



牛樟芝免疫调节蛋白的过量表达及活性分析

李彩彩¹, 朱聪¹, 杨国栋¹, 吴剑锋¹, 王晶晶¹, 乔悦¹, 付牧然¹, 崔宣宣¹,
董冰雪^{1,2*}

¹南阳师范学院生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473061

²河南省菌类食品工程技术研究中心, 河南 南阳 473061

摘要: 【目的】用大肠杆菌高效表达牛樟芝免疫调节蛋白(*Antrodia camphorata* immunomodulatory protein, ACA)。【方法】借助DNAworks3.2.4设计引物合成大肠杆菌密码子偏好性的ACA基因, 构建于pET-32a和pGEX-4t-2, 转化大肠杆菌, 测序后分别命名为pET-32a-ACA/BL21和pGEX-4t-2-ACA/BL21; 探索密码子偏好性、载体、培养基种类和诱导条件对ACA表达的影响并使用响应面法优化蛋白表达。纯化重组ACA (recombinant ACA, rACA)并干预小鼠巨噬细胞RAW264.7, 通过测定rACA对巨噬细胞增殖能力、吞噬能力、细胞形态及产NO、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF α)、白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等细胞因子能力的影响来评估rACA的活性。【结果】pET-32a-ACA/BL21更适合ACA表达; 在优化的SOB (酵母粉8.92 g/L)中培养pET-32a-ACA/BL21, 添加0.42 mmol/L IPTG 25 °C诱导7 h时rACA以可溶性表达为主, 产量达187.122 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 是目前大肠杆菌表达真菌免疫调节蛋白的最高报道。纯化的rACA能显著促进小鼠巨噬细胞增殖、提高细胞的吞噬活性和改变细胞形态, 显著诱导巨噬细胞分泌NO、TNF- α 和IL-1 β 。【结论】rACA的高效可溶性表达及类似天然ACA的活性使它可以替代天然ACA作为制药行业的食品添加剂或者免疫调节剂, 甚至可以用于药物研究。

关键词: 牛樟芝免疫调节蛋白, 密码子偏好性, 原核表达, 响应面分析, 免疫调节

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*), 又名樟芝, 血脂^[13]、消炎^[14–16]和治疗腹泻^[17]等功效, 其抗肿瘤和免疫调节功效已成为研究热点^[18]。牛樟芝是多孔菌科、台芝属的一种珍稀药用真菌^[1], 具有抗肿瘤^[2]、抗癌^[3–9]、护肝^[10–11]、抗氧化^[12]、降是台湾特有的地道药材, 被称为“森林中的红宝

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(21A180020, 20A180022); 南阳师范学院 2018 年博士专项(18013); 河南省菌类食品工程技术研究中心开放课题(2019HM0010, HM2020-001)

*通信作者。Tel: +86-377-63513726; E-mail: dongbingxue2004@163.com

收稿日期: 2020-08-29; 修回日期: 2020-11-04; 网络出版日期: 2020-12-14

石”^[19]，拥有丰富的次级代谢产物，目前对其产物的研究多集中在多糖和萜类物质^[1]，关于蛋白质的研究相对较少。牛樟芝免疫调节蛋白 (*Antrodia cinnamomea* immunomodulatory protein, ACA) 是一种从牛樟芝中分离出的小分子蛋白质，和真菌免疫调节蛋白 (fungal immunomodulatory protein, FIP) 同源，能增强巨噬细胞的吞噬活性，诱导巨噬细胞产生 NO、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)，促进巨噬细胞的 M1 极化和分化^[20]。ACA 诱导巨噬细胞所分泌的细胞因子可直接用于杀灭肿瘤细胞；M1 型巨噬细胞具有很强的肿瘤杀伤能力和抗原递呈能力，在肿瘤免疫治疗中发挥着重要作用^[21]，因此 ACA 是一种重要的免疫调节剂，临床应用潜力巨大。

天然牛樟芝中免疫调节蛋白含量低^[20]，直接从牛樟芝提取 ACA 费时费力、效率低、成本高，限制了研究工作的进行；更为遗憾的是天然牛樟芝寄主专一，仅生于中国台湾树龄百年以上的牛樟树 (*Cinnamomea kanehirai*) 腐朽树干^[22]，生长极其缓慢，人工培养困难。有效生产方法的缺乏使得 ACA 相关的药理学研究仍然很少，在临床上的应用也亟待开发，这就需要有一个合适的表达系统低成本、高水平表达 ACA。ACA 上的糖基对巨噬细胞活性影响不大^[20]，生物信息学分析显示 ACA 与南方灵芝免疫调节蛋白 (*Ganoderma australe* contig13717) 相似，相比其它 FIPs 翻译后修饰较少^[23]，更适合使用原核细胞进行表达。真核基因在原核细胞的成功表达受多种因素的影响，目前使用大肠杆菌高效表达可溶性 rACA 尚未见报道。

使用大肠杆菌表达蛋白时基因表达水平与

密码子偏好性密切相关，密码子的优化可以解决表达量低和形成包含体等问题^[24]。本实验根据报道的 ACA (登录号 AAT11911.1) 氨基酸序列，借助 DNAsworks 3.2.4 在线软件设计基因拼接引物，合成大肠杆菌密码子偏好性 ACA，构建于不同原核表达载体转化大肠杆菌，通过选择密码子偏好性、载体、培养基种类、诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度并借助响应面法进一步优化蛋白表达等措施实现了 ACA 在大肠杆菌中的高效可溶性表达；使用多种手段对纯化后 rACA 进行了生物活性验证。大肠杆菌表达 ACA 具有周期短、成本低和效率高的特点，为 ACA 的产业化生产、药理研究及临床应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞和菌株：质粒 pET-32a 为本实验室保存，pGEX-4t-2 由中山大学李刚博士惠赠；小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购于广州细胞库；大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3) plys 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器：质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Omega 公司；限制性内切酶、高保真 Primstar 酶购自 TaKaRa 公司；Ni-IDA 琼脂糖磁珠购于英芮诚生化公司；胎牛血清购自 Gibco 公司；酵母粉、蛋白胨购自 oxiford 公司，总一氧化氮检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；小鼠 TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购自上海邦奕；超滤膜购自 Minipore 公司；Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、中性红、小牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、噻唑蓝 (MTT)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自 Sigma 公司；胰蛋白酶-EDTA 消化液、双抗 (Pen,

Strep)购自索莱宝公司; DMEM 培养基购自 HyClone 公司; 其他试剂进口分析纯。PCR 仪购自 Eppendorf 公司; NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计、相差倒置显微镜、多功能酶标仪和二氧化碳细胞培养箱购自 Thermo Scientific 公司; 电泳仪和凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司。

1.2 ACA 表达载体的构建及表达条件的优化

借助 DNAworks 3.2.4 软件设计大肠杆菌密码子偏好性 ACA 基因拼装引物, 两端加上 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点, 使用实验室构建的基因合成及定点突变平台进行基因合成^[25], 连接至 pMD18-T 载体测序。将测序正确的 ACA 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接至用同样的酶处理过的 pET-32a 和 pGEX-4t-2, 电击转化大肠杆菌 BL21(DE3) plys, 测序后分别命名为 pET-32a-ACA/BL21 和 pGEX-4t-2-ACA/BL21。两种载体表达出的蛋白根据标签分别标记为 His-rACA 和 GST-rACA。为了验证密码子偏好性的影响, 使用类似的方法合成了 ACA 的全长 cDNA 序列, 连接在 pET-32a 转化大肠杆菌, 作为对照。蛋白表达条件优化参考前期工作^[26], IPTG 浓度设置为 0–1.4 mmol/L, 分别在 20、25、30、37 °C 下 200 r/min 诱导 3、5、7、9、11 h, 超声波破碎细胞离心取上清, 检测蛋白浓度。

