

7 种牛奶蛋白基因在大肠杆菌中的异源表达

张 齐¹ 崔金明¹ 蒙海林¹ 张炳照² 魏 婷² 黄建东^{2,3} 刘陈立^{1,2}

¹(广州中国科学院先进技术研究所生物工程研究中心 广州 511458)

²(中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学工程中心 深圳 518055)

³(香港大学李嘉诚医学院 香港 999077)

摘 要 通过将牛奶中的 α s1-酪蛋白、 α s2-酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白及白蛋白共 7 种主要蛋白基因在大肠杆菌中进行了异源表达, 并对其中的三种乳清蛋白进行了 Western-blot 验证。研究结果显示, 大肠杆菌可成功表达 7 种牛奶蛋白, 且未被降解。这表明将大肠杆菌作为产生重组牛奶蛋白的底盘细胞具有较好的应用潜能, 以上研究对后续进一步开发人造牛奶奠定了基础。

关键词 大肠杆菌; western-blot; 重组牛奶蛋白

中图分类号 TG 156 **文献标志码** A

Synthesis of Seven Milk Proteins in *Escherichia Coli*

ZHANG Qi¹ CUI Jinming¹ MENG Hailin¹ ZHANG Bingzhao² WEI Ting²

HUANG Jiandong^{2,3} LIU Chenli^{1,2}

¹(Bioengineering Research Center, Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 511458, China)

²(Center of Synthetic Biology Engineering Research, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

³(HKU Li Ka Shing Faculty of Medicine, Hong Kong 999077, China)

Abstract Seven main cow milk protein genes, including α s1CN, α s2CN, β CN, κ CN, α La, β Lg, and BSA (Bovine Serum Albumin), were expressed in *Escherichia coli* and three whey proteins were examined by western-blot. As a trial substage, these genes of seven cow milk proteins expressed successfully in *E. coli* without a phenomenon of degradation. The results indicated that it is initially feasible to gain recombinant milk proteins using recombinant *E. coli*, and this work lays foundations for the production of cow free milk.

Keywords *Escherichia coli*; western-blot; recombinant milk proteins

收稿日期: 2016-08-03 修回日期: 2016-09-29

基金项目: 广州市科技计划项目(201508020092); 深圳市未来产业发展专项资金(海洋类)第三批扶持计划(CXZZ20140901004122088); 广东省科技计划项目(2014A020216029、2014B020201001、2014A030304008、2014B050505003); 深圳科创委基础研究(JCYJ20150521144320992); 深圳市科技创新委员会孔雀团队(KQTD2015033117210153)

作者简介: 张齐, 硕士, 研究方向为重组功能多肽开发; 崔金明, 博士, 研究方向为合成生物学; 蒙海林, 博士, 研究方向为合成生物学; 张炳照, 博士, 研究方向为合成生物学; 魏婷, 博士, 研究方向为合成生物学; 黄建东, 教授, 研究方向为合成生物学与肿瘤治疗; 刘陈立(通讯作者), 教授, 博士生导师, 研究方向为合成生物学, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn.

1 引 言

牛奶是营养最为丰富的天然食物之一，主要由水、蛋白质、脂肪、乳糖、矿物质以及维生素等组成。全世界牛奶年消费总量超过 5×10^8 吨^[1]。时至今日，全世界的奶生产方式依旧依赖于奶牛，虽然这种传统产奶方式技术成熟且产量高，但却面临以下问题：(1) 疯牛病等造成的对牛奶品质毁灭性打击并由此产生的食品安全问题^[2]；(2) 奶牛沦为产奶机器所涉及的动物伦理问题^[3]；(3) “奶价涨了奶牛却没了”的经济困境^[4]。面对这些问题，近年来与牛奶相关的研究却依旧主要集中在各种蛋白成分功能上，如奶制品中的致敏源^[5,6]、牛奶蛋白来源活性功能肽^[7,8]、牛奶蛋白纤维^[9]等上。

合成生物学是在分子水平上通过人工设计和构建自然界中不存在的生物系统来解决能源、材料、健康和环保等问题的一门新兴学科^[10,11]。随着其发展，越来越多的关于合成生物学的手段和设想得以尝试。在此基础上，我们利用不同微生物作为底盘细胞探讨合成人造牛奶的可行性。大肠杆菌作为合成生物学的模式菌株之一，具有培养容易、生长迅速和遗传操作简单等特点。因此，在本研究中，我们首先选择了在大肠杆菌中开展了这一工作。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 质粒和菌株

