

重组 FLAG 标签的筛选、鉴定及与 新型荧光蛋白的融合表达

易 科¹, 高晓莲²

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018;

2. 中南大学湘雅医院中国医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要: 以 FLAG 标签的原始序列 DYKDDDDK (FLAG4) 为模板, 设计 4 种新 FLAG 标签与新型绿色荧光蛋白 (G2)、红色荧光蛋白 (H10) 融合。Western blotting 分析表明, 抗 FLAG 单克隆抗体 M2 (AFM2) 能够特异识别 G2-FLAG4, G2-FLAG5, H10-FLAG3, H10-FLAG4, H10-FLAG5 等 5 种 FP-FLAG 融合蛋白。采用非竞争性 ELISA 固相法, 计算出 FP-FLAG 融合蛋白与单克隆抗 FLAG M2 抗体 (AFM2) 的亲合常数。结果表明, FLAG 原始序列与 AFM2 之间的亲和力最高, FLAG5 和 FLAG3 次之, FLAG1 和 FLAG2 不能与 AFM2 特异识别。在 FLAG 融合蛋白的纯化应用中, 运用这些 FLAG 标签的亲和力差异, 在同一纯化体系下通过设计不同的洗提次序和洗提条件, 可以达到逐步分离不同目的物的效果。

关键词: 多肽与蛋白质生物化学; 重组 FLAG 标签; 新型荧光蛋白; 非竞争性 ELISA; 亲和常数

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1674-2850(2010)10-1983-9

Construction, expression and characterization of fusion proteins consisting of novel fluorescent protein and recombinant FLAG tag

YI Ke¹, GAO Xiaolian²

(1. College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. State Key Laboratory of Medical Genetics of China, Xiangya Medical School,
Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Based on FLAG-tag initial sequence (FLAG4: DYKDDDDK), designed four new FLAG tags and fused with H10 and G2. Western blotting was employed and the result showed that monoclonal antibody ANTI-FLAG M2 (AFM2) interacted specifically with five kinds of FP-FLAG fusion protein (G2-FLAG4, G2-FLAG5, H10-FLAG3, H10-FLAG4, H10-FLAG5). The functional affinity of FP-FLAG fusion protein and monoclonal antibody ANTI-FLAG M2 (AFM2) was determined by non-competitive ELISA. Results show that AFM2 against FLAG-tag initial sequence have the highest affinity, DYKDEDDK, DYKDYKDYK take the second place and DYKGGGYK is incapable of binding the antibody of AFM2. Using different affinity of these FLAG-tags, by designing different elution sequence and elution condition various FLAG fusion proteins can be gradually purified.

Key words: peptide and protein biochemistry; recombination FLAG-tag; novel fluorescent proteins; non-competitive ELISA; affinity constant

0 引言

随着蛋白质组学的飞速发展, 各种亲和标签的使用日益频繁。FLAG 亲和标签是一种由 8 个氨基

基金项目: 浙江省生物医学工程重中之重学科人才基金项目

作者简介: 易科 (1983—), 男, 助理研究员, 主要研究方向: 荧光蛋白与 FLAG 标签. E-mail: yike311@126.com

酸残基 DYKDDDDK 组成的表位标记物, 序列简短、亲水性很强, 并且具有肠激酶的酶切位点, 融合表达后对目标蛋白的结构和生物活性影响小, 可以用一条人工合成的寡聚核苷酸编码的特点使其得到广泛应用^[1~2]。组成 FLAG-tag 的 8 个氨基酸残基并非随意排列, 与 FLAG 的抗原作用息息相关。酸性氨基酸 Asp 是 FLAG 序列的第 1 个氨基酸, 它位于 N 端且带负电荷; 第 2 个氨基酸是芳香族氨基酸 Tyr, 在高极性环境中带电荷酸性氨基酸 Asp 与芳香族氨基酸 Tyr 相互辅助, 使得抗原性大大提高。接下来 6 个氨基酸残基 (KDDDDK) 具有很强的亲水性, 在蛋白表达时能形成高度暴露的三维结构, 使得 FLAG 标签抗原性进一步提高。根据不同的抗原结合要求, 目前已开发出 3 种抗 FLAG 的单克隆抗体: M1, M2 和 M5。M2 单抗与 FLAG 标签的结合不依赖于 Ca^{2+} , 允许 FLAG 序列前面有多余的氨基酸 (如 Met) 存在, 这种抗体的重要优势是可以应用于真核系统中表达具有 N 端 Met-FLAG-结构的重组蛋白; M2 单抗还可以识别并结合 C 端融合 FLAG 标签的重组蛋白^[3~5]。单抗 M5 结合 FLAG 标签也不需要 Ca^{2+} , 但显示出对 N 端 Met-FLAG 融合蛋白具有更高亲和力的特征, 是检测真核细胞细胞质表达的 FLAG 融合蛋白的首选抗体^[6], 而 M2 单抗可以结合到以上提到的所有类型的 N 端及 C 端 FLAG 融合蛋白上, 具有通用性。

