

DOI:10.13350/j.cjpb.220807

• 论著 •

# 猪重链铁蛋白的可溶性表达与纯化及纳米颗粒自组装\*

岳凯<sup>1</sup>, 韩雪英<sup>2</sup>, 冷超粮<sup>1</sup>, 刘家兴<sup>1</sup>, 姚伦广<sup>1\*\*</sup>, 刘阳坤<sup>1\*\*</sup>

(1. 南阳师范学院生命科学与农业工程学院, 河南省畜禽保健品工程技术中心, 河南南阳 473061; 2. 西北农林科技大学动物医学院)

**【摘要】** 目的 通过原核表达系统制备高可溶性的猪铁蛋白纳米颗粒, 以期用于抗原递呈和纳米疫苗开发等研究。

**方法** 以提取的猪心脏总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增猪重链铁蛋白(*Sus scrofa* ferritin heavy chain, FTH1) 基因。将目的片段连接到克隆载体 pEASY-Blunt Zero, 并对其进行双酶切鉴定和测序。将测序正确的 FTH1 基因克隆至含 MsyB 促溶标签的原核表达载体中, 构建重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1。将重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞并进行最佳表达条件的优化, 用 Ni-NTA 亲和层析法纯化重组蛋白, 通过 Western blot 和透射电镜观察对该蛋白进行分析与鉴定。 **结果** 成功扩增出大小为 543 bp 的 FTH1 基因片段, 构建的重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1 转化至 DE3 感受态细胞后经 IPTG 诱导表达分子质量约为 37 ku 的可溶性融合蛋白。优化的最佳诱导表达条件为温度 37 °C, IPTG 终浓度 0.6 mmol/L、诱导时间 6 h。Western blot 检测纯化的重组蛋白能被相应抗体识别。透射电镜观察到大小均一、粒径约 10 nm 的颗粒结构。 **结论** 利用大肠埃希菌可溶性表达并纯化了猪重链铁蛋白, 该蛋白具有反应原性, 可自组装成纳米颗粒, 为新型猪疫苗的研制奠定了实验基础。

**【关键词】** 猪重链铁蛋白; 可溶性表达; 纳米颗粒; 自组装

**【中图分类号】** R392

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)08-0901-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Aug.; 17(8):901-906.]

## Soluble expression and purification of *Sus scrofa* heavy chain ferritin and nanoparticles self-assembly

YUE Kai<sup>1</sup>, HAN Xue-ying<sup>2</sup>, LENG Chao-liang<sup>1</sup>, LIU Jia-xing<sup>1</sup>, YAO Lun-guang<sup>1</sup>, LIU Yang-kun<sup>1</sup>

(1. Henan provincial Engineering and Technology Center of Health Products for Livestock and Poultry, College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University)

**【Abstract】** **Objective** This study aimed to prepare high soluble swine ferritin nanoparticles in *E. coli*, for the application in the study of antigen presentation and nano-vaccine development. **Methods** *Sus scrofa* heavy chain ferritin (FTH1) gene was amplified from the porcine heart sample by RT-PCR and ligated to the cloning vector pEASY-Blunt Zero, and then it was identified by double enzyme digestion and sequenced. After identification, FTH1 gene was inserted into pET28a-MsyB vector, and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to explore the induction conditions. Then the expressed protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography, analyzed by Western blot, and detected by transmission electron microscope. **Results** The FTH1 gene with the size of 543 bp was successfully amplified and the soluble recombinant protein with molecular weight of 37 ku was obtained. After optimizing the induction conditions, the expressed protein was analyzed by SDS-PAGE. The expression was the highest at 37 °C, IPTG concentration 0.6 mmol/L and induction for 6 h. The purified recombinant protein was ultimately identified using Western blot. The result of transmission electron microscope showed that the purified protein could self-assemble into nanoparticles with the diameter of 10 nm.

**Conclusion** The soluble FTH1 protein was successfully expressed and purified, and it could self-assemble into nanoparticles, which provided a theoretical basis for the development of novel porcine nano vaccines.

