

乳糖作为诱导剂对人 β -防御素 3 蛋白表达的影响*

李春丽^{1,3} 席燕燕¹ 陈正华² 何国庆³

(河南农业大学牧医工程学院 郑州 450002)¹ (甘肃亚盛集团博士后科研工作站北京分站 北京 100101)²

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310019)³

摘要: 对人 β -防御素 3 基因工程菌株 BL21-pET-hBD₃ 的乳糖诱导条件进行了研究。乳糖浓度、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, 高浓度乳糖对菌株生长有抑制作用 ($P < 0.01$), 对目的蛋白的表达无显著影响 ($P > 0.05$), 延长诱导时间对菌株生长有利 ($P < 0.01$), 但对蛋白的表达无显著影响 ($P > 0.05$)。以 0.5% 乳糖在 37℃ 诱导 4h 对目的蛋白的表达有利, 目的蛋白的含量可达 28.1%。控制好诱导条件, 乳糖与 IPTG 的诱导效果基本相当。

关键词: 人 β -防御素 3; 大肠杆菌; 重组表达; 优化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0084-05

The Influences of Lactose as an Inducer on Expression of Human β -defensin 3 in *E. coli**

LI Chun-Li^{1,3} XI Yan-Yan¹ CHEN Zheng-Hua² HE Guo-Qing³

(College of Animal and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002)¹

(Beijing Branch of Postdoctoral Workstation of Gansu Yasheng Group Company, Beijing 100101)²

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)³

Abstract: The inductive conditions used lactose as inducer for the flask-shaking of *E. coli* BL21-pET-hBD₃ have been studied. The effect of three factors which were lactose concentration, induction time and temperature on growth of strains and on the yield of hBD₃ was analyzed in detail. The result indicated that high lactose concentration inhibit the growth of strains ($P < 0.01$) but had little effect on expression of target protein among 0.5%-5% ($P > 0.05$). Biomass would be improved as time passed ($P < 0.01$), but the yield of expressed protein didn't increase obviously ($P > 0.05$). The greater expressed level of hBD₃, as high as 28.1% of total strain protein, could be gained when strain was induced by 0.5% lactose at 37℃ for 4h. The effect using lactose as inducer is almost as same as using IPTG as inducer under control conditions.

Key words: Human β -defensin 3, *E. coli*, Recombinant expression, Lactose

防御素是生物体内产生的一种具有强烈抗菌作用的多肽类物质, 具有分子量小、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等优点, 具有独特的研究和开发价值^[1-3]。人 β -防御素 3 (hBD₃) 是最近发现的第 3 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], 但是直接分离防御素成本极高, 通过基因工程手段大量生产防御素是一有效途径。我们采用严紧控制性菌株 BL21

* 河南省自然科学基金项目 (No. 0411030300)

河南省教育厅基础研究项目 (No. 2004922043)

通讯作者 Tel: 0371-63554594, E-mail: hncelli@163.com

收稿日期: 2006-03-14, 修回日期: 2006-05-30

(DE) *plysS* 构建了人 β -防御素 3 高效表达的工程菌株, IPTG 诱导表达了与天然提取蛋白活性基本相当的防御素蛋白^[8]。

IPTG 是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂, 但是 IPTG 对于人体具有潜在的毒性, 并且价格昂贵, 在大规模发酵生产中, 通常不用 IPTG 诱导。乳糖是乳糖操纵子的天然诱导物, 与 IPTG 不同的是乳糖必须借助于乳糖通透酶的作用进入细胞, 并经 β -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖后起诱导作用^[9]。其诱导过程更为复杂, 诱导效果也不及 IPTG, 尽管如此, 乳糖因其无毒、廉价的优点对基因工程产品的工业化生产具有重要的意义。人 β -防御素 3 的乳糖诱导表达还未见报道, 本实验对重组蛋白在大肠杆菌中的乳糖诱导表达条件进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

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

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 50mL LB 液体培养基的 250mL 锥形瓶中, 37℃ 250r/min 培养过夜后成为活化种子, 1.5% 的接种量接入含 100mL 液体培养基的 500mL 锥形瓶中进行培养和诱导。