质粒 pET28a 及 *E. coli* BL21 (DE3) PlysS 购于 Novagen 公司；*E. coli* TOP10 购于 TaKaRa 公司；pNZ8148-*as1*CN、pNZ8148-*as2*CN、pNZ8148- β CN、pNZ8148- κ CN、pNZ8148- α La、pNZ8148- β Lg、pNZ8148-BSA 由本中心构建和保存。

2.1.2 培养基

LB 培养基：酵母粉 5.0 g/L，蛋白胨 10.0 g/L，NaCl 5.0 g/L。重组菌筛选时，在 LB 培养基中添加卡那霉素，终浓度 15 μ g/mL。

M9 培养基成分参照文献^[12]。

2.1.3 工具酶和试剂

Nco I 和 *Hind* III 限制性内切酶购于 NEB 公司；T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司；卡那霉素和 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖)购于阿拉丁生化公司； α -Lactalbumin、 β -Lactoglobulin、BSA (Bovine Serum Albumin) 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购于 Proteintech 公司。

2.2 方法

2.2.1 牛奶蛋白基因来源及分类

通过 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找 *as1*-酪蛋白、*as2*-酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白及白蛋白成熟肽氨基酸序列，对其编码序列密码子进行优化(在线优化软件网址：www.jcat.de)，然后委托上海捷瑞公司合成碱基序列。7 种牛奶蛋白分类和编号如表 1 所示。

2.2.2 目的基因的克隆

设计如下引物(见表 2)，引入 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点，分别以合成的 *as1*-CN、*as2*-CN、 β -CN、 κ -CN、 α -La、 β -Lg、BSA 基因为模板，通过 PCR 扩增相应目的基因片段。

PCR 扩增程序：98 $^{\circ}$ C，10 s；63 $^{\circ}$ C，5 s；72 $^{\circ}$ C，2 min；总反应循环数 30 次。

2.2.3 构建表达载体

PCR 产物经纯化后，酶切连接入 pET28a 质粒(pET28a 物理图谱见图 1)，转化大肠杆菌 TOP10，在含有卡那抗性 LB 平板上筛选转化子。抽提质粒，酶切验证后测序(Invitrogen

表 1 7 种牛奶蛋白缩写及编号

Table 1 Abbreviation of seven cow milk proteins

蛋白名称	英文名称	NCBI 登录号	编号	缩写	重组蛋白理论分子量 (kDa)	
酪蛋白	α s1-酪蛋白	α s1-casein	NP_851372.1	4	α s1-CN	23
	α s2-酪蛋白	α s2-casein	NP_776953.1	6	α s2-CN	24
	β -酪蛋白	β -casein	AAA30480.1	5	β -CN	23.6
	κ -酪蛋白	κ -casein	NP_776719.1	3	κ -CN	19
乳清蛋白	α -乳清蛋白	α -lactalbumin	AAA30615.1	1	α -La	14
	β -乳球蛋白	β -lactoglobulin	NP_776354.2	2	β -Lg	18
	白蛋白	bovine serum albumin	CAA76847.1	7	BSA	66

表 2 各引物序列

Table 2 Primer sequences

名称	序列
1-F	5' CATGCCATGGAACAACCTACTAAATGTGAAGTTTTCCG 3'
1-R	5' CCCAAGCTTTTAAAGTTTTTCACAAAGCCATTGATC 3'
2-F	5' CATGCCATGGCACTTATCGTTACTCAAACATG 3'
2-R	5' CCCAAGCTTTTAGATGTGACATTGTTCTTC 3'
3-F	5' CATGCCATGGTACAAGAACAAACCAAGAACAACC 3'
3-R	5' CCCAAGCTTTTAAACAGCAGTTGAAGTAACTTG 3'
4-F	5' CATGCCATGGACCGTCCAAAACACCCAATC 3'
4-R	5' CCCAAGCTTTTACCAAAGTGGCATAGTAG 3'
5-F	5' CATGCCATGGCACGTGAACTTGAAGAACTTAACG 3'
5-R	5' CCCAAGCTTTTAAACGATGATTGGGAATGGACCACG 3'
6-F	5' CATGCCATGGCCAAAAACACTATGGAACACG 3'
6-R	5' CCCAAGCTTTTAAAGGTAACGAACGTATGGGAT 3'
7-F	5' CATGCCATGGATACTCACAAATCAGAAATCG 3'
7-R	5' CCCAAGCTTTTAAAGCAAGAGCAGTTTGAG 3'

