

# 大腹园蛛次壶腹腺丝的表达

杨子江, 陈格飞, 孟清

东华大学生物科学与技术研究所, 上海 201620

杨子江, 陈格飞, 孟清. 大腹园蛛次壶腹腺丝的表达. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1323-1331.

Yang ZJ, Chen GF, Meng Q. Expression of *Araneus ventricosus* minor ampullate spidroin. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1323-1331.

**摘要:** 基于大腹园蛛次壶腹腺丝 Minor Ampullate Spidroin 全长编码基因最新报道, 研究了该基因的表达。利用 PCR 扩增该基因重复区一段长 1 348 bp 的片段 P1, 融合 his-tag 标签, 构建酵母表达载体, 在毕赤酵母菌 GS115 进行表达。同时构建大肠杆菌表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果表明, P1 在两种表达系统中均可实现表达。研究结果显示: P1 在 GS115 中的表达经优化后产量、产率有较大提高, 且远高于 BL21(DE3) 中的表达, 相应的纯化效率 GS115 也远高于对照 BL21(DE3) 的表达。研究表明酵母表达系统更适合重复度高、且富含 Gly/Ala 的天然蛛丝蛋白基因的表达, 为表达全长天然 MiSp 编码序列提供前期实验基础, 也为大规模蛛丝蛋白的重组表达建立了平台。

**关键词:** 次壶腹腺丝蛋白, 毕赤酵母表达系统, 大肠杆菌表达系统

## Expression of *Araneus ventricosus* minor ampullate spidroin

Zijiang Yang, Gefei Chen, and Qing Meng

Institute of Biological Science and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China

**Abstract:** A repetitive DNA fragment, named P1, was amplified by PCR with the full-length Minor Ampullate Spidroin gene sequence of *Araneus ventricosus* as template. P1 was ligated with pPic3.5 and PKT expression vectors and transferred into GS115 and BL21(DE3) competence cells, respectively. SDS-PAGE and Western blot were used to analyze the

**Received:** January 20, 2013; **Accepted:** March 22, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31070698), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA03Z451), Science and Technology Commission of Shanghai Key Project of Basic Research (No. 10JC1400300), Doctoral Science Fund Project of the Ministry of Education of China (No. 20120075110007).

**Corresponding author:** Qing Meng. Tel: +86-21-67792737; E-mail: Mengqing@dhu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31070698), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA03Z451), 上海市科委基础研究重点项目 (No. 10JC1400300), 教育部博士点基金项目 (No. 20120075110007) 资助。

网络出版时间: 2013-06-09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130609.0854.001.html>

recombinant his-tag fusion protein. With expressed in different expression systems, soluble P1 induced proteins could be obtained as the same size. Furthermore, the expression level and purification recovery efficiency were also higher in GS115 than that of BL21(DE3). Additionally, the expression level could be improved after optimizing the incubation and induction conditions of GS115. In this research, *Pichia pastoris* expression system is more suitable for the native repetitive Gly/Ala-rich spider spidroin gene sequence expression than *Escherichia coli* system. The data can help the native full-length MiSp gene expression and large-scale exploitation of recombinant of spider silk proteins.

**Keywords:** minor ampullate spidroin, *Escherichia coli* system, *Pichia pastoris* system

蜘蛛丝 (Spider silk) 是一种天然蛋白质纤维, 材料学特性卓越<sup>[1-2]</sup>, 作为一种生物大分子多聚物, 易于生物降解且具有良好的生物兼容性, 被越来越多地用于药载运输和细胞组织工程等多方领域<sup>[3-6]</sup>。蜘蛛可分泌 6 种蛛丝纤维, 其中次壶腹腺丝 (又称临时捕获丝) 主要用于加固蛛网和捕猎等, 具有和牵引丝相似的优良材料学性能, 但不同的是, 在水环境中临时捕获丝不发生超收缩现象, 这一特点使其具有特殊的应用价值<sup>[6-9]</sup>。

