

胡萝卜抗冻蛋白在大肠杆菌中的高效表达^{*}

张党权, 刘 兵, 范 云, 何炎明, 王金发

(中山大学生命科学学院 // 教育部基因工程重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 以 pET-11a 为载体构建了胡萝卜抗冻蛋白非融合表达的重组质粒, 并在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3, pLysS) 中成功地进行了高效表达。表达的蛋白质以包涵体的形式存在, 相对分子质量为 36 800。经正交试验得到了优化的诱导表达条件。包涵体经各种缓冲液洗涤纯化、溶解、复性和超滤浓缩后, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 纯度达单一带水平。生物学活性研究表明, 重组表达的胡萝卜抗冻蛋白具有很强的热滞活性和提高细菌耐寒性的作用。

关键词: 胡萝卜 *Daucus carota* var *sativa*; 抗冻蛋白; 表达; 包涵体; 诱导; 复性

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 03-0051-05

抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFPs) 是一类能抑制冰晶生长的蛋白质, 能在一定程度上降低水溶液的冰点, 并具有热滞 (thermal hysteresis) 活性。抗冻蛋白自从被发现以来, 已经在鱼类、昆虫和植物中开展了广泛的研究, 并已在冷冻食物的组织维持、血液、组织及器官的低温保存, 低温外科手术和农作物的冻害防治等方面有了一定的应用^[1]。与动物和昆虫抗冻蛋白具有较高的热滞值相比, 植物的抗冻蛋白的热滞值却只有 0.1~0.6 °C, 因而推测植物抗冻蛋白主要是修饰冰晶的形态和抑制重结晶^[2]。1998—1999 年, Dawn Worrall^[3] 和 Knut Meyer^[4] 等先后独立在胡萝卜中发现了具有冷诱导特性的抗冻蛋白, 并分离出此抗冻蛋白的编码基因。该抗冻蛋白的相对分子质量为 36 800, 具有 LRR (亮氨酸富集重复序列) 特征序列, 其 N 端是糖基化的, 能显著地抑制冰晶的形成^[5]。范云^[6] 等以中国胡萝卜栽培种为材料克隆了该抗冻蛋白的编码基因。本文在此基础上, 以 pET-11a 为载体构建了胡萝卜抗冻蛋白非融合表达的重组质粒, 并在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3, pLysS) 中成功地进行了高效表达, 表达产物能明显提高细菌的耐寒性。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌菌株 BL21 (DE3, pLysS)、表达载体 pET-11a 为本实验室保藏, 带有

胡萝卜抗冻蛋白编码基因的重组质粒 pBlue-afp 为本室所构建。

1.1.2 酶及主要试剂 各种限制性内切核酸酶、T₄ DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶、碱性磷酸酶、蛋白质相对分子质量标准、DNA 相对分子质量标准均购自 TaKaRa 公司, 胡萝卜抗冻基因的 PCR 扩增引物由 GeneCore 公司合成。其它试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 胡萝卜抗冻蛋白基因 PCR 引物设计与扩增 为使胡萝卜抗冻蛋白基因能以非融合表达的方式在大肠杆菌中表达, 以已克隆在重组质粒 pBlue-afp 上的 cDNA 为模板设计一对 PCR 扩增引物:

5' 端引物:

5'—CCGCAT**ATGC**AAAGATGC AAC AAC—3'

3' 端引物:

5'—GGCGAATTC**AACTAGC**ATTCTGGC—3'

根据载体上的酶切位点信息, 在 5' 端引物和 3' 端引物分别引入 *Nde* I 酶切位点和 *Eco* RI 酶切位点 (由下划线标出); 基因的翻译起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 的互补碱基 CTA 用黑体字显示。以质粒 pBlue-afp DNA 为模板进行 PCR, 总反应体积 20 μL: 2.0 μL 10× PCR buffer, 2.0 μL dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L), 10 μmol/L 的 5' 端和 3' 端引物各 0.5 μL, 0.2 μL 5 U μL pfu 高保真 DNA 聚合酶, 0.5 μL 质粒 DNA 模板, PCR water 14.3 μL。反应条

