

细胞穿膜肽与人表皮生长因子 在大肠杆菌中的重组融合表达

李风, 柯博文, 孙中伟, 韩双艳*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 该研究构建了细胞穿膜肽 Pep-1 和人表皮生长因子 hEGF 融合基因 (epEGF) 的重组表达质粒 PGEX-4T1-epEGF, 并成功转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 得到重组大肠杆菌株 BL21 (DE3)/PGEX-4T1-epEGF。通过 IPTG 诱导发酵, 制备重组融合人表皮生长因子蛋白, 并初步尝试建立纯化研究, 有效实现了人表皮生长因子 (hEGF) 在大肠杆菌中的可溶性表达。该研究通过发酵条件优化, 发现发酵过程中温度、诱导剂浓度、诱导时间、培养基都是影响蛋白表达量的关键因素; 温度在 20 °C、IPTG 浓度 0.4 mmol/L、诱导时间 8 h、培养基为 TB 液体培养基, 目的蛋白占总蛋白的量达到 21.58%, 蛋白浓度为 0.13 mg/mL。菌体破碎液上清经过 GST 亲和层析融合蛋白纯度达到 66.82%, 阴离子交换层析后融合蛋白纯度达到 92.57%。该研究成功在大肠杆菌中表达出可溶形式的 hEGF, 且纯化工艺较简单, 为 hEGF 的进一步开发利用提供了参考。

关键词: 人表皮生长因子 (hEGF); 细胞穿膜肽 (CPPs); 融合表达; 蛋白分离纯化

文章编号: 1673-9078(2021)11-151-158

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0232

Recombinant Fusion Expression of Cell-penetrating Peptide and Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*

LI Feng, KE Bowen, SUN Zhongwei, HAN Shuangyan*

(Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, the recombinant expression plasmid PGEX-4T1-epEGF containing the fusion genes of cell-penetrating peptide Pep-1 and human epidermal growth factor hEGF (epEGF) was constructed and successfully transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to obtain a recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/PGEX-4T1-epEGF. The recombinant fusion human epidermal growth factor was prepared through IPTG induced fermentation, the preliminary purification was established, and the soluble expression of human epidermal growth factor (hEGF) in *E. coli* was effectively achieved. Through optimization of fermentation conditions, it was found that temperature, inducer concentration, induction time and culture medium were the key factors affecting protein expression; Under the conditions of 20 °C, IPTG concentration of 0.4 mmol/L, induction time of 8 h, and use of TB liquid medium, the target protein accounted for 21.58% of the total protein and the protein concentration was 0.13 mg/mL. The purities of the fusion protein after GST affinity chromatography and anion exchange chromatography were 66.82% and 92.57%, respectively. In this study, the soluble form of hEGF was successfully expressed in *E. coli*, and the purification process was relatively simple, which provided a reference for the further exploitation and utilization of hEGF.

Key words: human epidermal growth factor (hEGF); cell-penetrating peptide (CPPs); fusion expression; protein isolation and purification
引文格式:

李风,柯博文,孙中伟,等.细胞穿膜肽与人表皮生长因子在大肠杆菌中的重组融合表达[J].现代食品科技,2021,37(11):151-158,+260

LI Feng, KE Bowen, SUN Zhongwei, et al. Recombinant fusion expression of cell-penetrating peptide and human epidermal growth factor in *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 151-158, +260

收稿日期: 2021-03-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFA0901500)

作者简介: 李风 (1994-), 男, 硕士, 研究方向: 蛋白表达与纯化, E-mail: bilifee@mail.scut.edu.cn

通讯作者: 韩双艳 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物酶学, E-mail: syhan@scut.edu.cn

人表皮生长因子 (human epidermal growth factor, hEGF) 是一种单链小分子多肽, 含 53 个氨基酸, 相对分子质量为 6.2 ku, 6 个半胱氨酸 (Cys) 在分子内形成 3 对二硫键, 等电点为 4.6^[1]。EGF 是由美国 Vanderbilt 大学医学系 Cohen 教授^[2]在 1962 年用羧甲基纤维素柱从小鼠颌下腺分离纯化神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 时偶然发现的小分子多肽, 研究发现这种活性多肽不仅能对神经细胞有作用, 而且与小鼠的眼睑早开和牙齿提早萌芽也有关联。1975 年 Gregory 等^[3]又从人尿液中提取出这种活性物质, 并命名为人表皮生长因子 (hEGF), 又因其可抑制胃酸的分泌, 又称抑尿胃素。EGF 在人体各种组织和体液中广泛存在, 包括血液、乳汁、胃液和十二指肠中, 调节多种生理生命活动, 能够加速组织的增殖与分化, 促进胚胎细胞的增殖与分化, 影响器官的生长发育^[4]; 促进表皮细胞生长, 对皮肤相关疾病具有一定的修复治疗价值等^[5]; 特别的, EGF 对刺激性食物导致的胃肠溃疡有显著疗效, 对促进胃肠粘膜的发育, 参与受损粘膜的修复有着重要的作用^[6]。

