

# 重组融合蛋白 MBP-BSH 在大肠杆菌中的表达及其纯化、功能鉴定

黄茜<sup>1</sup>, 黄璐<sup>1</sup>, 潘道东<sup>1,2</sup>, 杨瑶<sup>1,\*</sup>

(1. 南京师范大学 国家乳品加工技术研发分中心, 江苏 南京 210097; 2. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 选择 IF2 融合标签, 另选择含 SUMO、GST、NusA 和 MBP 融合标签的质粒构建表达载体。SDS-PAGE 电泳结果显示, 重组菌 *Escherichia Rosetta*(DE3) (pLS932-BSH) 的诱导表达细胞提取液上清出现了明显的融合蛋白 MBP-BSH 条带, 经诱导表达条件优化后, MBP-BSH 可溶性大幅度提高。用 Ni-NTA Resin 和 Amylose Resin 分别进行目标蛋白纯化, 结果显示前者效果更好, 并且 C 端融合 His-Tag 更有利于其与 Ni 离子结合, MBP-BSH 蛋白纯化量更大, 杂带更少。茚三酮显色反应测定酶活力, 结果显示纯化后的 MBP-BSH 的酶比活力为 2.4282U/mg。  
**关键词:** 融合蛋白 MBP-BSH; 表达纯化; 功能鉴定; 胆盐水解酶

## Expression in *Escherichia coli*, Purification and Functional Characterization of Recombination Fusion Protein MBP-BSH

HUANG Qian<sup>1</sup>, HUANG Lu<sup>1</sup>, PAN Dao-dong<sup>1,2</sup>, YANG Yao<sup>1,\*</sup>

(1. Branch Center of National Dairy Products Processing Technology Development, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** The protein BSH, from *Lactobacillus plantarum* Y1, can form inclusion body when expressed in *E. coli*. The fusion tag IF2 can improve its solubility on the basis of our previous studies. In the present study, five fusion tags such as SUMO, GST, NusA, MBP and IF2 were used to improve the solubility of BSH. The results showed that an obvious protein band of MBP-BSH in the culture supernatant of recombinant *E. coli* Rosetta (DE3) (pLS932-BSH) was observed during the examination of SDS-PAGE. However, after induction, its solubility was greatly improved. Meanwhile, Ni-NTA resin exhibited better purification efficiency for MBP-BSH protein than Amylose resin. In addition, His-Tag linked at the C-terminal was favorable for the binding of nickel ions and as a result, MBP-BSH containing less impurities was obtained in a higher yield. The enzymatic activity of purified BSH was 2.4282 U/mg (115.14 AU/mg) as determined by ninhydrin color reaction.

**Key words:** fusion protein MBP-BSH; expression and purification; functional characterization; bile salt hydrolase

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0198-06

血清中高胆固醇含量被认为是诱发高血压、冠心病等众多心血管疾病的重要因素, 因此, 降低血清胆固醇水平直接关系到人类的健康, 也是目前科学研究工作的热点之一。1984 年, Gilliland 等<sup>[1]</sup>报道, 分离自猪粪便的 *Lactobacillus acidophilus* RP32 在实验条件下生长能够吸收培养基中的胆固醇。自此, 一些具有降低血清中的胆固醇功能的乳酸菌相继被报道<sup>[2]</sup>。

目前, 胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH, EC

3.5.1.24)活性测定被普遍认为是筛选具有降胆固醇功能乳酸菌的一个条件<sup>[2]</sup>, 已有一些不同来源的 BSH 酶得以纯化和鉴定<sup>[3-5]</sup>。但是, BSH 酶的异源重组表达的研究报道较少, 多个报道结果显示重组的 BSH 以包涵体的形式存在<sup>[6-7]</sup>, 这为 BSH 蛋白功能的鉴定造成困难, 目前, 尚未发现重组 BSH 蛋白被测到胆盐水解酶活性的报道。因此, 提高重组 BSH 蛋白可溶性这一关键点亟待解决。

本课题组报道了植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* Y1

收稿日期: 2011-10-24

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(09KJB550003)

作者简介: 黄茜(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: xiaocaoxixi@sina.com.cn

\* 通信作者: 杨瑶(1981—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为功能乳酸菌的筛选及分子生物学。E-mail: 45220@nynu.edu.cn

