

PD0721 单链抗体的体外原核表达条件优化及蛋白质鉴定

张煜彬^{1,4}, 叶路芬⁴, 吴忠秀⁴, 薛维娜³, 何彬²,
杨畅¹, 李勇军², 王永林¹, 刘亭^{*1}

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 医药卫生管理学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为了构建抗表皮生长因子受体 III 型突变体 (epidermal growth factor receptor variant type III, EGFRv III) 的单链抗体 PD0721 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达系统, 作者研究了 PD0721 重组蛋白在大肠杆菌 BL21 中的最佳表达条件, 并建立相应的重组蛋白质纯化方法。首先构建重组表达质粒 PD0721-pET-22b(+) 并转化至大肠杆菌 BL21 中, 再利用 SDS-PAGE 研究不同诱导剂 IPTG 浓度、不同诱导温度、不同诱导时间和不同菌体浓度对 PD0721 重组蛋白表达的影响。利用镍柱亲和层析开发 PD0721 重组蛋白的纯化方法, 并使用蛋白质印迹法以及 N 端测序法对纯化后的蛋白质进行鉴定。菌落 PCR 及琼脂糖凝胶电泳表明, PD0721-pET-22b(+) 重组质粒及 PD0721 重组大肠杆菌 BL21 构建成功。PD0721 重组蛋白在体外原核表达的最佳诱导剂浓度为 0.6 μmol/L, 最佳温度为 15 °C, 最佳诱导时间为 12 h, 最佳菌体浓度 OD₆₀₀ 约为 0.6。经过 Ni²⁺ 柱亲和层析后, 当咪唑的浓度为 150 mmol/L, 可以得到纯度较高的 PD0721 重组蛋白。SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 结果表明, 重组蛋白质产物的相对分子质量约为 31 000, 与理论相对分子质量一致, 蛋白质的 N 端测序也与设计序列一致。作者成功构建了抗 EGFRv III 抗体 PD0721 重组蛋白的体外原核表达体系, 优化了最佳表达条件, 并提供了纯化重组 PD0721 蛋白的可行方法。

关键词: 大肠杆菌表达系统; EGFRv III; 表达条件优化; 亲和层析; 蛋白质印迹法

中图分类号: Q 511 文章编号: 1673-1689(2021)07-0042-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.005

Optimization and Identification of Prokaryotic Expression Conditions of PD0721 Single-Chain Antibody *in vitro*

ZHANG Yubin^{1,4}, YE Lufen⁴, WU Zhongxiu⁴, XUE Weina³, HE Bin²,
YANG Chang¹, LI Yongjun², WANG Yonglin², LIU Ting^{*1}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 4. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

收稿日期: 2019-07-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603189); 贵阳医学院院基金项目 ([2013]12); 贵州省教育厅大学生创新创业项目 (20195200937); 黔科中引地项目 ([2018]4006); 黔科合平台人才项目 ([2016]5613/5677)。

* 通信作者: 刘亭 (1981—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物技术制药方面的研究。E-mail: liuting@gmc.edu.cn

Abstract: This work aimed to construct the *Escherichia coli* expression system, obtain the optimum expression conditions and establish a robust purification method of single-chain antibody PD0721 against epidermal growth factor receptor variant type III (EGFRv III). The recombinant plasmid PD0721-pET-22 (+) was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL 21. The optimum concentration of isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), induction temperature, induction time and cell concentration (OD_{600}) of the PD0721 expression were investigated by SDS-PAGE method. Ni^{2+} affinity chromatography was employed to purify PD0721 protein. Western Blotting and N-terminal sequencing were used to identify PD0721 protein. Colony PCR and agarose gel electrophoresis confirmed the successful construction of PD0721-pET-22b (+) recombinant plasmid and PD0721 recombinant *Escherichia coli* BL 21. The optimum IPTG concentration, temperature, induction time and OD_{600} of PD0721 expression were 0.6 μ mol/L, 15 $^{\circ}C$, 12 h and 0.6. PD0721 protein of high purity could be obtained when the concentration of imidazole was 150 mmol/L during the Ni^{2+} affinity purification. SDS-PAGE and Western Blotting results showed that the molecular weight of the recombinant target protein was about 31 000, consistent with the theoretical molecular weight. N-terminal sequencing of the protein was also consistent with the theoretical sequence of PD0721. In summary, the *in vitro* prokaryotic expression system of anti-EGFRv III antibody PD0721 was successfully constructed. The optimum expression conditions were obtained, and a feasible method for purifying PD0721 protein was established.

