

猪溶菌酶在大肠杆菌中的表达及其复性

朱德伟,蔡国林,陆健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,粮食发酵工艺与技术国家工程实验室,
生物工程学院,江苏 无锡,214122)

摘要 作为C型溶菌酶的一种,猪溶菌酶(*Sus scrofa* lysozyme, SSL)是猪体内抵抗外源性疾病的一道重要屏障。鉴于猪在畜牧行业中的重要地位,尤其是在饲用抗生素的使用严重受限的今天,SSL的生产显得尤为迫切。化学合成得到了SSL的编码基因,通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切之后与载体 pET-28a(+)连接,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达。在 25℃、200 r/min 条件下,利用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h,离心发酵液获得菌体。对其进行超声破碎获得重组蛋白包涵体,然后对包涵体进行复性,最终获得了具有生物活性的目的蛋白,并对其酶学性质以及抗菌活性进行了研究。超声破碎后获得了 181.05 mg/L 的重组蛋白包涵体,对包涵体进行复性后,比酶活力可达 8 032.78 U/mg,其最适温度为 35℃,最适 pH 为 6.0,与其理论值基本一致,而其抗菌活性与标准品溶菌酶的作用效果也比较类似,为其规模化生产与进一步应用奠定了理论基础。

关键词 猪溶菌酶;大肠杆菌;包涵体;复性

随着健康养殖理念的倡导以及人们对食品安全要求的日益提高,饲用抗生素的使用受到了越来越严格的限制,寻求安全高效的抗生素替代品已经刻不容缓。作为一种天然盐基碱性蛋白质,溶菌酶被广泛应用于食品、医药、生物工程以及饲料等领域^[1]。作为C型溶菌酶的一种,猪溶菌酶(*Sus scrofa* lysozyme, SSL)是猪体内抵抗外源性疾病的一道重要屏障^[2-3]。而鉴于猪在畜牧行业中的重要地位,尤其是在饲用抗生素的使用严重受限的今天,SSL必然存在极为广阔的市场前景。

然而由于来源受限,目前SSL应用的报道还不多见。溶菌酶的生产可分为3类:直接从动植物组织器官提取^[4-5],转基因动植物生产^[6-7]以及微生物发酵^[8-10]。天然提取虽然简便易行,但是效率较低,且不易规模化生产;转基因动植物虽然可以把溶菌酶的提取与高附加值产品的生产有机结合,但是后续分离成本较高,且不能连续化生产;发酵生产不仅可以克服原材料限制的缺陷,且能够规模化连续生产,将成为未来溶菌酶生产的主要方式。

本研究化学合成了SSL的编码基因,通过 *Bam*H

I 和 *Hind* III 双酶切之后与载体 pET-28a(+)连接,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达。由于大肠杆菌表达系统对蛋白质的翻译后修饰能力较差,一般表达产物以包涵体的形式存在。因此,本研究对得到的溶菌酶产品进行了进一步的复性,以获得具有生物活性的SSL产品。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

克隆宿主 *E. coli* JM109,由本实验室保藏;克隆载体 pPICZA 和 pMD19-T,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;表达载体 pET-28a(+),由本实验室保藏;表达宿主 BL21(DE3),由本实验室保藏。测试菌种 *E. coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (CMCC(B) 46117), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) 以及 *Salmonella enteritidis* (CMCC(B) 50335),购自无锡赛维贸易有限公司; *Micrococcus luteus*,购自南京建成生物科技有限公司; *Bacillus subtilis* (Wild Strain, WS), *Bacillus amyloliquefaciens* (Wild Strain, WS)由本实验室保藏。

1.1.2 试剂与培养基

溶菌酶标准品购自生工生物工程(上海)股份有限公司; *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶, *T*₄ DNA 连接酶, Ex *Taq* DNA 聚合酶,购自大连宝生物公司(Takara);PCR 试剂,质粒抽提试剂盒,胶回收试剂盒,购自上海生工

第一作者:博士研究生(陆健教授为通讯作者, E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn)。

基金项目:973 项目(2013CB733602);中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51302A);江苏高校优势学科建设工程资助项目

