

具有抗骨质疏松作用的 N16 蛋白的 生物工程制备工艺研究*

徐祯彦^{1,2}, 欧嘉仪³, 黄家乐³, 邵鹏柱³, 苏薇薇²,
彭 维², 王永刚², 李沛波^{1,2}

(1. 中山大学深圳研究院, 广东 深圳 518057;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

3. 香港中文大学植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室中医中药研究所//
李达三叶耀珍中医药研究发展中心//生命科学学院, 香港 沙田)

摘要: N16 蛋白具有抑制破骨和促进成骨作用, 对骨质疏松疾病的治疗具有潜在的应用价值。采用 pRHis 质粒和 BL21 (DE3) plysS 菌株, 建立了表达产量较高的 N16-pRHis-BL21 (DE3) plysS 表达体系; 并建立了 N16 蛋白分离纯化工艺。该工艺表达方式简单, 分离纯化操作简便, 蛋白产量高, 成本低, 周期短, 为进一步研究 N16 蛋白的功能奠定了基础。

关键词: N16 蛋白; 表达; 纯化; 制备工艺

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2016) 03-0135-05

Preparation of N16, an anti-osteoporosis protein, by biological engineering method

XU Zhenyan^{1,2}, AU Kayee³, WONG Kalok³, SHAW Pangchui³, SU Weiwei²,
PENG Wei², WANG Yonggang², LI Peibo^{1,2}

(1. Research Institute of Sun Yat-sen University in Shenzhen, Shenzhen 518057, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China (CUHK),
LDS YYC R & D Centre for Chinese Medicine and School of Life Sciences,
School of Life Sciences, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China)

Abstract: N16 protein is a potential agent for treatment of osteoporosis due to its favorable anabolic and antiresorptive effects on bone. Our work described a biological engineering method to prepare N16. To build the high level expression system, pRHis plasmid was transformed into BL21 (DE3) plysS strain. The present study has established a complete N16 preparation process with simple protein expression and purification procedures. This procedure can improve N16 protein production, reduce the cost and shorten the cycle, which will facilitate further studies on the functions of N16.

Key words: N16 protein; expression; purification; preparation method

* 收稿日期: 2016-02-02

基金项目: 深圳市科技研发资金资助项目 (SGLH20120926171131592); 广东省海洋渔业科技推广专项资助项目 (A201301C01); 广东省重大科技专项资助项目 (2013A022100021)

作者简介: 徐祯彦 (1989 年生), 男; 研究方向: 岭南药用植物研究; 通讯作者: 李沛波; E-mail: lipb73@126.com

N16 蛋白相对分子质量为 16 000 (切除信号肽后相对分子质量为 12 800), 富含 Gly、Tyr、Asn、Cys 等多种氨基酸, 由 Samata 等^[1]于 1999 年在马氏珠母贝中发现。近期本课题组的研究表明, N16 蛋白具有显著的促进成骨和抑制破骨的功能, 对骨质疏松症的治疗具有良好的应用价值^[2]。但 N16 蛋白在珍珠母中含量很低^[3], 提取、分离困难, 且成本高。本研究首次采用生物工程技术制备 N16 蛋白, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

PCR 仪: Applied Biosystems 公司, 型号 Veriti; 摇床: Sanyo 公司, 型号 GallenKamp; 恒温培养箱: Sheldon 公司, 型号 1500E; 快速蛋白液相色谱仪 (FPLC): Amersham 公司, 型号 AKTA prime; Trizol: 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 (M-MLV): 购自 TAKARA 公司; 引物: 购自 Invitrogen 公司; DNA 提取试剂盒: 购自 BioMed 公司; 质粒: 香港中文大学邵鹏柱教授实验室提供; 限制性内切酶试剂盒: 购自 Promega 公司; 连接酶试剂盒: 购自 Promega 公司; *E. coli* DH5 α : 香港中文大学邵鹏柱教授实验室提供; 质粒抽提试剂盒: 购自 BioMed 公司; Luria Broth: 购自 ABI 公司, USB chemicals; 尿素: 购自 ABI 公司, USB chemicals; 凝胶排阻层析柱: GE Healthcare Life Sciences 公司, 柱体积 330 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 N16 蛋白表达体系的构建 将合浦珠母贝 *Pinctadafucata* 的外套膜切成小块, 利用 Trizolreagent 方法提取总 RNA, 然后进行逆转录得出第一链 cDNA。通过对美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 上收录的 N16 基因 DNA 序列的分析, 找出不含信号肽的编码区域, 依此设计引物 N16F (5'-GGAATTCATATGGCT-GTCCATTATAAGTGC-3') 和 N16R (5'-CGGGATC-CITTAATTGTC AAACCGTTC-3'), 引物包含有 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 然后以第一链 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。对 N16 基因扩增产物进行内切酶消化, 在 T4 连接酶作用下连接到蛋白表达载体。所选用质粒为 pRHsMBP (质粒图谱如图 1 所示), *Nde* I 为 5' 为酶切位点, *Bam*H I 为 3' 酶切位点, 筛选抗生素为氨苄青霉素 (Ampicillin)^[4]。

