

# 抗艾滋病病毒蛋白 CVNH 在大肠杆菌中表达条件的优化\*

李 宁<sup>1</sup>, 孙君波<sup>1</sup>, 韦 剑<sup>2</sup>, 丘力功<sup>2</sup>, 王 艇<sup>3</sup>, 苏应娟<sup>1</sup>

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广州拜迪生物医药有限公司, 广东 广州 511495;

3. 中国科学院武汉植物园湿地演化与生态恢复湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430074)

**摘 要:** CVNH (Cyanovirin-N homology) 蛋白家族是具有抗 HIV 活性的蓝藻抗病毒蛋白-N (Cyanovirin-N, CVN) 的同源物。在前期研究中, 已首次获得水蕨 *Ceratopteris thalictroides* CVNH 基因的全长序列, 构建了 pET32a-CtCVNH 的原核表达载体。以此为基础, 对 CVNH 在大肠杆菌 Rosetta 2 (DE3) 中的表达条件进行优化。分别探讨了最佳培养基类型及成分、培养基初始 pH、诱导时机、诱导剂浓度及诱导时间。优化后的诱导条件是: 含 24 g·L<sup>-1</sup> 酵母提取物和 72 g·L<sup>-1</sup> 胰蛋白胨的 TB 培养基、培养基初始 pH 为 8.0、菌液 A<sub>600nm</sub> 为 0.6 时加入 1.6 g·L<sup>-1</sup> 乳糖诱导 6 h。CVNH 蛋白的表达量较优化前提高了 1.9 倍。这为进一步开展 CVNH 的药物研制和开发奠定基础。

**关键词:** CVNH; 原核表达; 条件优化

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2013) 02-0090-07

## Optimization for Culture Condition of CVNH in *Escherichia coli*, A Novel Anti-HIV (Human Immunodeficiency Virus) Protein

LI Ning<sup>1</sup>, SUN Junbo<sup>1</sup>, WEI Jian<sup>2</sup>, QIU Ligong<sup>2</sup>, WANG Ting<sup>3</sup>, SU Yingjuan<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangzhou Baidi Biotechnology Co. Ltd, Guangzhou 511495, China;

3. Hubei Key Laboratory of Wetland Evolution & Ecological Restoration, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** CVNH (cyanovirin-N homology, CVNH) is the homology protein of CVN, which is a novel anti-HIV glycoprotein. In the previous study, we have firstly reported the full-length sequences of CVNH gene cloned from *Ceratopteris thalictroides*, and constructed prokaryotic expression plasmid pET32a-CtCVNH. The plasmid DNA was transformed into Rosetta 2 (DE3) *E. coli* cells for expression of the recombinant protein. In the study, we optimized culture conditions of CVNH protein expression, including the types and ingredients of the culture medium, initial pH, A<sub>600nm</sub> value, induction agents and concentrations, induction time, and expression time, respectively. The optimized culture conditions contained TB medium with 24 g·L<sup>-1</sup> yeast extract and 72 g·L<sup>-1</sup> tryptone, initial pH 8.0, and lactose induced for 6 hours at A<sub>600nm</sub> 0.6, which would increase CVNH productivity to 1.9 times than before. This result laid a foundation to explore the drug development of CVNH.

\* 收稿日期: 2012-12-13

基金项目: 广州市科技计划资助项目 (2010J-E101); 广东省科技计划资助项目 (2011B031700007, 2012B010300009); 广东省自然科学基金资助项目 (S2012010010502); 中山大学实验室开放基金资助项目 (KF201128)

作者简介: 李宁, (1989年生), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 苏应娟; E-mail: suyj@mail.sysu.edu.cn

**Key words:** CVNH; prokaryotic expression; optimized culture condition

蓝藻抗病毒蛋白 (cyanovirin-N, CVN) 是由美国学者 Boyd 等<sup>[1]</sup> 从椭圆念珠藻 *Nostoc cellulosum* 提取物中发现的一种新型、具抗艾滋病病毒活性的蛋白。CVN 为单链蛋白, 含 101 个氨基酸。它可被分为两个重复单元, 每个单元长约 50 个氨基酸, 且含一个二硫键 (分别为 C8 - C22 和 C58 - C73); 该蛋白无翻译后修饰<sup>[2]</sup>。三维结构上, 两个 CVN 重复借助一者的三链  $\beta$  折叠和另一者的  $\beta$  发夹之间的相互作用, 彼此结合形成包含两个折叠型结构域、沿长轴伸展的长椭圆形对称分子<sup>[3]</sup>。和糖蛋白中寡糖结合的位点就分别位于长轴两端的深缝中, 但它们同糖的亲水性一高一低<sup>[4]</sup>。CVN 的物理化学性质非常稳定, 能抵抗变性剂、去垢剂和有机溶剂的作用以及反复冻融和高温处理。经 100 °C 加热 15 min 后, CVN 仍能保持抗病毒活性。CVN 的抗 HIV 活性主要表现在它能阻断由 HIV 表面糖蛋白介导的病毒-细胞融合途径<sup>[1]</sup>。体外研究表明, CVN 能和 HIV 衣壳糖蛋白 gp120 特异、高亲和性地结合, 干扰 gp120 与靶细胞受体 CD4 分子之间的相互作用, 并抑制 HIV 感染宿主细胞<sup>[1, 5-6]</sup>。此外, CVN 对埃博拉病毒 (Ebola) 和流感病毒也有很高的抗病毒活性<sup>[7-8]</sup>。