公司)。正确连接的载体分别命名为 pET28a- α s1CN、pET28a- α s2CN、pET28a- β CN、pET28a- κ CN、pET28a- α La、pET28a- β Lg、pET28a-BSA。

2.2.4 转化子筛选

重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) PlysS 感受态细胞, 感受态细胞制备方法同 Choi 等^[8]提出的方法, 复苏约 1 h 后, 涂布于 LB (Kan+) 平板。培养过夜后, 挑单菌落至含有 5 mL LB (Kan+) 试管中进行诱养, 至 $OD_{600}=0.4$, 加入终浓度 1 μ mol/L IPTG 进行诱导。3 h 后取样离心, 弃上清。

2.2.5 SDS-PAGE 及 Western blot

上述样品加入 50 μ L 10% SDS, 反复吹打待

细胞完全裂解后, 加入等体积 2 \times 上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 12 000 g 离心 3 min, 每孔上样体积为 10 μ L。SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%, Western-blot 一抗和二抗稀释浓度分别为 1:5 000 和 1:3 000。具体方法参照汪家政等^[13]的文献。

3 实验结果

3.1 表达载体构建

将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 (图 2), 获得的条带清晰, 大小与理论值相符。构建好的载体经 PCR 验证以及测序验证后, 得到含有正

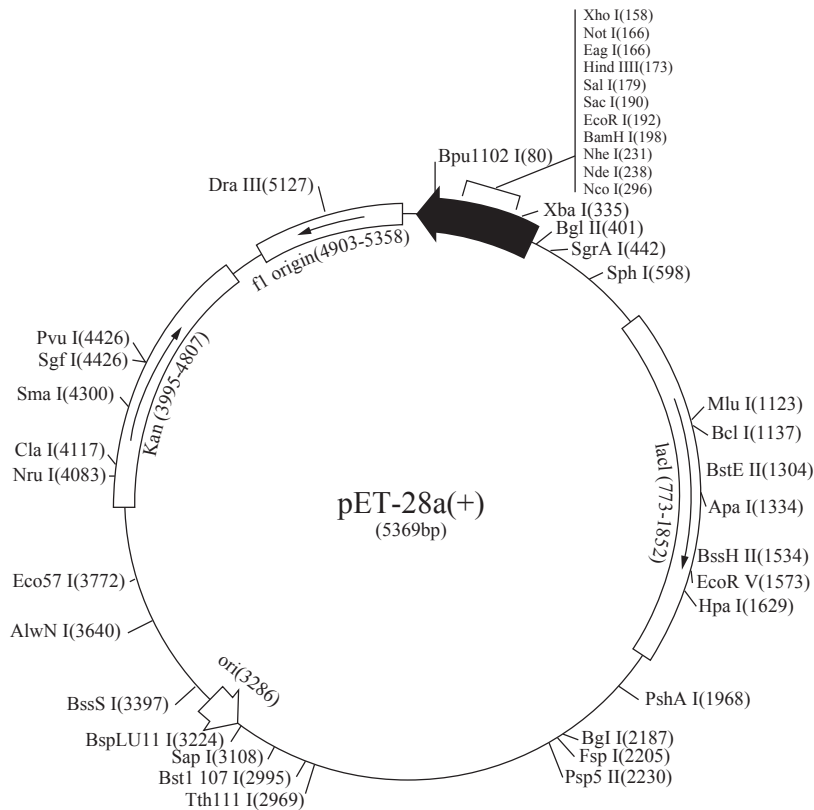
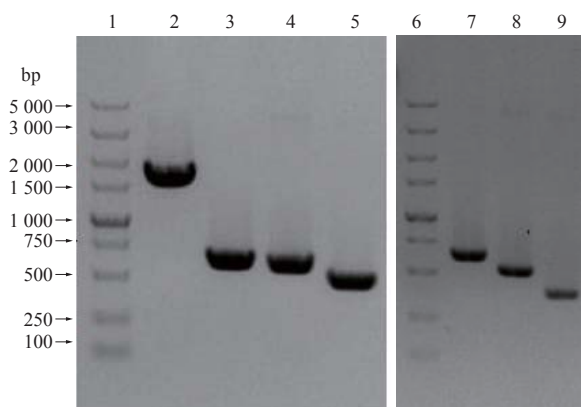


