

文章编号 :1009-038X(2002)06-0626-04

重组阿片肽包涵体的溶解工艺

陈义勇, 施用晖, 乐国伟
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:通过 SDS-PAGE 凝胶电泳确定了目的重组阿片肽存在于包涵体中,系统研究了影响大肠杆菌表达的重组阿片肽包涵体溶解的因素,确定了重组阿片肽包涵体制备溶解的最佳工艺条件,即菌体超声破碎 5 min,间隔时间 6 s,破碎效果最好;包涵体洗涤温度为 4 ℃,尿素洗涤液的浓度为 2 mol/L,洗涤时间 7~8 h,8 mol/L 的尿素溶液对包涵体进行溶解,蛋白质质量浓度约为 600 μg/mL,其效果最佳.

关键词:重组阿片肽 包涵体 溶解

中图分类号: Q 516

文献标识码: A

Solubilization of the Recombinant Casomorphin Inclusion Body

CHEN Yi-yong, SHI Yong-hui, LE Guo-wei

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The target recombinant casomorphin was found in inclusion body in *E. coli* by SDS-PAGE. The technique for solubilization of the recombinant casomorphin inclusion body was studied. The optimal solubilization conditions were obtained: *E. coli* cells were disrupted by ultrasonic in 5 minutes, alternation time was 6 s; the inclusion body was washed at 4 ℃, the washing concentration of urea was 2.0 mol/L, and the washing time was 7~8 hours. The optimal concentration of urea was 8 mol/L. After solubilizing, the protein concentration was about 600 μg/mL.

Key words: recombinant casomorphin; inclusion body; solubilization

近年来,人们发现许多小分子肽类具有特殊的生理功能,阿片肽类在生物活性肽中占有重要的地位,其生物活性表现在如下方面:镇痛,抗腹泻,促进小肠运动,促进摄食,调节垂体激素的分泌,调节免疫系统,降低血压,调节心血管系统功能等.阿片肽应用于动物生产,可降低幼龄动物的腹泻率,促进动物摄食且具有镇静并调节睡眠功能,最终促进动物的生长^[1].

自 20 世纪 70 年代分子克隆技术问世以来,利用大肠杆菌表达外源基因已成为医药生产的一项重要技术^[2].利用分子克隆技术可以很方便地得到一些从自然界难以得到甚至不能纯化的蛋白质^[3].目前表达的重组蛋白质已达 4 000 多种,其中用大肠杆菌表达的占 90% 以上.但是,在实践过程中,许多外源基因在大肠杆菌中表达时,往往不能自发折叠形成有一定空间结构的蛋白质,而是常常在细胞

收稿日期 2002-07-11; 修订日期 2002-09-13.

基金项目:中央级科研院所基础性工作专项资金重点项目(2001DEA20022)资助课题.

作者简介:陈义勇(1976-),男,河南驻马店人,粮食、油脂与植物蛋白工程硕士研究生.

内聚集,以一种不溶性的形式即包涵体(inclusion body)存在于胞浆中^[4].2000 年,吴蕾等探索了 rhIL-6 包涵体溶解的工艺条件,并对其进行了优化,取得了较好的溶解效果,从而为 rhIL-6 后期的纯化工艺奠定了基础^[6].但到目前为止,还没有利用 DNA 重组技术表达阿片肽的成功报道.

作者所在实验室通过设计叠加阿片肽基因,将不同的活性阿片肽基因连在一起,克隆到大肠杆菌-酵母穿梭质粒载体 PPIC9K 上,构建成重组阿片肽大肠杆菌工程菌,对阿片肽(相对分子质量 16 000 左右)进行了表达.作者通过 SDS-PAGE 凝胶电泳确定了阿片肽形成于包涵体中,另外,由于包涵体溶解的质量直接影响到后续阿片肽的纯化,作者又研究了重组阿片肽包涵体制备及溶解的工艺条件,并对其进行了优化,取得了较好的溶解效果,为进一步纯化阿片肽奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组阿片肽工程菌:大肠杆菌 CAG 155,江南大学食品学院动物科学实验室构建.

1.1.2 培养基 LB 培养基.

1.1.3 试剂 尿素购自上海化学试剂公司,PBS 缓冲液中的试剂购自上海化学试剂采购供应站.

