

人 β 防御素 3 和植物 *des-pGlu1-brazzein* 融合蛋白表达菌的诱导条件优化及其活性分析

李春丽, 徐雪丽, 郑振宇, 赵卫东

河南农业大学牧医工程学院 郑州, 450002

摘要: 对人 β 防御素 3 和植物甜蛋白 *des-pGlu1-Brazzein* 嵌合基因的工程菌株 BL-pET-*hBD₃-Bra* 的 IPTG 诱导表达条件进行了研究, 同时对所表达的目的蛋白进行了纯化和活性分析。IPTG 浓度、诱导时间和诱导温度对菌株生长和目的蛋白表达的试验结果显示: 所取的 IPTG 浓度(0.2~1.0 mmol/L)对菌株生长和目的蛋白的表达无显著影响($P>0.05$); 菌株的生物量随着诱导时间的延长而增加, 6 h 优于 4 h($P<0.01$), 但是蛋白的表达量无明显增加($P>0.05$); 其中温度是重要的影响因素, 在 30°C 诱导时, 目的蛋白的表达量占总蛋白的 35%左右。进一步的研究表明, 菌株在 30°C~32°C 生长, 在 30°C 诱导最优。对目的蛋白的活性分析表明, 所得到的 *hBD₃-Bra* 融合蛋白有甜味, 其甜度大约是蔗糖的 200 倍, 但是其杀菌活性很弱, 经凝血酶切割后, *des-pGlu1-Brazzein* 的甜度大大提高, 大约为蔗糖甜度的 600 倍, 重组 *hBD₃* 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑菌活性。

关键词: 人 β 防御素 3, 植物甜蛋白, 大肠杆菌, 高效表达, 优化

Optimizing Conditions for the Expression of Human β Defensin 3 and *des-pGlu1-Brazzein* in *Escherichia coli* and Analysis of Their Activity

Chunli Li, Xueli Xu, Zhenyu Zheng, and Weidong Zhao

College of Animal and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: The inductive conditions for the flask-shaking of *E.coli* BL21-pET-*hBD₃-Bra* had been optimized, at the same time, the expressed protein had been purified and analyzed. The effect of three factors which were IPTG concentration, induction time and temperature on growth of strain and on the yield of *hBD₃-Bra* was analyzed in detail. The result indicated that the concentration of IPTG had little effect on the growth and the expression of target protein between 0.2~1 mmol/L, Biomass would be improved as time passed, but the target protein didn't increase obviously as the same time. temperature was the most important factor, the expressed level of *hBD₃-Bra*, as high as about 35% of total cell protein, could be gained when strain was induced by IPTG under 30°C. Further analysis showed the best temperature for growth was 30°C~32°C and for expression protein was 30°C. The purified *hBD₃-Bra* has a weak antimicrobial activity, but is 200 times sweeter than that of sucrose. After digested by thrombin and purified by affinity column, the natural *des-pGlu1-Brazzein* also has 600-time sweetness of sucrose, and the recombinant *hBD₃* has a high antimicrobial activity again *E. coli* and *S. aureus*.

Keywords: human beta defensin 3, Brazzein, *E. coli*, recombinant expression, optimization

Received: July 17, 2007; Accepted: September 13, 2007

Supported by: State Education Ministry (No. 207069) and Henan Provincial Natural Science Fund (No. 0324090008).

Corresponding author: Weidong Zhao. Tel: +86-371-63558828; E-mail: zhao1000@henau.edu.cn

国家教育部科学技术研究项目 (No. 207069)和河南省自然科学基金研究项目(No. 0324090008)。

防御素是生物体内具有强烈抗菌作用的一类多肽物质,分子量小、热稳定性强、水溶性好、无免疫原性、抗菌谱广、不易使微生物产生耐药性,具有独特的研究和开发价值^[1-3]。人 β 防御素 3(hBD₃)是 2001 年发现的第三种人源性 β 防御素,与其他发现的人防御素相比,在抗菌活性等方面具有明显的优势,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有明显的抑杀作用^[4-7],有很强的应用价值。植物甜蛋白 *des-pGlu1-brazzein* 是从西非植物 *Pentadiplandra brazzeana* Baillion 的果实中分离得到的一种甜蛋白,由 53 个氨基酸组成,是 Brazzein 的异构体(仅仅缺乏第一个焦谷氨酸),其甜度更高,是 Brazzein 的 2 倍,是目前为止所发现甜蛋白中分子量最小、水溶性最好、甜度最高的蛋白,有望成为一新型甜味剂^[8-10]。防御素和甜蛋白 *des-pGlu1-Brazzein* 虽然具有潜在的应用价值,但是由于两者都难以从正常的机体细胞或是植物组织中大量分离纯化得到,又缺乏切实可行的替代获取途径,从而限制了其在医药、食品等行业的研究和应用。

