

重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 发酵条件优化

刘云海¹, 李 钰¹, 孙芳娇¹, 高炳森^{2*}

1.海南医学院理学院,海口 571199;

2.海南医学院药学院,海口 571199

摘 要: 基因工程法能够简便易行的合成重组芋螺毒素,发酵条件会影响其表达产量。为获得高效表达,采用单因素试验法优化基因工程大肠杆菌的发酵条件如发酵时间、IPTG 浓度、初始 pH 和发酵温度等。利用蛋白定量试剂盒测定表达上清总蛋白量,并用 Tricine-SDS-PAGE 电泳分离后灰度扫描分析重组芋螺毒素的含量。实验结果获得最佳发酵条件:发酵时间为 4 h, IPTG 浓度为 0.4 mmol/L,培养基初始 pH 为 6.0,发酵温度为 26℃,优化后表达量为 19.4 mg/L,研究结果为大规模生产芋螺毒素 MrVIB 奠定了坚实的基础。

关键词: 芋螺毒素;大肠杆菌;发酵条件;优化

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2016.05.08

Optimization of Fermentation Conditions for Recombinant Conotoxin His-Xa-MrVIB

LIU Yun-hai¹, LI Yu¹, SUN Fang-jiao¹, GAO Bing-miao^{2*}

1.College of Science, Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

2.College of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China

Abstract: Recombinant conotoxins could be simply synthesized by genetic engineering, and fermentation conditions affect its expression yield. To obtain high expression, the fermentation conditions for engineered *E. coli* were optimized by using single factor test methods, such as fermentation time, IPTG concentration, initial pH and fermentation temperature. Expression of total protein in the supernatant was measured using a Protein Assay Kit, which was separated in Tricine-SDS-PAGE and the amount of recombinant conotoxins was analyzed by scanning grayscale analysis. The results showed that the optimum fermentation conditions were as follows: fermentation time was 4 h, IPTG concentration was 0.4 mmol/L, initial pH was 6.0, and the fermentation temperature was 26℃, the expression yield was 18 mg/L after optimization. The results laied a solid foundation for large-scale production of conotoxin MrVIB.

Key words: conotoxin; *Escherichia coli*; fermentation condition; optimization

MrVIB 属于 μ O-家族芋螺毒素,于 1995 年从大理石芋螺 (*C. marmoreus*) 中分离纯化获得了 MrVIA 和 MrVIB。其中 MrVIB 由 31 个氨基酸组成且含 6 个半胱氨酸,作用机理为阻断钠离子通道,具有多种药理活性^[1~3]。由于 6 个半胱氨酸和多个疏水氨基酸的存在,人工化学合成 MrVIB 线性肽后存在氧化折叠形成异构体多、分离难度

大、产率低和成本高等问题^[4]。近年来,基因工程法能够简便易行的合成大量的芋螺毒素,尤其是对富含半胱氨酸、易成二硫键的多肽具有显著优势^[5]。通过融合不同标签的方式将芋螺毒素基因在大肠杆菌中成功表达的研究已有较多文献报道,但通过融合信号肽来引导芋螺毒素在大肠杆菌中分泌表达的报道较少^[6~8]。

收稿日期:2016-05-03; 接受日期:2016-05-27

基金项目: 海南省大学生创新创业训练计划项目(20140089);海南医学院创新性实验计划项目(HYCX201327);海南医学院科研培育基金项目(HY2013-11)资助。

作者简介: 刘云海,本科生,研究方向为海洋生物技术。E-mail:645771683@qq.com。* 通信作者:高炳森,副教授,研究方向为南药与海洋药物资源开发。E-mail:gaobingmiao@qq.com

本研究的前期工作已将分泌表达载体 pET22b(+)/His-Xa-MrVIB 构建和鉴定好,并转化至大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中获得分泌表达,但分泌量较低且易形成包涵体^[9]。因此,本研究从发酵时间、IPTG 浓度、培养基 pH 和发酵温度等影响因子对重组基因工程菌株的发酵条件进行了初步优化,获得最佳分泌发酵条件,为芋螺毒素 MrVIB 的药理活性、新药研发和规模化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