**【Key words】** *Sus scrofa* heavy chain ferritin; soluble expression; nanoparticles; self-assembly

\*\*\* 动物传染病是畜禽养殖过程中面临的主要风险, 不仅直接影响着养殖业的健康发展, 而且可能会对公共安全造成严重威胁。疫苗接种是防控此类疾病最有效的措施之一, 但灭活苗和弱毒苗等传统疫苗在制备过程中需要对传染性病原体进行培养、减毒或灭杀, 存在着生产成本高、无法区分自然感染和疫苗免疫动物等缺陷以及潜在的安全风险, 给动物传染病的防控带来困难<sup>[1]</sup>。因此, 迫切需要研制出一种安全高效和价

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 32002302, 31870917); 河南省科技攻关项目 (No. 202102110097); 河南省“疫苗工程”高校科技创新团队项目 (No. 20IRTSTHN024); 南阳师范学院高层次人才启动专项 (No. 2017ZX012)。

\*\* **【通讯作者】** 姚伦广, E-mail: lunguangyao@163.com  
刘阳坤, E-mail: lyk19861211@163.com

**【作者简介】** 岳凯 (1995-), 男, 河南人, 硕士研究生。研究方向: 基因工程疫苗。E-mail: 525120704@qq.com

格低廉的基因工程疫苗,而利用铁蛋白(Ferritin)纳米颗粒开发有效的候选疫苗正是一种备受关注的新兴技术<sup>[2]</sup>。

作为天然的生物纳米颗粒之一,铁蛋白是调控细胞内铁代谢平衡的重要功能蛋白,普遍存在于几乎所有生物<sup>[3]</sup>。铁蛋白结构在动物、植物和微生物中高度保守,主要由矿物质内核和蛋白外壳两部分组成,其中蛋白外壳为一个由24个铁蛋白亚基组成的球形空心笼状结构,其内径和外径分别约为8 nm和12 nm<sup>[4]</sup>。铁蛋白外壳结构稳定,耐受高温(70~80℃)和多种变性剂(尿素、胍类解离剂等)<sup>[5]</sup>。但是,铁蛋白对pH变化敏感,在pH 2.0的酸性条件下会解聚成铁蛋白亚基,当pH恢复到7.0时又重新组装成球形纳米笼结构,这个性质有助于在笼状结构内部包裹一些药物、抗生素等小分子活性物质,实现目标分子的缓释或靶向释放<sup>[6-7]</sup>。铁蛋白纳米笼的外表面也可以通过化学处理或基因融合的方式进行修饰,将诊断指示剂或抗原蛋白展示在笼状结构外表面,应用于疾病诊断和疫苗开发等领域<sup>[8-9]</sup>。近年来,铁蛋白纳米颗粒作为免疫原载体已经成为研究热点,被应用于多种疾病的亚单位疫苗制备<sup>[10-12]</sup>,有望成为一种理想的抗原递呈和疫苗开发平台。

哺乳动物铁蛋白由重链(H)和轻链(L)共同组成,并且不同组织铁蛋白中H链和L链的比例不同:H链多存在于心脏和大脑中,其分子质量为21 ku;L链多存在于肝脏和脾脏中,其分子质量为19 ku<sup>[13]</sup>。人源重链铁蛋白是目前研究最多的一种铁蛋白,已被广泛应用于纳米颗粒疫苗的开发,但是关于猪源铁蛋白的研究报道较少。李滨州等<sup>[14]</sup>利用pET32a原核载体成功表达猪源重链铁蛋白,但主要以包涵体形式表达,可溶性比例较低。本研究拟克隆猪重链铁蛋白基因,利用大肠埃希菌原核表达系统可溶性表达并纯化重组蛋白,通过透射电子显微镜观察纳米颗粒结构的组装,为猪铁蛋白纳米疫苗的研制奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 细菌和载体** 大肠埃希菌 Trans1-T1 和 BL21 (DE3)感受态细胞,以及 pET28a-MsyB 载体均由南阳师范学院河南省畜禽保健品工程技术中心保存。

**1.2 主要试剂** RT-PCR 试剂盒,PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自日本 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自美国 OMEGA Bio-tek 公司;Trizol,限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I,以及蛋白质分子质量标准均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA Marker,

IPTG,氨苄青霉素,卡那霉素及 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;鼠源 Anti-His 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

