文章编号:1673-1689(2008)05-0062-05

荧光素酶编码基因 luc 在大肠杆菌中的克隆、表达及纯化

夏 蕾[1,2], 饶志明*[1,2], 沈 微[1,2], 方慧英[1,2], 诸葛健[1,2]
(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 以荧光虫荧光素酶报告载体 pXP2 DNA 为模板,扩增得到编码萤火虫荧光素酶(LUC)的基因(luc),构建了诱导型表达载体 pQE30-luc。将载体导入 *E. coli* M15 获得高效诱导表达萤火虫荧光素酶基因的重组菌 M15/pQE30-luc。SDS-PAGE 电泳分析显示:重组蛋白的相对分子质量为 60 000,表达量占全菌胞内可溶性蛋白质的 50.9 %. 利用表达载体 pQE30 上的 His·Tag 标记选用 Ni 柱纯化表达具有活性的萤火虫荧光素酶(LUC),纯化后比酶活达到 1.43×10^9 RFU/ mg,纯化倍数达 10.6 倍,回收率为 25.3%.

关键词: 萤火虫荧光素酶;克隆;表达;纯化
中图分类号:Q 939.97 **文献标识码**: A

Cloning, Expression and Purification of Firefly Luciferase in *E. coli*

XIA Lei[1,2], RAO Zhi-ming*[1,2], SHEN Wei[1,2], FANG Hui-ying[1,2], ZHUGE Jian[1,2]
(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this research, the *luc* gene coding firefly luciferase (LUC) was amplified by using the DNA of Luciferase reporter vector pXP2 as the template. The *luc* gene was subcloned into expression vector pQE30 and its product LUC was overexpressed in *Escherichia coli* M15. LUC purified by Ni-NTA affinity chromatography showed a single band about 60 000 on SDS-PAGE gel and the expressed LUC accounted for 50.9 % in *E. coli*. The specified activity was about 1.43 10^9RFU/ mg, the purification fold is 10.6 times and the activity recovery is 25.3 %.
Key words: firefly luciferase; cloing; expression; purification

荧光素酶(firefly luciferase, LUC)是生物体内催化荧光素或者脂肪醛氧化发光的一类酶的总称。荧光素酶可以从发光细菌、萤火虫、发光海星和发光甲虫等多种发光生物中提取出来。由于荧光素酶具有灵敏性高、特异性好、反应迅速、操作简便、应用广泛,且对生物体无毒害作用等诸多优点,荧

收稿日期:2008-07-25.
基金项目:国家自然科学基金项目(20676053);国家 863 计划项目(2006AA020103);江苏省青年科技创新人才基金项目(BK2006504);长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0532).
作者简介: 夏蕾(1983-),女,江苏宿迁人,微生物学硕士研究生.
*通讯作者: 饶志明(1975-),男,江西临川人,农学博士,教授,硕士生导师,主要从事工业微生物育种及分子生物学改造方面的研究. Email:raozm@yahoo.com.cn.

万方数据

光素酶越来越多地应用于医学、分子生物学、环境监测等相关领域[1]。

萤火虫荧光素酶是由单一的多肽链组成的,从不同地种类的萤火虫中所提取出的荧光素酶的相对分子质量和结构也略有差异[2],其相对分子质量范围是60 000～64 000。萤火虫荧光素酶在有 O_2、Mg^{2+}、ATP 存在的条件下,催化 D-荧光素氧化脱羧,将化学能转化为光能,并释放出光量子,发出绿光[3],其反应可表示如下[4]:

$$\text{D-荧光素} + \text{ATP} + O_2 \xrightarrow[Mg^{2+}]{FL} \text{Oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + CO_2 + \text{光}$$

目前萤火虫荧光素酶的制备大多采用常规方法,以萤火虫为原料,从大量养殖的萤火虫中取下尾部的发光部分,经连续脱水处理,超低温冷冻贮存备用。每6 000个萤火虫可获得发光部分约 30 g。萤火虫需要人工捕捉和繁殖,这就受到地域和季节的限制,且繁殖周期长,养殖成本高,后处理还要经过离心分离、硫胺分级沉淀、柱层析纯化等多个化学提取步骤,才能最终得到结晶制剂[5]。

