维普资讯 http://www.cqvip.com

⑧143－148

第15卷第2期 中国病毒学 Vol.15 No.2
2000年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 2000

GST融合蛋白在杆状病毒系统中表达的可溶性研究*

Q782
Q786

杨 林[1]，李国清[2]，黄葆英[1]，王全忠[1]，龙繁新[1]，王珣章[1]

[1](中山大学生物防治国家重点实验室、生物医药中心，广州 510275)
[2](华南农业大学动物医学系，广州 510640)

摘要：将构建好的可表达GST融合蛋白的重组病毒AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28感染*Sf*9细胞，一定时间后取感染了病毒的细胞裂解物上清液进行SDS-PAGE分析，结果显示53 kDa的融合蛋白(GST-6xHis-*Etp*28)呈不溶状态。在原有裂解液的基础上，加固体十二烷基肌氨酸钠至终浓度1.5%，并将Triton X-100的比例由1%提高到2%。SDS-PAGE结果显示至少有1/3的GST-6xHis-*Etp*28处于溶解状态，可溶性GST-6xHis-*Etp*28经亲合层析，53 kDa的目标蛋白得到纯化。

关键词：GST融合蛋白；杆状病毒表达系统；可溶性分析
中图分类号：Q939.4，Q786 **文献标识码**：A **文章编号**：1003－5125(2000)02－0143－06

自从1983年Smith和Summers首次利用苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)表达人β-干扰素以来，至今已有数百种外源基因在杆状病毒载体系统中得到表达。由于杆状病毒载体表达系统具有较完备的翻译后加工修饰系统，如糖基化、磷酸化、蛋白酶特异性水解(如切除信号肽)和酰胺化等，还具有高效表达外源基因的能力，因此杆状病毒载体系统已成为最有应用前景的真核基因高效表达载体之一。

在应用杆状病毒系统进行外源基因的表达时，一个常用的转移载体是GST融合载体，这类载体将表达出GST融合蛋白。GST与还原型谷胱苷肽具有高度亲合性，因此可通过简便、高效的亲合纯化进行外源蛋白的分离纯化；此外，抗GST抗体可以对融合蛋白中的GST进行检测，从而使那些无法获得抗体的外源蛋白的检测成为可能。

应用原核系统表达GST融合蛋白时，往往会得到不可溶的表达产物[1]，这就给表达产物的纯化、活性保证等带来了困难。本研究探讨了GST融合蛋白在杆状病毒系统中表达的可溶性状况，并进行了解决可溶性问题的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 重组病毒 重组病毒AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28[2]由本室构建。

1.1.2 昆虫细胞、病毒和病毒基因组DNA 含合成启动子和β-半乳糖苷酶基因的无包涵体粉纹夜蛾重组株(TnNPV-SVI⁻G)由本室构建[3]，草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda* 9，*Sf*9)昆虫细胞引自英国自然环境研究

收稿日期：1999－01－04，修回日期：1999－03－31
* 基金项目：国家自然科学研究基金资助项目(39800108)
作者简介：杨林，男(1964年－)，云南建水人，助研，博士。主要从事病毒生物防治和生物医药的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

会病毒研究所。

1.1.3 其它生化试剂 Glutathione Agarose Beads、Glutathione Powder、昆虫细胞裂解缓冲液(1×)、蛋白酶抑制剂混合物(50×)购自 PharMingen 公司。Acrylamide、Bis-acrylamide 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒扩增

大量培养 *Sf*9 细胞,待细胞长成单层处于对数生长期时用于病毒感染。具体操作包括:吸弃培养基,接种病毒,使病毒感染复数(MOI)小于 1。室温吸附 1 h 后除去病毒接种物,换以新鲜培养基,27 ℃培养 48～72 h,收集上清待用。

