

多肽融合标签的移除策略*

谢浩** 杨程 陈丽娥

(武汉理工大学生物科学与技术系, 武汉 430070)

摘要 多肽融合标签能够赋予目标蛋白新的特性, 便于目标蛋白的定位、追踪、纯化以及结构和相互作用研究。但在很多情况下, 尤其是研究蛋白质结构或分离纯化药用蛋白时, 需要将多肽融合标签从融合蛋白上切除, 以降低和消除多肽融合标签对目标蛋白结构和功能的影响。可用来切除多肽融合标签的方法主要有 4 种, 即化学法、内切蛋白酶法、外切蛋白酶法以及自我剪切法。介绍和比较了每种方法的基本原理、应用以及研究进展。

关键词 融合蛋白, 多肽融合标签, 标签移除, 内含肽, 蛋白酶

学科分类号 Q5-3, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00160

融合标签技术是利用 DNA 重组技术将不同来源的基因或基因片段进行拼接, 在基因水平上改造目标蛋白, 产生含有融合标签的重组蛋白, 不仅保持原有蛋白质的功能活性, 还具有融合标签所特有的生理生化特性。随着蛋白质组学的发展及药用蛋白的研究开发, 融合标签技术被广泛地应用于科研及工业领域, 尤其在蛋白质分离纯化、膜蛋白结构研究、蛋白质生理功能研究等方面有着重要作用^[1~3]。

虽然一些多肽融合标签能够促进目标蛋白的正确折叠和溶解, 利于蛋白质的表达和定位, 但是也可能对目标蛋白造成不利影响, 主要表现在以下两个方面。

首先, 融合标签可能会影响目标蛋白的构象。例如基因调控蛋白 AreA 连接多聚组氨酸标签后, 与野生型蛋白相比, 虽然蛋白质的功能没有显著改变, 但是蛋白质构象却发生了细微变化^[4]。因此, 在研究蛋白质结构时, 需要移除融合标签, 排除和减少融合标签对蛋白质结构的影响。

其次, 融合标签可能会抑制和影响目标蛋白的活性。例如重组氨基肽酶 B 的 C 端连上多聚组氨酸标签后, 其外切蛋白酶活性降低了近一半^[5]。而对于用于癌症治疗的单抗 CC49 单链 Fv 片段(scFv)的研究表明, 当多聚组氨酸标签连接于 scFv 的 C 端时, 有可能部分覆盖 scFv 抗原结合位点, 从而极

大地降低了 scFv 对抗原的结合能力^[6]。因此, 在研究蛋白质或酶的性质或功能时, 需要充分考虑多肽融合标签的影响。对于药用蛋白质而言, 融合标签不仅可能影响目标蛋白的药效, 还会对人体存在潜在威胁, 因而多肽标签的移除变得更为必要。

目前主要通过 4 种方法移除多肽标签, 即化学法、内切蛋白酶法、外切蛋白酶法以及基于内含肽的自我剪切法。

1 化学方法

化学方法移除多肽标签需要利用溴化氰(cyanogen bromide, CNBr)或羟胺(hydroxylamine)处理, 所采取的基本策略如下: 在目标蛋白与融合标签之间插入一个甲氨酸残基, 诱导表达并纯化后, 用溴化氰或羟胺处理所纯化的融合蛋白, 使融合蛋白在插入的甲氨酸残基处断裂, 从而使标签从目标蛋白脱离^[7]。例如 Fairlie 等^[8]发展的用于生产和纯化含二硫键肽的系统就使用了溴化氰法。他们将纯化所得到的融合蛋白用溴化氰处理后, 利用

* 国家自然科学基金(30600004)和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 027-63391990, E-mail: drxiehao@126.com

收稿日期: 2009-03-19, 接受日期: 2009-06-16

RP-HPLC 柱除去脱离的融合标签，结果得到纯度大于 95%的目标多肽。相比于酶切法，化学法具有效率高、耗时短、成本低等优点。在上述例子中，融合蛋白用溴化氰处理 4 h 后切割率接近 100%。相比而言，很多酶需要长达十余小时才能达到理想的切割率。