1.3 目标蛋白浓度检测

以 BSA 为标准蛋白, 使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒检测上清总蛋白浓度; 目标蛋白含量使用 Bio-Rad 凝胶成像系统扫描分析、计算。

1.4 培养基种类对 ACA 表达的影响

分别使用 LB、SOB、2YT 和 TB 四种常用培养基培养工程菌, 添加 IPTG 0.6 mmol/L, 25 °C

下诱导 pET-32a-ACA/BL21 表达蛋白, 测目标蛋白浓度。

1.5 SOB 培养基诱导条件的优化

1.5.1 PB 设计: 采用 PB 两水平法对影响 His-rACA 表达的 SOB 培养基中 5 种成分及 IPTG 浓度共 6 个因素进行考察, 筛选主要影响因素。PB 试验因素和水平见表 1, 设计方案见表 2, 每个实验 3 个重复。使用“Design expert 8.0”软件进行数据分析。

1.5.2 最陡爬坡试验: 对 PB 试验筛选出的影响 His-rACA 产量的主要因素进行最陡爬坡试验, 根据因素的效应和实际结果设置步长, 进一步优化实验, 影响较小的因素使用“-1”水平。

1.5.3 CCD 试验设计: 根据中心组合设计原理, 以最陡爬坡试验得到的最佳值为中心点, 对影响 His-rACA 表达的主要因素进行响应面分析设计, 确定蛋白的最适表达条件。实验设计、数据分析和模型构建使用“Design expert 8.0”软件进行。

表 1. PB 试验中与重组樟芝免疫调节蛋白产量相关的因素及水平

Table 1. Factors and levels related to rACA protein production in PB experiment

Experiment No.	Factors	Levels	
		-1	1
A	Tryptone/(g/L)	20	40
B	Yeast extract/(g/L)	5	10
C	NaCl/(g/L)	0.5	0.75
D	KCl/(mmol/L)	2.5	3.75
E	MgCl ₂ /(mmol/L)	10	15
F	IPTG/(mmol/L)	0.4	0.8
G	G	-1	1
H	H	-1	1
J	J	-1	1
K	K	-1	1
L	L	-1	1

表 2. PB 试验的设计与结果
Table 2. PB design and their results

Experiment No.	Factors and levels											Yield of His-rACA/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	144.716 \pm 0.250
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	133.108 \pm 0.160
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	130.386 \pm 0.250
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	116.872 \pm 0.260
5	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	122.246 \pm 0.230
6	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	94.658 \pm 0.180
7	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	105.986 \pm 0.190
8	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	101.352 \pm 0.140
9	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	113.418 \pm 0.270
10	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	108.432 \pm 0.140
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	132.276 \pm 0.250
12	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	100.364 \pm 0.160

These tests were all conducted for 3 times, average values and variance were calculated based on tested data.

1.5.4 拟合度实验: 主要影响因素采用软件推荐最适值, 其他因素使用“-1”低水平, 每个实验 3 个重复, 分析预测值和真实值之间的拟合程度。

1.6 蛋白的纯化、检测及浓度测定

His-rACA 和 His-tag 蛋白纯化参照英芮诚公司的 Ni-IDA 琼脂糖磁珠使用说明书进行。SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度, 使用超滤膜通过多次浓缩稀释将缓冲液更换为 DMEM 培养基。使用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测定纯化 His-rACA 和 His-tag 的蛋白浓度 [$\epsilon_{\text{ACA}}=2.0190 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, $\epsilon_{\text{His-tag}}=3.3960 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$]。

1.7 小鼠巨噬细胞培养

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 使用添加了双抗 (100 U/mL 青霉素 G、100 mg/mL 链霉素) 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% 二氧化碳、37 °C

培养。

1.8 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响

细胞活性检测采用 MTT 法^[27]。将对数生长期 RAW264.7 细胞按照大约 $2.5 \times 10^5 \text{ cell}/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板中, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 置于 CO₂ 培养箱 37 °C 培养至 80% 细胞贴壁, 移去旧培养基, 设置空白对照组 (DMEM 培养液)、阳性对照组 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS) 组、rACA 组 (10、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 His-tag 组 (10、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理细胞, 24 h 后弃上清, 每孔加入 MTT (5 mg/mL 溶于 PBS) 工作液 30 μL , 继续培养 4 h 后弃去 MTT, 每孔加入 DMSO 200 μL 溶解结晶染料, 摇床避光振荡 15 min, 酶标仪 570 nm 处测定吸光度值, 计算细胞活力, 每个实验重复 3 次。

1.9 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 形态的影响

rACA 组和 His-tag 组处理选 25 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两个浓度, 细胞培养和处理方法参考 1.8, 每组设置 3 个复孔, 24 h 后用相差倒置显微镜放大 200 倍拍照进行形态观察。

1.10 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性的影响

采用中性红法^[28]检测细胞吞噬活性: 细胞培养和处理参照方法 1.8, 24 h 后弃上清, 用 PBS 洗两次, 加入 100 μL 0.1% 的中性红溶液, CO_2 培养箱孵育 30 min, 用 150 μL PBS 洗 2 次, 再加入细胞裂解液(冰醋酸: 无水乙醇=1:1) 100 μL , 水平摇床振荡 30 min, 540 nm 测吸光值, 计算吞噬能力, 每个实验 3 个重复。

1.11 NO 释放量

取对数生长期的巨噬细胞 RAW264.7, 按 2.5×10^5 cell/mL 浓度接种于 96 孔板, 每孔加 100 μL 细胞悬液, 置于二氧化碳培养箱内 37 $^\circ\text{C}$ 培养, 待 80% 以上细胞贴壁后, 移去完全培养液并用 PBS 清洗 3 次。设空白对照组(DMEM 培养基)、阳性对照组(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 溶液)、rACA 组(1、2、3、5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 His-tag 组(1、2、3、5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 各 200 μL , 每组设 6 个复孔, 培养 24 h 后收集上清液, 按照一氧化氮试剂盒的说明书测定细胞一氧化氮释放量。

1.12 肿瘤坏死因子 TNF- α 产生实验

细胞培养和处理参考方法 1.11, 培养 24 h 后收集上清液, 使用小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒检测 TNF- α 浓度。

1.13 IL-1 β 产生实验

细胞培养和处理参考方法 1.11, 培养 24 h 后收集上清液, 使用小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 浓度。

1.14 数据处理

使用 GraphPad Prism6 软件进行数据处理与分析, 数据用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(*), $P < 0.001$ 为极显著(**), $P < 0.0001$ (***)。

2 结果和分析

2.1 密码子偏好性和载体对 ACA 表达的影响

以 LB 为培养基、pET-32a 为载体产 His-rACA 最适条件为: 待大肠杆菌生长至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时添加 0.6 mmol/L IPTG 在 25–30 $^\circ\text{C}$ 诱导 7 h, 此时蛋白以可溶性表达为主。从 SDS-PAGE 结果可以看出无论是 25 $^\circ\text{C}$ 还是 30 $^\circ\text{C}$ 诱导蛋白表达, 密码子优化后得到的 His-rACA 量都远大于优化前(图 1-A), 所以后续工作选用密码子优化后的 ACA 基因表达蛋白。不同表达载体表达 rACA 能力不同。使用 pGEX-4t-2 表达可溶性 GST-rACA 的最适条件为: 添加 0.4 mmol/L IPTG 在 30 $^\circ\text{C}$ 诱导 7 h。分别在产 His-rACA 和产 GST-rACA 最适条件下同时诱导 pET-32a-ACA/BL21 和 pGEX-4t-2-ACA/BL21, His-rACA 产量均高于 GST-rACA (图 1-B), 后续工作使用 pET32a-ACA/BL21 进行 rACA 的表达。

