

文章编号 :1009-038X(2002)05-0492-04

半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中过量表达及 IPTG 诱导条件

陈卫, 葛佳佳, 张灏, 丁霄霖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:从嗜热脂肪芽孢杆菌(*IAM11001*)中克隆出编码热稳定的半乳糖苷酶蛋白基因 *bga B*, 构建具 T7 强启动子的 pET-20(b)-*bga B* 质粒, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达. 经 IPTG 诱导后, 重组菌周质中乳糖酶酶活达到 0.12 U/mL, 胞内酶活为 1.35 U/mL, 比酶活为 6.66 U/mg 蛋白, 比酶源菌产生的酶活提高 50 倍. 通过对 IPTG 诱导时机、诱导浓度和诱导时间的优化研究, 重组菌产生的比酶活进一步提高至酶源菌的 90 倍.

关键词:嗜热脂肪芽孢杆菌; β -半乳糖苷酶; 基因克隆; T7 表达系统; 大肠杆菌; 诱导条件

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Overexpression of β -galactosidase Gene *bga B* in *Escherichia coli* and Studies on IPTG Induction

CHEN Wei, GE Jia-jia, ZHANG Hao, DING Xiao-lin

(School of Food Science & Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A thermostable β -galactosidase gene *bga B* from *Bacillus stearothermophilus* (*IAM11001*) was cloned into pET-20(b) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). Expression was induced by IPTG, and the periplasmic and cytoplasmic enzyme activity reached 0.12 U/mL and 1.35 U/mL respectively. The specific activity of recombinant protein reached 6.66 U/mg protein, 50-fold higher than original strain. After optimizing of induction time, IPTG concentration and induction length, the enzyme activity increased to 90 times of original strain.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*; β -galactosidase gene cloning; T7 expression vector; *Escherichia coli*; induction conditions

β -半乳糖苷酶(β -Galactosidase, EC 2.3.1.23) 俗称乳糖酶, 因其能催化 β -半乳糖苷键水解而具有重要的工业用途, 如乳品加工中常用 β -半乳糖苷酶催化牛乳中乳糖的水解, 以生产低乳糖牛奶.

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)能合成 β -半乳糖苷酶. 据 Haruhisa 等^[1]报道, 嗜热脂肪芽孢杆菌能产生 3 种 β -半乳糖苷水解酶, 其中最耐热的一种为 β -Gal K (亚基相对分子量

70 000), 由 *bga B* 基因编码. 此酶的最适 pH 为 6.5, 最适作用温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 而且热稳定性非常好, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下酶活半衰期达到 500 h. 但这种耐热酶 β -Gal I 在出发菌株中酶活极低, 仅占总酶活的 1/10 左右.

本实验室开展了高温乳糖酶的基因工程研究, 已将来自嗜热脂肪芽孢杆菌 *IAM11001* 的 *bga B* 基因克隆出来, 并在大肠杆菌 *tac* 系统中成功表达, 与出发菌株相比, 耐热酶活提高了 10 倍左右^[2]. 尝试

收稿日期 2002-01-10; 修订日期 2002-06-10.

作者简介: 陈卫(1966-), 男, 江苏江都人, 讲师, 食品科学与工程在职博士研究生.

万方数据

了利用 pET 表达载体在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达 ,并对其诱导条件进行研究.

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、酶和主要试剂

嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilis*)IAM11001 和大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存. pET-20(b)表达载体和宿主菌 BL21(DE3)购自 Novagen 公司 ;限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶均购自 Takara 公司 ;IPTG 购自 Sagon 公司 ;相对分子质量低的蛋白质标准物购自华美生物工程公司.

1.2 质粒的抽提、感受态细胞的制备和质粒的转化

参照文献 [3] .

1.3 酶活检测

以 ONPG 为底物 ,在 55 $^{\circ}$ C 下(pH 值为 7.0)测定 β -半乳糖苷酶酶活. 1 个单位酶活定义为 1 min 内酶水解底物产生 ONP 的 μ mol 数.

1.4 周质酶活的检验

用渗透压法获得周质内蛋白 ,以 1.3 的方法测定酶活.

1.5 蛋白质含量测定

考马斯亮蓝法 ,以牛血清白蛋白 BSA 为标准.

1.6 菌株的诱导表达

将表达菌株培养至 OD 值为 0.5 时 ,加入

IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L ,诱导 4 h.

1.7 表达培养基

重组菌 pET-bga B06 的培养采用 SOB 培养基 胰蛋白胨 20 g 酵母膏 5 g 氯化钠 0.5 g 0.25 mol/L 氯化钾 10 mL 灭菌后加入 5 mL 2 mol/L 的 MgCl $_2$ 溶液. 氨苄青霉素 Amp 质量浓度为 100 μ g/mL.