细胞穿膜肽 (cell-penetrating peptide, CPP) 是一类能携带大分子物质进入细胞内部的短肽, 其穿膜能力不依赖经典的胞吞作用^[7], 已经实验证实的生物大分子有寡聚核苷酸、肽段、蛋白质、纳米颗粒和脂质体等^[8]。穿膜肽重要的一个应用是能够作为载体携带多肽和蛋白质跨越肠道^[9]、肺上皮^[10]以及穿越血脑屏障^[11]等; Park 等^[12]证实了 TAT-SOD 和 9Lys-SOD (超氧化物歧化酶 SOD) 具有穿透表皮细胞的能力。Guo 等^[13]构建了重组基因 TAT-hEGF-CD47 (免疫球蛋白 CD47), 发现其能有效促进人皮肤成纤维细胞和皮肤上皮细胞增殖, 促进作用与 TAT-hEGF-CD47 浓度呈正相关。给药至皮肤后, TAT-hEGF-CD47 由于 TAT 结构域有效地穿透皮肤表皮层, 并在皮肤中停留了很长时间, 因为 CD47 片段通过单核吞噬系统减缓了其清除速度。国内对 CPP (细胞穿膜肽) 的研究也早已开始, 梁英民等^[14]将 PTD (蛋白转导结构域) 与慢性粒细胞白血病癌蛋白 Bcr/Abl 在大肠杆菌中融合表达, 将纯化出的蛋白加入培养的 HL60 细胞和 C2C12 细胞后, 发现 PTD (蛋白转导结构域) 可以介导 Bcr/Abl 蛋白跨膜进入细胞内。余婷玉等^[15]成功创建了一种含有穿膜肽标记的荧光素酶 (LUC) 融合蛋白即 TAT-LUC。与 LUC 相比, TAT-LUC 能够穿透细胞膜进入细胞, 并对 ATP 和肿瘤细胞具有更好的灵敏性。

天然 EGF 的来源十分有限, 王武康等^[16]利用 8 种分离工艺与 2 步柱层析, 最终从 40 L 健康男性尿液中, 制备出 hEGF 2.36 mg。随着基因工程技术的兴

起, 已成功在不同的系统中表达出 hEGF, 包括大肠杆菌 *Escherichia coli* (*E. coli*)^[17]、豆科植物花生^[18]、毕赤酵母 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)^[19] 和家蚕^[20], 逐渐满足 hEGF 的需求量。人表皮生长因子 (hEGF) 由于其在上皮细胞的生长和分裂中起着重要作用, 在皮肤相关损伤和疾病中具有良好的应用前景; 但其透膜效率低, 以 0.5 $\mu\text{g/g}$ 的剂量涂抹在皮肤 12 h 后累积透皮率仅有 0.993%^[21]; 皮肤中的 hEGF 可以被单核吞噬细胞系统快速清除^[22], 这些限制了它的应用。为了克服 hEGF 透皮率低, 利用大肠杆菌异源表达易形成包涵体等, 综合考虑人表皮生长因子 hEGF 表达形式和表达量, 我们在 hEGF 的 N 端引入细胞穿膜肽 Pep-1, 再克隆至携带 GST 标签的表达载体 PGEX-4T-1 中, 尝试提高表达量和增加蛋白的可溶性, 以图提高 hEGF 的生产效率, 并对目的蛋白进行了纯化, 为 hEGF 的进一步开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 *E. coli Top10*^{*}, 由华南理工大学微生物酶学实验室保存。携带 GST 标签的表达质粒 PGEX-4T-1, 购自 Invitrogen 公司; 质粒 PUC57-epEGF, 携带已经过大肠杆菌密码子优化后的目的基因 epEGF (EK/Pep-1/G₄S/hEGF 融合片段), 该融合基因片段由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和工具酶

限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 购自 TaKaRa 公司; KOD DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、PCR Mix 和标准分子量蛋白质 Marker 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; PCR 纯化试剂盒购自 Magen (美基) 生物有限公司; 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 氨苄青霉素 (Amp)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 生工生物工程 (上海) 有限公司; 其余常用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基 (g/L): 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g 氯化钠; SOC 液体培养基 (g/L): 20 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、0.5 g 氯化钠、KCl 0.186 g、MgCl₂ 0.39 g; 2% 葡萄糖; SOB 液体培养基 (g/L): 20 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、0.5 g 氯化钠、KCl 0.186 g、MgCl₂ 0.39 g; 2 \times YT 液体培养基 (g/L): 16 g 胰

蛋白胨、10 g 酵母提取物、5 g 氯化钠。TB 液体培养基 (g/L): 20 g 胰蛋白胨、24 g 酵母提取物、12.54 g K_2HPO_4 、2.31 g KH_2PO_4 、0.4% 葡萄糖; LB 固体培养基 (g/L): 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g 氯化钠、2 g 琼脂糖, 根据需要添加 Ampicillin, 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.4 仪器与设备

知楚恒温培养摇床, 上海知楚仪表有限公司; PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; Eppendorf 5804R 型高速冷冻台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; UV-2350 型分光光度计, UNICO 公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; GST Focurose 4FF、Q Focurose 6HP 预装柱, 武汉汇研生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 穿膜肽 Pep-1 与人表皮生长因子 hEGF 融合基因的优化及合成

在 NCBI 数据库中获得人表皮生长因子 hEGF 蛋白序列 (Sequence ID:2KV4_A)。将文献报道的 Pep-1 蛋白序列 (KETWWWETWWTEWSQPCKKRKV) 通过柔性肽 (GGGGS) 连接至 hEGF 片段的 N 端, 并且在穿膜肽 N 端添加肠激酶酶切位点 (DDDDDK), 如图 1 所示。将该融合基因氨基酸序列送往合成, 经大肠杆菌密码子优化而获得的碱基序列, 全基因合成 255 bp 后克隆至质粒 pUC57, 得到含有穿膜肽与人表皮生长因子融合基因的重组质粒 pUC57-epEGF。