### 2 方法

**2.1 引物设计与合成** 根据 GenBank 公布的猪重链铁蛋白基因(*Sus scrofa ferritin heavy chain, FTH1*)序列(登录号:NM213975.1),利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物。上游引物:5'-GGATCCATGACGACCTCGTGCTCCTCG-3';下游引物:5'-CTCGAGGCTCTCACTGCTCCCCAGG-3'。下划线处分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,预计扩增片段长度为 555 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**2.2 猪重链铁蛋白基因的 PCR 扩增及克隆** 参照 Trizol 试剂说明书从猪心脏组织中提取总 RNA,通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 浓度、纯度及完整性。以提取的 RNA 为模板,按照 RT-PCR 试剂盒说明书反转录合成 cDNA,以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):cDNA 1 μL,5 × GXL Buffer 10 μL,dNTP Mixture(2 mmol/L)4 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 31 μL。PCR 反应条件:98℃预变性 3 min;98℃变性 10 s,55℃退火 15 s,68℃延伸 30 s,共 32 个循环;68℃延伸 5 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,经胶回收试剂盒纯化回收目的 DNA。回收的 DNA 与 pEASY-Blunt Zero 克隆载体连接后转化大肠埃希菌 Trans1-T1 感受态细胞,经 PCR 和酶切鉴定正确的质粒委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序正确的阳性质粒命名为 pEASY-Blunt-FTH1。

**2.3 pET28a-MsyB-FTH1 重组表达质粒的构建和鉴定** 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 将 pEASY-Blunt-FTH1 质粒和 pET28a-MsyB 载体同时进行双酶切,纯化的酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化至大肠埃希菌 Trans1-T1 感受态细胞。提取重组质粒进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,鉴定正确后命名为 pET28a-MsyB-FTH1。

**2.4 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析** 将重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1 转化大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落至 5 mL 的 LB 培养液中培养,然后取 1 mL 新鲜菌液加入 100 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37℃、180 r/min 恒温振荡培养至菌体 A<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37℃、180 r/min 诱导 6 h;收获菌体重并悬于 1 × PBS 缓冲液(pH7.4)中,超声破碎

(300 W, 工作 5 s, 间歇 5 s, 超声破碎共 5 min) 后 12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, 同时取诱导前重组蛋白为对照, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳观察重组蛋白表达情况并对其进行可溶性分析。

## 2.5 重组蛋白最佳诱导条件的优化

**2.5.1 重组蛋白最佳诱导温度的确定** 取重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1 表达阳性的新鲜菌液按照 1 : 100 的比例接种到 5 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 恒温振荡培养至菌体  $A_{600}$  值为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 分别于 25 °C、30 °C 和 37 °C、180 r/min 诱导 6 h 后收集菌体, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析确定重组蛋白表达最佳诱导温度。

**2.5.2 重组蛋白最佳诱导时间的确定** 取重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1 表达阳性的新鲜菌液按照 1 : 100 的比例接种到 5 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 分别在诱导 3、4、5、6、7 和 8 h 后收集菌体, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析确定重组蛋白表达最佳诱导时间。

**2.5.3 重组蛋白最佳诱导剂浓度的确定** 取重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1 表达阳性的新鲜菌液按照 1 : 100 的比例接种到 5 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 恒温振荡培养至菌体  $A_{600}$  值为 0.6~0.8 时, 分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L 的 IPTG, 于 37 °C、180 r/min 诱导 6 h 后收集菌体, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析确定重组蛋白表达最佳 IPTG 浓度。

**2.6 重组蛋白纯化** 将超声破碎后以可溶性形式表达的重组蛋白上清液用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 然后按照 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒说明书纯化重组蛋白。先用 Binding Buffer 平衡镍层析柱, 然后将过滤后的滤液加入层析柱, 用 Washing Buffer 和 Elution Buffer 洗层析柱, 将洗脱后的液体分别收集并进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

**2.7 纯化蛋白的 Western blot 分析** 将纯化的蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂乳溶液 (TBST 缓冲液配制) 4 °C 封闭过夜; 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入鼠源 Anti-His 单克隆抗体 (1 : 5000), 置 60 r/min 摇床室温孵育 2 h, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 3000), 60 r/min 摇床室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 用 ECL 显色液显色, 在凝胶成像系统上观察并拍照。