现今, 蛛丝蛋白的研究多以牵引丝 (Major ampullate silk) 和鞭毛状丝 (Flagelliform) 为主, 主要通过其特征模块的改造和拼接, 表达出串联的重组蛛丝蛋白, 进行相关方面的研究<sup>[10-13]</sup>。而这些重组蛛丝远远缺失了天然蛛丝的性质及研究价值, 如何实现仿生蛛丝的表达是当今首要解决的问题。自 1997 起科学家就开始尝试采用各类系统表达蛛丝蛋白, 包括大肠杆菌、酵母、昆虫、烟草、老鼠以及山羊等<sup>[2,14]</sup>。由于蛛丝蛋白序列重复度高且甘氨酸 (Glycine) 和丙氨酸 (Alanine) 含量高 (高于 60%), 导致表达中容易出现特殊的 mRNA 二级结构、转录不完全和翻译提前终止等现象, 因而常出现表达量低、产物可溶性差、大小不均一等结果, 到目前为止, 尚没有一个合适的表达系统可用于蛛丝蛋白的大

规模生产。

近期, 世界上首次报道了大腹园蛛 *Araneus ventricosus* 临时捕获丝蛋白 (Minor ampullate spidroin, MiSp) 全长编码基因序列, 该蛋白序列富含 Gly 和 Ala (约为 64%), 且主要由 GX、GXX、GXXX 和 poly-A 等重复模块组成<sup>[15]</sup>。为 *A. ventricosus* MiSp 全序列以及其他蛛丝蛋白基因的表达, 寻求合适的表达系统, 本研究以大肠杆菌 BL21(DE3) 的表达为参照, 在毕赤酵母 GS115 中首次尝试了 MiSp 重复编码区的部分序列的表达。该序列长 1 348 bp, 我们将它分别导入 GS115 和 BL21(DE3) 表达载体 pPic3.5 和 PKT, 并在 GS115 及 BL21(DE3) 中诱导表达。表达产物经 Ni-NTA 纯化后由 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测, 结果表明两种系统都可成功表达该段序列, 且可溶性好。相比而言, 优化后的毕赤酵母 GS115 系统的表达水平 (产量/产率: 相对表达量) 明显高于大肠杆菌 BL21(DE3), 就自身未优化前也有很大提高 (约 6~7 倍)。表达产物相对完整稳定, 纯化回收效率也远高于大肠杆菌系统。由此, 毕赤酵母表达系统相比大肠杆菌系统更适合蛛丝蛋白重复片段的表达, 是一种更好的天然蛛丝蛋白表达宿主。本研究为选择天然蛛丝蛋白基因表达系统提供了线索, 也为 *A. ventricosus* MiSp 全序列的表达奠定了前期实验基础。

# 1 材料与方

## 1.1 材料

MiSp 阳性克隆由早期建立的 *A. ventricosus* fosmid 文库筛选鉴定得到。实验所用酵母表达载体 pPic3.5 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌表达载体 PKT 则由 PET32a (+) 改造而来。实验所用的宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3)、DH5a 和 *P. pastoris* GS115 分别购置 Merck 公司、上海生物工程技术有限公司和 Invitrogen 公司。DNA 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司。Phusion mix 购自 NEB 公司。质粒抽提和胶回收试剂盒购自上海生物工程技术有限公司。酵母基因组抽提试剂盒购自天根公司。蛋白纯化 Ni-NTA 购自 Qiagen 公司。6 × His-tag, anti-mouse, mAb 抗体购自 Merck 公司。Western blotting 试剂盒购自 Invitrogen 公司。实验中所用培养基配方参见分子克隆第 3 版<sup>[24]</sup>。

## 1.2 酵母表达载体 PIC3.5-P1 的构建、转化及阳性克隆 GS115: PIC3.5-P1 的鉴定

以 *A. ventricosus* fosmid 文库筛选鉴定的

MiSp 阳性克隆为模板,设计 PCR 引物 (P1 和 P2, 见表 1), 并分别在引物上下游引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I。PCR 扩增目的片段 P1 经酶切后与 pPic3.5 载体连接,命名为 PIC3.5-P1, 该重组质粒分别经酶切和测序鉴定。P1 编码序列如图 1 所示。

