



炭疽水肿因子在大肠杆菌中高效表达及一步法纯化

李婵娟^{2,3}, 张向楠³, 张绍伟³, 吴高兵^{1*}

¹ 农业微生物学国家重点实验室, 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070

² 武汉设计工程学院, 湖北 武汉 430205

³ 华中农业大学生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070

摘要: 【目的】本研究旨在建立一种简单快捷的炭疽水肿因子(EF)重组表达及纯化方法。【方法】构建GST-EF融合表达载体, 基于EF基因的密码子使用偏好, 选择菌株*Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL为表达宿主, 对EF进行诱导表达; 细胞透性技术分离粗蛋白, 进而利用亲和层析一步法纯化EF; Native-PAGE、竞争性抑制实验及cAMP浓度分析用于鉴定EF的生物活性。【结果】实现了EF可溶性高效表达, 透性化处理可有效抽提可溶性重组蛋白; 利用亲和层析一步法纯化得到了纯度达96%的EF; EF可与保护性抗原(PA)结合形成水肿毒素, 该毒素能够急剧提高CHO-K1细胞中cAMP的浓度。【结论】本研究建立了一种高效快速制备具有生物活性的炭疽水肿因子的方法, 为炭疽相关研究工作提供了新的选择。

关键词: 炭疽, 水肿因子, 重组表达, 亲和层析

炭疽是一种由炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)引起的人畜共患传染病。*B. anthracis*主要的致病因子为其分泌的AB型二元毒素, 包括起催化功能的A成份—致死因子(lethal factor, LF)及水肿因子(edema factor, EF), 负责结合细胞受体并转运A成份的B成份—保护性抗原(protective antigen, PA)^[1]。PA与特定细胞结合并激活后, 以形成多聚体的形式将LF或EF运送至细胞内^[2]。LF是由776个氨基酸残基组成的Zn²⁺离子依赖的金

属蛋白酶, 它能够特异性切割有丝分裂蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase kinases, MAPKKs)的N端, 诱发一系列细胞反应, 使细胞裂解并且释放肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素1 β (IL- β)等休克介质, 导致细胞凋亡裂解^[3]。致死因子或水肿因子必须与保护性抗原结合形成致死毒素(LF+PA, LeTx)或水肿毒素(EF+PA, EdTx)才具有细胞毒性^[4]。EF与PA混合后注射动物能使动物皮肤发生水肿, 因此被命名为水肿因子。

基金项目: 国家自然科学基金(31200580)

*通信作者。E-mail: wgb@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2015-10-10; 修回日期: 2015-12-12; 网络出版日期: 2015-12-30

1982年, Leppla等证实了EF是一种依赖钙调蛋白激活的腺苷酸环化酶^[5-6]。EF在PA的介导下进入细胞质,催化胞内ATP转化成环腺苷酸(cAMP),扰乱细胞的信号转导途径,诱发细胞水肿膨大^[6]。成熟的EF由767个氨基酸组成,分子量为89 kDa。主要包括1-290位的氨基酸组成的N端功能域(EFn)和291-800位氨基酸组成的C端结构域(EF58, 58 kDa)。EFn主要负责结合PA,它与LF的N端结构域(LFn)具有相似的功能,二者结合PA上共同的位点^[7-8]; EF58是腺苷酸环化酶的催化功能域^[6]。

高效制备有生物活性的炭疽外毒素是深入系统研究炭疽致病机理、设计毒素抑制剂及开发新型诊断试剂的前提^[9]。利用异源重组表达技术很好地避免了从*B. anthracis*分离毒素蛋白带来的风险。还原性谷胱甘肽转移酶(GST)作为重组蛋白表达的标签,不仅可以提高目标蛋白的可溶性,亦有利于重组蛋白的亲纯性^[10]。本研究针对EF编码基因AT含量高及密码子使用偏好性特点,选用tRNA 密码子优化的*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL作为宿主菌,借助GST标签可溶性地表达了EF基因,通过亲和层析,一步法纯化了具有生物活性的EF蛋白,为深入研究炭疽水肿因子提供了新的选择。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