收稿日期:2016-03-10,改回日期:2016-04-05

生物工程有限公司;酵母提取物与胰蛋白胨,购自 Oxiod 公司;其他试剂均为分析纯,购自国药集团有限公司。LB 培养基(g/L),酵母提取物 5,胰蛋白胨 10,NaCl 10,琼脂 20(固体培养基),自然 pH,121 ℃ 灭菌 20 min。TSB 培养基(g/L),胰蛋白胨 15,大豆蛋白胨 5,NaCl 5,pH 为 7.2 ± 0.2 ,121 ℃ 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器、设备

SW-CJ-IFD 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;Mastercycler pro PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;琼脂糖凝胶电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;H1850R 离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;JY 92-11 超声波细胞粉碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;XB70 制冰机,宁波格兰特制冷设备制造有限公司;BCD-265CMX 冰箱,合肥美的荣事达冰箱有限公司;小型垂直电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;JD-801 凝胶成像仪,江苏省捷达科技发展有限公司;XMTD-8222 恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;GI54DWS 自动高压蒸汽灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;FE20 精密 pH 计,Mettler Toledo 公司;EL204 电子分析天平,Mettler Toledo 公司;UV-2100 紫外-可见分光光度计,龙尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的合成

根据 NCBI 的报道,将 SSL 的原始编码基因(NCBI-ID: 1174173)序列交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。在该片段两端分别加有 *Kpn* I & *Not* I 内切酶的酶切位点,经双酶切后与克隆载体 pPICZA 连接,重组质粒标记为 pPICZA-SSL。

1.2.2 目的基因片段的扩增与验证

根据 pPICZA-SSL 的基因序列设计并合成了扩增引物(见表 1),用于目的基因的扩增,在引物的两端引入了 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶的酶切位点。以重组质粒为模板,PCR 反应参数为:95 ℃ 10 min,94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,重复 30 个循环后 72 ℃ 继续延伸 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并割胶回收。胶回收具体操作参照试剂盒说明。将回收产物与 pMD19-T 载体连接,送样至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物名称	序列
SSL-F	5'-GGATTCCCAAGGTTTACGATAGATGTGA-3'
SSL-R	5'-AAGCTTCAACTTACAACCTCTAATGT-3'

1.2.3 表达载体的构建及转化

将含有质粒 pMD19-T-SSL 的重组大肠杆菌液接种于 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养过夜,用抽提试剂盒提取质粒,具体操作按试剂盒说明进行。质粒 pET-28a(+)和质粒 pMD19-T-SSL 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶处理之后于 16 ℃ 连接过夜。将连接产物分别转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中,菌液涂布于含 50 μg/mL Kan 的 LB 固体培养基。阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后,提取重组菌中的质粒,热激法转化至 BL21(DE3)的感受态细胞中,将细胞重悬后涂布于含 50 μg/mL Kan 的 LB 固体培养基。提取阳性转化子基因组进行 PCR 鉴定,之后将 PCR 产物送样至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。并对阳性转化子进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 的双酶切鉴定。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达

挑选阳性克隆于 LB(含 50 μg/mL Kan)固体培养基上划线培养 24 h,挑选单菌落接种至含 3 mL LB 培养基的小试管中 37 ℃ 200 r/min 中,培养过夜(约 16 h)。取 300 μL 培养液(1% 接种量)于 30 mL 含卡那霉素(加 15 μL,终质量浓度为 50 μg/mL)的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养,生长过程中无菌条件下测 OD₆₀₀ 值至 0.6(约 2.5 h)。然后在培养物中添加 IPTG(终浓度为 0.1 mmol/L,即 30 mL 样品中加入 30 μL、100 mmol/L 的 IPTG),25 ℃、200 r/min 继续诱导表达 8 h。

1.2.5 包涵体复性

将发酵液在 10 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清,用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)重悬洗涤菌体,之后进行超声波破碎(300 W 工作 20 min,2 s/2 s)。12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,得到的沉淀即为重组蛋白的包涵体。

