技术与应用

DOI: 10.3724/SP. J. 1123.2012.10004

增强型绿色荧光蛋白的色谱分离和纯化

侯清华¹², 宋淑亮¹², 梁 浩¹², 王伟莉¹², 吉爰国^{1,3*} (1. 山东大学(威海)国际生物技术研发中心,山东 威海 264209; 2. 山东大学(威海)海洋学院, 山东 威海 264209; 3. 山东大学药学院,山东 济南 250012)

摘要: 增强型绿色荧光蛋白(EGFP) 是生物领域常用的标记物。在前期成功克隆表达 EGFP 的基础上,本实验建立 了两步分离纯化 EGFP 的色谱方法,并验证其分离纯化效果 检验 EGFP 的活性。首先用金属螯合亲和色谱柱 His-Trap HP 对 EGFP 的重组菌体破碎上清液进行初步分离,再用葡聚糖凝胶排阻色谱柱 Sephadex G-10 HR 对其进行 脱盐纯化。采用丙烯葡聚糖凝胶排阻色谱柱 Sephacryl S-300 HR 和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 检测分离纯化后的 EGFP 纯度。最后通过荧光分光检测器和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE) 验 证分离纯化后的 EGFP 是否具有荧光活性。结果表明该方法可以简便快速地分离纯化 EGFP ,纯度超过 98%,同时 保持了 EGFP 的荧光活性。

关键词:金属螯合亲和色谱;凝胶排阻色谱;增强型绿色荧光蛋白;分离;纯化 中图分类号:0658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2013)02-0151-04

Isolation and purification of enhanced green fluorescent protein using chromatography

HOU Qinghua^{1 2}, SONG Shuliang^{1 2}, LIANG Hao^{1 2}, WANG Weili^{1 2}, JI Aiguo^{1 3*}
(1. Weihai International Biotechnology R& D Center, Shandong University, Weihai 264209, China;
2. Marine School of Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China;
3. Pharmaceutical School of Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: Enhanced green fluorescent protein (EGFP) is a common biological marker. In this research , on the foundation of successful clone and expression of EGFP , a two-step chromatographic method was established to separate and purify EGFP , which includes the use of HisTrap HP immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and Sephadex G-10 HR size exclusion chromatography in sequence. Sephacryl S-300 HR size exclusion chromatography and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to check out the purity of EGFP. At last , it was found that EGFP still had fluorescent activity using fluorescence spectrophotometric detection and Native-PAGE detection. This method can effectively separate the active EGFP. The purity of the obtained EGFP was more than 98%. Key words: immobilized metal affinity chromatography (IMAC); gel exclusion chromatography (GEC); enhanced green fluorescent protein (EGFP); separation; purification

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 是常用的生物标记蛋白,最初从发光水母 Aequorea victoria 中发现。其分子量为 27 kDa,由 238 个氨基 酸组成,在波长 395 nm 紫外光激发下能发出绿色荧 光,具有生物发光性^[1]。此外,它还具有灵敏度高、 不需要添加外来底物便能显色、可以利用显微镜直 接对活体细胞进行研究等优点。因此,绿色荧光蛋 白自发现便在生物学标记领域得到广泛应用^[2]。 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fuorescent protein, EGFP) 是绿色荧光蛋白 GFP 的突变体,即将 GFP 的第 64 位的苯丙氨酸置换成亮氨酸,将 65 位 的丝氨酸置换成苏氨酸。突变体 EGFP 的荧光强度 是 GFP 的 35 倍多^[2,3]。

目前关于 GFP 和 EGFP 的分离纯化已有大量报 道。Ward 等^[4]使用 Sephadex G-75 色谱柱分离得到

^{*} 通讯联系人. E-mail: jiaiguo@ sdu. edu. cn. 收稿日期: 2012-10-10

GFP。罗文新等^[5] 从厦门水域的大型多管水母中, 采用色谱柱 TSK GEL SW3000 分离到新的绿色荧光 蛋白 GFPxm。曲萍等^[6] 构建了原核表达载体 pGEX4T-I-EGFP 转化大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS, 经异丙基硫代- β -D-半乳糖苷诱导表达,用谷胱甘肽 (GST) -Sepharose 4B 色谱分析法纯化含有 GST 标签 的 EGFP 蛋白。