Keywords: *E. coli* expression system, EGFRv III, optimization of expression conditions, affinity chromatography, western blotting

恶性肿瘤已经成为严重危害人类健康的疾病之一。根据国家癌症中心的相关数据显示,2015年全国新发恶性肿瘤约为392.9万例,男性最常见的恶性肿瘤为肺癌,女性最常见的恶性肿瘤为乳腺癌^[1]。传统恶性肿瘤的治疗手段主要为手术、化疗与放疗等多模式疗法,尽管治疗取得了进展,但由于副作用大,患者的预后不理想,长期生存也不容乐观,因此,肿瘤靶向治疗逐渐进入人们的视野^[2]。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)家族是受体酪氨酸激酶(RTK)的主要类型,是参与许多癌症进程中的血管生成、细胞分化、增殖、存活的重要信号通路^[3]。EGFR家族成员可以诱导多种信号传导途径,包括PI3K / PTEN / Akt / mTORC1, Ras / Raf / MEK / ERK 和 Jak / STAT 信号通路^[4-5]。EGFR家族成员在正常细胞生长以及恶性转化、预防细胞凋亡、抗药性、肿瘤干细胞和多种癌症的转移中发挥重要作用^[6]。表皮生长因子(EGF)家族受体即表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR),是一种相对分子质量约为170 000的跨膜糖蛋白^[7],也称为ErbB或HER受体。EGFR拥有很多的突变体,其中最普通的就是EGFRv III。这种突

变起源于其胞外区的外显子2-7框内缺失,导致841个编码碱基对的丢失,变为相对分子质量只有145 000的糖蛋白,由于缺乏胞外的L1和CR1(富含半胱氨酸)的亚结构域,因此没有被任何配体激活的能力^[8]。EGFRv III作为组成型激活突变体,能够促进细胞内有丝分裂和生长支持信号传导,还能促进恶性肿瘤的发展,是肿瘤靶向治疗的理想靶点^[9]。目前已经在许多人类恶性肿瘤中检测到EGFRv III的存在,包括肺癌、结肠直肠癌、多形性胶质母细胞瘤、胸腺癌和头颈癌^[10]。然而,在包括正常乳腺组织在内的成人组织中,并没有发现可检测水平EGFRv III的存在^[11]。目前针对EGFR的抗体药物有:针对非小细胞肺癌的吉非替尼,针对转移性结肠癌和头颈癌的西妥昔单抗,针对胰腺癌的厄洛替尼以及针对乳腺癌的拉帕替尼等^[12]。

单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)是具有亲代抗体全部抗原结合活性的最小免疫球蛋白之一^[13],其相对分子质量约为30 000,由重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成,并通过柔性多肽接头连接在一起^[14]。单链抗体相对分子质量小,穿透能力强,易于在原核细胞系统内表达,是抗体偶

联药物中抗体部分的优选。本课题组前期通过单克隆技术和易错 PCR 技术,得到了一株亲和力较好的抗 EGFRvIII 单链抗体 PD0721,通过优化该抗体在原核中的表达条件,为制备抗体偶联药物提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

大肠杆菌 BL21 菌株、pET-22b(+)质粒、Top10 大肠杆菌:均购自 TaKaRa 生物技术有限公司。

1.2 实验试剂

LB 肉汤培养基、氨苄西林、异丙基硫代半乳糖、苯甲基磺酰氟、考马斯亮蓝 R-250、BCA 蛋白质质量浓度测定试剂盒、ECL Plus 超敏发光液、兔抗 His-tag 多抗、羊抗兔 IgG(H+L) HRP、牛血清白抗体:均购于北京索莱宝科技有限公司;Xho I 和 Nco I 酶切试剂盒:购于 TaKaRa 生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、PCR 反应试剂盒:均购于 BBI 生命科学有限公司;质粒 DNA 抽提试剂盒:购于上海百赛生物技术股份有限公司;PCR 引物:委托 TaKaRa 生物技术有限公司合成;HisTrap™ HP 亲和层析柱:购于 GE 公司。

1.3 PD0721 序列的合成以及阳性克隆的筛选和鉴定

根据大肠杆菌对密码子的偏好性进行优化,选择优化后的 PD0721 序列,使用 Xho I 和 Nco I 双酶切质粒 pET-22b(+),使用 T4 DNA 连接酶将重组 PD0721 序列与 pET-22b(+)质粒片段进行连接,构建成重组质粒 DNA,转化到 Top10 大肠杆菌菌株中扩大培养。按照质粒 DNA 提取试剂盒抽提质粒 DNA,并转化到大肠杆菌 BL21 中,接种于含 100 μg/mL 氨苄西林的 LB 固体培养基上,37 °C 恒温培养 12 h,挑取阳性克隆,设计 PCR 引物进行菌落 PCR 进行鉴定,引物设计见表 1。