包涵体的洗涤、裂解与复性过程参照文献的方法^[11]。用洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,5 mmol/L EDTA,2 mol/L 尿素,pH 8.0)洗涤,加入适量裂解液 50 mmol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,5 mmol/L EDTA,8 mol/L 尿素,pH 8.0)裂解。用复性缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,5 mmol/L EDTA,1 mol/L 尿素,0.5 mol/L L-Arg,2 mmol/L GSH,0.5 mmol/L GSSG,pH 8.0)复性后透析(50 mmol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,pH 8.0)。利用截留分子质量为 30 000 Da 的超滤管对蛋白液进行进一步纯化,然后对纯化后的溶液进行

SDS-PAGE 电泳,利用捷达凝胶成像系统软件对 SDS-PAGE 的条带进行分析;并用 BRADFORD^[12] 法测定纯化后的蛋白浓度。

1.2.6 SSL 的酶活力的测定

SSL 活力的测定参考 MINAGAWA^{ET}^[13] 的方法,原理是溶菌酶降解细胞壁之后菌液的浊度会下降,根据单位时间内浊度的降低程度来表征酶活力的大小。1 mL 的测试菌液 *M. lysodeikticus* (0.2 mg/mL 溶于 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中, pH 6.2) 与 0.2 mL 的酶液混匀, 25 °C 条件下分别测定 0.5 min 和 4.5 min 时 450 nm 处的吸光度。酶活力定义为:单位时间内 (1 min) 使得溶壁微球菌溶液的吸光度降低 0.001 所需要的酶量。测定进行 3 次,结果以平均值 \pm 标准差的形式表示。

1.2.7 SSL 的酶学性质

根据 1.2.6 中的酶活力测定方法,SSL 的最适作用温度测定时其他条件不变,把测定温度分别设为 15、20、25、30、35、40、45、50、60、70 和 80 °C,而热稳定性的测定则是分别将溶菌酶溶液在以上温度条件下保温 30 min 后测定其保留的酶活力占初始酶活力的百分比。而最适作用 pH 则是在最适作用温度条件下,将磷酸盐缓冲液换成同浓度下的不同 pH 缓冲液,而 pH 稳定性则是将溶菌酶在不同的 pH 缓冲液中处理 30 min 后测定其保留的酶活力占初始酶活力的百分比。其中用到的缓冲液有:乙酸钠缓冲液 (pH 3.5 ~ 5.5),磷酸盐缓冲液 (pH 6.0 ~ 8.0),Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5 ~ 9.0)。

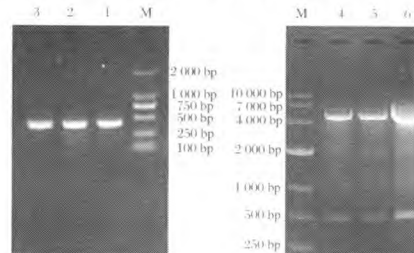
1.2.8 SSL 的抑菌活性测定

重组 SSL 的抑菌活性测定参照文献^[14] 的方法进行。测试菌经过二级活化之后,以 1% 的接种量接种至含 30 mL TSB 培养基的三角瓶中培养至 OD₆₀₀ 为 0.6,取 0.2 mL 菌液与 0.4 mL TSB 培养基混合后加入 0.2 mL 含有 SSL (溶菌酶标准品作对照) 的 PBS (0.05 mol/L, pH 7.0) 缓冲液混匀,使 SSL (或标准品) 的终浓度为 8.3×10^{-7} mol/L。混合体系于 37 °C、200 r/min 条件下培养 2 h 后,稀释涂布至 TSB 平板上,待长出菌落后进行计数。计算抑菌系数 $\lg N_0/N_1$,其中 N_0 是指空白组的菌落数,即只加 PBS 溶液; N_1 是实验组 (或对照组) 的菌落数。测定时设 3 组平行,结果以平均值 \pm 标准差的形式表示。对实验组与对照组的结果进行 T 检验,分析实验结果的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 SSL 目的基因与重组表达载体的双酶切验证