随着分子生物学的发展,人们开始用基因工程的方法进行生产。1985 年,Jeffery 等人首次克隆了萤火虫荧光素酶基因,并在 *E. coli* 中成功表达,从中得到具有活性的荧光素酶[6]。随后各种发光甲虫的荧光素酶基因相继克隆成功,并能在原核和真核表达系统中成功表达[4]。1993 年,Lu 等人构建了一株可以高效分泌萤火虫荧光素酶且可以分泌到细胞质中的 *E. coli* 菌株[6],从而使大规模发酵生产萤火虫荧光素酶成为可能。与常规方法比较,利用基因工程菌发酵生产具有周期短、成本低、过程易于规范控制等诸多优点,且由于发酵培养基成分简单、虫光素酶基因可受启动子基因调控,使其具备易纯化和可诱导高产的特点。因此利用基因工程菌发酵生产萤火虫荧光素酶成为国内外学者研究的热点。

作者克隆了来自荧光素酶报告载体 pXP2 的编码萤火虫荧光素酶的 luc 基因,构建了重组表达载体 pQE30-luc,并实现了萤火虫荧光素酶的成功表达。利用镍柱亲和层析法对其表达产物荧光素酶进行了纯化,得到酶活力较高的酶液,为其酶学性质的进一步研究奠定了良好的基础。

1　材料与方法

1.1　菌株和载体

大肠杆菌 M15、JM109 由作者所在实验室保藏,pXP2 载体由 Nordeen 教授惠赠[7],原核表达载体 pQE30 购自 Novagen 公司,克隆载体 pMD18-T 购自 Takara 公司。

1.2　工具酶和试剂

DNA 限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker 均购自 Takara 公司;DNA 纯化及片段回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒为博大泰克公司产品;荧光素酶检测试剂盒购自上海来安生物技术有限公司;金属螯合亲和层析柱(Ni-NTA)购自德国 QIAGEN 公司;Yeast Extract 和 Polypeptone 购自 England Oxoid LTD;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自 American Promega Corporation;广范围蛋白质相对分子质量标准盒购自 Fermentas 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3　培养基及培养条件

采用 LB 培养基[8],培养温度为 37 ℃,摇床转速 200 r/ min,氨苄青霉素质量浓度为 100 μg/ mL,卡那霉素质量浓度为 50 μg/ mL,以体积分数 2 %的接种量转接,相同培养条件下,培养至 OD 值(600 nm)约为 0.5～0.6,将其放入 4 ℃冰箱中彻底冷却,加入诱导物 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/ L,在 16 ℃、220 r/min 的摇床上培养过夜。

1.4　萤火虫荧光素酶基因的克隆

根据 NCBI 中 pXP2 载体中编码萤火虫荧光素酶基因 *luc* DNA 序列,设计引物,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;

上　游:　5′-CGC*GGATCC*ATGGAAGACGCCAAAAAC-3′　(*Bam*HⅠ)

下　游:　5′-CGC*AAGCTT*TTACAATTTGGACTTTCCG-3′　(*Hind*Ⅲ)

以 pXP2 载体为模板,PCR 扩增条件为 94 ℃,预变性 5 min;94 ℃ 50 s,52 ℃ 1 min,72 ℃、1 min 30 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min[9－10]。所得片段胶回收后,与克隆载体 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* JM109,挑取阳性转化子。提取质粒酶切鉴定,并将重组质粒命名为 T-*luc*,并测序。

1.5　大肠杆菌表达载体的构建

将 T-luc 用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ进行双酶切,胶回收 *luc* 片段,将其与经过相同酶切的 pQE30 载体连接,将得到的重组表达载体命名为 pQE30-luc[11],见图 1。

1.6　编码荧光素酶基因的诱导表达

将重组表达载体 pQE30-*luc* 转入大肠杆菌 *E. coli* M15 中,筛选出阳性转化子。挑选阳性转化子接种至含卡那霉素(终质量浓度为 50 μg/mL)和