自 1962 年首次从多管水母属 (*Aequorea*) 中分离纯化出了绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)^[7], 在 GFP 的初级氨基酸序列上, 第 65 个至第 67 个氨基酸 (Ser-Tyr-Gly) 形成环状六肽三体, 以共价形式与 GFP 蛋白肽键骨架相连^[8~9]。荧光蛋白的发射光谱和性质决定于这部分生色团结构, 生色团是其蛋白质一级序列固有的, 它产生荧光不需要底物和辅助因子^[10], 在紫外或者蓝光激发下, GFP 能保持较长的荧光, 而不出现如荧光素荧光淬灭的现象。另外, GFP 的生色团没有物种特异性, 在翻译后的几小时内可以通过自动催化作用合成, 其自身环化的动力源于荧光蛋白独特的三维结构^[11]。GFP 作为报告基因或分子探针的优点十分突出, 但天然 GFP 耐光性差、表达量低、荧光强度弱、蛋白构像折叠效率低、产生荧光的过程慢, 甚至在某些植物细胞中不能表达的缺点也同样明显。另外, 寡聚化、成熟过程缓慢和对某些细胞有毒性等自身的缺点^[12~13], 也限制了荧光蛋白的广泛应用。鉴于此类情况, 得到对细胞毒性较小、适于不同细胞、发光特性优异、聚集状态不同的突变体的需求变得尤为迫切, 对荧光蛋白进行各种修饰和改进方法的研究也随之深入^[14~15]。

实验用到的绿色荧光蛋白 (G2)、红色荧光蛋白 (H10) 由美国休斯顿大学惠赠。在此基础上, 设计 5 个 FLAG 序列: FLAG1 (DYKDYKYK), FLAG2 (DYKGGGYK), FLAG3 (DYKDYKDYK), FLAG4 (DYKDDDDK), FLAG5 (DYKDEDDK), 通过 PCR 技术将 5 个 FLAG 基因分别与 G2, H10 基因融合, 并构建了原核表达质粒 pET28a-FP-FLAG, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达重组蛋白 G2-FLAG, H10-FLAG 并利用 Ni^{2+} -IDA 亲和层析和 FPLC 分子筛层析的方法进行纯化, 对其进行 Western blotting 分析和结合单抗 M2 亲和常数的测定, 相关工作作为筛选适合多肽芯片实验的 FLAG 标签打下了一定的基础。建立了可用于 FLAG 融合蛋白纯化和检测的方法。这将为后基因组时代大量涌现的新分子结构和功能研究提供了重要的工具, 有很高的实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 由本实验室保存; FP 表达质粒 pET28a-FP 由美国休斯顿大学惠赠; Ni-IDA 亲和层析柱购自 Genscript 公司; Superdex 75 HR 10/30 分子筛柱购自北京韦氏博慧色谱公司; 0.2 μm PVDF 膜购自 PALL 公司; 96 孔酶标板购自 Corning 公司; BioMax-5 超滤管购自 Millipore 公司; 一抗鼠源的抗 FLAG 单克隆抗体 M2 购自 SIGMA 公司, 二抗辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体、TMB 显色液购自 Genscript 公司; DAB 显色液购自南京凯基生物科技有限公司。

1.2 构建原核表达载体 pET28-FP-FLAG

以 FLAG 标签 DYKDDDDK (FLAG4) 为基础设计了 4 个 FLAG 序列 (如表 1 所示), 设计一组引物 (如表 2 所示), 通过 PCR 技术将 5 个 FLAG 基因分别与 G2, H10 基因融合。为构建 C 端融合 FLAG 标签的重组蛋白 pET28a-FP-FLAG, 根据 G2, H10 序列分别设计上下游引物, G2, H10 碱基数分别为 714, 705 bp, 且 G2, H10 序列 N 末端含有 20 bp 相同的碱基序列, 具有相同的互补序列, 故下游引物可以通用。根据 FLAG 标签氨基酸序 (如表 1 所示), 设计引物在 FLAG 标签后加上 3 个保护性甘氨酸 (G)、终止密码子及酶切位点, 下游引物长度达到 65 bp, 其中 FLAG 24 bp, 保护性氨基酸碱基 9 bp, 终止密码子 3 bp, 酶切位点 (带有下划线的序列) 及保护性碱基 9 bp, 与模板互补序列 20 bp (如表 2 所示), 从而构建的重组基因 G2, FLAG, H10-FLAG 的分子量为 750 左右。引物工作浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 由上海生工合成。

表 1 重组 FLAG 标签
Tab. 1 Sequences of tags

标签	基因序列	氨基酸序列
FLAG1	GACTACAAAGACTACAAATACAAA	DYKDDDDK
FLAG2	GACTACAAAGGAGGAGGATACAAA	DYKGGGYK
FLAG3	GACTACAAAGACTACAAAGACTACAAA	DYKDYKDYK
FLAG4	GACTACAAAGACGACGACGACAAA	DYKDDDDK
FLAG5	GACTACAAAGACGAAGACGACAAA	DYKDEDDK