1.2.2 表达产物的检测

1.2.2.1 病毒定量感染和样品制备 接种 2×10^6 个处于对数生长期的 *Sf*9 细胞至 25 cm^2 细胞培养瓶中,使用高滴度病毒原液,病毒滴度(PFU/mL)至少为 1×10^8 有效病毒粒子/mL,且病毒感染复数(MOI)控制在 5～10 之间。病毒接种细胞吸附 1 h 后,弃病毒液,换以新鲜的培养基 27 ℃培养 72 h 后,移弃培养基,预冷的 PBS(pH7.4)缓冲液洗涤细胞数次。除尽残留液体,再加入 500 μL 预冷的细胞裂解液(含有 1× Protease inhibitor cocktail),用橡皮刮刮下细胞收集至 eppendorf 管内,置冰浴裂解 45 min,每 50 μL 细胞裂解物分装至一个 eppendorf 管中,置于 −20 ℃或者 −80 ℃贮存备用或直接用于表达情况分析。

1.2.2.2 SDS-PAGE 分析 将制备好的病毒感染的 *Sf*9 细胞裂解液上清取 50 μL,加入等量的蛋白质样品上样缓冲液(2×),水浴煮沸 5 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min,移取上清,在 BioRad 小型蛋白电泳装置上进行恒流电泳(SDS-PAGE 电泳浓缩胶浓度为 5%,电泳电流强度为 18 mA;分离胶浓度 10%,电泳电流强度为 34 mA)。电泳结束后,考马斯亮蓝染色,观察蛋白质带型。

1.2.3 GST-6xHis-*Etp*28 的纯化

取适量 Glutathione Agarose Beads, 500 g 离心 3～5 min,弃上清并用 5～10 倍体积的 PBS 洗两次;加入细胞裂解上清液,于 4 ℃轻摇摆 30 min,500 g 离心 3～5 min,弃上清,用 5 倍体积的 PBS 洗两次;加入 1 倍体积的 GST Elution Buffer,室温放置 2 min,500 g 离心 3～5 min,收集洗脱液,内含纯化的 GST 融合蛋白。

2 结果与分析

2.1 重组病毒 AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28

重组病毒 AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28,系通过含有 *Etp*28 基因的重组转移载体质粒 pAcGHLT-A-*Etp*28 与线性化致死缺失型苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV-OCC⁻)共转染 *Sf*9 细胞后构建而成[2]。

2.2 GST-6xHis-*Etp*28 融合基因在 *Sf*9 细胞中的表达

将 MOI 约为 3～10 的重组毒株 AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28 感染处于生长对数期的 *Sf*9 细胞,27 ℃培养 72 h 后,用适量的细胞裂解液裂解贴壁的细胞单层,取适量的裂解液上清进行 SDS-PAGE 分析,可观察到感染重组病毒的细胞裂解液上清蛋白质样品比感染了 TnNPV-OCC⁻的细胞样品多了一条 53 kDa 蛋白带(图 1)。该蛋白带与预期的表达产物大小一致,表明融合的 *Etp*28 基因得到了表达。

2.3 GST-6xHis-*Etp*28 融合蛋白的表达特性

为了探讨 GST-6xHis-*Etp*28 融合蛋白的溶解状态,在按常规方法裂解完细胞后,将裂解液以 12 000 r/min 离心 15 min,裂解上清液加等体积蛋白质样品上样缓冲液(2×),煮沸 5 min 后待用;裂解沉淀物则用 1×PBS 洗涤两次,加与 Lysis buffer 同样体积的 1×PBS,于冰浴中进行超声波粉碎,加等体积蛋白质样品上样缓冲液(2×),煮沸 10 min 后待用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