1.1.4 仪器 VCX-400 型超声波细胞粉碎仪,美国 Sonic and Material 公司产品;QL-901 型旋涡混合器,江苏海门其林医用仪器厂产品;722 型分光光度计,上海第三分析仪器厂产品;PHS-2C 型精密酸度计,上海医用仪器厂产品;GL-16G-II 型离心机,上海安亭科学仪器厂产品;DL-5 型低速大容量离心机,上海安亭科学仪器厂产品.

1.2 方法

1.2.1 工程菌的培养及诱导表达 将工程菌的单菌落接种于 5 mL 的 LB 培养液中,摇瓶条件为 180 r/min,30 ℃,过夜.按 1% (体积分数)的接种量接种于新鲜的 LB 培养液中,30 ℃ 培养至 $OD_{600}=0.6\sim 0.7$,迅速升温至 42 ℃,诱导表达 5 h.

1.2.2 菌体破碎 将发酵所得到的菌体经 PBS 缓冲液清洗后,用少量的 PBS 缓冲液将其悬浮,分别取 20 mL 的待测菌液于 4 个小烧杯中,用 152 W 的超声功率,在不同的破碎间隔时间超声 5 min,每次分别间隔 2,4,6,8,9 s 进行破碎.然后以 12 000 r/min 离心 5 min,测其经破碎后的上清溶液 OD_{595} 值,并通过考马斯亮蓝法测定杂蛋白质质量浓度.

1.2.3 包涵体的制备 工程菌发酵终止后,发酵液在 5 000 r/min、4 ℃ 下离心 10 min,收集菌块,然后用 PBS 洗涤菌体 3 次,并用 20 mL PBS 将其重悬.在冰浴条件下超声破菌 5 min,每次间歇 5 s,将已超声的菌液以 12 000 r/min 离心 20 min,取沉淀,用 PBS 洗涤沉淀数次,直至上清液 OD_{280} 小于 0.05,然后以 12 000 r/min 离心 10 min,其沉淀即为包涵体.

1.2.4 包涵体的洗涤 尿素溶液具有溶解膜蛋白质的能力.因此,在提取产物之前,将回收的包涵体分别用不同浓度的尿素溶液(1,2,3,4 mol/L)洗涤包涵体,以除去部分杂蛋白质,有利于包涵体的后期纯化.取 20 mL 浓度为 1,2,3,4 mol/L 的尿素溶液,在 4 ℃ 和常温条件下对包涵体进行洗涤,洗涤时间为 2,4,6,8,10,12 h,测定不同时间包涵体洗涤液中的杂蛋白质质量浓度.

1.2.5 包涵体的溶解 用 4.5,5,6,7,8 mol/L 不同浓度的尿素溶液对纯化的包涵体溶解 8 h,然后以 12 000 r/min 离心 30 min,测定上清液中蛋白质的质量浓度.

1.2.6 蛋白质含量测定 考马斯亮蓝 G250 染色法,见参考文献[7].

1.2.7 SDS-PAGE 凝胶电泳检测目的肽 运用 SDS-PAGE 凝胶电泳,方法见参考文献[8],分别对菌体破碎后的上清液、包涵体洗涤液和包涵体溶解液进行电泳,定位目的肽.

2 结果与讨论

2.1 菌体破碎条件的选择

图 1 为超声条件下不同时间间隔对菌体破碎的影响.

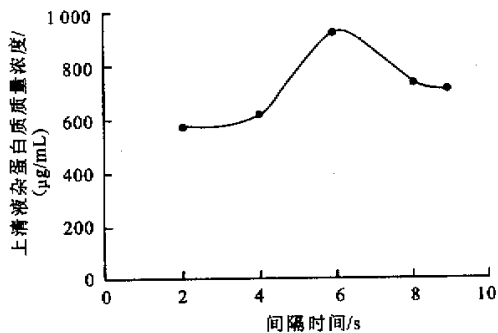


图 1 超声波条件下不同时间间隔对菌体破碎的影响
Fig.1 Effect of different alternation time on disintegration of *E. coli* cell by ultrasonic

在一定的超声强度下,冰浴中超声破菌 5 min. 从图 1 可以看出,随着间隔时间的延长,上清液杂蛋白质含量逐渐增加,在间隔 6 s 时,蛋白质含量最大,其破碎效果最好. 超过 6 s 时,蛋白质含量又下降. 这是由于在冰浴的条件下超声破碎,细胞溶胀作用而导致细胞壁破碎,合适的破碎强度及间隙时间操作,可避免超声波破碎过程中产热而引起蛋白质的降解.