* 收稿日期: 2002-07-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990258); 科技部植物转基因重大专项资助项目 (J00-A-009)

作者简介: 张党权 (1976 年生) 男, 博士生; 通讯联系人: 王金发; E-mail: ls19@zsu.edu.cn

件为: 94 ℃变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 60 s, 35 个循环; 72 ℃延伸 5 min, 4 ℃保存。PCR 扩增后, 吸取 1 μL 进行 $w=1.0\%$ Agarose 电泳以检测扩增结果。

1.2.2 质粒的提取、大肠杆菌感受态细胞的制备、连接产物的转化、重组子的筛选及酶切鉴定均按照文献 [7] 进行。

1.2.3 带有 *afp* 的非融合表达重组质粒的构建 将 *afp* 的 PCR 扩增产物用 *Nde* I 和 *Eco* R I 双酶切, 与经同样双酶切的载体 pET-11a 进行体外连接, 连接产物转化 BL21 (DE3, pLysS), 在氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性重组子。

1.2.4 诱导条件的优化 欲使目的蛋白质在表达体系中含最大, 必须对诱导条件进行优化。主要考虑两个因素: 加入 IPTG 进行诱导时的起始菌体密度和加入 IPTG 的作用浓度, 而诱导时间 (大于 2.5 h) 对目的蛋白的含量和产率的影响很小^[8]。为了得到较优的诱导条件, 采用正交方法进行, 即起始菌体密度为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 (A_{600}) 共 5 个梯度, IPTG 浓度为 0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 mmol/L 共 5 个梯度, 一共有 25 种组合, 诱导时间均为 4 h。经 SDS-PAGE 和光密度扫描检测后, 确定合适的起始菌体密度和 IPTG 浓度。

1.2.5 AFP 包涵体的纯化、溶解和复性 于 4 ℃, 5 000 g 离心 15 min 收集菌体。细菌沉淀用适量的 20 mmol/L TE 洗涤, 同上条件离心除去洗涤液。以每克湿菌加 10 mL 缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, $\varphi=5\%$ 甘油, 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇) 重悬细菌沉淀, 然后置冰浴中超声破碎 (500 W), 超声处理 3 次, 每次 2 min, 间歇 3 min。超声处理完毕, 4 ℃, 15 000 g 离心 15 min 回收沉淀 (即包涵体)。包涵体用 9 倍体积的包涵体洗涤液 I (缓冲液 A 含 1.0 mmol/L EDTA, $\varphi=0.5\%$ Triton X-100) 洗涤 2 次, 再用包涵体洗涤液 II (缓冲液 A 含 2 mol/L 尿素) 洗涤 2 次。沉淀再用包涵体溶解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), $w=0.3\%$ SIS (十二烷基肌氨酸钠), 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇) 溶解, 溶解液经 10 倍稀释, 4 ℃放置过夜。用不含 SLS 的包涵体溶解缓冲液充分透析, 完全去除去污剂使得蛋白质缓慢复性。透析液用 PALL 公司的超滤离心管超滤浓缩至 5 mL, 4 ℃保存。

1.2.6 AFP 的热滞活性检测 热滞活性是抗冻蛋白活性的检测标准。采用 Model 5614 Platinum Resistance Thermometer (Ertcd-Hart, USA) 来检测重组表达的胡萝卜抗冻的热滞活性。该仪器的精度为

0.01 ℃, 采用液氮进行程序降温, 通过计算机上的 COLLECT 程序进行联机操作。

1.2.7 AFP 的细菌抗寒性能检测 进行 AFP 提高细菌抗寒性的功能检测。取新鲜制备的 BL21 pET-11a 一级菌液, 以 $\varphi=1\%$ 的比例进行二级培养, 培养 3 h 后, 将菌液梯度稀释至 10~6 倍, 取 1 mL 稀释菌液加入到 99 mL 无菌水中, 充分混匀后, 吸取 200 μL 的菌液在氨苄青霉素的 LB 平板上进行涂板, 进行菌落总数测定, 同时吸取 1 mL 分装到 24 个 EP 管中, 分别加入终浓度为 5, 10, 15, 20, 25, 30 μg/mL 的 AFP (经过滤灭菌), 以不加 AFP 和只加入相同量透析缓冲液为阴性对照 (每种浓度和阴性对照都为 3 个 EP 管), 在 0~1 ℃分别处理 24, 48, 72, 96, 120 h。在经过 0~1 ℃处理后, 立刻分别吸取 200 μL 菌液在氨苄青霉素的 LB 平板上进行涂板, 37 ℃倒置培养 12 h, 然后进行菌落记数 (取平均值)。

