

乳糖诱导大肠杆菌中重组谷氨酰胺合成酶的表达

刘俊红^{1 2}, 刘顺谊², 殷志敏²

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)
(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[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 T7lac 启动子控制的重组目的产物蛋白的表达规律进行了优化研究, 分别比较了最佳诱导起始生长量、所需乳糖的浓度、诱导持续时间、补加乳糖和氨苄青霉素及不同培养基等参数对重组产物表达的影响. 实验结果表明, 对于 T7lac 启动子控制的重组目的产物, 乳糖作为诱导剂也可以起到很好的诱导表达效果, 诱导产物的表达量、可溶性及酶活与 IPTG 诱导产物基本接近. 本研究结果为乳糖作为诱导剂应用于重组大肠杆菌谷氨酰胺合成酶工业化生产提供了一定的参考依据.

[关键词] 谷氨酰胺合成酶, 原核表达, 乳糖, IPTG

[中图分类号] Q 78 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2006)03-0066-05

Expression of Recombinant Glutamine Synthetase
in *Escherichia coli* Induced by Lactose

Liu Junhong^{1 2}, Liu Shunyi², Yin Zhimin²

(1. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)
(2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract L-Glutamine is mainly produced by fermentation, rarely by enzyme reaction. Glutamine Synthetase gene is amplified from *Bacillus Subtilis* gnd cloned into prokaryotic expression vector pET3C. After the transformation of this recombinant plasmid into BL-21(DE3), Lactose and IPTG (isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside isopropylthio-β-D-galactoside) are used to induce gene expression at 37℃ respectively. Both of them can induce the expression of the Glutamine Synthetase gene efficiently. The influences of culture condition such as the lactose concentration, growth medium composition, the duration of the induction and the re-addition of lactose on the expression of the recombinant protein are analyzed in detail. The induction efficiency of lactose is basically the same as that of IPTG, which provides the evidence that lactose could be a promising inducer in the future large scale production of recombined Glutamine Synthetase.

Key words Glutamine Synthetase, prokaryotic expression, lactose, IPTG

0 引言

L-谷氨酰胺是一种对人体十分有益的氨基酸衍生物,它在氨基酸代谢中具有极其重要的地位,已广泛应用于营养补给、抗疲劳、胃肠道功能修复和提高人体免疫等方面,其市场需求量日渐增长.

目前国内外主要以发酵法生产 L-谷氨酰胺.近年来,酶法合成 L-谷氨酰胺已开始有少量研究^[1,2],在

收稿日期:2005-11-28.

基金项目:国家教委留学回国人员基金(2002SWXSBJBC22),南京师范大学人才基金(2001SWXXQB914)资助项目.

作者简介:刘俊红,女,1970—,博士研究生,讲师,主要从事细胞生物学的学习与研究. E-mail liujunhong700911@ yahoo. com. cn

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

这些研究中,所用的谷氨酰胺合成酶(GS)为提取酶,或者没有解决ATP再生的问题,因而成本很高,这是制约酶法合成L-谷氨酰胺的关键.本实验室以pET3C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^[3].

在pET系统中,宿主菌在非代谢性乳糖类似物异丙基- β -D-巯基半乳糖苷(IPTG)的诱导作用下能产生大量的T7RNA聚合酶,后者特异性的识别T7启动子序列,从而高效表达重组蛋白.IPTG是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂,但由于其对人体有潜在的毒性且价格昂贵,应用于大规模发酵生产基因工程重组药物有一定的局限性,故国内外均已在研究用乳糖代替IPTG作为Lac启动子的诱导剂^[4,5,6].本文以含pET3C/谷氨酰胺合成酶重组质粒的大肠杆菌BL21(DE3)为对象,对乳糖诱导目的蛋白表达的各种基本参数进行了初步的研究.

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.

1.1.2 试剂

蛋白胨(Tryptone)和酵母粉(Yeast Extract)购自英国OXOID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.

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OD₆₀₀的值.重组产物占菌体总蛋白百分含量的测定将诱导后菌体的全菌总蛋白经SDS-PAGE后通过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Bandscan分析确定.