表 1 引物

Table 1 Primer

引物名称	引物序列(5' -3')
上游引物	CATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTG
下游引物	CTCGAGTTTAATTTCAACTTTGGTGCCA

1.4 重组 PD0721 蛋白的表达

挑取阳性克隆,接种至含 100 μg/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养过夜。以 1:100 接种到含 100 μg/mL 氨苄霉素的 LB 液体培

养基中扩大培养,保持 37 °C、180 r/min,待 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时,加入 0.6 μmol/L 的诱导剂 IPTG,低温诱导培养 12 h 表达蛋白质(15 °C),低温离心收集菌体并破碎,取上清液,使用 SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

1.5 优化大肠杆菌 BL21 表达重组 PD0721 蛋白的条件

1.5.1 诱导剂 IPTG 浓度对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的影响 以 1:100 比例将已经活化的重组菌接种至含 100 μg/mL 氨苄西林的 LB 培养基中,保持 37 °C、180 r/min,待至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时,在摇菌管加入诱导剂 IPTG,使其终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L,低温(15 °C)诱导培养 12 h。低温高速离心收集菌体,PBS 清洗两次。超声破碎菌体并收集上清液。使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度,保持蛋白质质量浓度一致的情况下,使用 10 g/dL SDS-PAGE 电泳进行检测。

1.5.2 温度对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的影响 以 1:100 比例将已经活化的重组菌接种至 50 mL 含 100 μg/mL 氨苄西林的 LB 培养基中,保持 37 °C、180 r/min,待至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时,在摇菌管中加入 0.6 μmol/L 的 IPTG,分别置于 5、8、10、15、22、33 °C 环境中,180 r/min 诱导培养。低温高速离心收集菌体,PBS 清洗两次,超声破碎菌体并收集上清液。使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度,保持蛋白质质量浓度一致的情况下,使用 10 g/dL SDS-PAGE 电泳进行检测。

1.5.3 诱导时间对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的影响 以 1:100 比例将已经活化的重组菌接种至含 100 μg/mL 氨苄西林的 LB 培养基中,保持 37 °C、180 r/min,待 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时,在摇菌管中加入 0.6 μmol/L 的 IPTG,分别低温诱导培养 30、24、18、12、6 h(15 °C)。低温高速离心收集菌体,PBS 清洗两次,超声破碎菌体并收集上清液。使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度,保持蛋白质质量浓度一致的情况下,使用 10 g/dL SDS-PAGE 电泳进行检测。

1.5.4 菌体浓度对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的影响 以 1:100 比例将已经活化的重组菌接种至 50 mL 含 100 μg/mL 氨苄西林的 LB 培养基中,保持 37 °C、180 r/min,待至 OD₆₀₀ 分别为

0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 左右时,在摇菌管中加入 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 IPTG,低温诱导培养 12 h(15 $^{\circ}\text{C}$)。低温高速离心收集菌体,PBS 清洗两次,超声破碎菌体并收集上清液。使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度,保持蛋白质质量浓度一致的情况下,使用 10 g/dL SDS-PAGE 电泳进行检测。

1.6 重组 PD0721 蛋白的纯化

根据 1.5 中重组蛋白的优化条件,进行重组 PD0721 蛋白的诱导表达。低温高速离心收集菌体,PBS 清洗两次,加入 100 mmol/L PMSF 和 Buffer A,用高压均质机对细菌进行破碎,低温高速离心收集上清液,过 0.45 μm 滤膜。使用镍亲和柱对目的蛋白质进行亲和层析,使用咪唑(5、10、20、50、100、150、200、500 mmol/L)进行洗脱,收集洗脱峰。使用 10 g/dL SDS-PAGE 电泳进行检测。

1.7 重组 PD0721 蛋白的 Western Blotting 鉴定

纯化后的重组 PD0721 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜上,经过 50 mg/mL BSA 封闭液封闭过夜,一抗为按 1:1 000 比例使用 50 mg/mL BSA 封闭液稀释的兔抗 His 标签单抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,TBST 洗膜 5 次;二抗为按 1:5 000 比例使用 TBST 稀释的羊抗兔 IgG (H+L) HRP,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,TBST 洗膜 5 次,ECL 显色分析结果。