恒温摇床(美国 NBS 公司);手持式超声波细胞破碎仪(中国 Biosafer);台式高速冷冻离心机(德国 Sigma);垂直电泳仪(北京六一仪器厂);全自动数码凝胶图像分析系统(Tanon 4100);紫外风光光度计(UV-1800PC)。

IPTG、氨苄青霉素、低分子量蛋白质 Marker 和蛋白定量试剂盒均购自天根生化科技有限公司;SDS-PAGE 电泳相关试剂购自海南合辉实业有限公司;其他相关试剂为国产分析纯。

菌株:含有 pET22b(+)/His-Xa-MrVIB 的大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS,由本实验室前期构建并保存。

LB 培养基:其成分为蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 生长曲线测定 将基因工程菌 BL21(DE3) pLysS (pET22b(+)/His-Xa-MrVIB) 在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上划线,37℃ 培养过夜。挑取单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中,置 37℃ 和 250 r/min 摇床培养过夜后作为种子液。取种子液 1 mL 接种于 100 mL LB 液体培养基中,按上述条件培养,每隔 1 h 取 1 mL 检测 OD 值。

1.2.2 基因工程菌发酵件优化方法 基本培养条件:取种子液按 1:100 比例接种于 100 mL LB 液体培养基中,发酵温度为 37℃,250 r/min 振荡培养至对数生长期,加入 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L,诱导发酵 4 h。在基本培养条件基础上,分别设置不同的发酵时间(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h)、IPTG 浓度(0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4

mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L)、发酵温度(16℃、21℃、26℃、31℃、36℃)和初始 pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)来进行优化。

1.2.3 重组芋螺毒素的含量测定 上述不同条件下获得的样品进行超声破碎,12 000 r/min 离心 10 min 后留上清,采用蛋白定量试剂盒测定表达上清中总蛋白浓度,再采用 Tricine-SDS-PAGE 对上清电泳后进行灰度扫描获得重组芋螺毒素所占上清总蛋白的百分率,计算重组芋螺毒素浓度。

重组芋螺毒素浓度(mg/L) = 上清总蛋白浓度(mg/L) × 灰度扫描百分比。

2 结果与分析

2.1 重组芋螺毒素表达的电泳分析

重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 的理论分子量为 4.936 kDa,电泳图显示在诱导的总蛋白和裂解上清中在 4.1~6.5 kDa 间具有符合大小的特异条带,而未诱导菌中对应位置无相应条带。说明重组芋螺毒素 MrVIB 获得了分泌表达,但表达量较低(图 1)。

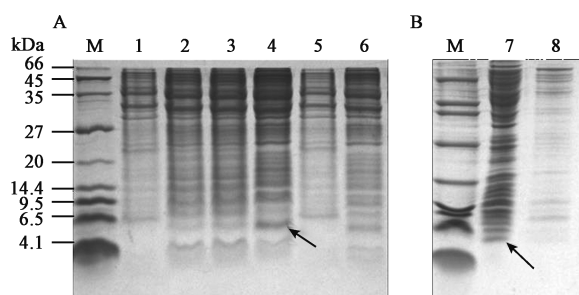


图 1 Tricine-SDS-PAGE 分析重组芋螺毒素的表达

Fig.1 Tricine-SDS-PAGE analysis of recombinant conotoxin expression.

