

单核细胞增多性李斯特菌 p60 蛋白 表达条件的优化

吕 添, 曹正茂, 武海涛, 王小红 *

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 在成功构建重组表达载体 pET-28a-p60 和获得重组宿主菌 *E.coli* BL21(DE3) 的基础上, 对重组宿主菌 *E.coli* BL21(DE3) 进行表达 p60 蛋白条件的优化研究。结果表明: 将重组大肠杆菌培养至 OD_{600nm} 达 0.7~0.8 左右时, 加入浓度为 1mmol/L 的异丙基- β -D- 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), 在摇床温度为 25℃, 转速为 150r/min 条件下诱导表达 6h, 可得到重组表达的 p60 蛋白占总蛋白的比例为 42.32%, 其中可溶性蛋白占总 p60 蛋白的比例为 85.36% 左右, 为 p60 蛋白诱导表达的最优条件。

关键词: 单核细胞增多性李斯特菌; p60 蛋白; 表达条件; 优化

Optimization of Expression Conditions for *Listeria monocytogenes* p60 Protein

LÜ Tian, CAO Zheng-mao, WU Hai-tao, WANG Xiao-hong*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this study, the optimal conditions for the expression of *Listeria monocytogenes* p60 protein, for which the recombinant expression vector pET-28a-p60 and the recombinant *E. coli* BL21(DE3) host strain were available, were investigated. The results showed that the optimal expression process determined was that the host strain was enriched to a OD_{600nm} value between 0.7 and 0.8, and IPTG was then added to a final concentration of 1 mmol/L, followed by 6 h expression on a shake table with a shaking speed of 150 r/min at 25 °C, and that after the expression, the content of p60 protein as a percentage of total protein content was 42.32%, and soluble protein occupied around 85.36% of the total p60 protein.

Key words: *Listeria monocytogenes*; p60 protein; expression condition; optimization

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0160-04

单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是李斯特菌属(*Listeria*)中最重要的食源性病原菌^[1], 呈世界性分布。该菌具有低温生长的特性, 在冷藏食品中容易达到感染致病所需的菌量, 是冷藏食品和即食食品污染的重要致病菌之一^[2]。LM 可导致人和动物的败血症、脑膜炎及流产等, 病死率高达 30%~70%^[3-4]。因此, 建立快速而有效的 LM 检测方法是当前针对冷藏食品安全的研究热点之一。LM 是典型的胞内寄生菌, 由其主要的毒力因子 *iap* 基因编码的 p60 蛋白, 是 LM 的保护性免疫中一个重要的抗原成分, 也能刺激机体 B 细胞和 T 细胞产生免疫反应, 并与该菌的侵袭性密切相关^[5-6]。p60 蛋白分子质量为 60kD, 由 478 个氨基酸残基所组成, 含有一个 Thr-Asn 的重复序列区域, 具有水解酶和酰胺

酶活性, 其 N 端和 C 端区域都具有高度的保守性, 是目前研究 LM 新型疫苗及建立快速检测方法的首选对象^[7]。为此, 国内外学者根据单增李斯特菌 *iap* 基因的序列, 利用分子生物学的方法对其表达的 p60 蛋白进行克隆表达方面的研究^[8-9], 但对表达菌株培养表达 p60 蛋白的条件研究比较少。

本研究在成功构建重组表达载体 pET-28a-p60 并转入宿主菌 *E.coli* BL21(DE3) 的基础上^[10], 进一步研究与重组菌的高效表达相关的几个重要培养条件, 如诱导剂浓度、诱导时机、生长环境的温度、诱导时间以及诱导过程中氧气含量等对 p60 蛋白表达的影响。旨在用最经济的方法大量制备 p60 蛋白, 并在提高表达量的前提下, 尽量让目的蛋白以可溶性形式表达, 减少无活性

收稿日期: 2010-01-24

基金项目: 华中农业大学“国家大学生创新性实验计划”资助项目(200837)