除蓝细菌外, 在一些细菌、真菌和蕨类植物中也发现有 CVN 同源基因 (cyanovirin-N homology, CVNH) 存在, 它们共同组成 CVNH 蛋白家族。该家族成员的结构域折叠方式同蓝藻 CVN 相匹配。进化上, 它们所共有的抗 HIV 结构域在真核生物中极其保守, 而且表现出相似的抗病毒活性<sup>[4, 9-10]</sup>。

目前, 有关 CVN 的研究主要集中在蛋白质晶体的三维结构、抗 HIV 活性及其机制等方面<sup>[1, 11]</sup>, 而涉及 CVNH 的研究则还相对很少。在前期研究中, 我们首次获得水蕨 *Ceratopteris thalictroides* CVNH 基因 (*CtCVNH*) 的全长序列<sup>[10]</sup>。随后, 在对水蕨 CVNH 编码序列进行优化后, 又构建出 pET32a-*CtCVNH* 的原核表达载体, 并对其进行了诱导表达。在诱导表达的过程中, 很多因素影响重组菌的生长及目的蛋白表达。这些因素包括培养基的类型及成分、培养基初始 pH 值、接种量、培养温度、诱导时机、诱导剂的浓度及诱导时间等。本研究对 CVNH 蛋白在大肠杆菌中表达条件展开了优化, 以期获得较高的 CVNH 蛋白表达量, 这为进一步开展 CVNH 的药物研制和开发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

表达菌株 Rosetta 2 (DE3) 为本实验室保存。

### 1.2 培养基

种子液体培养基为 LB, 其它培养基为 TB、SOB、SOC、M9、2 × YT, 配制方法参考《分子克隆实验指南》<sup>[12]</sup>。使用前添加氨苄青霉素 (100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、氯霉素 (34  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

### 1.3 试剂与仪器

Yeast Extract、Tryptone 均为英国 OXOID 公司生产; 丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷 (IPTG) 为 Genview 公司生产; 氨苄青霉素、甘油、甲叉双丙烯酰胺为 Sigma 公司生产; 考马斯亮蓝 R-250 为 USB 分装; N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵 (APS) 为生工生物工程 (上海) 有限公司生产; 乳糖为广东环凯微生物科技有限公司生产; 其余试剂均为国产分析纯。

SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); 101-1A 型数显式电热恒温干燥箱 (沪越科学实验仪器厂); 恒温培养摇床 THZ-100 (上海一恒科学仪器有限公司); DYY-8C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); Eppendorf AG 离心机; CyberScan pH510 台式 pH 计。

### 1.4 培养方法

取 -80 °C 保存的重组 CVNH 甘油菌, 划 LB 固体培养基平板, 37 °C 培养 12 h, 挑取单克隆菌落接入 LB 液体培养基中, 37 °C, 220  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床振荡培养过夜, 获得种子液。优化前的培养条件为: 将培养好的种子液按 1% 接种量接入装有 LB 培养基的三角瓶中, 37 °C, 220  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床振荡培养 3 h 时 ( $A_{600\text{nm}}$  约为 0.6 ~ 0.9), 取 1 mL 诱导前的菌液 4 °C 保存备用。之后, 用 IPTG (1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 诱导表达 4 h, 取 1 mL 诱导后的菌液, 将诱导前后的菌液 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min 收集沉淀。将菌体重悬于 40  $\mu\text{L}$  蒸馏水中, 加入 10  $\mu\text{L}$  5 × 蛋白点样缓冲液。100 °C 水煮裂解 10 min 后, 制成 SDS-PAGE 电泳蛋白样品, -20 °C 保存备用。点样前, 样品 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。