菌株 *bsh* 基因克隆至表达载体 pET-28a, 原核表达的重组蛋白为包涵体, 而选择含 IF2 融合蛋白标签的质粒构建表达载体获得的融合重组蛋白细胞上清液中出现目标蛋白, 可溶性得到提高<sup>[7]</sup>。在此基础上, 本研究选择另外 4 种含融合标签 SUMO、GST、NusA 和 MBP 的质粒构建表达载体, 以期为提高重组蛋白的可溶性, 纯化后蛋白尽快确定其胆盐水解酶的功能提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株及质粒

供试菌株和质粒及其特性说明见表 1。植物乳杆菌 *L.plantarum* Y1 于 MRS 培养基 37℃ 静置培养。*E. coli* 菌株于 LB 培养基上 37℃ 振荡培养过夜。所需抗生素为 100 μg/mL 氨苄青霉素、30 μg/mL 卡那霉素。固体培养基是在上述培养基中加入 2g/100mL 的琼脂。

### 1.2 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、250bp DNA Ladder Marker、λ/*Hind*III DNA Marker、pMD18-TTA 克隆试剂盒、质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收纯化试剂盒 宝生物工程(大连)有限公司; Protein Marker Mid Range、氨苄青霉素、卡那霉素 上海生工生物工程技术有限公司; 酵母粉、胰蛋白胨 英国 Oxoid 公司; T4 DNA 连接酶 美国 New England Biolabs 公司; Amylose Resin、Ni-NTA Resin 德国 Novagen 公司。

### 1.3 *bsh* 基因的克隆及测序

PCR 上游引物 BSH1 序列 5'-GGGGGATCCATGTGTA CTGCCATAACTTATC-3', 划线处为 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物有 BSH2 和 BSH22 两个, 序列分别为

5'-GGGCTCGAGGTTAACTGCATAGTATTGTGC-3' 和 5'-GGGCTCGAGGACTGCATAGTATTG TGC-3', 划线处均为 *Xho* I 酶切位点, BSH22 中不含 *bsh* 基因终止密码子, 便于 C 端含 6 × HIS 标签的重组融合蛋白表达, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。提取植物乳杆菌 *L.plantarum* Y1 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *bsh* 基因 (GenBank 登录号 HM163165), 反应产物按 DNA 胶回收试剂操作说明进行纯化回收, 构建 pMD18-T-BSH 重组质粒, 测序已完成<sup>[7]</sup>。

### 1.4 重组融合蛋白表达质粒的构建

分别用 *Bam*H I/*Xho*I 限制性内切酶双酶切方法 1.3 节获得的 pMD18-T-BSH 切下 *bsh* 基因序列并割胶回收, 与同样酶切的含 His-Tag 和不同融合蛋白标签的表达载体 (表 1) 16℃ 连接反应过夜, 将 *bsh* 基因插入相应表达载体启动子下游, 构建融合蛋白表达质粒, 转化 *E. coli* 10B 感受态, 涂布于含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 挑选菌落、质粒抽提并经酶切鉴定筛选阳性单克隆。

### 1.5 重组融合蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将重组表达质粒转化感受态 *E. coli* Rosetta(DE3) 菌株<sup>[7]</sup>, 挑取单个菌落, 接种于 3mL 含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 再以体积比 2:100 的比例转种于 5mL 含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 培养至 A<sub>600nm</sub> 值为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 37℃ 振荡培养 3h。离心收集细菌沉淀, 按体积比 10:1 的比例加入 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 中, 超声破碎细菌, SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况。取诱导表达 3h 的细菌沉淀超声破碎产物 4℃、12000 × g 离心 15min, 分别收集上清和沉淀, 加入 SDS-PAGE 电泳上样

表 1 实验所用菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in this work

菌株或质粒	特性说明	来源
<b>菌株</b>		
<i>L.plantarum</i> Y1	具有高效体外降胆固醇能力 <sup>[7]</sup>	实验室筛选保藏
<i>E.coli</i> DH10B	亚克隆操作宿主细胞	实验室保藏
<i>E.coli</i> Rosetta(DE3)	含稀有密码子, 表达宿主细胞 <sup>[7]</sup>	实验室保藏
<b>质粒</b>		
pMD18-T	Ap <sup>r</sup> , lacZ	日本 TaKaRa 公司
pLS922	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 SUMO, 12kD <sup>[8]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS932	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 MBP, 42kD, 靶蛋白 N 端 His-Tag <sup>[9]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS942	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 IF2, 18kD <sup>[10]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS952	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 NusA, 55kD <sup>[11]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS962	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 GST, 26kD <sup>[12]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS1802	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 m-MBP <sup>[13]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS1902	Kan <sup>r</sup> , 含融合标签 MBP, 靶蛋白 C 端 His-Tag <sup>[14]</sup>	尚广东博士馈赠
pLS932-BSH	Kan <sup>r</sup> , 融合蛋白 6 × HIS-MBP-BSH	本实验构建
pLS1902-BSH	Kan <sup>r</sup> , 融合蛋白 MBP-BSH-6 × HIS	本实验构建
pLS1802-BSH	Kan <sup>r</sup> , 融合蛋白 6 × HIS-mMBP-BSH	本实验构建

