纯化后的 GST 融合蛋白或 MBP 融合蛋白分别与 Glutathione Sepharose 4B 或 amylose resin 孵育结合 2 h, 充分洗脱未结合蛋白质后, 即得到结合有 GST 融合蛋白的 Glutathione Sepharose 4B 颗粒或含有 MBP 融合蛋白的 amylose resin 颗粒。分别与等量的 K562 细胞提取物于 4°C 翻转结合过夜。用结合缓冲液(12.5 mmol/L HEPES pH 7.4, 120 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.05% NP-40, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 2 mg/mL aprotinin, 0.5% bovine serum albumin, 10 μ mol/L ZnSO₄)洗涤颗粒 5 次, 每次 10 min。用 15 μ L SDS 加样缓冲液煮沸洗涤后的颗粒进行 SDS-PAGE, 凝胶考马斯亮蓝染色或 Western blotting 检测与 LMO2 结合的蛋白质。

1.2.6 Western blotting 印迹分析

样品进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜, 然后用 5%脱脂奶粉 4°C 封闭过夜, 弃溶液, 加入用 5%脱脂奶粉稀释的一抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 加入用 5%脱脂奶粉稀释的二抗, 室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 用化学发光法显色 5 min, 压片显影。

2 结果

2.1 GST-LMO2 融合蛋白在 *E. coli* 中的表达和纯化

DH5 α /pGEX-5X-1-LMO2 经 IPTG 诱导表达 4 h 后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色。与未诱导菌比较, 在相对分子量约 43 kD 处出现明显的诱导蛋白带, 同预期的 GST-LMO2 融合蛋白大小一致。电泳胶薄层扫描(Fig. 1)显示: 诱导表达的目的

蛋白约占菌体总蛋白的 40%。经超声破碎细胞, 离心分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果发现上清中几乎没有 GST-LMO2 融合蛋白, 其绝大部分以包涵体形式存在。通过改变 IPTG 诱导浓度, 改变诱导温度, 改变诱导时间等方法优化表达条件均未获得可溶的目的蛋白表达。因此, 我们尝试从包涵体中纯化 GST-LMO2 融合蛋白。

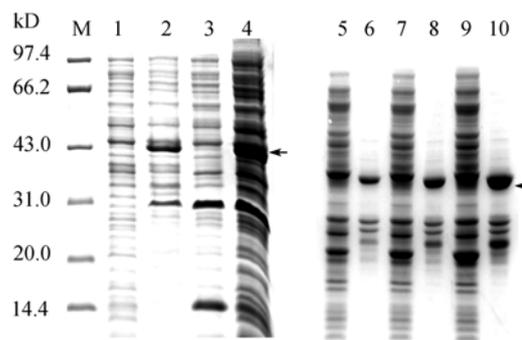


图 1 GST-LMO2 融合蛋白的表达

Fig. 1 Expression of GST-LMO2 from in *E. coli* DH5 α

Total protein of induced DH5 α /pGEX-LMO2 without (lane 1) and with (lane 2) IPTG; supernatant (lane 3) and precipitate (lane 4) of the lane 2 lysate; supernatant (lane 5, 7, 9) and precipitate (lane 6, 8, 10) of 27°C, 30°C, 37°C induced DH5 α lysate

将诱导表达的菌体进行超声破碎及 0.3% SKL 裂解, 在离心后的上清液中加入 0.6% Triton X-100 以屏蔽 SKL 影响融合蛋白与谷胱甘肽 Sepharose-4B 介质的亲和结合。GST-LMO2 用 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱后, 经透析除去 SKL 和谷胱甘肽, 使可溶性蛋白折叠复性, GST-LMO2 最终纯度达到 90%以上(Fig. 2)。

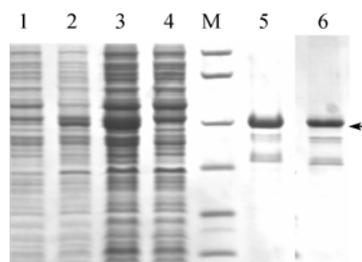


图 2 SDS-PAGE 分析纯化的 GST-LMO2 融合蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of isolated GST-LMO2

Total protein of DH5 α /pGEX-LMO2 without IPTG(lane 1) and with IPTG-induced(lane 2), supernatant (lane 3) and precipitate (lane 4) of the lane 2 lysate, eluant of GST-LMO2 from glutathione sepharose-4B(lane 5) and naturalized GST-LMO2 (lane 6). The arrow marks the position of GST-LMO2. Protein marker(M)is as same as that of Fig. 1