图1 pET28a 物理图谱

Fig. 1 Physical map of pET28a



对应泳道分别为 1、6 - Marker, 2-BSA, 3- α 2CN, 4- α 1CN,

5- β Lg, 7- β CN, 8- κ CN, 9- α La

图2 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products from seven cow milk proteins

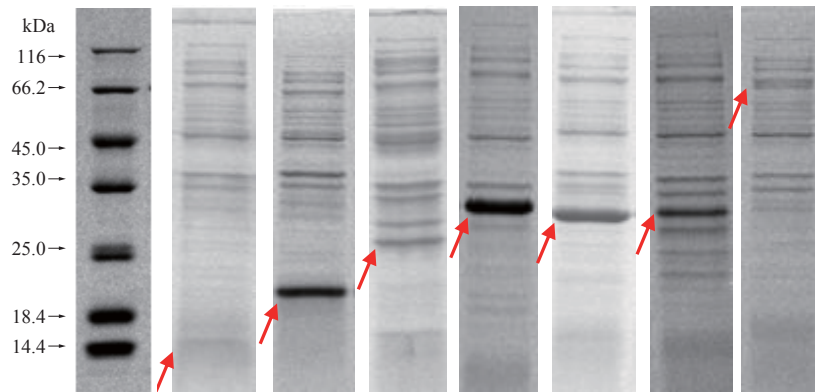
确编码序列的重组质粒 pET28a- α 1CN、pET28a- α 2CN、pET28a- β CN、pET28a- κ CN、pET28a- α La、pET28a- β Lg 和 pET28a-BSA。

3.2 重组大肠杆菌的筛选和牛奶蛋白基因的表达

挑选不同的转化子进行诱导表达, 由 SDS-PAGE 电泳考马斯亮蓝染色结果(图 3)可以看出, 与对照组相比, 均可以找到与理论大小相符的条带, 且表达水平具有明显差异性。其中, β -Lg、 α 1-CN、 α 2-CN、 β -CN、 κ -CN 条带清晰, 而 α -La 和 BSA 条带相对较弱。

3.3 Western-blot 结果

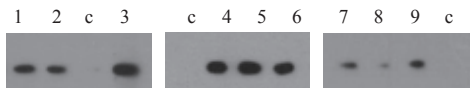
对 3 种乳清蛋白进行免疫印迹试验(图 4)。结果显示, 抗体能特异识别相应的重组牛奶蛋白, 表明重组蛋白表达无误。



从左至右依次是 Marker、 α -La、 β -Lg、 κ -CN、 α s1-CN、 β -CN、 α s2-CN、BSA

图 3 含有牛奶蛋白基因的转化子全细胞裂解 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of recombinant transformants cell lysate



c-空白对照; 1、2-重组 α -La; 4、5-重组 β -Lg; 7、8-重组 BSA;

3、6、9 分别为 α -La、 β -Lg、BSA 对照

图 4 3 种乳清蛋白免疫印迹试验结果

Fig. 4 Western-blot analysis of recombinant α -lactalbumin, β -lactoglobulin and BSA

4 讨论

以微生物作为底盘细胞利用合成生物学方法来产生牛奶蛋白, 对解决传统以奶牛为核心的产奶方式所面临的三大问题具有重要的意义。但牛奶蛋白大多容易被微生物自身代谢所降解掉^[1], 这也成为目前重组牛奶蛋白表达的一大瓶颈。2014 年, 美国 Muufri 公司提出人造牛奶概念(Cow Free Milk), 试图通过酵母合成重组牛奶蛋白^[14], 但至今仍无实质进展, 也未见进一步相关文献报道。目前国内外的研究主要还是集中在利用微生物合成某一种牛奶蛋白上。2010 年, 曹燕娟等^[15]克隆了 α s1 酪蛋白基因, 并将其部分片段整合在质粒 pET32a 上, 通过转化 *E. coli* BL21