以 SSL-F 和 SSL-R 为引物,质粒 pPICZA-SSL 为模板进行 PCR 反应。得到的 PCR 产物条带大小约为 400 bp,与实际基因片段大小 (414 bp) 相符。割胶回收后,与 pMD19-T 载体连接,送样测序 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 后证明目的基因正确合成,且酶切位点引入正确。质粒 pET-28a (+) 和质粒 pMD19-T-SSL 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶处理之后进行连接,对含有 Kan 的培养基中长出的菌落进行 PCR 验证。提取阳性克隆菌株的质粒 DNA,进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 的双酶切验证,结果如图 1 所示。pET-28a (+) 和目的基因的大小与理论值一致,且经过测序后确认,重组表达载体 pET-28a (+)-SSL 构建成功。将表达载体 pET-28a (+)-SSL 热激法转化至宿主 BL21 (DE3) 中,经 PCR 鉴定及测序验证,表达宿主构建成功,命名为 BL21 (DE3)-pET28a (+)-SSL。



M - Marker; 1, 2, 3 - 阳性重组子的菌落 PCR 结果; 4, 5, 6 - 重组表达载体 pET-28a (+)-SSL 的双酶切图谱

图 1 目的基因 SSL 的 PCR 鉴定及表达载体 pET-28a (+)-SSL 的双酶切 (*Bam*H I 和 *Hind* III) 验证

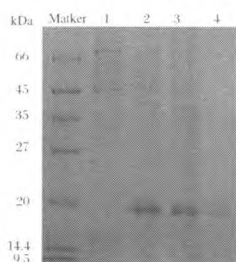
Fig. 1 The PCR identification of target gene SSL and the double enzyme (*Bam*H I and *Hind* III) digestion of expression vector pET-28a (+)-SSL

2.2 重组宿主 BL21 (DE3)-pET28a (+)-SSL 的诱导表达

对得到的宿主 BL21 (DE3)-pET28a (+)-SSL 进行诱导表达,发现 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导时得到的表达产物浓度与高浓度的 IPTG 诱导时差别不大,而明显高于更低浓度的 IPTG 获得的产物浓度。在 25 °C 条件下诱导较 30 °C 或 37 °C 条件下可以获得更高的表达量,低温条件下 (20 °C) 尽管可以获得同样浓度的表达产物 (181.05 mg/L),但是耗时更长 (16 h),而且破碎液的上清中也存在部分的蛋白,但是没有酶活力,同样需要复性 (数据未显示)。为了简化

复性的过程,最终选择的诱导条件是在 0.1 mmol/L 的 IPTG 条件下 25 ℃ 诱导 8 h。

从图 2 中可以看到,细胞破碎后的上清中基本都是杂蛋白,没有目的蛋白的条带。而在破碎后的沉淀中大部分的蛋白都是目的蛋白,只有少量的杂质。目的蛋白是以包涵体的形式存在,这是因为目的蛋白合成速度太快,而由于宿主细胞缺乏必要的酶系,来不及也没有办法对重组蛋白进行正确折叠,才会造成在细胞中大量的积累^[15]。本研究得到的重组表达蛋白包涵体的质量浓度为 181.05 mg/L(如图 2 泳道 2 所示)。图 2 中得到的目的蛋白分子量在 18 kDa 左右,较理论值 14.7 kDa 高了约 3 kDa,主要原因是在 *Hind* III 酶切位点之后还有 *Not* I、*Xho* I 以及 His-tag 的组氨酸标签。His-tag 的存在会增加重组蛋白的大小,此外它还会对天然蛋白在 SDS-PAGE 中的迁移造成阻碍,从而影响最终呈现的条带位置^[16]。



Marker - Marker; 1 - 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h 后的菌体破碎液上清; 2 - 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h 后的菌体破碎后的沉淀; 3 - 复性后的蛋白液; 4 - 超滤纯化后的复性蛋白液

图 2 BL21(DE3)-pET28a(+)-SSL 诱导表达产物及其复性后的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of the expression product of BL21(DE3)-pET28a(+)-SSL and its renatured protein

