

中性蛋白酶基因在大肠杆菌中诱导表达条件的研究

张 敏^{1,2}, 赵 丛¹, 路福平¹, 赵洪坤¹, 杜连祥¹

1(天津科技大学生物工程学院,天津市工业微生物重点实验室,天津,300457)

2(沈阳农业大学工程学院,辽宁沈阳,110161)

摘 要 采用PCR方法从枯草芽孢杆菌中扩增得到中性蛋白酶基因 *npr*,与表达载体 pET-22b(+)连接构建重组质粒 pET22b-*npr*,转化大肠杆菌 BL21 得到重组工程菌株。经 IPTG 诱导,其所含的中性蛋白酶基因可高效表达。研究不同的表达条件对中性蛋白酶表达水平的影响,发现当培养液的 OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 时,添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,28℃诱导 7 h,重组工程菌中性蛋白酶的表达量最高,SDS-PAGE 电泳结果显示明显的分子质量约 43 ku 的特异性蛋白条带。

关键词 枯草芽孢杆菌,大肠杆菌,中性蛋白酶,诱导表达

中性蛋白酶是指其最适作用 pH 为 6.0~7.5 的一类蛋白酶,能催化蛋白质肽键水解,具有催化反应速度快,无工业污染,催化反应条件适应性宽等性质和优点,被广泛地应用于食品、制药、化妆品、洗涤剂、丝纺、毛皮软化等行业。中性蛋白酶的研究工作自 1970 年代就已开始,但其发酵单位一直很低,科研工作者们试图通过诱变技术和基因工程手段来提高中性蛋白酶的发酵单位^[1~4]。

大肠杆菌是基因工程中常用的宿主菌,由于其遗传背景清楚,以及在实际生产中具有低成本、高效率、易操作等特点,因此成为外源基因的首选表达系统。目前已有关于中性蛋白酶基因在大肠杆菌中表达的报道,但众说纷纭。Wang 等人^[5]指出,由于中性蛋白酶基因(*nprE*)的表达产物对大肠杆菌有致死作用,因此在大肠杆菌中观察不到 *nprE* 的表达,若除去该基因上的核糖体结合位点,*nprE* 便能在大肠杆菌中低水平表达。吴汝平^[6]则认为,枯草杆菌蛋白酶基因不能在大肠杆菌中表达,是因为大肠杆菌不能转录枯草杆菌的促使生长调节基因。由此可知,枯草杆菌的中性蛋白酶基因能否在大肠杆菌中表达以及表达水平的高低,将成为能否用大肠杆菌作为宿主菌来表达中性蛋白酶基因的关键。

本试验将枯草芽孢杆菌的中性蛋白酶基因克隆并引入含 T7 启动子的高效表达载体 pET-22b(+)中,对中性蛋白酶基因在大肠杆菌中的表达进行了探索,以实现其在大肠杆菌中的表达,提高重组蛋白的表达量,为中性蛋白酶的工业化大规模生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)、JM109 以及质粒 pET-22b(+),由本研究室保存。

1.2 酶与试剂

本实验所用的限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sal*I、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司;DNA 分子量标准、Amp(氨苄青霉素)、IPTG (异丙基-β-D 硫代半乳糖苷)为 Takara 公司产品;DNA 胶回收试剂盒购自 Promega 公司;其它试剂为国产分析纯;引物合成及测序由 Invitrogen 公司完成。

1.3 培养基

LB(Luria-Bertani)培养基(g/L):用于大肠杆菌的液体培养,胰蛋白胍 10、酵母提取物 5、NaCl 10、pH 7.0。

LA 培养基:含有 1.6%琼脂粉的 LB 固体培养基。

SOC 培养基(g/L):用于质粒转化大肠杆菌后的液体培养,胰蛋白胍 20、酵母提取物 5、NaCl 0.5、2.5 mol/L KCl、10 mol/L MgCl₂、20 mmol/L 葡萄糖。

1.4 DNA 的提取及操作

参照分子克隆实验指南^[7]。

1.5 中性蛋白酶基因(*npr*)的克隆

从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中提取总 DNA,根据已发表的中性蛋白酶基因的全基因序列,设计用于扩增 *npr* 的一对引物:P1 为 5'-CGCGGATCCGGTGGGTTTAGGTAAGAAATTG-3' (*Bam*HI),P2 为 5'-CGCGTCGACTTACAATCCAACAGCATTCACG-3' (*Sal*I)。PCR 反应体系:10×Buffer 2μL,dNTP

第一作者:博士研究生(杜连祥教授为通讯作者)。

收稿日期:2007-05-16,改回日期:2007-06-20

200 μ mol/L; P1 和 P2 各 0.5 μ mol/L; 模板 DNA 1 μ g; Taq DNA 聚合酶 2U; 反应体系 20 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 90s, 72 $^{\circ}$ C 150s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.6 中性蛋白酶的诱导表达及表达产物的分析