我们按照细菌密码子的偏爱优化了 hBD₃ 和 *des-pGlu1-Brazzein* 的编码序列,并构建其表达载体 *pET-hBD₃-Bra*,采用严紧控制型菌株 BL21(DE3) *plysS* 作为表达菌株,使其得到了高效表达^[11]。本实验对重组蛋白在大肠杆菌中的 IPTG 诱导表达条件进行了优化并对表达蛋白的活性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株与培养基

含 hBD₃-Bra 成熟区序列的重组表达菌株 BL21-*pET-hBD₃-Bra*。种子培养基和摇瓶发酵培养基均为 LB 液体培养基。

1.1.2 仪器与试剂

低压层析系统购自 Amersham 公司,多功能荧光分析系统购自美国冷泉港仪器公司,冷冻干燥系统购自 Labconco 公司。酶标仪购自美国 Awareness 公司。凝血酶试剂盒购自德国默克公司,BCA 试剂盒购自碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化和培养

将-70℃、15%甘油保存的菌种接种于含 Kan 的

LB 固体培养基平板上培养过夜。取单菌落接种于含 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,37℃ 250 r/min 培养过夜后成为活化种子,以 1.5%的接种量接入含 100 mL 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中进行培养和诱导。

1.2.2 IPTG 诱导 BL21-*pET-hBD₃-Bra* 表达目的蛋白的条件选择

当菌液浓度 OD_{600} 达到 0.6~1.0 进行诱导表达,取常用的温度 30 和 37 以不同的 IPTG 浓度进行诱导表达,终浓度分别为 0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1 mmol/L,在 4 h 和 6 h 分别取样进行生物量测定和 SDS-PAGE 电泳分析,每个实验 2 个重复,求平均值并进行方差分析,以确定适合菌株生长和目的蛋白表达的 IPTG 浓度、诱导时间和温度。最后在在一定范围内筛选最适菌株生长和目的蛋白表达的温度。

1.2.3 菌液生物量的测定

取培养菌液测定 600 nm 光吸收值作为其生物量标志。

1.2.4 融合蛋白表达量的测定

采用多功能荧光分析系统及 Gel-Pro 软件对 SDS-PAGE 电泳结果进行分析,灰度扫描测定目的蛋白的百分比含量及 OD 值,以确定其相对含量和绝对含量。

1.2.5 数据的分析

所得数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

1.2.6 融合蛋白 hBD₃-Bra 的纯化

按照 Amersham 的产品说明操作,提取包涵体后直接进行亲和层析,并在层析柱上复性。洗脱下来的样品用 0.15 mol/L 的 NaCl 透析 2 次,再用双蒸水透析两次后,冷冻干燥。用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测提纯效果。

1.2.7 hBD₃ 和 *des-pGlu1-Brazzein* 的获取

纯化后的融合蛋白 hBD₃-Bra 按照凝血酶试剂盒的说明于 20 酶切 14~16 h,释放的目的蛋白进一步亲和层析纯化后,进行冷冻干燥。

1.2.8 目的蛋白浓度的检测

按照 BCA 试剂盒的说明测定蛋白浓度。

1.2.9 目的蛋白的活性检测

参照文献^[6,12],对重组 hBD₃-Bra 融合蛋白、酶切后带 His-Tag 的重组 hBD₃ 和 *des-pGlu1-Brazzein* 的抑菌活性和蛋白甜度进行检测。

2 结果

2.1 IPTG 浓度、诱导时间和温度的确定

2.1.1 IPTG 浓度、诱导时间和温度对菌株生长的影响

在 30 和 37 分别诱导至 4 h、6 h 测定的生物量结果如图 1 所示。方差分析显示, IPTG 浓度对所收获的生物量无显著影响($P>0.05$), 温度和时间对于生物量有显著影响($P<0.01$), 6 h 时的生物量明显优于 4 h 时($P<0.01$), 30 时的生长明显优于 37 时($P<0.01$), 这和常规大肠杆菌在 37 生长较好不一致, 插入的外源基因可能影响了菌株的一些生理特征。