1.2.2 菌株最佳诱导起始生长量的确定

在重组菌分别生长至OD₆₀₀值为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9时,向培养液中添加乳糖至终浓度为0.5 g/L,37℃继续诱导4 h,取一毫升菌液作全菌SDS-PAGE电泳.

1.2.3 最适诱导物浓度的确定

分别向处于最佳诱导起始生长量的7个摇瓶中分别加入不同量的乳糖,使其终浓度依次为0.025 g/L、0.05 g/L、0.1 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L、5 g/L、10 g/L,37℃继续诱导4 h,取1 mL菌液作全菌SDS-PAGE电泳.

1.2.4 乳糖最佳诱导时间的研究

在上述实验的结果之上,加入0.5 g/L的乳糖,37℃持续诱导10 h.每隔1 h取1 mL菌液作全菌SDS-PAGE电泳.以加IPTG至终浓度为0.1 mmol/L的摇瓶37℃诱导5 h为对照.

1.2.5 补加乳糖和氨苄青霉素对目的蛋白表达量的影响

在持续诱导5 h的基础上,补加乳糖至终浓度为1.0 g/L,氨苄青霉素至终浓度为100 mg/L,37℃再继续培养5 h,每隔1 h取1 mL菌液作全菌SDS-PAGE电泳.

1.2.6 不同培养基对目的蛋白表达的影响

使用M9培养基、1/2进口LB培养基、1/4进口LB培养基、国产原料配制的LB培养基与进口LB培养基进行比较.诱导起始时OD₆₀₀值为0.5,乳糖浓度为0.5 g/L,37℃继续诱导4 h.分别取1 mL菌液作全菌SDS-PAGE电泳.

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℃离心10 min,弃上清.用2 mL 1×谷氨酰胺合成酶裂解缓冲液重悬菌体,冰浴超声破碎.超声破碎的设置: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℃离心10 min,转移上清至另一离心管中,得万方数据

到诱导物的上清和沉淀. 沉淀用 500 μL 1 \times SDS Sample Buffer 重悬, 上清取出 50 μL , 再加入 50 μL 2 \times SDS Sample Buffer 混合均匀. 沉淀取 5 μL 加入 5 μL 1 \times 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. 取 5 μL 诱导得到的粗酶液, 加入 10 μL 反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 0. 5 h. 并设置空菌 BL-21 的粗提物作为阴性对照.

2 结果

2. 1 菌株最佳诱导起始生长量的确定

实验结果表明(如图 1) 在重组菌分别生长至 OD₆₀₀ 值为 0. 1、0. 3、0. 5、0. 7、0. 9 时开始用乳糖进行诱导均可得到目的蛋白的表达. 而在重组菌生长至 OD₆₀₀ 值为 0. 5 时诱导可获得最大产量的目的蛋白, 随后目的蛋白的产量随 OD₆₀₀ 值的增加反而下降.

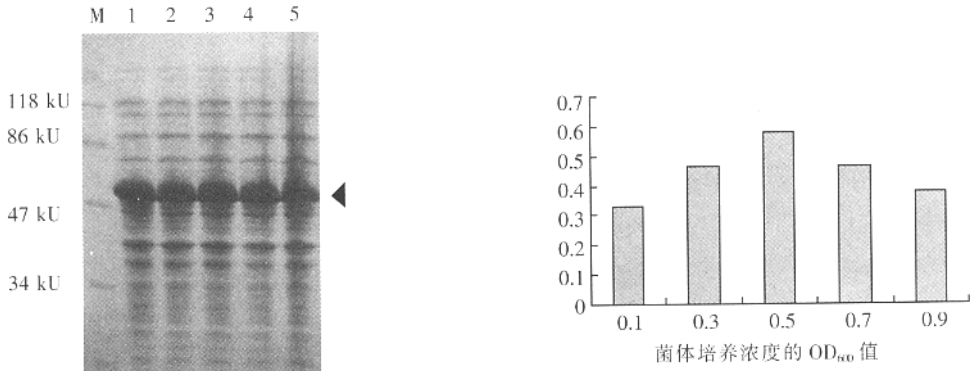


图 1 菌株最佳诱导起始生长量的确定

M:预染蛋白质分子质量标准化;OD₆₀₀=0.1; 2:OD₆₀₀=0.3,3:OD₆₀₀=0.5,4:OD₆₀₀=0.7,5:OD₆₀₀=0.9;箭头所示为目的蛋白

2. 2 最适诱导物浓度的确定

在重组菌生长至 OD₆₀₀ 值为 0. 5 时加入不同浓度的乳糖, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续诱导 4 h, 目的蛋白的表达量随着乳糖终浓度的不同而改变, 当乳糖终浓度为 0. 5 g/L 时为最高, 此后随着乳糖浓度的增高, 目的蛋白的产量不再增加(图 2).