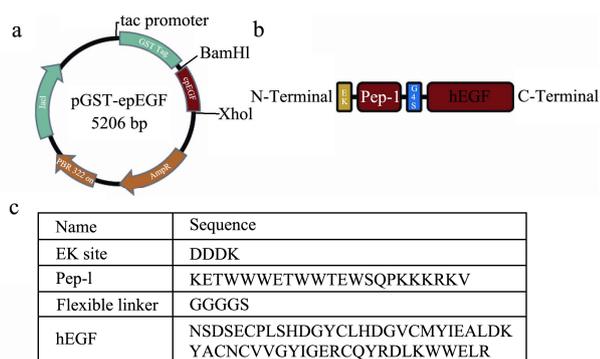


图1 融合蛋白 EK-Pep1-G4S-hEGF 重组表达质粒的构建过程

Fig.1 Construction of recombinant expression plasmid of fusion protein Ek-Pep1-G4S-hEGF

注: a: 重组表达载体 PGEX-4T-1-epEGF; b: 融合蛋白组成的各个片段; c: 肠激酶、穿膜肽、连接肽和人表皮生长因子氨基酸序列。

1.2.2 重组人表皮生长因子表达载体的构建与鉴定

在 epEGF 融合片段上下游分别引入 *BamH* I、*Xho* I 限制性酶切位点, 设计引物, (引物序列:

epEGF-F: GGCCGGATCCGATGATGATGATAAAA AAGAAACC; epEGF-R: ATACTCGAGTTAGCGC A GTTCCCAC)。以 pUC57-epEGF 为模板, 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用 PCR 产物回收试剂盒纯化, 用限制性内切酶 *BamH* I 和 *Xho* I 对 PCR 回收产物及质粒 PGEX-4T-1 分别进行双酶切, 纯化回收后用 T4 连接酶 22 $^{\circ}\text{C}$ 进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli Top10* 感受态细胞, 挑取单菌落进行菌落 PCR (引物序列: epEGF 菌落 PCR F: GCGCCGACATCA TAACGGTT, epEGF 菌落 PCR 下引: CAGACAAGC TGTGACCGTC)。将阳性转化子培养过夜, 提取质粒, 然后进行 *BamH* I 和 *Xho* I 双酶切验证, 之后重组质粒送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。测序结果显示得到重组表达载体 PGEX-4T-1-epEGF (缩写为 pGST-epEGF)。将鉴定后的质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞表达, 在 LB 氨苄青霉素抗性平板上挑取单菌落培养, 提取质粒双酶切鉴定, 将验证正确的菌种用于后续发酵。

1.2.3 目的蛋白的表达与 SDS-PAGE 分析

挑取鉴定正确的重组大肠杆菌 BL21 (DE3) -pGST-epEGF 单菌落于 10 mL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min, 培养 12~16 h。将菌液按照 1:100 转接至 100 mL 的 LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min, 继续培养到 OD_{600} 为 0.6~0.8 时, 加入 1 mol/L 的异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 16 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 条件下继续诱导培养 12 h。

将发酵液采用 6600 r/min 室温离心 10 min, 收集菌体, 用蒸馏水将菌体洗涤两次后加入破碎缓冲液重悬菌体。在冰浴条件下超声破碎 20 min (破碎条件: 6 mm 变幅杆, 频率 30%, 超声 3 s, 间隔 3 s)。对破碎后的全菌液采用 10000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 冷冻离心, 分离上清和沉淀, 将获得的全菌液、上清、沉淀样品分别进行 SDS-PAGE 分析, 确定融合蛋白的表达情况。

1.2.4 目的蛋白表达条件的优化

1.2.4.1 epEGF 融合蛋白诱导剂浓度的优化

挑取鉴定正确的阳性转化子在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄) 过夜培养, 按 1:100 的比例转接到 100 mL LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时, 分别加入不同浓度 IPTG (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L), 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 8 h。等量收集菌体, 以 SDS-PAGE 分析不同 IPTG 浓度下 epEGF 融合蛋白的表达量, 并确定 IPTG 最佳诱导浓度。

1.2.4.2 epEGF 融合蛋白诱导温度的优化

将工程菌在 37 °C 的条件下培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.8 时加入 0.4 mmol/L 的 IPTG 分别在 20、25、30、37 °C 下诱导过夜, 收集等量菌体, 以 SDS-PAGE 分析不同温度下融合蛋白的表达量, 并确定最佳诱导温度。

1.2.4.3 epEGF 融合蛋白诱导培养基的优化

挑取鉴定正确的阳性转化子在 37 °C 的 LB 液体培养基 (含 100 μg/mL 氨苄) 过夜培养, 按 1:100 的比例分别转接到 LB 液体培养基、SOC 液体培养基、SOB 液体培养基、2×YT 液体培养基、TB 液体培养基, 均含有 100 μg/mL 氨苄青霉素, 在 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L, 诱导温度为 20 °C 的条件下, 诱导过夜。分别收集等量菌体, 以 SDS-PAGE 分析不同培养基下重组融合蛋白的表达量, 并确定最佳诱导培养基。

1.2.4.4 epEGF 融合蛋白诱导时间的优化

将工程菌在 37 °C 的条件下培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时加入 0.4 mmol/L 的 IPTG 设置诱导温度为 20 °C 条件下继续培养, 分别在 2、4、6、8、10、12 h 时间点收集等量菌体, 通过 SDS-PAGE 方法鉴定不同时间段 epEGF 融合蛋白的表达量, 从而确定最佳诱导时间。

