

生物活性肽 Lunasin 的原核表达和分离纯化*

盖文丽 颜冬菁 王伟 陈孝平 陈正望[△]

(华中科技大学分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074)

摘要 目的 利用基因工程的方法在大肠杆菌中表达并纯化生物活性肽 Lunasin。方法 :将合成的 Lunasin 基因插入原核表达载体 pET-32a(+)的多克隆位点 Nde I 和 Xho I 之间 ,然后将重组载体转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中 ,利用 IPTG 诱导表达蛋白 ,经 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定蛋白的表达。然后利用亲和层析技术将含有 6× His 标签的蛋白分离纯化、脱盐、冻干。结果 :①鉴定结果表明在 6kDa 位置出现目的条带 Lunasin 重组蛋白。②亲和层析在 100mM 咪唑时得到了洗脱的重组蛋白。结论 :在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达并且纯化出了生物活性肽 Lunasin。

关键词 原核表达 ;亲和层析 ;IPTG ;

中图分类号 :Q75 Q78 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)05-805-03

Prokaryotic Expression and Purification of Bioactive Peptide Lunasin*

GAI Wen-li, YAN Dong-jing, WANG Wei, CHEN Xiao-ping, CHEN Zheng-wang[△]

(Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology(HUST), Wuhan, Hubei, 430074, China)

ABSTRACT Objective: To express prokaryotic and purify bioactive peptide Lunasin in *E. coli* by genetic engineering methods.

Methods : The gene of Lunasin was artificially synthetic and then inserted into Nde I and Xho I enzyme-cutting sites of pET-32a(+) plasmid. The recombinant expression vector pET-32a (+)-Lunasin-6His was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The fusion protein Lunasin was solubly expressed after the induction of IPTG. The fusion protein was identified by SDS-PAGE and Western Blot. After the expressed protein was purified by affinity binding chromatography with Ni-NTA, salt-out and freeze-dried. **Results:** ① The molecular mass of Lunasin-6His was 6kDa. ② The fusion protein was eluted by 100 mM Imidazole. **Conclusion:** Bioactive peptide Lunasin was successfully expressed and purified in *E. coli* BL21 (DE3).

Key words: Prokaryotic Expression; Affinity Chromatography; IPTG

Chinese Library Classification: Q75 Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-805-03

前言

生物活性肽 ,是产生于胃肠消化或食物加工过程 ,在代谢调控中起重要作用的从二肽到复杂的线性、环形结构的不同肽类的总称^[1]。研究表明 ,生物活性肽作为营养制品和功能性食品成分 ,可能对促进健康和降低患病风险具有功能。活性肽易于被人体消化吸收 ,有促进免疫、抗菌、抗炎、抗病毒、降血压、降血脂、激素调节等作用 ,并且食用安全性较高 ,是当前国际食品届研究最热门课题之一^[2]。

大豆生物活性肽 Lunasin 是 1987 年日本的一个研究小组从大豆中分离鉴定的一个天然多肽 ,全长 43 个氨基酸 ,分子量 5kDa^[3]。已有的体外实验及动物学实验表明 Lunasin 具有抗有丝分裂效应和抗炎作用^[4-6]。

天然生物活性肽 Lunasin ,已经发现存在于大豆、大麦、小麦、龙葵、苋菜红等多种植物中^[7-9]。Lunasin 虽然来源广泛 ,但是分离纯化成本高且产率较低 ,本研究构建了带 6 个 His 标签的重组表达载体并转化入大肠杆菌 ,利用乳糖操纵子的葡萄糖效

应诱导表达了生物活性肽 Lunasin。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5a 和 BL21(DE3)来自鼎国生物科技公司 ,pET-32a(+)来自本研究所保存。

1.1.2 工具酶及主要试剂 限制性核酸内切酶购自 NEB 公司 ;T4 连接酶购自 Takara 公司。DNA 分子量 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司 ;蛋白分子量 Marker 购自 NEB 公司 ;IPTG 购自 Gibco 公司 ;Amp 购自 Sigma 公司 ,胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司 ,质粒抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司 ,NiResin 购自 GE 公司 ,His 单克隆抗体购自天根生化 ,测序由北京奥科生物公司完成。其他试剂均为进口或国产分析纯级试剂。