### 1.5 菌体浓度的测定

比色法测定, 以 600 nm 处的吸光度  $A_{600\text{nm}}$  表示。

## 1.6 CVNH 蛋白表达量的表示方法

1.6.1 目的蛋白含量 (%) 取电泳蛋白样品上清液上样, 采用  $w = 5\%$  浓缩胶和  $w = 15\%$  分离胶的 SDS-PAGE 电泳。考马斯亮蓝 R-250 染色。脱色后, 用 BandScan 软件对凝胶进行分析, 计算每条泳道中目的蛋白的含量。

1.6.2 菌体干质量 (菌体生长量) 取 10 mL 诱导后的样品,  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min, 获菌体沉淀,  $80\text{ }^\circ\text{C}$  烘干至恒量, 称量<sup>[13]</sup>。

CVNH 蛋白表达量 = 目的蛋白含量  $\times$  菌体干质量<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌体生长曲线的测定

在 20 mL TB 培养基中按 1% 接种量接入种子液,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $220\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床振荡培养, 在第 0-5 h 间, 每隔半小时取菌液 300  $\mu\text{L}$  测  $A_{600\text{nm}}$  值; 在第 5-8 h 间, 每隔 1 h 取菌液 300  $\mu\text{L}$  测  $A_{600\text{nm}}$  值。实验重复 2 次。菌体生长曲线如图 1。

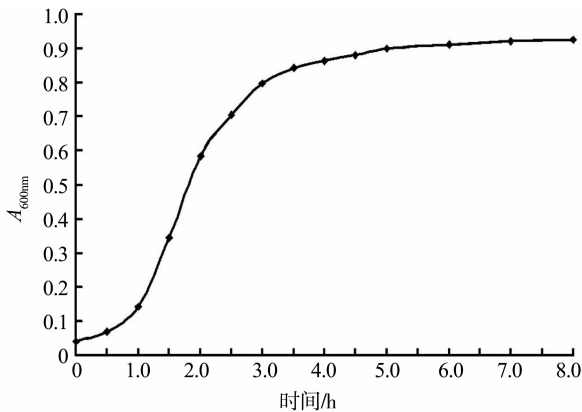


图 1 重组大肠杆菌的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of recombinant *E. coli*

菌体生长曲线呈典型的 S 型, 第 0-0.5 h 间为停滞期, 第 0.5-1 h 间为对数生长前期, 第 1-2 h 间为对数生长中期, 第 2-3 h 间为对数生长后期, 第 3-8 h 间为稳定期。

### 2.2 不同培养基对 CVNH 蛋白产量的影响

本实验分别选取 LB、TB、SOB、SOC、M9、 $2 \times \text{YT}$ 、LB + M9 和  $2 \times \text{YT} + \text{M9}$  八种培养基, 在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量来确定最佳培养基。实验重复 2 次, 结果见图 2。

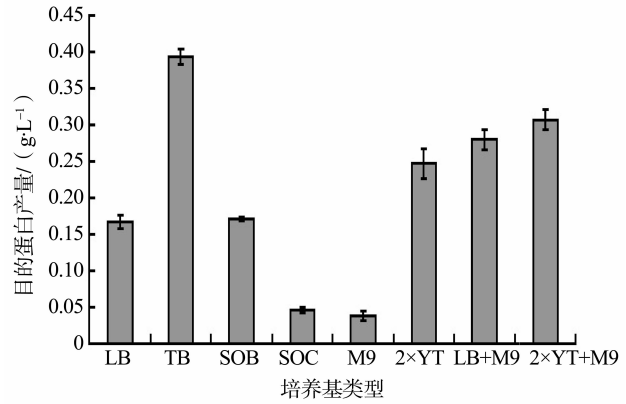


图 2 不同培养基对 CVNH 蛋白产量的影响

Fig. 2 Influence of different culture media on CVNH protein yields

CVNH 蛋白产量在 TB 培养基中最高。TB 培养基含有较多的有机物、氨基酸、核苷酸、生长因子以及一些微量元素, 被确定为 CVNH 蛋白表达的最佳培养基。

### 2.3 不同诱导时机对 CVNH 蛋白产量的影响

当  $A_{600\text{nm}}$  分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 和 0.9 时加入 IPTG 进行诱导, 在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量来确定最佳诱导时机。实验重复 2 次, 结果见图 3。