质粒pGEX-6p-1和菌株*E. coli* DH5 α 为本实验室保存,用于表达质粒的构建。*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL购自Stratagene公司。pCR2.1-TOPO-EF携带EF编码基因,用于EF基因克隆,由美国Stephen H Leppla教授馈赠。雄性BALB/c小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)与中国仓鼠卵巢细胞K1 (CHO-K1)均为本实验室保藏。

1.2 试剂及细胞培养基

DNA操作所用的限制性内切酶与T4连接酶购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司; *FASTpfu*

DNA polymerase购自北京全式金公司; AxyPrep Plasmid Miniprep Kit和AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒购自爱思进(杭州)技术有限公司。谷胱甘肽亲和树脂Glutathione Agarose Resin购自Thermo Fisher Scientific公司; PreScission protease购自GE Healthcare公司; 细胞活性染料amarBlueTM购自英国AbD Serotec公司,用于细胞毒性分析; DMEM (高糖)细胞培养基购自GIBCO公司; DMEM/F12 (1:1)培养基为HyClone公司产品; cAMP Parameter Assay Kit 购自美国R&D System公司,用于EF活性分析。

1.3 主要设备

多功能酶标仪(Synergy H4)为美国BioTek公司产品; 超速冷冻离心机为美国Beckman公司产品; 微型台式离心机为德国 Eppendorf产品; PCR仪为美国ABI公司产品。超声波细胞破碎仪为宁波新芝公司产品。

1.4 EF表达载体构建

利用高保真的DNA聚合酶*FASTpfu*,以pCR2.1-TOPO-EF为模板,扩增EF编码基因。正向引物为F-cya: CGGGATCCATGAATGAACA TTA CACTGAGAG (下划线为*Bam*H I切割位点); 反向引物为R-cya: CAGCTCGAGTTATTT TTCATCAATAATTTTTTGG (下划线为*Xho* I切割位点)。PCR反应体系如下: 5 \times PCR缓冲液5 μ L, 引物(浓度为10 mmol/L)各1 μ L, 模板1 μ L, *FASTpfu* polymerase (2.5 U/ μ L) 1 μ L, 模板1 μ L, 加水至终体积为50 μ L。扩增反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 54 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 6 min。PCR扩增产物用0.7%的琼脂糖凝胶检测,并用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒纯化目标DNA片段。用*Bam*H I和*Xho* I分别酶切载体pGEX-6p-1及EF片段,然后用DNA连接酶将EF片段与载体连接并转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆进行测序验证,构建正确的载体命名为pGEX-EF,其图谱如图1-A所示。

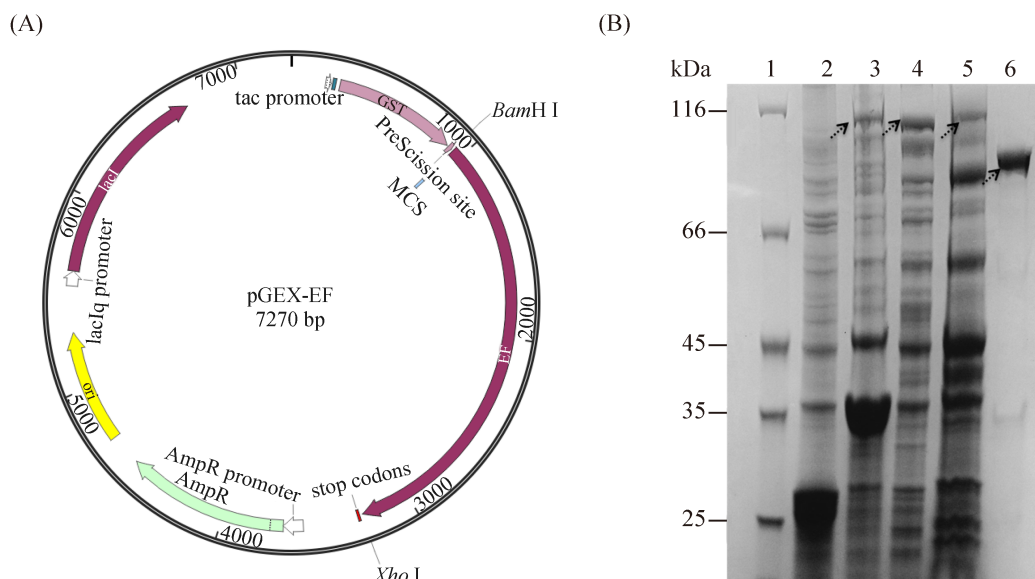


图 1. 表达载体构建(A)与蛋白表达及纯化SDS-PAGE分析(B)

Figure 1. Construction of expression vector (A) and SDS-PAGE analysis of EF expression and purification (B).