EGFP 的应用范围广泛,但传统的 EGFP 分离纯 化方法较为复杂,收率低,蛋白纯度低,迫切需要一 种较为简便的分离纯化方法。基于此,本实验在成 功构建菌株 *E. coli* DH5α/pUC18-EGFP 的基础 上^[7 8],诱导表达 EGFP,采用金属螯合亲和色谱和 凝胶排阻色谱分离目标蛋白质,获取高纯度 EGFP 并验证了其活性。

1 实验部分

1.1 设备及材料

冷冻离心机(J-20XP 美国 Beckman)公司;紫外 分光光度计(8453E,美国 Agilent公司);纯水系统 (Elix 5 + Milli QS 美国 Millipore公司);冷冻干燥机 (FD-1(-110), DGG-9140A,上海森信);高效液相色 谱仪(HPLC 1100,美国 Agilent公司);低压色谱系 统(AKTA FPLC,瑞典 Amersham公司);凝胶成像系 统(Gel Doc EQ,美国 Bio-Rad公司);摇床(Innova 4340,美国 NBS公司);电泳仪(165-8001,美国 Bio-Red 公司); 荧光分光光度计(LS45,美国 PerkinElmer公司)。

重组菌 E. coli DH5α/pUC18-EGFP 为本实验室 制备; HisTrap HP 金属螯合亲和色谱柱(美国 GE Healthcare 公司);葡聚糖凝胶排阻色谱柱(Sephadex G-10 HR,30 mm×16 mm)为自装柱;丙烯葡聚糖凝 胶排阻色谱柱(Sephacryl S-300 HR,30 mm×16 mm)为自装柱;主要试剂如酵母提取物、胰蛋白胨、 咪唑等均为国产。

1.2 EGFP 的表达与提取

将含 pUC18-EGFP 质粒的菌 *E. coli* DH5α 接种 于新鲜 LB 液体培养基(蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 5 g,溶解于 1 L 水中, pH 7.5)中, 30 ℃摇 床振荡培养 36~48 h 后取出菌液,以 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集菌体。以适量去离子水 洗涤菌体 3 次,重悬菌体,置于 - 20 ℃冰箱冻存,再 将其置于 0 ℃融化,反复冻融 3 次破碎细胞。将破 碎后的细胞以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液。 另取少量 30 ℃培养后的 DH5 α /pUC18-EGFP 菌液 置于荧光显微镜下观察。

1.3 EGFP 的分离纯化

谱

亲和色谱:本实验中在 EGFP 的 N 端加有 6 个 组氨酸标签 组氨酸与金属镍有很强的亲和作用 ,因 此通过镍金属亲和色谱柱分离纯化 EGFP。选用 HisTrap HP 色谱柱 ,连入 HPLC 系统 ,洗脱缓冲液 A 液为 10 mmol/L 咪唑缓冲液(pH 7.4) , B 液为 500 mmol/L 的咪唑缓冲液(pH 7.4) 。用 10~15 个柱 体积的 A 液平衡 HisTrap HP 柱 ,至基线平稳。将菌 体破碎上清液过 0.45 μm 滤膜后 ,取 1 mL 上样。 用 A 液与 B 液进行洗脱 $0 \sim 40$ min 内 ,从 100% A 液线性变化到 100% B 液 ,流速为 1 mL/min。柱温 为 25 ℃。收集流出组分 ,经紫外、荧光检测器检测。 紫外检测波长为 280 nm; 荧光检测最大激发波长 (λ_{Ex})为 489 nm ,最大发射波长(λ_{Em})为 511 nm。 收集紫外、荧光检测最大洗脱峰组分 ,置于 – 20 ℃ 冰箱内 24 h 后 ,用冷冻冻干机冻干后保存。

凝胶排阻色谱:选用 Sephadex G-10 HR(30 mm ×16 mm) 自装色谱柱,连入 AKTA FPLC 系统。将 HisTrap HP 色谱柱收集的最大洗脱峰溶液过 0.45 μm 滤膜,取 1 mL 上样。流动相为三蒸水(pH 7.0),流速为 1 mL/min^[9],紫外检测波长为 280 nm。收集各组分,置于 -20 ℃冰箱内 24 h 后,冷冻 冻干机冻干后保存。