2.2 MBP-LMO2 融合蛋白的表达和纯化

将 pMAL-LMO2 重组质粒分别转化到 DH5 α 中, 阳性转化子经 IPTG 诱导表达 6 h 后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色。与未诱导菌比较, 在相对分子量约 60 kD 处出现明显的诱导蛋白带, 同预期的 MBP-LMO2 融合蛋白大小一致。电泳胶薄层扫描显示: 诱导表达的目的蛋白约占菌体总蛋白的 30%。经超声破碎细胞, 离心分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果发现上清中含有大量的 MBP-LMO2 融合蛋白, 说明其绝大部分以可溶形式存在(Fig. 3A)。

重组菌裂解液离心上清液经 Amylose Resin (New England Biolabs) 亲和层析纯化, 洗脱后收集融合蛋白。进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色显示获得了单一的目的融合蛋白(Fig. 3B), 纯度达到 95% 以上。同时将上述样品 SDS-PAGE 后转至 NC 膜, 用 LMO2 特异性抗体进行 Western blot 验证。结果显示: 超声裂解的上清经 amylose resin 亲和纯化后, 获得了较纯的 MBP-LMO2 融合蛋白(Fig. 3B)。

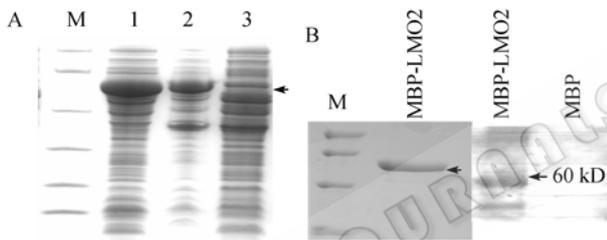


图 3 MBP-LMO2 融合蛋白的可溶表达和纯化

Fig. 3 Expression of MBP-LMO2 fusion protein in soluble form in *E. coli* DH5 α /pMAL-c2x-LMO2

(A) supernatant (lane 1) and precipitate (lane 2) of the total protein of induced DH5 α lysate; total protein of uninduced DH5 α lysate (lane 3). Purified MBP-LMO2 fusion protein after elution from amylose beads was determined by coomassie blue staining (B) or by Western blot (C) using anti-LMO2 antibody

2.3 GST pulldown 和 MBP pulldown 实验验证 LMO2 蛋白与内源性 GATA1 的结合

将复性后的 GST-LMO2 融合蛋白固化在谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和介质上, 或是将等摩尔 (0.5 nmol) 纯化后的 MBP-LMO2 融合蛋白固化在 amylose resin 亲和介质上充当诱饵蛋白, 再与 1×10^8 K562 细胞提取物混合后进行沉淀实验, 4 $^{\circ}$ C 翻转仪上翻转过夜, 收集沉淀蛋白质复合物利用结合缓冲液洗涤 5 次后进行 SDS-PAGE 分离, 用 GATA1 特异性抗体进行 Western blot, 分别以 GST 蛋白和 MBP

蛋白作为阴性对照。MBP-LMO2 实验组曝光 1 min, 而 GST-LMO2 实验组曝光 2 min。结果显示(Fig. 4), MBP-LMO2 实验组沉淀下来的 GATA1 蛋白明显多于 GST-LMO2 实验组, 这说明 MBP-LMO2 有更强的 GATA1 结合能力。

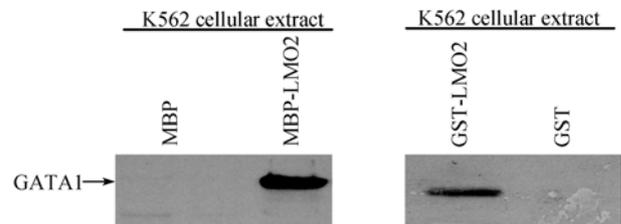


图 4 MBP 沉淀实验和 GST 沉淀实验

Fig. 4 MBP pulldown assay and GST pulldown assay
K562 cells extract was incubated with either MBP-LMO2 fusion protein immobilised on Amylose resin or GST-LMO2 fusion proteins immobilised on Sepharose-4B. The resin-bound fractions were analyzed by SDS-PAGE, then were analyzed by immunoblotting using antibody raised against GATA1

3 讨论

融合蛋白沉淀技术是近年来发展的一个敏感性和特异性较高的研究蛋白质相互作用的体外实验技术, 其主要应用于两方面: (1) 筛选和钓取与探针蛋白可能相互作用的未知蛋白; (2) 验证与探针蛋白可能相互作用的已知蛋白。