1.8 重组 PD0721 蛋白的 N 端测序

纯化后的重组 PD0721 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜上,立春红染色 15 min,脱色后剪下目的条带,送至上海生工测序。

2 结果与讨论

2.1 PD0721 序列的合成以及阳性克隆的筛选和鉴定

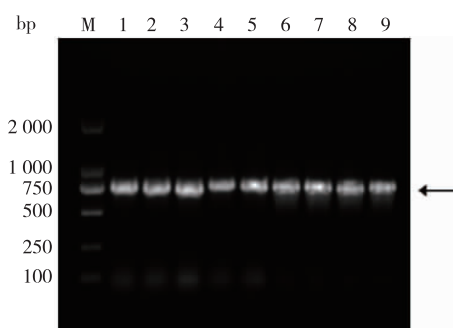
PD0721 的核酸序列如下:

CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCGGCGCC
TGGTGAACCGGGCGGCAGCCTGAAACTGAGCTG
CGCGGGAGCGCTTTACCTTTAGCAAATTTGGCA
TGAGCTGGGTGCGTCAGACCCCGGATAAACGTCT
GGAATGGGTGGCGACCATTAGCACCGGCGGCTAT
TATACCTATTATCCGATAGCGTGAAAGGCCGTTT
TACCATTAGCCGTGATAACGCGAAAAACACCCTG
TATCTGCAGATGAGCAGCCTGAAAAGCGAAGATA
CCGCGATGTATTATTGCGCGCGTGGCTATAGCAGC
ACCAAAGAATGGATGGATTATTGGGGCCAGGGCA
CCATGGTGACCCTGAGCAGCAGCGGCGGCGGCGAG

CGGCGGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGA
TATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGC
GCGAGCGTGGGCGATCGTGTGACCATTACCTGCC
AGGCGAGCACCGATATTGATGATGATATGAACTG
GTATCAGCAGAAACCGGGCAAACCCCGAAACTG
CTGATTTATGAAGGCAACAGCTTTATTCCGGGCGT
GCCGAGCCGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC
GATTTTATTTTTACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGA
AGATATTGCGACCTATTATTGCCAGCAGCTGCAGA
GCTTTAACGTGCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACC
AAAGTGGAATTTAAA

该核酸序列根据大肠杆菌密码子的偏好性进行了优化。

随机挑取 9 个菌落,菌落 PCR 进行琼脂糖电泳,挑取的 9 个菌落都为阳性克隆菌落,结果见图 1。



M:标准抗体相对分子质量;1-9:挑取的菌株。

图 1 菌落 PCR

Fig. 1 Colony PCR

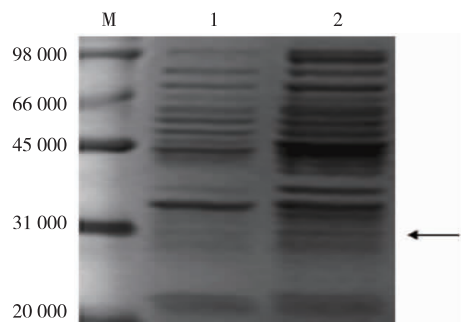
2.2 重组 PD0721 蛋白的表达

阳性克隆菌株在 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的诱导剂 IPTG 条件下,低温诱导培养 12 h 表达蛋白质(15 $^{\circ}\text{C}$),低温离心收集菌体并破碎,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 2。加入诱导剂 IPTG 的菌体会表达相对分子质量为 31 000 左右的重组目的蛋白质,而没有加入诱导剂的情况下菌体并不会表达目的蛋白质。

2.3 优化重组 PD0721 蛋白的表达条件

2.3.1 IPTG 浓度对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的影响 待菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右,分别加入不同浓度的诱导剂 IPTG(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$),低温 15 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 12 h。超声破碎菌体并收集上清液,使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 3。在 OD₆₀₀ 为 0.6、诱导时间为 12 h、

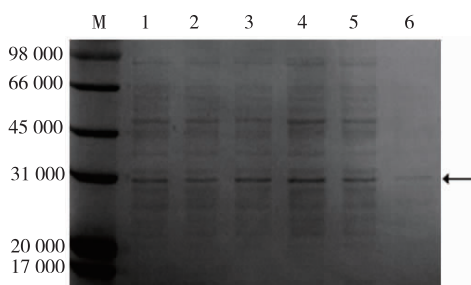
诱导温度为 15 °C 的情况下,当诱导剂浓度在 0.1~0.6 $\mu\text{mol/L}$ 范围内时,PD0721 蛋白的表达量随着诱导剂浓度的增加而增加;当诱导剂浓度在 0.6~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 范围内时,PD0721 蛋白的表达量随着诱导剂浓度的增加而降低;当诱导剂浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,PD0721 蛋白的表达量最大。



