

## 重组猪乳铁蛋白 N 端的高效表达及抑菌活性检测

哈卓<sup>1</sup>, 赵丽丽<sup>1</sup>, 于晓旭<sup>2</sup>, 宗晓淋<sup>3</sup>, 毛雅元<sup>1</sup>, 张健<sup>1</sup>, 李一经<sup>1</sup>, 葛俊伟<sup>1</sup>, 乔薪瑗<sup>1</sup>, 唐丽杰<sup>3</sup>

1 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030  
2 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030  
3 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** 为获得表达猪乳铁蛋白基因的重组菌株, 并检测其表达的重组猪乳铁蛋白抑菌活性, 应用 RT-PCR 方法从泌乳 3 d 后母猪乳腺组织中扩增了猪乳铁蛋白 N 端 1077 bp 的 PLF-N 基因片段, 与 GenBank 上发表的 4 株猪乳铁蛋白基因序列相比, 核苷酸同源性均达到 99% 以上。为了得到高表达量的 PLF-N 基因, 以扩增的 PLF-N 片段为参考模板, 经过密码子优化, 全基因合成了编码猪乳铁蛋白 N 端的基因 PLF-NS。将其定向插入到原核表达载体 pET-30b 中, 转化大肠杆菌 BL21, 获得了表达 PLF-NS 的重组菌 pET-PLF-NS/BL21; 经 IPTG 诱导, 并对表达条件进行优化, 以及通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析均表明猪乳铁蛋白得到了正确表达, 其产物分子量约为 42 kDa, 最优表达条件下蛋白表达量占菌体总蛋白的 32%, 表达产物以包涵体形式存在。包涵体经裂解、纯化、复性处理后纯度达到 98%。用琼脂孔穴扩散抑菌法检测表明重组猪乳铁蛋白具有明显的抑菌作用。表明通过基因优化对表达量低的基因进行改造使之高效表达, 是一种提高表达效率的有效手段。

**关键词:** 猪乳铁蛋白, 基因优化, 高效表达, 抑菌活性

## High-level expression and antimicrobial activity of recombinant N-terminal porcine lactoferrin

Zhuo Ha<sup>1</sup>, Lili Zhao<sup>1</sup>, Xiaoxu Yu<sup>2</sup>, Xiaolin Zong<sup>3</sup>, Yayuan Mao<sup>1</sup>, Jian Zhang<sup>1</sup>, Yijing Li<sup>1</sup>, Junwei Ge<sup>1</sup>, Xinyuan Qiao<sup>1</sup>, and Lijie Tang<sup>3</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China  
2 College of Resources and Environmental Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China  
3 College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** Lactoferrin in milk is a multifunctional protein. In addition, lactoferrin has antiviral, antifungal and antiparasitic activity. In this study, the N-terminus from porcine lactoferrin (PLF-N) was designed to express the antimicrobial action of recombinant porcine lactoferrin. We cloned a 1077 bp fragment of the PLF gene from mammary gland tissue of the lactating sow at the third day. Comparing nucleotide sequence with four strains of PLF gene published on GenBank, the homology was more than 99%. With the reference template of the cloned fragment of PLF-N and optimizing codon bias, we synthesized the gene of N-terminus encoding porcine lactoferrin (PLF-NS). The high expression gene of PLF-NS was cloned into the fusion expression

**Received:** January 2, 2010; **Accepted:** March 9, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30871809), President Foundation of Northeast Agricultural University.

**Corresponding author:** Lijie Tang. Tel: +86-451-55190321; Fax: +86-451-55190413; E-mail: tanglijie@neau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30871809), 东北农业大学校长基金资助。

vector pET30b and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). After induced with Isopropyl  $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG), the target fusion protein was successfully expressed and identified in inclusion bodies by SDS-PAGE and Western blotting. The protein had a molecular weight of 42 kDa and accounted for 32% of the total cellular protein. After purification and renaturation, the purity of the expressed protein was 98%. The expressed PLF-NS protein showed obviously antibacterial activity. This method provides an excellent way for high expression of antimicrobial proteins when optimizing codon bias.