2 结果与讨论

2.1 耐热 β -半乳糖苷酶基因的克隆

2.1.1 目的基因的克隆 耐热 β -半乳糖苷酶基因来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 ,基因序列报道见文献 [4] . 首先将嗜热脂肪芽孢杆菌的染色体 DNA 提取出来 ,以基因的报道序列设计引物 ,扩增出 2kb 的 DNA 条带 ,平端连入克隆载体 pBlue-Script 中 ,获得的转化子用 PCR 法判定方向 ,两个不同插入方向的转化子中的 *bga* B 基因测序 ,与报道的序列相一致.

2.1.2 重组质粒的构建 从已构建好的 pBlue-Script-bga B 中用限制性内切酶 NotI 和 SalI 切下 *bga* B 片段 ,插入 pET-20(b)载体 ,质粒构建图见图 1. pET 载体是利用大肠杆菌 T7 噬菌体的转录体系为元件构建的表达体系 ,是目前最有效的大肠杆菌表达载体之一.

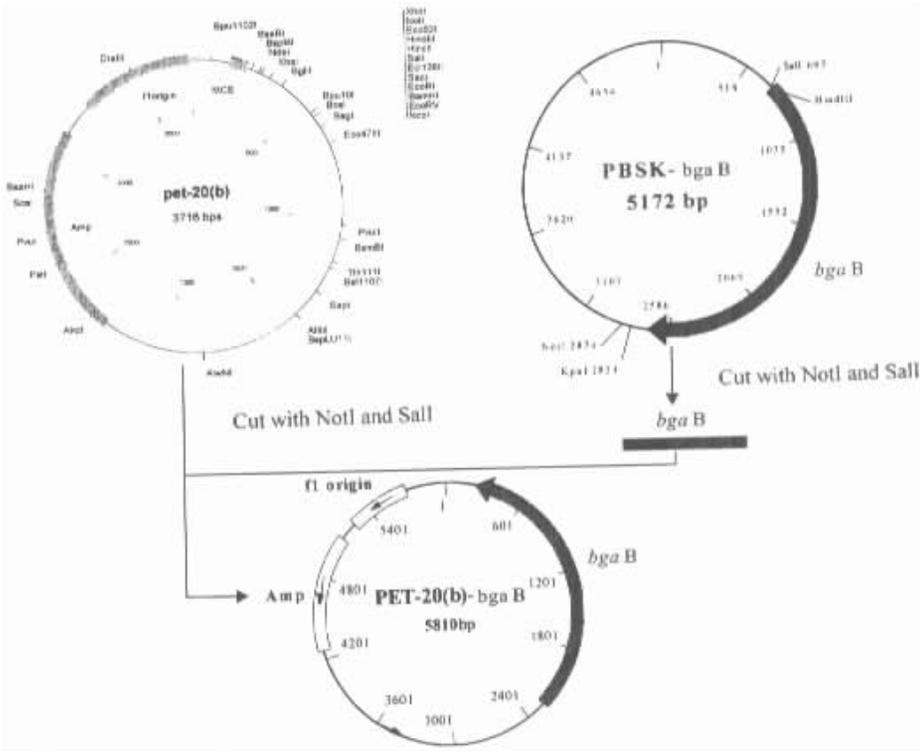


图 1 pET-20(b)-bga B 的质粒构建图

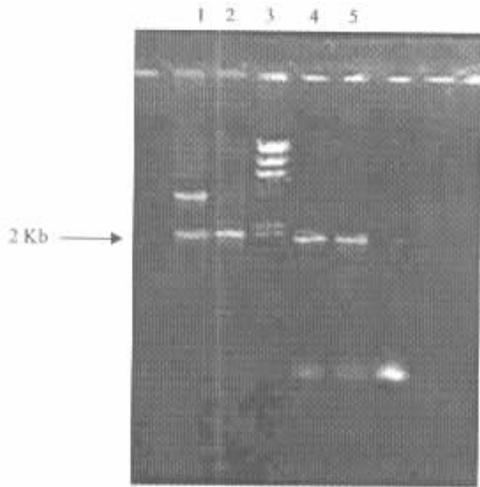
Fig.1 Construction of Plasmid pET-20(b)-bga B

2.2 β -半乳糖苷酶基因的表达

2.2.1 重组质粒的转化

用氯化钙法将重组质粒转入克隆宿主 JM109 中,筛选转化子,提取质粒后转化表达宿主 BL21 (DE3)中,再筛选转化子^[5].