M:蛋白分子量 Marker; 1:未诱导的大肠杆菌总蛋白; 2~6:诱导大肠杆菌的总蛋白; 7:诱导的大肠杆菌上清; 8:诱导大肠杆菌的颗粒蛋白。

2.2 生长曲线

根据菌液吸光度值绘制重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 基因工程菌的生长曲线如图 2 所示。在 1%接种量下,重组大肠杆菌生长比较旺盛,接种后 2 h 进入对数生长期,8 h 后大肠杆菌开始进入稳定期,14 h 开始有衰退迹象。可见,添加诱导剂的时机应该选择在对数生长旺盛期约 4 h,持续发酵时间应该不超过 8 h 为宜。

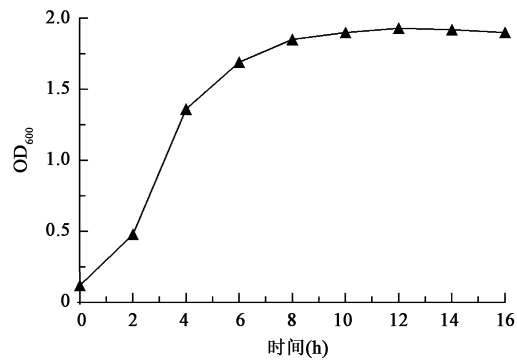


图2 基因工程大肠杆菌的生长曲线

Fig.2 Growth curve of gene engineering *E. coli*.

2.3 发酵时间

重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 表达量随发酵时间延长而逐步增加,在发酵时间达 4 h 时表达量最高,继续延长发酵时间则重组芋螺毒素表达量没有继续增加,反而出现了下降趋势,可能由于发酵时间过长导致菌体开始衰退死亡,随之重组芋螺毒素发生降解现象(图 3)。

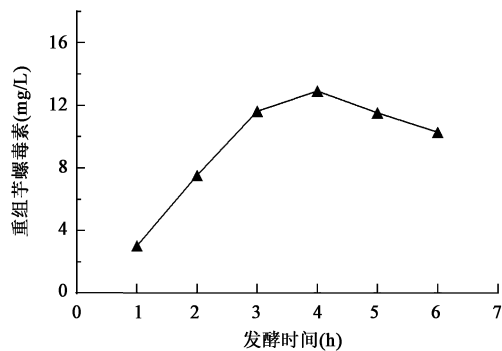


图3 发酵时间对重组芋螺毒素表达的影响

Fig.3 Effects of fermentation time on the expression of recombinant conotoxin.

2.4 IPTG 浓度

重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 表达量随着 IPTG 浓度的升高而逐渐增加,当浓度为 0.4 mmol/L 时,再增加 IPTG 浓度并未出现表达量的增加的情况,为了节约 IPTG 的用量选择低浓度 0.4 mmol/L 为最适 IPTG 浓度(图 4)。

2.5 初始 pH

重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 表达量在不同培养基初始 pH 条件下,结果在初始 pH 为 6.0 时表达量最高。从图 5 可以看出,pH 偏碱时产物表达相对较少,pH 偏酸时有利于产物表达。

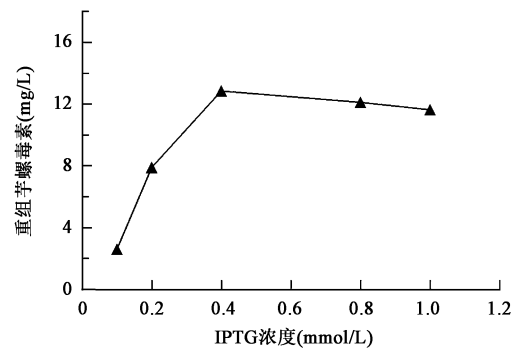


图4 IPTG 浓度对重组芋螺毒素表达的影响

Fig.4 Effects of IPTG concentrations on the expression of recombinant conotoxin.

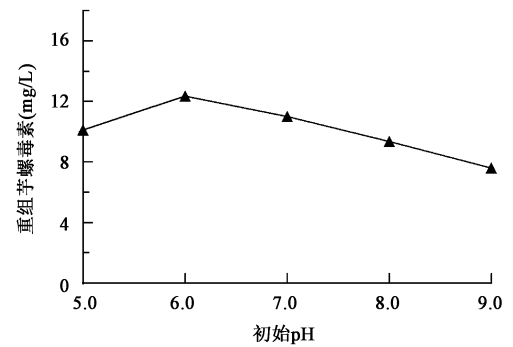


图5 初始 pH 对重组芋螺毒素表达的影响

Fig.5 Effects of the initial pH on the expression of recombinant conotoxin.