万方数据

氨苄青霉素(终质量浓度为100 μg/mL)的LB培养基中,培养、转化和诱导培养条件如1.3所述。

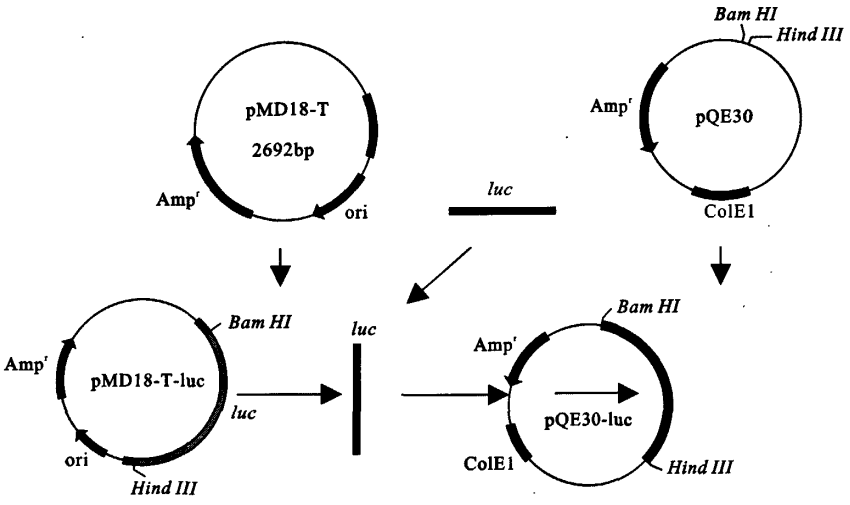


图1 质粒pQE30-*luc*的构建

Fig. 1 Construction of pQE30-*luc*

1.7 SDS-PAGE

采用5 g/dL的浓缩胶及12 g/dL分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白质分离,考马斯亮兰R-250染色[12]。

1.8 Ni-NTA纯化

将低温诱导过夜的菌液高速离心收集菌体,用PBS缓冲液(pH 7.4)洗涤一次,将其溶于MCAC-0缓冲液(20 mmol/ L Tris-HCl,500 mmol/ L NaCl,质量分数10%甘油,pH 8.0)中,于-20 ℃下冷冻过夜,解冻后,超声波破碎至菌液澄清(操作过程在低温下进行),高速离心,取上清液经0.45 μm滤膜过滤后上柱,经Ni-NTA纯化得到纯化后的荧光素酶[13-14]。

1.9 荧光素酶活性检测

将待测酶液样品与标准底物(上海来安生物技术有限公司)按体积比1∶5加于96孔白色微孔板的各个微孔中,混合均匀后立即放于荧光发光检测仪中记录数值。一般10~20 μL酶液加入100 μL的工作液,并以其记录的数值来表示酶的相对活性。

1.10 蛋白质质量分数测定

粗酶液蛋白质质量分数采用Bradford法[15]测定,以BSA为标准蛋白质。

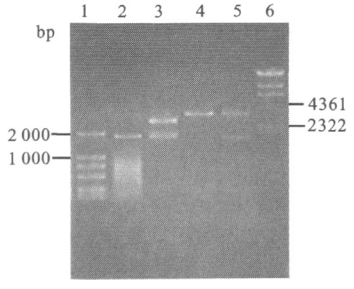
2 结果与分析

2.1 *luc* DNA的克隆及分析

以pXP2载体为模板,以P1、P2引物进行扩增,得到大小约1 800 bp的片段。将该片段回收纯化后,克隆到pMD18-T载体测序。扩增获得的基因*luc*DNA序列与GenBank中公布的Luciferase reporter vector pXP2 (GI:3929275)中luc基因序列进行比较,测得同源性达100%。

2.2 重组大肠杆菌表达载体的构建

将T-*luc*用BamH Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切,胶回收1 800 bp *luc*片段,将其与经相同酶切的pQE30载体连接,酶切验证,重组质粒经*Bam*H Ⅰ和*Hind*Ⅲ进行双酶切,释放约3 000 bp和1 800 bp大小的片段,分别对应于pQE30和*luc*的大小。结果表明,重组质粒构建成功,将其命名为pQE30-*luc*,见图2。