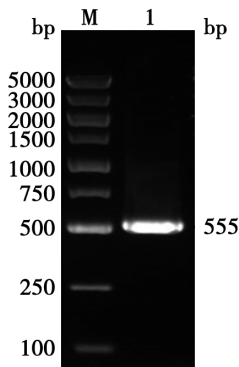
**2.8 纯化蛋白的透射电镜观察** 取 10  $\mu$ L 纯化的重组蛋白滴加到碳覆盖的铜网膜上, 吸附 3~5 min, 用滤纸吸去多余样品; 滴加 ddH<sub>2</sub>O 清洗铜网, 吸去多余

液体; 滴加 1 滴 2% 磷钨酸染色 2 min, 吸取染色液, 室温晾干铜网, 使用透射电子显微镜观察颗粒的形态及大小。

## 结 果

### 1 目的基因 FTH1 的 PCR 扩增与分析

用反转录的猪重链铁蛋白 cDNA 为模板, 用设计的特异性引物进行 PCR 扩增, 用 1.0% 琼脂糖凝胶检测, 扩增片段约为 500 bp, 与预期理论值 (555 bp) 一致 (图 1)。测序表明该猪重链铁蛋白基因的开放性阅读框大小为 543 bp, 编码 181 个氨基酸, pI 值为 6.32。该猪重链铁蛋白基因与 NCBI 上公布的猪重链铁蛋白 (NM213975.1) 同源性为 99.63%。



M DNA 标志物 (Trans2K Plus) 1 FTH1 基因 PCR 产物

图 1 猪 FTH1 基因 PCR 扩增结果

M Trans2K Plus DNA marker 1 PCR amplification product of FTH1 gene

Fig. 1 PCR amplification of *Sus scrofa* FTH1 gene

### 2 pET28a-MsyB-FTH1 重组表达质粒的构建及鉴定

取 pEASY-Blunt-FTH1 质粒和 pET28a-MsyB 载体同时进行双酶切, 纯化的酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1。用 BamH I 和 Xho I 双酶切重组质粒, 得到 5 659 bp 和 555 bp 两条酶切片段 (图 2), 与预期相符, pET28a-MsyB-FTH1 重组表达质粒构建正确。

### 3 融合蛋白的诱导表达及可溶性分析

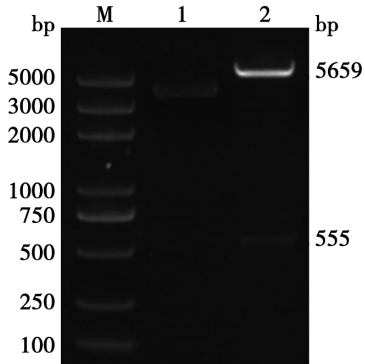
重组原核表达质粒 pET28a-MsyB-FTH1 共编码 329 个氨基酸 (包括 His 标签和 MsyB 促溶标签在内), 理论分子质量约为 37 ku。SDS-PAGE 电泳显示, 重组菌诱导后超声上清和沉淀均在约 37 ku 处出现蛋白带 (图 3), 与预期相符, 而且目的蛋白大部分存在于上清中, 说明融合蛋白主要以可溶性形式表达。

### 4 融合蛋白最佳诱导条件的确定

将重组表达质粒 pET28a-MsyB-FTH1 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 分别对不同诱导温度、诱导时间及 IPTG 浓度诱导表达的目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确定最佳诱导条件。结果显



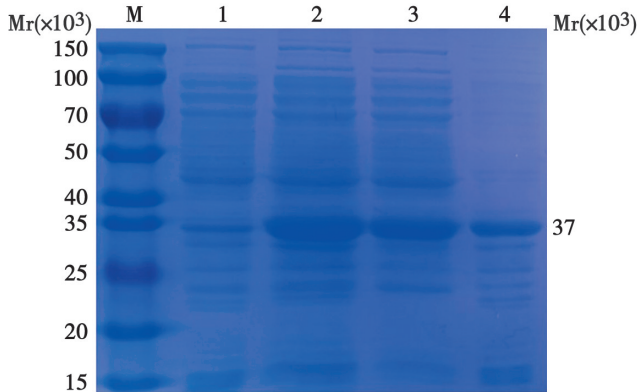
示,重组蛋白的最佳诱导温度为 37 °C (图 4),最佳诱导时间为 6 h(图 5),最佳 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L (图 6)。



M DNA 标志物(Trans2K Plus) 1 pET28a-MsyB-FTH1 未酶切 2 pET28a-MsyB-FTH1 经 BamH I 和 Xho I 双酶切

