

## 游仆虫第一类肽链释放因子在大肠杆菌中的表达、纯化和鉴定

张素平, 贺晓静, 袁静明, 梁爱华\*

(山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

**摘要** 为对肽链释放因子结构与功能进行研究,进而探讨纤毛虫这类生物中遗传密码表达特殊性的机理,利用 PCR 技术和基因重组技术构建了游仆虫第 1 类肽链释放因子 eRF1a 及 C 端带 6 个组氨酸的 eRF1a(His)<sub>6</sub> 的两个重组表达质粒 pBV221-eRF1a 和 pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub>. 在大肠杆菌 DH5 中,通过 42 °C 高温诱导 3 h, eRF1a 和 eRF1a(His)<sub>6</sub> 获得了可溶性表达. eRF1a(His)<sub>6</sub> 的表达水平达到可溶性细菌总蛋白约 8%,经 Ni-NTA 亲和层析和 Hitrap Q 离子交换层析,得到纯度较好的 eRF1a(His)<sub>6</sub>. Western 印迹鉴定为阳性.

**关键词** 纤毛虫 eRF1a, 温度诱导表达, Ni-NTA 亲和层析, Western 印迹分析  
**中图分类号** Q78

### Expression, Purification and Identification of eRF1a of *Euplotes octocarinatus*

ZHANG Su-ping, HE Xiao-jing, YUAN Jing-ming, LIANG Ai-hua\*

(Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** To study the structure and function of polypeptide release factors and understand the mechanism of the genetic deviation of ciliates from other eukaryotes by their reassignment of one or two stop codons to encode amino acids, two expression plasmids pBV221-eRF1a and pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub> were constructed respectively by means of PCR and recombinant DNA techniques. Non fusion and fusion expression of eRF1a in *E. coli* DH5 were performed by induction at high temperature of 42 °C. The expression level of eRF1a(His)<sub>6</sub> was 8% of the total bacterial proteins. The eRF1a(His)<sub>6</sub> was purified by Ni-NTA affinity chromatography and ion exchange chromatography. The expression products were also checked by Western blotting assay.

**Key words** ciliate eRF1a, high temperature induction expression, Ni-NTA affinity chromatography, Western blotting assay

在蛋白质生物合成终止过程中,肽链第 1 类释放因子(polypeptide release factor 1)特异性识别终止信号,促进肽酰-tRNA 酯键的水解,阻止蛋白质翻译过程中的错误通读,最后释放出正确的蛋白质<sup>[1,2]</sup>. 它的某些结构域与 tRNA 的结构非常相似,因此有人提出 tRNA-mimicry 模型<sup>[3]</sup>. 目前,关于肽链合成终止过程中蛋白质与 RNA 之间的相互识别与作用机理已经引起国外同行的关注<sup>[4]</sup>. 我国尚无关于肽链释放因子基因表达方面的研究报道.

真核生物中的第 1 类释放因子通常只有 1 种,即 eRF1,原核生物中通常有 2 种,分别为 RF1, RF2. 游仆虫是具纤毛的原生动物,生物进化上属低等真

核生物. 由于其遗传密码表达的特殊性,前不久,本课题组对其释放因子基因进行了研究. 发现这种生物的第 1 类释放因子有 2 种,分别为 eRF1a 和 eRF1b<sup>[5]</sup>. eRF1a 是分子量约为 50 kD 的蛋白质,它的

收稿日期:2001-04-16;接受日期:2001-06-22

国家自然科学基金(No. 39970416)和教育部科学技术研究重点项目.

\*联系人, Tel: (0351-7011499); E-mail: aliang@sxu.edu.cn

张素平,女,1978年12月生,硕士生.

Received: April 16, 2001; Accepted: June 22, 2001

Supported by the National Natural Science Foundation of China.