1.4 EGFP 的纯度检测

凝胶排阻色谱^[10]:选用 Sephacryl-S 300 HR(30 mm×16 mm) 自装色谱柱,连入 HPLC 系统,流动相为 0.15 mol/L NaCl(pH 7.0),流速为 1 mL/min 柱 温为 25 ℃。经紫外、荧光检测器检测,验证分离纯 化的 EGFP 是否为单一峰。紫外检测波长为 280 nm 荧光检测波长为 λ_{Ex} = 489 nm/λ_{Em} = 511 nm。

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[11]:分离胶的浓度为 12%,浓缩胶的浓度为 5%。上样样品为:纯化脱盐后的 EGFP 20 μL,菌体 破碎上清液 20 μL,分子量标准物 10 μL。

1.5 EGFP 的回收率检测

用 Bradford 法测定重组菌体破碎上清液和每步 分离纯化后的目标蛋白质浓度,以牛血清白蛋白为 标准蛋白制作标准曲线,计算每一步的回收 率^[12,13]。

1.6 EGFP 的荧光活性测定

荧光分光光度计检测:采用 LS45 荧光分光光度 计对分离纯化后的 EGFP 进行荧光激发光谱和荧光 发射光谱测定。

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)分析:采用 Native-PAGE 验证分离纯化的 EGFP 在紫

外下是否发出荧光 紫外检测波长为 365 nm。

2 结果与讨论

2.1 EGFP 在大肠杆菌中的表达

在荧光倒置显微镜下观察到菌体呈现较强的绿 色荧光,见图1。表明 EGFP 在 DH5α/pUC18-EGFP 中表达良好。



图 1 DH5α/pUC18-EGFP 的荧光照片(400×) Fig. 1 Fluorescent photo of DH5α/pUC18-EGFP (400×)

2.2 EGFP 的分离纯化

2.2.1 HisTrap HP 柱分离纯化

随着上样时间的增加,HisTrap HP 柱逐渐变成 绿色。在咪唑浓度达到 30% 即 150 mmol/L 时,绿 色荧光蛋白被洗脱下来。

2.2.2 Sephadex G-10 HR 柱分离纯化

将 HisTrap HP 柱分离纯化后的 EGFP 收集后, 在 Sephadex G-10 HR 凝胶色谱柱上进行进一步分 离纯化。从 AKTA FPLC 的脱盐图谱(图 2)可以发 现 EGFP 峰与盐峰分离度很好。由于 EGFP 的分子 量大于 NaCl,所以 EGFP 峰在凝胶排阻色谱中先被 洗脱出来,出现在 23 mL 左右;盐峰后被洗脱出来, 出现在 45 mL 左右。

2.3 EGFP 的纯度检测

2.3.1 凝胶色谱检测

图 3 为 EGFP 的紫外检测和荧光检测结果。从 中可知,分离纯化后的 EGFP 在紫外检测 280 nm 下 有单一峰,出峰时间为 50 min 左右。表明纯化后的 EGFP 为单一蛋白,纯度较高,大于 98%。另外,荧 光检测显示在 50 min 左右时出现单一荧光峰,出峰 时间与紫外检测出峰时间基本一致,说明该荧光峰 为纯化后的 EGFP。纯化后的 EGFP 纯度较高,同时 保持荧光活性。

2.3.2 SDS-PAGE 检测

采用 SDS-PAGE 再次验证 EGFP 纯度,见图4, 从左至右依次为分子量标准物、纯化的 EGFP、重组



图 2 EGFP在 Sephadex G-10 HR 柱上的凝胶排阻色谱图 Fig. 2 Chromatogram of EGFP on Sephadex G-10 HR column

a. ultraviolet (UV) detection at 280 nm; column size: $30 \text{ mm} \times 16 \text{ mm}$; elution buffer: pure water (pH 7.0); the flow rate of elution solution: 1 mL/min; sample: 1 mL of EGFP with salt. b. conductivity.





a. UV detection at 280 nm; column size: 30 mm \times 16 mm; elution buffer: 0.15 mol/L NaCl (pH 7.0); the flow rate of elution solution: 1 mL/min; sample: 1 mL of the purified EGFP. b. FLD detection with $\lambda_{\rm Ex}$ =489 nm/ $\lambda_{\rm Em}$ =511 nm.

