

# 重组枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶蛋白 在改良 M9 培养基中的诱导表达

刘顺谊, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

**[摘要]** 以重组枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶 (L-谷氨酸:氨连接酶, Glutamine Synthetase, GS EC 6.3.1.2) 蛋白表达宿主菌株 BL21 (DE3) (pET3C/谷氨酰胺合成酶)作为研究对象,借助 SDS PAGE 分析方法,对于用乳糖诱导由 T7 lac 启动子控制的重组目的产物蛋白的各种基本参数进行了初步的研究. 研究了最佳本底培养基、最佳碳源及其最佳添加比例、碳源与诱导物的最适组合,并探索了适用于改良型培养基的诱导参数. 实验结果表明,对于重组目的产物蛋白,改良型 M9 培养基完全可以替代 LB 培养基;以甘油为碳源,可以避免葡萄糖对 T7 lac 启动子的屏蔽作用. 以乳糖为诱导物,目的蛋白的表达量、可溶性及酶活与以 IPTG 为诱导物基本接近. 研究结果为酶法合成谷氨酰胺的工业化生产提供了一定的参考.

**[关键词]** 谷氨酰胺合成酶,改良 M9 培养基,原核表达

**[中图分类号]** Q78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616 (2007) 04-0074-06

## Induced Expression of Recombinant Bacillus Subtilis Glutamine Synthetase in Optimized M9 Medium

Liu Shunyi, Yin Zhimin

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** The gene of Bacillus Subtilis Glutamine Synthetase (GS EC 6.3.1.2) was amplified and cloned into pET3C, then the recombinant plasmid was transformed into BL21 (DE3). Many types of M9 medium and LB medium were used respectively to culture the bacteria. The factors such as medium selection, carbon source composition, dose of carbon source, best combination of carbon source and inducer were analyzed in detail. The expression efficiency of optimized M9 medium and LB medium are almost the same, which provides evidence that optimized M9 medium is a promising replacement of LB medium in the industrial production of recombinant Glutamine Synthetase in the future.

**Key words:** Glutamine Synthetase, optimized M9 medium, prokaryotic expression

## 0 引言

L-谷氨酰胺是谷氨酸的衍生物,它在氨基酸代谢中具有极其重要的地位,对人体有益.目前国内外主要以发酵法生产 L-谷氨酰胺,近年来已开始有人研究酶法合成 L-谷氨酰胺<sup>[1,2]</sup>.在这些研究中,有些所用的谷氨酰胺合成酶 (GS)为提取酶,有些没有解决 ATP 再生的问题,因而成本很高.本实验室以 pET-3C 质粒为载体,将枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶克隆至大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株,诱导产生大量的重组谷氨酰胺合成酶 (GS),在反应中采用粗酶结合新鲜酿酒酵母发酵的 ATP 再生体系,从而使酶法合成 L-谷氨酰胺的两个问题得到解决<sup>[3]</sup>.

目前培养细菌的培养基的主要成分是蛋白胨和酵母提取物,这些培养基配料价格昂贵,有些还需要使

收稿日期: 2007-03-04. 修回日期: 2007-05-08

基金项目:国家教委留学回国人员基金 (2002SWXSBJC22)、南京师范大学人才基金 (2001SWXXQB914)资助项目.

作者简介:刘顺谊 (1981—),硕士研究生.主要从事蛋白表达与活性的研究. E-mail: general1-r@163.com

通讯联系人:殷志敏 (1963—),教授,博士生导师.主要从事生物化学及细胞生物学的教学与研究. E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

用进口试剂配制,无法投入实际生产.还有一些培养基主要含无机盐和少量简单的有机小分子,但是其碳源(如葡萄糖)会屏蔽 T7 lac 启动子.甘油是一种常见的有机小分子物质,可以与水以任意比例互溶,价格低廉,无毒副作用,以其为碳源可以完全避免 T7 lac 启动子的屏蔽<sup>[4]</sup>.乳糖是乳糖操纵子的诱导剂,尽管与 IPTG 相比,其诱导过程更复杂,诱导效果也有所不及,但避免了对人体的潜在毒性且价格低廉,适用于大规模发酵生产基因工程重组药物<sup>[5-7]</sup>.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

含 pET3C/谷氨酰胺合成酶重组质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3)由本实验室构建并冻存<sup>[8]</sup>.