注: Ap<sup>r</sup>. 具有氨苄青霉素抗性; Kan<sup>r</sup>. 具有卡那霉素抗性; m-MBP. 具有 MBP 双突变 A317V/I322V。

缓冲液, 检测上清和沉淀中重组蛋白的表达<sup>[15]</sup>。

## 1.6 重组融合蛋白的纯化

### 1.6.1 基于 MBP 标签亲和层析的纯化

将 100  $\mu$ L 的 Amylose Resin 加入 1.5mL 离心管中, 加入 1mL Loading Buffer(20mmol/L Tris-HCl (pH7.4)、0.2mol/L NaCl、1mmol/L EDTA), 轻弹混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 10min, 再 2000r/min 离心 5min, 弃上清, 重复 1 次, 平衡树脂; 加入超声处理后的蛋白上清液 1mL, 混匀后, 4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 再 4000r/min 离心 5min, 取上清; 再加入 1mL Wash Buffer(20mmol/L Tris-HCl (pH7.4)、2mol/L NaCl、1mmol/L EDTA)混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 10min, 再 2000r/min 离心 5min, 弃上清, 重复 1 次; 加入 100  $\mu$ L Elution Buffer(10mmol/L 麦芽糖、20mmol/L Tris-HCl (pH7.4)、2mol/L NaCl、1mmol/L EDTA), 混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 再 4000r/min 离心 5min, 取上清。收集各阶段样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。

### 1.6.2 基于 His-Tag 标签亲和层析纯化

将 100  $\mu$ L 的 Ni-NTA Resin 加入 1.5mL 离心管中, 加入 Loading Buffer(5mmol/L 咪唑、300mmol/L NaCl, pH8.0)轻弹混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 10min, 于 2000r/min 离心 5min, 弃上清, 重复一次, 平衡树脂; 加入超声处理后的蛋白上清液 1mL, 混匀后, 4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 4000r/min 离心 5min, 取上清; 再加入 1mL Wash Buffer(20mmol/L 咪唑、300mmol/L NaCl, pH8.0)混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 10min, 2000r/min 离心 5min, 弃上清, 重复 1 次; 最后, 用 100  $\mu$ L Elution Buffer(250mmol/L 咪唑、300mmol/L NaCl, pH8.0)洗脱。收集各阶段样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。

## 1.7 MBP-BSH 酶蛋白活性的鉴定

### 1.7.1 氨基酸标准曲线的制作

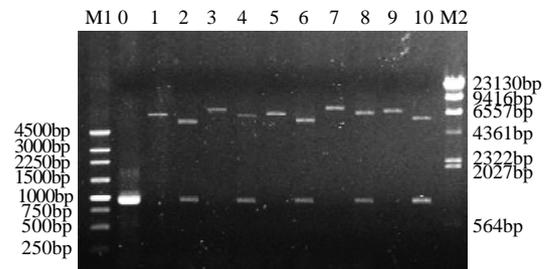
参考文献[16]方法, 以  $A_{570nm}$  为纵坐标, 氨基酸含量为横坐标, 绘制氨基酸标准曲线。

### 1.7.2 胆盐水解酶酶活测定

参考文献[17]方法并改进: 将 1.6.2 节纯化后蛋白样品 50  $\mu$ L, 加入到含底物牛磺胆酸钠的磷酸盐缓冲液(pH6.0)中, 酶反应体系 1mL, 牛磺胆酸钠终浓度为 0.3mmol/L。酶反应液置于 37 $^{\circ}$ C、140r/min 振荡反应 1h。立即加入 50  $\mu$ L 80% 三氯乙酸溶液混匀 1min 终止反应, 12000  $\times$  g、4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 吸取 1mL 反应上清液, 与 0.5mL 茚三酮显色剂混匀, 沸水浴 30min 待样品显色, 冷却, 加入 1.25mL 40% 乙醇振荡均匀, 静置 10min, 在波长 570nm 处测定样品的吸光度。将 1min 生成 1  $\mu$ mol 的氨基酸定义为 1 个酶活力单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 MBP-BSH 蛋白的重组表达