2.3 表达蛋白包涵体的复性

对蛋白包涵体进行洗涤、溶解、透析和浓缩等复性步骤后,进行 SDS-PAGE(图 2)实验。利用捷达凝胶成像系统软件分析发现,表达产物中杂蛋白基本得到全部去除,最终获得的与发酵液相同体积的复性液蛋白浓度为 61.10 mg/L,回收率为 33.75%。复性液的酶活力为 (490.80 ± 12.70) U/mL,在复性完成后进行一步超滤管的分离即可达到目的蛋白 90% 以上纯度的纯化效果(泳道 4 所示),比酶活力可达 8 832.78 U/mg。

His-tag 的组氨酸标签可用于重组蛋白的亲纯化。然而本文复性后的蛋白中只有极少量的杂蛋白存在,复性完成后进行一步超滤管的分离即可达到较

好的纯化效果,亲和纯化并没有进行的必要。尽管 His-tag 标签的存在并不影响本文中的 SSL 酶活性,但是在后续实验中可以在 *Hind* III 酶切位点之前引入终止密码子提前终止转录,以获得没有 His-tag 标签的 SSL 产品。

2.4 SSL 的酶学性质

2.4.1 最适作用温度与热稳定性

如图 3 所示,重组 SSL 的最适作用温度为 35 ℃,这与天然 SSL 的最适作用温度基本一致^[17]。随着温度的升高或降低,SSL 的酶活性均有不同程度的降低。在 30~40 ℃ 范围内,SSL 可保持 80% 以上的酶活力。温度过低,SSL 与反应底物的接触机率下降,导致其反应活力下降;而温度升高时,SSL 分子结构可能会发生改变,从而逐渐失去酶活性。

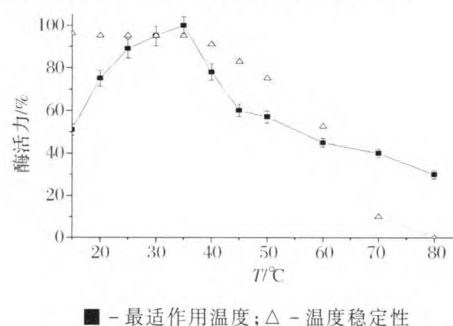


图 3 温度对 SSL 酶活力的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the enzyme activities of SSL

而在热稳定性方面,SSL 在 10~50 ℃ 范围内酶活力相对稳定,不同温度下保温 30 min 均能保持 70% 以上的酶活力;而在 60 ℃ 和 70 ℃ 条件下保温 30 min 之后,SSL 的相对酶活力只保留了初始值的 50% 和 8.5%;当 SSL 在 80 ℃ 条件下保温 30 min 之后,SSL 将会彻底失活。

2.4.2 最适作用 pH 与 pH 稳定性

如图 4 所示,SSL 的最适反应 pH 为 6.0,与天然 SSL 的特性基本一致^[17]。在 pH 5.5~6.5 的范围内,SSL 的酶活力相对稳定,都能保持其最适作用 pH 条件下酶活的 80% 以上。pH 过高或过低都会影响其酶活力。SSL 的 pH 稳定性较好,在 pH 4.0~9.0 范围内酶活力都相对稳定,不同 pH 条件下处理 30 min,均能保持其初始酶活力的 90% 以上。

2.5 SSL 的抑菌效果测定

如表 2 所示,与标准品溶菌酶的抗菌活性类似,SSL 的抗菌谱主要集中在革兰氏阳性菌,而对革兰氏阴性菌的作用效果较差。而在杀菌效果方面,SSL 除了对 *Bacillus amyloliquefaciens* (+) 和 *Pseudomonas*

