

重组抗原 *CP4 - EPSPS* 的克隆、表达和纯化

邓汉超^{1,2}, 刘玉琛³, 邓国标³, 刘晋^{1,2}, 周向阳^{1,2}

(1. 深圳市农业科技促进中心, 广东 深圳 518040; 2. 农业部农作物种子质量监督检验测试中心(深圳), 广东 深圳 518040; 3. 深圳市作物分子设计育种研究院, 广东 深圳 518107)

摘要:构建了一个含有 *CP4 - EPSPS* 外源基因的细菌表达载体并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的高效表达, 通过 SDS - PAGE 检测发现, 目的蛋白完全以可溶性方式存在于细胞破碎上清液中。收集该上清液并进而通过镍柱亲和层析, *CP4 - EPSPS* 重组蛋白纯度可达 85% 以上, 利用 Bradford 法测定蛋白质浓度为 0.9 mg/mL。该蛋白表达和纯化体系可为转基因植物、食品等蛋白检测用抗体提供稳定免疫性抗原, 同时也可为蛋白标准物质研制提供稳定物质基础。

关键词: *CP4 - EPSPS*; 表达; 纯化

中图分类号: Q 81 文献标识码: A 文章编号: 1007 - 7561 (2017) 05 - 0059 - 03

Cloning, expression and purification of recombinant antigen *CP4 - EPSPS*

DENG Han - chao^{1,2}, LIU Yu - chen³, DENG Guo - biao³, LIU Jin^{1,2}, ZHOU Xiang - yang^{1,2}

(1. Shenzhen Agricultural Science and Technology Promotion Center, Shenzhen Guangdong 518040;

2. Crop Seed Quality Supervision, Inspection and Test Center of Ministry of Agriculture (Shenzhen), Shenzhen Guangdong 518040;

3. Shenzhen Crop Molecular Design and Breeding Institute, Shenzhen Guangdong 518107)

Abstract: A bacterial expression vector containing *CP4 - EPSPS* exogenous gene was constructed and expressed efficiently in *E. coli* BL21 (DE3). SDS - PAGE showed that the target protein was completely soluble in the cell supernatant liquor. The supernatant was collected and further purified by nickel column affinity chromatography. The purity of *CP4 - EPSPS* protein was above 85%, and the protein concentration was 0.9 mg/mL determined by Bradford method. The protein expression and purification system can provide stable immune antigen for the transgenic plants, food and other antibody for protein detection, and also provide a stable material basis for the preparation of protein standard material.

Key words: *CP4 - EPSPS*; expression; purification

世界上第一例转基因抗草甘膦大豆问世以来, 转基因作物的应用与推广已有 16 载, 我国每年从国外进口大量的转抗草甘膦 *CP4 - EPSPS* 的作物和食品。随着人们对食品及转基因食品安全的关注, 建立转基因作物、苗、种子及其产品的检测技术体系极为重要。我国目前市场上已经开发出多种商业化的基于蛋白质测定的转基因检测试剂盒, 然而由于生产工艺的不同, 表达出的外源蛋白通过参考物质定量的量值难以溯源到上一级的计量标准, 因此造成不同厂商不同试纸条测定结果不准确和缺乏可比

性, 为此将对转基因的安全监管带来隐患, 而且会引发法律、贸易纠纷等经济和社会问题。面对我国缺少基于统一标准的溯源蛋白, 为此建立高效、快速、大量制备纯度高的重组蛋白 *CP4 - EPSPS* 技术体系尤为重要。本研究通过构建细菌表达载体在大肠杆菌进行表达, 建立大量制备高纯度的重组蛋白 *CP4 - EPSPS* 技术体系, 可为转基因植物、食品等蛋白检测用抗体提供稳定免疫性抗原, 同时也可为蛋白标准物质研制提供稳定物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究材料

转基因大豆种子, 表达载体 pet30a, *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞为实验室保存。