M: 标准抗体相对分子质量;1:诱导前;2:诱导后。

图 2 IPTG 诱导大肠杆菌 BL21 表达重组 PD0721 蛋白

Fig. 2 IPTG induced *E. coli* BL21 express recombinant PD0721 protein



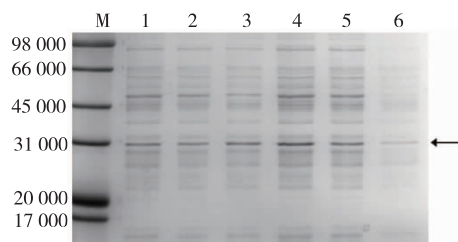
M: 标准抗体相对分子质量;1:0.1 $\mu\text{mol/L}$;2:0.2 $\mu\text{mol/L}$;3:0.4 $\mu\text{mol/L}$;4:0.6 $\mu\text{mol/L}$;5:0.8 $\mu\text{mol/L}$;6:1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 3 不同浓度 IPTG 对重组 PD0721 蛋白表达影响的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant PD0721 in different inducer IPTG concentration

2.3.2 温度对重组 PD0721 蛋白表达的影响 待菌液 OD_{600} 达到 0.6 左右,加入浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的诱导剂 IPTG 后,分别将菌液放置于不同温度(5、8、10、15、22、33 °C)中培养 12 h。超声破碎菌体并收集上清液,使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 4。在 OD_{600} 为 0.6、诱导时间为 12 h、诱导剂 IPTG 浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下,当诱导温度在 15 °C 以内时,PD0721 蛋白的表达量随着诱导温度的增加而增加;当诱导温度超过 15 °C 时,PD0721 蛋白的表达量随着诱导温度的增加而降低;当诱导温度为

15 °C 时,PD0721 蛋白的表达量最大。



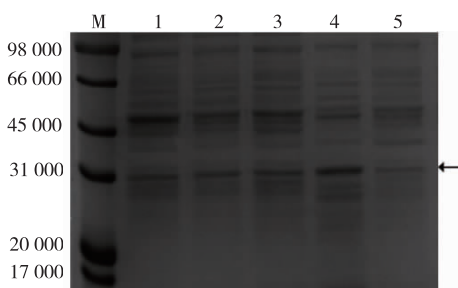
M: 标准抗体相对分子质量;1:5 °C;2:8 °C;3:10 °C;4:15 °C;5:22 °C;6:33 °C。

图 4 不同诱导温度对重组 PD0721 蛋白表达影响的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant PD0721 at different induced temperature

2.3.3 诱导时间对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌

BL21 中表达的影响 待菌液 OD_{600} 达到 0.6 左右,加入浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的诱导剂 IPTG 后,分别低温(15 °C)诱导培养 30、24、18、12、6 h。超声破碎菌体并收集上清液,使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 5。在 OD_{600} 为 0.6、诱导温度为 15 °C、诱导剂浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下,当诱导时间大于 12 h 时,PD0721 蛋白的表达量随着诱导时间的减少而增加;当诱导时间小于 12 h 时,PD0721 蛋白的表达量有所降低;当诱导时间为 12 h 时,PD0721 蛋白的表达量最大。



M: 标准抗体相对分子质量;1:30 h;2:24 h;3:18 h;4:12 h;5:6 h。

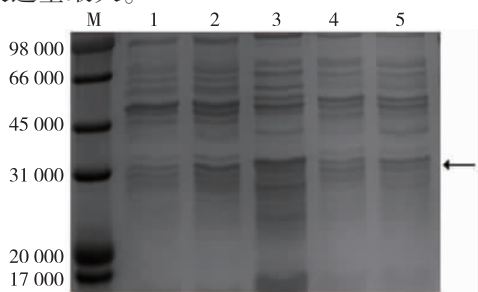
图 5 不同诱导时间对重组 PD0721 蛋白表达影响的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant PD0721 under different induction times

2.3.4 菌体浓度对重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌

BL21 中表达的影响 待菌液 OD_{600} 分别达到 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 左右,加入浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的诱导剂 IPTG 后,低温(15 °C)诱导培养 12 h,超声破碎