作者简介: 吕添(1989—), 男, 本科生, 研究方向为食品安全。E-mail: lvtian@webmail.hzau.edu.cn

* 通信作者: 王小红(1970—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物和食品安全。E-mail: wxh@mail.hzau.edu.cn

的不可溶的包涵体的产生,同时也免去变性与复性的纯化过程,使蛋白纯化更简便、更经济,为进一步研究 p60 蛋白的结构、功能和建立李斯特菌快速免疫检测方法提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种

重组表达载体 pET-28a-iap 和重组宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 由本实验室构建并保存^[10]。

1.1.2 试剂

异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG) Sigma 公司,卡那霉素(Kanamycin) 昆明杰泽生物技术有限公司;蛋白质分子质量 Marker Fermentas 公司;其余均为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器与仪器

VD-1320 超净工作台 哈尔滨东联电子有限公司;722N 可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;超声波破碎仪 美国 Sonics and Materials 公司;迷你型垂直板电泳型凝胶电泳仪 北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 重组菌的培养

无菌操作条件下,将重组菌 *E.coli* BL21(DE3)接种于 5mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37℃、200r/min 振荡培养 12h 后,将培养物按体积比 1:100 接种于 50mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37℃、200r/min 继续振荡培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右,加入一定量的 IPTG 进行诱导表达。

1.2.2 诱导时机对蛋白表达量的影响

分别在重组菌培养至 OD_{600nm} 值为 0.16、0.33、0.54、0.77、1.09、1.36 时加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L,37℃、200r/min 振荡培养 5h 后,取培养液于离心管中,5000r/min 离心 5min 收集菌体。沉淀用 0.02mol/L pH7.4 PBS 缓冲液重悬,按体积比 4:1 加入 5 × 上样缓冲液,于沸水中煮 5min 后将样品进行不连续 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 5%、分离胶 12%)。电泳后的凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色液于摇床上振荡 30min 进行染色,然后用 0.5mol/L NaCl 脱色液进行多次脱色至背景色被脱去^[11]。脱色后的凝胶于凝胶成像系统下拍照,使用 Bandscan^[12] 和 Quantity one^[13] 软件对结果进行分析。

1.2.3 诱导剂浓度对蛋白表达量的影响

在重组菌培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右时,将培养液在超净工作台中分装于无菌三角瓶中,加入终浓度分别为 0、0.001、0.01、0.1、0.25、0.5、1、2、5mmol/L

的 IPTG,37℃、200r/min 振荡培养 5h 后,按照 1.2.2 节的方法收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 诱导时间对蛋白表达量的影响

将重组菌培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右时,将培养液在超净工作台中分装于无菌三角瓶中,加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L,分别于 37℃、200r/min 振荡培养 0、1、2、3、4、5、6、7h 后取出,按照 1.2.2 节的方法收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 诱导温度对蛋白表达量及可溶性的影响

将重组菌培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右时,将培养液在超净工作台中分装于无菌三角瓶中,加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L,分别于 37、30、25℃ 下 200r/min 振荡培养 5h,离心收集菌体,加入 10mL 0.02mol/L pH7.4 PBS 缓冲液重悬,置于冰浴中用超声探头进行超声波间歇破碎 15min(超声 5s,间隔 5s),8000r/min 离心 30min 分离上清和沉淀,将上清转移至另一容器,沉淀用 10mL 0.02mol/L pH7.4 PBS 缓冲液进行重悬,各取 20μL 加入 5μL 5 × 上样缓冲液后进行不连续 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 摇床转速对蛋白表达量及可溶性的影响

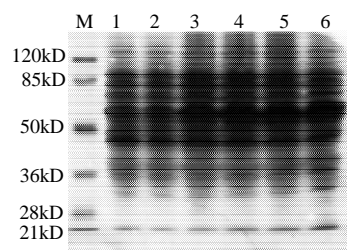
将重组菌培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右时,将培养液在超净工作台中分装于无菌三角瓶中,加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L,在 30℃ 下分别于 100、150、200r/min 振荡培养 5h,离心收集菌体,按 1.2.5 节中的操作对菌体进行超声处理和 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.7 最佳诱导条件下 p60 蛋白的表达分析