将转化子 pET-bgaB06 小量培养,提取质粒,用 NotI 和 SalI 双酶切.同时以此质粒 DNA 为模板,用 *bga B* 基因的上下游引物进行 PCR 扩增,电泳结果(图 2)显示在 2 kb 左右均有条带.



1. pET-20(b)-bga B 质粒用 NotI 和 SalI 双酶切;
2. 对照(pBSK-bga B1 的 PCR 扩增产物);
3. λ DNA/HindIII 相对分子质量标准;
4. 5. PCR product of transformant

图 2 重组质粒 pET-20(b)-bga B 的 PCR 鉴定结果

Fig.2 The PCR analysis of pET-20(b)-bga B

2.2.2 表达初检验

转化子依照材料方法所述进行诱导表达后,收集菌体,检测酶活,结果见表 1.由酶活检测结果可知,重组菌周质内酶活只占总酶活的 1/10,周质分泌效率较低.培养基上清液中基本无酶活,说明 *bga B* 基因在该系统中不能外泌表达,但总酶活比出发菌株^[2]提高了 50 倍左右.

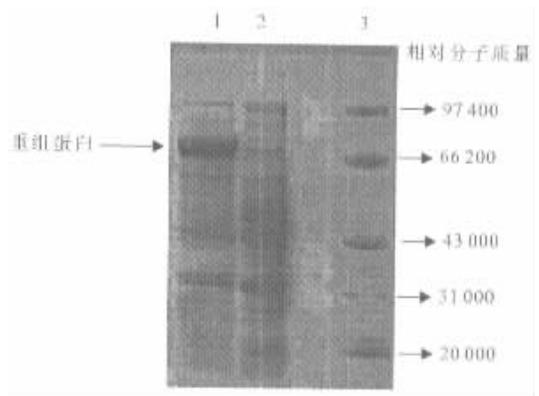
表 1 重组菌和出发菌株酶活的比较

Tab.1 Comparison of enzyme activity of recombinant strain and original strain

项 目	出发菌株	胞内	周质	培养基
酶活(U/mL)	0.02	1.35	0.12	<0.001
比酶活(U/mg)	0.13	6.66	6.78	<0.001

2.2.3 电泳检验

为了进一步检验重组蛋白的存在,取转化子培养液进行全细胞蛋白质的 SDS-PAGE,以转入空 pET-20(b)菌株的 BL21(DE3)为对照,结果见图 3.



1. pET-bga B06 的全细胞蛋白;
2. BL21(DE3) (pET-20(b)) 的全细胞蛋白;
3. 低相对分子质量蛋白质标准

图 3 pET-bga B06 的全细胞蛋白质电泳图

Fig.3 Protein electrophoresis of recombinant cell pET-bgaB06

2.3 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导条件的优化

IPTG 是一种乳糖类似物,能够与 T7 RNA 聚合酶基因前的 LacUV5 的表达产物相结合,解除其对 T7 RNA 聚合酶表达的阻遏,促进 T7 RNA 聚合酶的表达,从而大量转录插在 T7 启动子后的外源基因的表达.实验通过 IPTG 诱导时期、诱导浓度和诱导时间的进一步研究,找出基因工程菌的最佳诱导表达条件.

2.3.1 最佳诱导时期的选择

pET-bga B06 过夜培养物转接 SOB 培养基,分别在培养 1 2 3 4 5 6 8 h 时,加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,诱导表达 4 h,结果见图 4.

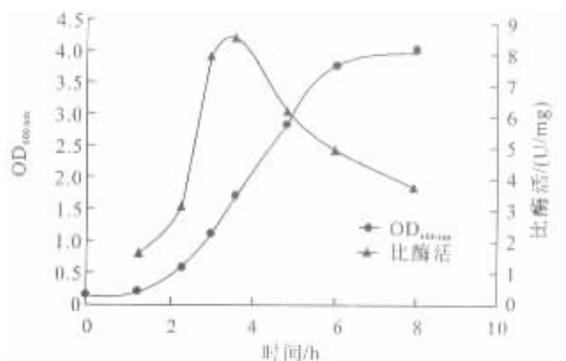


图 4 诱导时期对 IPTG 诱导表达的影响

Fig.4 Effect of inducing time on the expression

从图 4 可以看出,加入诱导剂的最适时间应为 4 h 左右,即对数生长期中期,此时表达量达到了最高值.诱导时机对基因表达效果影响很大,加入过早或过迟, *bga B* 的表达水平都不够理想.可能因为过早诱导微生物还处于年轻时期, *bga B* 产物的大

量产生干扰了宿主细胞的生长;若诱导太迟,菌体已成熟,菌体内各种酶的合成能力降低,表达量也减少。

2.3.2 最适诱导浓度的选择

pET-bga B06 过夜培养物转接 SOB 培养基,培养 4 h 时,加入 IPTG 至终浓度分别为 0.05、0.2、0.35、0.5、0.65、0.8、0.95、1.1 mmol/L,各自诱导表达 4 h,结果见图 5。