**Keywords:** porcine lactoferrin, codon optimization, high expression, antimicrobial activity

乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 是一种天然活性铁离子结合糖蛋白, 分子量约为 80 kDa, 广泛存在于动物的乳汁 (初乳)、血液、唾液、小肠液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中<sup>[1-3]</sup>。乳铁蛋白是一种具有多种生物学功能的蛋白质, 它不仅参与铁的转运, 而且具有抗微生物、调节免疫系统等功能<sup>[4-7]</sup>。LF 对细菌生长的抑制作用被认为是清除介质中的铁, 由于细菌需要铁离子以维持生长, 因此乳铁蛋白在结合铁离子的同时起到了抑制需铁细菌的生长, 进而导致病原菌死亡<sup>[8]</sup>。在一个乳铁蛋白分子中含有 2 个铁结合位点, 它包括 2 个结构相似的叶片状结构, 分别被命名为 N-叶和 C-叶, 2 个叶片被一条短肽链连接<sup>[9]</sup>。乳铁蛋白肽是乳铁蛋白在酸性环境条件下经胃蛋白酶水解的一段小肽, 位于乳铁蛋白的 N-叶, 它具有比乳铁蛋白更强的抗菌活性<sup>[10-11]</sup>, 许多研究表明, 乳铁蛋白的生物学性都与 N-叶密切相关<sup>[12]</sup>。

本研究利用 RT-PCR 方法, 从猪的乳腺组织中扩增出猪乳铁蛋白 N-叶基因, 以此为参考模板, 重新优化设计并合成了猪乳铁蛋白 N-叶片段, 插入到原核表达载体 pET-30b 中, 得到高效表达, 并进行了包涵体的裂解、纯化和复性, 得到了具有抑菌活性的重组猪乳铁蛋白, 为进一步研究其抗病毒和免疫调节功能提供了物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种及主要试剂

表达体质粒 pET-30b 和大肠杆菌 JM109 及 BL21(DE3) 均由本实验室保存。金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CVCC25923 株和大肠杆菌 *Escherichia coli* CVCC10141 株购于中国兽医药品监察所, 益生菌干酪乳杆菌 ATCC393 株由荷兰 NIZO 研究所惠赠。

少量 DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自

上海华舜生物工程有限公司。限制性内切酶及 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。针对 His 标签的单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。

### 1.2 猪乳铁蛋白基因的扩增和基因优化

#### 1.2.1 引物设计

根据 GenBank 登录的猪乳铁蛋白基因序列, 在其可读框两侧设计一对引物, 上游引物 P1:5'-GGATCCAATGAAGCTCTTCATCCC-3' 和下游引物 P2:5'-CTCGAGCTTCGCCTGCCGCGC-3' 分别含有 BamH I 酶切位点、Xho I 酶切位点 (下划线标示), 由上海生物工程有限公司合成。

#### 1.2.2 猪乳铁蛋白 RNA 的提取与基因扩增

取泌乳 3 d 的长白猪乳腺组织在液氮中研磨成粉末, 按照每 50~100 mg 组织加入 1 mL Trizol 液裂解乳腺组织细胞, 以氯仿、异丙醇抽提乳腺组织中的总 RNA, 在以 P1 为引物进行逆转录后, 再以 P1 和 P2 为引物通过 PCR 方法扩增出 1077 bp 的 PLF-N 基因片段。将其经胶回收纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 经质粒提取后进行酶切及 PCR 鉴定, 获得阳性重组质粒, 命名为 pMD-PLF-N, 送上海生物工程有限公司进行测序鉴定。

#### 1.2.3 基因的优化设计与合成

以 1.2.2 中应用 RT-PCR 方法扩增的 PLF-N 基因为参照序列, 利用在线软件, 将序列中的稀有密码子改为大肠杆菌优势密码子, 优化了密码子适应性指数, 根据已报道文献, 将密码子改为利于大肠杆菌表达的密码子<sup>[13]</sup>, 重新设计并合成了优化后的猪乳铁蛋白 PLF-NS 基因。

### 1.3 表达猪乳铁蛋白 PLF-NS 基因和 PLF-N 基因重组菌的构建

将 PLF-NS 基因、PLF-N 基因和原核表达载体

pET-30b 质粒, 分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 胶回收纯化试剂盒回收目的基因, 经 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。挑取单个菌落提取质粒, 经酶切、PCR 鉴定后, 获得含有阳性重组质粒的菌株, 分别命名为 pET-PLF-NS/BL21(DE3) 和 pET-PLF-N/BL21(DE3)。