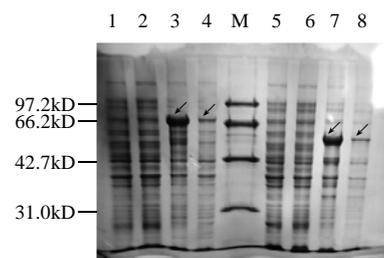


M1. 250bp DNA Ladder Marker; M2.  $\lambda$ /HindIII DNA Marker; 0. PCR 扩增的 *bsh* 基因; 1、3、5、7、9. 分别为 *Xho*I 单酶切重组质粒 pLS922-BSH、pLS932-BSH、pLS942-BSH、pLS952-BSH 和 pLS962-BSH; 2、4、6、8、10. 分别为 *Xho*I/*Bam*HI 双酶切 pLS922-BSH、pLS932-BSH、pLS942-BSH、pLS952-BSH 和 pLS962-BSH。

图 1 重组表达载体的酶切鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

载体酶切图谱如图 1 所示, 将获得的重组表达质粒先后电转化 *E. coli* Rosetta(DE3), 得到重组菌 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS922-BSH)、*E. coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)、*E. coli* Rosetta(DE3) (pLS952-BSH)和 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS962-BSH)。以 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS942-BSH) 诱导表达样品做对照, 对相同诱导条件下表达后重组菌细胞提取液进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 2。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 含 pLS922-BSH 重组菌全蛋白; 2. 含 pLS922-BSH 重组菌细胞上清液; 3. 含 pLS932-BSH 重组菌全蛋白, 箭头指融合蛋白 MBP-BSH; 4. 含 pLS932-BSH 重组菌细胞上清液, 箭头指融合蛋白 MBP-BSH; 5. 含 pLS952-BSH 重组菌全蛋白; 6. 含 pLS952-BSH 重组菌细胞上清液; 7. 含 pLS942-BSH 重组菌全蛋白, 箭头指融合蛋白 IF2-BSH; 8. 含 pLS942-BSH 重组菌细胞上清液; 箭头指融合蛋白 IF2-BSH。

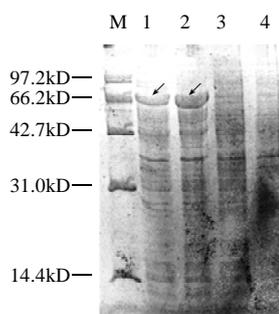
图 2 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE profile of expressed products after induction

SDS-PAGE 分析结果(图 2)表明, 在新选择的 4 种融合标签与 *bsh* 基因融合表达样品中, 只有含融合标签

MBP的重组菌 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)的全蛋白样品中出现大量蛋白条带,其大小约70kD,与预期的融合蛋白 MBP-BSH 分子质量大小相符,同时,其细胞上清液样品中同样位置也出现特异的蛋白表达条带,说明在融合标签 MBP 的帮助下, *bsh* 基因正常表达,且表达的融合蛋白具有一定的可溶性。从融合蛋白表达的量上看,含标签 MBP 与含标签 IF2 融合表达的重组蛋白表达量相近。

随后进行 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)和 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)重组蛋白表达条件优化实验。在改变变常规诱导表达条件(37℃诱导2~8h、30℃诱导2~12h和16℃诱导12~36h; IPTG 诱导浓度梯度0.1~1mmol/L)后,重组菌 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS942-BSH)细胞上清液样品中目的蛋白表达量未得到明显提高,而重组菌 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)细胞上清液样品中目的蛋白表达量明显增大,其 SDS-PAGE 结果见图3。



M. 蛋白质分子质量标准; 1.诱导的重组表达菌破菌上清; 2.诱导的重组表达菌全蛋白; 3.未诱导的重组表达菌全蛋白; 4.空载质粒对照。

图3 重组菌 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)表达产物的 SDS-PAGE 分析

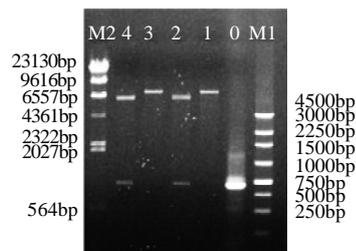
Fig.3 SDS-PAGE profile of expressed products in recombinant *E. coli* Rosetta (DE3) (pLS932-BSH)