参照 Invitrogen 公司的酵母表达手册, 将由 *Stu* I 单切线性化的 PIC3.5-P1 重组质粒转入 GS115 感受态细胞, 涂布于 MD 平板, 30 °C 倒置培养 3~5 d。挑取单克隆扩大培养, 采用天根生物科技有限公司酵母基因组提取试剂盒抽提酵母 GS115: PIC3.5-P1 重组基因组, 并以其上特定序列为模板进行 PCR 检测, 引物 P3 和 P4 (见表 1)。

## 1.3 PIC3.5-P1 在酵母中的表达优化和鉴定

挑取阳性重组子单克隆至 50 mL BMGY 培养液中, 30 °C、250 r/min 振荡培养。每 3 h 取样测培养液吸光度 (*OD*<sub>600</sub>), 并绘制生长曲线图。

将重组 GS115 接种于 50 mL BMGY 中, 同时引入对照 (空酵母菌 GS115 和带有 pPic3.5 空

```

NT-MSSADSANEVSTASASGASYATSTSSAVSSSQATGYSTAAGYGNAAGAGAGAAAAVSGGAGSAGGYG
EGAGAGVRSAGASAGAAGGYGRATGAGAGGAAAAGASGYGGSYGAGAGAGAAGAGGASAYGAGIG
GGYGAGAADAYGGGASAGAGAGAGAGVSGGYGRAAGAGAAAAAGANGYGGSYDAGVVGAGTAGAGA
GAGASGGYGGGAGEGAGAAAAAGAGAGGAGGYGGGAGSGAGAVARAGAGGAGGYGSGIGGGYGSG
AGAAAGAGAGGAGAYGGGYGTGAGAGARGADSAGAAAGYGGGVGTGTGSSAGYGRGAGAGAGAGA
AAGSGAGAALKIDECLTGDSQVLTRNGLMSIDNPQIKGREVLSY(NETL)QQWEYKKVLRWLDRGE
KQTLSIKTK (NSTV) RCTANHLIRTEQGWTRAENITPGMKILSPASGHHHHHHHG-CT
    
```

图 1 P1 编码的氨基酸序列 (与 intein-his 融合表达)

Fig. 1 Protein sequence deduced from P1 (fused with intein and his). The letter in bold: amino acid sequence of intein. There are 8 phosphorylation sites showed in **█**: SSAD, SANE, VGTGTGSSAGYGRGAGAGAGAGAAAAGSGAG AALK, KGREVLVS, LSYNE, SIK, TVR, TRAE; and the third is most like to happen. There are 2 glycosylation sites showed in ( ): NETL, NSTV.

表 1 PCR 引物序列

Table 1 primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	AAAGGATCCAATAATGTCTTCTGCGGATAGCGGAATGAAGTA
P2	TTTGAATTCTTATCAACCATGGTGATGATGGTGATGACCGCTAGCTTCTAG
P3	AAACTTAAGAAGTTTGCTGAATATTGTTTAACTTATGAGACTGAAATTATGACT
P4	TTTGAATTCTTATCAACCATGGTGATGATGGTGATGACCGCTAGCTTCTAG

载体的 GS115 菌株), 30 °C、250 r/min 摇床培养至  $OD_{600}$  达 2~6, 约 18~20 h。方案 1 (常规组): 直接取 BMGY 培养液, 离心收集菌体, 适量转接至 BMMY 培养基, 至  $OD_{600}$  达 0.8~1.0, 每 24 h 补加甲醇使其浓度保持 0.5%, 诱导 48 h。方案 2 (优化组): 取 1~2 mL 培养液至新鲜 50 mL BMGY 培养基至  $OD_{600}$  达 0.1~0.2, 250 r/min 摇床培养至  $OD_{600}$  达 0.8~1.0, 离心收集菌体, 将全部菌体转移至 50 mL BMMY 培养基,  $OD_{600}$  达 0.8~1.0, 30 °C、250 r/min 振荡培养, 每 24 h 补加甲醇使其浓度保持 0.5%, 诱导 48 h。

吸取诱导后的菌液至 50 mL 离心管中, 3 000×g 离心 5 min, 弃上清, 收集菌体, 按 10% (W/V) 加入裂解液 (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 重悬细胞。取 20  $\mu$ L 细胞悬浮液, 加入 5  $\mu$ L 5×上样缓冲液, 100 °C 水浴 10 min, 顺势离心后进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。