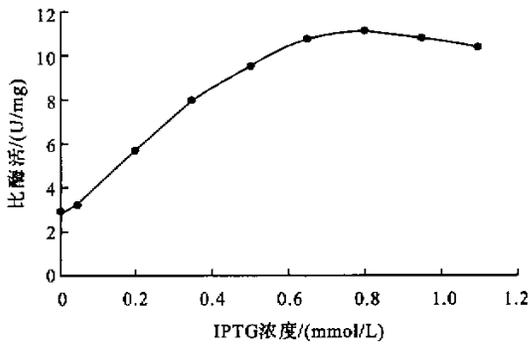


图 5 IPTG 浓度对表达量的影响

Fig. 5 Effect of IPTG concentration on inducing expression

由图 5 可以看出, IPTG 在浓度达到 0.8 mmol/L 时,即可使 *bga B* 的表达量达到最大。当大于 0.8 mmol/L 后, IPTG 对 *bga B* 的表达没有显著的影响。由于高浓度 IPTG 对含质粒工程菌的生长具有抑制作用,再加上 IPTG 本身价格昂贵,控制好 IPTG 的浓度是非常必要的。

2.3.3 最适诱导长度的选择

pET-bga B06 过夜培养物转接 SOB 培养基,培养 4 h 后,加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,分别在 37 °C 下诱导表达 1、2、3、4、5 h,结果见图 6。

由诱导结果可知,诱导 4 h 时表达量达到最高,而继续诱导下去表达量并没有得到相应的提高。

综上所述,重组大肠杆菌 pET-bga B06 的最佳诱导条件为:摇瓶发酵 4 h,加入 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L,诱导 4 h,β-半乳糖苷酶比酶活能达到 12 U/mg,比出发菌株提高 90 倍。

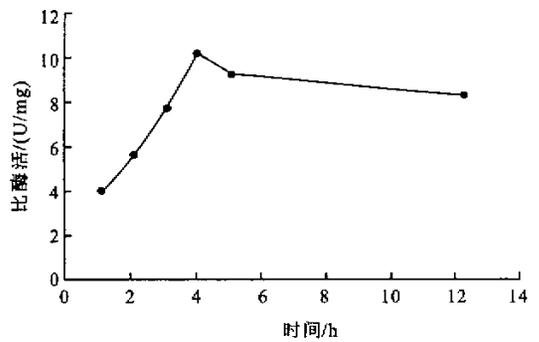


图 6 IPTG 诱导时间对表达的影响

Fig. 6 Effect of IPTG inducing time on enzyme activity

3 结 论

bga B 基因在 pET 表达载体中的表达效果较好,比采用 pKK223-3 载体进行表达的效果增强^[2]。但重组 β-半乳糖苷酶在 pET 载体中表达时,周质分泌效率较低。影响周质表达水平的因素很多,如启动子、信号肽、蛋白质本身特点、宿主、生长条件等,每一种因素都可能会对周质分泌产生影响。有研究表明,采用很强的启动子如 P_L、T7 等,重组蛋白虽可获得高效表达,但往往以未切去信号肽的前体分子聚集在胞内或结合在内膜内侧。本实验中所获得的重组蛋白也大部分存在于胞内,而仅有少量分泌到周质内。这与使用了强启动的 T7 启动子有一定的关系。

pET 表达系统信号肽 pel B 来源于欧文氏菌^[6],虽然该信号肽已经多次应用于大肠杆菌表达系统并成功地使目标蛋白转运到周质蛋白中,但并不是任何蛋白质加上信号肽序列都可以转运到周质空间中。一些结构相似的蛋白,有的可以顺利地转运,有的在同样条件下却不能,目前对这些现象还难以解释。因为转运过程比较复杂,涉及到许多因素,其机理目前尚未完全清楚,还需通过进一步的深入研究加以阐明。

参考文献:

- [1] HIRATA H, FUKAZAWA T. Structure of α-galactosidase gene of bacillus stearothermophilus [J]. *Journal of bacteriology*, 1986, 166: 722-727.
- [2] 葛佳佳, 陈卫, 张灏. 耐热 β-半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达 [J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(3): 296-298.
- [3] J. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [4] HIRATA H, NEGORO S, OKADA H. Molecular basis of isozyme formation of β-galactosidases in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two β-galactosidase genes, *bgaA* and *bgaI* [J]. *J Bacteriol*, 1984, 160: 9-14.
- [5] F. 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] 李育阳. 基因表达技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 6-12.