表 2 PCR 使用的引物
Tab. 2 Primers for the PCR

引物名称	序列	酶切位点
F-G2	CGCGGATCCATGAGCAAAGCGAAGAACTGTTCA	<i>Bam</i> H I
F-H10	CGCGGATCCATGAGCAAAGCGAAGAGAACAACA	<i>Bam</i> H I
R-FLAG1	CCCAAGCTTTCATCCTCCTCCTTTGTATTGTAGTC TTTGTAGTCCTTGTACAGTTCATCCATGC	<i>Hind</i> III
R-FLAG2	CCCAAGCTTTCATCCTCCTCCTTTGTAACCACCACC TTTGTAGTCCTTGTACAGTTCATCCATGC	<i>Hind</i> III
R-FLAG3	CCCAAGCTTTCATCCTCCTCCTTTGTAGTCTTTGTAG TCTTTGTAGTCCTTGTACAGTTCATCCATGC	<i>Hind</i> III
R-FLAG4	CCCAAGCTTTCATCCTCCTCCTTTGTGTCGTCGTCGTC TTTGTAGTCCTTGTACAGTTCATCCATGC	<i>Hind</i> III
R-FLAG5	CCCAAGCTTTCATCCTCCTCCTTTGTGTCGTCGTCGTC TTTGTAGTCCTTGTACAGTTCATCCATGC	<i>Hind</i> III

注: F-G2, F-H10 代表 G2, H10 的上游引物; R-FLAG 代表 5 个 FLAG 标签的下游引物; 下划线部分为酶切位点; 黑体部分为 FLAG 序列

以 FP 表达质粒 pET28a-FP 为模板, 使用表 2 的引物进行 PCR 扩增, 反应体系: 去离子水 40.5 μL , 10 $\times$ Buffer 5 μL , 10 mmol/L dNTP 1.2 μL , 上游引物 1 μL , 下游引物 1 μL , Vent DNA polymerase 0.3 μL , 模板 1 μL , 反应的总体积 50 μL 。热循环条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。以 PCR 清洁试剂盒回收 PCR 产物。通过 PCR 反应将 FLAG 标签融合到 FP 序列的 3'端, *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切 PCR 扩增产物和空载体后, T4 DNA 连接酶连接, 构建表达质粒 pET28a-FP-FLAG (如图 1 所示)。转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂板, 挑选阳性克隆, 经 PCR 和双酶切验证后, 由上海 Invitrogen 公司进行 DNA 测序。

1.3 FP-FLAG 蛋白的表达纯化

将 DNA 测序鉴定正确的重组质粒 pET28a-FP-FLAG 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。以

1%接种量将过夜活化的菌液转接含 30 mg/L 卡那霉素的 100 mL 液体 LB 培养基, 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.5~0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 37℃ 诱导表达 12 h, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 10 mL PBS 悬浮, 加入 PMSF 和 EDTA 至终浓度 1 mmol/L, 冰浴超声破碎, 12 000 r/min 离心 20 min 收集上清, 0.45 μm 滤膜过滤后上样 Ni²⁺-IDA 亲和层析柱 (流速: 1 mL/min), 重复过柱 3 次, 用 1×PBS 缓冲液 (20 mmol/L 咪唑) 洗涤 15 个柱床体积的杂蛋白后, 用 1×PBS 缓冲液 (200 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白, 流速为 1 mL/min. 为进一步提高蛋白纯度, 用 FPLC 对亲和层析收集的蛋白样品进行分子筛层析 (流速: 0.5 mL/min, 监测: UV 280 nm, 洗脱液: PBS), 收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测纯化结果。

1.4 Western blotting 免疫印迹

以纯化的 5 种 FP-FLAG 融合蛋白作抗原, 以 G2, H10 荧光蛋白为阴性对照, 蛋白制样后用 12% SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后, 通过半干电转移法将蛋白转移至 0.22 μm 的 PVDF 膜上, 用封闭液 (10 mL PBST 中加入 0.3 g BSA, pH 值为 7.4) 室温封闭 1 h, 与单抗 M2 (1:1 000 稀释) 37℃ 孵育 1.5 h, PBST 洗涤后, 与 HRP 标记的羊抗鼠多克隆抗体 (1:1 000 稀释) 室温孵育 1 h, 洗涤后加入 DAB 显色液暗处反应 5~10 min, 至有明显的显色条带时拍照并分析。

1.5 非竞争性 ELISA 测定单抗 M2 与 FLAG 标签相互作用的亲和常数

1.5.1 确定 FLAG 融合蛋白最佳包板浓度

将 Western blotting 筛选出的 FLAG 融合蛋白用包被液梯度稀释至 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5 mg/L, 每孔 100 μL 依次加入到酶标板中, 设置内对照 (每浓度 2 个孔)、封闭液和 PBS 的阴性对照, 4℃ 包被过夜; PBST 洗板 3 次, 每孔加入 300 μL 封闭液, 4℃ 封闭过夜; PBST 洗板 3 次, 向每孔加入 100 μL 浓度为 1 mg/L 的一抗, 4℃ 孵育 12 h; PBST 洗板 3 次, 每孔加入 1:15 000 稀释的二抗 100 μL, 37℃ 孵育 1.5 h; PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μL TMB 显色液避光显色 15 min; 每孔滴 200 μL 2 mol/L 硫酸中止反应; 读 OD₄₅₀ 值并做出曲线。