\*Corresponding author Tel: 0351-7011499; Fax: 7018731

E-mail: aliang@sxu.edu.cn

表达和纯化对于其结构和功能研究,及进一步搞清多肽链合成终止机制,研究生命活动基本规律及从分子水平上探讨生物进化均有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pGEMF19-1 质粒由本课题组构建,内含游仆虫第 1 类释放因子 eRF1a 全基因序列; *E. coli* DH5 由本实验室保存;克隆载体 pGEM-T Easy 购于 Promega 公司;表达载体 pBV221 由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶,限制性内切酶购于 Promega 公司;质粒抽提、DNA 纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,基因表达引物由上海生物工程有限公司合成, Ni-NTA agarose 柱和 HiTrap Q 均为 Pharmacia 公司产品;抗体为 QIAGEN 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 PCR 扩增 eRF1a 基因及 eRF1a(His)<sub>6</sub> 基因**  
以 pGEMF19-1 质粒为模板,分别用引物 P1 和 P2、P1 和 P3 扩增出 eRF1a 和 eRF1a(His)<sub>6</sub> 基因片段,其中, P1: 5'-GCC GAA TTC GCT AGC ATG TCA ATA ATT GAT AG-3 为上游引物,含 *EcoR* 和 *Nhe* 酶切位点; P2: 5'-GCC AAG CTT TTA TAT GAA ATC TTC ATC-3 为下游引物,含 *HindIII* 酶切位点。P3: 5'-GCC GGA TCC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TAT GAA ATC TTC ATC TGC-3 为下游引物,含 *BamH* 酶切位点及 6 个组氨酸的密码子。

**1.2.2 工程菌的构建** 回收并纯化 PCR 产物后,连入 pGEM-T Easy 克隆载体中,再从重组的 pGEM-T Easy 中分别用 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切出 eRF1a, *EcoR* 单酶切出 eRF1a(His)<sub>6</sub>,表达载体 pBV221 也用同样的酶消化,单酶切的载体再用 CIP 去磷酸化,回收并纯化,连接,转化到 *E. coli* DH5 中,然后用 PCR 和酶切鉴定,分别得到重组的表达质粒 pBV221-eRF1a 和 pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub>。

**1.2.3 eRF1a 基因的诱导表达与纯化** pBV221-eRF1a 和 pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub> 30 培养至  $A_{600} = 0.9$  时,迅速升温至 42 °C,诱导 3 h,离心收集菌体,溶于磷酸缓冲液,超声破碎菌体,离心取上清。融合型 eRF1a,即 eRF1a(His)<sub>6</sub> 带有 6 个组氨酸,可以用 Ni-NTA 柱进行亲和层析。含 eRF1a(His)<sub>6</sub> 的上清液过 Ni-NTA 柱,缓冲液为 0.02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mol/L NaCl, pH7.2,用 20 mmol/L 咪唑洗脱可得 eRF1a

(His)<sub>6</sub>。初步纯化产物过夜透析,透析外液用 HiTrap Q 柱的平衡缓冲液;过 Q 柱,用含 0.1 ~ 0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris 缓冲液 (pH7.6) 线性梯度洗脱,10 % SDS-PAGE 检测。

**1.2.4 Western 印迹鉴定** 参照 Promega 公司的实验手册。

## 2 结果

### 2.1 eRF1a 和 eRF1a(His)<sub>6</sub> 基因的扩增与克隆

利用引物 P1 和 P2、P1 和 P3 扩增 eRF1a 和 eRF1a(His)<sub>6</sub> 基因片段,得到的 PCR 产物大小约 1 200 bp,与已知的 eRF1a 基因大小一致 (Fig. 1)。eRF1a(His)<sub>6</sub> 中虽然多了 6 个编码组氨酸的核苷酸,但由于其长度上仅多了 18 bp,在琼脂糖凝胶上看不出与 eRF1a 的差异。将 eRF1a 和 eRF1a(His)<sub>6</sub> 基因克隆到温度诱导型表达载体 pBV221 中后,对重组质粒进行了酶切分析,随后对其核苷酸序列进行了测序,表明在 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子下游插入的 DNA 片段与已知的 eRF1a 基因序列完全一致,并且酶切位点接头处序列正确,无移码现象。

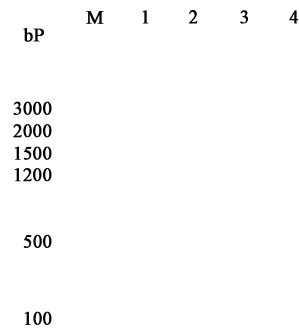


Fig. 1 Restriction endonuclease digestion and PCR analysis of recombinant plasmid

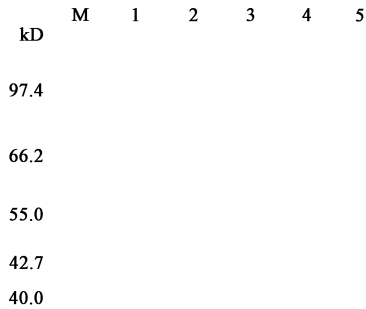
- M. 100 bp DNA ladder plus; 1. PCR product of eRF1a;  
2. PCR product of eRF1a(His)<sub>6</sub>;  
3. pBV221-eRF1a digested with *EcoR* ;  
4. pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub> digested with *EcoR*