(DE3) 获得重组蛋白, 表达水平较高, 并具有良好的免疫原性。2012 年, Anisha 等^[16]克隆了印度一种瘤牛的乳铁蛋白基因, 并将其在大肠杆菌中进行了异源表达, 获得的重组蛋白利用胃蛋白酶消化后对肠致病性大肠杆菌显示出了较好的生长抑制效果; 同时, 由于蛋白自身精氨酸含量高的特点, 有利于伤口愈合及心血管疾病的防治, 具有较高的潜在应用价值。2013 年, 美国 NEB 公司 Colussi 等^[17]在克鲁维酵母中表达重组牛白蛋白, 成功应用在酶保护剂等多个方面, 获得了很好的经济效益。

本研究通过大肠杆菌异源成功地表达 7 种牛奶蛋白, 这些蛋白覆盖了天然牛奶蛋白总量的 95% 以上。相比目前对单个重组牛奶蛋白的研究, 本研究以微生物异源合成牛奶蛋白为侧重点, 进一步将研究向牛奶全蛋白的生物合成做了有益的探讨。在本研究结果中, 最终蛋白表达水平表现出较明显差异, 这与蛋白自身理化性质、N 端序列差异以及宿主细胞毒性等相关, 深入的研究对于进一步推动合成牛奶全蛋白的研发具有重要的意义^[1, 18]。生物学方法用于牛奶的合成展示出了巨大的潜能, 然而其目前产量跟天然牛奶相比还存在一定的差距。如何结合最新的基因编

辑、代谢工程等手段对大肠杆菌进行进一步的遗传改造,来提升重组牛奶蛋白表达水平及其安全性能,也是我们继续研究的重要方向。

参 考 文 献

- [1] Fox PF. Milk proteins: general and historical aspects [M] // *Advanced Dairy Chemistry*, 2013.
- [2] Walters MJ. The dark side of progress: mad cow disease [M] // *Seven Modern Plagues*, 2014.
- [3] 李芬,周娟,马云,等. 奶牛生产寿命和产奶量的相关性研究 [J]. *中国牛业科学*, 2006, 32(6): 12-14.
- [4] 龙朝晖. 解决牛奶业困境的建议 [J]. *中国集体经济*, 2009(1): 51-52.
- [5] Agamy EI. The challenge of cow milk protein allergy [J]. *Small Ruminant Research*, 2007, 68(1-2): 64-72.
- [6] 段翠翠. 不同乳源蛋白致敏性的评估 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [7] Schaafsma G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition [J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 63(10): 1161-1168.
- [8] Choi J, Sabikhi L, Hassan A, et al. Bioactive peptides in dairy products [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2012, 65(1): 1-12.
- [9] 蔡忠波,朱军军,刘优娜,等. 牛奶蛋白纤维的发展与展望 [J]. *中国纤检*, 2015(7): 82-84.
- [10] 赵国屏. 合成生物学的科学内涵和社会意义——合成生物学专刊序言 [J]. *生命科学*, 2011, 23(9): 825.
- [11] 陈国强. 2013 合成生物学专刊序言 [J]. *生物工程学报*, 2013, 29(8): 1041-1043.
- [12] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [14] 《中国乳业》编辑. 人造牛奶有望在未来问世 [J]. *中国乳业*, 2014(7): 74.
- [15] 曹燕娟, 胡东生, 刘志刚, 等. 牛奶主要过敏原 α_1 (s1)-酪蛋白全长与片段基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(7): 601-605.
- [16] Anisha S, Bhasker S, Mohankumar C. Recombinant lactoferrin of Vechur cow, the critical breed of *Bos indicus* and the *Lf* gene variants [J]. *Gene*, 2012, 495(1): 23-28.
- [17] Colussi PA, Evans TC, Taron CH. *rBSA* from *K. lactis* expression, secretion and purification of recombinant bovine serum albumin(*rBSA*) from *K. lactis* and uses thereof: PCT/US2007/007921 [P]. 2013-01-29.
- [18] Lou C, Stanton B, Chen YJ, et al. Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(11): 1137-1142.