#### 1.4 酵母表达产物 PIC3.5-P1 的纯化

诱导后的菌液转移至 50 mL 离心管中, 3 000×g 离心 5 min 收集菌体, 按 10% (W/V) 加入裂解液 (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 重悬细胞。采用 JnBio 的高压破碎仪 1 500~1 800 Pa 破碎酵母, 反复 3 次, 8 000×g 离心 20 min 分离上清和沉淀。可溶性蛋白和不可溶性蛋白分别采用非变性和变性纯化的方法纯化, 方法均参照 Qiagen 标准手册。

的方法纯化, 方法均参照 Qiagen 标准手册。

#### 1.5 大肠杆菌表达系统的构建、表达及纯化

借助于 PIC3.5-P1 两端的酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I, 酶切后经连接反应插入到 PKT 载体, 构建克隆 PKT-P1, 经菌液 PCR、酶切和测序鉴定。

选取重组表达质粒转化至 BL21(DE3), 挑取单克隆 37 °C 培养 10 h, 按 1 : 100 的比例接种于 50 mL LB 培养基 (卡那霉素 30  $\mu$ g/mL), 培养至  $OD_{600}$  值达 0.6~1.0 时加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导 2.5 h, 蛋白鉴定同 1.3。裂解液重悬离心收集的菌体, 超声波破碎细胞, 8 000×g 低温离心 20 min 分离上清和沉淀。纯化方法同 1.4。

## 2 结果

### 2.1 GS115:PIC3.5-P1 及对照 BL21(DE3):PKT-P1 阳性克隆的鉴定

通过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切反应, 将目标 DNA 片段分别插入载体 pPic3.5 和 PKT, 构建克隆 PIC3.5-P1 和 PKT-P1。重组质粒由 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 琼脂糖凝胶图谱检测正确。另外, 测序结果证实, 该片段为 MiSp 重复区片段, 且无核苷酸突变, 可用于后续的表达研究。

载体 PIC3.5-P1 通过转化进入酵母 GS115 后, 涂布于 his<sup>-</sup>营养缺陷 MD 培养基, 3~5 d 后,

可见生长良好的菌落, 经过 PCR 鉴定证实 P1 基因通过同源重组转入酵母基因组中。

BL21(DE3): PKT-P1 转化子经菌液 PCR、测序鉴定, 结果正确。

## 2.2 GS115:PIC3.5-P1 表达优化及与参照 BL21(DE3): PKT-P1 的比较

目标基因长为 1 348 bp, 融合表达产物的理论分子量为 38.54 kDa。诱导菌液 SDS-PAGE 检测结果如图 2 所示, P1 在 GS115 出现和对照 BL21(DE3) 大小一致的带, 为 34~50 kDa, 阴性对照相应位置则无条带。以组氨酸标签 (6×his) 作为检测抗原, 以 6×His-tag、Anti-Mouse、mAb 为一抗, Alk-Phos. conjugated Anti-Mouse 为二抗, 参照 Invitrogen 产品实验技术, 采用 Western blotting 进一步检测, 该条带为目标蛋白。此外图中于 50~90 kDa 间, 大约 80 kDa 处也出现了

条带, 而这初步推测是由于酵母的超糖基化、磷酸化所致, 且本序列经相关生物学软件分析, 如图 1 所示, 存在多处糖基化、磷酸化位点, 而这种超糖基化或磷酸化现象与优化条件是紧密相关的。

## 2.3 PIC3.5/PKT-P1 表达产物的纯化

在变性 (含有 8 mol/L 尿素) 与非变性的条件下通过 Ni-NTA 对 GS115:PIC3.5-P1 菌体破碎产物沉淀及上清进行纯化。如图 3 所示, 在 e1-3 泳道中 34~50 kDa 处可以看到明显的目的条带, 而沉淀中无明显的目的蛋白条带 (E1-E6), 这表明目标产物, 即 MiSp 部分重复区, 能以可溶形式存在破碎液上清中。对于参照大肠杆菌, 采用相同的办法对产物进行纯化处理发现, 目标蛋白也是以可溶的形式存在。除了目的条带, 26~34 kDa 处还发现一条带, 这是部分目标蛋白