2.2 培养基种类对 rACA 表达的影响

LB、TB、SOB 和 2YT 4 种常用培养基都能够用于表达 His-rACA, 四者的产蛋白能力依次为: SOB>TB>LB>2YT (图 2)。培养基中酵母粉的

品质和含量对蛋白诱导表达有较大影响^[29],不同培养基表达同一蛋白时最适 IPTG 浓度可能会有所不同,为得到更高的蛋白表达量使用响应面法对 SOB 培养基产 His-rACA 条件进一步进行优化。

2.3 使用 SOB 表达蛋白条件优化

2.3.1 PB 试验结果: 使用优化前的 SOB 培养基诱导表达 rACA 的产量为 137.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$,采用 PB

试验中 12 种条件下诱导 His-rACA 表达量为 $94.658\pm 0.18\text{--}144.716\pm 0.25\ \mu\text{g}/\text{mL}$,使用软件进行分析和建模,结果见表 3。从表中可以看出所构建模型显著($P<0.05$);6 个和蛋白表达相关的因素中有 2 个因素(酵母粉和 IPTG 浓度)对 His-rACA 表达影响显著。选酵母粉和 IPTG 浓度作为影响蛋白表达的主因素进行最陡爬坡设计。

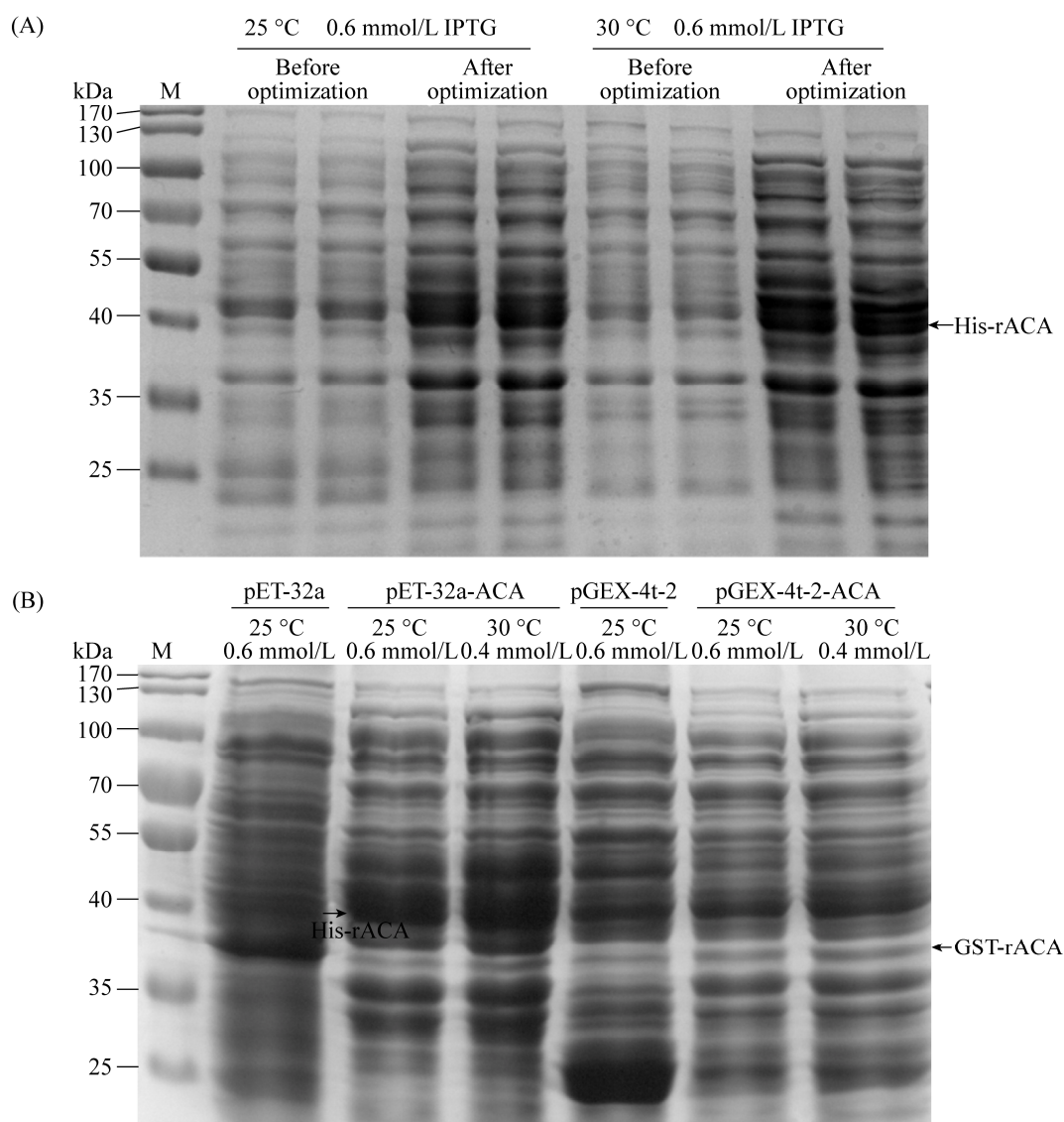


图 1. 密码子偏好性(A)和载体(B)对 rACA 表达的影响

Figure 1. Effects of codon bias (A) and vectors (B) on the expression of rACA. M: standard protein molecular mass markers (sites in kilodaltons are indicated on the left).

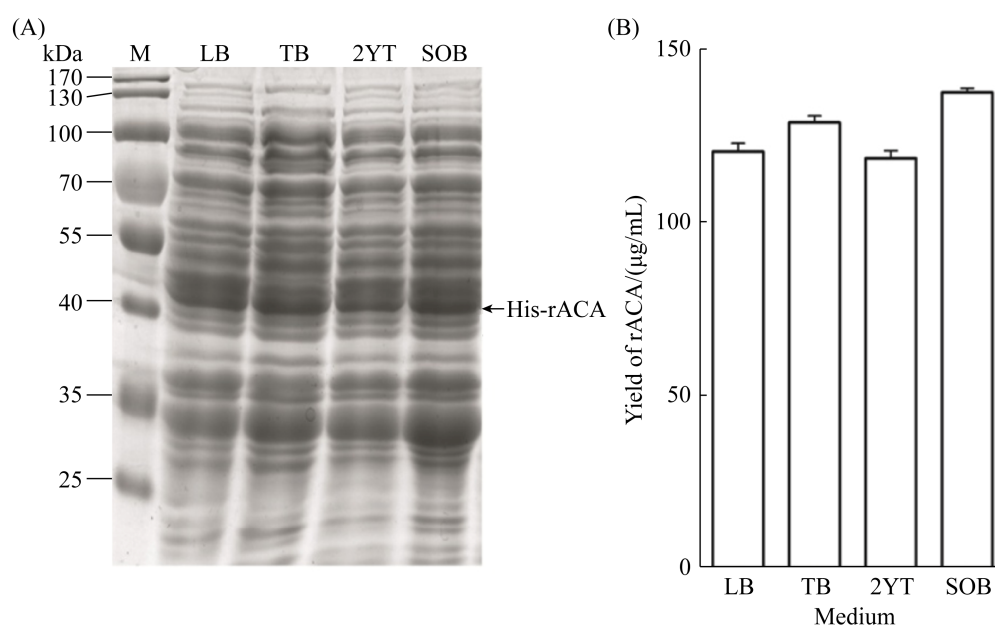


图 2. 培养基种类对 His-rACA 表达的影响

Figure 2. The effect of mediums on the expression of His-rACA. A: SDS-PAGE analysis of rACA expression with different medium. M: standard protein molecular mass markers (sites in kilodaltons are indicated on the left); B: yield of His-rACA; Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD.