#### 1.4 基因表达条件的优化和表达产物的鉴定

##### 1.4.1 表达条件的选择及优化前后表达量的比较

为了获得重组蛋白的最佳表达量, 取少量重组菌种 pET-PLF-NS/BL21(DE3)过夜培养, 按 1:100 比例接种于 100 mL 含氨苄青霉素 100 mg/L LB 培养基中, 培养至  $OD_{600}$  在 0.4~0.6 之间时, 分别于 28℃、32℃、37℃ 条件下以 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 在诱导后的 6 h 内, 每隔 1 h 取样进行 SDS-PAGE 分析, 确定最佳表达条件, 用 BandScan 软件分析重组蛋白表达量, 并在相同条件下对未优化的重组菌 pET-PLF-N/BL21(DE3) 诱导表达, 比较优化前后重组蛋白表达量的变化。

##### 1.4.2 融合蛋白的表达形式分析及 Western blotting 鉴定

诱导后菌液经超声波破碎后, 在 4℃ 下, 10 000×g 离心 10 min, 上清和沉淀同时进行 SDS-PAGE 分析。同时将诱导前和诱导后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到硝酸纤维素膜上, 以针对 His 标签的单克隆抗体为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blotting 分析确定蛋白的表达。

#### 1.5 重组蛋白表达产物的纯化及复性

收集诱导后的表达菌体, 重悬于 PBS (pH 7.4) 缓冲液中, 加入溶菌酶, 37℃ 作用 30 min 后, 置冰浴中超声裂解, 功率 300 W, 3 s/次, 间隔时间 3 s, 至不再粘稠。4℃、10 000×g 离心 10 min, 用溶液 I (0.01 mol/L Tris, 0.1 mol/L NaCl, 2 mol/L 尿素) 重悬沉淀, 8 000×g 离心 10 min, 再加入溶液 II (0.01 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 4 mol/L 尿素) 重悬沉淀, 8 000×g 离心 10 min, 收集上清液, 得到初步纯化的包涵体, -20℃ 保存备用。

将上述包涵体溶解到裂解液中 (0.01 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素)。4℃ 下磁

力搅拌器溶解过夜。采用亲和层析法纯化表达蛋白, 参照 Qiagen 公司镍离子亲和层析柱 ( $Ni^{2+}$ -NTA) 操作说明进行, 在洗脱液中加入 0.1% Triton-100 和 10% 丙三醇加以改进。

将纯化后的蛋白进行尿素梯度透析复性, 依次在含有 6、5、4、3、2.5、2、1.5、1.0、0.5 和 0 mol/L 尿素的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含有 20 mmol/L 巯基乙醇, 0.3 mol/L NaCl, 10% 丙三醇, pH 9.0) 中透析各 4 h (4℃), 将裂解液中的尿素替换出来。通过 SDS-PAGE 及 BandScan 软件检测纯化后的样品纯度。

#### 1.6 重组蛋白的抑菌活性检测

重组蛋白的抑菌活性检测采用琼脂孔穴扩散抑菌圈法<sup>[14]</sup>, 将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌接种到 5 mL LB 中, 37℃ 摇床培养至对数生长期。乳杆菌接种于 5 mL MRS 培养基中, 37℃ 静止培养至对数生长期。取 10 μL 细菌培养液加入到 1 mL 的培养基中混匀, 涂于琼脂平板, 待菌液稍干后, 放置牛津杯, 加入 200 μL 复性超滤浓缩的 1 g/L 重组蛋白, 对照采用最后一次透析液, 拍照观察并测定清晰的抑菌圈直径。

取灭菌的干净试管 10 支, 分成两组, 每组 5 支, 编号 1~5, 然后将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养至对数生长期, 再将其稀释至  $10^5$ /mL, 每支试管中加入 0.5 mL。再向第一支试管中加入 0.5 mL 超滤浓缩的重组蛋白, 混匀后取 0.5 mL 加入到第二支试管中, 同样的方法一直稀释到第五支试管中, 1~5 管中重组蛋白的浓度分别 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 g/L, 37℃ 作用 18 h, 观察细菌生长状况, 确定 MIC 值<sup>[15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pMD-PLF-N 的鉴定