化学法也有很多不足，例如化学法所需的反应条件容易破坏目标蛋白的结构和功能，而且所使用的溴化氰等试剂具有毒性，不适合药用蛋白的处理及研究。化学法使用的溴化氰能够使蛋白质在甲氨酸残基处断裂，如果目标蛋白含有内源甲氨酸残基，会发生非特异性断裂，导致降解和破坏目标蛋白。而且化学法切割时容易产生副反应，会对修饰一些氨基酸侧链而改变目标蛋白的特性^[7,8]。这些缺点限制了化学法在移除多肽融合标签时更为广泛的应用。

2 内切蛋白酶法

内切蛋白酶能够识别蛋白质的特殊序列，并从这段序列内部或附近的特定氨基酸残基处切割蛋白质。使用内切蛋白酶切除标签的一般策略如下：a. 选择合适的内切蛋白酶，注意避免内切蛋白酶在目标蛋白内部有多余识别位点；b. 构建表达载体，在融合标签与目标蛋白之间引入内切蛋白酶识别序列；c. 将所构建的质粒导入宿主并诱导表达，分离纯化重组融合蛋白；d. 将初次纯化的融合蛋白用对应的内切蛋白酶处理；e. 再次纯化以除去内切蛋白酶及融合标签。在使用内切蛋白酶法移除融合标签过程中，需要经过两步纯化，即从细胞裂解液中纯化融合蛋白，以及将内切蛋白酶及脱离的融合标签从目标蛋白中除去。表 1 列出了几种常用的内切蛋白酶。

Table 1 The basic features of several endoproteases

Endoprotease	Cleavage site	Other features	Commercial name (Supplier)
Enterokinase	DDDDK*	Secondary sites	Recombinant enterokinase (Novagen); EKMax enterokinase (Invitrogen)
Factor Xa	IDGR*	Secondary sites at GR	Factor Xa (Amersham); Restriction grade factor Xa (Novagen); Factor Xa protease (Qiagen)
Thrombin	LVPR*GS	Secondary sites	Thrombin (Amersham Biosciences); Restriction grade thrombin (Novagen)
TEV protease	EQLYFQ*G	His-tag for removal of the protease	rTEV protease (Life Technologies)
3C protease	ETLFQ*GP	GST-tag for removal of the protease	PreScission protease (Amersham; Biosciences)

The position of endoprotease is indicated with an asterisk (*).

在利用内切蛋白酶去除融合标签时，如果酶切效率低下，通常需要延长反应时间，不仅耗时，而且容易导致非特异性切割，长时间酶切反应环境也可能会使目标蛋白发生变化或失活^[9,10]。内切蛋白酶的特异性和酶切效率主要受 3 种因素影响。第一种因素是内切蛋白酶固有的非特异性酶切。有些内切蛋白酶如 Factor Xa 和凝血酶存在着第二切割位点，而且随着反应条件的不同其第二位点的切割效率也是变化的。非特异性切割可以通过控制反应条件减少，但不能完全消除^[11]，因此需要优化条件减少非特异位点切割，并且需要检测切割后的产物，以确定目标蛋白产物的均一性。第二种因素是目标蛋白的结构。由于蛋白质肽链的空间折叠，有些融合蛋白的酶切识别位点位于蛋白质结构内部，内切蛋白酶活性中心难以接触到识别位点，导致酶切效率低下。例如利用肠激酶对处于聚集状态的目标蛋白所含的多聚组氨酸标签的切除研究证实，只有使

目标蛋白结构发生一定的变化，暴露出肠激酶的切割识别位点，才能很好地达到标签切除的目的^[12]。第三种因素是溶液中化学成分如去垢剂的影响。在纯化一些疏水性蛋白和跨膜蛋白时，需要加入去垢剂，有可能会影响内切蛋白酶活性而降低酶切效率。例如去垢剂在低浓度范围内对 TEV protease 酶切效率影响不明显，但是达到一定浓度后会明显抑制酶活性^[13]。