表 3. PB 设计试验结果的方差分析表

Table 3. ANOVA table for PB design

Factors	Sum of squares	Degress of ferrdom	Mean squares	F-Value	P-value	Significance
Model	540.32	5	108.06	4.85	0.0403	Significant
A-tryptone	8.96	1	8.96	0.4	0.5493	
B-yeast extract	134.83	1	134.83	6.05	0.0491	
C-NaCl	80.8	1	80.8	3.63	0.1056	
D-KCl	27.22	1	27.22	1.22	0.3114	
F-IPTG	288.51	1	288.51	12.95	0.0114	
Residual	133.7	6	22.28			
Cor total	674.02	11				

2.3.2 最陡爬坡试验结果: 酵母粉和 IPTG 的步长分别设置为 1 g/L 和 0.1 mmol/L, 最陡爬坡的试验设计和结果见表 4。最陡爬坡试验中试验 5 的蛋白产量最高(179.45 ± 0.21 $\mu\text{g/mL}$), 所以以该试验对应的酵母粉含量(9 g/L)和 IPTG 浓度(0.4 mmol/L)为中心点进行后续的响应面试验设计。

表 4. 最陡爬坡试验的设计与结果

Table 4. The steepest ascent experimental design and corresponding results

Experiment No.	Yeast extract/(g/L)	IPTG/(mmol/L)	Yield of His-rACA/($\mu\text{g/mL}$)
1	5	0.8	129.96 ± 0.37
2	6	0.7	152.20 ± 0.30
3	7	0.6	169.04 ± 0.35
4	8	0.5	177.85 ± 0.44
5	9	0.4	179.45 ± 0.21
6	10	0.3	170.13 ± 0.31

2.3.3 中心组合设计及响应面分析结果：用 Design Expert 8.0 软件对中心组合试验结果(表 5)进行二次多元回归拟合，得到 His-rACA 产量 Y 与 2 因素 X_1 (酵母粉)和 X_2 (IPTG 浓度)之间的二次回归方程： $Y=186.11-3.29X_1+8.46X_2-6X_1X_2-27.25X_1^2-26.34X_2^2$ ，回归方程中各变量对响应值影响的显著性由 F 检验来判定。从方差分析表(表 6)中的 P 值可以看出 X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_1X_2 对响应值影响显著，在 His-rACA 表达中 IPTG 浓度对响应值影响最大，且酵母粉含量和 IPTG 浓度之间交互作用显著。

本实验所选用模型效果极显著($P<0.0001$)， $R^2=0.9849$ ，说明方程能解释 98.49%的实验所得 His-rACA 产量变化，拟合度良好(lack of fit 不显著)。因此可以使用该模型替代真实试验点对 His-rACA 表达量进行分析、预测，寻找 His-rACA 表达的最适条件。

利用软件 Design expert 8.0 还可以得到酵母粉和 IPTG 浓度两个因素和它们的响应值之间的等高线(图 3-A)和响应面图(图 3-B)。根据 3D 响

表 5. 中心组合试验设计及试验结果

Table 5. Experimental design and central composite design data

Experiment No.	Factor level		Yield of His-rACA/ ($\mu\text{g/mL}$)
	X_1 : Yeast extract/(g/L)	X_2 : IPTG/(mmol/L)	
1	0 (9)	0(0.4)	185.61 \pm 0.16
2	0	0	189.97 \pm 0.32
3	0	1.414 (0.54)	146.79 \pm 0.17
4	0	0	187.12 \pm 0.23
5	0	0	182.89 \pm 0.25
6	0	-1.414 (0.26)	124.63 \pm 0.18
7	1.414 (10.41)	0	133.60 \pm 0.22
8	-1 (8)	1 (0.5)	151.68 \pm 0.18
9	1 (10)	1	126.96 \pm 0.24
10	-1	-1 (0.3)	121.53 \pm 0.26
11	-1.414 (7.59)	0	134.20 \pm 0.22
12	0	0	184.98 \pm 0.33
13	1	-1	120.80 \pm 0.29

应面图可以看出 X_1 和 X_2 存在极点值,通过软件可以计算出最大响应值对应的酵母粉用量和 IPTG 浓度分别为 8.92 g/L 和 0.42 mmol/L。此时预测 His-rACA 产量为 186.961 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 6. 响应面法所建二项式模型的方差分析表

Table 6. ANOVA table for response surface quadratic mode

Factors	Sum of	df	Mean	F -value	P -value	Significance
Model	9643.20	5	1928.64	91.07	< 0.0001	Significant
X_1 -Yeast extract	86.54	1	86.54	4.09	0.0829	
X_2 -IPTG	572.26	1	572.26	27.02	0.0013	
X_1X_2	143.94	1	143.94	6.80	0.0351	
X_1^2	5165.05	1	5165.05	243.89	<0.0001	
X_2^2	4827.65	1	4827.65	227.96	<0.0001	
Residual	148.24	7	21.18			
Lack of fit	120.44	3	40.15	5.78	0.0617	Not significant
Pure error	27.80	4	6.95			
Cor total	9791.44	12				

$R^2=0.9849$.

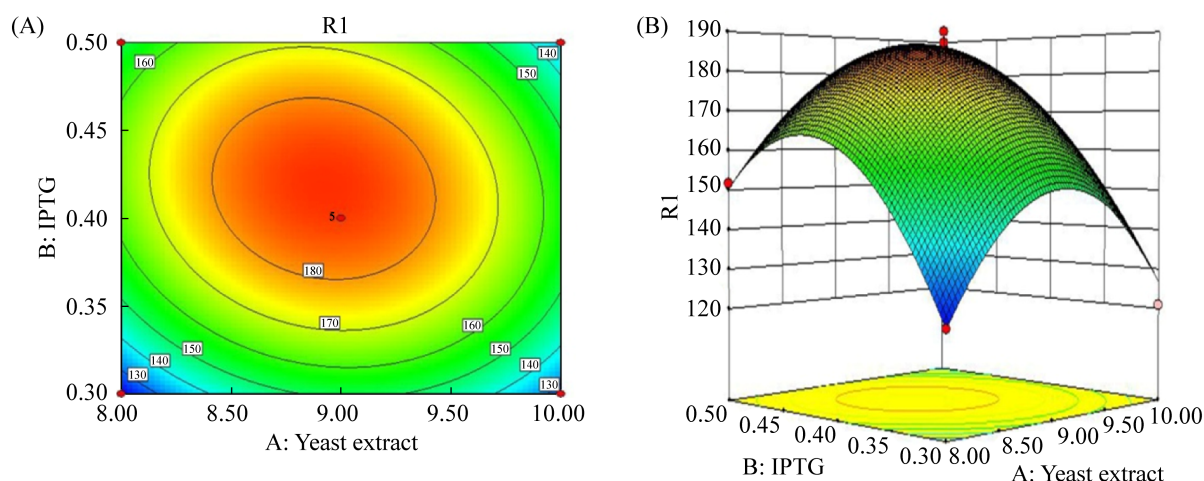


图 3. 响应面(X_1 , X_2)等高线(A)和三维分析图(B)

Figure 3. Contour pattern (A) and three-dimensional surface pattern (B) derived using response surface methodology (X_1 , X_2).