重组质粒 pMD-PLF-N 用 *Bam*H I 或 *Xho* I 单酶切后得到大小约为 3.6 kb 的基因片段, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后得到大小约为 1.0 kb 和 2.6 kb 基因片段, 以 P1/P2 为引物进行 PCR 扩增, 得到约为 1.0 kb 基因片段, 与预计大小相符合。表明 PLF-N

基因片段插入到克隆载体 pMD18-T 中。

测序结果表明获得大小为 1.0 kb 的 PLF-N 基因与预期相符, 通过与 GenBank 上已发表的序列相比对, 结果表明本研究获得的长白猪 PLF-N 基因与 GenBank 序列 AY306198.1、M81327.1、L77887.1 及 M92089.1 的核苷酸同源性分别达 99.16%、99.07%、99.63% 和 99.35%, 可见 PLF-N 基因在核苷酸序列上高度保守。

## 2.2 基因优化

将序列中的稀有密码子换成有利于大肠杆菌表达的优势密码子, 使全基因的密码子适应性指数由原来的 0.2 提高到 0.5, 优化后的基因序列和对应的氨基酸序列如图 1。

## 2.3 重组表达载体的鉴定

挑取单菌落过夜培养, 提取质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 单、双酶切和 PCR 鉴定均表明与预期大小的核酸片段相一致。将鉴定正确的阳性质粒转化到表达菌 BL21(DE3) 中, 获得重组菌株 pET-PLF-NS/BL21(DE3) 和 pET-PLF-N/BL21(DE3)。

## 2.4 蛋白的诱导表达

对重组菌的最佳表达条件研究, 结果表明基因优化后的重组菌在 28℃ 诱导 3 h 表达量最大, 相对分子质量约为 42 kDa (图 2), 经薄层扫描分析表明目的蛋白表达量可占菌体总蛋白的 32%。而野生型重组菌蛋白表达量较低, 表明通过基因优化明显提高了重组蛋白的表达量。

```

ATG AAA CTG TTT ATT CCG GCC CTG TTG TTT CTG GGC ACC CTG GGT CTG TGC
M K L F I P A L L F L G T L G L C
CTG GCG GCC CCG AAG AAA GGC GTT CGC TGG TGC GTT ATT AGC ACC GCC GAA
L A A P K K G V R W C V I S T A E
TAT AGC AAA TGC CGC CAG TGG CAG AGC AAA ATT CGC CGT ACC AAT CCG ATT
Y S K C R Q W Q S K I R R T N P I
TTT TGC ATT CGC CGT GCC AGC CCG ACC GAT TGC ATT CGC GCC ATT GCG GCC
F C I R R A S P T D C I R A I A A
AAA CGC GCC GAT GCC GTT ACC CTG GAT GGT GGC CTG GTT TTT GAA GCC GGT
K R A D A V T L D G G L V F E A G
CAG TAT AAA CTG CGC CCG GTT GCC GCG GAA GTT TAT GGT ACC GAA GAG
Q Y K L R P V A A E V Y G T E E
AAC CCG CAG ACC TAT TAC TAT GCC GTT GCC GTT GTG AAG AAA GGT TTT AAT
N P Q T Y Y Y A V A V V K K G F N
TTT CAG CTG AAC CAG CTG CAG GGC CGC AAA AGC TGC CAT ACC GGC CTG GGC
F Q L N Q L Q G R K S C H T G L G
CGC AGC GCC GGT TGG AAC ATT CCG ATT GGT CTG TTG CGC CGT TTT CTG GAT
R S A G W N I P I G L L R R F L D
TGG GCC GGT CCA CCG GAA CCG CTG CAG AAA GCC GTT GCC AAA CTG TTT AGC
W A G P P E P L Q K A V A K L F S
CAG AGC TGC GTT CCG TGC GCC GAT GGT AAC GCC TAT CCG AAC CTG TGC CAG
Q S C V P C A D G N A Y P N L C Q
CTG TGC ATT GGC AAA GGT AAA GAT AAA TGC GCC TGT AGC AGT CAG GAA
L C I G K G K D K C A C S S Q E
CCG TAT TTT GGT TAT AGC GGT GCC TTT AAC TGT CTG CAT AAA GGC ATT GGT
P Y F G Y S G A F N C L H K G I G
GAT GTG GCC TTT GTT AAA GAA AGC ACC GTG TTT GAA AAC CTG CCG CAG AAA
D V A F V K E S T V F E N L P Q K
GCC GAT CGC AAC AAA TAT GAA CTG TTG TGC CCG GAT AAC ACC CGC AAA CCG
A D R N K Y E L L C P D N T R K P
GTT GAA GCC TTT CGC GAA TGC CAT CTT GCC CGC GTT CCG AGC CAT GCC GTT
V E A F R E C H L A R V P S H A V
VTG GCC CGC AGC GTG AAT GGT AAA GAA AAC AGC ATT TGG GAA CTG TTG TAT
V A R S V N G K E N S I W E L L Y
CAG AGC CAG AAA AAG TTT GGC AAA AGC AAT CCG CAG GAA TTT CAG CTG TTT
Q S Q K K F G K S N P Q E F Q L F
GGC AGC CCG GGC CAA CAG AAA GAT TTG CTG TTT CGC GAT GCC ACC ATT GGC
G S P G Q Q K D L L F R D A T I G
TTT CTG AAG ATT CCG AGC AAA ATT GAT AGC AAA CTG TAT CTG GGT CTG CCG
F L K I P S K I D S K L Y L G L P
TAT CTG ACC GCC ATT CAG GGC CTG
Y L T A I Q G L

