

重组牛乳铁蛋白素在大肠杆菌中的表达

邢芳芳^{1,2}, 印遇龙^{1,*}, 黄瑞林¹, 孔祥峰¹, 李铁军¹, 唐志如¹, 张友明^{1,3}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 湖南 410125 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

3. 基因桥有限公司, 德国 德累斯顿 01307)

摘要: 将牛乳铁蛋白素(lactoferricin B)基因克隆到表达载体pET28a后, 转化到BL21大肠杆菌表达系统, 筛选表达温度和诱导剂IPTG的浓度, 使其在原核表达系统中表达, 将诱导表达的产物进行Tricine-SDS-PAGE蛋白电泳及抑菌活性检测, 证明该表达产物是乳铁蛋白素。实验结果表明, Lactoferricin B基因能够在原核表达系统中表达, 表达量约占细菌总蛋白的21%, 而且表达的蛋白质具有生物学活性。

关键词: 牛乳铁蛋白素基因; 原核表达系统; Tricine-SDS-PAGE; 抑菌活性

Expression of Recombinant Lactoferricin B in *E. coli*

XING Fang-fang^{1,2}, YIN Yu-long^{1,*}, HUANG Rui-lin¹, KONG Xiang-feng¹,

LI Tie-jun¹, TANG Zhi-ru¹, ZHANG You-ming^{1,3}

(1. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China;

3. Gene Bridges GmbH, Dresden 01307, Germany)

Abstract After cloning into the expression vector pET28a, the lactoferricin B gene was transformed into BL-21 *E. coli* prokaryotic expression system. By selecting expression temperature and IPTG concentration, lactoferricin B gene was expressed at high level in prokaryotic cells. The expression of lactoferricin B was detected by tricine-SDS-PAGE protein electrophoresis and functional test, and it was proved to be the lactoferricin B. The result also showed that the gene of lactoferricin B can be highly expressed in prokaryotic expression system, and the expression product accounts for about 21% of total bacterial proteins with biology activity.

Key words lactoferricin B gene; prokaryotic expression system; Tricine-SDS-PAGE; functional test

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0221-04

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种铁结合糖蛋白, 存在于哺乳动物外分泌液和多核淋巴细胞某些颗粒中, 具有抗菌、调节机体铁质转移、抗肿瘤及病毒等多种生物功能^[1-2], 并通过调节多种细胞因子参与机体抗感染和免疫过程。牛乳铁蛋白素(lactoferricin B, 简称为Lfcin B)是牛乳铁蛋白(lactoferrin B, LFB)在酸性环境下经胃蛋白酶作用从N端释放的一段25个氨基酸残基的多肽。LFB是近年来发现的一种新型抗菌肽, 具备抗菌、抑菌、抗病毒、抗氧化、调节机体的免疫和提高肠道对铁离子的吸收等作用, 其抗菌活性比乳铁蛋白高400多倍^[3]。因为Lfcin B来源于动物本身, 具有传统抗生素没有的作用效果, 而且它不会使细菌产生抗药性, 也不会残

留于畜产品中, 加之其理化性质和生物学活性独特, Lfcin B成为近年来研究的热点。

Lfcin B不含稀有氨基酸和外源化学成分, 是一种健康安全的产品, 具有替代抗生素的巨大潜能。Lfcin B具有营养生理调节作用, 提高幼龄动物的免疫机能、改善动物肠道微生态环境, 促进动物健康的作用, 用于饲料与食品中起到天然防霉、防腐剂作用, 抑制致病菌有良好的耐热稳定性, 特别是在酸性条件下, 加热甚至是高温、高压处理对其抗菌活性均没有影响, 因此, Lfcin不仅能够耐受饲料与食品加工过程中高温、高压等剧烈条件, 并且可以在饲料与食品的保存过程中持续发挥其作用, 保持饲料与食品品质, 延长贮存期限。

收稿日期: 2007-04-19

基金项目: 湖南省重大科技专项(2007FJ1003); 中国科学院海外杰出学者基金项目(2005-1-7);

国家自然科学基金项目(30700581; 30771558; 30671517; 30528006)