1.5 EF表达与纯化

将构建好的pGEX-EF转化至BL21-CodonPlus (DE3)-RIL中, 挑取单克隆接种于含100 mg/mL 氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37 °C、200 r/min培养过夜。次日, 按1%的接种量转入1 L的培养基中, 同样条件下培养至 OD_{600} 约为0.6时, 加入终浓度为0.1 mmol/L的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -d-thiogalactoside, IPTG), 28 °C诱导培养6 h。离心收集菌体, 并用PBS缓冲液(NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, KH_2PO_4 2 mmol/L, pH 7.4)重悬菌体1次。再次离心收集菌体后, 加入50 mL的透性化溶液 [PBS含有0.5 mg/mL硫酸多粘菌素B, 0.05%的曲拉通 (Triton X-100)及5 mmol/L四乙酸二氨基乙烷 (EDTA)], 重悬后置于4 °C轻柔振荡20 min, 再次离心分离上清。取2 mL Glutathione Agarose Resin置于层析柱内, 用50 mL PBS平衡柱床后, 将上清低速流过亲和树脂, 使GST-EF与树脂充分结合。然后用200 mL PBS洗脱杂蛋白。加入1 mL含有200 U PreScission protease的PBS缓冲溶液, 4 °C过夜切除GST标签, 最后加入1 mL PBS洗脱收集

EF。利用12%的SDS-PAGE及myImageAnalysis (Thermo Scientific公司产品)进行纯度分析。本研究所用LF和PA由本实验室前期制备^[11-13]。

1.6 EF与PA结合分析

EF与PA形成复合体的能力通过梯度的Native-PAGE (4%–20%)来检测^[14]。方法简述如下: 0.5 U的furin蛋白酶(购自美国NEB公司)与4 μ g的PA混合后25 °C温育10 min, 然后加入等量的EF, 继续温育30 min后, 取混合样品进行Native-PAGE (购自南京金斯瑞生物科技有限公司)分析, 具体操作产品说明书。

1.7 cAMP分析

将CHO-K1细胞接种到96孔细胞培养板中培养16 h后, 吸弃培养液, 每孔再加入100 μ L含梯度浓度的EdTx (固定PA的1 μ g/mL, EF的浓度梯度分别为0、0.01、0.10、1.00、10.00、100.00、1000.00 ng/mL EF混合)新鲜DMEM/F12 (1:1)培养液, 继续培养2 h后, 用cAMP Parameter Assay Kit分析胞内的cAMP浓度。

1.8 EF与LF竞争抑制分析

将不同终浓度的EF (分别为0、0.5、1.0、

2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与一定浓度的LdTx (PA和LF浓度分别为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合, 加入到预先接种了RAW 264.7细胞的96孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 h后, 加入1/10体积的alamarBlue继续培养4 h, 检测细胞相对活力^[12-13]。为了分析LF对EF的抑制作用, 本研究将不同浓度的LF (分别为1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与固定浓度EdTx (PA和EF分别为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合, 加入到预先接种了CHO-K1细胞的96孔培养板, 继续培养2 h后, 利用cAMP Parameter Assay Kit分析细胞内的cAMP浓度, 具体操作参见产品说明书。