2 结 果

2.1 胡萝卜抗冻蛋白非融合表达载体的构建与鉴定

首先用 *Nde* I 和 *Eco* R I 双酶切重组质粒 pBlue-*afp* 的 PCR 扩增产物, 然后将切下的 *afp* 重组片段 (938 bp) 插入到表达载体 pET-11a 的 *Nde* I 和 *Eco* R I 酶切窗口, 转化 BL21 (DE3, pLysS), 在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选重组子, 得到了重组质粒 pET-*afp* (图 1)。 *Nde* I 和 *Eco* R I 双酶切鉴定阳性克隆, 电泳结果与预期的一致 (图 2)。DNA 测序 (GeneCore) 结果表明插入片段得到了正确的扩增并且插入正确。

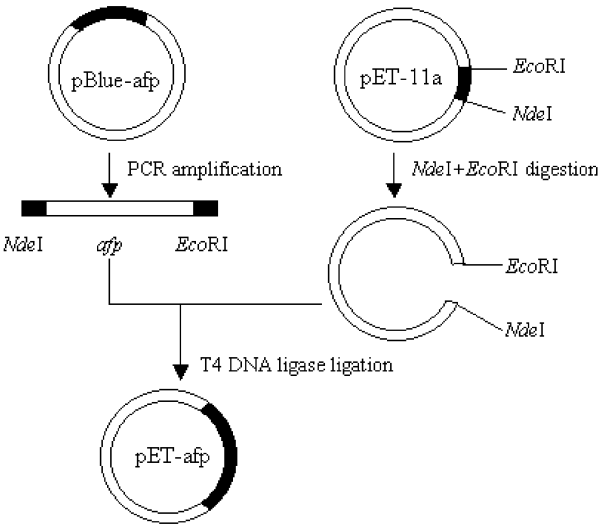


图 1 重组质粒 pET-*afp* 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pET-*afp*

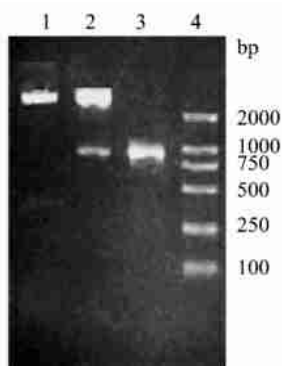


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pET-afp

- 1: 经 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切的载体 pET-11a;
- 2: 经 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切重组质粒 pET-afp;
- 3: 重组质粒 pET-afp 的 PCR 鉴定;
- 4: *DL*2000 的相对分子质量标准

2.2 诱导条件的优化

对诱导条件的起始菌体密度和加入 IPTG 的作用浓度进行正交实验分析 (图 3)。采用光密度扫描法对目的蛋白在总蛋白中的含量进行定量 (图 4)。由于每种组合在加入 IPTG 后均诱导 4 h, 确保了都能得到最大量的表达。结果显示, 随着起始菌体密度 (A_{600}) 的增大, 其诱导表达的蛋白量也逐渐增大, 而此时 IPTG 的浓度对其影响不大; 当 A_{600} 增至 0.50 时, 诱导表达的蛋白量为最大; 当 A_{600} 继续增大时, 诱导表达的蛋白量却逐渐减少, 至 A_{600} 为 1.25 时, 诱导表达的蛋白量为最少。对不同的起始菌体密度而言, 诱导表达的蛋白量随着 IPTG 的浓度增加而逐渐增加, IPTG 的浓度增至 0.5 mmol/L 时, 诱导表达的蛋白量已达最大; 当继续增大 IPTG 的浓度时, 诱导表达的蛋白量却呈逐