### 2.2 eRF1a 基因和 eRF1a(His)<sub>6</sub> 基因表达与纯化

含 eRF1a(His)<sub>6</sub> 的工程菌超声裂解物经 10 % SDS-PAGE 分离、染色后,在分子量约 50 kD 处出现 1 个新增蛋白条带 (Fig. 2)。经薄层扫描测定此条带约占菌体可溶性总蛋白的 8 %,对照菌(空菌)及未经诱导的工程菌则无此条带。利用同样的方法,eRF1a 基因也得到了表达。

含 eRF1a(His)<sub>6</sub> 的超声裂解液上清经 Ni-NTA 亲

和层析和 HiTrap Q 柱纯化后, SDS-PAGE 分析显示几乎不含杂蛋白, 结果见 Fig. 2. Western 印迹分析表明, 可溶性 eRF1a(His)<sub>6</sub> 可与 anti-His AP 偶联抗体反应 (Fig. 3), 说明已得到比较纯的 eRF1a.



**Fig. 2** Expression and purification of fusion eRF1a(His)<sub>6</sub> protein synthesized in *E. coli*

M. Protein marker;

1. Uninduced pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub> whole cell protein;
2. Induced pBV221-eRF1a(His)<sub>6</sub> whole cell protein;
3. Supernatant after centrifugation;
4. eRF1a(His)<sub>6</sub> fraction after chromatography in Ni-NTA agarose;
5. eRF1a(His)<sub>6</sub> fraction after purified on HiTrap Q column

1 2 3

**Fig. 3** Western blotting analysis of the soluble protein of eRF1a(His)<sub>6</sub>

1. Inclusion body of eRF1a(His)<sub>6</sub>;
2. Soluble crude protein eRF1a(His)<sub>6</sub>;
3. eRF1a(His)<sub>6</sub> after purification

### 3 讨论

本文报道游仆虫 eRF1a 在大肠杆菌中表达、纯化和鉴定的初步研究结果. 在游仆虫一些基因中, 通用终止密码 UGA 不作为终止信号, 而是编码半胱氨酸, UAA 作为主要的终止信号; 而在四膜虫 (*Tetrahymena*) 及草履虫 (*Paramecium*) 等另一些纤毛虫中, UGA 是唯一的终止密码, UAA 和 UAG 编码谷氨酰胺<sup>[6]</sup>. 对纤毛虫这种遗传密码表达特殊性的解释, 起初推测可能生物体内有可携带半胱氨酸并可识别 UGA 密码子的 tRNA 的存在, 并开展了一系列的研

究, 但未得到实验证实<sup>[7]</sup>. 近年来, 随着对肽链释放因子研究的深入, 人们对纤毛虫的肽链释放因子发生了浓厚兴趣, 试图从释放因子的结构来解释纤毛虫中某些终止密码翻译为氨基酸的机理<sup>[8]</sup>.

1999 年, Karamyshev 等<sup>[9]</sup>克隆了四膜虫的 eRF1 基因并在 *E. coli* 中进行了表达. 但表达的 eRF1 在 *E. coli* 中形成包涵体, 无论怎样改变条件, 均无法实现可溶性表达. 为得到可溶性的 eRF1, 进而对其结构进行分析, 本研究采用表达载体 pBV221 进行表达研究, 该载体使用噬菌体的 P<sub>L</sub>、P<sub>R</sub> 启动子, 温度诱导表达, 利用这类载体已有成功高效表达目的蛋白的报道<sup>[10]</sup>. 我们的研究表明, 表达产物存在于裂菌上清液中, 无须变性和复性等繁琐的处理, 实现了 eRF1a 基因的融合和非融合型的可溶性表达. 融合型表达基因在下游引物中引入 6 个组氨酸. 这样, 既不影响目的基因的表达, 又有利于它的亲和纯化, 再选用 HiTrap Q 柱纯化最终得到纯度达 95% 的 eRF1a(His)<sub>6</sub> 融合蛋白. 从而大大缩减了纯化步骤, 降低了损失率, 为进一步研究它的结构和功能奠定了基础.

