

高分子量 RGD-蛛丝蛋白重组体的构建、高密度发酵及纯化

Construction , Fermentation and Purification of High Polymer Spider Dragline Silk Protein Containing RGD Peptide

阮超然 ,黄晶星 ,魏梅红 ,李 敏*

RUAN Chao-Ran ,HUANG Jing-Xing ,WEI Mei-Hong and LI Min*

福建师范大学生命科学学院 ,福州 350108

College of Life Sciences ,Fujian Normal University ,Fuzhou 350108 ,China

摘 要 蜘蛛丝是自然界综合性能优良的天然蛋白质纤维之一 ,因其具有良好的生物相容性和可降解性在生物医学领域具有潜在的应用前景。在本室已经构建的 RGD-蜘蛛拖丝蛋白基因 16 多聚体基础上 ,通过首尾相连、倍加等方法进一步多聚化 ,得到 RGD-蜘蛛拖丝蛋白基因 32 和 64 多聚体 ,分别将这两种多聚体与原核高效表达载体 pET-30a(+)连接 ,转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS ,得到的 32 多聚体表达重组子命名为 pNSR32 ,64 多聚体表达重组子命名为 pNSR64。通过酶切、琼脂糖电泳鉴定及对目的片段的测序均与理论值相符。将 32 和 64 多聚体基因序列注册 GenBank ,序列号分别为 DQ469929 和 DQ837297。重组体 pNSR32 和 pNSR64 经 IPTG 诱导表达 ,SDS-PAGE 图谱显示表达产物分子量分别为 102kD 和 196.6kD ,与天然蛛丝蛋白分子量接近并与理论值相吻合。高分子量的蛛丝蛋白在原核生物成功实现高效表达 ,在国内外尚未见报道。在此基础上对 pNSR32 工程菌进行高密度发酵 ,建立了简单高效的目的蛋白纯化工艺。

关键词 RGD ,蛛丝蛋白 ,高密度发酵 ,纯化

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0858-04

Abstract Spider silk is a natural protein fibroin with excellent character as it is light and tenacious. It has a wild potential applications in the biomedical field due to its good biocompatibility and degradation. Arginine-glycine-aspartic acid(RGD) is a highly conserved amino acid sequence of many adhesion protein. Biological materials binding with RGD peptide in the surface can promote cells adhesion , migration and proliferation. Our lab had constructed the 16 muhimers with the introduced RGD peptide codons which involve cell adhesion for the first time. It was found that the mechanical capability of the 16 mulimer protein was very limited because of the big gap in molecular weight with nature spider proteins when it was used to made biomaterial scaffold. In this paper ,based on the 16 multimers of the highly ,repetitive sequence of spider dragline silk and with RGD peptide condons which has been constructed by our lab forestall ,it was used to construct the 32 and 64 multimers sequence of spider dragline silk by the strategy of“ head to tail ”. The 32 and 64 multimers were ligated into prokaryotic expression vector pET-30a ,and then the BL21(DE3)pLysS. The fragments were in agreement with the desired through digestion ,agarose gel electrophoresis respectively. By registration into the GenBank data-base ,the serial numbers of DQ469929 and DQ837297 were gained respectively. The expression of recombinant protein was introduced by the addition of IPTG. SDS-PAGE analysis shows

Received : January 4 ,2007 ; Accepted : March 12 ,2007 .

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(Nos.30370414 ,30570956).

* Corresponding author. E-mail : mli@fjnu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos.30370414 ,30570956)资助。

that the molecular weight of products expressed here are 102kD and 196.6kD in agreement with the desired respectively. It was the first time for the high polymer spider dragline silk protein expressed in prokaryotic biology. Furthermore, a larger quantity of synthetical proteins with high density fermentation were searched after, and a suit of high efficient purification methods for 32 multimers protein were established.