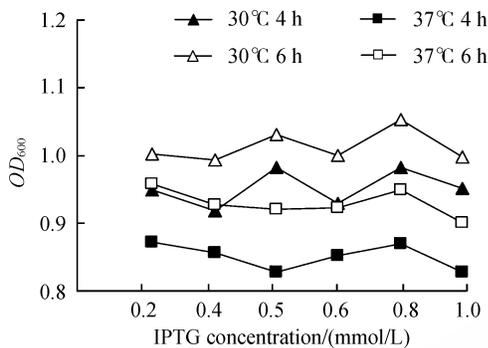


图 1 不同温度和 IPTG 浓度诱导时所收获的生物量
Fig. 1 Biomass achieved when induced with different concentration of IPTG at different temperatures

2.1.2 IPTG 浓度和温度对目的蛋白表达的影响

以不同 IPTG 浓度和温度诱导至 4 h、6 h 时取样进行 SDS-PAGE 电泳结果如图 2 和图 3。箭头所指是目的蛋白。

从图可以看到, IPTG 浓度对于诱导结果无明显的影响, 但是温度有明显影响, 30 优于 37。其目的蛋白占总蛋白的百分比、目的蛋白 OD 值的扫描分析结果如图 4 和图 5 所示。

对其扫描结果进行统计分析显示, IPTG 浓度对目的蛋白表达无显著影响($P>0.05$), 所以可采用低浓度 IPTG 诱导表达, IPTG 在 0.1 mmol/L 时目的蛋白仍可大量表达, 但在 0.02 mmol/L 时目的蛋白基本不表达(结果未显示)。温度对蛋白表达有极显著影响, 30 优于 37 ($P<0.01$), 在 30 诱导时, 目的蛋白的表达量占总蛋白的 35%左右。

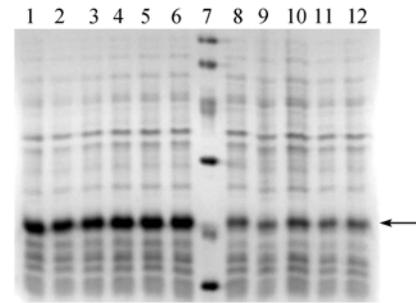


图 2 不同温度和 IPTG 浓度诱导 4 h 时的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression protein induced for 4h with different concentration of IPTG at different temperatures

1~5: induced with different concentration at 30 (0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mmol/L); 8~12: induced with different concentration at 37 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol/L); 7: marker

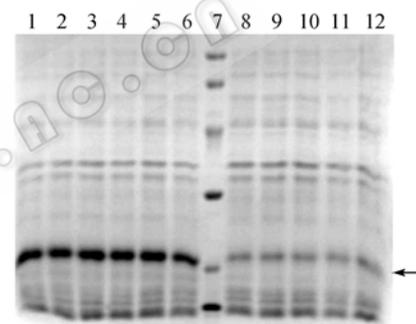


图 3 不同温度和 IPTG 浓度诱导 6 h 时的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression protein induced for 6h with different concentration of IPTG at different temperatures

1~5: induced with different concentration at 30 (0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mmol/L); 8~12: induced with different concentration at 37 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol/L); 7: marker

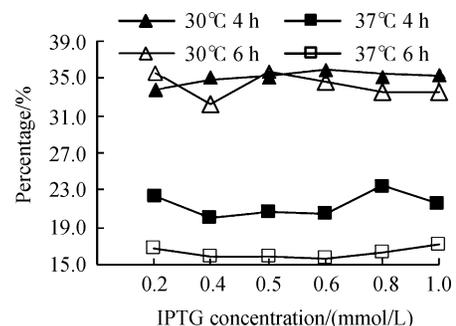


图 4 不同温度和 IPTG 诱导时目的蛋白占总蛋白的百分比
Fig. 4 The percentage of target protein achieved when induced with different concentration of IPTG at different temperatures

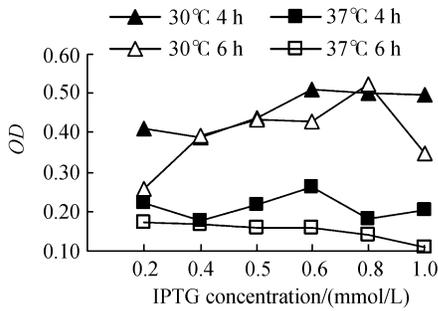


图5 不同温度和 IPTG 浓度诱导时目的蛋白的 OD 值
Fig. 5 The OD of target protein achieved when induced with different concentration of IPTG at different temperatures