1.1.3 蛋白纯化系统 Ni-NTA 纯化树脂为 GE 公司产品。层析系统(AKTA prime ,Amersham ,瑞典) ,脱盐用透析袋(截分子量 3500) ,高速冷冻离心机(GL21M ,英泰 ,长沙) ,微量蛋白质

* 基金项目 国家自然科学基金(30470823)

作者简介 盖文丽(1983-) ,女 ,硕士 ,研究方向 分子生物学 E-mail: ge20090301@126.com

[△]通讯作者 陈正望 电话 :027-87792027 E-mail: zwchen@mail.hust.edu.cn

(收稿日期 2010-11-10 接受日期 2010-12-06)

垂直电泳仪 (Mini. PROTEAN 3Cell ,Bio-rad , 美国) , 冻干机 (SNL 315SV Speed Vac ,Savant ,美国)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 Lunasin 基因的获得 基因由南京金思瑞生物公司合成 , 连接到 pUC57 载体上 ,Lunasin 基因的两端带有 Nde I 和 Xho I 酶切位点。

1.2.2 重组载体 pET32a (+)-Lunasin 的构建及鉴定 分别将 Lunasin 基因和载体 pET32a(+)用 Nde I 和 Xho I 双酶切 ,胶回收后将 Lunasin 基因用 T4 连接酶连接到 pET-32a(+)上。利用连接产物转化大肠杆菌 DH5a ,挑选阳性克隆测序。

1.2.3 重组蛋白的表达、鉴定 将测序结果正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) ,挑选阳性克隆接种于 Amp(50mg/L) LB 培养基 37℃、250rpm 过夜培养 ,次日按 1:100 比例转接于 Amp (50mg/L) LB 培养基振荡培养至 OD 值 0.6 左右 ,加入 IPTG (0.1mmol/L) 诱导 ,继续培养 3h ,4℃、5000rpm 离心 10min 收集菌体 ,15% SDS-PAGE 分析蛋白组分、Western Blot 鉴定目的蛋白。

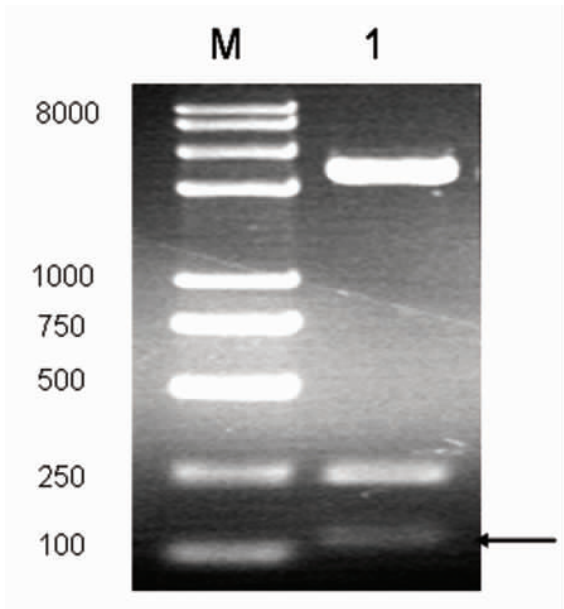


图 1 pUC57-Lunasin 质粒酶切电泳图 M: DNA 分子量标准 ;1: pUC57-Lunasin 质粒酶切

Fig. 1 Digestion of pUC57-Lunasin M: DNA Marker; 1: digestion of pUC-Lunasin

2.3 重组蛋白的诱导表达和鉴定

将测序正确的 pET-32a (+) 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) ,IPTG 诱导表达 3h ,与对照组 pET-32a(+)空质粒转化的大肠杆菌 BL21(DE3)相比 ,实验组诱导后表达产物在 6kDa 左右 (见图 3) Lunasin 蛋白分子量为 5kDa ,6× His 分子量约为 1kDa ,与理论值 6kDa 相符。

2.4 蛋白的分离纯化

将过亲和层析柱的洗脱液分别收集、透析脱盐并冻干。15% SDS-PAGE 分析分离纯化的蛋白(图 4)。结果显示 ,在含 100mM 咪唑的磷酸盐缓冲液中 ,含有目的蛋白。

3 讨论

1.2.4 蛋白的分离纯化 菌体沉淀重悬于亲和层析柱(GE Healthcare)上样缓冲液 (20mM 磷酸盐 ,0.5M NaCl ,5mM 咪唑 ,pH7.4) ,冰上 400W 超声破碎菌体 ,超 5s 停 5s 共 40 个循环。菌体裂解液于 4℃、12000rpm 离心 30min ,取上清 0.45μm 滤器过滤 ,分别用含 20mM、60mM 咪唑的缓冲液洗脱杂蛋白 ,100mM 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白。收集各洗脱峰 ,分别透析脱盐、冷冻干燥 ,15% SDS-PAGE 分析蛋白。