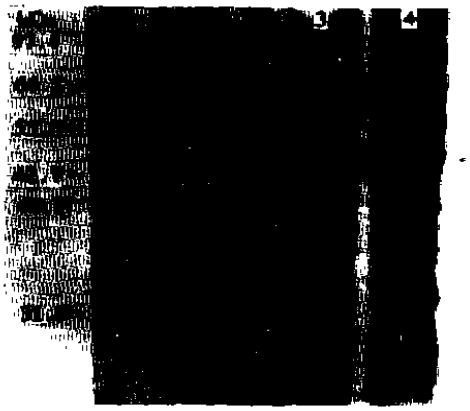

图 1　感染了重组毒株 AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28 的 *Sf*9 细胞裂解物 SDS-PAGE 分析

Fig.1　SDS-PAGE analysis of the *Sf*9 cell lysate

1. Mid-range protein molecular weight marker;
2. The *Sf*9 cell lysate infected with TnNPV-SVTG;
3～4. The *Sf*9 cell infected with different recombinant virus clonies of AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28

(图中箭头所指示表达产物 GST-6xHis-*Etp*28, 以下图均同此标注)

SDS-PAGE 结果显示, GST-6xHis-*Etp*28 主要存在于裂解沉淀物中, 即 GST-6xHis-*Etp*28 呈不可溶状态, 在裂解上清中基本看不到 GST-6xHis-*Etp*28(图 2)。

图 2　GST-6xHis-Etp28 溶解性质的 SDS-PAGE 分析

Fig.2　SDS-PAGE analysis of GST-6xHis-Etp28 solubility

1. Supernatant of *Sf*9 cell lysate infected with TnNPV-SVTG;
2. Supernatant of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28;
3. Insoluble pellet of *Sf*9 cell lysate infected with TnNPV-SVTG;
4. Insoluble pellet of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28;
5. Mid-range protein molecular weight marker

从表达、样品制备等方面对 GST-6xHis-*Etp*28 不可溶的原因进行了探讨:(1)首先通过向 Lysis buffer 中直接加固体 Tris 的办法将 Lysis buffer 的 pH 值由 7.5 提高到 8.5。*Etp*28 的等电点(pI)为 6.71, GST 的 pI 为 6.90。Lysis buffer 的 pH 值与 pI 差别越大则越有助于 GST-6xHis-*Etp*28 的可溶性。但 SDS-PAGE 结果显示 GST-6xHis-*Etp*28 仍处于不可溶状态(图略)。(2)在细胞感染早期收获样品, 即在 24pi、36pi 和 48pi 就收获细胞, 但 SDS-PAGE 结果显示 GST-6xHis-*Etp*28 仍处于不可溶状态(图略)。(3)较低的 MOI 可能会有助于改善外源蛋白的溶解性。我们用 MOI<1 进行细胞感染, 结果发现除表达量降低外, GST-6xHis-*Etp*28 仍处于不可溶状态(图 3)。(4)用 MOI<3 进行细胞感染, 然后于 48pi 就收获细胞, 结果约有 1/3 的 GST-6xHis-*Etp*28 处于溶解状态, 但该实验结果重复性较差(图略)。(5)对裂解液成份进行调整, 即将非离子去垢剂 Triton X-100 的比例由 1% 提高到 2%, 并加入终浓度为 1.5% 的固体 Sarkosyl, 结果发现约有 20%～30% 的 GST-6xHis-*Etp*28 呈可溶状态, 且实验重复性好(图 4)。

2.4　GST-6xHis-*Etp*28 的纯化

将可溶性 GST-6xHis-*Etp*28 进行亲合纯化, SDS-PAGE 和 Western-blot(图略)结果显示 53 kDa 的目标蛋白得到了纯化。SDS-PAGE 显示的另一条约 26 kDa 蛋白带为细胞内天然 GST(图 5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

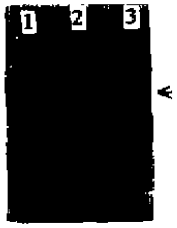

图3 MOI<1时GST-6xHis-*Etp*28溶解性质的SDS-PAGE分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of GST-6xHis-*Etp*28 solubility when MOI<1