图 2 重组质粒 pET28a-MsyB-FTH1 双酶切鉴定

M Trans2K Plus DNA marker 1 pET28a-MsyB-FTH1 plasmid 2 pET28a-MsyB-FTH1 plasmid digested by BamH I and Xho I  
Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pET28a-MsyB-FTH1



M 蛋白分子质量标准(15-150 ku) 1 未诱导全菌 2 诱导全菌 3 诱导全菌超声破碎上清 4 诱导全菌超声破碎沉淀

图 3 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

M PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 15 to 150 ku 1 Total cellular protein before IPTG induction 2 Total cellular protein after IPTG induction 3 Induced expression supernatant 4 Induced expression supernatant

Fig. 3 Expression and identification results of recombinant protein

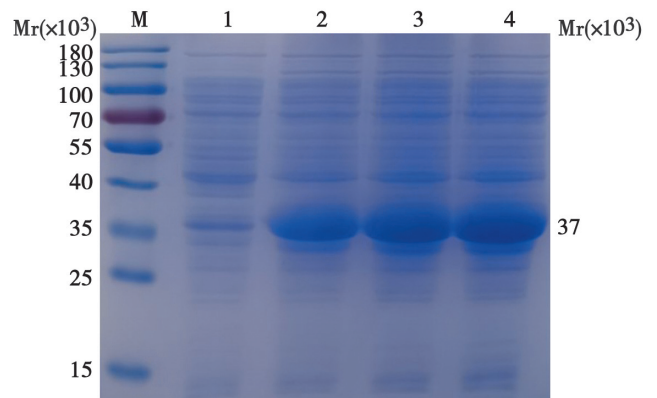
### 5 重组蛋白的纯化及鉴定

对重组菌超声破碎后含有重组蛋白的上清利用镍柱亲和层析进行纯化,收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示,洗脱液中目的蛋白条带较单一(图 7)。经 Western blot 鉴定,该纯化蛋白能与鼠源 Anti-His 单克隆抗体的特异性结合,反应条带位于约 37 ku 处,与预期相符(图 8)。表明纯化的重组蛋白具有反应原性。

### 6 纯化蛋白的透射电镜观察

将纯化的重组蛋白调整蛋白浓度为 0.5 mg/mL,利用透射电子显微镜进行观察,蛋白质呈现为均匀的

纳米级颗粒,粒径约为 10 nm(图 9),与预期的铁蛋白纳米颗粒大小相符。表明通过大肠埃希菌表达系统可溶性表达的猪重链铁蛋白成功组装为纳米颗粒。

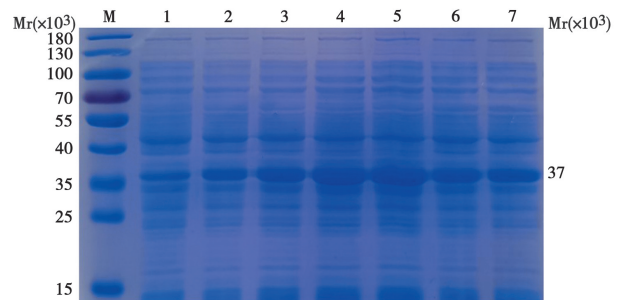


M 蛋白分子质量标准(10-180 ku) 1 未诱导全菌 2 25 °C 诱导的重组菌超声破碎上清 3 30 °C 诱导的重组菌超声破碎上清 4 37 °C 诱导的重组菌超声破碎上清

图 4 不同诱导温度表达的重组蛋白 SDS-PAGE 分析

M PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 ku 1 Total cellular protein before IPTG induction 2 Induced expression supernatant at 25 °C 3 Induced expression supernatant at 30 °C 4 Induced expression supernatant at 37 °C

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein with different induction temperatures