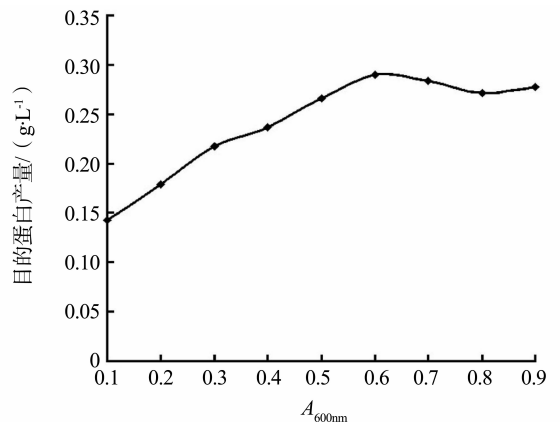


图 3 不同诱导时机对 CVNH 蛋白产量的影响

Fig. 3 Influence of different induction time on CVNH protein yields

结果发现, CVNH 蛋白产量随着  $A_{600\text{nm}}$  的增加呈现先增加后减少的趋势。当  $A_{600\text{nm}}$  为 0.6 时, CVNH 蛋白产量最高。当  $A_{600\text{nm}}$  值小于 0.6 时, CVNH 蛋白产量随着  $A_{600\text{nm}}$  的增加而增加。此时, 大肠杆菌生长状态为潜伏期及对数生长前期, 菌体

密度较低, 蛋白总产量较低。当  $A_{600\text{nm}}$  为 0.6 时, 大肠杆菌处于对数生长期。此时菌体密度较高, 可诱导产生最多的目的蛋白。当  $A_{600\text{nm}}$  继续增加时, 目的蛋白的产量会稍有下降。此时处于稳定期及衰亡期, 部分菌体已死亡, 蛋白开始自溶, 导致蛋白产量降低。

#### 2.4 不同诱导剂浓度对 CVNH 蛋白产量的影响

本文比较了 IPTG 和乳糖的诱导效果。IPTG 的浓度分别为 0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而乳糖的质量浓度分别为 0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量来确定最佳诱导浓度。实验重复 2 次, 结果见图 4。

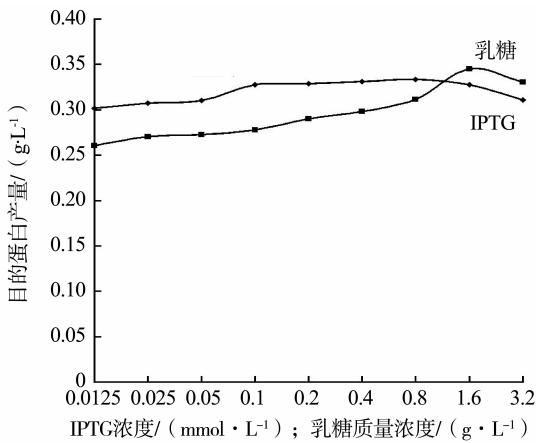


图 4 不同诱导剂浓度对 CVNH 蛋白产量的影响  
Fig. 4 Effects of concentrations of different induction agents on CVNH protein yields

随着 IPTG 和乳糖质量浓度的增加, CVNH 蛋白产量均呈现先增加后减少的趋势, 但变化趋势不明显, 说明菌种对 IPTG 和乳糖的诱导作用比较敏感。当 IPTG 诱导时, 随着其浓度的增加, 菌体的质量呈下降趋势; 而乳糖作诱导剂时, 菌体的质量基本不变。表明 IPTG 对菌的生长具有抑制作用。IPTG 浓度达到 0.8  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 目的蛋白的产量最高。IPTG 浓度继续增加, 其抑制菌种效果也增加, 目的蛋白的产量随之降低。乳糖质量浓度在 1.6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 目的蛋白产量最高, 且高于 IPTG 诱导的产量。乳糖质量浓度继续增加, 其降解物葡萄糖浓度也增加, 就会产生抑制菌种生长的乙酸等物质, 导致目的蛋白的产量降低。因此, 确定 1.6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的乳糖为最佳诱导剂。

#### 2.5 不同诱导时间对 CVNH 蛋白产量的影响

本文用 1.6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  乳糖分别诱导 1、2、3、4、5、6、8 和 10 h, 并以 IPTG 诱导 4 h 作为对照 (ck)。在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量来确定最佳诱导时间。实验重复 2 次, 结果见图 5。

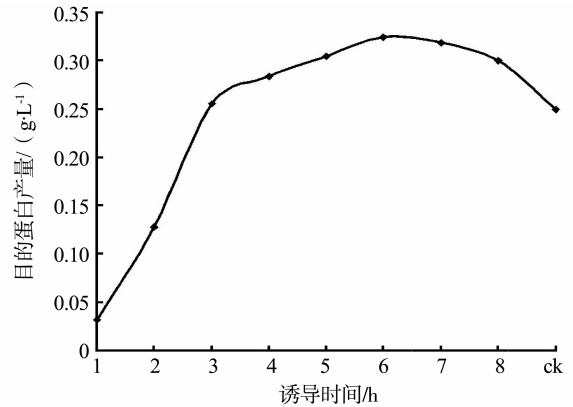


图 5 不同诱导时间对 CVNH 蛋白产量的影响  
Fig. 5 Effect of different expression time on CVNH protein yields