1.2.2 乳糖浓度、诱导时间和温度的优化: 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℃ 以不同的乳糖浓度进行诱导表达, 乳糖的终浓度分别为 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%。诱导至 4h 和 6h 分别取样进行菌体浓度的测定和融合蛋白表达量的测定, 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乳糖浓度、诱导时间和温度。最后再在一定范围内与 IPTG 的诱导效果进行比较分析。

1.2.3 菌体生物量的测定: 取培养菌液测定其 600nm 光吸收值, 作为菌体生物量的指示。

1.2.4 融合蛋白表达量的测定: 取 1mL 菌液离心后, 加入上样缓冲液煮沸 5min, 进行 15% SDS-PAGE 分析, 采用多功能荧光分析系统及软件 (购自美国冷泉港仪器公司), 灰度扫描测定目的产物占菌体总蛋白的百分比含量及目的蛋白的 OD 值, 以确定目的蛋白表达的相对含量和绝对含量。

1.2.5 数据的分析: 所得数据采用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 乳糖浓度、诱导时间和温度的确定

2.1.1 乳糖浓度、诱导时间和温度对菌株生长的影响: 30℃ 和 37℃ 以不同乳糖浓度进行诱导表达, 诱导至 4h、6h 时测定的生物量均值如图 1 所示。方差分析显示, 乳糖浓度、诱导时间和温度对于菌株生长均有极显著影响 ($P < 0.01$), 37℃ 优于 30℃ ($P < 0.01$), 诱导 6h 优于 4h ($P < 0.01$), 高浓度乳糖对菌体生长有明显抑制作用 ($P < 0.01$)。多重比较分析得知, 4h 时, 0.5% 和 1%、2% 和 3%、4% 和 5% 之间无显著差

异, 其它浓度之间差异极显著。6h时, 1%和2%、2%和3%、4%和5%之间无显著差异, 其它浓度之间有极显著差异。

2.1.2 乳糖浓度和温度对目的蛋白表达的影响: 以不同的乳糖浓度和温度诱导至4h时取样进行SDS-PAGE结果如图2所示, 箭头所指是目的蛋白(6h时的诱导结果与4h类似, 图略)。从图中可以看到, 37℃诱导优于30℃, 对目的蛋白的扫描分析结果显示, 温度对目的蛋白的表达有极显著影响, 37℃优于30℃ ($P < 0.01$), 所取的乳糖浓度范围对目的蛋白表达无显著影响 ($P > 0.05$), 因此可采用低浓度的乳糖进行诱导, 又因为高浓度乳糖对于菌株的生长有一定的抑制作用, 以0.5%的浓度诱导比较合适。

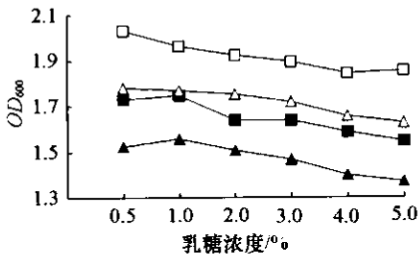


图1 不同温度和乳糖浓度诱导不同时间所收获的生物量

▲—30℃ 4h, ■—37℃ 4h,
△—30℃ 6h, □—37℃ 6h

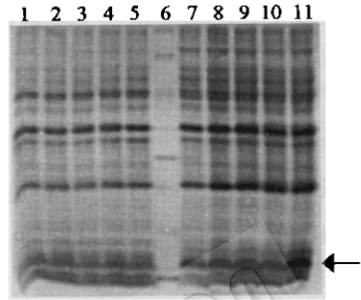


图2 以不同乳糖浓度诱导4h时的SDS-PAGE电泳分析

1~5 30℃时以不同乳糖浓度诱导的结果(0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%), 7~11 37℃时以不同乳糖浓度诱导的结果(0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%)

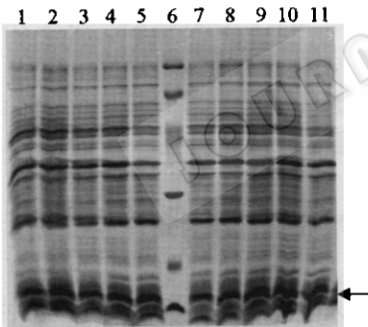


图3 30℃时以不同乳糖浓度诱导不同时间的SDS-PAGE电泳分析

1~5 30℃时不同乳糖浓度诱导4h时的结果(0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%), 7~11 30℃时不同乳糖浓度诱导6h时的结果(0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%)