1.5.2 确定 FLAG 融合蛋白最佳包板时间

将 FLAG 融合蛋白以 PBS 稀释至 5 mg/L 加入酶标板中, 每孔加入 100 μL, 同时设置封闭液、PBS 阴性对照; 4℃ 包被时间分别为 3, 6, 12, 16, 24, 48 h; 封闭、加入一抗、二抗、显色及读数的过程同上。

1.5.3 确定最佳抗原抗体反应时间

将 FLAG 融合蛋白以 PBS 稀释至 5 mg/L 加入酶标板中, 每孔加入 100 μL, 同时设置封闭液、PBS 阴性对照; 洗板及封闭后将一抗稀释至 5 μmol/L, 每孔加入 100 μL, 4℃ 孵育, 时间分别为 2, 8, 16, 24, 48, 72 h; 其后的显色及读数过程同上。

1.5.4 测定重组 FLAG 标签与 M2 单抗相互作用的亲和常数

FLAG 融合蛋白用包被液倍比稀释至 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/L, 每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板, 同时设置 PBS 和封闭液的阴性对照, 4℃ 包被 24 h; PBST (10 mL PBS 加入 0.1 mL Tween-20, pH 值为 7.4) 洗板后每孔加入 300 μL 封闭液室温孵育 12 h; 洗板; 用 PBS 将单抗 M2 的浓度调整至 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/L 加至不同包被量的抗原孔中 (每孔 100 μL, 每浓度 2 个复

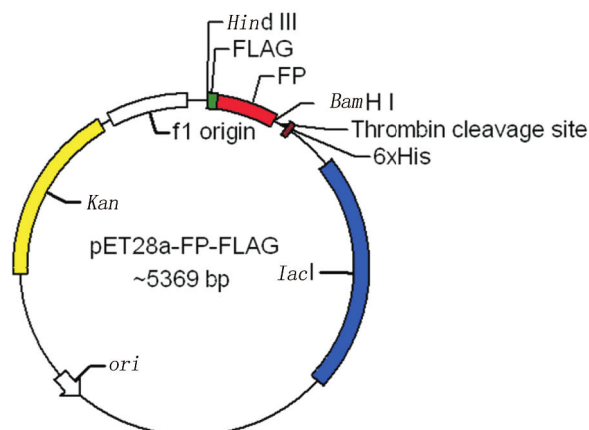


图1 质粒 pET28a-FP-FLAG 构建示意图
Fig. 1 Schematic illustration of construction of plasmid pET28a-FP-FLAG

孔), 4℃ 孵育 16 h; 其后显色及读数过程同上。

2 结果与分析

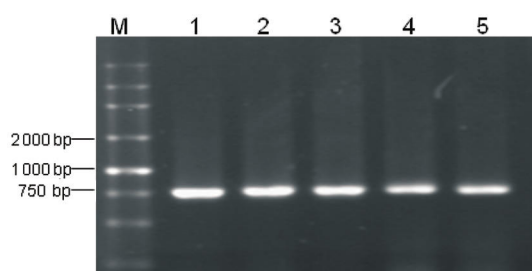
2.1 构建原核表达载体 pET28-**FP-FLAG**

荧光蛋白 G2, H10 基因碱基数分别为 714, 705 bp, 设计引物在 FLAG 标签后加上 3 个保护性甘氨酸 (G)、终止密码子及酶切位点, 下游引物长度达到 65 bp, 其中 FLAG 24 bp, 3 个保护性甘氨酸 (G) 碱基 9 bp, 终止密码子 3 bp, 酶切位点及保护性碱基 9 bp, 从而构建的重组基因 G2-FLAG, H10-FLAG 的分子量为 750 左右。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后在 750 bp 附近显示出一条特异性条带, 大小与 FP-FLAG 理论值相符 (如图 2 所示)。对重组质粒进行 DNA 测序, 结果表明重组质粒 pET28a-**FP-FLAG** 中插入的 FP-FLAG 基因与预期一致, 证明重组原核表达质粒 pET28a-**FP-FLAG** 构建成功。

2.2 **FP-FLAG** 蛋白的原核表达纯化

2.2.1 重组蛋白 Ni^{2+} -IDA 亲和层析结果

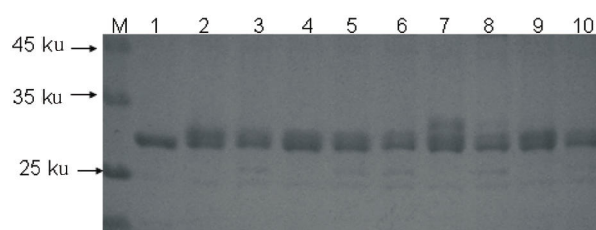
经 IPTG 诱导后, **FP-FLAG** 蛋白在大肠杆菌中得以表达。离心收集菌体超声波破碎后, 经溶菌酶处理和超声破碎的菌液, 4℃, 12 000 g 离心收集的上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后, 上样 Ni^{2+} -IDA 亲和层析柱, 收集的样品经 12% SDS-PAGE 电泳检测, 有浓集的目的蛋白表达条带 (如图 3 所示)。