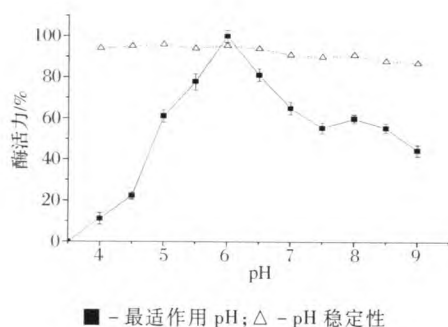


图 4 pH 对 SSL 酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pH on the enzyme activities of SSL

aeruginosa(-)的作用效果与标准品有显著性差异之外,对其他微生物的杀灭效果并无明显差异。

表 2 SSL 的抗菌活性

Table 2 Anti-microbial activities of SSL

测试菌株 (Gram)	菌株名称 或类型	标准品抑菌 活性($\lg N_0/N_1$)	SSL 抑菌活性 $\lg(N_0/N_1)$
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	WS	3.34 ± 0.06	3.25 ± 0.08
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (+)	WS	3.55 ± 0.10	$3.35 \pm 0.10^{**a}$
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> (+)	ATCC 4698	3.40 ± 0.10	3.25 ± 0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	ATCC 25923	0.18 ± 0.03	0.22 ± 0.04
<i>E. coli</i> (-)	ATCC 25922	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.03
<i>Klebsiella pneumonia</i> (-)	CMCC (B) 46117	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	ATCC 15442	0.12 ± 0.02	$0.18 \pm 0.04^{*b}$
<i>Salmonella enteritidis</i> (-)	CMCC (B) 50335	0	0

注:a; $P < 0.01$; b; $P < 0.05$ 。

SSL 属于 C 型溶菌酶的一种,其杀菌作用机制是作用于微生物细胞壁肽聚糖中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4-糖苷键。革兰氏阳性菌的细胞壁组成比较简单,且肽聚糖直接暴露在最外层,有利于 SSL 的结合与作用;而革兰氏阴性菌的细胞壁中肽聚糖含量较少,且外层还有保护性的脂多糖,所以 SSL 对其作用效果较差。后续可以通过脂肪酸酯化脂多糖、插入疏水性多肽、部分变性以及分离抗菌肽等方式来提高其对革兰氏阴性菌的作用效果^[18]。

3 结论

根据 NCBI 网站的数据,化学合成了 SSL 的编码基因,通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切之后与载体 pET-28a(+)连接,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中成功得到了诱导表达。在 25 ℃、200 r/min 条件下,利用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h,离心发酵液获得菌体,超声破碎后,获得了 181.05 mg/L 的重组蛋白包涵体。通过对包涵体的洗涤、溶解、透析以及浓缩,最

终获得了有生物活性的 SSL 产品,其复性液蛋白浓度为 61.10 mg/L,比酶活力可达 8 032.78 U/mg。

本研究中,目的蛋白的复性过程与其纯化过程耦合程度较高,只需结合截留分子量为 30 000 kDa 超滤管的超滤步骤,不需要亲和柱的纯化即可达到 90% 以上的纯度。因此,后续可以通过在 *Hind* III 酶切位点之前添加终止子,使目的基因的转录提前终止,从而获得不含 His-tag 标签的重组蛋白。用大肠杆菌来表达 SSL 与利用毕赤酵母表达系统相比,一方面产物以包涵体的形式存在,可以减少或降低宿主产生的蛋白酶对目的蛋白的降解,这是在毕赤酵母表达系统中经常会出现的一个缺陷^[19];另一方面,可以获得纯度和活性更高的蛋白产品 SSL(毕赤酵母 X-33 表达系统中经过纯化的 SSL 比酶活力最高只有 2 845.38 U/mg^[1]),有利于其后续的酶学性质或抗菌活性的研究。

此外,对复性得到的 SSL 进行酶学性质和抗菌活性进行了研究,发现其最适作用温度为 35 ℃,最适作用 pH 为 6.0,与理论值基本一致,且抗菌活性与标准品溶菌酶的作用效果基本一致,为 SSL 的规模化生产及其应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] ZHU De-wei, CAI Guo-lin, WU Dian-hui, et al. Comparison of two codon optimization strategies enhancing recombinant *Sus scrofa* lysozyme production in *Pichia pastoris* [J]. Cellular & Molecular Biology, 2015, 61(2): 43-49.
- [2] YU Mei, IRWIN D M. Evolution of stomach lysozyme; the pig lysozyme gene [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 5(2): 298-308.
- [3] PALMIERI C, BRUNETTI M, SALDA L D. Immunohistochemical characterization of Kisselev nodules (ectopic lymphoid follicles) in wild boar (*Sus scrofa* L.) [J]. Research in Veterinary Science, 2007, 83(1): 109-115.
- [4] ZHANG Chen-ming, LILLIE R, COTTER J, et al. Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1069(1): 107-112.
- [5] BARROS G O F, BALLEEN M A T, WOODARD S L, et al. Recovery of bovine lysozyme from transgenic sugarcane stalks: extraction, membrane filtration, and purification [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(10): 1407-1416.
- [6] YU Hui-qing, CHEN Jian-quan, LIU Si-guo, et al. Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 676-683.