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乳糖浓度诱导至4h和6h的结果在同一块胶上进行比较, 以确定适合的时间, 30℃的诱导电泳结果如图3所示, 箭头所指是目的蛋白(37℃的结果与30℃的结果类似, 图略)。从图可以看到, 在同一温度下, 乳糖浓度和时间对目的蛋白表达无明显影响。对其扫描分析结果分析显示, 同一温度下, 乳糖浓度和诱导时间对目的蛋白的表达无显著影响 ($P > 0.05$)。培养6h时, 菌体浓度明显增加, 而表达量并没有明显增加, 因此, 从节约能源的角度考虑, 以诱导4h为宜。

2.2 与IPTG诱导效果的比较

为了比较乳糖和IPTG诱导的结果, 我们选择一系列温度, 采用0.2mmol/L IPTG和0.5%的乳糖分别诱导4h后对收获的生物量和目的蛋白表达量进行比较。结果如图4和5所示。

从图4可以看到, 温度和诱导剂对菌株生长均有影响。方差分析表明, 以乳糖为诱导剂时菌株生长优于以IPTG为诱导剂时 ($P < 0.01$), 温度对菌株生长有极显著影响 ($P < 0.01$), 多重比较后得知, IPTG诱导时, 以34℃最优, 乳糖诱导时, 37℃最优。从图5可以看到, 温度对诱导结果有明显的影响, 扫描显示的目的蛋白占总蛋白的百分比含量和目的蛋白OD值见图6和7。

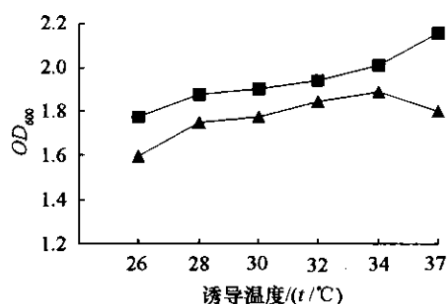


图4 不同温度和诱导剂诱导 4h 所收获的生物量

—▲— IPTG, —■— 乳糖

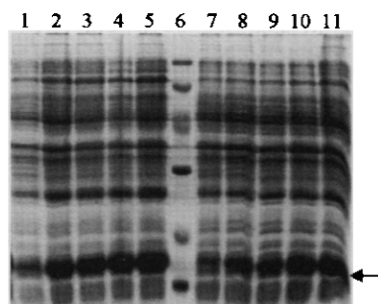


图5 不同温度下 IPTG 和乳糖分别诱导的 SDS - PAGE

1~5 不同温度下 IPTG 的诱导结果 (28°C, 30°C, 32°C, 34°C, 37°C), 7~11 不同温度下乳糖的诱导结果 (28°C, 30°C, 32°C, 34°C, 37°C)