作者简介: 邢芳芳(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为单胃动物营养与分子生物学。E-mail: xff9178@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 印遇龙(1956-), 男, 研究员, 研究方向为单胃动物营养。E-mail: yyulong@hotmail.com

Lfcin 具有抗真菌和抗脂质氧化等作用, 可用作防霉剂和抗氧化剂; 具有乳化作用, 可促进脂肪消化吸收。由于具有强大生物学功能及安全性等优点, Lfcin B 在乳品、食品以及动物营养中正在进行应用^[4], 其表现出良好的开发前景。因此, 乳铁蛋白素在开发新的绿色、环保、保健食品添加剂方面具有重要应用价值。本研究将 Lfcin B 基因在原核表达系统中表达, 并对表达蛋白的生物学活性进行初步检测。

1 材料与方法

1.1 表达载体与菌株

质粒 pSC101-Cm、表达载体 pET28a、HS996 大肠杆菌及表达系统 BL21 大肠杆菌由德国基因桥有限公司分子生物学实验室张友明博士提供, 通过对 pET28a 进行改造得到稳定表达 Lfcin B 基因的表达载体。

1.2 试剂与工具酶

Taq DNA 聚合酶、Ava I、Nco I 限制性内切酶、IPTG、Tricine、SDS、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED、APS 等 大连宝生物工程公司; T4 DNA 连接酶 Promega 公司; DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒 Invitrogen 公司。

1.3 仪器与设备

PCR 热循环仪、紫外分析仪、PCR 电泳仪、水浴摇床、SDS-PAGE 垂直蛋白电泳仪、分光光度计、XZQ-X100 振荡培养箱、TGL 台式离心机等。

1.4 Lfcin B 基因优化及引物合成

根据 Genbank 公布的 Lfcin B 基因序列及蛋白序列, 为使目的基因获得稳定表达, 用适于在 BL21 中表达的密码子代替那些不适合于在其中表达的密码子优化 Lfcin B 基因, 优化前后序列见图 1。

根据优化后的目的序列分别设计上游引物和下游引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物: 5' TGGAT ACC ATG GGC TTC AAA TGC CGT CGC TGG CAG TGG CGT ATG AAA AAA CTG GGT GCT CCG TCT

ATC ACC TGC GTG CGC CGT GCG TTC TAG GCG TAT CAC GAG GCC CTT; 下游引物: 3' TCA ATTC CCGGG TTA CGC CCC GCC CTG CCA CTC, 并在 5' 端引物设计了 Nco I 酶切位点(红色标记), 3' 端引物设计了 Ava I 酶切位点(红色标记), 以 pSC101-Cm 为模板, 扩增片段约为 1 kb。

1.5 Lfcin B 基因的克隆

1.5.1 目的基因扩增

以质粒 pSC101-Cm 为模板, 以 5' TGGAT ACC ATG GGC TTC AAA TGC CGT CGC TGG CAG TGG CGT ATG AAA AAA CTG GGT GCT CCG TCT ATC ACC TGC GTG CGC CGT GCG TTC TAG GCG TAT CAC GAG GCC CTT(下划线为 Lfcin B 基因)和 3' TCA ATTC CCGGG TTA CGC CCC GCC CTG CCA CTC 为引物, 选择 50 μl 体系进行 PCR 扩增。扩增程序如下: 95℃ 3min, 32(95℃ 55s, 54℃ 55s, 72℃ 1min), 72℃ 10min, 然后利用 1% 琼脂糖凝胶, 100 V 电压进行电泳检测。

1.5.2 载体构建及转化

将 PCR 扩增产物和表达载体 pET28a(+) 分别用 Nco I 和 Ava I 双酶切, 用试剂盒回收后进行连接; 将连接产物转入大肠杆菌 HS996 感受态细胞, 在含氯霉素(50 μg/ml)的抗性平板上培养过夜, 挑取单克隆进行液体培养, 选取阳性重组菌株送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5.3 阳性克隆鉴定

测序结果表明, 所得片段为目的基因, 将连接产物转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 在含氯霉素(50 μg/ml)的抗性平板上培养过夜。挑取数个转化菌单菌落, 于少量 LB 液体培养基(含氯霉素), 37℃ 培养过夜, 质粒提取试剂盒提取质粒, 用 Nco I 和 Ava I 双酶切鉴定。