如图3所示,在最佳诱导表达条件下,重组的融合蛋白 MBP-BSH 可溶性较优化前(图2)大幅提高。目前,已经有 MBP 作为融合标签提高重组蛋白的可溶性表达的报道<sup>[9]</sup>,但是利用融合标签重组表达 *bsh* 基因未见文献报道。重组蛋白可溶性的大幅提高是 *bsh* 基因原核表达的重要突破,为后续的基因功能鉴定提供条件。

### 2.2 MBP-BSH 蛋白的分离纯化

重组表达质粒酶切鉴定如图4所示,在未与 Amylose Resin 结合的 Loading buffer 流出液样品中出现大量目标条带,而 Elution buffer 流出液样品中未出现目标条带,有杂带,表明 MBP-BSH 蛋白与 Amylose Resin 结合度很低,纯化困难。Walker 等<sup>[13]</sup>报道融合标签 MBP 蛋白双突变体 A317V/I322V 大幅提高了与 Amylose Resin 的结

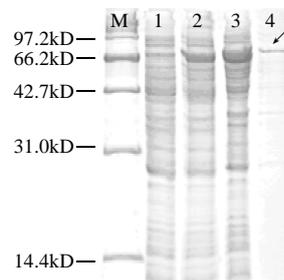
合度。因此,本研究先后构建了表达载体,将 *bsh* 基因(PCR 引物为 BSH1 和 BSH2,序列含终止子 TGA)亚克隆至含 mMBP(MBP 双突变体 A317V/I322V)编码基因的质粒载体 pLS1802 上,获得的重组表达质粒先后电转化 *E.coli* Rosetta(DE3),得到重组菌 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS1802-BSH),表达和纯化 SDS-PAGE 见图5。



M1. 250bp DNA Ladder Marker; M2.  $\lambda$  /Hin dIII DNA Marker; 0. PCR 扩增的 *bsh* 基因; 1、3. 分别为 *Xho*I 单酶切重组质粒 pLS1802-BSH 和 pLS1902-BSH; 2、4. 分别为 *Xho*I/*Bam*HI 双酶切 pLS1802-BSH 和 pLS1902-BSH。

图4 重组表达载体 pLS1802-BSH 和 pLS1902-BSH 的酶切鉴定

Fig.4 Identification of recombinant pLS1802-BSH and pLS1902-BSH by restriction enzyme digestion



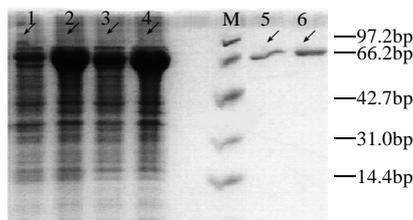
M. 蛋白质分子质量标准; 1. Wash Buffer 流出液中样品; 2. Binding Buffer 流出液中样品; 3. 纯化前重组表达菌破菌上清; 4. Elution Buffer 流出液中样品,箭头指纯化的重组融合蛋白 MBP-BSH 的条带。

图5 重组菌 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS1802-BSH)表达产物纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE profile of purified products from recombinant *E. coli* Rosetta (DE3) (pLS1802-BSH)

如图5所示,Elution Buffer 流出液样品中虽然有部分杂带,但目标条带较明显,说明 MBP 蛋白的双突变体提高了自身与 Amylose Resin 特异性结合率。但是,由于 mMBP-BSH 蛋白纯化后的量很低,蛋白活性鉴定难度很大。继而,根据 1.6.2 节方法纯化重组的融合蛋白 MBP-BSH,利用 His-Tag 与 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析,重组菌是 *E.coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH)。由于6个 *his* 序列位于 pLS932 载体启动子下游和 MBP 编码基因起始密码子上游,因此目标重组蛋白 N 端带有 His-Tag,为融合蛋白 6 × HIS-MBP-BSH。考虑到 His-Tag 的融合位置可能会影响亲和层析的结果,因此,本研究又构建了载体