本文中使用的探针蛋白 LMO2 蛋白是一种不可溶蛋白, 在原核表达中稳定性不高^[7]。我们首先选用 GST 标签进行 LMO2 蛋白的融合表达, 结果表明 GST-LMO2 融合蛋白主要以包涵体形式表达, 基本检测不到可溶蛋白。外源蛋白在原核表达中的主要问题在于包涵体的形成, 研究者们试图通过以下方法^[8,9]避免包涵体的形成并提高融合蛋白的可溶性: 1) 低温诱导; 2) 提高诱导时的细胞密度; 3) 缩短诱导时间; 4) 增大培养物的通风; 5) 在渗透压胁迫下进行诱导; 6) 使用不同的宿主菌表达。在实验过程中, 我们曾参考以上经验, 改进诱导表达条件, 但是效果都不理想。我们也曾经尝试表达带有组氨酸标签或硫氧还蛋白标签的融合蛋白, 同样是形成大量的包涵体(数据未显示)。因此只能通过包涵体的变性溶解、谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和层析纯化、透析复性等步骤获得可溶性的 GST-LMO2 融合蛋白。而利用 MBP 亲和标签则非常显著的提高了 MBP-LMO2 融合蛋白的溶解度, 避免了包涵体的形成, 因

而可能获得了更多的具天然立体结构的 LMO2 融合蛋白。将诱导菌的上清液经 amylose resin 亲和介质纯化, 采用麦芽糖温和洗脱即获得了大量可溶的 MBP-LMO2 融合蛋白, 避免了去污剂或变性剂对蛋白质活性的影响。将两种不同标签的融合蛋白应用于沉淀实验, 我们发现二者都能结合内源 GATA1 蛋白(已知的 LMO2 相互作用蛋白), 而且 MBP-LMO2 融合蛋白捕获的 GATA1 蛋白明显多于 GST-LMO2 融合蛋白。这有可能是因为离子去污剂(SKL)的去 除仍然不能使 GST-LMO2 融合蛋白折叠成正确的 构象。

我们的实验结果显示, 相比 GST 标签, 与 MBP 进行融合表达显著改善了 LMO2 蛋白的溶解性, 而且纯化后的 MBP-LMO2 融合蛋白用于沉淀 实验可以高效捕获细胞内源性的相互作用蛋白, 避 免了 GST-LMO2 融合蛋白变性、复性带来的干扰。 虽然 MBP 标签比较大, 并有可能由此带来空间位 阻效应, 但该结果表明 MBP 标签在提高探针蛋白 的可溶性的同时并未影响蛋白质本身的功能以及 蛋白质之间的相互作用。下面是两种融合蛋白沉淀 体系的比较。

	GST-LMO2	MBP-LMO2
产物性质 及产量	基本无可溶性蛋白	可溶性蛋白产量达 10 mg/L(占80%)
纯化方式	复杂, 包涵体变性溶解 后复性再纯化	简单, 直接纯化细菌 裂解上清液
与已知蛋白 结合能力	只能捕获到很少的相互作 用蛋白	能捕获到较多的 相互作用蛋白

我们的实验结果为融合蛋白沉淀技术这类体外 蛋白相互作用实验中标签的选择提供了新的思路:

对于那些疏水性强而且不易检测蛋白活性的探针蛋 白, 我们可以采用基于 MBP 标签的 MBP 沉淀技术, 增强目标蛋白的可溶性, 从而更加有效的研究蛋白 质之间的相互作用。

REFERENCES

- [1] Alfarano C, Andrade CE, Anthony K, *et al.* The biomolecular interaction network database and related tools 2005 update. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: D418.
- [2] Xenarios I, Rice DW, Salwinski L, *et al.* DIP: the database of interacting proteins. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(1): 289.
- [3] Benard V, Bokoch GM. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol*, 2002, **345**: 349-359.
- [4] Chai J, Du C, Wu JW, *et al.* Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 2000, **406**(6798): 855-862.
- [5] Ren L, Chang E, Makky K, *et al.* Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin. *Anal Biochem*, 2003, **15**, **322**(2): 164-169.
- [6] Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 1999, **8**: 1668-1674.
- [7] Deane JE, Sum E, Mackay JP, *et al.* Design, production and characterization of FLIN2 and FLIN4: the engineering of intramolecular ldb1: LMO complexes. *Protein Engineering*, 2001, **14**(7), 493-499.
- [8] Yu LD, Deng KP, Yu CA. Cloning, gene sequencing, and expression of the small molecular mass ubiquone-binding protein of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase. *J Bio Chem*, 1995, **270**: 25634-25638.
- [9] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	伯乐生命医学产品(上海)有限公司	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	德国葛莱纳公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	封三/内页	上海国强生化工程装备有限公司	内页
美国 Promega 公司	内页	镇江东方生物工程公司	内页
生物谷网站	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
大连亚博会展有限公司	内页	国药励展	内页
杭州博日科技有限公司	内页		