将经鉴定后的 pET22b-*npr* 重组质粒转化到表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中, 同时以空白质粒转入相同宿主作为对照, 挑取单菌落到含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 然后按 1% 的接种量转接到新鲜的 LB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 值约为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L, 诱导表达 7 h。取一定体积的菌液于 8000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min, 沉淀用生理盐水洗涤 2 次并重悬于磷酸缓冲液 (pH=7.5), 于冰浴中超声破碎细胞后, 离心取上清液即为粗酶液, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳来考察蛋白的表达情况。

1.7 蛋白表达量的测定

应用 BIO-Rad 公司的 GS-700 凝胶扫描分析系统来分析 SDS-PAGE 电泳中蛋白的表达情况。

1.8 中性蛋白酶活力的测定

按部颁行业标准 QB1805.3-1993, 采用 Folin 法测定^[8]。蛋白酶活力定义为: 1 mL 液体酶, 在 40 $^{\circ}$ C 和 pH7.5 的条件下, 1 min 水解酪素产生 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示。

2 结果与讨论

2.1 *npr* 基因的 PCR 扩增结果

以 *B. subtilis* 的染色体 DNA 为模板, 使用引物 P1 和 P2 克隆出的 *npr* 的 DNA 序列, 经电泳显示 (图 1) 为单一的条带, 经测序证明其与 GenBank 上发表的中性蛋白酶基因序列的同源性达到了 99%, 大小为 1566 kb。

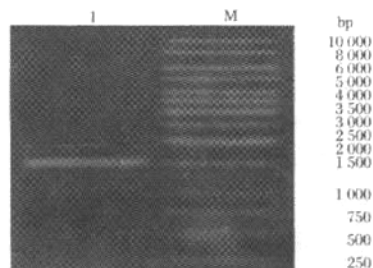


图 1 *npr* 基因的 PCR 结果

M—1kb DNA ladder; 1—*npr* PCR 产物

2.2 表达重组子的构建、筛选与鉴定

对 *npr* 基因的 PCR 产物与质粒 pET22b(+) 分别用 *Bam*HI 和 *Sal*I 限制性内切酶双酶切, 经 DNA 胶回收试剂盒回收后, 将 2 者以 3:1 的摩尔比进行连接, 将重组载体转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 在含有 100 μ g/mL Amp 的 LA 筛选平板上挑取阳性转化子, 获得了重组质粒 pET22b-*npr*。经酶切和 PCR 验证 (图 2), 均得到约 1.6 kb 大小的基因片段, 证明 *npr* 基因已成功重组到质粒 pET22b(+) 上。

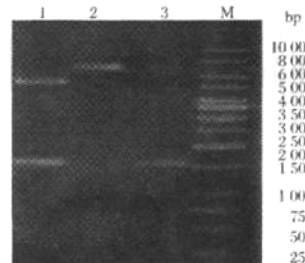


图 2 重组质粒 pET22b-*npr* 的酶切鉴定图谱

M—1kb DNA ladder; 1—pET22b-*npr* digested with *Sal*I/*Bam*HI;

2—pET22b-*npr* digested with *Bam*HI; 3—*npr* PCR 产物

为确认质粒 pET22b(+) 与 *npr* 基因信号肽序列之间的阅读框连接正确, 我们对重组质粒进行了测序, 结果表明 2 者连接处的读码框是正确的。

2.3 *npr* 表达产物的分析

将重组质粒 pET22b-*npr* 电转化入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 挑选阳性转化子, 获得表达重组菌 pET22b-*npr*/BL21。对重组菌进行诱导 6 h 后, 离心收集菌体经细胞破碎后进行 SDS-PAGE 电泳。

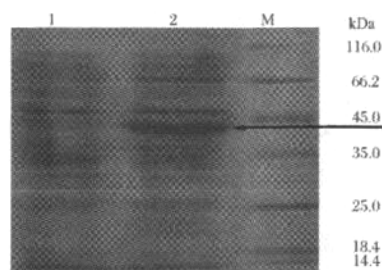


图 3 pET22b-*npr*/BL21 重组蛋白表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

M—蛋白质标样; 1—空白对照; 2—蛋白表达产物

由图 3 可以看出, 与对照空载体相比, 在约 43 ku 处有明显的特异性表达产物带产生, 表达量约占菌体总蛋白的 21.2%。试验说明实现了中性蛋白酶基因在大肠杆菌中的表达, 与刘白玲等人^[1]的试验结果相符, 即未经任何缺失处理的、完整的中性蛋白酶基因是可以在大肠杆菌中表达的, 但基因的表达产物并