### 参考文献 (References)

- 1 Nakamura Y, Ito K, Lsaksson L A. Emerging understanding of translation termination. *Cell*, 1996, **87**(2):147 ~ 150
- 2 Buckingham R H, Grentzmann G, Kisselev L. Polypeptide chain release factors, *Mol Microbiol*, 1997, **24**(3):449 ~ 456
- 3 Ito K, Ebihara K, Uno M, Nakamura Y. Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(11):5443 ~ 5448
- 4 张素平, 梁爱华. 第一类肽链释放因子研究进展. 生物化学与生物物理进展 (Zhang Surping, Liang Ai-hua. The advances of the release factor (Class 1) in translation termination). *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(5):619 ~ 622
- 5 Liang A, Brühner-Nieweler C, Muramatsu T, Kuchino Y, Beier H, Heckmann K. The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1, *Gene*, 2001, **262**(1):161 ~ 168
- 6 梁爱华, 王伟, Heckmann K. 赭纤虫 RNA 聚合酶 基因片段的分析. 动物学报 (Liang Ai-hua, Wang Wei, Heckmann K. Analysis of the gene fragment encoding RNA polymerase from *Blepharisma*. *Acta Zool Sin*), 1999, **45**(4):435 ~ 439
- 7 Grimm M, Bruenner-Nieweler C, Junker V, Heckmann K, Beier H. The hypotrichous ciliate *euplotes octocarinatus* has only one type of tRNA<sup>Cys</sup> with GCA anticodon encoded on a single macronuclear DNA molecule. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**:4557 ~ 4565
- 8 Muramatsu T, Heckmann K, Kitanaka C, Kuchino Y. Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodens. *FEBS Lett*, 2001, **488**:105 ~ 109
- 9 Karamyshev A L, Karamysheva Z N, Ito K, Matsufuji S, Nakamura Y.

- Overexpression and purification of recombinant eRF1 protein of rabbit and *Tetrahymena thermophila*. *Biochemistry (Mosc)*, 1999, **64** (12): 1391 ~ 1400
- 10 柴红梅,赵永昌,宋令荣,范长胜,陈永青. 大肠杆菌 *ppsA* 基因的克隆表达. 中国生物化学与分子生物学报 (Chai Hong-mei, Zhao Yong-chang, Song Ling-rong, Fan Chang-sheng, Chen Yong-qing. Cloning and expression of phosphoenolpyruvate synthetase (*ppsA*) gene of *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2000, **16** (4): 559 ~ 561

## 基因分析新技术及其应用学术交流会通知

为了促进分子遗传学和基因分析技术在生命科学各领域的推广和应用,总结经验、交流成果,定于 2002 年 6 月上旬在浙江温州举办“基因分析新技术及其应用学术交流会”。

一. 主办单位:中国遗传学会《遗传》杂志编委会

二. 承办单位:浙江温州医学院检验医学与公共卫生学院

三. 协办单位:温州市生物化学与分子生物学学会

四. 大会主席:《遗传》杂志副主编曾溢滔院士、夏家辉院士

五. 大会秘书长:《遗传》杂志编辑部主管李绍武编审;温州医学院检验医学与公共卫生学院院长、细胞与分子医学研究所所长吕建新教授

六. 交流内容:1. 基因序列分析与基因组研究;2. 新基因的克隆、鉴定、定位与表达;3. 基因诊断与基因治疗;4. DNA 技术的法医学应用;5. 基因突变的检测;6. 基因芯片技术的应用;7. 国内外基因分析新技术、新方法、新进展;8. 生物信息学;9. 基因分析新设备、新仪器及新书刊展销。

七. 收费标准:会期 4 ~ 5 天,每位代表收会务及餐饮费 650 元,研究生 550 元。发放会议论文集和 2002 年全年《遗传》杂志。2002 年 5 月 1 日前交费者会议费 600 元,研究生 500 元,请汇到温州市生物化学与分子生物学学会。

开户银行:工商银行温州市分行营业部

帐号:120320209064008035

八. 征文与报名:会议征文 2 000 ~ 4 000 字,参见《遗传》杂志的格式。内容有:题目、作者姓名、工作单位及邮政编码、正文、参考文献、基金项目、第一作者简介、电话与电子信箱。文内可有少量图、表和照片。请注明“会议征文”字样。征文截止日期:2002 年 4 月 1 日。书面投稿的同时请发来电子邮件(Word 文件),E-mail:swli@genetics.ac.cn。

经审查选用的论文编入《基因分析新技术原理及其应用》一书,由中国科技出版社正式出版,部分论文由《遗传》杂志选用。大会将评选优秀论文,颁发证书和奖金。

有无征文均可报名参加会议。欢迎公司企业参展。国内公司 1 500 元/展位,外商 3 000 元/展位,并列入大会通讯录,发放会议资料。

联系地址:北京市安定门外大屯路 917 大楼 中国科学院遗传研究所编辑室 邮编:100101

联系人:李绍武 电话:010—64889354,传真:010—64889348