将携带有 N16 基因的蛋白表达质粒转入大肠杆菌 (BL21DE3plysS), 将转化后的菌液接种至

LB 培养板上 (平板上涂布有氨苄和氯霉素), 37 °C 培养 16 h。挑取单菌落并转至 50 mL 新鲜的液体培养基中 (含氨苄和氯霉素), 37 °C 震荡培养 16 h, 转速 220 r/min。吸取 10 mL 菌液至 1 L 新鲜的液体培养基中 (含氨苄和氯霉素), 37 °C 震荡培养, 转速 220 r/min, 直至 A_{600} 值达 0.6, 然后加入诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.4 mmol/L, 继续 37 °C 震荡培养 16 h, 转速 220 r/min。表达完成后将菌液离心 (12 000 \times g, 3 min), 弃上清, 将菌体保存于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.2 N16 蛋白的提取纯化 在每 1 L 菌液收集的菌体中加入 100 mL 的清洗液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 置于冰上超声破碎 30 min, 离心 30 min (18 000 \times g), 弃上清液, 重复前述步骤 1 次。在收集的菌体中加入 100 mL 的清洗液 (2 mol/L 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl, φ = 0.1% Tween20, pH 8.0), 置于冰上超声 30 min, 离心 30 min (18 000 \times g), 弃上清液, 重复该步骤 1 次。在收集的菌体中加入 50 mL 溶解液 (8 mol/L 尿素, 20 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.0), 置于冰上超声溶解 30 min, 放入摇床摇洗过夜 (转速为 220 r/min), 然后离心 30 min (18 000 \times g), 收集上清液。使用截留相对分子质量为 3 000 的浓缩离心管将上清液离心 (3 500 \times g), 直到样本浓缩至约 6 mL, 然后用孔径为 0.45 μ m 的滤膜过滤。将过滤后的样品注入快速蛋白液相色谱仪 (FPLC), 使用凝胶排阻层析法进行样品蛋白的纯化。层析柱为 HiPrep26/60SephacrylS - 300HR (GE Health care Life Sciences); 流动相为含 8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris-HCl、40 mmol/L 巯基乙醇的水溶液 (pH 7.0); 流速为 1.5 mL/min; 上限压为 0.3 MPa; 进样量为 5 mL; 每收集管收集容量为 5 mL。最后采用 SDS-PAGE 电泳法观察纯化效果。

1.2.3 N16 蛋白的去盐复性 根据电泳结果选取含 N16 蛋白的分液, 合并加入到透析袋 (透过相对分子质量限制为 6 000 ~ 8 000) 中, 以 100 倍体积的磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.0) 于 4 °C 下渗透复性 4 h, 再将透析袋转至新鲜的 100 倍体积的磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.0) 中, 于 4 °C 下渗透复性过夜。

1.2.4 N16 蛋白的定量 将复性后的 N16 蛋白采用 SDS-PAGE 电泳法检测其纯度, 并用紫外分光光度法于 280 nm 处测定吸光值。利用蛋白质研究工具 ProtParam, 根据 N16 蛋白的氨基酸序列计算其

消光系数，并以公式 $A = \epsilon cl$ (A 为吸光值， ϵ 为消光系数， c 为蛋白浓度， l 为液层的厚度) 计算 N16 蛋白的浓度。

1.2.5 N16 蛋白的 N 端测序 将含 10 pmol 的 N16 蛋白以液氮急速冷冻，冻干 24 h 后，委托台湾明欣生物科技有限公司进行蛋白质 N 端测序，共测 10 个循环。

2 结果与讨论

2.1 N16 蛋白表达体系的建立

由图 1 可见，本研究成功将 N16 蛋白基因 (不包括信号肽的编码区域) 克隆到 pRHisMBP 蛋白表达载体，插入位置为 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点之间。通过对 N16 基因进行 DNA 测序，得到 N16 蛋白的 DNA 序列；相关资料已呈交到 NCBI，DNA 序列登录号为 KJ078646。