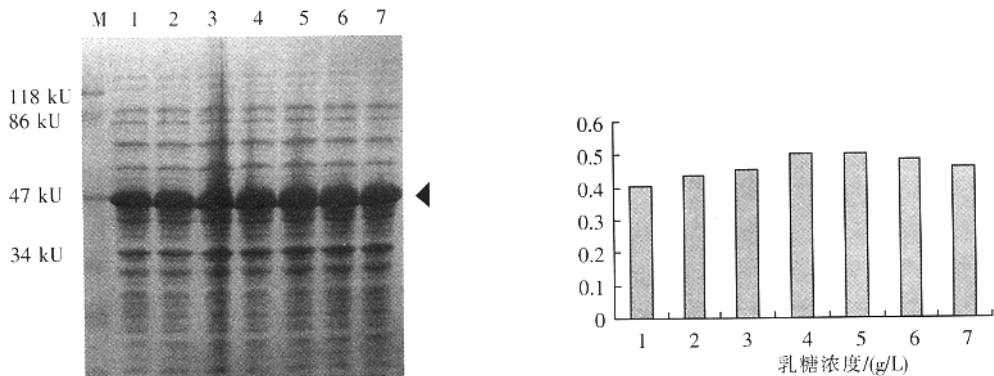


图 2 最适诱导物浓度的确定

M:预染蛋白质分子质量标准;1:0.025 g/L 的乳糖诱导;2:0.05 g/L 的乳糖;3:0.1 g/L 的乳糖;4:0.5 g/L 的乳糖;5:1.0 g/L 的乳糖;6:5 g/L 的乳糖;7:10 g/L 的乳糖.箭头所示为目的蛋白.

2. 3 乳糖最佳诱导时间的研究

在重组菌生长至 OD₆₀₀ 值为 0. 5 时加入终浓度为 0. 5 g/L 乳糖, 持续诱导 10 h, 在前 1 ~ 5 h 目的蛋白量随着时间的延长而增加, 从第 6 h 开始, 目的蛋白量不再随着时间而增加(图 3).

2. 4 补加乳糖和氨苄青霉素对目的蛋白表达量的影响

根据上述实验结果, 在重组菌生长至 OD₆₀₀ 值为 0. 5 h 加入终浓度为 0. 5 g/L 乳糖, 诱导 5 h 后补加乳糖和氨苄青霉素. 所获得目的蛋白与补加前相比有明显的增加, 并在补加后第 3 h 达到最大. 见图 4.