收稿日期: 2017 - 03 - 15

基金项目: 转基因新品种培育重大专项 (2009ZX08001 - 023B), 深圳市技术创新项目 (CXZZ20120614165508810)

作者简介: 邓汉超, 1984 年出生, 男, 农艺师。

通讯作者: 刘晋, 1979 年出生, 女, 高级农艺师。

1.1.2 试剂

T4 DNA 连接酶、*NdeI* 限制性内切酶、*XhoI* 酶、Taq DNA 聚合酶等酶购自 TaKaRa 公司、卡那霉素 Kan 购自深圳市百胜科创生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *CP4-EPSPS* 基因的克隆和表达载体构建

在 NCBI 上获取 *CP4-EPSPS* 基因序列(登录号为 AF464188.1),使用 Primer5 软件设计引物,上下游引物 5 端分别增加 *NdeI* 和 *XhoI* 酶切位点,其中上游引物 F 为: AGATATACATATGTCTCACGGTCAAGCAGCC,下游引物 R 为:GTGCTCGAGGGCAGCCTTCGTATCGGAGA。

将大豆种子研磨成粉末,用 Qiagen 核酸提取试剂盒提取基因组 DNA。以提取的 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 2 min;10 °C 降温 2 min。

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,分离目的片段,采用胶回收试剂盒回收 PCR 产物,回收产物与 pet30a 载体进行连接。连接产物通过 42 °C 热击,转化进入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,然后将转化菌液涂于 LB 平板(含卡那霉素)上,37 °C 条件下培养过夜。挑取单克隆进行 PCR 验证及测序验证,将正确的菌落重新接种,-80 °C 条件下保菌及提取质粒在 -20 °C 长期保存。

1.2.2 目的蛋白表达与纯化条件优化

取出 -80 °C 保存的菌,在冰上缓慢解冻或者取保存的质粒进行热击转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,然后接入含 Kan 的 LB 液体培养基中,37 °C 中振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8,加入终浓度为 1 mM 的 IPTG,在 25 °C 低温下诱导过夜表达。

收集菌体,超声,离心,取上清,上样至镍柱,分别以 15 mM、60 mM、150 mM 以及 300 mM 咪唑洗涤,将各洗涤组分进行电泳,选择最优的咪唑洗涤浓度。将最优咪唑洗脱浓度洗涤的组分进行 10 mM Tris-HCl

(pH8.0)透析,测量浓度和纯度,-20 °C 保存。

1.2.3 目的蛋白 Bradford 定量分析

使用 0.15 mmol/L NaCl 将牛血清白蛋白标准品(浓度 20 mg/mL)稀释 40 倍使终浓度为 0.5 mg/mL;进行两组平行样,各取 4 支试管分别加入 10 μL、20 μL、30 μL、40 μL 稀释的标准品,然后分别加入 0.15 mmol/L NaCl 190 μL、180 μL、170 μL、160 μL,另取一试管作为空白(200 μL 0.15 mmol/L NaCl);取 20 μL 纯化产物,加入 180 μL 0.15 mmol/L NaCl;然后将每试管分别加入 2 mL 考马斯亮蓝(G-250)染液,充分振荡混匀,室温条件下静置 30 min;使用全波长分光光度计(DU series600)分别测定 A₅₉₀,最终绘制标准曲线以及计算样品蛋白含量。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建及鉴定

采用本研究设计的上下游引物进行 PCR 扩增,将扩增产物切胶纯化后,以 *NdeI* 和 *XhoI* 限制性内切酶进行双酶切,同时 pet30a 载体也进行双酶切。将双酶切后线性化的 pet30a 载体与双酶切的 PCR 产物进行连接,获得带有 *CP4-EPSPS* 基因的质粒载体(pBPIT-*CP4-EPSPS*),其结构如图 1。