M 蛋白分子质量标准(10-180 ku) 1 未诱导全菌 2~7 分别为 IPTG 诱导 3、4、5、6、7、8 h 的重组菌超声破碎上清

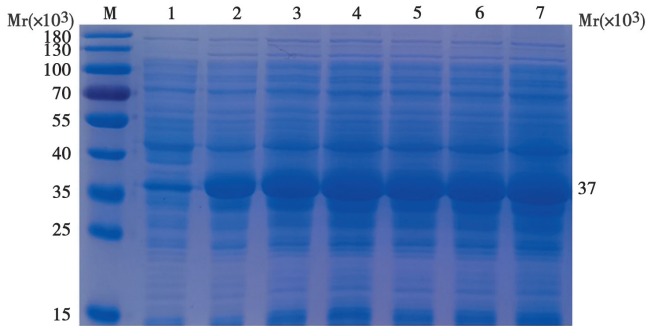
图 5 不同诱导时间表达的重组蛋白 SDS-PAGE 分析

M PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 ku 1 Total cellular protein before IPTG induction 2-7 Supernatant of recombinant protein expressed at 3,4,5,6,7 and 8 h, respectively

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein with different induction time

### 讨论

铁蛋白外壳由 24 个蛋白亚基自组装而成,其中每 3 个蛋白亚基组成一个三聚体亚单位,8 个三聚体亚单位再组装成一个中空的球形结构<sup>[15]</sup>。每个铁蛋白亚基的 N 端暴露于球形结构的外表面,将抗原蛋白通过基因工程的方法与铁蛋白 N 端融合表达后,目标抗原蛋白就会展示到自组装形成的铁蛋白球形结构外表面,形成纳米颗粒疫苗<sup>[8]</sup>。而且由于铁蛋白亚基独特的自组装方式,其 N 端融合表达的抗原蛋白会随着铁蛋白的自组装而形成三聚体结构,这对于表达天然构

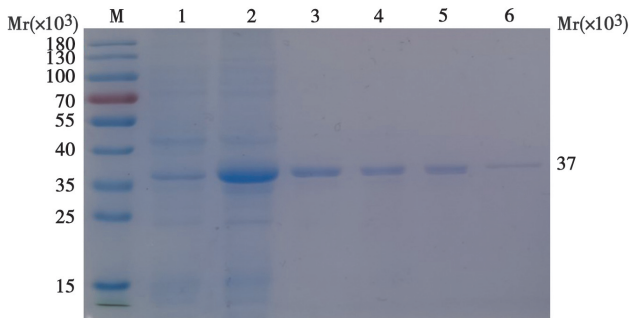


M 蛋白分子质量标准(10-180 ku) 1 未诱导全菌 2~7 IPTG 终浓度依次为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L 诱导 6 h 的重组菌超声破碎上清

图 6 不同 IPTG 浓度诱导表达的重组蛋白 SDS-PAGE 分析

M PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 ku 1 Total cellular protein before IPTG induction 2-7 Supernatant of recombinant protein expressed at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 mmol/L, respectively

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant protein with different IPTG concentrations

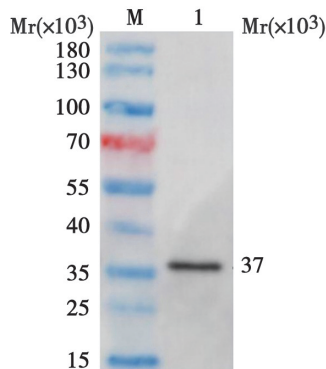


M 蛋白分子质量标准(10-180 ku) 1 未诱导全菌 2 诱导后全菌 3~6 重组菌超声破碎上清第 1~4 次洗脱液

图 7 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 ku 1 Total cellular protein before IPTG induction 2 Total cellular protein after IPTG induction 3-6 The 1st to the 4th elution of Elution Buffer, respectively

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant protein purification



M 蛋白分子质量标准(10-180 ku) 1 纯化重组蛋白与鼠源 Anti-His 单克隆抗体反应条带

图 8 纯化蛋白的 Western blot 分析

M PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 ku 1 Purified protein

Fig. 8 Western blotting analysis of purified protein

象为三聚体的抗原来说具有显著优势,可以最大程度还原抗原蛋白的构象表位,有利于提高其免疫原性<sup>[16-17]</sup>。同时,铁蛋白由于其耐高温和对 pH 敏感的特性还可以被应用于口服疫苗的开发。总之,基于铁蛋白纳米颗粒的研究工作,为以后抗原递呈和疫苗研发提供了一种新的思路。