```

图 1 优化后的基因序列和对应的氨基酸序列

Fig. 1 Optimized gene sequence and its deduced amino acid sequence.

## 2.5 重组蛋白表达产物的 Western blotting 鉴定

由于 pET-30b 为表达载体所表达的融合蛋白带 His 标签, 以针对 His 标签的单克隆抗体为一抗和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blotting 分析在 42 kDa 位置出现了特异的反应带, 说明目的蛋白得到了表达 (图 3)。

## 2.6 重组蛋白的纯化与复性

通过 SDS-PAGE 分析, 上清液中未检测到目的蛋白, 发现目的蛋白存在于沉淀中, 说明该目的蛋白以包涵体形式存在。经包涵体提取、镍离子亲和层析柱纯化变性的融合蛋白, 得到了纯化后的重组蛋白 (图 4)。经 BandScan 软件分析, 蛋白的纯度达到 98% 以上。

## 2.7 重组 PLF-NS 蛋白的抑菌活性检测

抑菌试验表明, 重组蛋白对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌作用, 对大肠杆菌的抑菌作用较弱, 而对益生菌干酪乳杆菌没有观察到抑菌作用 (图 5)。

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 13 mm 和 6 mm。对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 1.0 g/L, 对大肠杆菌的最小抑菌浓度大于 2.0 g/L。

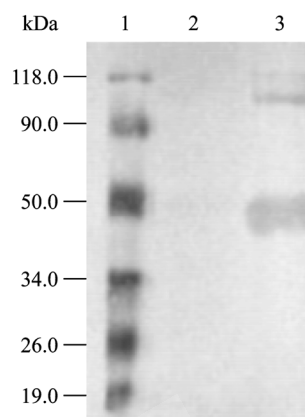


图 3 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of recombinant protein PLF-NS. 1: protein molecular weight marker; 2: non-induced expression of pET-PLF-NS in *E. coli* BL21(DE3); 3: induced expression of pET-PLF-NS in *E. coli* BL21(DE3).

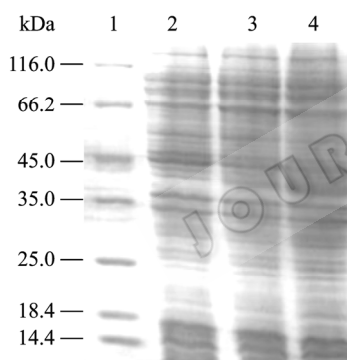


图 2 重组菌诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of induced recombinant strain. 1: protein molecular weight marker; 2: non-induced expression of pET-PLF in *E. coli* BL21(DE3); 3: expression of wild-type gene in *E. coli* BL21(DE3) induced for 3 h; 4: expression of optimized gene in *E. coli* BL21(DE3) induced for 3 h.