Key words RGD peptide, silk protein, high cell density fermentation, purification

蜘蛛丝既轻又坚韧,所具有的强固性和柔韧性是其他人造纤维材料无法同时比拟的,是自然界性能最好的天然蛋白质纤维之一。蜘蛛丝蛋白在 300℃ 以上才开始变黄,在 -40℃ 还具有弹性,其韧度为制造防弹背心的 Kelvar 纤维的 5 倍,强度为钢铁的 5 倍^[1],且蜘蛛丝生物相容性良好,这些特性使蛛丝在工业、军事和生物医学等领域具有广泛的应用前景,可作为防弹衣、降落伞及外科手术缝合的材料,也可作为细胞培养的合适的基质、组织工程所需的临时支架以及非毒性和可生物降解的生物材料如细胞膜,还可用于介导药物对特殊的细胞组织和器官进行治疗等^[2]。

精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)是许多粘附蛋白的高度保守氨基酸序列,生物材料表面结合 RGD 肽有助于细胞在材料上的粘附、迁移和增殖。本室先前运用基因工程的方法,将具有特定信号识别功能的 RGD 三肽模体与蛛丝蛋白基因重组,构建了具有 RGD 三肽编码子和蛛丝蛋白基因 16 多聚体的克隆重组子 pDSR16,首次生物合成 RGD 三肽和蛛丝蛋白 16 多聚体(pNSR16)^[3]。但在利用 16 多聚体重组蛛丝蛋白作原料制备生物材料的研究中,观察到因其与天然蛛丝蛋白在分子量上的差距较大,影响了材料性能的表现。本文在已构建的 RGD-蛛丝蛋白 16 多聚体的基础上,通过倍比加聚生物合成了分子量接近天然蜘蛛丝蛋白的 RGD-蛛丝蛋白 32 多聚体(pNSR32)和 64 多聚体(pNSR64)。为了规模化制备大量的重组蛋白,本文在摇瓶培养的基础上,摸索建立了 pNSR32 工程菌的高密度发酵条件和目的蛋白纯化工艺。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

pDSR16/TG1、pET-30a/BL21(DE3) 宿主菌 TG1 和 BL21(DE3)pLysS 均为本室保存。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Sca* I、*Bam*HI、*Hind*III、T4 连接酶、小量质粒抽提试剂盒购于 TaKaRa 公司, *Kpn*21 及 *Cfr*9I 购于上海生工有限公司,次高蛋白质分子

量标准购于华美生物工程有限公司, IPTG、氨苄青霉素购于 Sigma 公司, DNA 片段回收试剂盒购于北京天根生物有限公司。

1.3 培养基^[4]

发酵培养基(g/L):葡萄糖 5,酵母汁 5, (NH₄)₂HPO₄ 4, KH₂PO₄ 13.3, 柠檬酸 1.7, MgSO₄·7H₂O 1.2, 微量元素(g/L): FeSO₄·7H₂O 0.1, CaCl₂·2H₂O 0.02, ZnSO₄·7H₂O 0.0225, MnSO₄·4H₂O 0.005, (NH₄)₆MoO₄·4H₂O 0.001, Na₂B₄O₇·H₂O 0.0002, CuSO₄·H₂O 0.01。

补料培养基(g/L):葡萄糖 600, MgSO₄·7H₂O 20, 酵母汁 100。

1.4 RGD-蛛丝蛋白基因 32 和 64 多聚体重组子的构建

分别用 *Xma* I / *Sca* I 和 *Bsp*E I / *Sca* I 双酶解 pSDR16 DNA,电泳,胶回收含有 16 多聚体基因的 *Xma* I - *Sca* I 酶解片段和一个基因单体的 *Sca* I - *Bsp*E 酶解片段,连接,转化 TG1,重组子 Amp 抗性筛选,得到 32 多聚体克隆重组子,在此基础上重复上述过程,得到 64 多聚体克隆重组子,分别命名为 pDSR32 和 pDSR64。分别对 pDSR32 和 pDSR64 用 *Bam*HI / *Hind*III 双酶解,胶回收后与经同样双酶解的 pET30a(+)连接,转化 BL21(DE3)pLysS,得到多聚体表达重组子,分别命名为 pNSR32 和 pNSR64。

1.5 重组子的筛选、鉴定和测序

分别挑取 pNSR32 和 pNSR64 单克隆于 5mL LB 液体培养基(含 30μg/mL 卡那霉素),37℃ 过夜振荡培养,质粒抽提试剂盒纯化质粒。分别用 *Bam*HI / *Hind*III 双酶解,1% 的琼脂糖电泳鉴定,将 pNSR32 和 pNSR64 分别 DNA 测序。