- [7] XU Na, PAN Jun-li, LIU Shou-sheng, et al. Three in one: Identification, expression and enzymatic activity of lysozymes in amphioxus [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2014, 46(2): 508–517.
- [8] GAO Yu, ZHAO Hong-lei, FENG Xin, et al. Expression of recombinant human lysozyme-tachyplesin I (hLYZ-TP I) in *Pichia pastoris* and analysis of antibacterial activity [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(4): 319–322.
- [9] LI Jian-bo, JIANG Ming-feng, WANG Yong. Expression, purification, and characteristic of tibetan sheep breast lysozyme using *Pichia pastoris* expression system [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2014, 27(4): 574–579.
- [10] KIM J W, PARK S I, YOE J, et al. Cloning and overexpression of lysozyme from *Spodoptera litura* in prokaryotic system [J]. Animal Cells and Systems, 2011, 15(1): 29–36.
- [11] 王俊雄, 关怡新, 姚善涇. 重组瑞替普酶包涵体制备及其体外复性 [J]. 化工学报, 2015, 66(2): 709–716.
- [12] BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248–254.
- [13] MINAGAWAET S, HIKIMA J I, HIRONO I, et al. Expression of Japanese-ounder c-type lysozyme cDNA in insect cells [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2001, 25(5/6): 439–445.
- [14] PELLEGRINI A, THOMAS U, BRAMAZ N, et al. Identification and isolation of a bacterial domain in chicken egg white lysozyme [J]. Journal of Applied Microbiology, 1996, 82(3): 372–378.
- [15] LIOVIC M, OZIR M, ZAVEC A B, et al. Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(67): 1–5.
- [16] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因 [J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 64–68.
- [17] JOLLRS J, JOLLRS P, BOWMAN B H, et al. Episodic evolution in the stomach lysozymes of ruminants [J]. Journal of Molecular Evolution, 1989, 28(6): 528–535.
- [18] MINE Y, MA Fu-peng, LAURIAN S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(5): 1 088–1 094.
- [19] TENG Da, FAN Ying, YANG Ya-lin, et al. Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(5): 1 074–1 083.

The expression of *Sus scrofa* lysozyme in *E. coli* and its refolding

ZHU De-wei, CAI Guo-lin, LU Jian*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT As a kind of C-type lysozyme, *Sus scrofa* lysozyme (SSL) plays an important role in anti-exterior microorganisms. Considering the important role of pig in stock farming, especially that the feed antibiotic is severely limited, the production of SSL is urgently demanded. The CDS of SSL gene was synthesized and inserted into vector pET-28a(+) after digestion with *Bam*H I and *Hind* III. Then the recombinant plasmid was transformed into BL21(DE3). Under the condition of 25 °C, 200 r/min, 0.1 mmol/L IPTG was added for 8 h induction. With the process of refolding, SSL with natural activity was obtained. Furthermore, the characterization of the recombinant protein was carried out. After centrifugation and ultrasonic disruption, 181.05 mg/L inclusion body of recombinant protein was harvested. After refolding, SSL with the specific enzyme activity of 8032.78 U/mg was obtained. In the study of enzymatic property, the optimal temperature and pH was 35 °C and 6, respectively, which were the same as their theoretical values. In the antimicrobial activity analysis, recombinant SSL had a similar result to standard lysozyme. The results will lay the foundation for the industrial production of SSL and its further applications.

Key words *Sus scrofa* lysozyme(SSL); *E. coli*; including body; refolding