根据上述实验结果确定最佳诱导条件,并在此条件下进行 p60 蛋白的诱导表达,分析 p60 蛋白的表达量和可溶性。

2 结果与分析

2.1 诱导时机对蛋白表达量的影响



M. Marker; 1~6. OD_{600nm} 值依次为 0.16、0.33、0.54、0.77、1.09、1.36 时加入诱导剂。

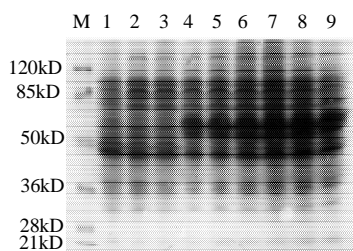
图1 诱导时机对 p60 蛋白表达量的影响 SDS-PAGE 分析

Fig.1 Effect of time of IPTG addition on expression of p60 protein examined by SDS-PAGE

诱导表达结果如图 1 所示,当 OD_{600nm} 值小于 0.77

时, p60 蛋白表达量随 OD_{600nm} 值增大而增加, 可达到最大值 38.3%, 而 OD_{600nm} 值继续增大时, 表达量反而下降到 36.2%。表明过早加入诱导剂, 会使菌体很早就诱导表达 p60 蛋白, 增加菌体的负担, 不利于细菌的生长繁殖。而加入过迟, 细菌生长开始次级代谢, 且培养基中营养成分不够, 不利于蛋白的诱导表达。因此在 OD_{600nm} 为 0.77 时, 最适宜菌体的生长与 p60 蛋白的诱导表达。

2.2 不同 IPTG 浓度对蛋白表达量的影响



M. Marker; 1~9. 添加的诱导剂浓度依次为 0、0.001、0.01、0.1、0.25、0.5、1、2、5mmol/L。

图2 IPTG 浓度对 p60 蛋白表达量影响的 SDS-PAGE 分析

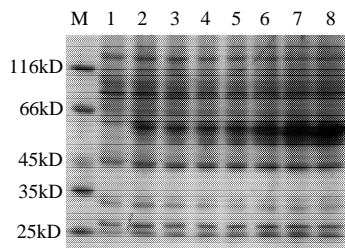
Fig.2 Effect of final IPTG concentration on expression of p60 protein examined by SDS-PAGE

如图 2 所示, IPTG 浓度为 0~1mmol/L 时, 蛋白表达量随诱导剂浓度增大而增加, p60 蛋白表达量可达到 38.9%, 但再增加 IPTG 浓度, 表达量反而下降到 36.1%。说明当 IPTG 浓度增加时, 促进 p60 蛋白的诱导表达。但浓度过高, 会使菌体负荷过大, 对菌体造成了毒害作用, 不利于菌体的生长, 而使蛋白表达量减少。所以 IPTG 诱导 p60 蛋白表达的最佳浓度可选择为 1mmol/L。

2.3 诱导时间对蛋白表达量的影响

如图 3 所示, 在加入 IPTG 进行诱导后, 蛋白的表达量随时间的延长而增加, 当诱导时间在 0~6h 之间时, 蛋白表达量与菌体量均随时间延长而增加, 在 6h 时表达量达到 40.3%, 菌体量达到 6.49g/L, 而 6~7h 之

间, 表达量略微增加到 40.8%, 但菌体量下降到 6.41g/L。可能是由于重组菌在诱导后, 大量的能量会消耗在外源蛋白的表达上, 致使菌体的生长提前进入衰亡期, 如果不及时收获会造成溶菌现象的发生。因此选择最佳诱导表达时间为 6h。