2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

从图 2 可以看出,菌体破碎上清液和包涵体洗涤液中并没有目的肽,而在包涵体溶解液中有目的肽(相对分子质量为 16 000 左右),说明了外源阿片肽基因在大肠杆菌中得到了表达,并且形成了不溶性的包涵体,阿片肽存在于形成的包涵体中.

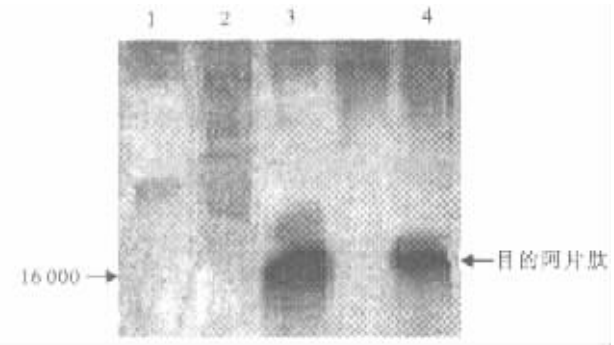


图 2 SDS-PAGE 电泳目的肽定位图

Fig.2 Location of target casomorphin by SDS-PAGE

2.3 包涵体的洗涤效果

用低浓度的尿素溶液(1,2,3,4 mol/L)洗涤包涵体除去杂蛋白质,分别在 4 ℃ 和常温条件下进行洗涤,洗涤时间分别为 2,4,6,8,10,12 h. 同时对 4 ℃ 和常温条件下的洗涤效果进行了比较,结果见图 3 和图 4.

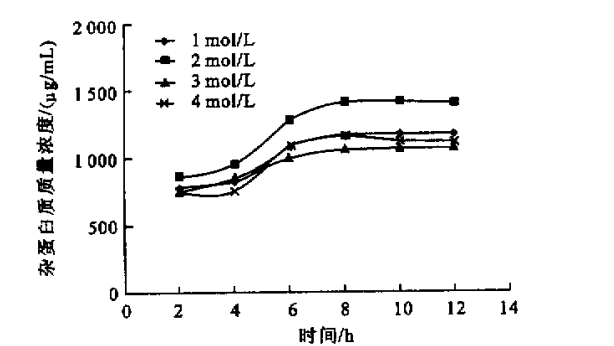


图 3 4 ℃ 条件下尿素溶液洗涤时间对包涵体的影响

Fig.3 Effect of washing time on inclusion body by urea solution at 4 °C

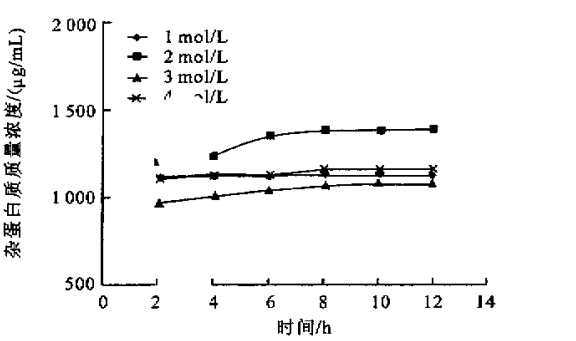


图 4 常温下尿素溶液洗涤时间对包涵体的影响

Fig.4 Effect of washing time on inclusion body by urea solution at normal temperature

在溶解包涵体之前用浓度小于 4 mol/L 的尿素溶液洗涤包涵体,可以去除大量的杂蛋白质、核酸等杂质^[5]. 张耀东等(1998)对基因重组 Gamma-干扰素包涵体进行清洗,结果表明,2 mol/L 的尿素溶液能较多洗去杂蛋白质而又使 Gamma-干扰素损失最少,并且洗涤 8~9 h 后杂蛋白质达到饱和^[9]. 从图 3、图 4 中可以看出:同一温度下,同一洗涤时间,以 2.0 mol/L 的尿素溶液能较多地洗去杂蛋白质,洗涤 7~8 h 后杂蛋白质达到饱和,杂蛋白质质量浓度可达 1.4 mg/mL 左右.

从图 5 可以看出:刚开始时,在常温条件下,尿素溶液对包涵体的洗涤效果较好,但在 7 h 左右、4 ℃ 条件下,洗涤效果接近于常温条件. 8 h 后,4 ℃ 时洗涤效果略好于常温条件,同时考虑到低温条件下有利于肽的稳定,所以选择 4 ℃ 作为包涵体的洗涤温度.