2 结果

2.1 Lunasin 基因的获得

利用 Nde I 和 Xho I 将 pUC57-Lunasin 质粒双酶切 ,获得 Lunasin 基因(134bp) ,2%琼脂糖凝胶电泳结果显示正确(图 1)。

2.2 重组载体 pET32a(+)-Lunasin 的构建及鉴定

将分别用 Xba I 和 Pst I 双酶切后的 Lunasin 基因和 pET-32a (+) 片段用 T4 连接酶 16℃连接过夜 ,转化大肠杆菌 DH5a ,挑选单克隆酶切鉴定 ,结果见图 2 所示。将酶切正确的质粒送北京奥科生物公司测序。

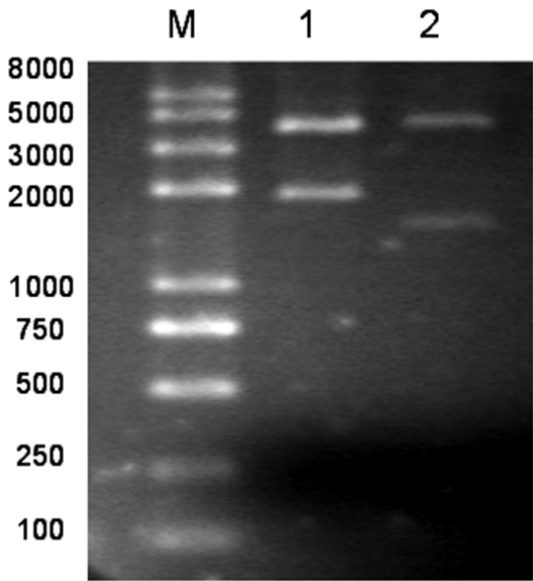


图 2 Xba I 和 Pst I 酶切鉴定重组质粒 M: DNA 分子量标准 ;1 空 pET-32a(+)酶切 ;2 重组质粒酶切

Fig. 2 Digestion of recombinant plasmid by Xba I and Pst I M: DNA Marker; 1: pET-32a(+); 2: recombinant plasmid

大豆生物活性肽 Lunasin 是第一个已知的具有抗有丝分裂效应的食物性(大豆)来源的抗有丝分裂物质^[10] ,并可以通过抑制 NF-κB 通路来抑制炎症。Lunasin 的以上性质表明 :其可能作为抗癌药物抑制癌症 ,并且可能作为抗炎物质抑制炎症的发生发展。但是 ,这些假说还有待更多的研究进一步证实。

作为新发现的生物活性肽 ,Lunasin 的天然含量较低 ,而人工合成蛋白的成本昂贵 ,限制了其研究和应用的进展。

随着基因工程技术的发展 ,使得利用重组技术表达蛋白成为可能。在大肠杆菌中原核表达具有简单、快捷、高通量的优点。pET 系统是有史以来在大肠杆菌 (E.coli) 中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统。目的基因克隆到 pET 质粒载体上 ,

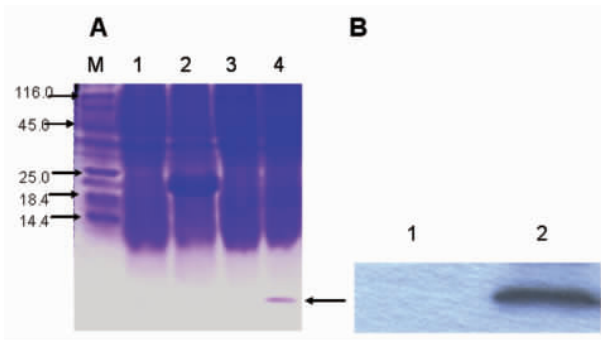


图 3 IPTG 诱导表达结果 :A 图 15%SDS-PAGE 电泳结果 M: 蛋白分子量标准 ;1: pET-32a(+) 诱导前 ;2: pET-32a(+) 诱导后 ;3: 重组质粒诱导前 ;4: 重组质粒诱导后. B 图 Western Blot 结果 :1 为空 pET-32a(+)诱导后 ;2 为重组质粒诱导后