随着乳糖诱导时间的增加, CVNH 蛋白产量先升高后降低。当乳糖诱导 6 h 时, CVNH 蛋白的产量最高, 而且比 IPTG 诱导 4 h 的 CVNH 蛋白量高。乳糖是二糖诱导剂, 需先降解为葡萄糖和半乳糖, 半乳糖再诱导 CVNH 蛋白的表达。这一过程需要多种酶的参与, 因此诱导时间比 IPTG 长。但随着时间的增加, 会产生乙酸等抑制物, 导致 CVNH 蛋白产量降低。故选用乳糖诱导 6 h 作为最佳诱导时间。

#### 2.6 不同碳源对 CVNH 蛋白产量的影响

本文在 TB 培养基中分别添加:  $\varphi = 2\%$  甘油、20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖、20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖、 $\varphi = 2\%$  甲醇、 $\varphi = 2\%$  乙醇、 $\varphi = 2\%$  异丙醇和  $\varphi = 2\%$  丙酮为碳源, 以不加碳源的 TB 培养基为对照 (ck)。在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量来确定最佳碳源。实验重复 2 次, 结果见图 6。

当培养基中无任何碳源时, CVNH 蛋白产量最高。以葡萄糖为碳源时, CVNH 蛋白的产量最低, 但它的菌体干质量最高, 说明葡萄糖可促进菌体生长。另外, 以乳糖作为诱导剂时, 乳糖分解会产生葡萄糖, 二者共同作用, 使葡萄糖的含量增加, 促进菌体生长。然而, 乳糖也会产生大量乙酸, 抑制目的蛋白表达, 使其表达量降低。另外, 以醇类及酮等有机试剂为碳源时, 目的蛋白的产量与添加糖

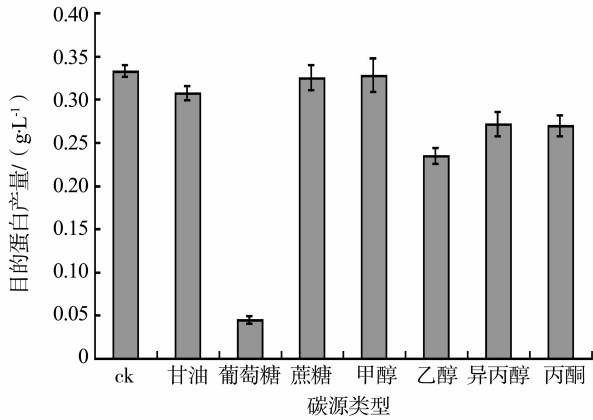


图 6 不同碳源对 CVNH 蛋白产量的影响

Fig. 6 Influence of different carbon source on CVNH protein yields

类相差不大。因而, CVNH 蛋白表达不需再添加任何碳源。

## 2.7 不同氮源对 CVNH 蛋白产量的影响

本文使用的 TB 培养基含有胰蛋白胨和酵母提取物两种氮源, 二者的比例不同会影响 CVNH 蛋白的表达。首先固定胰蛋白胨质量浓度 ( $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 改变酵母提取物的添加量, 分别为 0、4、6、12、24 和  $36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (即添加比例分别为胰蛋白胨: 酵母提取物 = 1:0、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3); 然后固定酵母提取物含量 ( $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 改变胰蛋白胨的添加量, 分别为 0、8、12、24、48 和  $72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (即添加比例分别为酵母提取物: 胰蛋白胨 = 1:0、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3)。另外, 其他无机氮源对蛋白表达量也有影响。为此, 我们固定酵母提取物 ( $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和胰蛋白胨 ( $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 含量, 分别添加了硫酸铵、氯化铵、硝酸铵, 尿素和乙酸铵五种无机氮源, 添加量以氮元素摩尔数相等为依据。在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量来确定最佳氮源。实验重复 2 次, 结果见图 7。

当氮源为  $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  胰蛋白胨时, CVNH 蛋白产量达到最高。虽然曲线仍处于上升趋势, 但变化趋势变小。仅以胰蛋白胨为氮源, CVNH 蛋白百分含量较高, 但菌体干质量偏低, 表明胰蛋白胨可促进蛋白表达。而仅以酵母提取物为氮源, 菌体干质量较高, 但 CVNH 蛋白含量较低, 说明酵母提取物能促进菌体生长。另外, 添加的其它无机氮源并没有明显提高蛋白表达量。因此, 考虑到培养的经济性, 我们决定不再增加其他氮源。故选取  $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  胰