2.1.3 诱导时间对目的蛋白表达的影响

为了减少试验误差, 将同一温度下以不同 IPTG 浓度诱导至 4 h 和 6 h 的结果在同一块胶上进行比较, 以确定适合的时间, 30 °C 诱导时的电泳结果见图 6, 箭头所指的是目的蛋白(37 °C 的结果与 30 °C 的结果类似, 图略)。对其扫描结果进行方差分析可知, 无论是在 30 °C 诱导, 还是在 37 °C 诱导, 诱导时间对于目的蛋白表达无显著影响($P>0.05$)(扫描分析结果图略)。

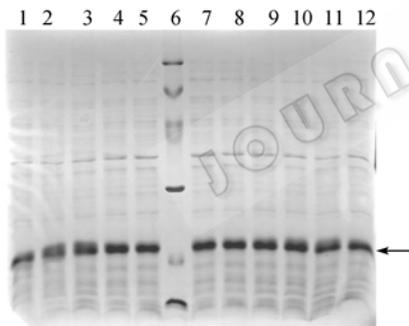


图6 30°C时不同 IPTG 浓度诱导不同时间的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expression protein induced at 30°C with different concentration of IPTG for different time 1~5: induced with different concentration for 4 h(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol/L); 7~12: induced with different concentration for 6 h(0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mmol/L); 6: marker

2.2 最佳诱导温度的确定

以上结果显示, 温度对于菌株生长和目的蛋白表达均有极显著影响($P<0.01$), 为了进一步确定温度对诱导表达的影响, 在 30 °C 左右各取了两个不同的温度, 以 0.2mmol/L IPTG 诱导 4 h, 测得的生物量结果和 SDS-PAGE 电泳结果如图 7 和图 8 所示。

通过方差分析可知, 温度对菌株生长有极显著影响($P<0.01$)。通过多重比较得知, 30 °C 与 26 °C、

28 °C、34 °C 差异显著, 其它温度之间差异不显著, 菌株在 30 ~32 °C 之间可以较好生长。

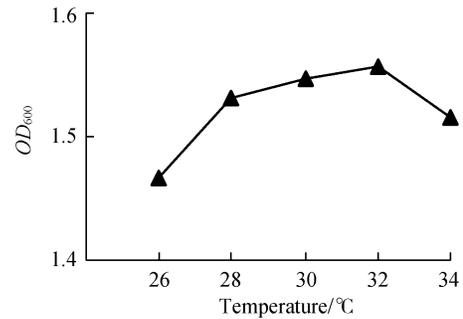


图7 不同温度下诱导 4 h 所收获的生物量
Fig. 7 Biomass achieved when induced at different temperature for 4 h

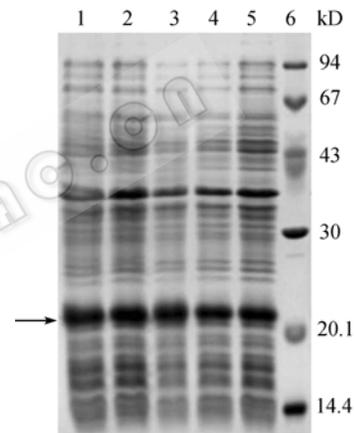


图8 以不同温度诱导的电泳分析
Fig. 8 SDS-PAGE analysis of expression protein induced by IPTG at different temperature 1-5: induced with IPTG at different temperature (26 °C, 28 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C); 6: marker

对图 8 的扫描结果如图 9 和图 10 所示, 方差分析结果表明, 温度对于蛋白的 OD 值无显著影响($P>0.05$), 但是对于目的蛋白的百分比含量有极显著影响($P<0.01$), 经 LSD 法多重比较, 26 °C 与 28 °C 差异不显著($P>0.05$), 32 °C 和 34 °C 差异不显著($P>0.05$), 与其它各温度差异极显著。30 °C 优于其他温度($P<0.01$)。

2.3 目的蛋白的纯化和活性分析

2.3.1 hBD₃-Bra 融合蛋白的纯化

按照 Amersham 的产品说明, 采用超声波法提取细胞内可溶蛋白和包涵体蛋白, 在亲和柱上纯化、复性并去除杂蛋白, 收集洗脱下来的峰进行 SDS-PAGE 电泳显示只有一条约 20 kD 的条带, 得到了较为纯净的 hBD₃-Bra 融合蛋白, 如图 11 所示。