#### 1.1.2 试剂

进口蛋白胨 (Tryp tone)和进口酵母粉 (Yeast Extract)购自英国 OXO D 公司; IPTG 购自 Merck 公司;丙烯酰胺 (Acr)及甲叉双丙烯酰胺 (Bis)购自 Promega 公司;四甲基乙二胺 (TEMED)购自 BioRad 公司;其余试剂均为国产分析纯.

谷氨酰胺合成酶反应液配方<sup>[3]</sup> (咪唑调节 pH 至 6.5):

L - Glu 100 mmol/L

NH<sub>4</sub>Cl 200 mmol/L

ATP 100 mmol/L

MnCl<sub>2</sub> 50 mmol/L

#### 1.1.3 培养基

(1) LB 培养基: 10 g 蛋白胨 + 5 g 酵母粉 + 10 g NaCl 加水定容至 1 L<sup>[9]</sup>.

(2) M9 培养基: 17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.5 g NaCl + 1.0 g NH<sub>4</sub>Cl 加水定容至 1 L<sup>[9]</sup>.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌体生长及目的蛋白表达量的测定方法

菌体培养浓度的测定采用读取 A<sub>600</sub> 的值.重组产物占菌体总蛋白百分含量的测定通过诱导后菌体的全菌总蛋白经 SDS - PAGE 电泳后经江苏捷达科技发展有限公司捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统扫描并经 Band scan 分析,所得数据均为对 SDS - PAGE 图多次分析的平均值.

#### 1.2.2 菌株最佳本底培养基的确定

使用国产原料配制的 LB 培养基、1/2 进口 LB 培养基、1/4 进口 LB 培养基、M9 培养基与全进口 LB 培养基进行比较.诱导起始时 A<sub>600</sub> 值为 0.5, IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 37 °C 继续诱导 4 h 分别取 1 mL 菌液作全菌 SDS - PAGE 电泳<sup>[8]</sup>.

#### 1.2.3 最佳碳源的确定

由于 M9 培养基配方中需添加葡萄糖为碳源,但是当以葡萄糖为碳源培养大肠杆菌时,可能会屏蔽 T7 lac 启动子从而无法表达目的蛋白.因此以甘油和葡萄糖相比较,以 LB 培养基为对照,探讨甘油作为碳源的可能性.分别配制 9 种含有不同种类或质量分数碳源的 M9 培养基,其碳源成份及质量分数依次为 0.1% 葡萄糖、0.5% 葡萄糖、1% 葡萄糖、5% 葡萄糖、0.5% 甘油、1% 甘油、2% 甘油、5% 甘油、0.5% 葡萄糖 + 1% 甘油.以加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L 的 LB 摇瓶为对照.37 °C 继续诱导 4 h,取 1 mL 菌液作全菌 SDS - PAGE 电泳.

#### 1.2.4 碳源最佳添加比例的确定

甘油作为碳源是大肠杆菌生长所必需的,而过多的甘油会使培养基变粘稠,不利于大肠杆菌生长.因此在上述实验的结果之上,又分别配制 10 种甘油质量分数不同的 M9 培养基,其甘油质量分数依次为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%. 37 °C 继续诱导 4 h,取 1 mL 菌液作全菌 SDS - PAGE 电泳.

#### 1.2.5 碳源与诱导物浓度组合的确定

由于乳糖在作为乳糖启动子的诱导物的同时,也可供大肠杆菌作为碳源,所以必须寻找一种甘油和乳

糖的合适的浓度组合. 因此在上述实验的结果之上, 以不同浓度甘油的 M9培养基培养重组菌, 在培养至最佳诱导起始生长量时添加不同浓度的乳糖和 0.1 mmol/L IPTG, 37 °C 继续诱导 4 h, 从而确定碳源与诱导物的最佳组合, 取 1 mL 菌液作全菌 SDS-PAGE电泳.

1.2.6 不同温度对目的蛋白表达的影响

温度对细菌的生长速度及目的蛋白的表达效率均有较大的影响. 因此研究在不同温度下、相同时间内菌体的湿重及其中目的蛋白所占的比例, 对于实现目的蛋白的高效表达有极其重要的意义. 在上述实验的基础之上, 我们分别在 28 °C、30 °C、33 °C、37 °C 下用改良 M9培养基培养重组菌, 在培养至最佳诱导起始生长量时添加最佳浓度的乳糖, 37 °C 继续诱导 4 h, 测量其湿菌重量, 并取相同重量的菌体作全菌 SDS-PAGE电泳以测量目的蛋白所占比例.