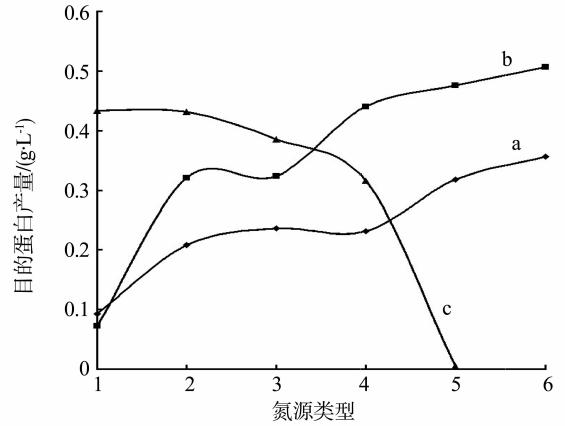


图 7 不同氮源对 CVNH 蛋白产量的影响

Fig. 7 Effect of different nitrogen source on CVNH protein yields

(曲线 a 代表胰蛋白胨为  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  不变, 横坐标 1-6 分别表示酵母提取物为 0、4、6、12、24 和  $36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 曲线 b 代表酵母提取物为  $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  不变, 横坐标 1-6 分别表示胰蛋白胨为 0、8、12、24、48 和  $72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 曲线 c 代表胰蛋白胨为  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和酵母提取物为  $24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  不变, 横坐标 1-5 分别表示添加的无机氮源为硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、尿素、乙酸铵)

蛋白胨作为最佳氮源。

## 2.8 不同初始 pH 对 CVNH 蛋白产量的影响

本文初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5, 在其它条件相同的情况下培养大肠杆菌, 根据 CVNH 蛋白产量确定最佳初始 pH。实验重复 2 次, 结果见图 8。

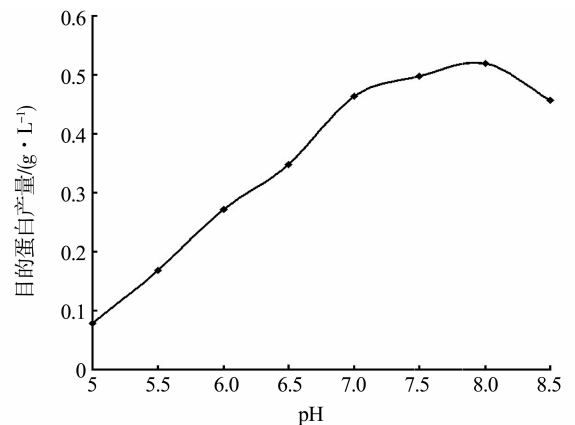


图 8 不同初始 pH 对 CVNH 蛋白产量的影响

Fig. 8 Influence of different initial pH on CVNH protein yields

随着培养基初始 pH 的增加, CVNH 蛋白产量先增加后减少, 当初始 pH 为 8.0 时, CVNH 蛋白产量达到最高。本研究优化的最佳培养基初始 pH

为 8.0。

## 2.9 CVNH 蛋白产量优化前后的对比

在不同影响因素的优化过程中, 存在多种外部因素的影响, 如菌种和培养环境的差异。为检测优化后的蛋白表达效果, 在相同的条件下, 我们比较了优化前后的蛋白表达量。优化后的实验条件为: 含  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白胨的 TB 培养基, 培养基初始 pH 为 8.0, 菌液  $A_{600\text{nm}}$  为 0.6 时加入  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乳糖诱导 6 h。根据 CVNH 蛋白产量判断优化的效果。实验重复 2 次, 结果见图 9。

优化后的目的蛋白表达量增高, CVNH 蛋白的表达量较优化前提高了 1.9 倍, 说明优化效果明显。

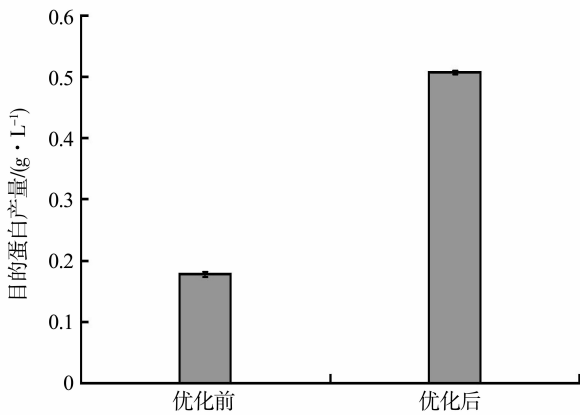


图 9 优化前后 CVNH 蛋白产量的对比

Fig. 9 Comparison of CVNH protein yields between optimized and not optimized conditions