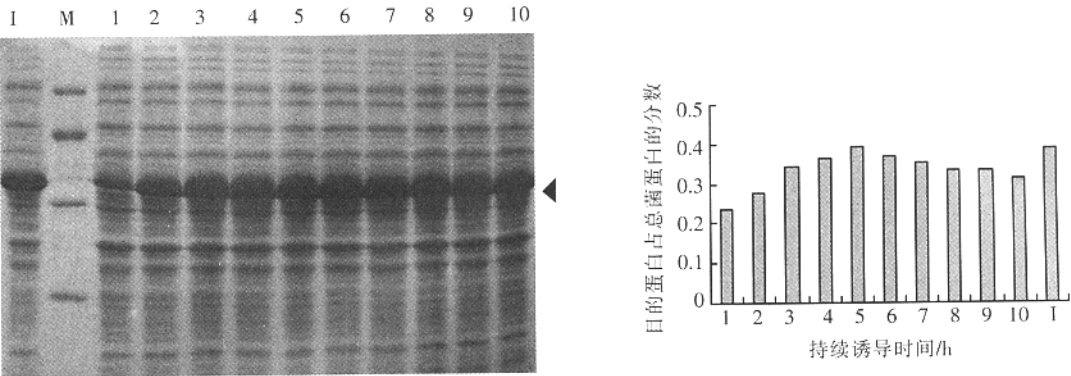


图3 乳糖最佳诱导时间的确定

I:0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导; M:相对分子质量标准; 1:乳糖诱导 1 h;2:诱导 2 h;3:诱导 3 h;4:诱导 4 h;5:诱导 5 h;6:诱导 6 h;7:诱导 7 h;8:诱导 8 h;9:诱导 9 h;10:诱导 10 h;箭头所示为目的蛋白。

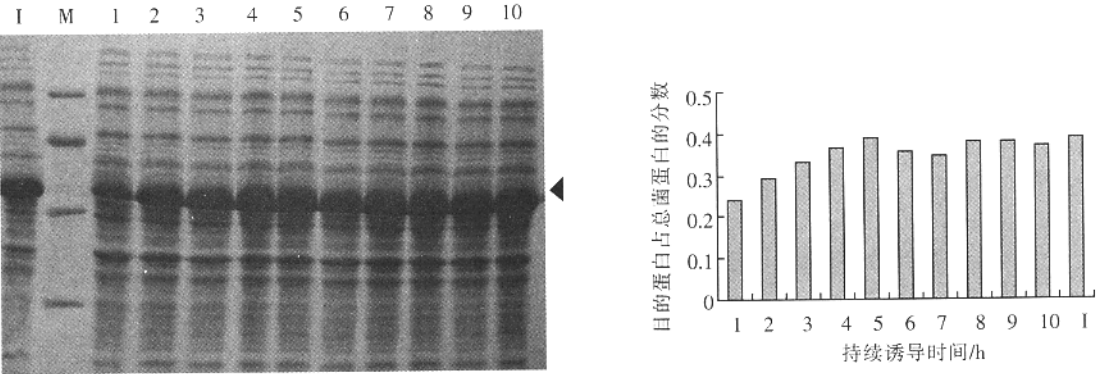


图4 补加乳糖和氨苄青霉素对目的蛋白表达量的影响

I:IPTG 诱导 5 h; M:相对分子质量标准; 1:乳糖诱导 1 h; 2:乳糖诱导 2 h; 3:乳糖诱导 3 h; 4:乳糖诱导 4 h; 5:乳糖诱导 5 h 补加乳糖; 6:补加后 1 h; 7:补加后 2 h; 8:补加后 3 h; 9:补加后 4 h; 10: 诱补加后 5 h;箭头所示为目的蛋白。

2.5 不同培养基对目的蛋白表达的影响

由图 5 可知 :与进口 LB 培养基的培养效果相比 ,国产 LB 培养基、M9 培养基的效果有明显差距 ,而用 1/2 进口 LB 培养基、1/4 进口 LB 培养基差别不大。

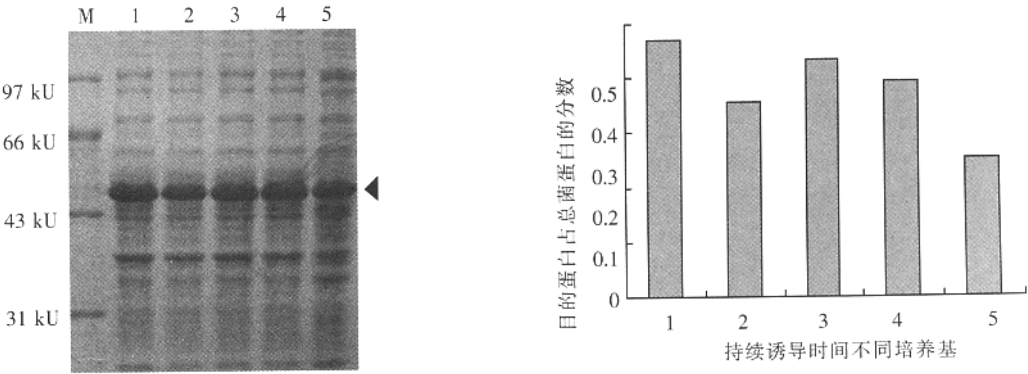


图5 不同培养基对目的蛋白表达的影响

M:相对分子质量标准; 1:进口 LB; 2: 国产 LB; 3: 1/2 进口 LB 培养基; 4: 1/4 进口 LB 培养基; 5: M9 培养基;箭头所示为日的蛋白。