1.2.7 表达产物分布的确定

按照上述实验的结果进行放大诱导. 将诱导得到的 50 mL 培养物 10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 弃上清. 用 2 mL 1 × 谷氨酰胺合成酶裂解缓冲液<sup>[3]</sup>重悬菌体, 冰浴超声破碎. 超声破碎的设置和工作 5 s, 间歇 25 s, 功率 100 W, 全程时间 45 min. 超声破碎产物 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 转移上清至另一离心管中, 得到诱导物的上清和沉淀. 沉淀用 500 μL 1 × SDS Sample Buffer重悬, 上清取出 50 μL, 再加入 50 μL 2 × SDS Sample Buffer混合均匀, 沉淀取 5 μL 加入 5 μL 1 × SDS Sample Buffer混合后上样, 上清直接取 20 μL 上样作 SDS-PAGE电泳检测.

1.2.8 表达产物活性的鉴定

将上述方法中所得上清即蛋白粗酶液利用氨基酸纸层析法测定诱导蛋白的活性<sup>[3]</sup>: 取 5 μL 诱导得到的粗酶液, 加入 10 μL 谷氨酰胺合成酶反应液, 37 °C 水浴中反应 0.5 h, 并设置转化了空的 pET-3C质粒的 BL-21(DE3)菌株的粗提物作为阴性对照.

2 结果

2.1 菌株最佳本底培养基的确定

由图 1可知: 国产 LB培养基、M9培养基的效果与进口 LB培养基的培养效果差距不大, 而 1/2进口 LB培养基、1/4进口 LB培养基则要差很多. 而相对于其他两者而言, M9培养基是一种既能满足重组菌生长需要成本又相对较低的培养基, 其成本仅为进口 LB的 1/10.

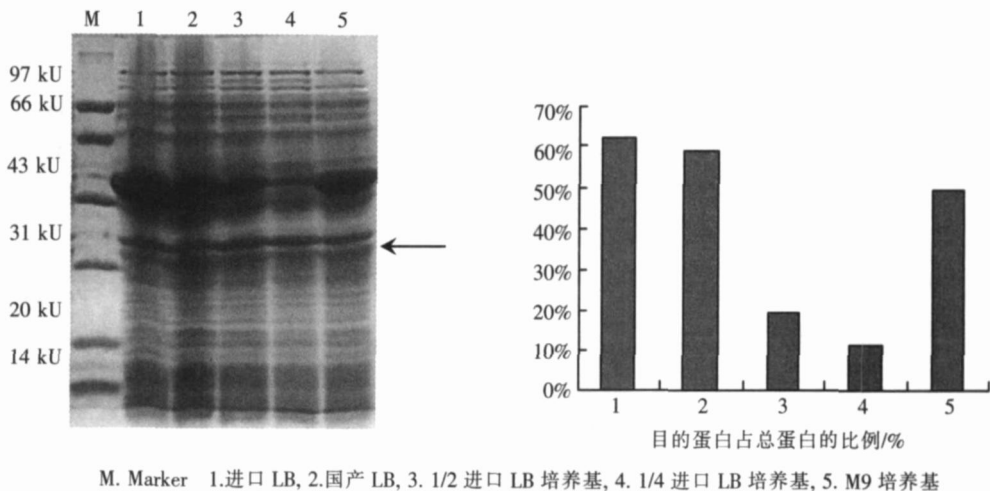


图 1 菌株最佳本底培养基的确定  
Fig.1 The selection of basic medium

2.2 最佳碳源的确定

由图 2可知: 单纯以葡萄糖为碳源的 M9培养基中目的蛋白几乎没有表达, 单纯以甘油为碳源的 M9培养基中目的蛋白有较好的表达, 而同时含有葡萄糖和甘油的 M9培养基中目的蛋白也几乎没有表达. 说明葡萄糖会屏蔽乳糖启动子从而屏蔽目的蛋白的表达.