2.3.4 拟合度: 摇瓶实验结果显示, 3 个平行的 His-rACA 表达量接近, 平均产 His-rACA 量为 187.122 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 和预测值拟合度良好。

2.4 蛋白纯化及浓度测定

使用 Ni-IDA 磁珠纯化 rACA 和 His-tag 后都得到单一条带, rACA 大小约为 41 kDa (图 4-A), 和软件推测值加上 Trx 标签和 6 \times His 标签之和相符; His-tag 大小约 25 kDa (图 4-B)。使用超滤法更换缓冲液浓缩后测得 rACA 蛋白浓度为 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$; His-tag 的浓度为 850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖和细胞形态的影响

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以内的 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 没有毒性, 并且能明显促进小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖($P < 0.0001$), 其中 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rACA 对巨噬细胞的增殖活性最强(137.9%), 略低于 LPS (142.9%); His-tag 对细胞增殖几乎没有影响(图 5)。显微观察发现使用 rACA 和 LPS 处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 相似, 处理后 rACA

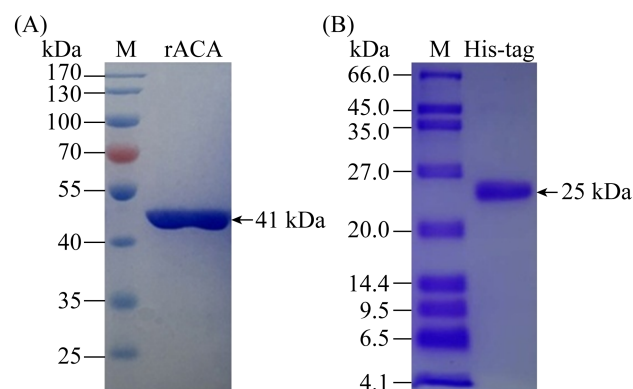


图 4. 纯化后重组 ACA (A)和 His-tag (B)的 SDS-PAGE 分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis of purified recombinant ACA (A) and His-tag (B). M: standard protein molecular mass markers (sizes in kilodaltons are indicated on the left); rACA: recombinant ACA purified by Ni-IDA enriching beads; His-tag: His-tag purified by Ni-IDA enriching beads.

组细胞数量比对照组明显增多, 印证了 rACA 可以促进细胞增殖; 细胞形态也发生了明显改变: 出现膨大、变形和双核现象, 甚至伸出明显的伪足, 在形态上有发生极化的特征; 经 His-tag 处理后的细胞形态和对照相比没有明显变化(图 6)。

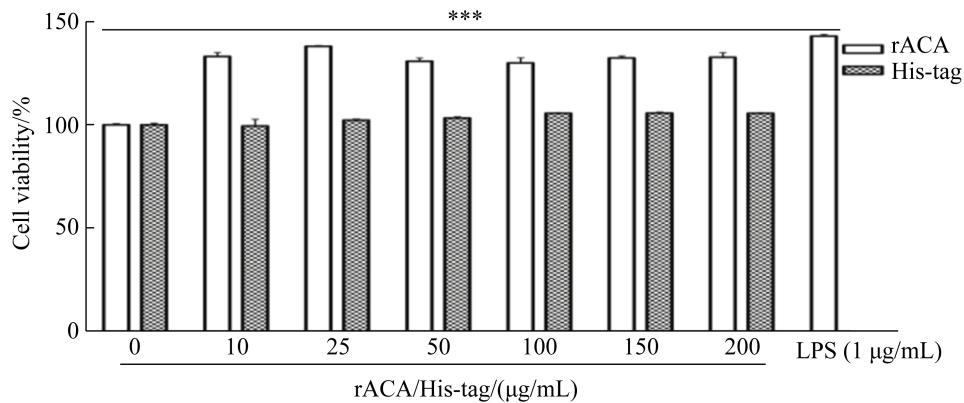


图 5. rACA 和 His-tag 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Figure 5. Effects of rACA and His-tag on the RAW264.7 cell proliferation. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD; ***: $P < 0.0001$.

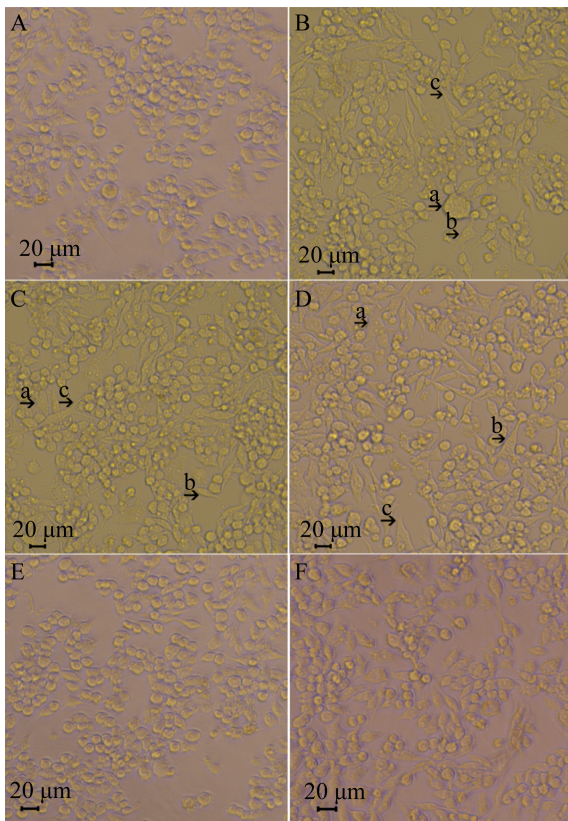


图 6. 细胞形态变化

Figure 6. The change of cell morphology. A: control; B: macrophages treated with 25 $\mu\text{g/mL}$ rACA; C: macrophages treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ rACA; D: morphology treated with LPS; E: macrophages treated with 25 $\mu\text{g/mL}$ His-tag; F: macrophages treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ His-tag; a: swollen cell; b: binuclear cell; c: cell with pseudopod.

2.6 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬活性的影响

各浓度(10–200 $\mu\text{g/mL}$)的 rACA 均能显著增强小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的吞噬活性($P < 0.0001$), 且吞噬活性都高于阳性对照 LPS, 分别是空白组的 3.96、4.17、4.12、4.30、4.39 和 4.27 倍; His-tag 对巨噬细胞吞噬活性影响不明显(图 7)。综合图 5 细胞增殖结果可以看出吞噬活性的增强不完全是由细胞增殖引起, rACA 对巨噬细胞具有激活作用。

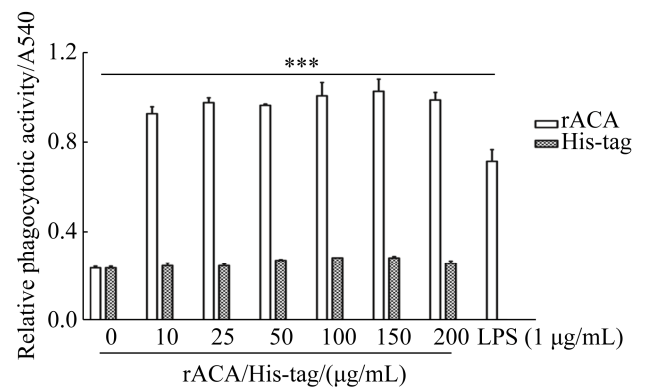


图 7. rACA 和 His-tag 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响

Figure 7. Effects of rACA and His-tag on the phagocytotic activity of RAW264.7 cell. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD; ***: $P < 0.0001$.