1. Mid-range protein molecular weight marker;
2. Insoluble pellet of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28;
3. Insoluble pellet of *Sf*9 cell lysate infected with TnNPV-SVI-G

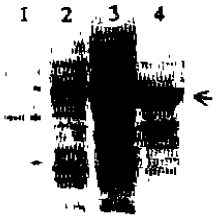

图4 Sarkosyl对GST-6xHis-*Etp*28溶解性质影响的SDS-PAGE分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the effect of sarkosyl on GST-6xHis-*Etp*28 solubility

1. Mid-range protein molecular weight marker;
2. *Sf*9 cell lysate infected with TnNPV-SVI-G;
3. Supernatant of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28;
4. Insoluble pellet of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28

图5 GST-6xHis-*Etp*28亲和纯化效果的SDS-PAGE分析

Fig.5 SDS-PAGE of affinity purification of GST-6xHis-*Etp*28

1. Eluted PBS wash buffer after washing the glutathione agarose bound with GST-6xHis-*Etp*28;
2. Eluted supernatant fractions of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28 added to the glutathione agarose;
3. Supernatant of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28;
4. Insoluble pellet of *Sf*9 cell lysate infected with AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28;
5. Purified GST-6xHis-*Etp*28;
6. Mid-range protein molecular weight marker;
7. Affinity purification of supernatant of *Sf*9 cell lysate infected with TnNPV-SVI-G

3 讨论

对杆状病毒表达系统，表达外源蛋白的可溶性被认为是该系统的优点之一，实际情况也大多如此。获得可溶性的外源蛋白，不仅有利于亲合纯化得到GST融合蛋白，而且在大部分情况下是外源蛋白保证其生物学功能的重要前提，例如蛋白质的正确折叠、糖基化磷酸化以及信号肽的正确切割等都有赖于外源蛋白的可溶性。但本研究中发现，GST-6xHis-*Etp*28融合蛋白基本处于不可溶状态。本实验室应用杆状病毒系统表达过其它GST融合蛋白(例如鸡传染性支气管炎病毒S1-GST融合蛋白、猪生殖和呼吸综合症病毒M-GST融合蛋白等)以及单纯GST蛋白，发现基本上都呈不可溶状态(未发表)。通常，造成GST融合蛋白不可溶的原因可能是：(1)过迟收获被感染外源蛋白本身的性质所决定。(2)重组病毒的MOI过高，例如远大于10。(3)昆虫细胞系选择不当。(4)由外源蛋白本身的性质所决定。(5)外源蛋白表达量过高也可能造成一定程度的不溶。(6)细胞裂解液所致。

维普资讯 http://www.cqvip.com

我们在感染后24、36和48 h收获细胞,然后降低MOI至1以下(表达量同时得到减少)以及更换不同的细胞系(如 *Sf*9 和 *Hi*5),除偶然几次可得到部分可溶性 GST-6xHis-*Etp*28 外,大部分实验得到的 GST-6xHis-*Etp*28 均呈不可溶状态,且获得可溶性 GST-6xHis-*Etp*28 的实验重复性较差。

还有一个因素应考虑,即裂解液的 pH 值。*Etp*28 的等电点(pI)为 6.71,裂解液的 pH 值距 *Etp*28 的 pI 越远,则越有助于 GST-6xHis-*Etp*28 的溶解。所用的昆虫细胞裂解液的 pH 值为 7.5,理论上已足以让 *Etp*28 可溶,但我们还向昆虫细胞裂解液中直接加固体 Tris,提高 pH 值至 8.5,SDS-PAGE 分析表明 GST-6xHis-*Etp*28 依旧处于不可溶状态。