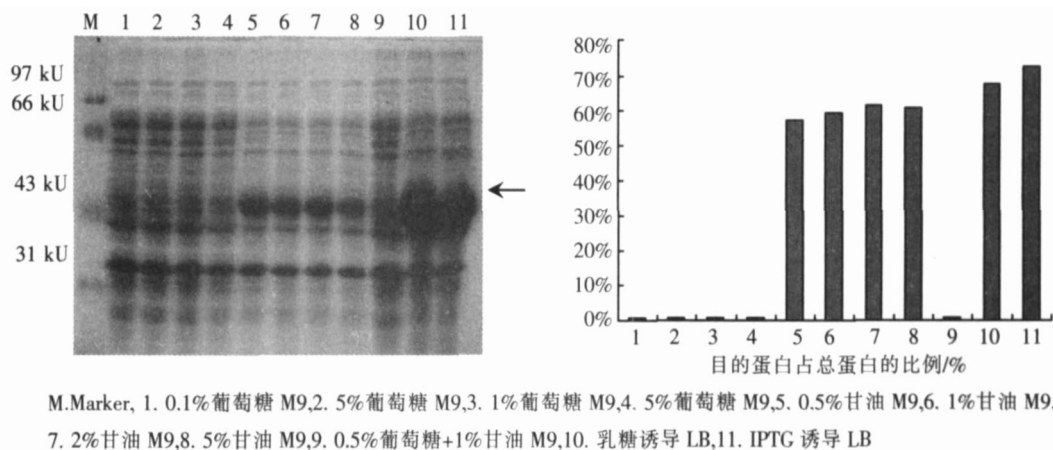


图 2 最佳碳源的确定

Fig.2 The selection of carbon source

2.3 碳源最佳添加比例的确定

由图 3可知,添加不同比例的甘油,对于目的蛋白在总蛋白中所占的比例影响不大,高浓度的甘油只是能够略微提高菌体的生长速度,而目的蛋白比例却有略微下降.而添加 0.5%~2%的甘油,则能使目的蛋白比例随着甘油比例的上升而提高.

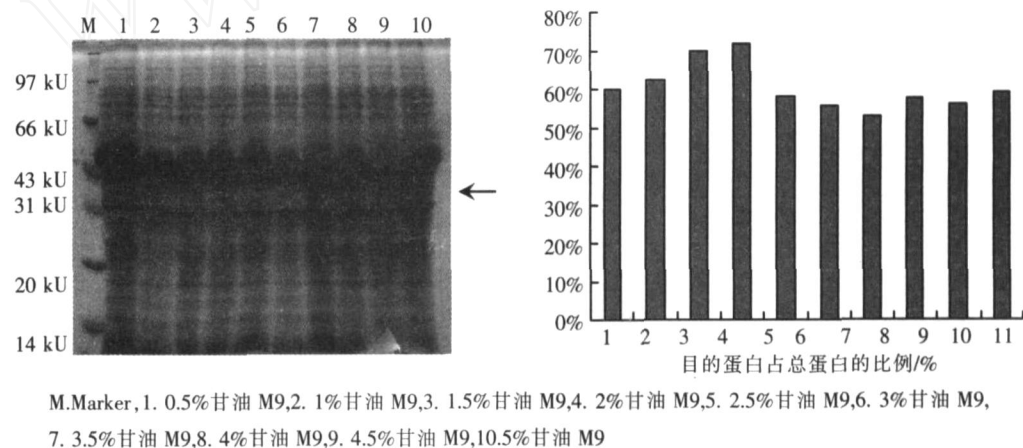


图 3 碳源最佳添加比例的确定

Fig.3 Dose of carbon source

2.4 碳源与诱导物浓度组合的确定

由图 4可知:在甘油作为碳源的改良 M9培养基中,甘油与诱导物的最适组合是:2%的甘油作为碳源,添加终浓度为 0.1 g/L的乳糖为诱导物. IPTG会抑制菌体生长,不适合用作诱导物;添加过多的甘油反而不利于目的蛋白比例的提高.

2.5 不同温度对目的蛋白表达的影响

由图 5可知:在不同温度下培养的菌体中,目的蛋白的比例随着培养温度的降低而下降.因此,37 是最佳的培养温度.

2.6 表达产物的分布

由图 6可知:由改良 M9培养基和由进口 LB培养基培养所获得的目的蛋白基本上均以可溶性蛋白的形式存在且表达量相似.