1.6 重组大肠杆菌的诱导表达及表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析

从 LB 抗性平皿培养基上挑取阳性克隆单个菌落, 于 5ml LB 培养基中 37℃ 摇床培养过夜, 第 2d 转 100 μl 至

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | TTC | AAA | TGC | CGC | CGA | TGG | CAG | TGG | AGG | ATG | AAG | AAG | CTG | GGT | GCT | CCC |
| 1 | Phe | Lys | Cys | Arg | Arg | Trp | Gln | Trp | Arg | Met | Lys | Lys | Leu | Gly | Ala | Pro |
| 49 | TCT | ATC | ACC | TGT | GTG | AGG | AGG | GCC | TTT | | | | | | | |
| 17 | Ser | Ile | Thr | Cys | Val | Arg | Arg | Ala | Phe | | | | | | | |
| A | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | TTC | AAA | TGC | CGC | CGC | TGG | CAG | TGG | CGT | ATG | AAA | AAA | CTG | GGT | GCT | CCG |
| 1 | Phe | Lys | Cys | Arg | Arg | Trp | Gln | Trp | Arg | Met | Lys | Lys | Leu | Gly | Ala | Pro |
| 49 | TCT | ATC | ACC | TGC | GTG | CGC | CGT | GCG | TTT | | | | | | | |
| 17 | Ser | Ile | Thr | Cys | Val | Arg | Arg | Ala | Phe | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | | | | | |

图 1 改造前(A)后(B)的乳铁蛋白素基因序列及氨基酸序列
Fig.1 Fore-and-aft reconstruct gene sequence and amino sequence of lactoferricin B

50ml LB 液体培养基中 37℃ 振荡培养, 每 20min 测一次 OD 值, 待菌液达到对数期 ($OD_{600} \approx 0.5$) 时, 加诱导剂 IPTG 至 3mol/ml, 诱导 5h。

收集诱导表达后的 BL21 菌液, 8000r/min 离心 10min, 沉淀加约 10ml 蒸馏水, 进行超声破碎。超声 3s/off, 4s/on, 50 循环。超声破碎后的溶液 12000r/min 离心 20min。取 100 μ l, 于一 EP 管, 加 50 μ l 样品处理液 (1/3 体积), 煮沸 5min, 此为上清样品。未诱导的样品同样处理, 作对照。对这两个样品利用本实验室改进的 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳方法电泳^[5-7], 电泳完毕后对凝胶进行双波长扫描, 明确目的蛋白的表达量。并利用超声破碎后的菌液进行下一步的体外抑菌实验。

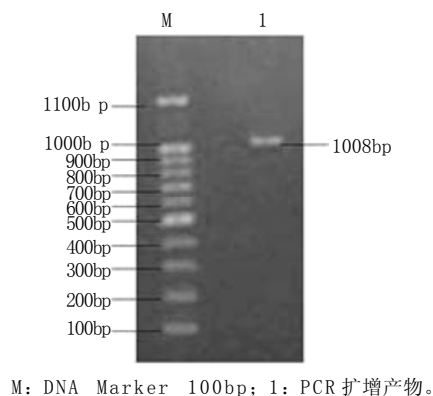
1.7 目的蛋白表达、活性分析

为了进一步证明牛乳铁蛋白在工程菌中获得表达, 利用牛乳铁蛋白的抗菌作用进行体外抑菌实验。分别取加 IPTG 诱导表达后的全菌样品与未加诱导剂诱导表达的全菌样品 100 μ l, 加到处于接入大肠杆菌 DH5 α 的 LB 液体培养基中, 37℃ 恒温振荡培养, 5h 后观察 DH5 α 的生长状况。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增

以 pSC101-Cm 为模板, 利用合成的上游引物、下游引物进行 PCR 扩增, 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶, 100V 电压下电泳 40min。得到 1kb 左右的一条带 (图 2), 大小与预期结果 (1008bp) 相等。