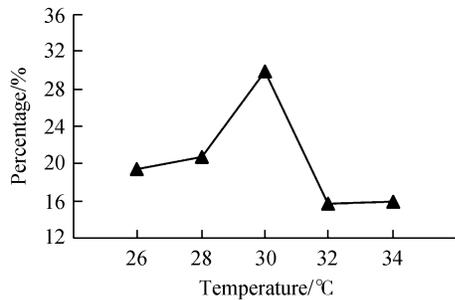


图 9 不同温度下目的蛋白占总蛋白的百分比

Fig. 9 The percentage of target protein achieved when induced at different temperatures

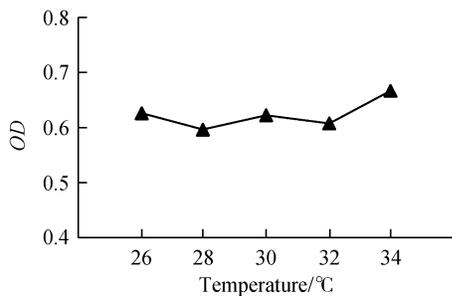


图 10 不同温度下目的蛋白 OD 值

Fig. 10 The OD of target protein achieved when induced at different temperatures

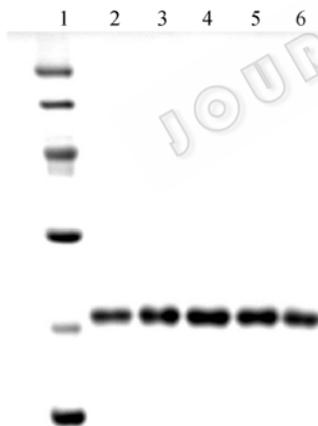


图 11 SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白

Fig. 11 SDS-PAGE analysis of
1: marker; 2: purified recombinant protein

2.3.2 目的蛋白的纯化

亲和层析后的样品冷冻干燥, 按照凝血酶试剂盒的说明(Novagen), 在 20 酶切带 His-Tag 的 hBD₃-Bra 融合蛋白 12 h 后, 经 Ni²⁺亲和层析柱再次纯化后 SDS-PAGE 电泳结果如图 12 所示, 从图中可以看到, 酶切后得到了带 His-Tag 的 hBD₃ 和 *des*-pGLU1-Brazzein。

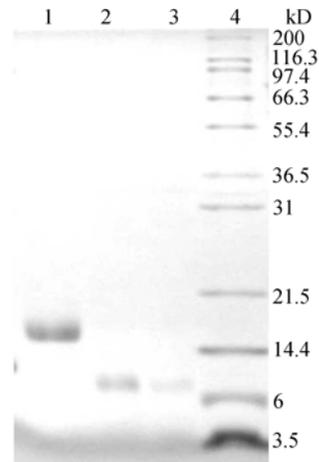
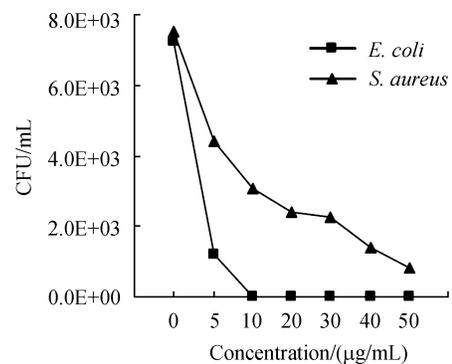
图 12 纯化后的 hBD₃ 与 *des*-pGlu1-Brazzein

Fig. 12 SDS-PAGE analysis of purified protein

1: hBD₃ with His-Tag; 2~3: *des*-pGlu1-Brazzein; 4: marker

2.3.3 目的蛋白的活性检测

通过抑菌试验表明, hBD₃-Bra 融合蛋白的杀菌活性很弱, 经凝血酶切割后, 带有 His-Tag 的重组 hBD₃ 显示明显的抑菌活性, 如图 13 所示, 与单独表达的人防御素 3 的结果相似^[13]。hBD₃-Bra 融合蛋白有甜味, 其甜度大约是蔗糖的 200 倍, 呈天然形态的 *des*-pGlu1-Brazzein 的甜度大约为蔗糖的 600 倍。