1.2.5 目的蛋白的分离纯化与 SDS-PAGE 电泳分析

利用 GST 亲和层析法^[23], 对已用 0.45 μm 滤膜过滤的菌体破碎上清进行纯化。pH 8.0 缓冲液 (10 mmol/L GSH, 50 mmol/L Tris-HCl) 并收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

收集到的 GST 纯化样品经超滤管浓缩后, 置换其中的 GSH, 再用 0.22 μm 滤膜过滤后按照上述方法上样至阴离子交换柱 (Q Focurose 6HP 5 mL), 按照 Q 柱纯化方法进行融合蛋白的第二步纯化。收集 Q 离子柱洗脱液, 收集洗脱液后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 蛋白浓度计算方法

应用软件 Image J 分析蛋白电泳条带, Image J 方法是利用灰度值来近似估算蛋白的纯度, 条带的深浅和面积综合代表蛋白的量; 利用 Bradford^[24]方法测定优化诱导工艺和纯化后蛋白浓度; 目的蛋白的相对含量利用如下公式计算。

对浓度的计算公式如下:

$$C(\text{目的蛋白浓度}) = \frac{h(\text{目的条带灰度值})}{H(\text{总蛋白灰度值})} \times C(\text{蛋白总浓度})$$

1.2.7 数据处理

数据分析与处理利用软件 Graphpad prism 8.0。

2 结果与讨论

2.1 重组人表皮生长因子表达载体的构建与

鉴定

以带有目的片段 epEGF 的 PUC57 质粒为模板, 通过 PCR 扩增得到带有酶切位点的基因片段。PCR 扩增结果如下图 2a 所示。从图中可以看出 PCR 产物条带单一且明亮, 特异性得到目的 PCR 产物。目的片段的长度在 250 bp 左右, 与预期结果相符。

按照材料方法 1.2.2 描述, 对 PCR 产物与质粒 PGEX-4T-1 分别用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切, 体外连接构建重组表达载体 pGST-epEGF, 并转化大肠杆菌, 利用氨苄抗性平板进行抗性筛选, 利用菌落 PCR 鉴定阳性转化子。菌落 PCR 鉴定结果如图 2b 所示。从图中可以看出, 编号 1~10 的菌株的菌落 PCR 产物片段在 1000 bp 左右, 与理论值相符, 初步判断重组质粒 pGST-epEGF 对应的转化子已构建成功。

菌落 PCR 鉴定正确的转化子, 将其接种到 LBA 液体培养基中过夜培养, 保存甘油菌并提取重组质粒进行双酶切鉴定, 结果如图 2c 所示。从图中可以看出, 酶切 2 条带大小约为 5000 bp 和 250 bp, 符合理论结果, 可以基本判定重组表达质粒成功构建。

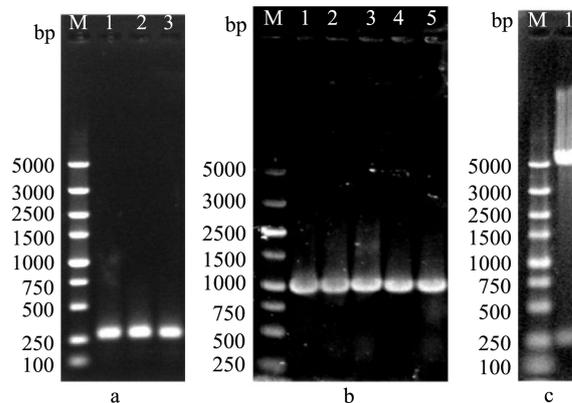


图 2 重组人表皮生长因子表达载体的鉴定;

Fig.2 Identification of recombinant human epidermal growth factor expression vector

注: a: 融合基因 PCR 鉴定结果 (M: DL 5000 DNA Marker; 1~2: 融合基因 PCR 条带); b: 菌落 PCR 鉴定结果 (M: DL 5000 DNA Marker; 1~10: 抗性平板转化子); c: 双酶切鉴定结果 (M: DL 5000 DNA Marker; 1: 重组质粒双酶切片段)。

将 1~5 号菌株的质粒, 送至生工生物工程 (上海) 有限公司进行基因测序, 测序结果与目的基因比对完全正确, 可以得出结论重组表达质粒已成功构建。

2.2 目的蛋白的表达与 SDS-PAGE 分析

按照“1.2.3”对重组人表皮生长因子工程菌进行发酵, 取重组菌 BL21 (DE3) -pGST-epEGF 未诱导与诱导的发酵液离心后的菌体, 加入蛋白上样缓冲液,

煮沸后直接 SDS-PAGE 鉴定, 结果如图 3 所示。可以看出在 36 ku 处出现明显条带, 而未诱导菌株无明显此条带, 与预期结果一致, 即初步说明重组菌株表达了重组 epEGF。

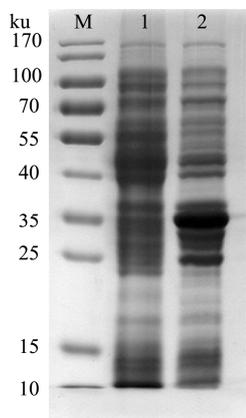


图 3 重组工程菌 SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 SDS-PAGE Identification of recombinant engineered bacteria