2.6 发酵温度

发酵温度对重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 表达量有较大影响。在 26℃ 条件下发酵培养 4 h 后,可获得较高的表达量,温度过低或过高都不利于重组芋螺毒素的分泌表达(图 6)。

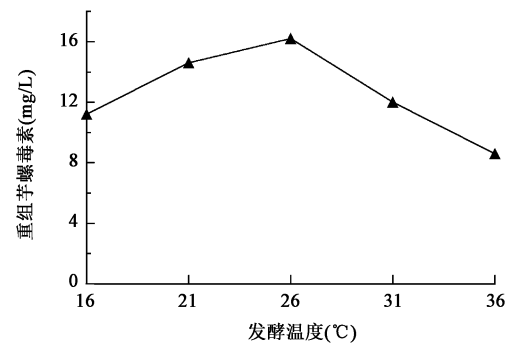


图6 发酵温度对重组芋螺毒素表达的影响

Fig.6 Effects of fermentation temperatures on the expression of recombinant conotoxin.

2.7 最佳条件下诱导表达

通过以上实验结果获得最佳发酵条件为:发酵时间为 4 h, IPTG 浓度为 0.4 mmol/L, 培养基初始 pH 为 6.0, 发酵温度为 26℃, 优化后表达量为 19.4 mg/L, 是优化前表达量的 2 倍(图 7)。

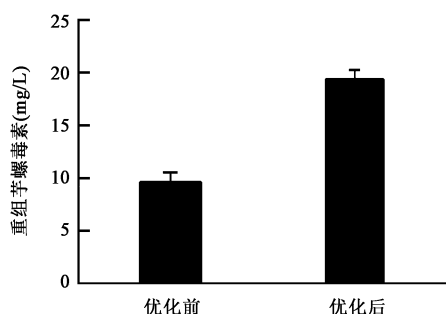


图 7 发酵条件优化前后重组芋螺毒素表达量的比较

Fig.7 Comparison of expression levels of recombinant conotoxin before and after the optimization of fermentation conditions.

3 讨论

目前芋螺毒素表达的文献报道逐年增多,从原核表达系统到真核表达系统,以及从表达形成包涵体到分泌表达的转变等^[10]。诸多文献报道利用基因工程法能够合成芋螺毒素,能够防止过度采集天然芋螺导致其资源匮乏、解决天然芋螺毒素分离纯化困难和化学合成成本高且难氧化折叠等问题^[4]。但也存在一定的问题:如芋螺毒素分子量较小、二硫键丰富、疏水氨基酸含量大等特点导致了其较难在外源表达系统中获得高效表达。因此,芋螺毒素基因在利用外源宿主合成芋螺毒素时,会受到多种因素影响,其中除了宿主菌本身因素和表达载体的选择外,发酵条件的优化也是基因工程法合成芋螺毒素的一个关键环节^[11]。高炳森等^[12]通过改变发酵条件等影响因素对重组芋螺毒素 K41 的表达条件进行了优化,表达产量大大提高。

本实验在通过单因素考察各因素对重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 表达量的影响。其中诱导剂 IPTG 浓度对于表达量有较大影响,在 IPTG 浓度增加到 0.4 mmol/L 时,重组芋螺毒素表达量达到最大值,为了降低实验成本没有必要再增加 IPTG 的浓度。温度过高菌体生长较快,合成的过量的