1. DNA Marker DL2000; 2. *luc* gene; 3. T-*luc* /*Bam* H Ⅰ + *Hind* Ⅲ; 4. pQE30 / *Hind* Ⅲ; 5: pQE30-*luc*/*Bam*H Ⅰ + *Hind* Ⅲ; 6: λ DNA/*Hind* Ⅲ;

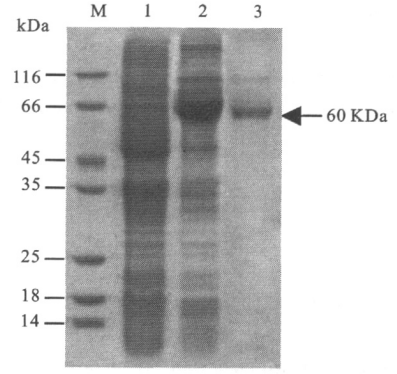
图2 质粒pQE30-*luc*的酶切验证

Fig. 2 Restriction map of recombinant plasmid pQE30-*luc*

万方数据

2.3 *luc* 基因在 *E. coli* M15 中表达与重组蛋白质的纯化

将 pQE30-*luc* 转入 *E. coli* M15 中，在卡那霉素和氨苄青霉素抗性 LB 平板上挑选阳性转化子，即 pQE30-luc/M15，经 IPTG 诱导后的菌液经超声波破碎细胞，上清液 SDS-PAGE 分析，检测到一条相对分子质量约为60 000 的特异性条带，与报道的目标蛋白质大小一致[4]，其表达量占全菌胞内可溶性蛋白质的 50.9 %，见图 3。上清液测得酶活为 1.35×10^8 RFU/mg，表明基因在大肠杆菌中得到表达，且表达酶蛋白具有生物学活性。



M：protein marker；1：阴性对照；2：基因 *luc* 在 M15 中表达；3：纯化后 LUC

图 3　M15 中诱导表达 LUC 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE profile of LUC in *E. coli* M15

采用镍柱金属亲和层析法对萤火虫荧光素酶进行了纯化。纯化后的荧光素酶经 SDS-PAGE 分析，可看出经过纯化后得到均一条带，可以认为已得到相对较纯的荧光素酶蛋白。纯化后酶液的比酶活达到 1.43×10^9 RFU/mg，是纯化前粗酶液酶活的 10.6 倍，活力回收率为 25.3 %，见表 1。

表 1　萤火虫荧光素酶的纯化表

Tab. 1　Purification scheme for firefly luciferase

	总蛋白质质量/mg	总活力/RFU	比酶活/(RFU/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	28.6	3.86×10^9	1.35×10^8	100	1
亲和色谱柱	0.68	9.76×10^8	1.43×10^9	25.3	10.6

3　结　语

作者从荧光素酶报告载体 pXP2 上扩增得到的编码萤火虫荧光素酶的基因 *luc*，将 *luc* 置于 T_5 启动子下游，成功构建表达了质粒 pQE30-*luc*，并转化至其专性宿主菌 *E. coli* M15 中。重组菌经 IPTG 诱导后，经过 SDS-PAGE 分析相对分子质量为 60 000 目标蛋白质条带，表达量占全菌胞内可溶性蛋白质的 50.9 %，说明外源蛋白-萤火虫荧光素酶成功表达。破碎细胞后取上清液，检测荧光素酶的比酶活为 1.35×10^8 RFU/mg，对荧光素酶进行了纯化，纯化获得的荧光素酶比酶活达到 1.43×10^9 RFU/mg。本实验中用于表达 *luc* 的表达载体为 pQE30，由于该载体上含有 His6 · Tag 组氨酸标签，利用该特点，实验中采用了 Ni-NTA 柱纯化目标蛋白质的方法对目标蛋白-萤火虫荧光素酶进行了纯化，纯化得到的酶与粗酶液相比，酶活提高了 10.6 倍。此方法与文献[16]中报道的利用硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤层析和离子交换层析等方法纯化得到萤火虫荧光素酶相比，工艺简单，表达量高，且获得重组酶酶活较高，具有生物学活性，为酶学性质的进一步研究奠定了良好的基础。