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: 未诱导; 2: 诱导后。

2.3 融合蛋白发酵条件优化

2.3.1 IPTG 浓度优化

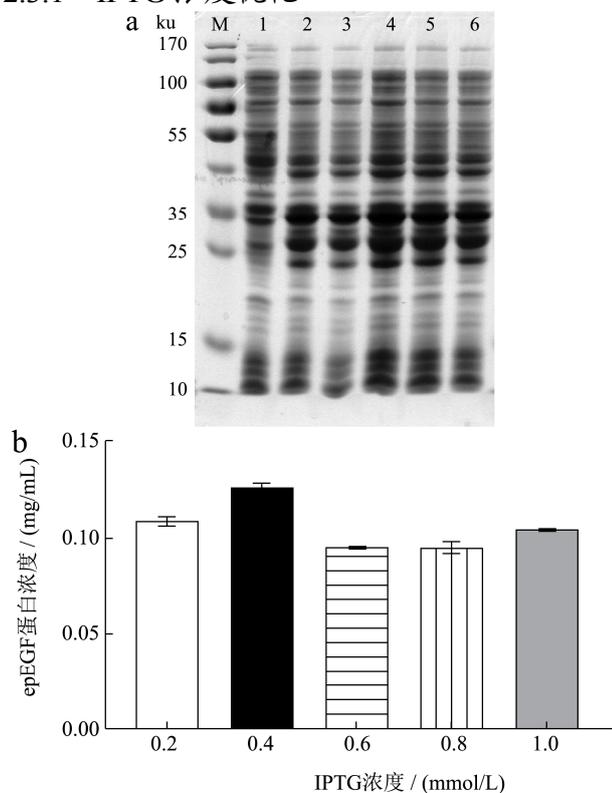


图 4 融合蛋白表达条件中诱导剂浓度的优化

Fig.4 Optimization of inducer concentration in fusion protein expression condition

注: a: 不同浓度 IPTG 下融合蛋白表达 SDS-PAGE 电泳图 (M: 标准蛋白 Marker; 1: 未诱导; 2: IPTG 0.2 mM; 3:

IPTG 0.4 mM; 4: IPTG 0.6 mM; 5: IPTG 0.8 mM; 6: IPTG 1.0 mM); b: 不同浓度 IPTG 下蛋白表达相对含量。

如图 4 所示, 以不加 IPTG 诱导的菌株作对照, 分别在 0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L, 不同浓度的 IPTG 诱导下对重组菌株进行发酵培养, 分析不同浓度下 SDS-PAGE 电泳图, 利用 1.2.6 蛋白浓度计算方法, 计算目的蛋白表达的相对含量; 结果表明, 在其他条件一样的情况下, 当 IPTG 的浓度为 0.4 mmol/L 时, 目的蛋白占总蛋白的含量最高, 约为 0.13 mg/mL。在诱导剂浓度偏高或偏低时, 蛋白表达量均有所降低, 因而认为融合蛋白 epEGF 最适诱导剂浓度为 0.4 mmol/L。

2.3.2 温度优化

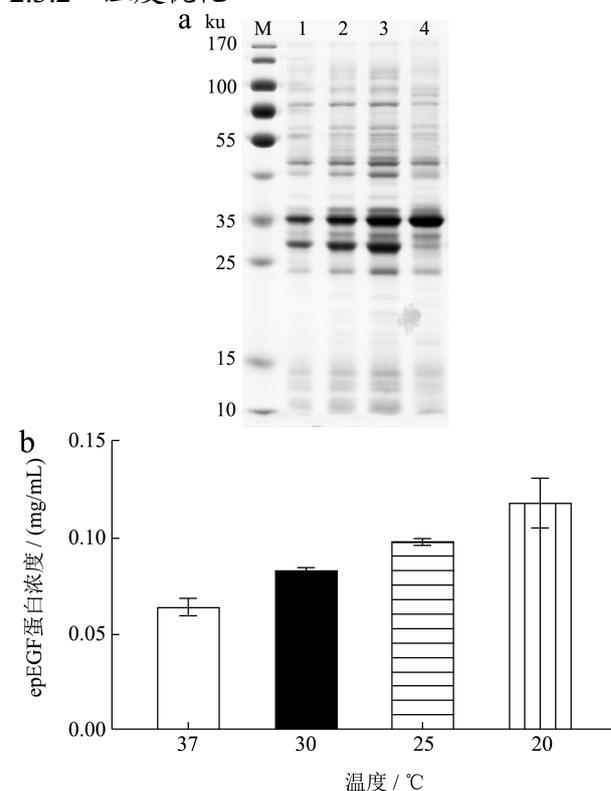


图 5 融合蛋白表达条件中诱导温度的优化

Fig.5 Optimization of induction temperature in fusion protein expression condition

注: a: 不同诱导温度下融合蛋白表达 SDS-PAGE 电泳图 (M: 标准蛋白 Marker; 1: 37 °C 条件下; 2: 30 °C 条件下; 3: 25 °C 条件下; 4: 20 °C 条件下); b: 不同温度下蛋白表达相对含量。

在发酵过程中分别设定不同的诱导温度 (37、30、25、20 °C), 研究温度对工程菌表达目的融合蛋白的影响。结果如图 5 所示, 温度对工程菌表达目的蛋白有影响。当诱导温度设置为 20 °C 时, 蛋白表达量明显高于其他对照组, 此时蛋白含量为 0.12 mg/mL。即工程菌最优表达温度为 20 °C。