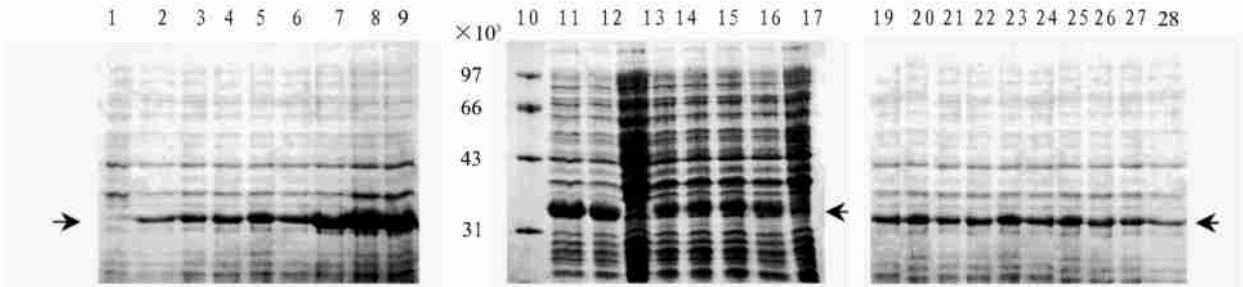


图 3 诱导条件的最优化

Fig 3 Potimization in inductive conditions

- 1: BL21(DE3, p: ysS) 总蛋白;
- 2—6: pET-afp/BL21(DE3, p: ysS) 在相同的 A_{600} 0.25 条件下分别用 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG 进行诱导的总蛋白;
- 7—9, 11, 12: pET-afp/BL21(DE3, p: ysS) 在相同的 A_{600} 0.50 条件下分别用 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG 进行诱导的总蛋白;
- 10: 蛋白质相对分子质量标准;
- 13—17: pET-afp/BL21(DE3, p: ysS) 在相同的 A_{600} 0.75 条件下分别用 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG 进行诱导的总蛋白;
- 18: pET-11a/BL21(DE3, p: ysS) 总蛋白;
- 19—23: pET-afp/BL21(DE3, p: ysS) 在相同的 A_{600} 1.00 条件下分别用 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG 进行诱导的总蛋白;
- 24—28: pET-afp/BL21(DE3, p: ysS) 在相同的 A_{600} 1.25 条件下分别用 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 mmol/L IPTG 进行诱导的总蛋白;

渐减少的趋势, 这与高浓度 IPTG 对细菌的生长有一定的抑制作用相符合^[9]。通过正交试验, 得到了优化的起始菌体密度和 IPTG 工作浓度, 即 A_{600} 为 0.5 时, IPTG 为 0.5 mmol/L。随着诱导时间的增加 (小于 2.5 h), 目的蛋白含量也逐渐增加, 当目的蛋白含量增至最大值 (2.5 h) 后就不再增加, 而且其占全菌总蛋白的比例呈逐渐减小的趋势 (3.5 h 后) (图略)。通过以上的分析, 优化的诱导条件应为: A_{600} 为 0.5; IPTG 为 0.5 mmol/L; 诱导时间: 2.5 h。

2.3 AFP 包涵体的纯化、溶解及复性

在 afp 基因克隆到表达载体 pET-11a 的过程中,

由于所插入的 *Nde*I 酶切位点为载体中的非融合表达位点, 因而在重组工程菌中表达的胡萝卜抗冻蛋白为其完整的天然蛋白。经超声破碎、包涵体纯化、包涵体溶解、复性和超滤浓缩处理后, 得到了较纯的胡萝卜抗冻蛋白, 质量浓度达到了 0.594 mg/mL (图 5)。采用上述的优化表达方法, 1 L 发酵液能得到约 18.80 mg 重组蛋白。

2.4 AFP 的热滞活性检测

1 mg/mL 的重组表达的 AFP 被用来进行热滞活性检测 (缓冲液作为阴性对照)。结果表明, 经大肠杆菌重组表达胡萝卜抗冻蛋白的热滞值为 0.34 °C, 与从胡萝卜体内直接分离的抗冻蛋白的热滞值