## 3 讨论

以大肠杆菌为代表的原核表达系统目前广泛用于外源基因的表达。作为宿主菌, 大肠杆菌遗传背景清晰、易于控制、培养条件简单、生长迅速, 短时间内可获得大量的蛋白质<sup>[15]</sup>。大肠杆菌 Rosetta 2 是 BL21 的改造菌种, 增加了相容性的氯霉素抗性质粒, 补充了七种稀有密码子 (AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA、CGG) 对应的的 tRNA, 因而提高了含稀有密码子外源基因的表达量<sup>[16]</sup>。CVNH 蛋白是最近发现的 CVNH 蛋白家族新成员, 含有与 CVN 非常相似的抗 HIV 结构域。在前期研究中, 我们首先尝试利用 CVNH 编码序列进行重组蛋白的制备。由于在编码序列中含有多个稀有密码子, 而且存在两个稀有密码子串联存在的现象, 我们选择可以额外提供稀有密码子 tRNA 的 Rosetta

2 (DE3) 作为表达宿主菌, 避免由稀有密码子造成的翻译问题<sup>[17]</sup>。

pET 表达系统是一种高效的原核表达系统, 它利用 T7 启动子控制外源基因的表达, 而 T7 启动子由乳糖操纵子操控的 T7 RNA 聚合酶控制。外源基因克隆到宿主菌中并不立即表达, 只有在诱导剂的作用下, 诱导乳糖操纵子操控的 T7 RNA 聚合酶表达, 从而启动外源基因的表达。因此, 将菌体的生长和外源蛋白的表达分开, 可以避免相互影响, 便于控制。

本文主要探讨了最佳培养基类型及成分、培养基初始 pH、诱导时机、诱导剂浓度及诱导时间对 CVNH 蛋白在大肠杆菌中表达的影响。以摇瓶培养的方式, 对 CVNH 在大肠杆菌 *E. coli* Rosetta 2 (DE3) 中的培养条件进行了优化。具体分述如下: ①培养基是宿主菌生长繁殖和目的蛋白积累的能量和物质来源, 不同培养基的营养物质不同, 它们对大肠杆菌的生长和 CVNH 蛋白的表达有影响<sup>[18]</sup>。本文确定 TB 培养基为最佳培养基。该培养基以甘油为碳源, 可减少培养过程中乙酸的产生; 磷酸盐缓冲液可维持 pH 的稳定, 有利于宿主菌的生长及 CVNH 蛋白的表达。②诱导的时机非常重要<sup>[19]</sup>。诱导时机的不同, 会导致宿主菌生长状态和菌体密度的不同, 因而蛋白的表达量也不同。我们确定  $A_{600\text{nm}}$  在 0.6 时为最佳诱导时机。③诱导剂对于外源基因的高效、稳定表达也极为重要, 不同类型和浓度的诱导剂对于目的蛋白的表达量有影响<sup>[20]</sup>。IPTG 虽然是常用的诱导剂, 能高效的诱导蛋白的表达。但对菌体存在抑制作用和毒性, 会影响质粒的稳定性, 促使质粒丢失, 而且价格昂贵, 不适于大规模发酵生产。发酵生产中常使用乳糖为诱导剂, 替代 IPTG。乳糖对宿主菌没有抑制作用, 可提供碳源。本文确定  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的乳糖为最佳诱导剂。④诱导时间的长短能影响蛋白的表达量。诱导时间短, CVNH 蛋白的表达量低; 诱导时间长, 乙酸等抑制物的产生会导致 CVNH 蛋白产量降低。本文选用乳糖诱导 6 h 为最佳诱导时间。⑤碳源是大肠杆菌生长过程中的能量来源, 能提供合成原料和细胞碳架, 因而不同的碳源对蛋白产量的影响较大<sup>[21]</sup>。本文 CVNH 蛋白表达不需再添加任何额外的碳源。⑥氮源是宿主菌代谢过程中含氮物的原料。培养基的氮源有两类: 无机氮源和有机氮源。本文添加的其它无机氮源并没有明显提高 CVNH 蛋白表达量, 因而决定不再增加其他氮源, 仅以 TB 培养基中的  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰

蛋白胨作为最佳氮源。⑦pH 能影响培养基中营养物质的离子化程度和酶的活性, 从而影响宿主菌对营养物质的吸收和目的蛋白的高效表达<sup>[22]</sup>。大肠杆菌表达外源蛋白一般最佳 pH 为 6.0~6.5, 而本研究优化的最佳培养基初始 pH 为 8.0。这是因为大肠杆菌在培养过程中, 会有乙酸等代谢物的产生和累积, 使培养基的 pH 值下降到接近最佳外源蛋白表达的 pH 范围。