pLS1902-BSH, 即将 *bsh* 基因(PCR 引物为 BSH1 和 BSH22, 序列不含终止子 TGA)亚克隆至 MBP 蛋白编码基因和 6 个 *his* 序列之间(质粒载体 pLS1902<sup>[14]</sup>), 目标重组蛋白 C 端带有 His-Tag, 为融合蛋白 MBP-BSH-6 × HIS, 载体酶切鉴定如图 4。获得的重组表达质粒电转化 *E. coli* Rosetta(DE3), 得到重组菌 *E. coli* Rosetta(DE3) [pLS1902-BSH], 表达纯化 SDS-PAGE 结果如图 6 所示。相比之下, 虽然 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS1902-BSH) 和 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH) 诱导表达产生的目标蛋白的量(条带 2 和 4 比较)和可溶性蛋白的量(条带 1 和 3 比较)相同, 但是 Elution Buffer 流出液中, 纯化的 MBP-BSH-6 × HIS 比 6 × HIS-MBP-BSH 蛋白量多, 该结果显示了 C 端融合 His-Tag 更有利于 MBP-BSH 蛋白的纯化, 纯化量大, 杂带少, 有利于蛋白活性鉴定。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 含 pLS932-BSH 重组菌上清; 2. 含 pLS932-BSH 重组菌全蛋白; 3. 含 pLS1902-BSH 重组菌上清; 4. 含 pLS1902-BSH 重组菌全蛋白; 5. 含 pLS932-BSH 重组菌上清纯化后 MBP-BSH; 6. 含 pLS1902-BSH 重组菌上清纯化后 MBP-BSH; 箭头指重组融合蛋白 MBP-BSH。

图 6 重组菌 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS932-BSH) 和 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS1902-BSH) 诱导表达及产物纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE for evaluating the expression and purification of target proteins in recombinant *E. coli* Rosetta (DE3) (pLS932-BSH) and *E. coli* Rosetta (DE3) (pLS1902-BSH)

### 2.3 MBP-BSH 蛋白的活性鉴定

根据茚三酮法测牛磺氨基酸标准曲线方程为  $y = 0.1579x + 0.018$  ( $R^2 = 0.9991$ )。对纯化后的 MBP-BSH 蛋白(重组菌为 *E. coli* Rosetta(DE3) (pLS1902-BSH))进行胆盐水解酶活性测定, 计算得出酶比活力为 2.4282U/mg。该结果证明了扩增的植物乳杆菌 *L. plantarum* Y1 菌株 *bsh* 基因在大肠杆菌中表达重组蛋白具有胆盐水解酶的功能。该结果还证明了 MBP 作为融合标签并未对靶蛋白 BSH 的活性造成影响, 这是 MBP 融合标签在蛋白表达中发挥优势作用的又一例证。值得注意的是, 在以往多个 *bsh* 基因原核表达研究中<sup>[7]</sup>, 均没有重组蛋白 BSH 胆盐水解酶活性的报道, 推测可能是由于重组蛋白 BSH 是包涵体, 可溶性太低, 纯化的蛋白量太少, 无法对产物进行活性鉴定。

### 3 讨论

目前, 大部分重组蛋白使用的表达载体是大肠杆菌细胞, 这是因为大肠杆菌表达的外源蛋白质量大, 有时达到细胞内蛋白质总量的 5%~20%, 甚至达到 50% 以上。但是, 大肠杆菌表达的蛋白质, 当含量相当大时, 有时由于原核细胞缺少分泌到胞外的机制或者折叠的机制, 最后表达的蛋白质往往以无活性的包涵体的形式存在。本研究中的 BSH 酶在大肠杆菌中的表达就出现上述情况, 表达量大但可溶性极低<sup>[7]</sup>。

为避免形成包涵体, 本研究采取了几个手段: 1) 对诱导表达的条件进行优化。有大量关于尝试用各种不同的培养条件来减少包涵体的形成, 增强蛋白正确折叠率的报道。一般来说, pH 值距离等电点越远, 表达的蛋白产物越不容易形成包涵体; 控制蛋白合成速度也可以减少折叠中间体聚集形成包涵体。经常采用的方法如降低培养温度、改变培养基的 pH 值, 或利用大量的培养基使菌体生长缓慢达到指数期等。2) 选择能为大肠杆菌稀有密码子提供额外 tRNA 的 *E. coli* Rosetta(DE3) 作为宿主菌。3) 选择多个融合标签。融合蛋白可提高蛋白可溶性是因为融合蛋白部分离开核糖体后迅速地形成天然构型, 使下游折叠单位通过异构反应得到正确折叠。融合蛋白只用于蛋白纯化检测, 实验中发现某些融合蛋白可以提高目的蛋白可溶性, 减少其在胞质中形成包涵体。虽然 SUMO、GST、NsuA 均有提高靶蛋白可溶性的报道<sup>[8-12]</sup>, 但本研究中只有 IF2 和 MBP 改善了重组蛋白的可溶性, 结合诱导条件优化研究, 最终只有重组蛋白 MBP-BSH 可溶性得到大幅提高。除了以上 3 种方法, 仍旧有一些提高蛋白可溶性的方法在实验中成功应用, 如使用分子伴侣、加入折叠酶共表达和加入化学物质修饰等等, 但是, 由于蛋白质的种类繁多, 理化性质各异, 目前没有 1 个可以提高可溶性表达的通用方法, 不同蛋白的最佳表达条件还需要具体的实验摸索。