注: M 为 DNA ladder; 1, 2, 3, 4, 5 分别为 **FP-FLAG**1, **FP-FLAG**2, **FP-FLAG**3, **FP-FLAG**4, **FP-FLAG**5 的 PCR 扩增产物

图 2 **FP-FLAG** 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Result of PCR products of **FP-FLAG** gene



注: 泳道 M 为低分子量蛋白 marker; 泳道 1~5 分别为洗脱下来的 **G2-FLAG**1~**G2-FLAG**5 重组蛋白; 泳道 6~10 分别为洗脱下来的 **H10-FLAG**1~**H10-FLAG**5 重组蛋白

图 3 SDS-PAGE 分析 **FP-FLAG** 蛋白的亲和层析结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of protein **FP-FLAG**

2.2.2 重组蛋白的分子筛层析结果

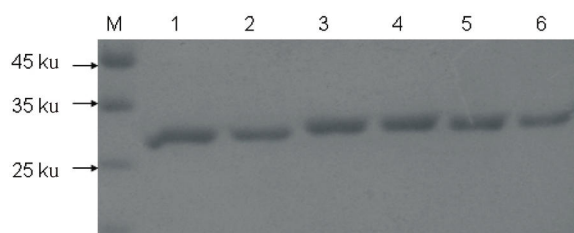
Ni^{2+} -IDA 亲和层析已去掉大部分杂蛋白, 但电泳检测仍有细微杂带 (如图 3 所示), 为除去杂蛋白使目标蛋白纯度进一步提高, 用 FPLC 分子筛层析对亲和层析收集的蛋白进一步纯化, 将收集的蛋白样品用 12% SDS-PAGE 电泳检测纯度, 得到一条单一的目的蛋白条带, 凝胶扫描分析表明, 已经得到纯度较高 (高于 90%) 的 **FP-FLAG** 蛋白 (如图 4 和图 5 所示)。

2.3 Western blotting 检测单抗 M2 的特异性

Western blotting 检测单抗 M2 识别抗原的特异性, **G2-FLAG** 系列中 **G2-FLAG**4, **G2-FLAG**5 融合蛋白的位置都有明显条带, 而阴性对照 **G2** 蛋白的位置没有显色 (如图 6 所示), 这表明单抗 M2 能够特异性识别这 2 种 FLAG 标签。**H10-FLAG** 系列中 **H10-FLAG**3, **H10-FLAG**4, **H10-FLAG**5 融合蛋白的位置都有明显条带, 而阴性对照 **H10** 蛋白的位置没有显色 (如图 7 所示), 这表明单抗 M2 能够特异性识别这 3 种 FLAG 标签。

2.4 非竞争性 ELISA 测定 AFM2 与 FLAG 标签相互作用的亲和常数

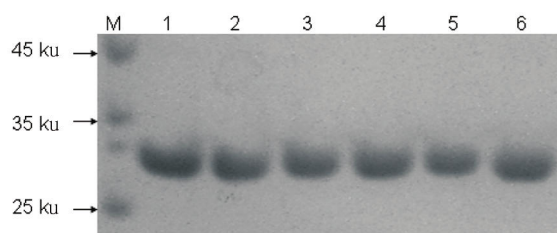
当 Western blotting 筛选出的 **FP-FLAG** 融合蛋白以 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5 mg/L 6 个倍比稀释浓度 **FP-FLAG** 蛋白包板时, 其 OD_{450} 值均落在 0.15~2.50 之间, 证明在此范围内 OD 值



注：泳道 M 为低分子量蛋白 marker；泳道 1 为 G2 蛋白；泳道 2~6 分别为洗脱下来的 G2-FLAG1~G2-FLAG5 重组蛋白

图 4 SDS-PAGE 分析 G2-FLAG 蛋白的分子筛层析结果

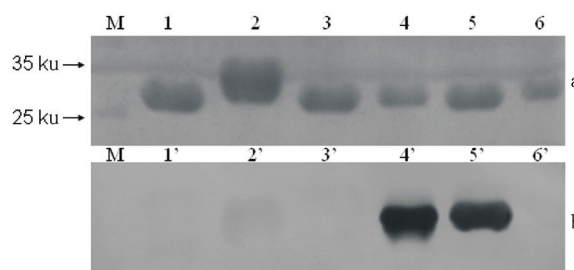
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of protein G2-FLAG after purification using FPLC