在利用内切蛋白酶切除融合标签之后，必须除去内切蛋白酶。通常的策略是利用含有亲和融合标签的重组内切蛋白酶，在酶切完成后，通过二次过柱使重组酶吸附在柱上，而目标蛋白则洗脱下来^[14,15]。柱纯化技术和分子生物学的发展，使人们可以利用重组内切蛋白酶实现一步式柱纯化^[15]，即酶和融合蛋白都采用同种亲和融合标签，过柱后都吸附在柱上，酶在柱上完成对目标蛋白融合标签的剪切。

在利用内切蛋白酶移除融合标签时, 还需要考虑是否在目标蛋白上产生了多余的外源氨基酸残基, 从而带来不确定因素, 尤其是对于治疗用蛋白而言, 会产生潜在风险. 融合蛋白经肠激酶或 Factor Xa 切割后, 不会在目标蛋白 N 端产生多余的外源氨基酸残基. 由于目标蛋白 N 端氨基酸残基的变化对肠激酶切割效率影响很弱, 因此可以将肠激酶发展成通用的对重组蛋白进行处理以移除融合标签的内切蛋白酶^[16, 17]. 例如 Lin 等^[18]在研究邻氨基苯甲酸合成酶复合体亚基 TrpE 蛋白时, 就利用肠激酶切除 N 端的多聚组氨酸标签.

随着技术进步以及蛋白质纯化工业发展, 内切蛋白酶法朝着两个方向发展. 一方面通过基因筛选等技术寻找特异性更好、效率更高的内切蛋白酶. 另一方面向简化纯化步骤方向发展, 实现一步式柱纯化或无柱纯化等. 如 Mao^[19]将内切蛋白酶与目标蛋白融合, 组成“标签-内切蛋白酶-目标蛋白”的结构, 在内切蛋白酶与目标蛋白之间是酶识别序列. 在纯化过程中控制内切蛋白酶保持无活性状态, 直到过亲和柱后, 改变条件诱导内切蛋白酶恢复活性, 切下目标蛋白.

3 外切蛋白酶法

外切蛋白酶能够从蛋白质的 N 端或 C 端开始, 依次切除一个或几个氨基酸残基, 直到遇到某种特定的氨基酸残基才会停止. 外切蛋白酶的种类包括氨基肽酶和羧肽酶, 分别可以用来切除位于目标蛋白 N 端和 C 端的融合标签, 例如氨基肽酶 M (aminopeptidase M, APM) 和羧肽酶 A 和 B (carboxypeptidase A 和 B, CPA 和 CPB) 等^[5].

在利用外切蛋白酶法移除融合标签的系统中, 最有代表性的是 QIAGEN 公司基于二肽氨基肽酶 I (dipeptidyl aminopeptidase I, DPPI, 商业名称为 DAPase) 的作用机理所提供的 TAGZyme 系统, 用于移除 N 端的多聚组氨酸标签^[20~23]. DAPase 能够从蛋白质 N 端依次切除二肽, 切除反应的终止位点为 N 端出现 Lys、Arg、Gln 残基, 或者在 N 端第 2 个或第 3 个氨基酸残基是 Pro. 如果目标蛋白在 N 端具有天然的 DAPase 切除终止位点, 可以直接设计利于 DAPase 切除的融合标签, 构建相应重组蛋白质. 如果目标蛋白在 N 端不具备 DAPase 切除终止位点, 那么需要引入 Gln 残基作为终止位点. 当 DAPase 切除反应结束后, 利用谷氨酰胺循环转移酶 (glutamine cyclotransferase, GCT, 或称为

Qcyclase), 将所引入的 Gln 转变成焦谷氨酸 (pyroglutamyl) 残基, 再利用焦谷氨酸氨基肽酶 (pyroglutamyl aminopeptidase, pGAPase) 切除. 由于 DAPase、Qcyclase 和 pGAPase 都经过遗传改造而含有多聚组氨酸标签, 因而可以容易地利用亲和层析移除. 在最优条件下, TAGZyme 系统切除融合标签的效率可以达到 90%~98%^[7]. 利用 TAGZyme 系统, 学者们成功地纯化了多种蛋白质如白细胞介素^[21]和甲酸脱氢酶^[24].