2.2 N16 蛋白表达

通过 SDS-PAGE 电泳法对 N16 蛋白表达效果进行了考察，如图 2 所示，转入空质粒的细菌不表达 N16 蛋白，而转入携带 N16 基因的质粒时，细菌表达 N16 蛋白，表明该体系适合 N16 蛋白的表达；对菌体破碎物离心后的上清和下层中 N16 蛋白的含量进行检测，结果显示，上清中 N16 蛋白的含量很低，而下层中 N16 蛋白的含量较高，提示该

表达体系表达 N16 蛋白的方式为包涵体表达，而非可溶性表达；此外，在电泳图上，N16 蛋白的条带比其他杂蛋白更明显，说明 N16 蛋白在菌体所表达的总蛋白中占有较大的比例。由此可见，本体系可以以包涵体表达的方式成功表达出 N16 蛋白，且产量较高。

2.3 N16 蛋白的纯化

由于细菌表达的 N16 蛋白存在于包涵体中，故本研究利用其不溶于水的特性，于层析分离前进行前期纯化。为考察前期纯化过程是否会导致 N16 蛋白的损失，本研究在每个步骤中提取同等比例的样品，采用 $w = 15\%$ SDS-PAGE 进行电泳分析，比较样品中的 N16 含量。结果如图 3 所示，N16 的含量于前期纯化步骤 1、2、3、4 后并无明显变化，即样品前处理的 4 次清洗均没有造成目标蛋白 N16 的明显损失。

样品前处理完成后，再采用色谱柱对 N16 蛋白进行纯化。由于 N16 蛋白去掉信号肽后相对分子质量约为 12 800，小于菌体所表达的其他蛋白的相对分子质量，故本研究采用根据蛋白分子大小进行分离的凝胶排阻层析法来纯化 N16 蛋白样品。由图 4 可见，收集到的 28-31 号分液的 N16 蛋白已与其它蛋白分开 (泳道中只有 N16 蛋白一条条带)，提示该纯化方法可行且分离效果理想。

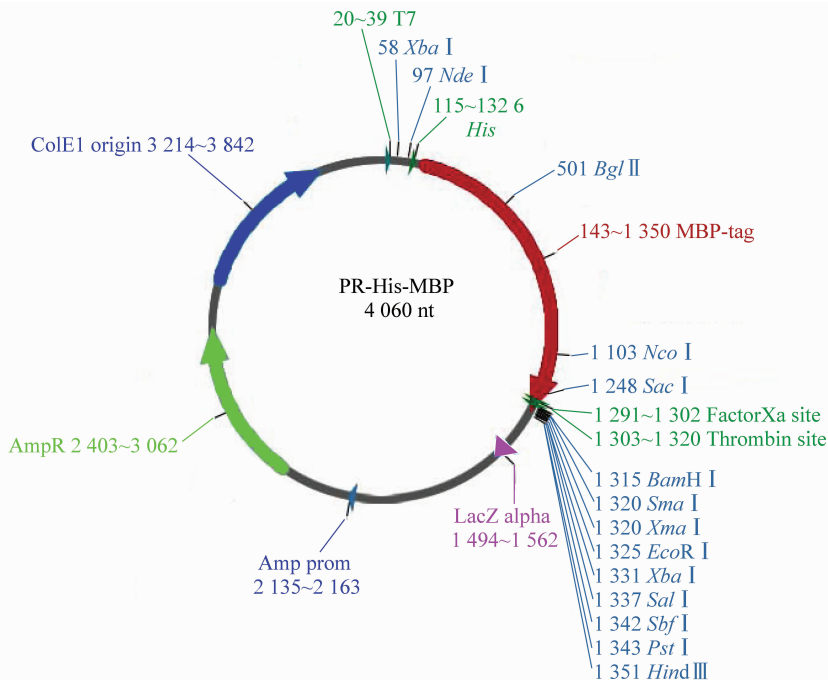


图 1 pRHisMBP 质粒图谱

Fig. 1 Vector map of pRHisMBP

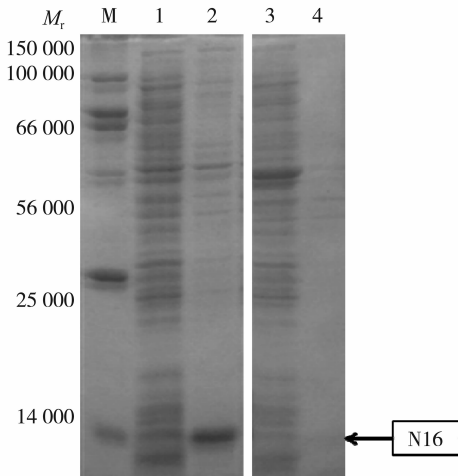


图 2 N16 蛋白表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 Identification of N16 by SDS-PAGE