注：泳道 M 为低分子量蛋白 marker；泳道 1 为 H10 蛋白；泳道 2~6 分别为洗脱下来的 H10-FLAG1~H10-FLAG5 重组蛋白

图 5 SDS-PAGE 分析 H10-FLAG 蛋白的分子筛层析结果

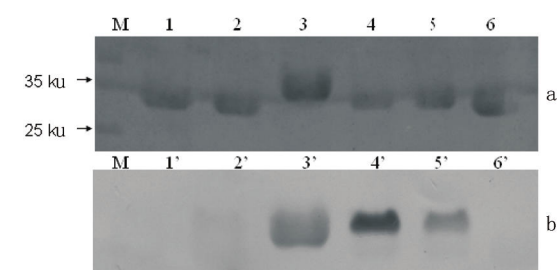
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of protein H10-FLAG after purification using FPLC



注：a—SDS-PAGE 分离胶；b—Western blotting 免疫印迹；泳道 M 为预染蛋白 marker；1, 1' 为 G2-FLAG1 融合蛋白；2, 2' 为 G2-FLAG2 融合蛋白；3, 3' 为 G2-FLAG3 融合蛋白；4, 4' 为 G2-FLAG4 融合蛋白；5, 5' 为 G2-FLAG5 融合蛋白；6, 6' 为 G2 蛋白

图 6 5 种 G2-FLAG 融合蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 6 Western blotting analysis for the five G2-FLAG fusion proteins



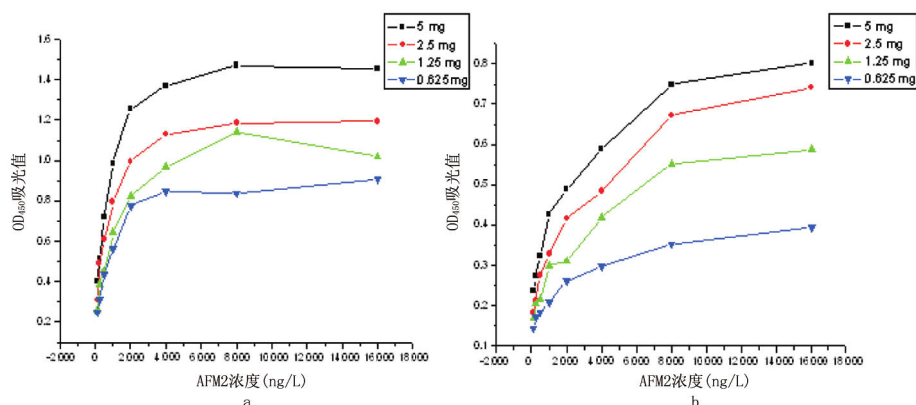
注：a—SDS-PAGE 分离胶；b—Western blotting 免疫印迹；泳道 M 为预染蛋白 marker；1, 1' 为 H10-FLAG1 融合蛋白；2, 2' 为 H10-FLAG2 融合蛋白；3, 3' 为 H10-FLAG3 融合蛋白；4, 4' 为 H10-FLAG4 融合蛋白；5, 5' 为 H10-FLAG5 融合蛋白；6, 6' 为 H10 蛋白

图 7 5 种 H10-FLAG 融合蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 7 Western blotting analysis for the five H10-FLAG fusion proteins

与包板的 FP-FLAG 蛋白浓度线性关系良好。取中间 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/L 4 个浓度测定抗原抗体反应曲线。以 5 mg FP-FLAG 为代表与 10 mg/L AFM2 反应确定最佳抗原包板时间。结果表明，最佳包板时间为包板 24 h，时间过短或过长包板效率均有所下降。以 5 mg FP-FLAG 包板，10 mg/L AFM2 为代表测定了最佳抗体结合时间。结果提示：二者共同 4℃ 孵育 16 h 后 OD₄₅₀ 值达到最大，其后随时间增加 OD₄₅₀ 值反有所下降。测定 4 个倍比 FP-FLAG 蛋白浓度包板条件下 AFM2 与 FP-FLAG 的结合反应曲线（如图 8、图 9 所示），参照 BEATTY 等^[16]所建立的方法，以 5% 递减法确定出 4 条曲线右侧的结合反应平台期分别代表以 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/L 浓度包板，四者浓度之比为 1:2:4:8，通过作图法取其最大 OD 值一半（即 OD 50%）处对应的抗体浓度。代入公式 $K = (n-1)/2(nAb' - Ab)$ 计算亲和常数，其中，Ab' 和 Ab 分别为当抗原浓度为 Ag' 和 Ag 时，产生半数吸光值的抗体浓度 (mol/L)， $n = Ag/Ag'$ 。然后两两比较，当 $n=2$ 时，可得 3 个 K 值； $n=4$ 时，可得 2 个 K 值； $n=8$ 时，可得 1 个 K 值，求出 6 个 K 值的均数作为最终结果。

对 G2-FLAG4, G2-FLAG5, H10-FLAG3, H10-FLAG4, H10-FLAG5 亲和力测定曲线（如图 8、图 9 所示）进行模拟后求解到的 K 值，AFM2 与 G2-FLAG4, G2-FLAG5 的亲和常数分别为 $1.67E+11$, $4.65E+10$, AFM2 与 H10-FLAG3, H10-FLAG4, H10-FLAG5 的亲和常数分别为 $6.49E+10$, $1.47E+11$, $6.63E+10$ 。