2.7 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的影响

1–20 $\mu\text{g/mL}$ 的 rACA 能够显著刺激巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO ($P<0.001$), 且产 NO 能力具有剂量依赖性。1 $\mu\text{g/mL}$ 的 rACA 产 NO 能力和 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 相当, 在不高于 10 $\mu\text{g/mL}$ 时随着 rACA 浓度增加产 NO 能力增强, 超过 10 $\mu\text{g/mL}$ 后产 NO 能力下降, 超过 20 $\mu\text{g/mL}$ 刺激巨噬细胞产 NO 能力和空白对照相比差异不显著; 1–30 $\mu\text{g/mL}$ 的 His-tag 刺激巨噬细胞产 NO 能力和空白对照相比没有显著差异(图 8)。

2.8 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌 TNF- α 的影响

不同浓度(1–30 $\mu\text{g/mL}$)的 rACA 能够极显著地刺激巨噬细胞 RAW264.7 产生肿瘤坏死因子 TNF- α 的产生($P<0.0001$), 15 $\mu\text{g/mL}$ 的 rACA 刺激能力最强(42.729 ng/L), 是空白对照(13.125 ng/L) 的 3.26 倍, 超过 15 $\mu\text{g/mL}$ 时刺激能力逐渐下降,

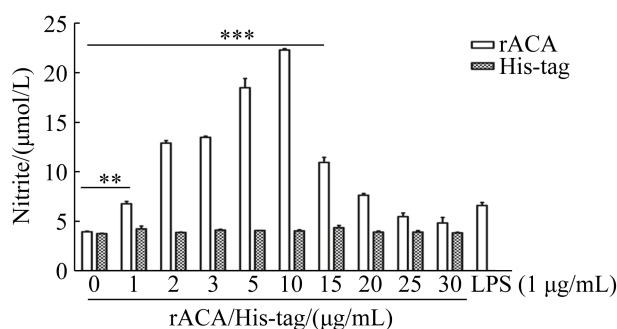


图 8. rACA 和 His-tag 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的影响

Figure 8. Effects of rACA and His-tag on the NO releasing in RAW264.7. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD; **: $P<0.001$; ***: $P<0.0001$.

但仍保持较高的 TNF- α 分泌水平; 1–30 $\mu\text{g/mL}$ 的 His-tag 均不能明显刺激巨噬细胞 RAW264.7 产生 TNF- α (图 9)。

2.9 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL- β 的影响

低浓度(1–3 $\mu\text{g/mL}$)的 rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL- β 影响不显著, 5–20 $\mu\text{g/mL}$ 时对巨噬细胞的刺激极显著($P<0.0001$), 10 $\mu\text{g/mL}$ 时刺激能力最强, 随着 rACA 浓度提高刺激能力下降, 但仍能显著刺激 IL-1 β 的产生, 和对照相比具有统计学意义($P<0.05$); 1–30 $\mu\text{g/mL}$ 的 His-tag 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL- β 影响均不显著(图 10)。

3 讨论

产业化生产 ACA 是进行药理研究和临床应用的基础, 也是满足人们日益增长的医疗和健康需求的必由之路。根据生物信息学分析结果选择

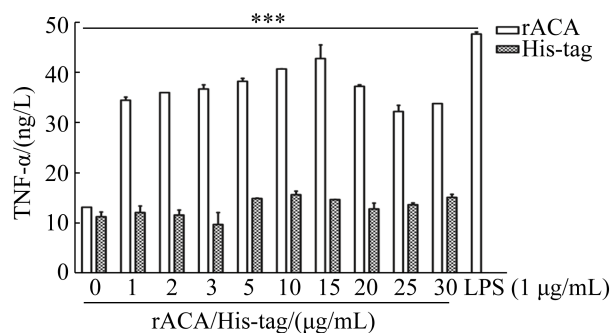


图 9. rACA 和 His-tag 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌 TNF α 的影响

Figure 9. Effects of rACA and His-tag on the secretion of TNF α secreting in RAW264.7. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD; ***: $P<0.0001$.

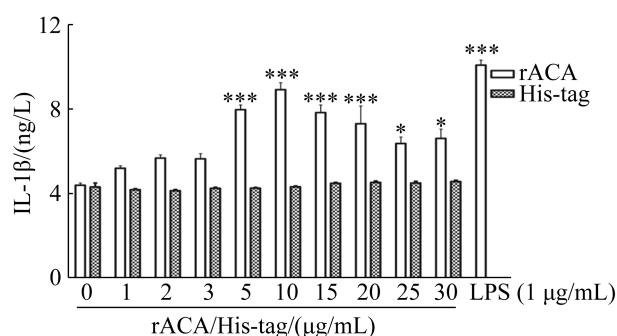


图 10. rACA 和 His-tag 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL-1 β 的影响

Figure 10. Effects of rACA and His-tag on the secretion of IL-1 β secreting in RAW264.7. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.0001$.

大肠杆菌表达 ACA, 大肠杆菌表达真核基因时稀有密码子会导致产量下降, 甚至表达终止, 密码子优化可以有效提高外源蛋白在大肠杆菌中的表达^[30], 本实验也验证了这一结论。不同载体表达蛋白的能力不同, 早期实验发现 pET-28a 表达蛋白时容易产生包含体, 本实验选择了 pET-32a 和 pGEX-4t-2 两种载体对大肠杆菌密码子偏好性的含信号肽全长 ACA 进行了表达纯化, 发现 pGEX-4t-2 表达 rACA 效率低, 细胞破碎过程中重组蛋白 GST 标签容易断裂、纯化困难; 孔祥辉使用 pGEX-4t-2 在大肠杆菌中表达金针菇免疫调节蛋白时也遇到了同样的问题^[31]。不同培养基产蛋白能力不同, 培养基中酵母粉含量及 IPTG 浓度对 rACA 的表达有显著影响, 且二者交互作用显著。通过选择大肠杆菌偏好性密码子、合适的表达载体、培养基种类, 调整 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间和利用响应面优化等多种手段大大提高了 rACA 的表达效率, 使 rACA 在大肠杆菌中以可溶性表达为主, 产量可高达 187.12 $\mu\text{g/mL}$, 比 LB 培养基诱导(120.29 $\mu\text{g/mL}$)提高 55.56%,

比优化前的 SOB (137.37 $\mu\text{g/mL}$)提高 36.22%, 是目前大肠杆菌表达 FIPs 量的最高报道, 先前报道的 FIPs 家族中的松杉灵芝免疫调节蛋白 (FIP-gts)、金针菇免疫调节蛋白(FIP-fve)和赤芝免疫调节蛋白(FIP-glu)在 *E. coli* 中的表达量分别为 20 mg/L、30 mg/L 和 36.67 mg/L^[32-34], 远低于本实验的结果。

FIPs 是近年来从一些高等担子菌子实体中提取的一类小分子蛋白质, 具有多种免疫药理活性, 它的研究在治疗过敏、移植排斥反应和肿瘤等疾病方面具有重大的意义。体外免疫实验显示 His-rACA 对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 无毒并且能促进其增殖、增强 RAW264.7 细胞的吞噬活性、改变细胞形态、刺激巨噬细胞产生 NO、TNF- α 和 IL-1 β 等细胞因子, 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 具有激活作用, 单独的 His-tag 则不具有以上活性。说明 His-rACA 和天然 ACA 具有相似的活性, 是一种免疫刺激剂, 能够提高机体的免疫反应。使用带有 His 标签的重组蛋白进行活性研究省去了标签切割及二次纯化的步骤, 简化了流程、提高了效率、降低了成本。包括 FIP-fve、灵芝免疫调节蛋白(r LZ-8)、草菇免疫调节蛋白(FIP-vvo)和赤球丛赤壳免疫调节蛋白(FIP-Nha)等在内的大多数 FIPs 具有血细胞凝集活性, 能促进淋巴细胞增殖, 并且明显增加多种细胞因子分泌, 具有抗过敏、抗肿瘤等活性^[31,35-38]。rACA 不具有血细胞凝集活性^[22], 仅与 FIPs 家族中云芝免疫调节蛋白(FIP-TVC)具有相似活性^[39], 而与毛蚶蛋白组分 III^[26]、人参蛋白^[40]等其它来源的蛋白活性相似, 说明 ACA 和 FIPs 家族蛋白差别比较大, 王莹等在对南方灵芝免疫调节蛋白 cl3717 进行生物信息学分析时也从序列、结构和翻译后修饰