Fig. 3 Protein expressed by the induction of IPTG :A 15%SDS-PAGE: M: Protein Marker; 1: before induction of pET-32a(+); 2: after induction of pET-32a(+); 3: before induction of recombinant plasmid; 4: after induction of recombinant plasmid. B Western Blot: 1: after induction of pET-32a(+); 2: after induction of recombinant plasmid

受噬菌体 T7 强转录和翻译(可选择)信号的控制 ,表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导。

本研究利用基因工程的方法构建带有一个 6× His 标签的重组载体 ,His-Tag 在 pH8.0 时不带电 ,无免疫原性 ,对蛋白的分泌、折叠和功能等基本无影响 ,并且可以高度亲和镍离子 ,利于亲和层析纯化蛋白。将重组表达载体转化的大肠杆菌进行诱导表达、亲和层析纯化出了具有生物活性的生物活性肽 Lunasin。

此生物活性肽的成功表达使得 Lunasin 的制备成本降低、操作更加简便可行。对于 Lunasin 功能和机制的广泛研究具有重要意义 ,并且为今后 Lunasin 的临床应用具有一定意义。

参考文献(References)

[1] Shahidi F, Zhong Y. Bioactive peptides [J]. Aoac International, 2008, 91 (4): 914 - 931
[2] Mota M, Gargavu S, Popa S, et al. Soya-the Medicine Food Product[J]. Rom J Intern Med, 2007, 45 (1): 113 - 121
[3] Odani S, Koide R, Ono T. Amino acid sequence of a soybean (Glycine max) seed polypeptide having a poly (L-Aspartic acid) structure[J]. Biol Chem, 1987, 262 (22): 10502-10505
[4] Jeong JB, Jeong HJ, Park JH, et al. Cancer-preventive peptide Lunasin

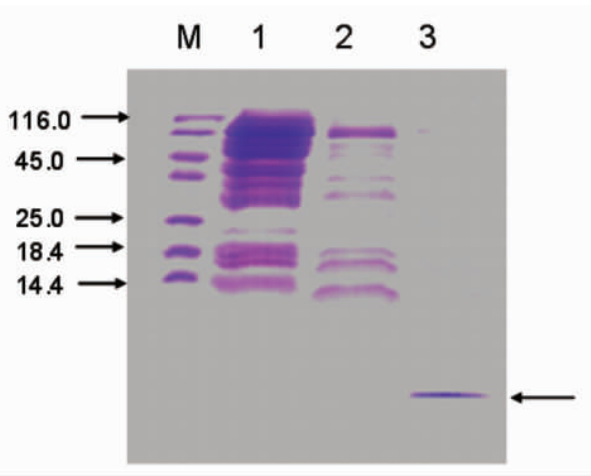


图 4 15%SDS-PAGE 分析分离纯化的蛋白 M: 蛋白分子量标准 ;1: 20mM 咪唑洗 ;2: 60mM 咪唑洗 ;3: 100mM 咪唑洗

Fig 4 The fusion protein was identified by SDS-PAGE after purification : M: Protein Marker; 1: elution by 20mM Imidazole; 2: 60mM Imidazole; 3: 100mM Imidazole

from Solanum Nigrum L. Inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinblastoma protein (Rb) [J]. Agric Food Chem, 2007, 55: 10707 - 10713

[5] Galvez AF, Chen N, Macasieb J, et al. Chem preventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation[J]. Cancer Res, 2001, 61: 7473 - 7478
[6] Park JH, Jeong HJ, Lumen BO. In vitro digestibility of the cancer-preventive soy peptides Lunasin and BBI [J]. Agric Food Chem, 2007, 55: 10703 - 10706
[7] Park JH, Jeong HJ, Lumen BO. Contents and bioactivities of Lunasin, Bowman-Birk Inhibitor, and Isoflavones in soybean seed [J]. Agric Food Chem, 2005, 53: 7686 - 7690
[8] Jeong HJ, Lam YI, and Lumen BO. Barley Lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells[J]. Agric Food Chem, 2002, 50: 5903 - 5908
[9] Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, et al. The cancer preventive peptide Lunasin fom wheat inhibits core histone acetylaion[J]. Cancer Letters, 2007, 255: 42 - 48
[10] Kennedy AR. The evidence for soybean products as cancer preventive agents[J]. Nutr, 1995, 125: 733 - 743