M. Marker; 1~8. 诱导表达时间依次为 0、1、2、3、4、5、6、7h。

图3 诱导时间对 p60 蛋白表达量影响的分析

Fig.3 Effect of induction time on expression of p60 protein examined by SDS-PAGE

2.4 诱导温度对蛋白表达量及表达形式的影响

实验过程中为了比较不同培养温度对 p60 蛋白表达的影响, 将可溶性 p60 蛋白生产能力定义为上清液中 p60 蛋白占总蛋白含量 \times 终浓度 OD_{600nm} 值^[14-15], 以观察可溶性 p60 蛋白表达量的变化。如表 1 所示, 随着温度的升高, 上清液中 p60 蛋白在总蛋白中的含量逐渐降低, 在 37℃ 时达 13.91%, 而在沉淀中的含量逐渐增加到 9.24%。随着温度的升高, 菌体浓度 (OD_{600nm} 值) 先增大后减小, 这说明重组菌在较高的温度下生长较快, 适当降低温度有利于产物的表达和增加产物可溶性。而温度过高时, 菌体的比生长速率较高, 培养过程中容易积累代谢副产物, 反过来又抑制菌体的生长和目的产物的表达^[16-17], 综合比较温度对菌体生长速率与蛋白可溶性的影响, 选择 25℃ 为最佳诱导温度。

2.5 摇床转速对蛋白表达量及表达形式的影响

表1 诱导温度对 p60 蛋白表达量及可溶性的影响

Table 1 Effect of induction temperature on production and solubility of p60 protein

温度/℃	OD_{600nm}	上清液中p60蛋白含量/%	上清液中p60蛋白占总蛋白比例/%	沉淀中p60蛋白含量/%	沉淀中p60蛋白占总蛋白比例/%	可溶性p60蛋白生产能力
25	1.875	21.92	18.24	24.91	4.17	0.34
30	2.075	18.96	14.81	29.91	6.54	0.30
37	1.76	20.46	13.91	28.79	9.24	0.24

表2 摇床转速对 p60 蛋白表达量及可溶性的影响

Table 2 Effect of shaker speed on production and solubility of p60 protein

转速/(r/min)	OD_{600nm}	上清液中p60蛋白含量/%	上清液中p60蛋白占总蛋白比例/%	沉淀中p60蛋白含量/%	沉淀中p60蛋白占总蛋白比例/%	可溶性p60蛋白生产能力
100	1.89	30.98	25.85	34.23	5.68	0.48
150	2.11	27.57	23.35	37.09	5.87	0.49
200	1.76	19.34	15.43	38.05	8.89	0.27

如表2所示,随着摇床转速的增加,上清液中p60蛋白占总蛋白的含量逐渐降低,在200r/min时达15.43%,而在沉淀中的含量逐渐增加到8.89%。培养时的转速会影响培养基中的溶氧量、影响细菌的生长速率和蛋白表达的速率,当转速为150r/min时,供氧量适中,满足了重组菌的生长需求,所以重组菌的生长和重组蛋白的表达情况良好,当低转速(100r/min)时,不能保证充足的供氧,重组菌生长慢,p60蛋白表达情况不佳。当高转速(200r/min)时,供氧量过大,菌体的比生长速率较高,培养过程中容易积累代谢副产物,且因生长速率过快,容易使目的蛋白没有足够的时间进行正确折叠而形成包涵体,影响目的蛋白的可溶性。综合比较转速对菌体生长速率与蛋白可溶性的影响,选择150r/min为诱导培养条件下的最佳转速。

2.6 最佳诱导条件下的p60蛋白的表达分析

综合上述各优化条件,选择在重组菌OD_{600nm}为0.7~0.8时,加入浓度为1mmol/L的IPTG,在温度为25℃,摇床转速为150r/min培养条件下,诱导表达6h,可得到重组表达的p60蛋白占总蛋白的含量为42.32%,其中可溶性蛋白占总p60蛋白含量的85.36%左右,为p60蛋白诱导表达的最优条件。