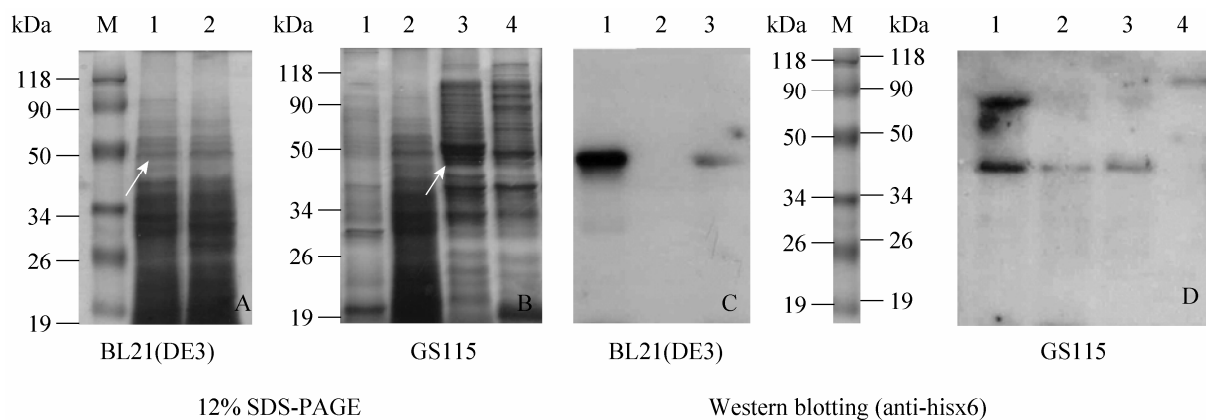


图 2 P1 在 BL21(DE3)和 GS115 中表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the recombinant proteins derived from P1 in BL21 (DE3) and GS115 respectively. M: protein marker. (A) SDS-PAGE of BL21 (DE3) culture. 1: 37 °C induced 2.5 h; 2: negative control, strain without transform. (B) SDS-PAGE of GS115 after 48 h induction. 1: negative control; 2: negative control, strain with empty plasmid; 3: optimized expression sample; 4: not optimized expression sample. (C) Western blotting of BL21 (DE3). 1: 37 °C induced 2.5 h; 2: negative control, strain without transform; 3: 25 °C induced 12 h. (D) Western blotting of GS115 after 48 h induction. 1: optimized expression sample; 2-3: not optimized expression sample; 4: negative control, strain without transform.

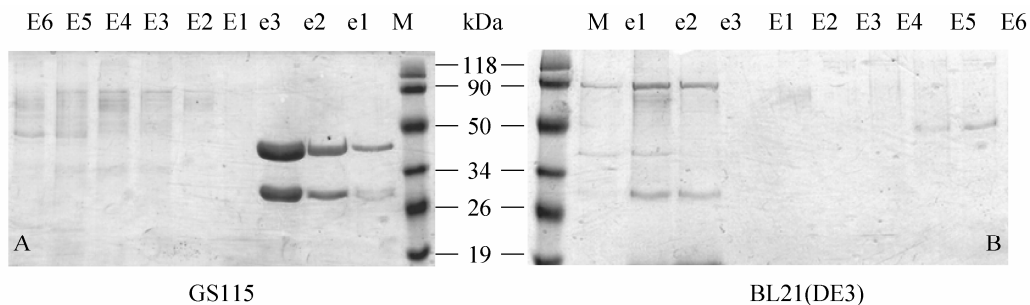


图3 P1在BL21(DE3)和GS115表达产物在非变性与变性条件下纯化的检测

Fig. 3 SDS-PAGE for purification of P1 expression products of BL21 (DE3) and GS115 in natured and denatured with 8 mol/L Urea condition. M: protein marker; e1-e3: native purification of supermatant; E1-E6: 8 mol/L Urea denature purification of precipitate. (A) SDS-PAGE for purification of P1 expression products of GS115. (B) SDS-PAGE for purification of P1 expression products of BL21 (DE3).