1.6 pNSR32 和 pNSR64 工程菌的摇瓶表达

分别挑取 pNSR32 和 pNSR64 工程菌落,37℃ 培养过夜,按 1:50 比例转入 LB 培养基(含 30μg/mL 卡那霉素和 34μg/mL 氯霉素),37℃ 培养至 OD₆₀₀ 约 0.6。于 30℃ 加 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L,诱导表达 5h 后,离心收集菌体。诱导期间每小时取样 5mL,用 SDS 上样缓冲液处理,电泳。

1.7 pNSR32 工程菌的分批补料高密度发酵

1.7.1 一级菌种制备 :pNSR32 菌株活化后单菌落接入到 LB 培养基(含 30μg/mL 卡那霉素和 34μg/mL 氯霉素) 37℃ 200r/min 培养 7~8h。

1.7.2 二级菌种制备 :以 2% 接种量将一级种子接入到 LB 培养基(含 30μg/mL 卡那霉素和 34μg/mL 氯霉素) 37℃ 200r/min 培养过夜。

1.7.3 GBCS-10B/1 型发酵罐中分批补料培养 :以 4% 接种量将二级种子接入到 LB 培养基(含 30 μg/mL 卡那霉素和 34μg/mL 氯霉素) 37℃ 分批补料培养。4h 后开始流加补料培养基 ,补料速度以 5~10mL/h 逐渐递加 37℃ 培养 14h ,加入终浓度 0.4mmol/L IPTG 和 0.2%(W/V)甘氨酸/丙氨酸 ,于 30℃ 诱导 5h。

1.8 pNSR32 重组蛋白的分离与纯化

离心收集菌体 ,以 1:6(W/V)比例混悬于缓冲液 (100mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O , 1mmol/L EDTA , 10mmol/L Tris-Cl pH 8.5) ,冰浴超声 8min ,离心。上清液用 10mol/L NaOH 调 pH 至 9.1 ,4℃ 放置 2h ,离心。上清液用 3mol/L HCl 调 pH 至 5.6 ,4℃ 放置 2h ,离心 ,上清液在 55~60℃ 水浴 8min ,离心。上清液用 10mol/L NaOH 调 pH 至 6.5 ,加入饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液至 15% 饱和度 ,4℃ 放置 2h ,离心 ,沉淀即为 pNSR32 重组蛋白。

2 结果

2.1 pDSR32 和 pDSR64 工程菌的构建及鉴定

Xma I / *Sca* I 和 *Bsp* E I / *Sca* I 双酶解 pDSR16 , 分别获得蛛丝蛋白基因 16 多聚体的两个酶切片段。由于具有相互匹配的 CCGG 粘性粘端的特点 ,通过头尾相连接形成 32 多聚体的克隆重组子 ,命名为 pDSR32。同样的方法构建得到 pDSR64。新形成的杂合位点不再被 *Xma* I、*Bsp* E I 切割。对所构建的 pDSR32 和 pDSR64 用 *Bam* H I / *Hind* III 双酶解 ,电泳鉴定。本实验得到的 32 和 64 多聚体两个片段长度分别为 3.2kb 和 6.4kb ,与理论值相符。

2.2 pNSR32 和 pNSR64 工程菌的构建及鉴定

Bam H I 酶解 pNSR32 和 pNSR64 ,产生的片段大小分别为 8.6kb 与 11.8kb ,图 1 箭头所示为目的条带 ,与理论值相吻合。测序的结果亦与理论值一致。分别将 pNSR32 和 pNSR64 序列登入 GenBank ,注册序列号分别为 :DQ469929 , DQ837297。

2.3 pNSR32 和 pNSR64 重组蛋白在大肠杆菌中的表达及鉴定

7% SDS-PAGE 电泳(图 2)显示 pNSR32 和

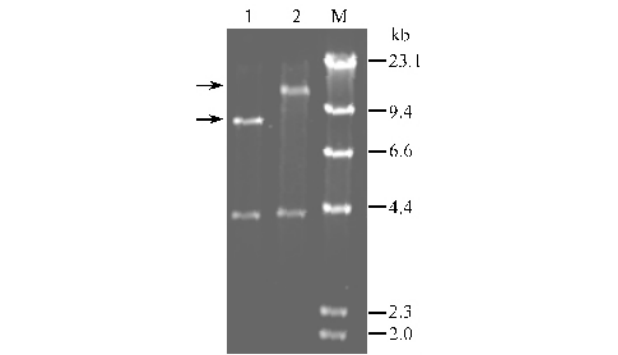


图 1 pNSR32 和 pNSR64 酶切电泳图谱
Fig. 1 pNSR32 and pNSR64 agarose electrophoresis
1 : pNSR32 + plysS/ *Bam* H I ; 2 : pNSR64 + plysS/ *Bam* H I ;
M λDNA/ *Hind* III marker.