与内切蛋白酶相比, TAGZyme 系统有很多优势. 外切蛋白酶的作用独立于目标蛋白内部的序列, 不会造成非特异性切割, 几乎可以适用于任何目标蛋白. 而内切蛋白酶在使用时需要考虑目标蛋白内部是否有隐藏切点, 还必须避免非特异性切割. 外切蛋白酶完成酶切所需酶量也少于内切蛋白酶用量, 既减少了非特异性切割的风险, 又降低了从体系中去除的难度^[7]. 此外, 外切蛋白酶完成酶切的时间相对较短, 也降低了造成目标蛋白损伤的可能性^[25].

使用 TAGZyme 系统时, DAPase 对不同序列的多肽有不同的酶切速率, 例如对 HQ 二肽的切除速率高于 HH、HM 和 HA 二肽^[9], 因而必须优化目标蛋白融合标签的设计. 此外, 由于 DAPase 是依次切除 2 个氨基酸残基, 如果是偶数氨基酸残基的多肽标签, 当 N 端 Met 残基被加工切除后, 有可能被加工成奇数残基的多肽标签, 导致 DAPase 酶切越过终止位点而不停止^[25, 26]. 一般通过选择宿主品系或优化多肽标签的设计来避免这一问题.

4 基于内含肽的自我剪切法

内含肽(intein)是前体蛋白中的一段插入序列, 能够自我催化蛋白质的剪接(protein splicing), 使自身从前体蛋白中切除, 并将两侧外显肽(extein)连接形成成熟蛋白^[27]. 目前已经发现超过 450 个以上的内含肽, 分布于真核生物、真细菌和古细菌、病毒和噬菌体^[28, 29].

内含肽可以在异源表达系统或者体外翻译系统中介导自我剪接, 对反应条件和两侧的外显肽要求不高, 仅需对“内含肽-外显肽”连接点附近少数残基进行突变, 适用于切除重组融合蛋白的多肽标签^[30]. 当利用内含肽切除多肽标签时, 需要改变内含肽序列, 避免内含肽自我剪切后发生多肽标签和目标蛋白的重新拼接. 通常是在所引入内含肽靠近多肽标签的一端引入突变, 抑制内含肽与多肽标签

的分离, 而另一端发生自我剪切使目标蛋白与内含肽分离^[30~32]. 在纯化目标蛋白时, 含有亲和标签及内含肽的融合蛋白与相应的配体结合而吸附于亲和柱上, 通过改变温度、pH 或加入巯基试剂等诱导自我剪切, 使目标蛋白从吸附于亲和柱上的亲和标签脱离并洗脱下来, 从而能够实现蛋白质的“一步一柱法纯化”. 应用基于内含肽的自我剪切法成功地切除了许多目标蛋白的融合标签, 例如对药用蛋白 PorA 和 Human Brain Natriuretic Peptide (hBNP) 的纯化^[33, 34].

相比于化学法, 自我剪切法条件温和, 不会使目标蛋白损伤变性. 相比于酶切法, 自我剪切法简化了纯化过程, 节约了成本和时间. 传统的酶切法需要多次过柱和多步纯化, 以分离融合蛋白和除去蛋白酶及融合标签. 而自我剪切法能够免除酶的消耗及过柱所产生的昂贵费用. 例如 Singleton 等^[35]在纯化 RecA 蛋白的一系列突变体时采用自我剪切法, 不仅缩短了纯化时间, 而且不同突变体蛋白的纯化过程基本一致, 不需要针对不同的突变体蛋白设计不同的纯化策略. 此外, 自我剪切法具有良好的特异性, 一般只在剪接位点的氨基酸残基上发生切割. 酶切法由于第二识别位点等因素的存在, 容易发生非特异性切割.