2 结果和分析

2.1 EF融合表达与一步法纯化

本研究将GST 标签置于EF的N端, 构建了GST-EF的融合表达载体(图1-A)。利用tRNA 密码子优化*E. coli*菌株BL21-CodonPlus (DE3)-RIL作为表达宿主, 在28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 添加0.1 mmol/L的IPTG, 进行诱导表达。诱导6 h后, 以空载的pGEX-6p-1为对照(lane 1), 取少量诱导后的细胞进行超声波破碎, 利用SDS-PAGE 检测上清(lane 2)和沉淀(lane 3)。结果表明, GST-EF表达较好, 且主要分布于上清中(图1-B, lane 4)。进而利用细胞透性化试剂硫酸多粘菌素B, TritonX-100及EDTA对诱导后的细胞进行处理, 以初步提取目标蛋白。如图1-B所示, 透性化处理后的上清含有大量GST-EF (lane 5), 表明该方法对可溶性蛋白的抽提效率与超声波破碎法相当。因此, 本研究利用透性化处理法替代传统超声和机械破碎, 抽提细胞的可溶性蛋白, 进而采用GST亲和层析纯化EF。GST-EF特异性地结合到亲和树脂上, 利用PreScission 蛋白酶原位切割移除GST, 即可收获无标签的EF。经SDS-PAGE法测得其分子量大小为89 kDa, 与理论分子量一致。利用myImageAnalysis 软件分析EF的纯度为96% (lane 6)。经Bradford

法测定EF浓度为0.6 mg/mL, 计算纯化得率约为2.4 mg。

2.2 EF生物活性鉴定

PA经furin类蛋白酶激活后形成多聚体, EF或LF通过其N端的功能域结合该多聚体, 形成毒素复合体。复合体具有较大的分子量, 在梯度Native-PAGE (nondenaturing polyacryl-amide gel) 上电泳时, 显示出极低的迁移率。因此, Native-PAGE 分析是检测EF与PA结合的常用手段^[14-15]。本研究利用梯度浓度的Native-PAGE (4%–20%)检测了EF与PA的结合能力, 如图2所示, EF与PA混合能够形成一个迁移率很低、分子量极大的电泳条带, 而单独的EF无此条带, 表明本研究纯化的EF能够与PA结合形成水肿毒素复合体。

EF与PA形成的水肿毒素(EdTx)作用于CHO-K1细胞, 能提高细胞内cAMP的浓度, 因此本研

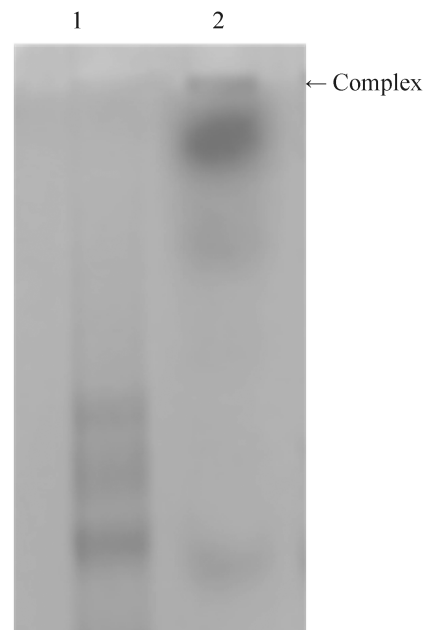


图 2. 利用4%–20%梯度非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE)分析EF与PA形成复合体能力

Figure 2. EdTx complex formed by incubating EF with furin-nicked PA was detected by Native-PAGE (4%–20%). lane 1: EF; lane 2: EF with furin-nicked PA. The complex with a very low mobility band was marked by an arrow.

究通过检测经不同浓度EF处理后的CHO-K1细胞内cAMP浓度, 来分析重组EF的活性。如图3所示, 在PA浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 随着EF浓度的增加, CHO细胞内的cAMP浓度逐渐提高。EF浓度为0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, cAMP浓度为23 pmol/mg, 而当EF浓度达到1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cAMP浓度提高到1200 pmol/mg, 表明本研究纯化的EF具有较好的腺苷酸环化酶活性。