中 P1 融合的 intein 蛋白在纯化过程中断裂后剩余的部分 P1, 与理论大小 26.61 kDa 相符, 研究表明 intein 融合蛋白表达时容易发生断裂现象<sup>[16]</sup>。本实验最初融合 intein 大约 12.45 kDa, 是为后续剪接实验准备, 与蛛丝基因表达无关, 这里不进一步讨论。

纯化结果进一步与参照比较发现, 纯化后 GS115 的产率 (目的蛋白占总蛋白的比例) 明显高于 BL21(DE3), 如表 3 所示, 可达到 13~14 倍。

#### 2.4 P1 表达的优化及产量、产率及纯化效率的分析

对 *P. pastoris* 表达系统进行了初步优化, 首先统计绘制了重组菌在 BMGY 培养基中的生长曲线, 如图 4 所示。

为同时保证诱导时适度的菌体密度和最佳生长状态, 选取 18~20 h 对数生长中后期的 BMGY 培养物转接于新鲜的 BMGY 培养基。在新鲜的 BMGY 培养基中菌体重新分裂至  $OD_{600}$  大约 0.8 左右, 离心后按 1:1 转接至新鲜 BMMY 培养基。如此通过再次分裂, 保证新生的菌株在

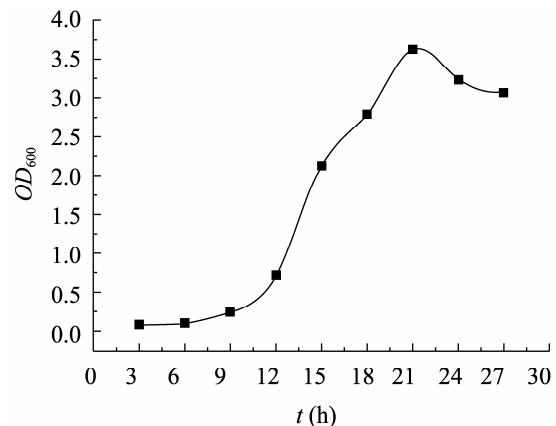


图4 重组菌株 GS115: PIC3.5-P1 在 BMGY 的生长曲线

Fig. 4 growth curve of recombinant GS115: PIC3.5-P1 in BMGY.

状态最佳时诱导; 同时, 诱导时菌体密度较低, 保证了充足的营养物质。参照 SDS-PAGE 表达图谱, 利用 Image J 软件比较分析各组蛋白的表达水平, 结果如表 2 所示, 优化后的表达量可提高 6~7 倍。

如表 3 所示, 我们分析比较了纯化前后 *P. pastoris* 和 *E. coli* 中目的蛋白的产量和产率,

并进一步计算了相应的纯化效率。*P. pastoris* 和 *E. coli* 中重组蛋白的产量和产率存在较大差别, 根据 Image J 分析比较的数据, 纯化前 *P. pastoris* 表达系统经初步优化后, 表达量可提高为原来的 6~7 倍, 达到 *E. coli* 的 2~3 倍, 产率达 *E. coli*

的 6 倍, 由此可以看出, 两种表达系统对 P1 的表达水平存在较大的差别。另外经纯化, 表达差距进一步扩大, 说明 *P. pastoris* 和 *E. coli* 两种表达系统的纯化效率也存在较大差异, 如表 3 和表 4 所示, *P. pastoris* 为 *E. coli* 的 6 倍左右。

表 2 纯化前目的蛋白 P1 的产量、产率 (目的蛋白在表达总蛋白中的含量) 在 BL21(DE3)和 GS115 中常规组及优化组中的比较

Table 2 Comparison of optimization and no optimization for protein yields and protein productivity in two expression system before purification

Strain	Yields (mg/L)	Productivity (%)
BL21(DE3)	5.57–11.14	0.78
GS115	1.93–3.86	0.49
GS115*	12.68–25.36	2.27

\* GS115 after optimization.

表 3 目的蛋白 P1 在 BL21(DE3)和 GS115 的产量在纯化前后的比较

Table 3 Comparison of purify efficiency in the two expression system for protein yields

Strain	Yeild		Purify efficiency (After/before purification, %)
	Before purification (mg/L)	After purification (mg/L)	
BL21(DE3)	5.57–11.14	0.45–0.9	8.08
GS115'	7.31–14.61	3.5–7.00	47.88

GS115 represent the comprehensive level, here basically is integrated of results before and after optimization.