pNSR64 表达产物 ,分子量分别为 102kD 和 196.6kD ,与理论值吻合。

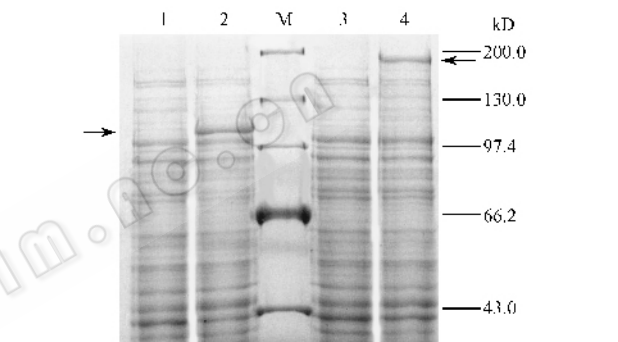


图 2 pNSR32 及 pNSR64 重组蛋白表达电泳
Fig. 2 The expression of pNSR32 and pNSR64 recombinant protein

1 , 2 : pNSR32 expressed before and after induction 5h respectively , arrow point to recombinant protein ; M : protein molecular weight marker ; 3 , 4 : pNSR64 expressed before and after induction 5h respectively , arrow point to recombinant protein.

2.4 pNSR32 工程菌分批补料高密度发酵

pNSR32 菌株的生长和比生长速率曲线见图 3。

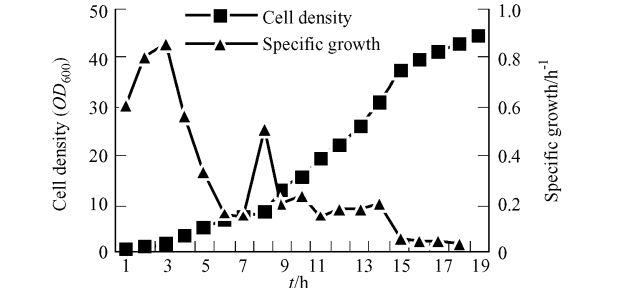


图 3 pNSR32 工程菌的生长曲线和比生长速率曲线
Fig. 3 Bacterial growth and specific growth rate curve of pNSR32

0~4h 细菌处于生长延滞期 ,在此期间菌体密度较小 ,发酵培养基中残留营养成分较多 ,不添加补料。4~14h 细胞进入对数生长期 ,生长旺盛 ,菌体密度提高 ,溶氧下降较快 ,开始以 10mL/h 的速度流

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

加补料。随着菌体密度不断增加,补料速度也随之提高,根据恒 pH 反馈法确定以 5~10 mL/h 的速度递增补料量。14h 添加终浓度为 0.4 mmol/L IPTG, 0.2% Ala/Gly (W/V) 目的蛋白前体,降低温度至 30℃ 诱导,诱导后菌体密度有所上升,比生长速率下降至 0.032。诱导 4h 后重组蛋白表达比率约 10%。

2.5 pNSR32 重组蛋白的分离与纯化

利用蛛丝蛋白较强的耐热性通过调碱、调酸、和 58℃ 加热等步骤去除杂蛋白,调至等电点,15% 饱和度的硫酸铵沉淀目的蛋白,纯度达 92% 以上(图 4)。

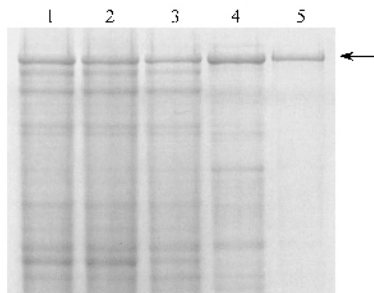


图 4 pNSR32 蛛丝蛋白纯化产物电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE of pNSR32 protein

1: supernatant of pNSR32 bacterium; 2: supernatant after being denatured with alkali; 3: supernatant after being denatured with acerbity; 4: supernatant after being heated at 58℃; 5: products precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with 15% saturation.