参考文献(References)：

[1] 杨颖，张逢春. 荧光素酶的分类、结构与应用[J]. 北华大学学报：自然科学版，2006，7(5)：411－415.
YANG Yin，ZHANG Feng-chun. The species，structure and applications of luciferase[J]. **Journal of Beihua University：Natural Science**，2006，7(5)：411－415. (in Chinese)

[2] Yuichi O Mitsunori，Yuichiro O. Identification of paralogous genes of firefly luciferase in the Japanese firefly，*Luciola cruciata*[J]. **Gene**，2006，368：53－60.

[3] 马三梅，王永飞. 绿色荧光蛋白和荧光素酶[J]. 生物学教学，2005，30(12)：5－6.
MA San-mei，WANG Yong-fei. Green fluorescent protein and Luciferase[J]. **Biology Teaching**，2005，30(12)：5－6 . (in Chinese)

[4] 张菊梅，吴清平，周小燕，等. 荧光素酶研究进展[J]. 微生物学通报，2001，28(5)：98－101.
ZHANG Ju-mei，WU Qing-ping，ZHOU Xiao-yan，et al. The research and evolution of Luciferase[J]. **Microbiology**，2001，28(5)：98－101. (in Chinese)

万方数据

[5] 蒋宇扬，金振华. 萤火虫荧光素酶的研究及开发利用. 生物工程进展，1995，15(6)：24－27.
JIANG Yu-yang，JIN Zhen-hua. The research and application of Firefly Luciferase[J]. **Progress in Biotechnology**，1995，15(6)：24－27. (in Chinese)

[6] Chen X J，Ren S R，Jin Zhen-hua，et al. Production and purification of firefly luciferase in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnology Techniques**，1996，10(2)：89－92.

[7] Nordeen S K. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers[J]. **Biotechniques**，1988，6 (5)：454－458.

[8] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京：高等教育出版社，1996.

[9] 徐娴，谢承佳，何冰芳. 枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的克隆及高效表达[J]. 食品与生物技术学报，2007，26(5)：75－78.
XU Xie，XIE Cheng-jia，HE Bin-fang. Cloning and effective expression of glucose dehydrogenase gene from *Bacillus subtilis* in *E. coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2007，26(5)：75－78. (in Chinese)

[10] 张晓梅，唐雪明，诸葛斌，等. 编码 1，3-丙二醇氧化还原同工酶基因 *yqh*D 的克隆与高效表达[J]. 食品与生物技术学报，2006，25(4)：77－80.
ZHANG Xiao-mei，TANG Xue-ming，ZHUGE Bin，et al. Cloning and over expression of gene yqhD encoding 1，3-propenediol oxidor eductase isoenzyme in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2006，25(4)：77－80. (in Chinese)

[11] 李镭，丁宏标，余晓斌，等. 耻垢分枝杆菌海藻糖合成酶基因 TreS 的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 食品与生物技术学报，2007，26(6)：69－73.
LI Lei，DING Hong-biao，YU Xiao-bin，et al. Cloning and expression of TreS gene from *Mycobacterium smegmatis* in *Escherichia coil*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2007，26(6)：69－73. (in Chinese)

[12] Joseph S，David W R. Molecular Cloning[M]. New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press，2001.

[13] 田亚平. 生化分离技术[M]. 北京：化学工业出版社，2006.

[14] Masoomeh Y，Saman H，Khosro K，et al. Expression，purification and immobilizition of firefly luciferase on alkyl-substituted *Sepharose* 4B[J]. **Enzyme and Microbial Technology**，2007，40：740－746.

[15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**，1976，72：248－254.

[16] 蒋宇扬，金振华，王书锦，等. 萤火虫荧光素酶分离纯化及其特性研究[J]. 清华大学学报：自然科学版，1998，38(6)：16－19.
JIANG Yu-yang，JIN Zhen-hua，WANG Shu-jin，et al. Separation and properties of firefly luciferase[J]. **Journal of T singhua University：Sci&Tech**，1998，38(6)：16－19. (in Chinese)

（责任编辑：李春丽）

万方数据