自我剪切法也存在一些缺点, 例如外显肽靠近内含肽的残基能够影响自我剪切效率. 对于某些蛋白质, 需要在目标蛋白与内含肽的接头端引入氨基酸残基提高剪切效率^[28, 31, 33], 从而会给目标蛋白产物带来多余的氨基酸残基. 自我剪切法的诱导条件也不易控制, 融合蛋白可能会在表达过程中发生体内诱导的提前剪切导致纯化失败, 而且有些自我剪切的诱导剂如巯基试剂会影响目标蛋白的二硫键及相应结构^[36]. 另外, 常用的缓冲液成分 Tris 也会在剪切反应中和硫酯中间体形成稳定的加合物, 对蛋白质纯化结果有所影响^[37].

亲和树脂层析柱通常非常昂贵, 是某些蛋白质纯化大规模工业化的瓶颈. 基于内含肽的自我剪切技术, 可以发展蛋白质的无柱纯化系统, 如基于聚羟基丁酯(polyhydroxybutyrate, PHB) 的 PHB 系统和基于弹性蛋白样多肽(elastin-like polypeptide, ELP) 的 ELP 系统^[38, 39]. PHB 系统利用了聚合标签(aggregation tags)能形成聚合体的特性. 某些细菌在缺氧缺氮等条件下会在体内形成 PHB, 以大约 1 μm 的颗粒形式存在, 能够结合小的 PHB 颗粒结合蛋白如 phasins. 因此可以利用 phasins 作为融合

标签构建形式为“phasins- 内含肽 - 目标蛋白”的重组蛋白, 与 PHB 颗粒结合, 通过离心使目标蛋白与 PHB 颗粒一起沉淀, 诱导内含肽发生自我剪切, 再次离心后, 目标蛋白出现在上清液中而与处于沉淀中的融合标签分离. ELP 系统则利用了 ELP 的热诱导相变性质, 即室温下高度水溶性的 ELP 在温度上升至 30~40℃ 时将不溶于水, 其相变温度与 ELP 的链长、浓度等因素及序列组成有关. 对于在 ELP 相变温度时能保持活性的目标蛋白, 可以利用相应的 ELP 作为融合标签构建形式为“ELP- 内含肽 - 目标蛋白”的重组蛋白, 表达后在低于相变温度时离心并收集上清液, 再在高于相变温度时离心, 分离得到纯化的融合蛋白沉淀, 在低于相变温度下溶解并诱导自我剪切, 再升高到相变温度以上. 此时, 目标蛋白存在于上清液中, 而 ELP- 内含肽存在于沉淀中, 从而达到纯化的目的. 例如 Banki 等^[39]报道了利用 ELP 系统对大肠杆菌所表达的 10 种不同的重组蛋白的纯化研究. 这些无柱纯化系统, 比基于酶切的多步多柱纯化系统和基于自我剪接的一步一柱纯化系统, 能够节约分离纯化的成本和时间.

5 小 结

虽然可以利用化学法、内切蛋白酶法、外切蛋白酶法、自我剪切法移除重组融合蛋白的多肽标签, 但 4 种方法各有利弊, 需要根据目标蛋白的特性, 以及标签移除方法和实验目的进行选择. 就融合标签切除的精确度而言, 化学法虽然可以较准确地在设计的位点切割, 但容易对目标蛋白造成一些不必要的化学修饰, 甚至使目标蛋白降解. 内切蛋白酶法也存在非特异性切割问题. 相对而言, 外切蛋白酶法和自我剪切法在精确度方面更好. 就切除过程对目标蛋白及其后续步骤的影响而言, 化学方法的极端反应条件易对目标蛋白造成破坏, 而且使用有毒试剂对目标蛋白尤其是药用蛋白的后续使用也有影响. 内切蛋白酶法处理目标蛋白耗时过长, 容易导致目标蛋白会发生变化甚至失活, 而且有些来源于动物的内切蛋白酶存在着被病原体污染的风险, 也不适合处理药用蛋白. 自我剪切法在诱导剪切时需加巯基试剂, 会影响目标蛋白的二硫键. 因此, 需要综合考虑目标蛋白的性质和后续用途, 选择合适的方法. 就方法的经济性和可行性而言, 目前纯化策略都朝着简单快速的方向发展. 酶法由于引入了外加酶, 不仅需要增加额外步骤除去酶, 还