M: DNA Marker 100bp; 1: PCR 扩增产物。

图 2 目的基因 PCR 产物

Fig.2 PCR products of target gene

2.2 表达载体构建及重组质粒酶切鉴定

扩增片段经回收纯化, 连接到改造后的载体 pET28a(+) 上, 得到的重组质粒载体骨架上含有限制性内切酶 Nco I、Ava I、EcoR I 的酶切位点以及氯霉素抗性基因 (图 3)。重组质粒转化到大肠杆菌 HS996 感受态细胞, 挑选阳性克隆进行质粒提取, 用 Nco I 和 Ava I 双

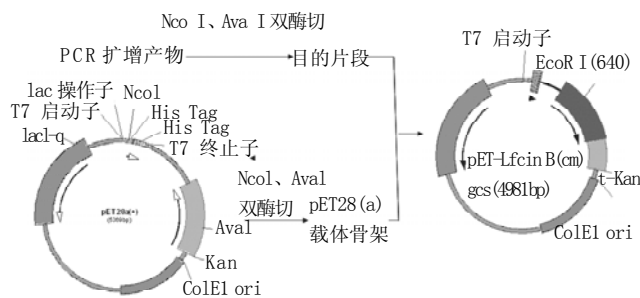
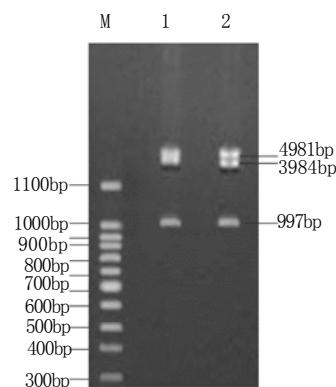


图 3 表达载体构建流程图

Fig.3 Flow chart of expression plasmid construction



M: DNA Marker 100bp; 1 和 2: 质粒双酶切结果。

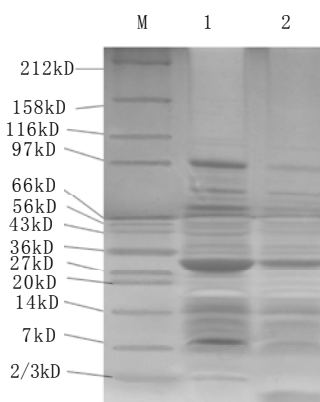
图 4 重组质粒双酶切结果

Fig.4 Results of recombinant plasmid digested by Nco I and Ava I

酶切鉴定。重组质粒酶切后经 1% 琼脂糖电泳后有符合大小的片断出现 (图 4), 鉴定结果表明提取的质粒为重组表达质粒。

2.3 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 分析

分别将未诱导和诱导过夜的 BL21 大肠杆菌的总蛋白进行 Tricine-SDS-PAGE 蛋白电泳。从电泳的结果来看,



M: 分子量蛋白标准品; 1: 诱导表达全菌蛋白;

2: 未诱导表达全菌蛋白。

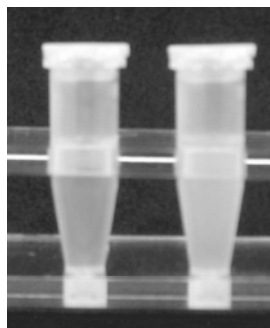
图 5 牛乳铁蛋白电泳图 (银染法)

Fig.5 Electrophoresis of lactoferricin B (silver blotting)

相对与空白对照 IPTG 诱导的 BL21, 诱导表达的 BL21。电泳后泳道中分别可见 1 条特异性的条带与牛乳铁蛋白素重组蛋白的理论分子量 3.1kD 相符(图 5), 由此说明 Lactoferricin B 在大肠杆菌 BL21 中获得稳定表达。

2.4 目的产物表达检测

利用工程菌全菌蛋白溶解液进行抗菌活性检测, 结果如图 6 所示。加入诱导表达全菌蛋白的菌液相对澄清, 说明加入的蛋白混合物中含有抗菌物质; 而加入未诱导表达全菌蛋白的菌液相对混浊, 细菌长势良好, 说明 IPTG 诱导表达产物为乳铁蛋白素。进而对目的蛋白进行半定量检测, 凝胶双波长扫描结果表明, 目的蛋白质质量分数占全菌蛋白约 21%, 乳铁蛋白素基因获得高效表达。