EF的1-290位的氨基酸构成的N端功能域(EFn)负责与furin激活后的PA结合, 其291-800位

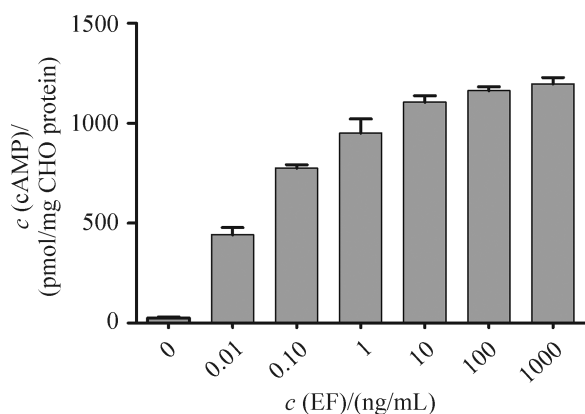


图3. cAMP分析

Figure 3. cAMP assay. The concentration of intracellular cAMP from CHO-K1 cells that treated with various amount of EF (ranging from 0 to 1000 ng/mL) in the presence of fixed amount of PA (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was determined using cAMP Parameter Assay Kit. The results are represented as the mean \pm SEM of at least three assays.

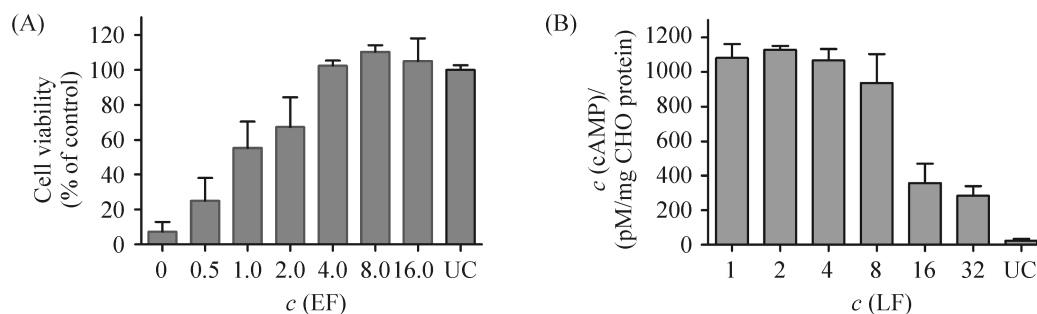


图4. EF与LF竞争性抑制作用分析

Figure 4. Assay of competitive inhibition between LF and EF. A: EF inhibits LF in a dose-dependent manner. B: LF inhibits EF in a dose-dependent manner. Untreated cells (UC) were used as control, and the results are represented as the mean \pm SEM of at least three assays.

氨基酸形成腺苷酸环化酶的活性功能域。PA参与结合EF和结合LF位点相同, 二者与PA的结合具有竞争性。因此, 可以通过竞争抑制分析来判断EF与PA的结合能力。如图4-A所示, 相对于对照(untreated cell, UC), 致死毒素LeTx可杀死超过90%的细胞, 但EF的加入可明显抑制其细胞毒性。当EF浓度超过4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LeTx的毒性完全被抑制。本研究进一步通过检测添加了不同浓度LF的EdTx对CHO-K1细胞cAMP浓度的影响, 分析LF对EF的抑制作用。如图4-B所示, 相对于对照, EdTx显著提高CHO-K1细胞内的cAMP水平, 但LF的出现, 明显抑制EdTx的作用, 且伴随LF浓度提高, 抑制作用加剧。以上结果表明, 本研究纯化的EF能够与LF相互竞争结合PA特定位点, 具有形成水肿毒素复合体的能力。

3 讨论

炭疽水肿因子(EF)编码基因(GenBank Accession No.: M24074.1)全长2403 bp, 编码蛋白由800个氨基酸构成, 其中N端1-33位为信号肽。序列组成分析表明, EF编码基因AT含量高达71%^[5]。过高的AT含量意味着其可能含有较多*E. coli*稀有密码子, 如编码Ile的ATA, 不利于该基因的高效表达。我们进一步利用在线稀有密码子分析工具RaCC (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>)