增加了酶及纯化树脂的成本支出。相比而言,自我剪切法避免使用酶而更为经济。

参 考 文 献

- Xie H, Guo X M, Chen H. Making the most of fusion tags technology in structural characterization of membrane proteins. *Mol Biotech*, 2009, **42**(2): 135~145
- Waugh D S. Making the most of affinity tags. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, **23**(6): 316~320
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Micro Biotech*, 2003, **60**(5): 523~533
- Chant A, Kraemer-Pecore C M, Watkin R, *et al.* Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Prot Exp Puri*, 2005, **39**(2): 152~159
- Cadel S, Gouzy-Darmon C, Petres S, *et al.* Expression and purification of rat recombinant aminopeptidase B secreted from baculovirus-infected insect cells. *Prot Exp Puri*, 2004, **36**(1): 19~30
- Goel A, Colcher D, Koo J S, *et al.* Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1523** (1): 13~20
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen G E, *et al.* Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Prot Exp Puri*, 2006, **48**(1): 1~13
- Fairlie W D, Uboldi A D, De Souza D P, *et al.* A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide-containing peptides. *Prot Exp Puri*, 2002, **26**(1): 171~178
- Kenig M, Peternel S, Gaberc-Porekar V, *et al.* Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tag removal in purification of recombinant proteins. *J Chromato A*, 2006, **1101**(1-2): 293~306
- Simons B L, King M C, Cyr T, *et al.* Covalent cross-linking of proteins without chemical reagents. *Protein Science*, 2002, **11**(6): 1558~1564
- Jenny R J, Mann K G, Lundblad R L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Prot Exp Puri*, 2003, **31**(1): 1~11
- Shahravan S H, Qu X L, Chan I S, *et al.* Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Prot Exp Puri*, 2008, **59**(2): 314~319
- Yeliseev A, Zoubak L, Gawrisch K. Use of dual affinity tags for expression and purification of functional peripheral cannabinoid receptor. *Prot Exp Puri*, 2007, **53**(1): 153~163
- Loretsen R H, Fynbo C H, Thøgersen H C, *et al.* Expression, refolding, and purification of recombinant human granzyme B. *Prot Exp Puri*, 2005, **39**(1): 18~26
- Chatterjee S, Schoepe J, Lohmer S, *et al.* High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set. *Prot Exp Puri*, 2005, **39**(2): 137~143
- Hosfield T, Lu Q. Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)₄Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. *Anal Biochem*, 1999, **269**(1): 10~16
- Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Toscano A, *et al.* Gi/o proteins: expression for direct activation enquiry. *Prot Exp Puri*, 2006, **47**(1): 303~310
- Lin X H, Xu S F, Yang Y P, *et al.* Purification and characterization of anthranilate synthase component I (TrpE) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Prot Exp Puri*, 2009, **64**(1): 8~15
- Mao H. A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. *Prot Exp Puri*, 2004, **37**(1): 253~263
- Qiagen. TAGZyme™ Handbook for Exoproteolytic Cleavage of N-terminal His tags, 2003
- Block H, Kubicek J, Labahn J, *et al.* Production and comprehensive quality control of recombinant human Interleukin-1 beta: A case study for a process development strategy. *Prot Exp Puri*, 2008, **57** (2): 244~254
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen G E, *et al.* The use of TAGZyme for the efficient removal of n-terminal His-tags. *Metho Mol Biol*, 2008, **421**: 229~243
- Arnau J, Lauritzen C, Pedersen J. Cloning strategy, production and purification of proteins with exopeptidase-cleavable His-tags. *Nature Protocols*, 2006, **1**(5): 2326~2333
- Ordu E B, Karaguler N G. Improving the purification of NAD(+)-dependent formate dehydrogenase from *Candida methylca*. *Prep Biochem Biotech*, 2007, **37**(4): 333~341
- Pedersen J, Lauritzen C, Madsen M T, *et al.* Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Prot Exp Puri*, 1999, **15**(3): 389~400
- Frottin F, Martinez A, Peynot P, *et al.* The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mole Cell Prot*, 2006, **5**(12): 2336~2349
- 邵爱云, 孟 清. 断裂蛋白质内含子的剪接机制、起源和进化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, **24** (6): 512~521
- Shao A Y, Meng Q. *Chin J Biochem Mole Biol*, 2008, **24** (6): 512~521
- Perler F B. InBase, the intein database. *Nucl Acid Res*, 2002, **30**(1): 383~384
- <http://www.neb.com/neb/inteins.html>
- Guo C, Li Z, Shi Y, *et al.* Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin. *Prot Exp Puri*, 2004, **37**(2): 361~367
- Mathys S, Evans T C, Chute I C, *et al.* Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation. *Gene*, 1999, **231**(1-2): 1~13
- Xu M Q, Perler F B. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO Journal*, 1996, **15** (19): 5146~5153
- Humphries H E, Christodoulides M, Heckels J E. Expression of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* and purification using a self-cleavable affinity tag.