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 为转入带 N16 蛋白基因质粒的菌体经超声破碎后离心分出的上清; 2: 为转入带 N16 蛋白基因质粒的菌体破碎后离心分出的下层; 3、4: 分别为转入空质粒 (不含 N16 基因的 pRHismBP 质粒) 的对照菌体经超声破碎后离心分出的上清和下层

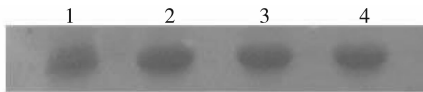


图 3 前期纯化步骤 1、2、3、4 中 N16 的含量

Fig. 3 N16 quantity after purifying step 1、2、3 and 4

1、2、3、4: 分别代表菌体经 Tris 缓冲液清洗第一次、Tris 缓冲液清洗第二次、Tris - 2M 尿素缓冲液清洗第一次和 Tris - 2M 尿素缓冲液清洗第二次后收集到的样品

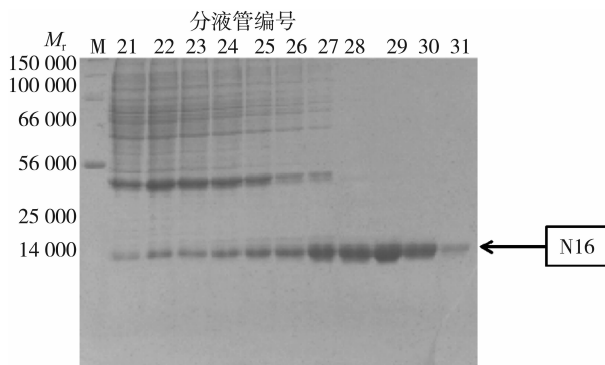


图 4 凝胶排阻层析法分离 N16 蛋白

Fig. 4 N16 separation by gel filtration

M: 代表蛋白质相对分子质量标准

2.4 N16 蛋白测序

N16 蛋白 (不包含信号肽部分) 测序结果如图 5 所示。证实本研究所获得的蛋白属于 N16 蛋

白家族。经 ProtParam 分析, 推算其消光系数为 $45\,880\text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1[5]}$ 。

```
MAVHYKCGRYSYCWLPHYDIERDRYDNGDKKCCFCRH
AWSQWQCNEDERYEWLRCGRNFYSLCCYTDDDDNGN
GNGNGNGFNLYKLSLYGGYGNNGEFWEEYIDERFDN
```

图 5 N16 蛋白氨基酸序列

Fig. 5 Amino acid sequence of N16

3 讨论

本文首次建立了 N16 蛋白生物工程制备工艺, 包括 N16 蛋白的大肠杆菌表达体系的构建和 N16 蛋白分离纯化方法的建立。在 N16 蛋白表达体系的构建方面, 本研究选取了 pRHismBP 质粒和适用于 pET 表达系统的 BL21 (DE3) plysS 菌株, 建立了表达产量较高的 N16 - pRHismBP - BL21 (DE3) plysS 表达体系。由图 2 可见, 本研究所表达的 N16 蛋白占菌体总蛋白的比例较高, 说明 N16 蛋白的表达水平较高。当菌体表达一种外源蛋白达到较高水平时, 该蛋白一般不再以可溶形式存在, 菌体会将外源蛋白以包涵体形式贮存在菌体内^[5]。因此, 可推测 N16 蛋白主要是以包涵体形式存在于菌体。在大肠杆菌表达体系中, 包涵体表达的优点在于表达量高、蛋白收集方法简便, 但是在蛋白的纯化和复性方面相对困难, 且包涵体中常含有较多的杂质蛋白, 因此在纯化 N16 蛋白的过程中, 本研究先以 Tris 缓冲液尽可能洗去一部分水溶性杂质蛋白, 再将样品变性溶于 8 mol/L 尿素溶液; 由于 N16 蛋白的相对分子质量仅为 12 800, 远小于其他杂质蛋白的相对分子质量, 故本研究采用根据相对分子质量大小进行分离的凝胶排阻层析方法进行 N16 蛋白的分离纯化; 最后选择用磷酸缓冲液进行复性。