菌体破碎上清液。与菌体破碎上清液相比,纯化的 EGFP 为单一条带。分子量约为31 kDa,稍大于 EG-FP 的理论分子量,主要是因为表达的 EGFP 带有 6 个组氨酸标签 6 个组氨酸分子量为 0.84 kDa^[14]。 SDS-PAGE 与采用 Sephacryl S-300 HR 柱的凝胶色 谱法验证的纯度结果一致,表明采用本实验所建立 的方法可以很好地分离纯化 EGFP。

2.4 EGFP 的纯化效率

谱

色







经 HisTrap HP 柱纯化后的 EGFP 占破碎菌体上 清液中蛋白质的 26.7%; 再经 Sephadex G-10 HR 凝 胶色谱柱脱盐 ,得到的 EGFP 占破碎菌体上清液中 蛋白质的 19.1%。即目标蛋白质 EGFP 的得率为 19.1%。

2.5 EGFP 的活性测定

2.5.1 荧光分光光度计检测

采用荧光检测分离纯化后的 EGFP 结果如下: λ_{Ex} 为 481 nm , λ_{Em} 为 513 nm ,见图 5。检测结果与 Lauf 等^[14]报道 EGFP 的 λ_{Ex} = 488 nm/ λ_{Em} = 509 nm 基本一致 说明分离纯化后的 EGFP 仍具有荧光活 性。





2.5.2 Native-PAGE 分析

由图 6 可见,分离纯化的 EGFP 经 Native-PAGE 检测,在紫外灯(365 nm)照射下发出绿色荧光。表明 EGFP 经分离纯化后,仍具有荧光活性。



图 6 EGFP 的 Native-PAGE 分析结果 Fig. 6 Native-PAGE analysis of EGFP UV detection at 365 nm.

3 结语

本实验在构建表达载体 pUC18-EGFP 的基础 上 利用宿主大肠杆菌 DH5α 表达目的蛋白 ,得到含 有组氨酸标签的 EGFP ,其分子量约为 31 kDa。对 EGFP 进行前期处理后 ,通过镍柱亲和色谱分离纯 化蛋白 ,再进一步脱盐 ,并对其荧光活性、光谱特性 进行了研究。本文建立了分离纯化 EGFP 的方法 , 该方法简单 ,蛋白纯度高 ,同时保持了 EGFP 的活 性 ,为进一步工艺优化 EGFP 的分离纯化条件、提高 产率奠定了基础。

参考文献:

- [1] Chalfie M , Tu Y , Euskirchen G , et al. Sci , 1994 , 263 (5148) : 802
- [2] Zlokarnik G , Negulescu P A , Knapp T E , et al. Sci , 1998 , 279 (5347) : 84
- [3] Shaner N C , Patterson G H , Davidson M W. J Cell Sci , 2007 , 120(24): 4247
- [4] Ward W W , Bokman S H. Biochemistry , 1982 , 21: 4535
- [5] Luo W X , Zhang J , Yang H J , et al. Acta Oceanologica Sinica (罗文新,张军,杨海杰,等. 海洋学报), 2002, 24(4):82
- [6] Qu P, Sui Y F, Ye J, et al. Shaanxi Medical Journal (曲萍,隋 延芳,叶菁,等. 陕西医学杂志), 2006, 35(10): 1235
- [7] Tang J B , Zhu P , Yang H M , et al. Biotechnol Lett , 2008 , 30 (8): 1409
- [8] Tang J B , Yang H M , Song S L , et al. Food Chem , 2008 , 108 (2): 657
- [9] MaLN, WuD, BianLJ. Chinese Journal of Chromatography (马丽娜,吴丹,边六交. 色谱), 2012, 30(8): 822
- [10] Deng Z H , Sun H , Lin Y , et al. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology (邓志会,孙贺,林岩,等.中国生物化 学与分子生物学报), 2011, 27(8):768
- [11] Zhou B, Bian L J. Chinese Journal of Chromatography (周勃, 边六交. 色谱), 2008, 26(3): 384
- [12] Ye W M, Han H X, Fan L Y, et al. Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences (叶伟民,韩焕兴,范列英,等. 上海 医学检验杂志), 1996, 11(4): 207
- [13] Zhang Z T , Liu J S , Xu Q , et al. Food & Machinery (张志涛, 刘金生,许强,等. 食品与机械), 2011, 27(5): 128
- [14] Lauf U , Lopez P , Falk M M. FEBS Letters , 2001 , 498: 11