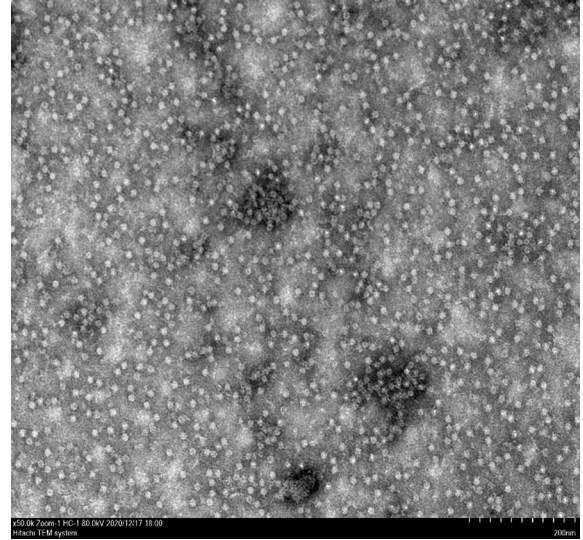


图 9 透射电子显微镜观察重组蛋白纳米结构

Fig. 9 Transmission electron microscope observation of recombinant protein nanoparticle

为了搭建铁蛋白纳米颗粒平台,可利用多种表达系统对铁蛋白进行体外表达<sup>[18-21]</sup>。在这些表达系统中,大肠埃希菌具有遗传背景清楚、操作简单、生长繁殖速度快、成本低廉、可快速大规模生产等优势,非常适用于铁蛋白的生产,是目前铁蛋白表达的首要选择。然而,目前成功表达的铁蛋白主要来源于人和细菌(幽门螺旋杆菌、激烈火球菌、大肠埃希菌等),其它物种来源的铁蛋白的研究报道较少<sup>[2]</sup>。考虑到选择宿主来源的铁蛋白作为抗原递呈载体,在疫苗免疫后会将诱导铁蛋白自身免疫的可能性最小化,本研究利用 RT-PCR 克隆了猪重链铁蛋白基因,并选择 pET-28a(+) 原核表达系统进行蛋白的重组表达。

铁蛋白原核表达大多以包涵体形式存在,而包涵体纯化涉及到变性和复性,不仅操作繁琐,而且使用的变性剂和去垢剂等可能会影响蛋白质性质,这对于蛋白的进一步应用是不利的<sup>[22]</sup>,因此提高铁蛋白的可溶性是原核表达系统迫切需要解决的技术问题。研究表明,MsyB 是大肠埃希菌中存在的极酸性多肽,可使融合蛋白的净负电荷增加,提高亲水性,增加融合蛋白的可溶性<sup>[23]</sup>。有研究报道 MsyB 可使单独表达时以包涵体形式存在的牛肠激酶(bovine enterokinase, EK)和烟草蚀纹病毒蛋白酶(Tobacco etch virus protease, TEV)的可溶性表达量超过总表达量的 60%<sup>[23-24]</sup>。因

此,为了促进铁蛋白的可溶性表达,本试验将 MsyB 标签与猪重链铁蛋白进行了融合表达。结果显示,利用带有 MsyB 标签的原核表达质粒在 37 °C 条件下可获得高效可溶性表达的重组猪重链铁蛋白。表明极酸性多肽 MsyB 显著提高了猪重链铁蛋白的可溶性,可为其它包涵体蛋白的可溶性表达提供参考。

本研究利用原核表达系统可溶性表达猪重链铁蛋白,通过多次摸索不同诱导温度、诱导时间及 IPTG 浓度,最终确定在 37 °C 和 IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L 的条件下诱导 6 h,蛋白表达量较高。将表达的蛋白纯化后进行 Western blot 分析,显示该蛋白能被鼠源 Anti-His 单克隆抗体识别,即具有反应原性。纯化的融合蛋白通过透射电子显微镜可观察到大小均一的颗粒,其粒径约 10 nm,与人重链铁蛋白大小相近<sup>[25]</sup>。表明猪重链铁蛋白成功组装为纳米颗粒。