1: 加入诱导表达的全菌蛋白; 2: 加入未诱导表达的全菌蛋白。

图 6 牛乳铁蛋白素抗菌活性检测结果

Fig.6 Results of lactoferricin B against bacterium

3 讨论

牛乳铁蛋白素是近年来发现的一种新型抗菌肽, 有广泛的生物学活性, 但是由于价格昂贵等原因目前还没有广泛应用^[8]。长期以来, 如何获得大量廉价牛乳铁蛋白素, 成为研究者们努力解决的难题。通过色谱法、超滤法、盐析、酸沉淀等方法制得牛乳铁蛋白, 然后水解制得 Lfcin B, 以及利用多肽自动合成仪少量合成 Lfcin B 及其多种衍生物的方法都有很多不利因素, 因此利用基因工程生产 Lfcin B 具有广阔的应用前景^[2]。

基因工程生产是一个较为理想的选择, 但是由于抗菌肽分子小, 容易被蛋白酶降解, 同时由于其表达产物对宿主菌有害, 可造成宿主细菌的自杀, 因此不能在原核系统中直接表达^[9]。本研究利用基因重组技术成功克隆了 Lfcin B 基因, 在已知的 Lfcin B 序列的基础上, 根据密码子的兼并性改造个别碱基, 确保编码序列的稳定性。载体 pET-28a(+) 是一种带有 His-Tag 的表达载体, 可高效克隆及表达的质粒; BL21 菌株转化效率高, 并可高拷贝表达质粒, 并含有用于高效表达克隆于 pET-

28a(+) 的 T7 噬菌体启动子的表达载体的基因。因此, 本研究以 pET-28a(+) 为载体, 与靶基因克隆后, 先转化 HS996 大肠杆菌菌株内, 提取质粒后进行酶切鉴定, 然后再转化人 BL21 菌株内, 对诱导剂 IPTG 浓度、起始诱导菌浓度、宿主菌种类等对系统进行了优化, 进行靶基因的高效表达^[2]。由于 Lfcin B 的分子量只有 3.1kD, 使用常规的 SDS-PAGE 方法不能实现 Lfcin B 的分离, 本实验采用改进的 Tricine-SDS-PAGE 方法分析工程菌的表达产物, 成功地分离了具有生物活性的 Lfcin B。

目前国内关于 Lfcin B 克隆及应用的研究较少, 本研究对 Lfcin B 基因进行了大肠杆菌表达系统表达尝试, 成功克隆了牛乳铁蛋白素基因, 为研究其它动物的乳铁蛋白素基因进行了初步探索, 为其它乳铁蛋白素的生产提供了一条可行的路径。得到的 Lfcin B 为可溶性蛋白, 无需复性, 仍保持其生物活性, 具有重要的生物学功能。由于目前市场上牛乳铁蛋白素价格非常高, 而且尚无商品化的牛乳铁蛋白素抗体, 因此本实验中采用体外抑菌实验进行粗略活性检测。

利用基因工程手段生产乳铁蛋白素, 不但可以提高 Lfcin 的生产效率, 降低成本, 而且可以改造 Lfcin 和设计新抗菌肽分子, 使之成为新一代肽类抗菌药的来源, 为绿色畜牧业以及营养健康服务。

参考文献:

- [1] SCHIBILI D J, VOGEL P M, HANS J. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles [J]. FEBS Letters, 1999, 446: 213-217.
- [2] KIM HK, CHUN D S, KIM J S, et al. Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 19: 1-9.
- [3] BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUDHIM K, et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin [J]. Biophys Acta, 1992, 1121: 130-136.
- [4] WAKABAYASHI H, UCHIDA K, YAMAUCHI K, et al. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 46: 595-601.
- [5] SCHAGGER H, VON-JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J]. Anal Biochem, 1987, 166: 368-379.
- [6] 马歇尔 D R, 门永 J T, 布格斯 R R, 等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南 [M]. 2版. 朱厚础, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2000: 256-259.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2000.
- [8] 黄海青, 汪以真. 乳铁蛋白素的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2004: 38 (6): 15-18.
- [9] PRASAD V, SATYAVATHI V V, SANJAYA, et al. Expression of biologically active hemagglutinin-neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus in transgenic pigeonpea [*Ca. janus ca. jan* (L) Millsp] [J]. Plant Science, 2004, 166 (1): 199-205.