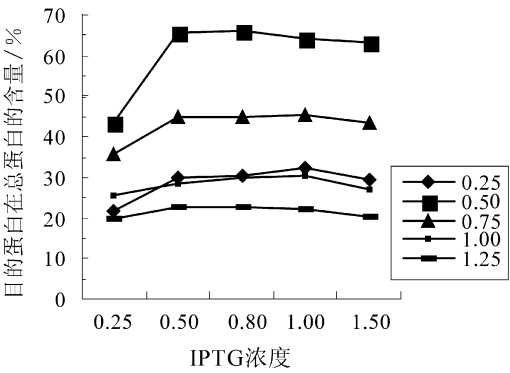


图 4 目的蛋白含量的定量分析

Fig 4 Quantitative analysis of budget protein in concentration

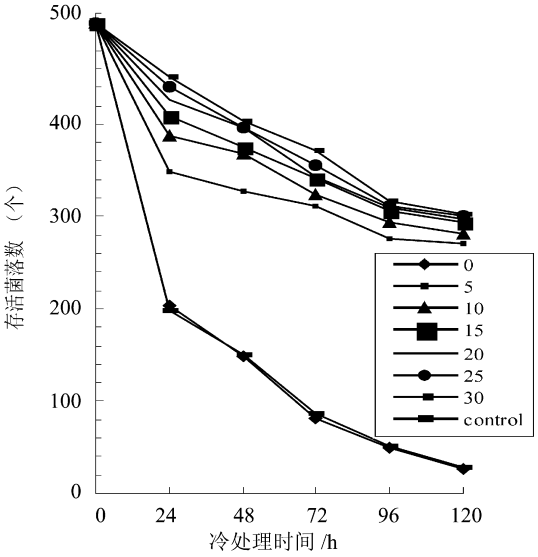


图 6 胡萝卜 AFP 提高细菌低温抗性的效果

Fig 6 Effects of carrot AFP on low temperature resistance of bacteria

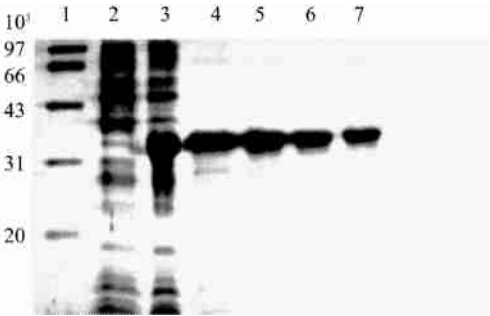


图 5 AFP 包涵体的复性和纯化

Fig 5 Purification and refolding of AFP inclusion body

- 1: 蛋白质相对分子质量标准;
- 2: BL21(DE3, p: ysS) 总蛋白;
- 3: pET-afp/BL21(DE3, p: ysS) 总蛋白;
- 4: 纯化的 AFP 包涵体;
- 5: 溶解后的 AFP 包涵体;
- 6: 复性的 AFP;
- 7: 浓缩的 AFP

几乎完全相同 ($0.35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 mg/mL)^[3], 表明在大肠杆菌中表达和纯化的胡萝卜抗冻蛋白具有与其天然形式相同的热滞活性。这一结果表明采用本文的表达与纯化方法, 不仅能得到大量的重组胡萝卜抗冻蛋白, 而且具有很强的热滞活性, 因而本文中的方法是一个高效的表达与纯化方法。

2.5 AFP 的细菌抗寒性能检测

大肠杆菌表达的胡萝卜抗冻蛋白具有明显提高细菌抗寒性能的作用 (图 6)。与不加抗冻蛋白和只加复性缓冲液的阴性对照相比, 加入少量的胡萝卜抗冻蛋白 ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) 就可以显著地提高细菌的抗寒性能, 而提高抗冻蛋白的使用量可使抗寒性能相应增加, 但增幅不大。

3 讨论

虽然抗冻蛋白在动植物中都存在, 但迄今为止只有鱼类的抗冻蛋白得到了较为系统的研究。由于植物的抗冻性状往往是多个基因共同作用的结果^[10], 因而, 单独具有较强抗冻性能的胡萝卜抗冻蛋白将有十分重要的理论研究价值和诱人的应用前景。由于对胡萝卜抗冻蛋白的研究工作还处于起始阶段, 因而得到大量纯化的具有天然活性的蛋白对于进一步开展其功能和作用机理的研究是非常重要的。