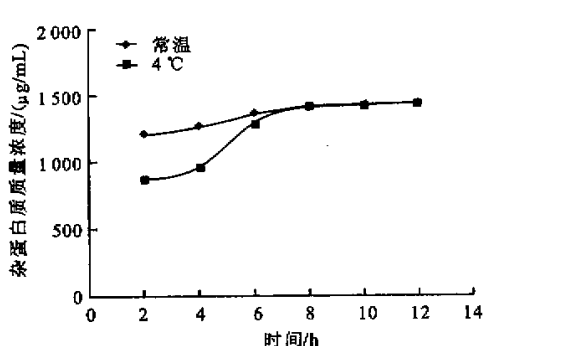


图 5 不同温度下尿素溶液对包涵体洗涤的影响

Fig.5 Effect of temperature on washing of inclusion body by urea

2.4 尿素浓度对包涵体溶解的影响

从图 6 可以看出,随着尿素浓度的增加,包涵体溶解度也增大,上清液蛋白质质量浓度也相应增大. 尿素浓度达到 8 mol/L 时,蛋白质质量浓度达到

饱和,约为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$,取得较好的溶解效果.

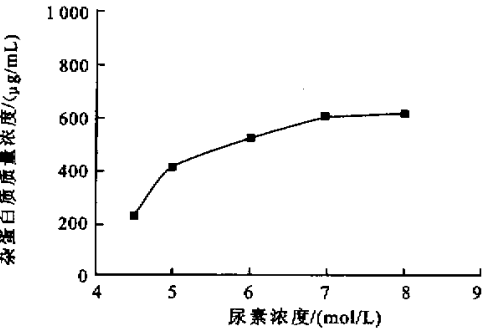


图 6 不同浓度尿素溶液对包涵体溶解的影响
Fig.6 Effect of urea concentration on solubilization of inclusion body

3 结 论

- 1) 对诱导发酵后的菌液进行破碎,结果表明,在一定的超声功率下,超声 5 min,间隔 6 s,破碎效果较好.
- 2) 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳,确定阿片肽在大肠杆菌中得到了表达,并且存在于包涵体中.
- 3) 影响包涵体洗涤的因素研究表明,2 mol/L 的尿素溶液洗涤效果最好,洗涤时间为 7~8 h,洗涤温度为 4 $^{\circ}\text{C}$,杂蛋白质质量浓度可达 1.4 mg/mL 左右.
- 4) 研究了不同浓度的尿素溶液对包涵体溶解的特性,结果表明,8 mol/L 的尿素溶液有较好的溶解效果,蛋白质质量浓度约为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

参考文献：

[1] 滑静,杨佐君,门瑞霄. 内源性阿片肽研究进展[J]. 北京农学院学报,1998,13(3) :115-121.

[2] LI S. Expression in *Escherichia coli* and purification of human thrombopoietin[J]. *Biotechnol Appl Biochem*,1997, 26 :15-26.

[3] 钟彦伟,阎锡蕴,汤健等. 重组血管内皮细胞生长因子包涵体复性条件研究[J]. 生物学杂志,1999,16(5) :13-14.

[4] 郭立安,耿信笃. 蛋白的色谱复性及同时纯化[J]. 生物工程学报,2000,16(6) :661-666.

[5] 徐明波,董晓杰,孟文华等. 原核基因工程中以包涵体形式表达产物的中试分离纯化研究[J]. 高技术通讯,1993,(9) :11-16.

[6] 吴蕾,张瑛,甘一如. 重组人白细胞介素-6 包涵体溶解工艺研究[J]. 化学工业与工程,2000,17(6) :321-325.

[7] 陈执中,章月华. 现代生化药物与基因工程药物分析[M]. 上海:上海医科大学出版社,2000.

[8] 石继红,赵永同,王俊楼等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小分子多肽[J]. 第四军医大学学报,2000,21(6) :761-763.

[9] 张耀东,洪深求,张丽华. 基因重组人 Gamma-干扰素发酵和提取优化工艺的研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),1998,26(2) :55-69.

[10] FISCHER B, SUMNER I, GOODENOUGH P. Isolation,renaturation,and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies[J]. *Biotech Bioeng*,1993,41 (1) :3-13.

(责任编辑 朱 明)