麦芽糖结合蛋白(matlose binding protein, MBP) 标签蛋白大小为 40kD, 由大肠杆菌 K12 的 *malE* 基因编码。MBP 可增加在细菌中过量表达的融合蛋白的溶解性, 结合的融合蛋白可用 10mmol/L 麦芽糖在生理缓冲液中进行洗脱<sup>[9]</sup>。但是, 在本研究中, 重组融合蛋白 MBP-BSH 并没有表现出很强的与麦芽糖的特异性结合率, 推测是由于靶蛋白 BSH 的肽链折叠影响了 MBP 麦芽糖结合性。相反, 小分子融合标签 6 × HIS 由于分子量小, 构型简单, 受到 MBP-BSH 肽链折叠较小, 因此本研究中基于 His-Tag 标签的亲亲和层析纯化效果稳定。目前, 选择 N 端 His-Tag 或者 C 端融合表达的实例很多, 在本研究中, C 端 His-Tag 更有利于目标蛋白的纯化。

虽然本研究解决了 *bsh* 基因原核表达的瓶颈, 即可溶性表达, 但是, 对 BSH 蛋白的研究还只是一个开始。目前本课题组继续开展利用位点特异性蛋白酶将融合蛋白 MBP-BSH 的 MBP 蛋白切除实验, 以获得纯化单一的 BSH 蛋白, 进而开展最适 pH 值、最适温度、最适底物浓度及底物特异性等酶学性质的研究。

#### 参考文献:

- [1] GILLILAND S E, NELSON C R, MAXWELL C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 377-381.
- [2] MÁIRE B, COLIN H, CORMAC G M. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72: 1729-1738.
- [3] DEAN M, CERVELLATI C, CASANOVA E, et al. Characterization of cholyglycine hydrolase from a bile-adapted strain of *Xanthomonas maltophilia* and its application for quantitative hydrolysis of conjugated bile salts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 3126-3128.
- [4] KNARREBORG A, ENGBERG R M, JENSEN S K, et al. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 6425-6428.
- [5] STELLWAG E J, HYLEMON P B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*[J]. Biochemical and Biophysical Acta, 1976, 452: 165-176.
- [6] 战媛媛, 王长远, 于长青. 植物乳杆菌中胆盐水解酶基因的原核表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(9): 876-879.
- [7] 黄茜, 黄璐, 潘道东, 等. 植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* Y1 菌株胆盐水解酶基因(*bsh*)的克隆及重组表达研究[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2010, 33(3): 91-94.
- [8] MARBLESTONE E G, EDAVETAL S C, LIM Y T, et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO[J]. Protein Science, 2006, 15: 182-189.
- [9] TERPE K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60: 523-533.
- [10] SØRENSEN H P, PETERSEN H U, MORTENSEN K K. A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin[J]. Protein Express and Purification, 2003, 32: 252-259.
- [11] DAVIS G D, ELISEE C, NEWHAM D M, et al. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 65(4): 382-388.
- [12] MAKRIDES S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(3): 512-538.
- [13] WALKER I H, HSIEH P C, RIGGS P D. Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88: 187-197.
- [14] KAPUST R B, WAUGH D S. Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease[J]. Protein Expression and Purification, 2000, 19: 312-318.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] 刘慧, 何欢, 熊利霞. 藏灵菇源克鲁维酵母 K1 菌株胆盐水解酶的特性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 322-325.
- [17] 刘慧, 杜薇, 张红星. 乳酸乳球菌乳酸亚种高产胆盐水解酶发酵条件的优化研究[J]. 中国酿造, 2010, 11(1): 69-73.