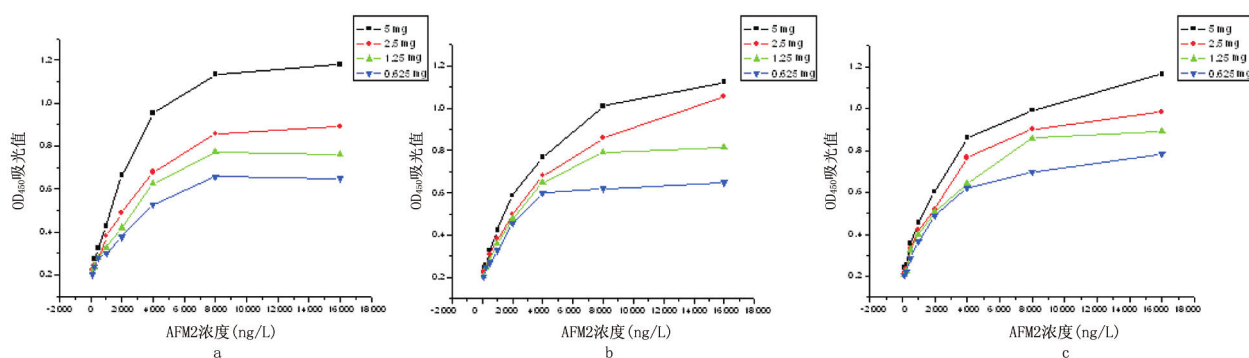
注：从大到小依次为 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/L

图 8 AFM2 与 G2-FLAG 融合蛋白的结合反应曲线

Fig. 8 Interaction curves between AFM2 and G2-FLAG fusion proteins

a—G2-F4 与 AFM2 结合曲线；b—G2-F5 与 AFM2 结合曲线

a-Interaction curve of G2-F4 and AFM2; b-Interaction curve of G2-F5 and AFM2



注：AFM2 浓度从大到小依次为 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/L

图 9 AFM2 与 H10-FLAG 融合蛋白的结合反应曲线

Fig. 9 Interactions between curves AFM2 and H10-FLAG fusion proteins

a—H10-F3 与 AFM2 结合曲线；b—H10-F4 与 AFM2 结合曲线；c—H10-F5 与 AFM2 结合曲线

a-Interaction curve of H10-F3 and AFM2; b-Interaction curve of H10-F4 and AFM2

c-Interaction curve of H10-F5 and AFM2

3 讨论与结论

随着基因组学和蛋白质组学的发展，融合蛋白的纯化已成为蛋白质组学的重要任务，后期蛋白纯化已占有总成本的 70% 以上，因此建立快速、高效、方便、低廉的纯化方法已成为其发展的瓶颈问题。以含标签的融合蛋白的形式表达目的蛋白具有多种优势，使之成为后基因组时代的重要研究工具。

FLAG 标签是一类由亲水性的 8 个氨基酸残基 DYKDDDDK 组成的多肽标签，亲水性很强，片段小，并且具有肠激酶的酶切位点，它可以融合于目的蛋白的 N 端或 C 端，广泛应用于对重组蛋白的纯化和检测，且一般不会影响目标蛋白的活性。其抗原性与其 8 个氨基酸残基的组成及排序密切相关。实验对 FLAG 标签的氨基酸序列进行替换，重组合成 4 种新型 FLAG 标签，构建荧光蛋白与重组 FLAG 标签的融合蛋白表达质粒，在大肠杆菌中表达融合蛋白并纯化，Western blotting 检测筛选 FP-FLAG 融合蛋白与单克隆抗体 M2 的特异性，采用非竞争 ELISA 法对 FLAG 标签与单克隆抗体 M2 相互作用的亲和常数进行测定，获得几种重组 FLAG 标签的亲和常数。结果显示，G2-FLAG 系列中 G2-FLAG4, G2-FLAG5 融合蛋白的 DAB 显色条带清晰且单一，而阴性对照 G2 蛋白的位置没有显色，

H10-FLAG 系列中 H10-FLAG3, H10-FLAG4, H10-FLAG5 融合蛋白的位置都有明显条带, 阴性对照 H10 蛋白的位置没有显色。这表明这些融合蛋白的 FLAG 标签暴露在融合蛋白外面, 具有正确的三维结构和完整的生物学活性, 能够被抗 FLAG 单克隆抗体 M2 特异性识别。重组 FLAG 标签 FLAG3 (DYKDYKDYK), FLAG5 (DYKDEDDK) 末端的亲水序列 KDYKDYK, KDEDDK 形成暴露的三维结构, 具有较强的抗原性, 而 FLAG1 (DYKDYKYK), FLAG2 (DYKGGGYK) 末端的亲水序列 KDYKYK, KGGGYK 在蛋白表达过程中藏于融合蛋白内部, 或该段亲水序列中氨基酸的替换使其失去 FLAG 标签的抗原性。亲和常数的差异, 反映了 FLAG 下游序列对 FLAG 抗原表位形成的影响, DDDDK 序列具有最大的亲水性, 且形成高度暴露的三维结构, 展示出很强的抗原性, 使 DYKDDDDK 短肽以最短的形式高效地表达了亲和标签的作用。