菌体并收集上清液。使用 BCA 蛋白质质量浓度试剂盒测定蛋白质质量浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 6。在诱导时间为 12 h、诱导温度为 15 ℃、诱导剂浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下,当 OD_{600} 小于 0.6 时,PD0721 蛋白的表达量随着菌体浓度的增加而增加;当 OD_{600} 大于 0.6 时,PD0721 蛋白的表达量有所降低;当菌液 OD_{600} 约为 0.6 时,PD0721 蛋白的表达量最大。



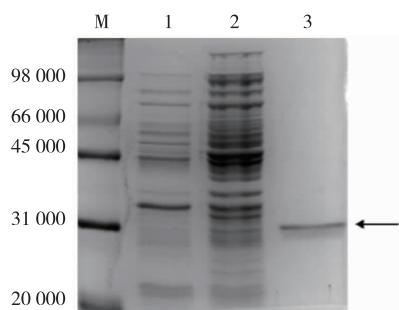
M: 标准抗体相对分子质量;1:0.2;2:0.4;3:0.6;4:0.8;5:1.0。

图 6 不同菌体浓度对重组 PD0721 蛋白表达影响的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant PD0721 with different bacterium densities

2.4 重组 PD0721 蛋白的纯化

目的蛋白质末端携带了 6 个组氨酸标签,可以使用 Ni^{2+} 柱进行纯化。在 15 ℃ 和 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 诱导剂 IPTG 的条件下进行蛋白质表达。收集并裂解菌体,裂解液离心过滤后,进行 Ni^{2+} 柱亲和层析。考察不同浓度的咪唑(5、10、20、50、100、150、200、500 mmol/L) 的洗脱效果,获得最佳的纯化方案,结果见图 7。经过 Ni^{2+} 柱亲和层析后,当咪唑的浓度为 150 mmol/L 时,能够得到纯度较高的 PD0721 蛋白。



M: 标准抗体相对分子质量;1:诱导前;2:诱导后;3:纯化后。

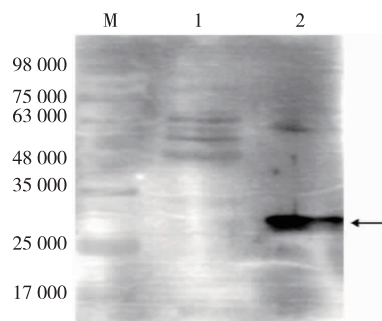
图 7 纯化后重组 PD0721 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant PD0721 protein after purification

2.5 重组 PD0721 蛋白的 Western Blotting 鉴定

纯化后的样品经过 Western Blotting 电泳后,结

果见图 8。在 31 000 附近观察到可见特异条带,相对分子质量与重组 PD0721 蛋白基本相同,表明重组 PD0721 蛋白在大肠杆菌 BL21 中成功表达。



M: 标准抗体相对分子质量;1:未纯化的重组 PD0721 蛋白;2:纯化后的重组 PD0721 蛋白。

图 8 纯化后重组 PD0721 蛋白的 Western Blotting 鉴定
Fig. 8 Western Blotting analysis of purified recombinant PD0721 protein

2.6 重组 PD0721 蛋白的 N 端测序

利用 Edman 降解法将重组 PD0721 蛋白 N 端的氨基酸依次水解,借助高效液相色谱分析其序列,结果见图 9-10。样品的 N 端序列为 Met-Gln-Val-Gln-Leu(简写 MQVQL)与重组 PD0721 蛋白的序列一致,结合 Western Blotting 的实验结果,表明纯化的蛋白质为重组 PD0721 蛋白。

3 结语

原核表达中的目的蛋白质经常发生错误的折叠,且原核本身就没有翻译后修饰的环节,比较容易形成包涵体,可以采用降低诱导温度或降低 IPTG 浓度并延长诱导时间来改善;该质粒为分泌型表达,将蛋白质输出到细胞周质中。

通过将转化重组质粒的大肠杆菌在不同诱导剂浓度下培养,发现诱导剂浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,PD0721 蛋白的表达量最大;诱导剂 IPTG 的作用是激活乳糖操纵子,使细菌开始合成外源蛋白质,但当诱导剂浓度过高时,细菌合成的外源蛋白质更容易形成包涵体,导致可溶性降低,含量减少^[15]。诱导温度为 15 ℃ 时,目的蛋白质的表达量最多;诱导温度低时,热休克蛋白未被激活,其对蛋白质的降解作用就比较弱,有助于形成蛋白质的活性空间结构;但如果温度过低,促进蛋白质折叠的伴侣蛋白活性被抑制,反而降低了可溶性蛋白质的表达量^[16];温度过高时,大肠杆菌则开始增殖,不利于表