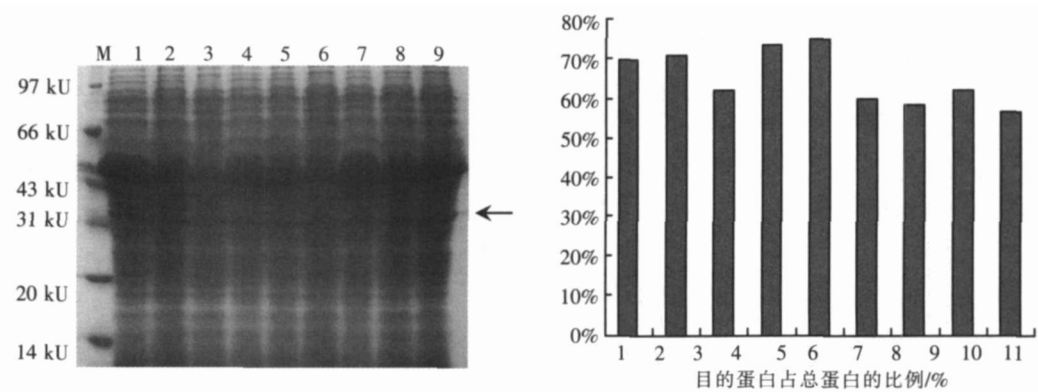
2.7 表达产物的活性

由图 7可知:改良 M9培养基和 LB培养基培养所获得的目的蛋白均有很高的催化活性.

3 讨论

乳糖 (lac)操纵子是目前最为常用的大肠杆菌基因操纵子,利用其调控机理设计的表达系统和载体系

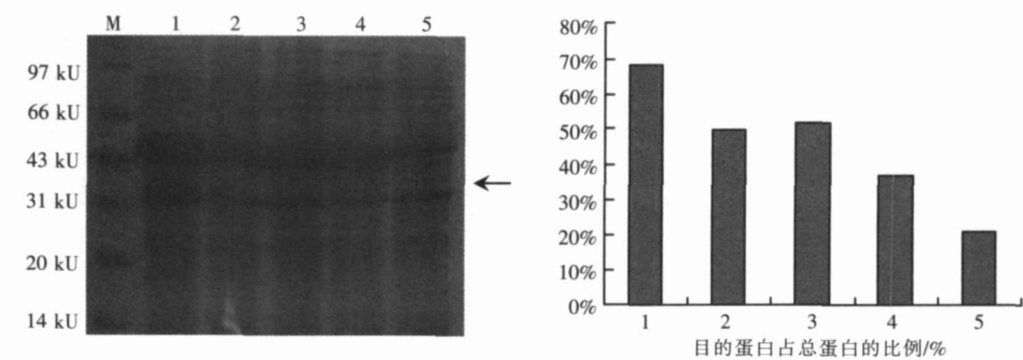
统已得到广泛应用. 人们在科研中通常使用 LB 培养基来培养重组大肠杆菌. 但是对于工业化生产来说, 使用进口原料配制的 LB 培养基显然过于昂贵. M9培养基是一种完全由常规无机盐配制的廉价培养基, 甘油则是一种工业上常用的廉价化工原料. 在 M9培养基中添加甘油作为碳源之后, 即成为一种十分有效的大肠杆菌培养基, 而其成本却仍然很低, 即使全部使用分析纯试剂, 其成本也不会超过 1. 00元 /L, 完全适用于工业化生产.



M.Marker, 1. 1%甘油 M9 +0.1 g 乳糖诱导, 2. 1%甘油 M9 +0.5 g 乳糖诱导, 3. 1%甘油 M9 +IPTG 诱导, 4. 2%甘油 M9 + 0.1 g 乳糖诱导, 5. 2%甘油 M9 +0.5 g 乳糖诱导, 6. 2%甘油 M9 +IPTG 诱导, 7. 4%甘油 M9 +0.1 g 乳糖诱导, 8. 4%甘油 M9 +0.5 g 乳糖诱导, 9. 4%甘油 M9 +IPTG 诱导