外源重组芋螺毒素无法进行正确的剪切和折叠而形成包涵体。温度过低,菌体生长受到抑制,无法获得足够的菌体量,外源重组芋螺毒素表达量太少。因此,发酵温度是影响重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 在大肠杆菌中获得高效分泌表达的最重要因素之一^[13]。本实验结果表明 26℃ 时重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 表达量最高,可确定最佳温度在 26℃ 左右。该结果与 Pi 等^[8]采用 21℃ 都是低温诱导获得可溶性的重组芋螺毒素。培养基的最佳 pH 在 6.8~7.6 之间时,大肠杆菌生长较好,外源蛋白的表达最佳 pH 为 7.0 左右。但本实验获得最佳初始 pH 为 6,原因在于酸性培养基中中性蛋白酶的活性受到抑制,有利于重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 的稳定性。重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 优化后的表达量为 19.4 mg/L,是优化前的 2 倍,也明显高于前期研究重组芋螺毒素 MrVIB-His-tag 表达量 5.9 mg/L,但低于可溶性融合芋螺毒素 Trx-His-MrVIB 的表达量 73.6 mg/L^[6,14]。

本研究结果表明重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 最佳发酵条件为发酵时间 4 h, IPTG 浓度 0.4 mmol/L, 发酵温度 26℃, 培养基初始 pH 为 6.0。通过对重组芋螺毒素工程菌在摇瓶水平上优化了发酵条件,可以有效提高重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 的表达量,为规模化和工业化发酵奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] McIntosh J M, Hasson A, Spira M E, *et al.* A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels[J]. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(28):16796-16802.
- [2] Zorn S, Leipold E, Hansel A, *et al.* The μ O-conotoxin MrVIA inhibits voltage-gated sodium channels by associating with domain-3[J]. *FEBS Lett.*, 2006, 580:1360-1364.
- [3] Prashanth J R, Brust A, Jin A H, *et al.* Cone snail venom: from novel biology to novel therapeutics [J]. *Future Med. Chem.*, 2014, 6(15):1659-1675.
- [4] Araujo A D, Callaghan B, Nevin S T, *et al.* Total synthesis of the analgesic conotoxin MrVIB through selenocysteine-assisted folding[J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, 50:6527-6529.
- [5] 高炳森,李宝珠,吴勇,等. 重组芋螺毒素 GeXIVAWT 的表达、纯化和鉴定[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(9):34-40.
- [6] Gao B, Zhangsun D, Hu Y, *et al.* Expression and secretion of functional recombinant μ O-Conotoxin MrVIB-His-tag in *Escherichia coli*[J]. *Toxicon*, 2013, 72:81-89.
- [7] Gao B, Zhangsun D, Wu Y, *et al.* Expression, renaturation

- and biological activity of recombinant conotoxin GeXIVAWT [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(3):1223-1230.
- [8] Pi C H, Liu J L, Wang L, *et al.*. Soluble expression, purification and functional identification of a disulfide-rich conotoxin derived from *Conus litteratus* [J]. *J. Biotechnol.*, 2007, 128(1):184-193.
- [9] 高炳森, 刘云海, 魏娜, 等. 重组芋螺毒素 His-Xa-MrVIB 分泌表达研究[J]. *生物技术*, 2015, 25(1): 66-70.
- [10] Bruce C, Fitches E C, Chougule N, *et al.*. Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity [J]. *Toxicon*, 2011, 58:93-100.
- [11] 王靖瑶, 王天女, 卢磊, 等. 大肠杆菌 I 型分泌表达系统研究进展及提高蛋白表达量的策略 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(6):98-104.
- [12] 高炳森, 彭超, 郑晓冬, 等. 重组芋螺毒素 K41 表达条件优化 [J]. *生物技术*, 2011, 21(4):48-51.
- [13] Eom G T, Lee S H, Oh Y H, *et al.*. Efficient extracellular production of type I secretion pathway-dependent *Pseudomonas fluorescens* lipase in recombinant *Escherichia coli* by heterologous ABC protein exporters [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2014, 36(10):2037-2042.
- [14] 高炳森, 刘云海, 彭超, 等. 融合表达载体 pET32a/Trx-EK-MrVIB 的构建及在大肠杆菌中表达 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(2):1-6.