表 4 目的蛋白 P1 在 BL21(DE3)和 GS115 的产率在纯化前后的比较

Table 4 Comparison of purify efficiency in the two expression system for protein productivity

Strain	Productivity		Purify efficiency (After/before purification, %)
	Before purification (%)	After purification (%)	
BL21(DE3)	0.78	3.97	5.08
GS115'	1.36	47	34.85

GS115 represent the comprehensive level, here basically is integrated of results before and after optimization.

### 3 讨论

自 20 世纪 80 年代以来, 科学家就开展了蜘蛛丝的多项研究, 包括基因克隆、蛋白表达以及仿生丝纤维的应用等, 但蛛丝在表达上的困难严

重阻碍它的发展。迄今为止, 国内外只获得了 3 种丝纤维蛋白的全长基因组序列, 分别为 MaSp (Major ampullate spidroin)、MiSp 和 AcSp (Aciniform spidroin), 其中 MaSp 和 AcSp 均来自黑寡妇蜘蛛 *Latrodectus hesperus*, 而 MiSp 则来

自 *A. ventricosus*, 由本课题组筛选鉴定<sup>[15, 20-21]</sup>。这些完整的蛛丝蛋白, 分子量大、编码基因 GC 含量高, 常见的表达系统很难完成其全长的表达。而研究表明, 高分子量是决定蛛丝性能的重要因素, 对此科学家分别尝试了不同的方法来获取高分子量的重组蛛丝蛋白<sup>[11, 13]</sup>。2010 年韩国科学家在代谢水平对大肠杆菌进行改造, 补充 Gly 酰 tRNA, 最终表达出 284 kDa 的 MaSp 重组串联蛋白, 但表达量较低, 获得的重组蛛丝蛋白的纤维性能只有天然蛛丝的一半<sup>[13]</sup>。2012 年德国科学家尝试了用蛋白质内含子 (Intein) 介导拼接的方法表达出高分子量的蛛丝蛋白, 他们利用 intein 的体外剪接反应, 在体外让融合 intein 的蛛丝蛋白相互剪接产生 Flag 蛋白的串联体, 产物可达到约 300 kDa, 但是该方法特异性较差, 随机性较强, 产物的大小无法控制, 因此难于得到目标产物, 不适合大规模的纯化生产<sup>[11]</sup>。

为了寻找适合表达天然蛛丝蛋白全长基因的系统, 本研究在 *P. pastoris* 表达系统中首次尝试表达天然的 MiSp 部分重复序列 (P1), 并与大肠杆菌表达结果进行比较。P1 编码氨基酸序列富含 Gly 和 Ala 且高度重复, 符合蛛丝蛋白序列的典型特征, 在异源表达时, 容易因为宿主密码子使用的偏爱性及稀有氨基酸合成代谢不足而受到影响; 另外, 片段本身的大小亦会一定程度上决定表达水平和产物的完整性, 而有报道 *E. coli* 在表达高重复的大片段蛛丝蛋白时, 容易出现表达提前终止现象, 而片段达到 1 000 氨基酸长度, 表达效率就会明显降低<sup>[2, 13, 22]</sup>。本研究结果表明在 *P. pastoris* 和 *E. coli* 系统中, P1 均实现了表达, 蛋白产物可溶性好 (图 3), 采用非变形纯化即可得到可溶性的蛋白。我们还分析比较

了两种表达系统中 P1 表达量和产率, 在优化后 *P. pastoris* 表达系统中, P1 表达量高, 为 *E. coli* 表达系统的 2 倍左右 (表 2)。这是由于天然的 MiSp 基因含有数十个精氨酸 (Arginine) 等, *E. coli* 系统因为密码子的偏爱性无法高效地表达该氨基酸; 另外, 由于 P1 编码的氨基酸 Gly 和 Ala 含量非常高 (60% 左右), *E. coli* 表达系统的氨基酸合成亦会受到影响。*P. pastoris* 为真核表达系统, 可以更好地编码上述稀有密码子。参照 GS115 生长曲线 (图 4), 对 *P. pastoris* 表达系统进行初步优化, 选择 18~20 h 对数生长中后期的 BMGY 培养物转接新鲜 BMGY, 离心收集菌体去除了陈旧的培养基等, 减轻了经过长期的代谢产生的有害物的影响以及 pH 变化的影响、提高菌体的代谢水平, 菌体生长状态; 二次培养达到较低菌种密度开始诱导, 外环境营养丰富, 更好地促进了外源基因的表达, 优化前后表达量可提高 6~7 倍。*P. pastoris* 系统是常用的真核表达系统, 较 *E. coli* 而言, 有更大的优化空间 (包括诱导时间、诱导甲醇浓度和扩大发酵培养等), 且易于扩大, 适合工业大规模生产, 是表达蛛丝蛋白或其他多重复大片段分子的良好宿主<sup>[23]</sup>。由于蛛丝基因本身的特点, 为了获取更高表达量的重组蛋白, 我们将会进一步优化 *P. pastoris* 表达系统并尝试 MiSp 天然基因和其他蛛丝蛋白基因的全长表达。