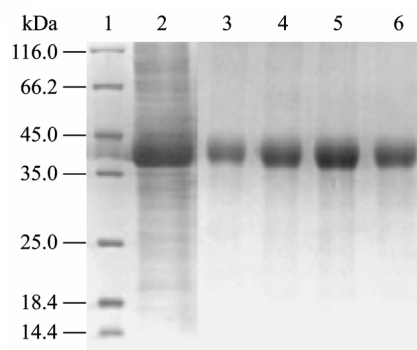


图 4 包涵体和纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the inclusion and purified fusion protein. 1: protein molecular weight marker; 2: inclusion body of recombinant strain pET-PLF-NS/BL21(DE3); 3-6: purified fusion protein of inclusion body from recombinant strain pET-PLF-NS/BL21(DE3).

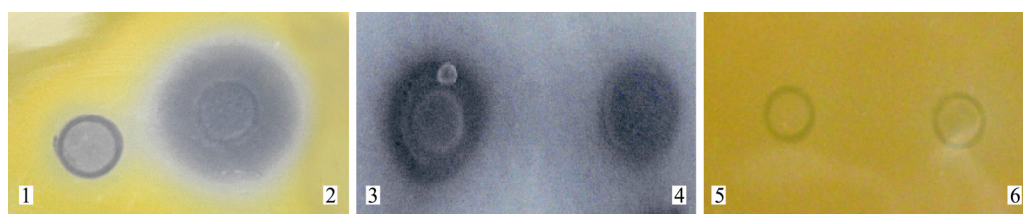


图 5 重组 PLF-NS 蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和益生菌干酪乳杆菌的抑菌活性

Fig. 5 Antimicrobial activities of recombinant PLF-NS to *S. aureus* CVCC25923, *E. coli* CVCC10141 and *L. casei* ATCC393. 1, 4, 6: control assay; 2: *S. aureus* CVCC25923; 3: *E. coli* CVCC10141; 5: *L. casei* ATCC393.

### 3 讨论

由于传统的乳铁蛋白分离从初乳中进行提取纯化工艺繁琐、价格昂贵,利用基因工程方法生产乳铁蛋白显得尤为重要。大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早,目前应用最广泛的经典表达系统,具有遗传背景清楚、目的基因表达水平高、培养周期短、抗污染能力强等特点<sup>[16]</sup>。但利用大肠杆菌表达系统进行表达时,往往会遇到外源蛋白的低表达或不表达<sup>[17]</sup>,在进行本研究时就遇到了蛋白表达水平低的问题,所以为了得到高水平表达的蛋白进行了基因的优化,主要对密码子的偏爱性、密码子适应指数、串联密码子对进行了分析,在保证氨基酸不变的情况下,利用在线软件对基因进行改进,和未改进前相比明显提高了蛋白的表达量。结果证明通过基因优化的方式对表达量低或不表达的基因进行改造使之高效表达是一种提高表达效率的有效手段。

pET 系统是现今原核表达方面使用最广泛的系统,本实验所选用的 pET-30b 载体受强噬菌体 T7 转录及翻译信号控制,表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导,充分诱导时,几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白<sup>[18]</sup>。载体中含有 His 标签,可以用亲和层析方法纯化融合蛋白。通过对表达条件的优化,表达蛋白可达到全菌体的 32%。由 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析,特异性条带所处的位置分子量大约为 42 kDa,与理论计算的分子量相一致,直接证明了 PLF-N 可读框的完整性。在生产中考虑到蛋白酶的价格昂贵,本实验使用 pET-30b 载体,由于融合标签小,表达产物经纯化复性后无需进行标签的切除,就可以得到具有生物学活性的猪乳铁蛋白。

在纯化过程中出现了蛋白的聚集,严重影响了纯化效率,后经过加入 0.1% Triton-100 和 10% 丙三醇避免了蛋白的聚集,大大提高了纯化效率。采用尿素梯度透析的复性方法,由于蛋白的浓度和复性液的 pH 值对蛋白复性的好坏起着决定性的影响,当蛋白浓度过高时几乎所有的蛋白都发生了聚集,复性缓冲液的 pH 值必须在 7.0 以上,这样可以防止