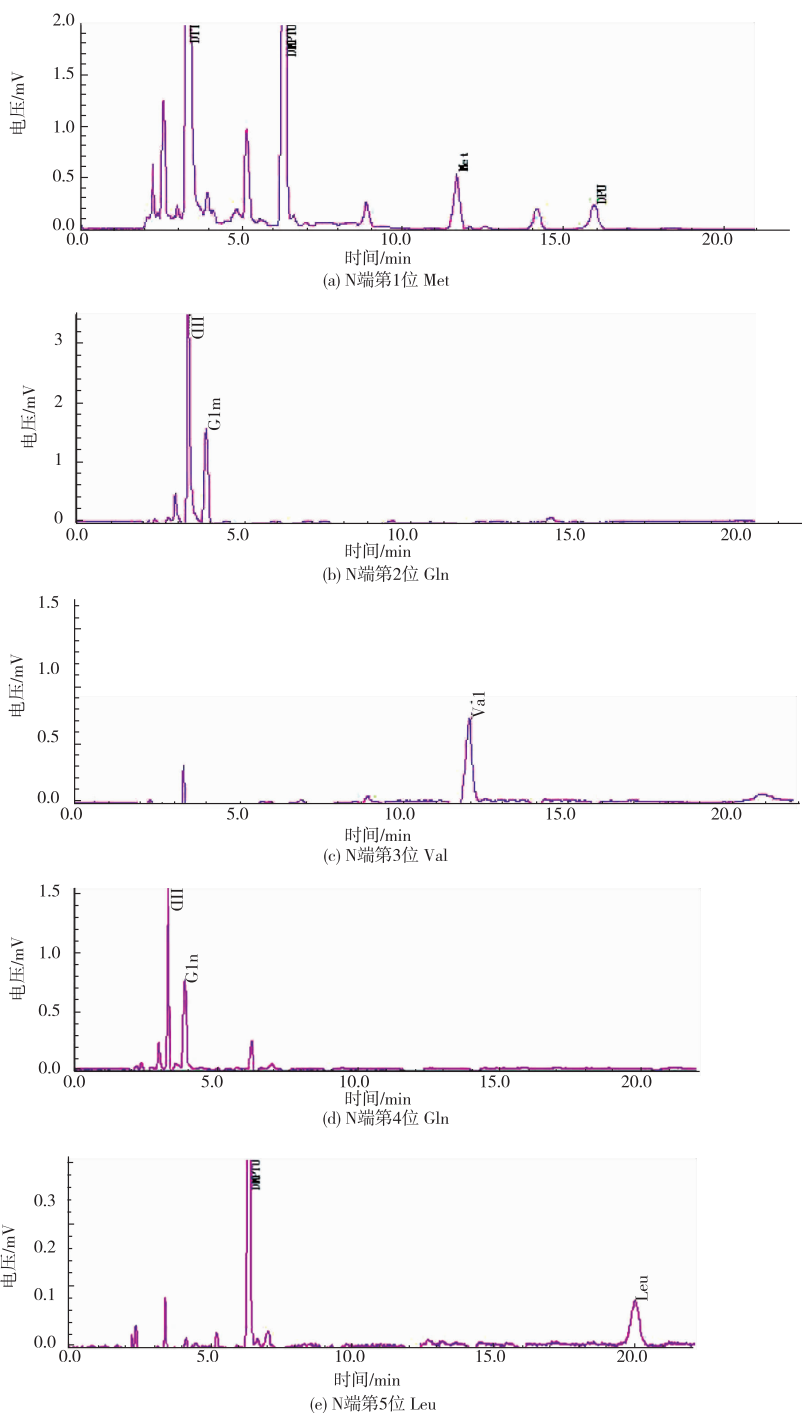


图 9 重组 PD0721 蛋白的 N 端氨基酸序列分析图

Fig. 9 N-terminatio amino acid sequencing map of recombinant PD0721 protein

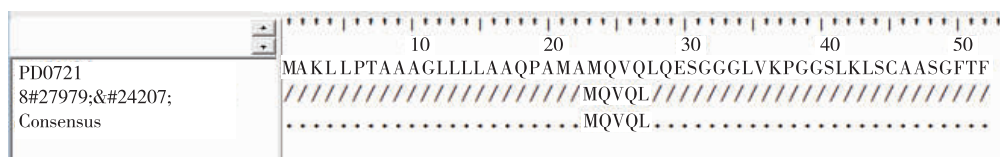


图 10 N 端测序序列与重组 PD0721 蛋白序列比对

Fig. 10 Sequence alignment of N end sequencing and recombinant PD0721 protein sequencing