本研究通过对 *P. pastoris* 和 *E. coli* 两种表达系统地比较以及对 *P. pastoris* 系统地优化, 证明了 *P. pastoris* 作为天然蛛丝蛋白 MiSp 表达宿主的优越性。为天然蛛丝蛋白基因可溶性表达提供了线索, 也为 *A. ventricosus* MiSp 全序列的表达提供了前期实验基础。



## REFERENCES

- [1] Hinman MB, Jones JA, Lewis RV. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol*, 2000, 18: 374–379.
- [2] Rising A, Widhe M, Johansson J, et al. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 169–184.
- [3] Hofer M, Winter G, Myschik J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 2012, 33: 1554–1562.
- [4] Lammel A, Schwab M, Hofer M, et al. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 2011, 32: 2233–2240.
- [5] Lewicka M, Hermanson O, Rising AU. Recombinant spider silk matrices for neural stem cell cultures. *Biomaterials*, 2012, 33: 7712–7717.
- [6] Hudspeth M, Nie X, Chen W, et al. Effect of loading rate on mechanical properties and fracture morphology of spider silk. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 2240–2246.
- [7] Foelix RF. *Biology of Spiders*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1996.
- [8] Guinea GV, Elices M, Plaza GR, et al. Minor ampullate silks from nephila and argiope spiders: tensile properties and microstructural characterization. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 2087–2098.
- [9] Work RW. Dimensions, birefringences, and force-elongation behavior of major and minor ampullate silk fibers from orb-web-spinning spiders—the effects of wetting on these properties. *Textile Res J*, 1977, 47: 650–662.
- [10] Teule F, Addison B, Cooper AR, et al. Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers*, 2012, 97: 418–431.
- [11] Hauptmann V, Weichert N, Menzel M, et al. Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. *Transgenic Res*, 2013, 22: 369–377.
- [12] Wen H, Lan X, Zhang Y, et al. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 1815–1821.
- [13] Xia XX, Qian ZG, Ki CS, et al. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14059–14063.
- [14] Widhe M, Johansson J, Hedhammar M, et al. Current progress and limitations of spider silk for biomedical applications. *Biopolymers*, 2012, 97: 468–478.
- [15] Chen G, Liu X, Zhang Y, et al. Full-length minor ampullate spidroin gene sequence. *PLoS ONE*, 2012, 7: e52293.
- [16] Qi X, Meng Q, Liu XQ. Spontaneous C-cleavage of a mini-intein without its conserved N-terminal motif A. *FEBS Lett*, 2011, 585: 2513–2518.
- [17] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 2003, 24: 401–416.
- [18] Kuhbier JW, Reimers K, Kasper C, et al. First investigation of spider silk as a braided microsurgical suture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 97: 381–387.
- [19] Krishnaji ST, Kaplan DL. Bioengineered chimeric spider silk-uranium binding proteins. *Macromol Biosci*, 2012, 13: 256–264.
- [20] Ayoub NA, Garb JE, Kuelbs A, et al. Ancient properties of spider silks revealed by the complete gene sequence of the prey-wrapping silk protein (AcSp1). *Mol Biol Evol*, 2012, 30: 589–601.
- [21] Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, et al. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PLoS ONE*, 2007, 2: e514.
- [22] Fahnstock SR, Irwin SL. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47: 23–32.
- [23] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190: 55–62.

(本文责编 郝丽芳)