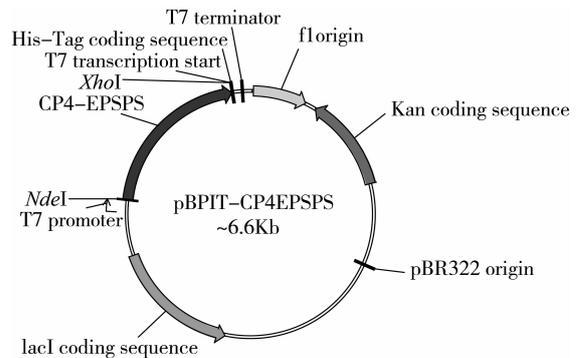


图1 *CP4-EPSPS* 质粒结构图

以通用引物进行双向测序(部分结果见图 2 和图 3),测序结果经过 BLAST 比对,测序序列与原 NCBI 序列完全一致。

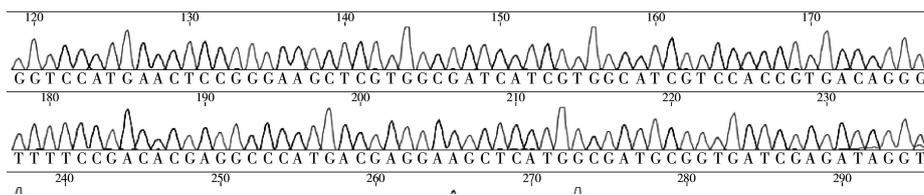


图2 反向测序部分结果

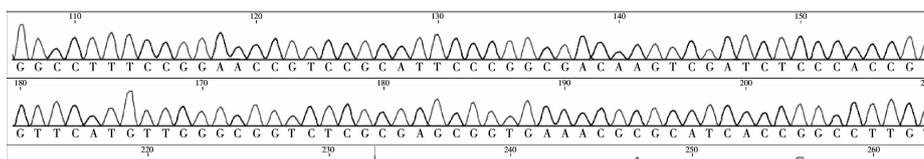


图3 正向测序部分结果

2.2 目的蛋白纯化条件优化

本研究采用镍柱对目的蛋白进行纯化,分别以 15 mM、60 mM、150 mM 以及 300 mM 咪唑进行洗涤,将 4 个梯度咪唑浓度洗涤的组分进行电泳,结果见图 4。使用 15 mM 咪唑洗涤只能获得极少部分的蛋白(见条带 4),使用 60 mM 咪唑洗涤只能获得极少部分目的蛋白(见条带 5),使用 300 mM 咪唑进行洗涤获得较多的杂蛋白(见条带 7),最优的咪唑洗涤浓度为 150 mM(见条带 6)。

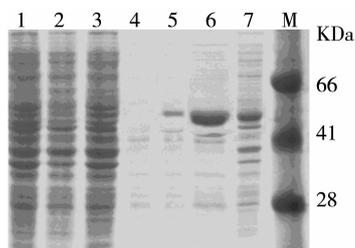


图4 *CP4-EPSPS* 的表达和纯化结果

注:1. 质粒 pet30a 未诱导全菌;2. 质粒 pet30a 诱导后全菌;3. pBPIT-*CP4-EPSPS* 质粒未诱导全菌;4. *CP4-EPSPS* 蛋白 15mM 咪唑洗涤;5. *CP4-EPSPS* 蛋白 60mM 咪唑洗涤;6. *CP4-EPSPS* 蛋白 150mM 咪唑洗涤;7. *CP4-EPSPS* 蛋白 300mM 咪唑洗涤;M. 分子量 Marker