综上所述,本研究利用大肠埃希菌原核表达系统可溶性表达了猪重链铁蛋白,纯化的重组蛋白纯度较高且具有反应原性,透射电镜观察该蛋白在体外自组装为具有纳米结构的铁蛋白纳米颗粒,为融合抗原蛋白制备新型疫苗研究奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] Vanderwaal K, Deen J. Global trends in infectious diseases of swine[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115 (45): 11495-11500.
- [2] Rodrigues MQ, Alves PM, Roldao A. Functionalizing ferritin nanoparticles for vaccine development[J]. Pharmaceutics, 2021, 13 (10): 1621.
- [3] Munro HN, Linder MC. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism[J]. Physiol Rev, 1978, 58(2): 317-396.
- [4] Banyard SH, Stammers DK, Harrison PM. Electron density map of apoferritin at 2.8-Å resolution[J]. Nature, 1978, 271(5642): 282-284.
- [5] Stefanini S, Cavallo S, Wang C, et al. Thermal stability of horse spleen apoferritin and human recombinant H apoferritin [J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 325(1): 58-64.
- [6] Khoshenjad M, Parhiz H, Shuvaev VV, et al. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting[J]. J Control Release, 2018(282): 13-24.
- [7] Zhang B, Tang G, He J, et al. Ferritin nanocage: A promising and designable multi-module platform for constructing dynamic nano-assembly-based drug nanocarrier[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2021(176): 113892.
- [8] Nguyen QD, Kikuchi K, Maity B, et al. The versatile manipulations of self-assembled proteins in vaccine design[J]. Intern J Mol Sci, 2021, 22(4): 1934.
- [9] Pan J, Cui Z. Self-assembled nanoparticles: Exciting platforms for vaccination[J]. Biotechnol J, 2020, 15(12): e2000087.
- [10] Kang YF, Sun C, Zhuang Z, et al. Rapid development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates[J]. ACS Nano, 2021, 15(2): 2378-2752.
- [11] Ma H, Li X, Li J, et al. Immunization with a recombinant fusion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modified GP5 and ferritin elicits enhanced protective immunity in pigs[J]. Virology, 2021(552): 112-120.
- [12] Chen Y, Hu Y, Chen H, et al. A ferritin nanoparticle vaccine for foot-and-mouth disease virus elicited partial protection in mice [J]. Vaccine, 2020, 38(35): 5647-5652.
- [13] Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein[J]. Blood, 2002, 99(10): 3505-3516.
- [14] 李滨州, 和春昊, 吴秋玲, 等. 猪源铁蛋白重链亚基纳米粒的制备 [J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(3): 361-365.
- [15] Towe KM. Structural distinction between ferritin and iron-dextran (imferon). An electron diffraction comparison[J]. J Biol Chem, 1981, 256(18): 9377-9378.
- [16] Malladi SK, Patel UR, Rajmani RS, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a highly thermotolerant, trimeric SARS-CoV-2 receptor binding domain derivative[J]. ACS Infect Dis, 2021, 7(8): 2546-2564.
- [17] Lim J, Cheong Y, Kim YS, et al. RNA-dependent assembly of chimeric antigen nanoparticles as an efficient H5N1 pre-pandemic vaccine platform[J]. Nanomedicine, 2021(37): 102438.
- [18] Powell AE, Zhang K, Sanyal M, et al. A single immunization with spike-functionalized ferritin vaccines elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in mice[J]. ACS Central Sci, 2021, 7(1): 183-199.
- [19] Ma H, Li X, Li J, et al. Immunization with a recombinant fusion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modified GP5 and ferritin elicits enhanced protective immunity in pigs[J]. Virology, 2020(552): 112-120.
- [20] Kim YS, Son A, Kim J, et al. Chaperone-mediated assembly of ferritin-based Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus nanoparticles[J]. Front Immunol, 2018(9): 1093.
- [21] He L, Lin X, Wang Y, et al. Single-component, self-assembling, protein nanoparticles presenting the receptor binding domain and stabilized spike as SARS-CoV-2 vaccine candidates[J]. Sci Adv, 2021, 7(12): eabf1591.
- [22] Singhvi P, Saneja A, Srichandan S, et al. Bacterial inclusion bodies: A treasure trove of bioactive proteins[J]. Trend Biotechnol, 2020, 38(5): 474-486.
- [23] Zou ZR, Cao LJ, Zhou P, et al. Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in Escherichia coli[J]. J Biotechnol, 2008, 135 (4): 333-339.
- [24] Zhang YB, Howitt J, Mccorkle S, et al. Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge[J]. Prot Exp Purificat, 2004, 36(2): 207-216.
- [25] 李凯, 许汪, 于潼, 等. 重组人重链铁蛋白纳米粒的构建、表达及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(9): 877-880.

【收稿日期】 2022-03-21 【修回日期】 2022-06-06