达蛋白质。当诱导时间为 12 h 时,重组目的蛋白质表达量最大;可溶性蛋白质的表达量随着时间的增加先增加后减少,表明诱导时间过长可能导致可溶性蛋白质变性为包涵体蛋白质,过长的诱导时间反而不利于可溶性蛋白质的获得^[17]。菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,PD0721 蛋白的表达量最大;菌液浓度过低,菌体尚处于迟缓期,加入 IPTG 诱导剂将会对还未适应新环境的菌体产生一定的影响;若菌液浓度过高,菌体开始进入稳定期,菌体繁殖速度开始下降,培养基内毒性产物开始增多,不利于重组蛋白质的积累。作者优化了诱导重组 PD0721 蛋白表达的诱导剂浓度、诱导温度、诱导时间以及菌体浓度等几

个重要条件,为后续获得更多的重组目的蛋白质打下了坚实的基础。

在后续的蛋白质纯化实验中,选择裂解菌体之后的上清液用于纯化,是由于重组 PD0721 蛋白属于可溶性蛋白质,而沉淀中的蛋白质大多数是以包涵体的形式存在的,没有生物活性与功能。上清液中的目的蛋白质经过镍柱亲和层析纯化之后使用 SDS-PAGE 分析、Western Blotting 鉴定以及蛋白质的 N 端测序鉴定,可确认为目的蛋白质,为后续研究重组 PD0721 蛋白与细胞毒性药物偶联提供了一定的基础。

参考文献:

- [1] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2019,28(1):1-11.
- [2] SAWYERS C. Targeted cancer therapy[J]. *Nature*,2004,432(7015):294-297.
- [3] CLAUDITZ T S,GONTAREWICZ A,LEBOK P, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in salivary gland carcinomas: potentials as therapeutic target[J]. *Oral Oncol*,2012,48(10):991-996.
- [4] DAVIS N M,SOKOLOSKY M,STADELPMAN K, et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer:possibilities for therapeutic intervention[J]. *Oncotarget*,2014,5(13):4603-4650.
- [5] SCHURMANS S,POLIZZI S,SCOUMANNE A, et al. The Ras/Rap GTPase activating protein RASA3:from gene structure to *in vivo* functions[J]. *Adv Biol Regul*,2015,57:153-161.
- [6] HAMPTON K K,CRAVEN R J. Pathways driving the endocytosis of mutant and wild-type EGFR in cancer[J]. *Oncoscience*,2014,1:504-512.
- [7] CARPENTER G,WAHL M I. Peptide Growth Factors and Their Receptors I[M]. New York:Springer-Verlag,1991.
- [8] VOLDBORG B R,DAMSTRUP L,SPANG-THOMSEN M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations,function and possible role in clinical trials[J]. *Ann Oncol*,1997,8:1197-1206.
- [9] GUO G,GONG K,WOHLFELD B, et al. Ligand-independent EGFR signaling[J]. *Cancer Res*,2015,75:3436-3441.
- [10] JOSEPH H,SILVA S,RAMI M. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in the era of precision medicine;the tale of a perfect example of targeted therapy,a review[J]. *Meta Gene*,2017,11:157-163.
- [11] LUO X Y,GONG X Q,CAREEN K. Suppression of EGFRvIII-mediated proliferation and tumorigenesis of breast cancer cells by ribozyme[J]. *International Journal of Cancer*,2003,104(6):716-721.
- [12] MODJTAHEDI H,ESSAPEN S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment;advances,challenges and opportunities[J]. *Anti-Cancer Drugs*,2009,20(10):851-855.
- [13] WEISSER N E,HALL J C, et al. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics[J]. *BiotechnolAdv*,2009,27:502-520.
- [14] AHMAD Z A,YEAP S K,ALI A M, et al. ScFv antibody:principles and clinical application[J]. *Clin Dev Immunol*,2012(2012):1-15.
- [15] WEICKERT MJ,DOHERTY D H,BEST E A, et al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*,1996,7(5):494-499.
- [16] KIM J Y,KIM S I,HONG E S, et al. Strategies for increasing heterologous expression of a thermostable esterase from *Archaeoglobus fulgidus* in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*,2016,127:98-104.
- [17] 常云胜,周维,高增鸿,等. 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*) *recA* 基因的克隆与原核表达[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(5):1947-1954.