2.3 目的蛋白的表达和定量分析

通过离心收集表达菌体,再经过超声破碎、离心后,分为上清和沉淀,然后使用 SDS-PAGE 电泳进行检测,检测结果见图 5。由图 5 可知,所表达的目的蛋白 *CP4-EPSPS* 在细菌细胞内绝大部分是以可溶性方式存在于细胞上清液中(可见条带 6),以包涵体形式存在细胞中很少(见条带 5)。使用镍柱纯化细胞上清液,最终获得高纯度的目的蛋白(可见条带 7),将 150 mM 咪唑洗脱获得的组分进行 10 mM Tris-HCl 透析(可见条带 8),该组分的电泳纯度 >85%,利用 Bradford 法测定蛋白质浓度为 0.9 mg/mL。

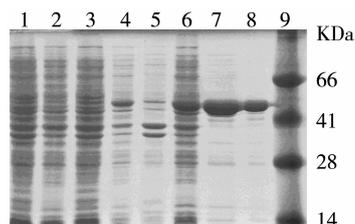


图5 *CP4-EPSPS* 蛋白的表达和纯化结果

注:1. 质粒 pet30a 未诱导全菌;2. 质粒 pet30a 诱导后全菌;3. pBPIT-*CP4-EPSPS* 质粒未诱导全菌;4. pBPIT-*CP4-EPSPS* 质粒诱导后全菌;5. pBPIT-*CP4-EPSPS* 质粒诱导超声沉淀;6. pBPIT-*CP4-EPSPS* 质粒诱导超声上清;7. *CP4-EPSPS* 蛋白 150mM 咪唑洗涤;8. *CP4-EPSPS* 蛋白透析后;9. Marker

3 讨论

转基因食品的安全性一直备受人们的关注,其安全性评价需要以转基因成分检测结果为基础。基于转基因作物、食品等的转基因成分检测技术可分为两大类:一类是基于外源核酸(DNA)成分的检测方法^[1-3],另一类是基于外源核酸表达的外源蛋白质通过免疫学的分析方法^[4-5]。目前,基于蛋白质的检测技术在植保植检、农产品质量安全、食品安全、生命科学研究、生物产业化进程等领域的应用越来越广泛。在全球范围内所有已经商业化的转基因作物中,种植和销售最为广泛的是含抗草甘膦 *CP4-EPSPS* 转基因作物。我国每年进口 3000 多万 t 大豆,而且年年在增加,这些大豆绝大部分来自美国和巴西转基因大豆。因此,我国应该尽快研究、制定和建立针对特异性蛋白质的检测鉴定技术体系,为我国转基因作物及食品的安全性检测、评价保驾护航。

本研究构建了一个含有 *CP4-EPSPS* 外源基因的细菌表达载体并在大肠杆菌 BL21 菌株中的高效表达,通过 SDS-PAGE 检测发现,目的蛋白完全以可溶性方式存在于细胞破碎上清液中。收集该上清液并进而通过镍柱亲和和层析,*CP4-EPSPS* 重组蛋白纯度可达 85% 以上,利用 Bradford 法测定蛋白质浓度为 0.9 mg/ml。该蛋白表达和纯化体系可为 *CP4-EPSPS* 转基因植物蛋白检测用抗体提供稳定免疫性抗原,同时也可作为蛋白标准物质研制提供稳定物质基础。

参考文献:

- [1] SALVI S, DORSO F, MORELLI G. Detection and quantification of genetically modified organisms using very short locked nucleic acid TaqMan probes [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(12): 4320-4327.
- [2] LIU M, LUO Y, TAO R, et al. Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (Roundup Ready) by loop-mediated isothermal amplification [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(11): 2365-2369.
- [3] GUAN X, GUO J, SHEN P, et al. Visual and Rapid Detection of Two Genetically Modified Soybean Events Using Loop-mediated Isothermal Amplification Method [J]. Food Analytical Methods, 2010, 1936-9751: 1-8.
- [4] MARGARIT E, REGGIARDO M, VALLEJOS R, et al. Detection of BT transgenic maize in foodstuffs [J]. Food Research International, 2006, 39: 250-255.
- [5] Jing L X, Cai X F, Mu S Z, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody against *CP4-EPSPS* [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2007, 23(5): 457-459. ☉