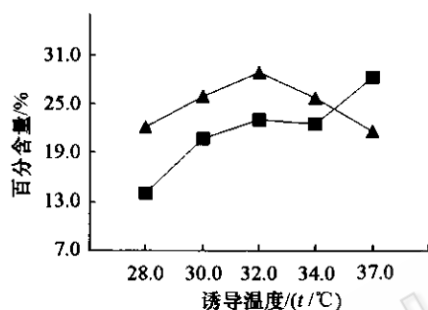


图6 不同温度和诱导剂诱导时目的蛋白的百分比含量

—▲— IPTG, —■— 乳糖

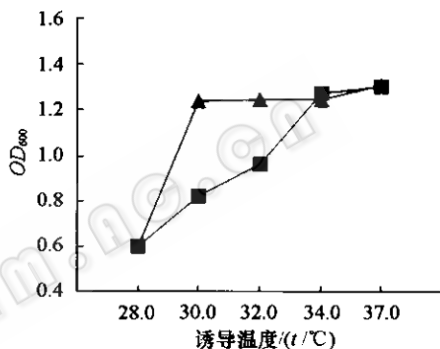


图7 不同温度和诱导剂诱导时目的蛋白的 OD 值

—▲— IPTG, —■— 乳糖

方差分析表明, 温度对目的蛋白表达有显著影响 ($P < 0.01$), IPTG 诱导时, 30°C ~ 34°C 诱导都可得到满意结果。乳糖诱导时, 诱导温度以 37°C 为宜。不同诱导剂的诱导效果与温度密切相关, 低温时 (28°C ~ 34°C), IPTG 的诱导效果优于乳糖, 高温 (37°C) 时, 乳糖的诱导效果优于 IPTG, 控制好条件, 乳糖的诱导效果和 IPTG 的诱导效果基本接近, 目的蛋白的表达量可达 28.1%。

3 讨论

乳糖操纵子是研究得最为详尽的基因操纵子, 乳糖是乳糖操纵子的天然诱导物, 虽然其诱导过程要比 IPTG 复杂一些, 诱导效果也有所不及, 但是其无毒、廉价的优点对基因工程产品的工业化生产具有重要意义。本文深入研究了以乳糖为诱导剂时, 影响菌株生长和目的产物表达的诱导剂浓度、诱导时间和温度等因素, 从中分析并寻找适合菌株 B121-pET-hBD₃ 生长和诱导的条件。结果表明, 37°C 以 0.5% 的乳糖诱导 4h 对于菌株生长、诱导以及节约能源非常有利, 表达量可达 20% 左右, 这和其他以乳糖诱导的结果基本相当^[10-13]。张毅等以乳糖诱导白细胞介素 3 的表达量可达总菌体蛋白的 15%, 刘永庆等以乳糖诱导生长抑素的表达量在 20% 左右^[10,11], 吴一凡以乳糖诱导人 B 淋巴细胞刺激因子表达量可达 10.3% ~ 15.7%^[12], 这可能与携带的目的基因不同

有关^[13],可能也与起始诱导的 OD_{600} 值不同有关。

进一步的研究表明适合的条件可以使乳糖与 IPTG 的诱导效果基本相当,诱导的目的蛋白可占菌体蛋白的 28.1%,说明在诱导过程中的条件控制非常重要,本实验兼顾了表达量和菌体的收获量,有利于提高单位体积设备的生产能力。以乳糖为诱导剂时,菌株的生长优于以 IPTG 为诱导剂时,可能是因为乳糖本身可以作为碳源被菌体利用,并且以不同的诱导剂诱导时,适合菌株生长和目的蛋白表达的温度有明显的差异,可能诱导剂的不同会引起菌体不同的生理和生长特性变化,对于其机理和规律还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Ganz T, Lehrer R I. *Current Opinion in Immunology*, 1994, **6**: 584 ~ 589.
- [2] Hancock R E. *Lancet Infect Dis*, 2001, **11** (3): 156 ~ 164.
- [3] Periathamby A R, Andrew R D. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **206**: 9 ~ 10.
- [4] Bensch K W, Raida M, Magert H J. *FEBS Letter*, 1995, **368**: 331.
- [5] Harder J, Bartels J, Christophers E. *Nature*, 1997, **387**: 861.
- [6] Harder J, Bartels J, Christophers E. *J Biol Chem*, 2001, **276** (8): 5707 ~ 5713.
- [7] Garcia J R, Krause A, Schulz S. *FASEB J*, 2001, **15** (10): 1819 ~ 1821.
- [8] 李春丽, 阮 辉, 陈正华, 等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, **5**: 705 ~ 708.
- [9] Wong P, Gladney S, Keasling J D. *Biotechnol Prog*, 1997, **13** (2): 132 ~ 143.
- [10] 张 毅, 屈贤铭, 杨胜利. *生物工程学报*, 2000, **16** (4): 464 ~ 468.
- [11] 刘永庆, 刘文波, 潘杰彦, 等. *南京农业大学学报*, 2003, **26** (1): 61 ~ 65.
- [12] 吴一凡, 张双全, 高秀玉. *南京师范大学学报*, 2002, **25** (1): 89 ~ 93.
- [13] Yan J, Zhao S F, M Y F, *World J Gastroenterol*, 2004, **10** (12): 1755 ~ 1758.