图 4 碳源与诱导物浓度组合的确定

Fig.4 Best combination of carbon source and inducer



M.Marker, 1. 37℃培养, 2. 33℃培养, 3. 30℃培养, 4. 38℃培养, 5. 25℃培养

图 5 不同温度对目的蛋白表达的影响

Fig.5 Expression affected by different temperatures

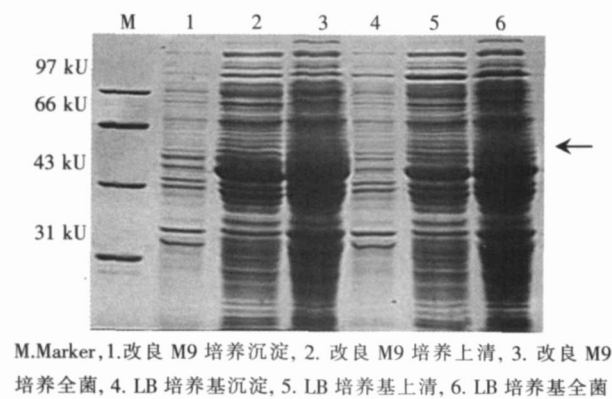
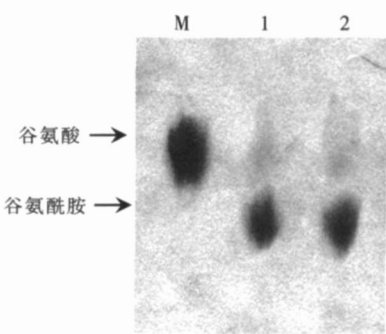


图 6 表达产物的分布

Fig.6 Target protein distribution



1. 改良 M9 培养所得谷氨酰胺合成酶催化, 2. LB 培养所得谷氨酰胺合成酶催化

图 7 表达产物的活性

Fig.7 Enzyme activity analysis of target protein

本文对培养重组菌的培养基进行了初步的研究和改进, 确定出适合重组菌生长和谷氨酰胺合成酶表达的优化培养基配方, 确定了最佳本底培养基、最佳碳源及其最佳添加比例、碳源与诱导物的最适组合, 并

摸索了适用于改良型培养基的诱导参数.对枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶在大肠杆菌中的表达进行的研究,说明了在常用的 M9培养基中添加适量的甘油作为碳源,完全可以满足大肠杆菌生长和目的蛋白表达的需要,其培养效果与进口 LB培养基基本类似.对于重组目的产物蛋白,改良型 M9培养基完全可以替代 LB培养基;以甘油为碳源,可以避免葡萄糖对 T7lac启动子的屏蔽作用.以乳糖为诱导物,目的蛋白的表达量、可溶性及酶活与以 IPTG为诱导物基本接近.与此同时,M9培养基在添加了甘油之后的成本却只有进口 LB培养基的 1/10左右.本研究为工业化生产枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶,从而以酶法合成谷氨酰胺提供了一定的参考.

### [参考文献]

- [1] Yang C Y, Ma C Q, Xu P. Glutamine production by the enzyme method[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2002, 2 (6): 529-533.
- [2] Wakisaka S, Ohshima Y, Ogawa M, et al. Characteristics and efficiency of glutamine production by coupling of a bacterial Glutamine Synthetase reaction with the alcoholic fermentation system of Baker's yeast[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (8): 2 952-2 957.
- [3] 陈群英,陈国安,薛彬,等.基因工程酶法结合酵母能量偶联高效合成 L-谷氨酰胺的研究[J].生物工程学报,2004, 20 (3): 456-460.
- [4] 胡志明,马骊,周明乾,等.重组人血管内皮细胞生长因子工程菌高密度发酵工艺研究[J].中国人民解放军第一军医大学学报,2005, 25 (3): 267-269.
- [5] 张毅,屈贤铭,杨胜利.乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J].生物工程学报,2000, 16 (4): 464-468.
- [6] 侯松旺,李小洁,马辉文.受乳糖启动子控制的基因表达过程的优化[J].武汉大学学报:自然科学版,1998, 44 (4): 513-516.
- [7] 吴一凡,张双全,高秀玉,等.乳糖诱导 pET载体表达重组蛋白的研究[J].南京师大学报:自然科学版,2002, 25 (1): 89-93.
- [8] 刘俊红,刘顺谊,殷志敏.乳糖诱导大肠杆菌中重组谷氨酰胺合成酶的表达[J].南京师大学报:自然科学版,2006, 29 (3): 66-70.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[责任编辑:孙德泉]