图 13 hBD₃ 蛋白的抑菌活性Fig. 13 Antimicrobial activity of hBD₃

3 讨论

基因工程菌株发酵培养条件的优化主要目的是尽可能的提高产量、降低成本。本实验兼顾了表达量和菌体的收获量, 为了减少实验的误差, 本实验尽量在条件一致的情况下比较结果, 并采用了统计方法分析结果, 使得结果更为可靠。结果表明, 菌株在 30 ~32 生长, 在 30 诱导以 0.2 mmol/L IPTG

诱导 4 h 比较合适, 目的蛋白的表达量可达 35% 左右。此外, 在试验中发现诱导时的起始 OD_{600} 对于诱导结果也至关重要。为进一步在发酵罐内进行分批发酵和补料发酵提供了参考。

本研究以 hBD₃ 和 *des*-pGlu1-Brazzein 互为融合伴侣, 在大肠杆菌中得到了高效表达, 从而最大限度地利用了宿主的蛋白合成能力。纯化后的 hBD₃-Bra 融合蛋白的抗菌活性非常弱, 切除 *des*-pGlu1-Brazzein 则恢复活性, 说明 *des*-pGlu1-Brazzein 有效消除了 hBD₃ 对宿主细胞的毒害(与在真核中的表达结果类似, 结果尚未发表), hBD₃-Bra 融合蛋白有甜味, 其甜度大约是蔗糖的 200 倍, 显示 N 端带有融合伴侣 hBD₃ 影响 *des*-pGlu1-Brazzein 的甜味, 这与 Assadi-porter FM 研究认为 N-端和 C-端是甜度决定中心相一致^[10], 呈天然形态的 *des*-pGlu1-Brazzein 的甜度大约为蔗糖的 600 倍, 其检测结果比报道的 1000 倍要低^[9], 其原因可能是蛋白在空间结构上与天然蛋白存在一定的差异, 也由于对于甜味的检测只能是通过品尝, 具有较大的主观性, 有一定的误差, 其原因尚需要进一步分析。hBD₃-Bra 融合蛋白经凝血酶切割后成为 hBD₃ 与 *des*-pGlu1-Brazzein 的混合物, 今后有望开发成兼具防腐和增味作用的新型食品添加剂。

REFERENCES

- [1] Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol*, 1994, **6**: 584-589.
- [2] Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*, 2001, **11**(3): 156-164.
- [3] Periathamby AR, Andrew RD. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **206**: 9-18.
- [4] Bensch KW, Raida M, Magert HJ. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Letter*, 1995, **368**: 331.
- [5] Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al.* A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 1997, **387**: 861.
- [6] Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al.* Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 2001, **276**(8): 5707-5713.
- [7] Garcia JR, Krause A, Schulz S, *et al.* Human β -defensin-4: a novel inducible peptide with a special salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, 2001, **15**(10): 1819-1821.
- [8] Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweetening-tasting proteins. *Applied Microbiological Biotechnology*, 2000, **53**: 145-151.
- [9] Assadi-porte FM, Aceti DJ, Cheng H, Markley JL. Efficient production of recombinant Braxxein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 2000, **376**(2): 252-258.
- [10] Assadi-porter FM, Aceti DJ, Markley JL. Sweetness of determinant sites of Brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 2000, **376**(2): 259-265.
- [11] Li CL, He GQ, Ruan H, *et al.* Synthesis of the mosaic gene of human β -defensin-3 gene and plant Brazzein and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, **13**(2): 217-220.
何国庆, 李春丽, 阮晖, 等. 人 β -防御素-3 与植物甜蛋白 Brazzein 嵌合基因的合成及其在大肠杆菌中的表达. *农业生物技术学报*, 2005, **13**(2): 217-220.
- [12] Cui H-ZH, Li M, Xu QF, *et al.* Synthesis of a Bacterial-like plant monellin gene and its expression in *E.coli*. *Scientia Agriculture Sinica*, 1999, **32**(1): 58-62.
崔洪志, 李敏, 徐琼芳, 等. 植物 monellin 甜蛋白基因的细菌化改造合成及其在大肠杆菌中的表达. *中国农业科学*, 1999, **32**(1): 58-62.
- [13] Li CL, Ruan H, Chen ZH, *et al.* Expression of recombinant human β defensin 3 in *E.coli* and its antimicrobial activity analysis. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, **21**(5): 705-708.
李春丽, 阮晖, 陈正华, 等. 重组人 防御素 3 在大肠杆菌中的表达和活性分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, **21**(5): 705-708.