由于融合蛋白易于纯化和进行检测, 因而在大肠杆菌中表达外源蛋白时, 最常用的方法是采用融合表达的方式^[11]。但融合蛋白中担体蛋白的存在经常会影响目的蛋白正常的功能和结构研究, 而且后续处理费用昂贵^[12]。我们采取了非融合表达即完整天然蛋白表达的方案, 不仅可以得到大量纯化的天然的胡萝卜抗冻蛋白, 而且经济简便。

由于不同的诱导条件在一定程度上决定了目的蛋白的最终得率, 因而找到该目的蛋白优化的诱导表达条件就非常必要。诱导条件的两个关键因素是起始菌体密度和 IPTG 作用浓度, 因而以这两个因素为变量对其进行正交试验分析, 然后通过线性方式确定诱导时间, 从而得到优化的诱导条件, 并在此基础上, 使胡萝卜抗冻蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3, pLysS) 中进行了高效表达, 获得了具有高度生物活性的重组表达的胡萝卜抗冻蛋白, 为其今后的定点突变和结构功能域的研究打下了基础。

参考文献:

- [1] KNIGHT C A. Adding to the antifreeze agenda[J] . Nature, 2000, 406: 249—251.
- [2] GRIFFITH M, ANTIKAINEN M, HON W C, et al. Antifreeze proteins in winter rye[J] . Physiol Plant, 1997, 100 (2): 327—332.
- [3] WORRALL D, ELIAS L, ASHFORD D, et al. A carrot Leucine-Rich Repeat protein that inhibits ice recrystallization [J] . Science, 1998, 282(2): 11—13.
- [4] MEYER K, KEIL M, NALDRETT M J. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity[J] . FEBS letters, 1999, 447: 171—178.
- [5] SMALLWOOD M, WORRALL D, BYASS L, et al. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) [J] . Biochem J, 1999, 340: 385—391.
- [6] 范云, 刘兵, 王宏斌, 等. 胡萝卜抗冻蛋白基因的克隆及其在 *E. coli* 中的表达[J] . 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 53—56.
- [7] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning, a laboratory manual [M] . 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 1. 31—1. 138.
- [8] BURG M, MUTHING J. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction[J] . Process Biochemistry, 2000, 9 (35): 1019—1025.
- [9] PATNAIK P R. Investigation of induction effect on the steady state performance of a continuous fermentation for recombinant β -galactosidase[J] . Process Biochemistry, 2001, 11(36): 1069—1074.
- [10] KAYE C, NEVEN L, HOFIG A, et al. Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold acclimation proteins in tobacco [J] . Plant Physiol, 1998, 116: 1367—1377.
- [11] FORD C F, SUOMINEN I, GLATZ C E. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins[J] . Protein Expr. Purif, 1991, 2: 95—107.
- [12] MARIA M C, JOSE L C, ANTONIO V. Proteolytic digestion of bacterial inclusion body proteins during dynamic transition between soluble and insoluble forms [J] . Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1434: 170—176.

High Efficient Expression of Carrot Antifreeze Protein in *E. coli*

ZHANG Dang-quan, LIU Bin, FAN Yun, HE Yan-ming, WANG Jin-fa

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using pET-11a as vector, a recombinant plasmid containing coding sequence of carrot antifreeze protein (AFP) was constructed and high efficiently expressed in the *E. coli* BL21 (DE3, pLysS) strain. A non-fusion expression protocol was adopted to express carrot AFP, the expressed carrot AFP existed in the form of inclusion body in the total proteins, and the molecular weight of the recombinant protein is 36 800. An optimal inductive condition was obtained by a designed orthogonal experiments protocol. The AFP inclusion body was dissolved after washed with kinds of washing buffers, and the AFP in the supernatant was refolded and concentrated by ultrafiltration. The purified AFP displayed a single band by SDS-PAGE analysis, and could increase low temperature resistance of bacteria with thermal hysteresis activity.

Key words: carrot (*Daucus carota* var. *sativa*); antifreeze protein; expression; inclusion body; induction; renaturation