等多个角度揭示了 ACA 同 c13717 在亲缘关系上更近, 而与其他 FIPs 亲缘关系较远^[21], 说明 ACA 是不同于其他 FIPs 的一种新型免疫调节蛋白。

利用发酵工程生产食用菌的有效成分, 以及利用生物工程菌生产特殊的药用成分如多肽类药物, 将是我国今后生物医药的一个重要发展方向。本实验构建了牛樟芝免疫调节蛋白表达的工程菌, 通过筛选培养基、调整诱导条件以及响应面优化的方法实现了 rACA 的高效可溶性表达, 所得蛋白具有和天然蛋白类似的活性, 可以替代天然 ACA 作为食品添加剂或者免疫调节剂用于制药行业甚至是进行药物研究。为有效利用食用级资源、探索生产提高人体免疫力的新型免疫蛋白药物提供了基础, 为 ACA 的产业化生产奠定了基础, 并为将来开展药理学研究和临床应用提供了可能性。

参 考 文 献

- [1] Lv S, Zhang MY, Luo XY, Wang CL, Huang S, He L. Optimization of extracting technology of total triterpenoids in *Antrodia camphorata* by central composite design-response surface methodology and study on antitumor activity of total triterpenoids. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(22): 3990–3996. (in Chinese)
吕莎, 张梦雅, 罗晓云, 王春丽, 黄松, 贺莲. 星点设计-效应面法优化牛樟芝总三萜提取工艺及其抗肿瘤活性研究. *中草药*, 2016, 47(22): 3990–3996.
- [2] Huang TT, Lan YW, Chen CM, Ko YF, Ojcius DM, Martel J, Young JD, Chong KY. *Antrodia cinnamomea* induces anti-tumor activity by inhibiting the STAT3 signaling pathway in lung cancer cells. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5145.
- [3] Li TY, Chiang BH. 4-acetylanthroquinonol B from *Antrodia cinnamomea* enhances immune function of dendritic cells against liver cancer stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 109: 2262–2269.
- [4] Lin TY, Tseng AJ, Qiu WL, Chao CH, Lu MK. A sulfated glucan from *Antrodia cinnamomea* reduces slug expression through regulation of TGFβ/AKT/GSK3β axis in lung cancer. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 210: 175–184.
- [5] Chen YC, Liu YC, El-Shazly M, Wu TY, Chang JG, Wu YC. *Antrodia cinnamomea*, a treasured medicinal mushroom, induces growth arrest in breast cancer cells, T47D cells: new mechanisms emerge. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(4): 833.
- [6] Chen JF, Tsai YT, Lai YH, Lin CC, Chou HC, Kuo WH, Ko ML, Wei YS, Wang YS, Lin MW, Chen YJ, Lee YR, Chan HL. Proteomic analysis of *Antrodia Cinnamomea*-induced ER stress in liver cancer cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 187: 113142.
- [7] He RJ, Wu KX, Zhang AQ, Xie ZF, Sun PL. Mechanochemical-assisted extraction and pharmacological study of triterpenoids from *Antrodia camphorata*. *Applied Sciences*, 2019, 9(20): 4281.
- [8] Lee CI, Wu CC, Hsieh SL, Lee CL, Chang YP, Chang CC, Wang YZ, Wang JJ. Anticancer effects on human pancreatic cancer cells of triterpenoids, polysaccharides and 1, 3-β-D-glucan derived from the fruiting body of *Antrodia camphorata*. *Food Function*, 2014, 5(12): 3224–3232.
- [9] You RI, Lee YP, Su TY, Lin CC, Chen CS, Chu CL. A benzenoid 4,7-dimethoxy-5-methyl-L, 3-benzodioxole from *Antrodia cinnamomea* attenuates dendritic cell-mediated Th2 allergic responses. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2019, 47(6): 1271–1287.
- [10] Yi ZW, Xia YJ, Liu XF, Wang GQ, Xiong ZQ, Ai LZ. Antrodin a from mycelium of *Antrodia camphorata* alleviates acute alcoholic liver injury and modulates intestinal flora dysbiosis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 254: 112681.
- [11] Kuo TH, Kuo YH, Cho CY, Yao CJ, Lai GM, Chuang SE. Protective effect of *Antrodia cinnamomea* extract against irradiation-induced acute hepatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(4): 846.
- [12] Hseu YC, Chen SC, Yech YJ, Wang L, Yang HL. Antioxidant activity of *Antrodia camphorata* on free radical-induced endothelial cell damage. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 118(2): 237–245.

- [13] Lee MT, Lin WC, Lin LJ, Wang SY, Chang SC, Lee TT. Effects of dietary *Antrodia cinnamomea* fermented product supplementation on metabolism pathways of antioxidant, inflammatory, and lipid metabolism pathways—a potential crosstalk. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2020, 33(7): 1167–1179.
- [14] Chien SC, Chen ML, Kuo HT, Tsai YC, Lin BF, Kuo YH. Anti-inflammatory activities of new succinic and maleic derivatives from the fruiting body of *Antrodia camphorata*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 2008, 56(16): 7017–7022.
- [15] Chen YC, Liu YL, Li FY, Chang CI, Wang SY, Lee KY, Li SL, Chen YP, Jinn TR, Tzen JTC. Antcin a, a steroid-like compound from *Antrodia camphorata*, exerts anti-inflammatory effect via mimicking glucocorticoids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2011, 32(7): 904–911.
- [16] Tang HL, Nie WB, Xiao JN, Zha ZQ, Chen QL, Yin HP. Structural characterization and anti-inflammatory effect in hepatocytes of a galactoglucan from *Antrodia camphorata* mycelium. *RSC Advances*, 2019, 9(14): 7664–7672.
- [17] Geethangili M, Tzeng YM. Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011: Article ID 212641.
- [18] Li HY. The effect and mechanism of *Antrodia camphorata* on HCC. Doctor Dissertation of Nanjing University of Chinese Medicine, 2015. (in Chinese)
李红玉. 牛樟芝抗肝癌的效应与机制研究. 南京中医药大学博士学位论文, 2015.
- [19] Zhang BB, Guan YY, Hu PF, Chen L, Xu GR, Liu LM, Cheung PCK. Production of bioactive metabolites by submerged fermentation of the medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*: recent advances and future development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(4): 541–554.
- [20] Sheu F, Chien PJ, Hsien KY, Chin KL, Huang WT, Tsao CY, Chen YF, Cheng HC, Chang HH. Purification, cloning, and functional characterization of a novel immunomodulatory protein from *Antrodia camphorata* (bitter mushroom) that exhibits TLR2-dependent NF- κ B activation and M1 polarization within murine macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(10): 4130–4141.
- [21] Li QZ, Chang YZ, He ZM, Chen L, Zhou XW. Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(12): 23337–23348.
- [22] Chen YM, Sung HC, Kuo YH, Hsu YJ, Huang CC, Liang HL. The effects of ergosta-7,9(11), 22-trien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* on the biochemical profile and exercise performance of mice. *Molecules*, 2019, 24(7): 1225.
- [23] Wang Y, Gao YN, Wang Y, Li Y, Tang LH, Bai R, Bao DP. Bioinformatic analysis of a putative immunomodulatory protein, c13717, from *Ganoderma australe*. *Acta Edulis Fungi*, 2016, 23(3): 25–29. (in Chinese)
王莹, 高英女, 汪滢, 李燕, 唐利华, 白睿, 鲍大鹏. 南方灵芝中一种新型免疫调节蛋白的生物信息学分析. 食用菌学报, 2016, 23(3): 25–29.
- [24] Qian BJ, Shen HF, Xiong JJ, Chen L, Zhang L, Jia JW, Wang Y, Zhang ZC, Yuan Z, Cao KM, Zhang DB. Expression and purification of the synthetic preS1 gene of hepatitis B Virus with preferred *Escherichia coli* codon preference. *Protein Expression and Purification*, 2006, 48(1): 74–80.
- [25] Dong BX, Mao RQ, Li BJ, Liu QY, Xu PL, Li G. An improved method of gene synthesis based on DNA works software and overlap extension PCR. *Molecular Biotechnology*, 2007, 37(3): 195–200.
- [26] Dong BX, Ya YK, Zhang W, Zhang YJ, Li CC, Xu AL, Li HT, Mao RQ. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived bacterial perhydrolase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(2): 276–286. (in Chinese)
董冰雪, 押玉柯, 张伟, 张英君, 李彩彩, 徐安乐, 李会庭, 毛润乾. 宏基因组来源新过水水解酶的分子克隆与酶学特性. 生物工程学报, 2020, 36(2): 276–286.
- [27] Dat LD, Tu NTM, Duc NV, Luyen BTT, Huyen CTT, Jang HJ, Thu DT, Huong TT, Tram LH, van Thong N, Hung ND, Kim YH, Thao NP. Anti-inflammatory secondary metabolites from the stems of *Millettia dielsiana* harms ex Diels. *Carbohydrate Research*, 2019, 484: 107778.
- [28] Fu Y, Feng T, Zhao C, Tian JX, Lin HY, Sun ZX. The antitumor activity of *Arca subcrenata* protein.

- Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2014, 26(6): 412–418. (in Chinese)
- 付莹, 冯婷, 赵晨, 田佳鑫, 林华英, 孙震晓. 毛蚶蛋白抗肿瘤活性研究. *癌变·畸变·突变*, 2014, 26(6): 412–418.
- [29] Srivani K, Pydi Setty Y. Effect of yeast extract concentration on microbial production of xylitol. *International Journal of Biotechnology Applications*, 2011, 3(3): 110–113.
- [30] Lu XM, Wang J, Jin XB, Zhu JY. High-level expression of a novel liver-targeting fusion interferon with preferred *Escherichia coli* codon preference and its anti-hepatitis B virus activity *in vivo*. *BMC Biotechnology*, 2015, 15(1): 54.
- [31] 孔祥辉. 金针菇免疫调节蛋白(FIP-fve)表达特性及活性特征研究. 东北林业大学博士学位论文, 2013.
- [32] Lin WH, Hung CH, Hsu CI, Lin JY. Dimerization of the N-terminal amphipathic α -helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(32): 20044–20048.
- [33] 徐贵雪. 金针菇免疫调节蛋白的重组表达及生物学特性的初探. 东北师范大学硕士学位论文, 2009.
- [34] Cong WR, Xu H, Liu Y, Li QZ, Li W, Zhou XW. Production and functional characterization of a novel fungal immunomodulatory protein FIP-SN15 shuffled from two genes of *Ganoderma* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(13): 5967–5975.
- [35] Ding Y, Seow SV, Huang CH, Liew LM, Lim YC, Kuo IC, Chua KY. Coadministration of the fungal immunomodulatory protein FIP-Fve and a tumour-associated antigen enhanced antitumour immunity. *Immunology*, 2009, 128: e881–e894.
- [36] Li QZ, Wang XF, Bao TW, Ran L, Lin J, Zhou XW. *In vitro* synthesis of a recombinant fungal immunomodulatory protein from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (*Aphyllophoro mycetideae*) and analysis of its immunomodulatory activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2010, 12(4): 347–358.
- [37] Sun XL, Huang W, Xiao SJ, Liang CY, Zhang SQ, Liu ZY, Sun F. Extracellular expression and efficient purification of a functional recombinant *Volvariella volvacea* immunomodulatory protein (FIP-vvo) using *Pichia pastoris* system. *Protein Expression and Purification*, 2014, 94: 95–100.
- [38] Li SY, Nie Y, Ding Y, Shi LJ, Tang XM. Recombinant expression of a novel fungal immunomodulatory protein with human tumor cell antiproliferative activity from *Nectria haematococca*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(10): 17751–17764.
- [39] Li F, Wen HA, Liu XZ, Zhou FZ, Chen GC. Gene cloning and recombinant expression of a novel fungal immunomodulatory protein from *Trametes versicolor*. *Protein Expression and Purification*, 2012, 82(2): 339–344.
- [40] Wang YY, Yan FY, Yan KL, Wang RJ, Xu N, Wang DY, Wang Y, He HN, Liu L. Extraction of ginseng proteins and immunomodulation activities *in vitro*. *Journal of Changchun University of Chinese Medicine*, 2018, 34(3): 443–445. (in Chinese)
- 王钰莹, 闫福源, 闫凯丽, 王任晶, 许宁, 王丹阳, 汪莹, 何慧楠, 刘莉. 人参蛋白的提取和体外免疫调节活性研究. *长春中医药大学学报*, 2018, 34(3): 443–445.

Overexpression and activity analysis of *Antrodia camphorata* immunomodulatory protein

Caicai Li¹, Cong Zhu¹, Guodong Yang¹, Jianfeng Wu¹, Jingjing Wang¹, Yue Qiao¹, Muran Fu¹, Xuanxuan Cui¹, Bingxue Dong^{1,2*}

¹ School of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan Province, China

² Henan Engineering Technology Research Center for Mushroom-based Foods, Nanyang 473061, Henan Province, China

Abstract: [Objective] The aim of our study is to express *Antrodia camphorata* immunomodulatory protein (ACA) in *Escherichia coli* efficiently. [Methods] We synthesized ACA gene with *E. coli* codon bias using DNAWorks 3.2.4 program to design and optimize primers. Then, we sequenced the PCR products, inserted the correct gene into expression vector pET-32a and pGEX-4t-2, transformed them into *E. coli* and named them pET-32a-ACA/BL21 and pGEX-4t-2-ACA/BL21 respectively after sequencing. We investigated the effects of codon bias, vectors, mediums and the induction conditions on the expression of recombinant ACA (rACA), and further optimized the protein expression using response surface methodology (RSM) subsequently. To evaluate the bioactivity of rACA, we determined the proliferation of RAW264.7 cells, analyzed the phagocytosis of macrophages, observed the cell morphology, detected the secretion of cytokine such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) after treated RAW264.7 cells with purified rACA. [Results] pET-32a-ACA/BL21 was more suitable for the expression of ACA. The rACA was expressed mainly in soluble form with a yield of 187.122 $\mu\text{g/mL}$, when the pET-32a-ACA/BL21 was cultured in optimized SOB medium (8.92 g/L yeast extract) and induced with 0.42 mmol/L IPTG at 25 °C for 7 h. This was the highest expression report for fungal immunomodulatory protein in *E. coli* so far. Moreover, the purified rACA promoted the proliferation of RAW264.7, enhanced the phagocytosis activity, changed the cell morphology as well as induced NO, TNF- α and IL-1 β production within murine macrophages. [Conclusion] The highly soluble expression, and the very similar biological activities to native ACA make it a good candidate of native ACA for potential application as a food supplement or immunomodulatory agent in pharmaceuticals and even medical studies.

Keywords: *Antrodia camphorata* immunomodulatory protein, codon bias, prokaryotic expression, response surface methodology, immunomodulatory

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Scientific Research Projects of Institutions of Higher Learning in Henan Province (21A180020, 20A180022), by the Research Fund for the Doctoral Program of Nanyang Normal University (18013) and by the Open Project Program of Henan Engineering Technology Research Center for Mushroom-based Foods (2019HM0010, HM2020-001)

*Corresponding author. Tel: +86-377-63513726; E-mail: dongbingxue2004@163.com

Received: 29 August 2020; Revised: 4 November 2020; Published online: 14 December 2020