因此, 优化后的诱导条件是: 含  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白胨的 TB 培养基、培养基初始 pH 为 8.0、菌液  $A_{600\text{nm}}$  为 0.6 时加入  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乳糖诱导 6 h。另外, CVNH 蛋白的表达量较优化前提高了 1.9 倍, 优化效果明显。这为工业化发酵提供了理论依据, 也为进一步开展 CVNH 的药物研制和开发奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] BOYD M R, GUSTAFSON K R, MCMAHON J B, et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 1997, 41(7): 1521–1530.
- [2] GUSTAFSON K R, SOWDER R C, HENDERSON L E, et al. Isolation, primary sequence determination, and disulfide bond structure of cyanovirin-N, an anti-HIV (human immunodeficiency virus) protein from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(1): 223–228.
- [3] YANG F, BEWLEY C A, LOUIS J M, et al. Crystal structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein, shows unexpected domain swapping [J]. *J Mol Biol*, 1999, 288(3): 403–412.
- [4] PERCUDANI R, MONTANINI B, OTTONELLO S. The anti-HIV cyanovirin-N domain is evolutionarily conserved and occurs as a protein module in eukaryotes [J]. *Proteins*, 2005, 60(4): 670–678.
- [5] BEWLEY C A, GUSTAFSON K R, BOYD M R, et al. Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein [J]. *Nature Structural Biology*, 1998, 5(7): 571–578.
- [6] BOLMSTEDT A J, O'KEEFE B R, SHENOY S R, et al. Cyanovirin-N defines a new class of antiviral agent targeting N-linked, high-mannose glycans in an oligosaccharide-specific manner [J]. *Molecular Pharmacology*, 2001, 59(5): 949–954.
- [7] BARRIENTOS L G, O'KEEFE B R, BRAY M, et al. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP<sub>1,2</sub> and inhibits infectivity of Ebola virus [J]. *Antivir Res*, 2003, 58(1): 47–56.
- [8] O'KEEFE B R, SMEE D F, TURPIN J A, et al. Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(8): 2518–2525.
- [9] 齐小琼, 高磊, 苏应娟, 等. CVNH 结构域的进化分析和选择压力检测 [J]. *遗传*, 2010, 32(1): 87–94.
- [10] QI Xiaoqiong, YANG Yongxia, SU Yingjuan, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cyanovirin-N homology gene in *Ceratopteris thalictroides* [J]. *American Fern Journal*, 2009, 99(2): 78–92.
- [11] BEWLEY C A, OTERO-QUINTERO S. The potent anti-HIV protein cyanovirin-N contains two novel carbohydrate binding sites that selectively bind to Man<sub>8</sub> D1D3 and Man<sub>9</sub> with nanomolar affinity: implications for binding to the HIV envelope protein gp120 [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(17): 3892–3902.
- [12] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992: 908–910.
- [13] TABANDEH F, KHODABANDEH M, YAKHCHALI B, et al. Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture [J]. *Chemical Engineering Science*, 2008, 63(9): 2477–2483.
- [14] 王晓洲, 刘丹. 大肠杆菌工程菌发酵工艺中诱导条件的研究 [J]. *四川文理学院学报*, 2010, 20(2): 46–48.
- [15] 戎晶晶, 刁振宇, 周国华. 大肠杆菌表达系统的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2005, 12(6): 416–420.
- [16] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展 [J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2008, 5(3): 77–82.
- [17] BURGESS-BROWN N A, SHARMA S, SOBOTT F, et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study [J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 59(1): 94–102.
- [18] 杨炜, 王伟刚, 田海英, 等. 重组大肠杆菌高表达高密度发酵研究 [J]. *生物技术*, 2006, 16(3): 83–86.
- [19] 周宇荀, 曹巍, 魏东芝, 等. 抗菌肽 Adenoregulin 基因工程菌培养条件的优化及分批发酵研究 [J]. *生物工程学报*, 2005, 21(4): 615–621.
- [20] RABHI-ESSAFI I, SADOK A, KHALAF N, et al. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon  $\alpha$  as a GST-fusion protein in *E. coli* [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2007, 20(5): 201–209.
- [21] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [22] 魏蔚, 刘萍, 白斌, 等. 重组大肠杆菌 DH5 $\alpha$  生产 rh-Tum-5-NGR 培养条件的优化 [J]. *西北大学学报: 自然科学版*, 2010, 40(4): 622–626.