本研究首次建立了一套完整的 N16 蛋白的生物工程制备工艺, 表达纯化后 N16 蛋白的产量达到 20 ~ 30 mg/L (每升菌液), 产量较高。本工艺采用的宿主菌为 BL21 工程菌, 该菌种具有易于培养、应用广泛、发酵表达工艺简单的优势, 适用于工业化大生产。大多数生物工程方法制备蛋白需要经过多次纯化, 而本工艺只需进行一次色谱柱纯化, 故工艺周期短、操作简便、生产成本较低。本研究为今后开展 N16 蛋白的系统研究和工业化生产奠定了基础。

(下转第 144 页)

态制剂的效果最为明显。

3) 微生物制剂能增强仔鸡体内有关抗氧化方面的酶的活性。

4) 微生物制剂能改善仔鸡盲肠 PH 值和其内容物益生菌数。

参考文献:

- [1] 郑永利,雷秋波,徐润林,等. 枯草芽孢杆菌粉剂作为鸡饲料添加剂的研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 69-72.
- [2] 葛兵, 陈林. 中草药饲料添加剂的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(3): 29-31.
- [3] 王敦, 张强, 翟少伟. 昆虫源蛋白质、壳聚糖、脂肪酸在动物营养和饲料中的应用研究与前景 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(4): 135-138.
- [4] 杨宁. 家禽生产学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [5] 嵯梅, 昝于明, 赵小刚, 等. 日粮中添加植物提取物对肉仔鸡免疫机能的影响 [J]. 动物营养与饲料科学, 2009, 36(6): 14-18.
- [6] 张日俊, 潘淑媛, 白永义, 等. 微生物饲料添加剂益生康对肉仔鸡营养代谢与免疫功能的调控机理 [J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3): 40-47.
- [7] 朱宁, 王春清, 张华晨, 等. 中草药添加剂对肉仔鸡生长性能的影响 [J]. 饲料工业, 2011, 32(3): 13-15.
- [8] HOSSAIN M E, YANG C J. Effect of fermented water

plantain on growth performance, meat composition, oxidative stability, and fatty acid composition of broiler [J]. Livestock Science, 2014, 162: 168-177.

- [9] 陈艳新, 李志伟. 中草药制剂对肉仔鸡免疫功能影响的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 146-149.
- [10] GUPTA A, GUPTA P, DHAWAN A. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41: 113-119.
- [11] 张超范, 寇玉红, 魏萍. 复合微生物制剂对肉仔鸡免疫功能的影响 [J]. 动物医学进展, 2004, 25(4): 101-103.
- [12] 杨小军, 贺喜, 何丽霞, 等. 日粮中添加多不饱和脂肪酸对肉仔鸡抗氧化指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2008, 20(3): 299-304.
- [13] 陈寒青, 金征宇, 朱立贤. 中草药饲料添加剂研究进展 [J]. 饲料工业, 2002, 23(10): 18-23.
- [14] 徐刚, 陈玉林, 马雄, 等. 4 种绿色饲料添加剂对肉仔鸡生长性能的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(2): 1-7.
- [15] GIANG H H, VIET T Q, OGLE B, et al. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii* [J]. Livestock Science, 2012, 143: 132-141.

(上接第 138 页)

参考文献:

- [1] SAMATA T, HAYASHI N, KONO M, et al. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata* [J]. FEBS Lett, 1999, 462(1-2): 225-229.
- [2] MA J Y, WONG K L, XU Z Y, et al. N16, a nacreous protein, inhibits osteoclast differentiation and enhances osteogenesis [J]. Journal of Natural Products, 2016, 79: 204-212.
- [3] WANG N, KINOSHITA S, RIHO C, et al. Quantitative

expression analysis of nacreous shell matrix protein genes in the process of pearl biogenesis [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2009, 154(3): 346-350.

- [4] NG K L, LAM K H, ZHANG H M, et al. Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein [J]. J Virol, 2012, 86(12): 6758-67.
- [5] PALMER I, WINGFIELD P T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion body) proteins from *Escherichia coli* [J]. Curr Protoc Protein Sci, 2012, 6(3): 1-18.