2.3.3 培养基优化

选择了 5 种常用的细菌培养基，LB (Luria-Bertani)、SOB (Super Optimal Broth)、SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression)、TB (Terrific Broth)、2×YT (2×YT medium) 来探究培养基对蛋白表达的影响，结果如图 6 所示。使用 TB 与 SOC 后，蛋白表达量较其他培养基有所提高，其中 TB 对蛋白含量的提高最为明显。可能原因是这两种培养基含有葡萄糖，提供更多的碳源，有利于蛋白质的合成，即工程菌 BL21 (DE3) -pGST-epEGF 最适发酵培养基为 TB 培养基。

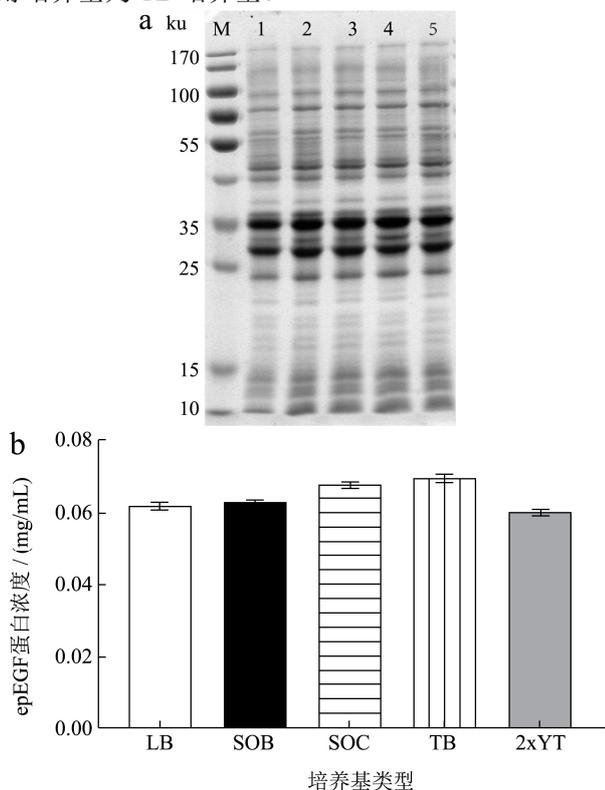


图 6 融合蛋白表达条件中培养基的优化

Fig.6 Optimization of medium under the expression conditions of fusion protein

注: a: 不同培养基下融合蛋白表达 SDS-PAGE 电泳图 (M: 标准蛋白 Marker; 1: LB 液体培养基; 2: SOB 液体培养基; 3: SOC 液体培养基; 4: TB 液体培养基; 5: 2×YT 培养基); b: 不同培养基下蛋白表达相对含量。

2.3.4 诱导时间的优化

在诱导过程中 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h，分别取等量菌体，直接取适量菌体进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 7 所示。在诱导 2 h 时已经有目的蛋白的表达，2 h~8 h 内，随着时间的增加，目的蛋白表达量也在逐步增加，超过 8 h 后，随着时间的增加，

目的蛋白表达量逐渐减少，故确定 8 h 是工程菌最适诱导时间。发酵液目的蛋白最终浓度为 0.12 mg/mL。

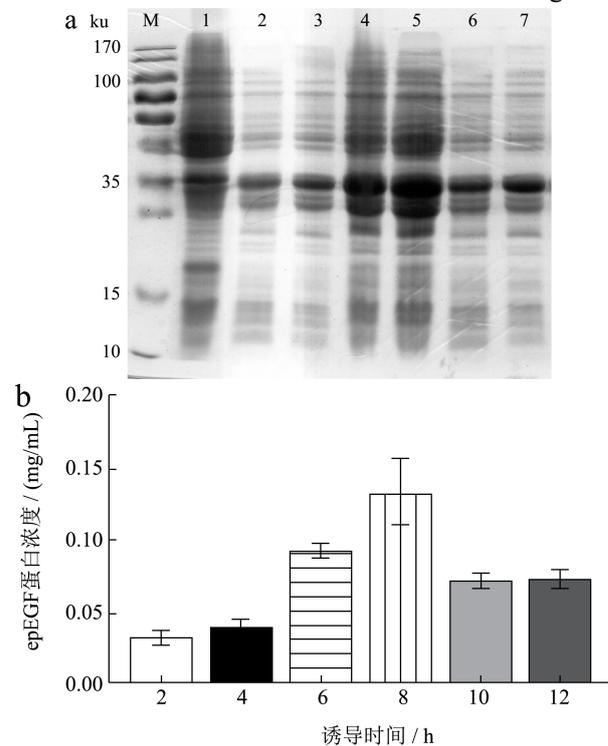


图 7 融合蛋白表达条件中诱导时间的优化

Fig.7 Optimization of induction time in fusion protein expression condition

注: a: 不同时间点融合蛋白表达 SDS-PAGE 电泳图 (M: 标准蛋白 Marker; 1: 0 h; 2: 2 h; 3: 4 h; 4: 6 h; 5: 8 h; 6: 10 h; 7: 12 h); b: 不同时间点蛋白表达相对含量。

2.4 融合蛋白的初步纯化

2.4.1 融合蛋白 GST Focurose 4FF 亲和层析

按照材料与方法 1.2.5 中描述 GST 亲和层析柱操作方案对破碎液上清进行第一步纯化，结果如图 8 所示。上清经 GST 一步纯化，得到目的蛋白纯度为 66.82% (图 8a 融合蛋白表达各个步骤 SDS-PAGE 电泳图，图 8b 为纯化阶段的色谱图穿透峰和洗脱峰如图上箭头所注); 收集洗脱液进行超滤浓缩，置换其中的还原型谷胱甘肽，浓缩后的样品用于融合蛋白的第二步纯化。