自由硫醇的质子化作用影响正确配对的二硫键的形成,过高或过低会降低复性效率<sup>[19]</sup>,所以本研究尝试了不同的初始蛋白浓度和不同的 pH 值,最后确定蛋白浓度为 0.1~0.2 mol/L, pH 值为 9.0 时,蛋白得率最高。

体外抑菌试验发现猪乳铁蛋白对革兰氏阳性金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性大肠杆菌均有抑菌作用,而对益生菌乳酸菌无抑菌作用;其中尤以对金黄色葡萄球菌抑菌作用明显,反映出猪乳铁蛋白与其他乳铁蛋白一样,在抗菌活性作用上均表现为对革兰氏阳性菌抑制作用比革兰氏阴性菌要明显些。这可能与 G<sup>+</sup>菌和 G<sup>-</sup>菌的细胞膜构成差异有关,乳铁蛋白结合到细胞膜上,引起细胞膜的变化方式或者程度有可能不同,从而产生抑菌活性的差异。有关重组猪乳铁蛋白的其他生物学功能将有待于进一步研究。本试验获得重组猪乳铁蛋白的高效表达也为生物功能蛋白通过基因优化获得高效表达提供参考,为基因工程重组猪乳铁蛋白在生产应用中奠定基础。

### REFERENCES

- [1] Rey MW, Worldshuk SL, DeBeor HA, *et al.* Complete nucleotide sequence of human. *Nucleic Acid Res*, 1990, **18**(17): 5288-5289.
- [2] Johansson B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand*, 1960, **14**: 510-512.
- [3] Montreuil J, Tonnelat J, Mullet S. Preparation and properties of lacto-transferrin of human milk. *Biochim Biophys Acta*, 1960, **45**: 413-421.
- [4] Bluard-Deconinck JM, Masson PL, Osinski PA, *et al.* Amino acid sequence of cystic peptides of lactoferrin and demonstration of similarities between lactoferrin and transferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **365**(2): 311-317.
- [5] Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*, 2003, **40**: 395-405.
- [6] Elizabeth JD. Antibiotic properties of bovine Lf on helicobacter pylori. *Digest Dis Sci*, 1998, **43**(12): 2573-2812.
- [7] Britigan BE, Lewis TS, Waldshmidt M, *et al.* Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their

- immunostimulatory effects on human B cells. *J Immunol*, 2001, **167**: 2921–2928.
- [8] Reyes RE, Manjarrez HA, Drago ME. El hierro and la virulencia bacteriana. *Enf Inf Microbiol*, 2005, **25**: 104–107.
- [9] Anderson BF, Baker HM, Norris GE, *et al.* Structure of human lactoferricin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1989, **209**: 711–734.
- [10] Dionysius DA, Milne JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J Dairy Sci*, 1997, **80**(4): 667–674.
- [11] Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, *et al.* Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1121**(2): 130–136.
- [12] Nakamura I, Watanabe A, Tsunemitsu H, *et al.* Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Expr Purif*, 2001, **21**(3): 424–431.
- [13] Svetlana B, Georgi C, Ivan I. Codon pairs in the genome of *Escherichia coli*. *Bioinformatic*, 2003, **19**(18): 987–998.
- [14] Bu XJ, Du XJ, Zhou WJ, *et al.* Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(5): 723–732.  
卜兴江, 杜欣军, 周文杰, 等. 中国明对虾溶菌酶基因克隆、重组表达与性质分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(5): 723–732.
- [15] Xu SY, Chen X. *Pharmaco-experiment Methodology*. Beijing: People's Health Press, 2001: 797–889.  
徐叔云, 陈修. *药理实验方法学*. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 797–889.
- [16] Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, **12**(2): 195–201.
- [17] Grantham R, Gautier C, Gouy M, *et al.* Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**: 49–62.
- [18] Novagen. pET System Manual. 9th ed. 2000.
- [19] Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein refolding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*, 1996, **5**(3): 517–523.

JOURNALS.IM.PEER