参照 BEATTY 等^[16]所建立的方法, 通过作图法取其最大 OD 值一半 (即 OD 50%) 处对应的抗体浓度。代入公式 $K = (n-1)/2(nAb' - Ab)$ 计算亲和常数, 计算后求解到的 K 值, AFM2 与 G2-FLAG4, G2-FLAG5 的亲和常数分别为 $1.67E+11$, $4.65E+10$; AFM2 与 H10-FLAG3, H10-FLAG4, H10-FLAG5 的亲和常数分别为 $6.49E+10$, $1.47E+11$, $6.63E+10$ 。FLAG 标签原始序列 FLAG4 (DYKDDDDK) 及重组标签 FLAG5 (DYKDEDDK), FLAG3 (DYKDYKDYK) 与抗 FLAG 单克隆抗体 M2 (AFM2) 的亲和常数在 $10^{10} \sim 10^{11}$ 水平, 所以可以用于免疫学纯化或者免疫学测定。且其亲和常数存在一个数量级大小的差距, 在 FLAG 融合蛋白的纯化应用中, 运用这些 FLAG 标签的亲和力差异, 在同一纯化体系下通过设计不同的洗提次序和洗提条件, 可以达到逐步分离不同目的物的效果。新型荧光蛋白 G2 和 H10 作为性质优良的标记物, 与重组 FLAG 标签融合形成双功能融合蛋白, 相关工作作为筛选适合多肽芯片实验的 FLAG 标签打下了一定的基础, 为后基因组时代出现的新分子的结构和功能研究提供重要的工具, 具有很高的实用价值。荧光蛋白与 FLAG 标签的双功能融合蛋白不仅可用于 FLAG 融合蛋白纯化和检测, 也为今后 FLAG 融合蛋白的纯化与检测提供了新的思路和理论基础。

[参考文献] (References)

- [1] CHIANG C M, ROEDER R G. Expression and purification of general transcription factors by FLAG epitope-tagging and peptide elution[J]. *Pept. Res.*, 1993, 6(2): 62-64.
- [2] KNAPPIK A, PLÜCKTHUN A. An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments[J]. *Biotechniques*, 1994, 17(4): 754-761.
- [3] LARSON D M, SEUL K H, BERTHOUD V M, et al. Functional expression and biochemical characterization of an epitope-tagged connexin37[J]. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 2000, 3(2): 115-121.
- [4] EINHAUER A, JUNGBAUER A. Affinity of the monoclonal antibody M1 directed against the FLAG peptide[J]. *J. Chromatogr. A*, 2001, 921(1): 25-30.
- [5] PARK S H, CHEONG C, IDOYAGA J, et al. Generation and application of new rat monoclonal antibodies against synthetic FLAG and OLLAS tags for improved immunodetection[J]. *J. Immunol. Methods*, 2008, 331(1-2): 27-38.
- [6] SLOOTSTRA J W, KUPERUS D, PLÜCKTHUN A, et al. Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5[J]. *Mol. Divers.*, 1997, 2(3): 156-164.
- [7] CODY C W, PRASHER D C, WESTLER W M, et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(5): 1212-1218.
- [8] BRAND A. GFP in drosophila[J]. *Trends Genet.* 1995, 11(8): 324-325.
- [9] 段青, 王倩, 祁庆生. 绿色荧光蛋白在蛋白质研究中的应用[J]. *生命的化学*, 2007, 27 (1): 48-51.
DUAN Q, WANG Q, QI Q S. Application of green fluorescent protein in protein study[J]. *Chemistry of Life*, 2007, 27(1): 48-51. (in Chinese)

- [10] BREJC K, SIXMA T K, KITTS P A, et al. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(6): 2306-2311.
- [11] CUBITT A B, HEIM R, ADAMS S R, et al. Understanding, improving and using green fluorescent proteins[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1995, 20(11): 448-455.
- [12] VALDIVIA R H, HROMOCKYJ A E, MONACK D, et al. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions[J]. Gene, 1996, 173(1): 47-52.
- [13] LIU H S, JAN M S, CHOU C K, et al. Is green fluorescent protein toxic to the living cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 260(3): 712-717.
- [14] WYTE C D, ADAMS S L, CABEL J A, et al. Prospective evaluation of emergency medicine instruction for rotating first-postgraduate-year residents[J]. Acad. Emerg. Med, 1996, 3(1): 72-76.
- [15] ERRAMPALLI D, LEUNG K, CASSIDY M B, et al. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 35(3): 187-199.
- [16] BEATTY J D, BEATTY B G, VLAHOS W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 100(1-2): 173-179.