2.6 表达产物的分布

经凝胶成像系统分析由乳糖诱导所获得的目的蛋白 61.6% 以可溶性蛋白的形式存在 ,见图 6。

2.7 表达产物的活性

由图 7 可知 ,IPTG 和乳糖诱导的目的蛋白均有很高的催化活性。

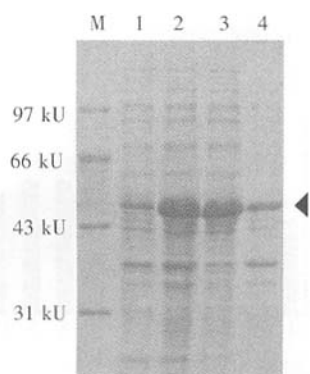


图 6 表达产物的分布

M: 相对分子质量标准; 1: 未诱导的总菌蛋白; 2: 乳糖诱导后的总菌蛋白; 3: 乳糖诱导上清; 4: 乳糖诱导沉淀; 箭头所示为目的蛋白。

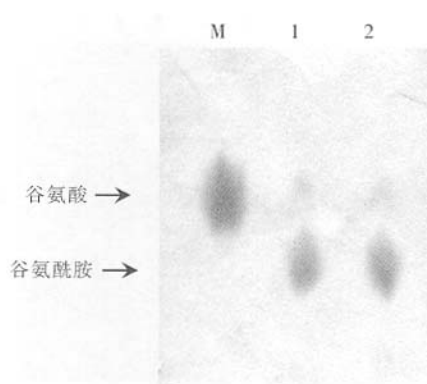


图 7 表达产物的活性

M: 谷氨酸标准品; 1: IPTG 所诱导谷氨酰胺合成酶催化活性; 2: 乳糖所诱导谷氨酰胺合成酶催化活性。

3 讨论

乳糖(lac)操纵子是迄今为止研究的最为深入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。乳糖以其无毒、价廉的特点,使得人们期望能够利用其作为 IPTG 的替代诱导物。然而,由于乳糖本身是一种碳源,可以被菌体代谢所利用,引起菌体及生长特性的变化,同时因乳糖只有借助于乳糖透性酶的作用进入到菌体细胞内,并经过 β -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖才会起到诱导作用,所以,需要对乳糖诱导下菌体的生长及诱导条件进行更为精细的研究及优化。

本文对重组枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶在大肠杆菌中的表达进行了研究,确定了在使用乳糖为诱导物时,菌株最佳诱导起始生长量、最适诱导物浓度、最佳诱导时间、补加乳糖和氨苄青霉素对目的蛋白表达量的影响、不同培养基对目的蛋白表达的影响。结果表明,在优化诱导表达条件之后,与 IPTG 诱导相比,用乳糖为诱导剂时谷氨酰胺合成酶的产量没有降低,相反有所上升,而且目的蛋白绝大部分以可溶的形式表达。这可能是因为 IPTG 不仅对人体具有潜在的毒性,而且也会抑制宿主菌的生长及重组蛋白的表达,而乳糖不具有毒性,且本身是一种碳源,为宿主菌提供了额外的营养。这表明对大肠杆菌表达的重组枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶而言,乳糖可以作为极佳的诱导剂在工业化生产中广泛使用。

此外,国产 LB 培养基和 M9 培养基中目的蛋白的诱导表达产量与进口 LB 培养基相比虽然有一定的差距,但差距并不大,在实际工业化生产中可以通过成本核算考虑是否采用这些低成本的培养基。本实验对重组枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶的工业化生产提供了一定的参考数据。

[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): 2952-2957.
- [3] 陈群英, 陈国安, 薛彬, 等. 基因工程酶法结合酵母能量耦联高效合成 L-谷氨酰胺的研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 456-460.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.

[责任编辑:孙德泉]