- Prot Exp Puri, 2002, **26**(2): 243~248
- 34 Sun Z, Chen J, Yao H, *et al.* Use of Ssp dnaB derived mini-intein as a fusion partner for production of recombinant human brain natriuretic peptide in *Escherichia coli*. Prot Exp Puri, 2005, **43**(1): 26~32
- 35 Singleton S F, Simonette R A, Sharma N C, *et al.* Intein-mediated affinity-fusion purification of the *Escherichia coli* RecA protein. Prot Exp Puri, 2002, **26**(3): 476~488
- 36 Mee C, Banki M R, Wood D W. Towards the elimination of chromatography in protein purification: expressing proteins engineered to purify themselves. Chem Engin J, 2008, **135**(1~2): 56~62
- 37 Peroza E A, Freisinger E. Tris is a non-innocent buffer during intein-mediated protein cleavage. Prot Exp Puri, 2008, **57**(2): 217~225
- 38 Banki M R, Gerngross T U, Wood D W. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using *in vivo* polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. Prot Sci, 2005, **14**(6): 1387~1395
- 39 Banki M R, Feng L, Wood D W. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. Nat Methods, 2005, **2**(9): 659~661

Current Strategies for Polypeptide Fusion Tags Removal*

XIE Hao**, YANG Cheng, CHEN Li-E

(Department of Biological Science and Biotechnology, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract Using gene fusion technology, polypeptide fusion tags can be engineered into target proteins at the genetic level. The resultant recombinant proteins may possess the biochemical properties of the imported fusion tags. Therefore, it is possible to take advantage of fusion tags to improve and evaluate protein expression, to detect and track protein targets, and to purify and characterize proteins. However, it is necessary to eliminate any influence of the fusion tag in structural characterization experiments or in isolating pharmaceutical proteins. Scientists must therefore remove fusion tags prior to structural and functional analyses when fusion tags are suspected of interfering with the biological activity of a protein or influencing its behavior. The fusion tag can be removed by several methods including harsh chemical treatment, mild enzymatic cleavage by endoprotease or exoprotease, and intein-mediated self-cleavage. Here the literature is reviewed in relation to principles, applications, and approaches of each method.

Key words fusion proteins, polypeptide fusion tags, tag removal, intein, protease

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00160

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30600004) and Scientific Foundation for The Returned Overseas Chinese Scholars, The Ministry of Education.

**Corresponding author.

Tel: 86-27-63391990, E-mail: drxiehao@126.com

Received: March 19, 2009 Accepted: June 16, 2009