3 讨论

文献报道蛛丝蛋白具有高度的重复性^[5,6],基本结构为 Gly-Pro-Gly-x-x (x 为 Ser, Gly, Tyr), Gly-Gly-x, (Ala)_{5~12}^[7,8]。本室先前根据蛛丝蛋白这一特性合成出了含 RGD 序列的蛛丝蛋白 DNA 单体,分子量为 112bp,通过倍比加聚得到了 16 多聚体。本文在此基础上进一步倍比加聚,首次合成了蛛丝蛋白高聚物 pNSR32 和 pNSR64,并在大肠杆菌中实现高效表达,摇瓶培养目的蛋白表达比率分别为 19.5% 和 16.3%。

在摇瓶培养的基础上进行分批补料高密度发酵,发酵方法基本上参照本室的方法^[4]略有改进。采取先在 37℃ 下让菌体充分增长至一定的密度 (OD_{600} 约 40) 开始降温诱导。参考摇瓶培养的结果,最终选定 30℃ 作为诱导温度。菌体在较低温度下,菌体自身生长相对缓慢(比生长速率下降至 0.032) 转而合成外源基因,添加 0.2% 的甘氨酸/丙氨酸 (W/V) 前体有利于蛛丝蛋白高聚物的表达。

对目的蛋白的纯化条件进行初步摸索,将 pNSR32 序列输入数据库获得理论 pI 为 6.5。由于

本室先前将 pNSR16 输入数据库获得 pI 理论值为 6.37 与等电聚焦测得实际值为 6.2^[3] 相接近,故我们认为 pNSR32 实际 pI 在 6.5 左右。利用目的蛋白与杂蛋白 pI 差异和蜘蛛丝蛋白具有很强的热稳定性这一特点,参照本室方法^[3],通过调碱、调酸、加热变性三个步骤去除杂蛋白。之后将 pH 调至等电点,用饱和的硫酸铵沉淀目的蛋白。

此外还观察到 pNSR64 工程菌重复序列高达 64 聚体,在高密度发酵时表达量较低而且出现了明显的降解。分析出现这种情况的主要原因有:①蛛丝蛋白基因含有大量的 Gly 和 Ala 编码序列,在表达过程中易造成细胞中 tRNA 的不平衡,导致蛋白质合成提前终止;②所表达的目的蛋白分子量高达 196.6kD,势必对菌体造成过重负荷。有文章报道随着多聚体分子量的增加,表达量明显下降^[9]。本研究也证实了这一点。

目前,我们正在对高分子量的蛛丝蛋白高密度发酵条件作进一步优化,期望重组蛛丝蛋白为生物医学材料方面研究提供物质基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Vollrath F, Knight DP. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 2001 **410**: 541–548.
- [2] Tirrell DA. Putting a new spin on spider silk. *Science* 1996 **271**: 39–40.
- [3] Li M (李敏), Huang JK (黄建坤), Tu GY (涂桂云), et al. Biological synthesis and purification of spider dragline silk protein polymers containing RGD three peptide. *Journal of Biomedical Engineering* (生物医学工程学杂志) 2004 **21**(6): 1006–1010.
- [4] Li M (李敏), Tu GY (涂桂云), Huang ZH (黄智华), et al. Study on the conditions of high density fermentation for the engineering. *Journal of Biomedical Engineering* (生物医学工程学杂志), 2005 **22**(6): 1206–1209.
- [5] Riekel C, Vollrath F. Spider silk fibre extrusion: combined wide- and small-angle X-ray microdiffraction experiments. *International Journal of Biological Macromolecules* 2001 **29**: 203–210.
- [6] Li MZ, Lu SZ, Wu ZY, et al. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. *International Journal of Biological Macromolecules* 2002 **30**: 89–94.
- [7] Hinman MB, Lewis RV. Isolation of a clone encoding a second dragline Silk fibroin. *J Biol Chem* 1992 **267**(27): 19320.
- [8] Xu M, Lewis RV. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci* 1990 **87**(18): 7120.
- [9] Li M (李敏), Zhang WX (章文贤), Huang ZH (黄智华), et al. Study on construct and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002 **18**(3): 331–334.