考察了EF编码基因密码子组成特点, 结果表明其含有较多*E. coli*的稀有密码子, 包括编码Ile的稀有密码子30个, 编码Arg稀有密码子为16个, 编码Leu的稀有密码子5个。富含稀有密码子的EF基因难以在常规的大肠杆菌宿主中表达, 因此本研究选用了以上3种氨基酸密码子偏爱性改良的宿主细胞BL21-CodonPlus (DE3)-RIL进行表达, 该宿主能较好地克服富含AT基因的表达障碍。恰如预期, 利用该宿主菌, EF实现了可溶性高效表达, 为其纯化提供了条件。还原性谷胱甘肽转移酶(GST)作为重组蛋白表达的常用融合标签, 不仅有助于提高目标蛋白表达的可溶性, 且有利于目标蛋白的快速纯化^[10]。鉴于此, 本研究选用GST作为融合表达标签。可溶的GST-EF与GST·Bind Resin结合后, 通过PreScission蛋白酶原位切割, 即可实现EF与GST的分离。新引入的切割酶因自身携带有GST标签, 切割目标蛋白的同时会被GST·Bind Resin捕获^[16]。因此, 通过洗脱收集便可得到不含GST及PreScission protease的EF。

高效细胞破碎技术是分离纯化*E. coli*重组蛋白的前提。超声波及高压匀浆破碎是目前常用的方法, 但存在诸多弊端: 首先, 前者效率低下, 不适合大规模的细胞破碎, 后者需要昂贵的设备, 且操作费时费力; 其次, 2种破碎方法释放出大量除目标蛋白之外的生物大分子, 包括核酸及脂多糖等, 增加了破碎液的粘度和成份的复杂性, 不利于目标蛋白的纯化; 最后, 两种破碎方法往往产生大量的热量, 不利于蛋白活性的保持。利用能改变*E. coli*细胞膜通透性的温和试剂, 对细胞进行透性化处理, 以提取可溶的目标蛋白, 能较好地克服上述细胞破碎法的弊端^[17]。多粘菌素B, EDTA及低浓度的Triton-X100等试剂对蛋白稳定性及活性没有影响, 且能改变*E. coli*细胞膜通透性^[18-19]。因此, 本研究选用这3种试剂作为细胞透性化试剂, 在4 °C条件下, 处理

诱导后的*E. coli*细胞20 min, 即可将大量的目标蛋白抽提到上清中, 其效率与超声波破碎法相当(图1-B)。该透性化处理法具有高效、温和的特点, 可避免对蛋白活性的破坏, 不仅可用于EF的纯化, 亦可用于其它可溶性重组蛋白的纯化。

具有应用价值的重组炭疽水肿因子不仅要具备催化活性, 还需具备结合PA形成水肿毒素的能力。本研究通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析、LF与EF相互抑制实验, 证明了EF能够与PA结合。在此基础上, 分析了经不同浓度EF与一定浓度PA的混合物处理的CHO-K1细胞cAMP浓度变化, 结果表明, 相对于空白对照, 0.01 ng/mL的EF能将细胞内cAMP浓度提高60倍, 伴随着EF浓度增加, cAMP浓度逐渐提高。这些结果充分表明, 本研究纯化的重组EF具有较好的生物活性。国内外已报道的重组炭疽水肿因子制备方法均涉及到多步操作, 包括离子交换、亲和层析、疏水层析、透析等^[20-22], 繁琐的操作不仅增加了实验成本, 降低了纯化效率, 还会影响EF的生物活性。本研究首次利用GST融合表达系统与亲和层析, 建立了一步法快速纯化具有生物活性的炭疽水肿因子的方法, 为炭疽相关研究工作提供了新选择。

参考文献

- [1] Liu SH, Moayeri M, Leppla SH. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(6): 317-325.
- [2] Young JAT, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, 76(1): 243-265.
- [3] Klimpel KR, Molloy SS, Thomas G, Leppla SH. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(21): 10277-10281.
- [4] Mahtab Moayeri, Stephen H. Leppla, Catherine Vrentas,