在 GST 融合蛋白的原核表达系统中(例如 pGEX 系列),虽然表达产物被商家描写为可溶性蛋白,但就实际情况而言 GST 融合蛋白经常处于不可溶状态。一般来讲,标准分离 GST 融合蛋白的方法是采用非离子去垢剂,例如 Triton X-100。但据报道,通过这种方法获得的 GST 融合蛋白的不可溶性是一个普遍现象。J.V. Frangioni 和 B.G. Neel(1993)[1]利用十二烷基肌氨酸钠(Sarkosyl)可溶解肌动蛋白这一特性,在 *E. coli* 细胞裂解液中加入适量 Sarkosyl,从而获得了部分甚至完全可溶的 GST 融合蛋白。Sarkosyl 是一种人工合成的烷基阴离子去垢剂,最初是为了用来筛选抗龋剂的,它能够在体外吸附到 Casein 上,并抑制唾液中具有龋活性的酸的形成。

本研究将非离子去垢剂 Triton-X-100 的比例由 1%提高到 2%,并加入终浓度为 1.5%的固体 Sarkosyl,结果发现约有 20%~30%的 GST-6xHis-*Etp*28 呈可溶状态。去垢剂和蛋白的比例、即 Sarkosyl 的绝对浓度直接影响蛋白的可溶性,因此对于每一种 GST 融合蛋白来说,有必要优化 Sarkosyl 的使用量。我们获得的可溶性 GST-6xHis-*Etp*28 仍只占整个融合蛋白的小部分,因此有必要进一步摸索条件提高可溶部分的比例。采用 Sarkosyl 裂解细胞,虽然可得到可溶的融合蛋白,但有可能影响其与 Glutathione Agarose Beads 的结合,从而降低纯化效率。从实际结果看,只有约 50%的可溶性 GST-6xHis-*Etp*28 能够结合到 Glutathione Agarose Beads 上。不过 J.V. Frangioni 和 B.G. Neel 发表的结果显示:调整好 Sarkosyl 与 Triton X-100 的比例,将会极大改进 GST 融合蛋白与 Glutathione Agarose Beads 的结合效率。通常,1.5% Sarkosyl:2% Triton X-100 已经足够,但在一些极端情况下,可将 Triton X-100 的比例提高至 4%。

参 考 文 献

[1] Frangioni J V, Neel B G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase fusion proteins [J]. Analytical Biochemistry, 1993, 210:179~187

[2] 杨林,朱维,王瑀章,等.鸡球虫 *Etp*28 基因的克隆及其在杆状病毒系统中的表达[J].生物化学与生物物理学报,1998,3:293~298

[3] 王瑀章,谢伟东,龙紫新,等.形成多角体的杆状病毒载体系统的建立[J].病毒学报,1991,7:252~261

[4] O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors—a laboratory manual, New York: WH Freeman, 1992.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Solubilization Analysis of GST Fusion Protein Expressed in Baculovirus System

YANG Lin, LI Guo-qing, HUANG Bao-ying, WANG Quan-zhong, LONG Qing-xin, WANG Xun-zhang

[1](*State key Lab for Biological Control, Biopharmaceutical Center, Zhongshan University, Guangzhou* 510275, *China*)

[2](*Department of Animal Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou*, 510640, *China*)

Abstract: Insect *Sf*9 cells were infected with constructed recombinant virus AcMNPV-OCC⁻-GST-6xHis-*Etp*28, which could produce GST fusion protein and the supernatant of 72 h pi cell lysate was examined by SDS-PAGE. The results showed that GST-6xHis-*Etp*28 fusion protein of 53 kDa was expressed in insoluble status. After the sodium salt of the alkylanionic detergent sarkosyl was added to insect cell lysis buffer to a final concentration of 1.5%, and the final concentration of TritonX-100 was increased from 1% to 2%, at least 1/3 of GST-6xHis-*Etp*28 appeared to be soluble, which was examined by SDS-PAGE. Then soluble GST-6xHis-*Etp*28 was purified by affinity chromatography using glutathione agarose.

Key words: GST fusion protein; Baculovirus expression system; Solubilization analysis