2.4.2 融合蛋白阴离子交换层析

超滤浓缩后的样品经 Q Focurose 6HP 阴离子柱纯化后，结果如图 9 所示。从图中可以看出目的蛋白在 0.4 mol/L NaCl 浓度条件下被洗脱下来，利用 Image J 进行灰度扫描，显示纯化后的目的蛋白纯度达到 92.57%。

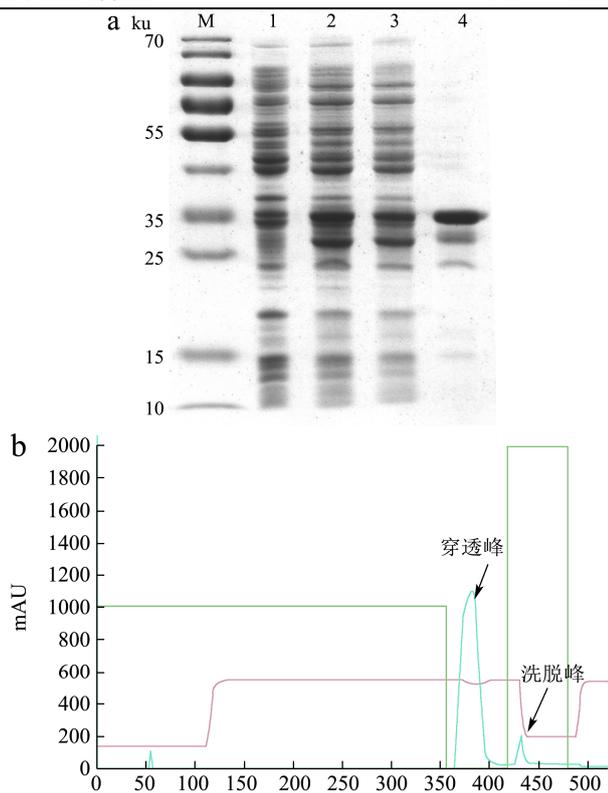


图8 融合蛋白 GST 亲和层析柱纯化结果

Fig.8 Purification results of fusion protein GST by affinity chromatography column

注: a: 融合蛋白表达各个步骤 SDS-PAGE 电泳图 (M: 标准蛋白 Marker; 1: 阴性对照; 2: 破碎液上清; 3: GST 层析柱纯化穿透液; 4: GST 层析柱纯化洗脱液); b: 融合蛋白纯化色谱图。

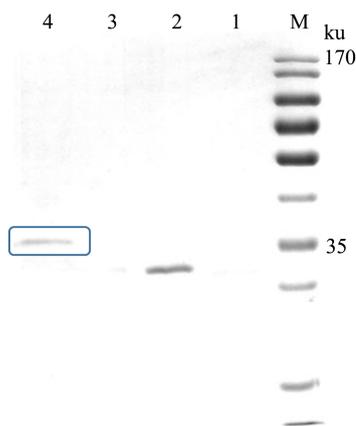


图9 融合蛋白阴离子交换层析柱纯化结果

Fig.9 Purification results of fusion protein on anion exchange chromatography column

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: 0.1 mol/L NaCl 洗脱液; 2: 0.2 mol/L NaCl 洗脱液; 3: 0.3 mol/L NaCl 洗脱液; 4: 0.4 mol/L NaCl 洗脱液。

2.5 讨论

本研究构建重组大肠杆菌 BL21 (DE3) /PGEX-4T1-epEGF, 成功表达可溶性的含有细胞穿膜肽的人表皮生长因子, 通过发酵条件优化, 目的融合蛋白的量可达 0.13 mg/mL。相对黄秉仁等^[25]在酵母中表达的含量 4 mg/L 提高了 32.5 倍, 且表达周期相比酵母系统大大缩短。同样在大肠杆菌中, 甘人宝等^[26]合成 pAE-8 表达质粒, 在大肠杆菌中的表达量为 1.5 mg/L。赵忠良等^[27]也将 EGF 与 GST 标签进行融合表达, 但是其 EGF 的表达量只占细菌总蛋白的 18%, 本研究构建的融合蛋白通过特殊表达载体, 创新性的添加人工合成细胞穿膜肽 Pep-1 融合表达, 利用 tac 启动子表达水平提高到 21.58%。传统分离纯化人表皮生长因子需经过 8 种分离工艺与 2 步柱层析^[16], 本研究中重组蛋白经过 2 步柱层析, 纯度达到 92.57%, 简化了纯化工艺, 大大节约了成本, 为其工业化生产提供了可能。

3 结论

人表皮生长因子 (hEGF) 在皮肤损伤修复中具有显著作用, 获取高产 EGF 的重组基因工程菌成为热门的研究方向。本研究构建了含有穿膜肽的人表皮生长因子, 即重组 Pep-1-hEGF (epEGF), 并在大肠杆菌中成功表达了融合蛋白 GST-epEGF。论文也研究了发酵条件对融合蛋白的影响, 发现最适发酵条件为: IPTG 浓度为 0.4 mmol/L、温度为 20 °C、最适发酵培养基为 TB 液体培养基、诱导时间为 8 h。通过添加 GST 促溶标签与发酵条件优化, 明显提高目的蛋白的可溶性表达, 目的蛋白表达量占总蛋白的 21.58%, 可达 0.13 mg/mL。通过 GST 亲和层析与阴离子交换层析两步纯化后目的蛋白的纯度达到 92.57%。本研究成功实现了人表皮生长因子在大肠杆菌中的可溶性表达, 并对其进行了初步纯化, 后续尝试采用肠激酶处理, 去除 GST 标签, 以便获得更理想的无免疫副作用的人表皮生长因子蛋白。