- Andrei P. Pomerantsev, Shihui Liu . Anthrax pathogenesis. *Annual Review Microbiology*, 69: 185–208.
- [5] Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(10): 3162–3166.
- [6] Shen YQ, Zhukovskaya NL, Guo Q, Florián J, Tang WJ. Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor. *The EMBO Journal*, 2005, 24(5): 929–941.
- [7] Arora N, Leppla SH. Residues 1–254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(5): 3334–3341.
- [8] Leuber M, Kronhardt A, Tonello F, Dal Molin F, Benz R. Binding of N-terminal fragments of anthrax edema factor (EF_N) and lethal factor (LF_N) to the protective antigen pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2008, 1778(6): 1436–1443.
- [9] Guo Q, Xu JJ, Dong DY, Fu L, Chen W. Expression and characterization of the recombination anthrax lethal factor. *Acta Microbiologica Sinica*, 44(6): 749–751. (in Chinese)
郭强, 徐俊杰, 董大勇, 付玲, 陈薇. 重组炭疽致死因子的表达及生物活性分析. *微生物学报*, 2004, 44(6): 749–751.
- [10] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 172.
- [11] Cao S, Liu ZD, Guo AZ, Li Y, Zhang CX, Wu GB, Feng CF, Tan YD, Chen HC. Efficient production and characterization of *Bacillus anthracis* lethal factor and a novel inactive mutant rLFm-Y236F. *Protein Expression and Purification*, 2008, 59(1): 25–30.
- [12] Wu GB, Feng CF, Hong YZ, Guo AZ, Cao S, Dong JL, Lin L, Liu ZD. Soluble expression and purification of the anthrax protective antigen in *E. coli* and identification of a novel dominant-negative mutant N435C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 609–616.
- [13] Wu GB, Hong YZ, Guo AZ, Feng CF, Cao S, Zhang CC, Shi RP, Tan YD, Liu ZD. A chimeric protein that functions as both an anthrax dual-target antitoxin and a trivalent vaccine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(11): 4750–4757.
- [14] Cunningham K, Lacy DB, Mogridge J, Collier RJ. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(10): 7049–7053.
- [15] Mogridge J, Mourez M, Collier RJ. Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(6): 2111–2116.
- [16] Dian C, Eshaghi S, Urbig T, McSweeney S, Heijbel A, Salbert G, Birse D. Strategies for the purification and on-column cleavage of glutathione-S-transferase fusion target proteins. *Journal of Chromatography B*, 2002, 769(1): 133–144.
- [17] Zhou S, Wang FS. Cell permeabilization and its application. *Chemistry of Life*, 2008, 28(4): 481–484. (in Chinese)
周帅, 王凤山. 细胞透性化技术及其应用. *生命的化学*, 2008, 28(4): 481–484.
- [18] Teuber M, Bader J. Action of polymyxin B on bacterial membranes. *Archives of Microbiology*, 1976, 109(1/2): 51–58.
- [19] Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 1992, 56(3): 395–411.
- [20] Cooksey BA, Sampey GC, Pierre JL, Zhang XZ, Karwoski JD, Choi GH, Laird MW. Production of biologically active *Bacillus anthracis* edema factor in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(6): 1651–1659.
- [21] Gupta M, Alam S, Bhatnagar R. Kinetic characterization and ligand binding studies of His351 mutants of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, 446(1): 28–34.
- [22] Kumar P, Ahuja N, Bhatnagar R. Purification of anthrax edema factor from *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen. *Infection and Immunity*, 2001, 69(10): 6532–6536.

Efficient expression of anthrax edema factor in *Escherichia coli* and its single-step purification

Chanjuan Li^{2,3}, Xiangnan Zhang³, Shaowei Zhang³, Gaobing Wu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

² Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan 430205, Hubei Province, China

³ College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [**Objective**] To develop a new method for efficient expression and rapid preparation of biologically active anthrax edema factor (EF). [**Methods**] EF was fused with GST and expressed in the host *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL by IPTG induction. The crud protein was extracted by permeabilization, and then EF was purified by one-step affinity chromatography. cAMP assay, Native-PAGE and competitive inhibition analysis were carried out to evaluate EF's biological activity. [**Results**] EF was expressed in soluble form and then purified to 96% purity by single-step. The recombinant EF was able to bind furin-nicked protective antigen (PA) to form edema toxin, which could elevate the intracellular cAMP level of CHO-K1 cells dramatically. [**Conclusion**] This work provides a time-saving method for purification of EF with high purity and good biological activity, which might be valuable for anthrax-related study.

Keywords: anthrax, edema toxin, recombinant expression, affinity chromatography

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200580)

*Corresponding author. E-mail: wgb@mail.hzau.edu.cn

Received: 10 October 2015; Revised: 12 December 2015; Published online: 30 December 2015