3 讨 论

基因工程菌株培养与发酵的目的是希望其外源基因能够高水平表达,以便获得大量的外源基因产物。大肠杆菌表达系统表达的外源蛋白可占菌体总蛋白的10%~50%,其表达产物通常以可溶和不可溶(即包涵体)形式存在,为了提高目的蛋白的活性和质量,就要选择合适的条件,尽量让目的蛋白以可溶形式表达,减少无活性的不可溶的包涵体的产生^[18],同时也免去了变性与复性的纯化过程,使蛋白纯化更简便、更经济。另外,可溶表达形式的外源蛋白在大肠杆菌细胞中能正确折叠,从而获得特定空间结构和生物功能,最终获得高纯度、高活性的目的蛋白^[19]。

本研究在成功构建重组表达载体pET-28a-p60和获得重组宿主菌BL21(DE3)的基础上^[20],进一步研究重组菌的培养条件,对重组菌的诱导表达p60蛋白时的诱导时机、诱导剂浓度、诱导时间、诱导温度和摇床转速5个因素进行优化,获得了p60蛋白诱导表达的最优条件,

得到的重组p60蛋白有较高的表达量和较好的可溶性。

参考文献:

- [1] CHI-ZHANG Y D, YAM K L, CHIKINDAS M L, et al. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(1): 15-22.
- [2] 李小春, 陈慧燕, 李毅, 等. 速冻食品中李斯特菌检测方法探讨与结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 88-89.
- [3] 余淑冰, 梁景涛, 周强忠, 等. 单核细胞增生李斯特菌污染调查及快速检验方法的比较[J]. 中华预防医学杂志, 1998, 32(4): 240-241.
- [4] ROWAN N J, CANDLISH A G, BUBERT A, et al. Virulent rough filaments of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples secreting wild-type levels of cell-free p60 protein[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(7): 2643-2648.
- [5] BUBERT A, SCHUBERT P, KOHLER S, et al. Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L.monocytogenes* p60 proteins[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(9): 3120-3127.
- [6] BUBERT A, HEIN I. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4688-4692.
- [7] 江玲丽. 单核细胞增生性李斯特菌的主要毒力基因分析及其重组菌构建与免疫原性[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [8] 王俊霞. 单核细胞增生性李斯特菌p60蛋白在酵母细胞中的表达及其免疫原性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [9] YU K Y, NOH Y, CHUNG M, et al. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes*[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, 11(3): 446-451.
- [10] 吕添, 武海涛, 曹正茂, 等. 单核细胞增生性李斯特菌*iap*基因的克隆、表达与p60蛋白的纯化[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 157-161.
- [11] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 54-105.
- [12] 刘照惠, 邵丽君, 李猛, 等. HBV PreS2-MBP融合蛋白在大肠杆菌中表达条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(6): 435-438.
- [13] 王妍, 林青, 谢金梅, 等. 薄层色谱结合凝胶成像系统测定小鼠表皮神经酰胺含量[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(4): 281-282.
- [14] 杨梅, 程安春, 汪铭书, 等. 重组鸭 α -干扰素基因工程菌表达条件的研究[J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(3): 337-342.
- [15] 张怡洁. 重组大肠杆菌DH5 α 生产rNGR-Thm-5工艺的研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [16] 叶姣, 陈长华, 夏杰, 等. 温度对重组大肠杆菌生长及外源蛋白表达的影响[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(2): 364-367.
- [17] 任增亮, 堵国成, 陈坚, 等. 大肠杆菌高效表达重组蛋白策略[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 103-109.
- [18] 董燕, 王捷, 谭刘欣, 等. 重组人骨唾液酸蛋白的纯化及生物学活性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(2): 71-74.
- [19] 李泽鸿, 岳玉环, 吴广谋, 等. 白喉毒素DAB₃₈₉-(Gly₄Ser)₂- α -促黑激素工程菌发酵条件的初步研究[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(1): 55-58.