参考文献

- [1] 曾嵘, 邵晓霞, 夏其昌. 人表皮生长因子肽谱及一级结构的质谱法分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 1: 33-38
ZENG Rong, SHAO Xiaoxia, XIA Qichang. Human epidermal growth factor peptide spectrum and primary structure analysis by mass spectrometry [J]. Journal of Biochemistry and Biophysics, 1999, 1: 33-38
- [2] Cohen, S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum [J]. Proceedings of the National Academy of

- Sciences, 1960, 46(3): 302-311
- [3] Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor [J]. *Nature*, 1975, 257: 325-327
- [4] 吴美玉,阮靖华,钟伯雄.人表皮生长因子的研究进展[J].*生物工程学报*,2020,36(12):2813-2823
WU Meiyu, RUAN Jinghua, ZHONG Boxiong. Progress in human epidermal growth factor research [J]. *Chin J Biotech*, 2020, 36(12): 2813-2823
- [5] 孙浩博,吕国忠.重组人表皮生长因子对深II度烧伤患者创面愈合效果及相关炎症因子水平的影响[J].*中国美容医学*, 2020,29(10):75-78
SUN Haobo, LYU Guozhong. Recombinant human epidermal growth factor in patients with deep II degree burns wounds healing effect and the related factor levels of inflammation [J]. *Chinese Aesthetic Medicine*, 2020, 29(10): 75-78
- [6] Arda-Pirincci P, Bolkent S. The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(1): 167-175
- [7] Gandhi Rádís-baptista, Iana S Campelo, Jean-Étienne R L Morlighem, et al. Cell-penetrating peptides (CPPs): from delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 5(2): 252-255
- [8] ZOU Le, PENG Qi-lin, WANG Ping, et al. Progress in research and application of HIV-1 TAT-derived cell-penetrating peptide [J]. *J Memb Biol*, 2017, 250(2): 115-122
- [9] Kamei N, Aoyama Y, Khafagy E S, et al. Effect of different intestinal conditions on the intermolecular interaction between insulin and cell-penetrating peptide penetratin and on its contribution to stimulation of permeation through intestinal epithelium [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 94: 42-51
- [10] Jun Yu, Chamila Rupasinghe, Jamie L, et al. Targeting receptor tyrosine kinases and their downstream signaling with cell - penetrating peptides in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2015, 85(5): 586-597
- [11] Stalmans S, Bracke N, Wynendaele E, et al. Cell-penetrating peptides selectively cross the blood-brain barrier *in vivo* [J]. *PLoS ONE*, 2017, 10(10): 139-148
- [12] Park J, Ryu J, Jin L H, et al. 9-polylysine protein transduction domain: enhanced penetration efficiency of superoxide dismutase into mammalian cells and skin [J]. *Molecules and Cells*, 2002, 13(2): 202-204
- [13] GUO Huifang, HU Fengrui, LI Kang, et al. Expression, purification and functional identification of the modified hEGF protein [J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 179: 105-111
- [14] 梁英民,孙强,蒋姗姗,等.带有蛋白转导结构域的Bcr/Abl癌蛋白片段的表达及其跨膜转运[J].*中国生物化学与分子生物学报*,2001,22(5):574-578
LIANG Yingmin, SUN Qiang, JIANG Shanshan, et al. Expression of Bcr/Abl oncoprotein fragment with protein transduction domain and its transmembrane transport [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 22(5): 574-578
- [15] 余婷玉,方志远,黄卫,等.穿膜肽标记的荧光素酶蛋白在大肠杆菌中表达条件的优化及其活性研究[J].*实验技术与管理*,2018,35(2):62-66
YU Tingyu, FANG Zhiyuan, HUANG Wei, et al. Optimization of expression conditions and activity of transmembrane peptide-labeled luciferase protein in *E. coli* [J]. *Experimental Technology and Management*, 2018, 35(2): 62-66
- [16] 王武康,陈屏,张亚男,等.从尿中分离制备人表皮生长因子[J].*中国生化药物杂志*,2003,2:86-87
WANG Wukang, CHEN Ping, ZHANG Yanan, et al. Isolation and production of human epidermal growth factor from urine [J]. *Chinese Journal of Biochemical Medicine*, 2003, 2: 86-87
- [17] Shams D, Alizadeh M, Azari S, et al. High expression level of human epidermal growth factor (hEGF) using a well-designed fusion protein-tagged construct in *E. coli* [J]. *Bratislava Medical Journal* 2019, 120: 757-763
- [18] Qingshou Yao, Zipeng Yu, Pu Liu, et al. High efficient expression and purification of human epidermal growth factor in *Arachis hypogaea* L [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8): 2045-2056
- [19] Eissazadeh S, Moeini H, Dezfouli M G, et al. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris* [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, 48(2): 286-293
- [20] Bienert M, Hoss M, Bartneck M, et al. Growth factor-functionalized silk membranes support wound healing *in vitro* [J]. *Biomed Mater*, 2017, 12(4): 5023-5034

(下转第 260 页)