没有被分泌到胞外,而是主要存在于大肠杆菌的细胞质中,这可能是由于中性蛋白酶基因所编码的信号肽在大肠杆菌中的功能不强,使合成的酶不能及时分泌至细胞周质造成的。

2.4 IPTG 作为诱导剂时诱导条件的确定

IPTG 是一种乳糖诱导物,能够与 *E. coli* BL21 (DE3) 中的 T7 RNA 聚合酶基因前 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。

2.4.1 诱导浓度对表达量的影响

将重组菌在诱导培养温度为 30℃、诱导时间为 6 h 的情况下,考察不同 IPTG 终浓度对重组菌诱导表达的影响。

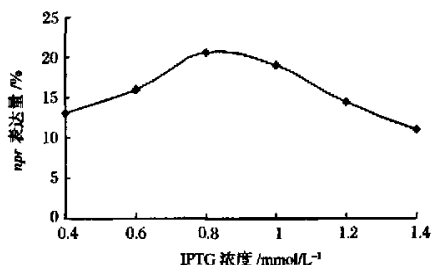


图4 IPTG 终浓度对 *npr* 表达量的影响

由图4可看出,随着 IPTG 浓度的增大,中性蛋白酶的表达式呈上升趋势,当 IPTG 浓度达到 0.8 mmol/L 时,表达量最高可达到 20.6%。由于 IPTG 具有一定的毒性,继续增大诱导剂的浓度,反而对产物表达不利。

2.4.2 诱导时间对表达量的影响

在诱导培养温度为 30℃、IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L 的条件下,对重组菌分别诱导表达 4、5、6、7、8、9 h,收获菌体,经 SDS-PAGE 测定中性蛋白酶的表达式情况,结果如图5所示。

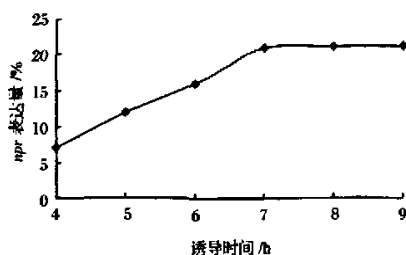


图5 诱导时间对 *npr* 表达量的影响

由诱导结果可知,随着诱导时间的延长,重组菌

株发酵液中蛋白酶的表达式呈缓慢上升的趋势,在诱导 7 h 时表达式达到 20.9%,而继续诱导下去表达式并没有得到相应的提高。这可能是因为随着诱导时间的延长,菌体产酶逐渐饱和,使表达式不再继续增加,反而会因为外源蛋白被菌体产生的蛋白酶降解,使表达式降低。

2.4.3 不同起始诱导 OD_{600} 值对表达式的影响

诱导时机对基因表达的效果影响很大。若诱导太早,微生物生长还处于初期,菌体密度太小,酶的总体表达式偏低;但诱导太迟,菌体内各种酶系已趋于成熟,蛋白酶等的切割加工能力增强,有可能使酶活水平下降。初始诱导 OD_{600} 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.5,在 30℃ 下诱导 7 h 后,测定中性蛋白酶的表达式情况,结果如图6所示。

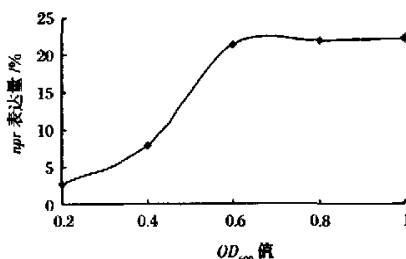


图6 初始 OD_{600} 值对 *npr* 表达量的影响

由图6可知,当初始诱导 OD_{600} 值低于 0.4 时,由于菌体太少,目的蛋白的表达式不高;若 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时开始诱导,则目的蛋白表达式较高;当 OD_{600} 值为 1.0 时开始诱导,目的蛋白不再继续增加;但如果起始 OD_{600} 值大于 1.5 时,没有检测到目的蛋白,可能是由于诱导前菌液浓度若过高,细胞分泌的代谢物抑制目的蛋白的表达式。

2.4.4 诱导温度的确定

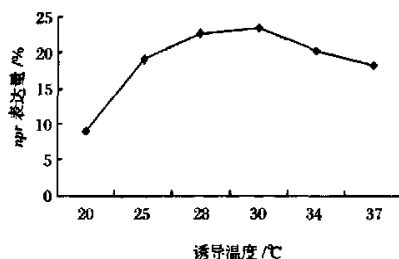


图7 诱导温度对 *npr* 表达量的影响

菌体培养温度是影响蛋白可溶性的一个重要因素,37℃ 是细菌生长的最佳温度,但在此温度下诱导表达

的蛋白易以包涵体的形式积累,降低诱导温度可提高蛋白的可溶性。本文在初始 OD_{600} 为 0.6~0.8 的条件下,分别于 20、25、28、30、34、37℃ 诱导 7 h,使 IPTG 终浓度达到 0.8 mmol/L。

由图 7 可发现,当诱导温度为 28℃ 时,中性蛋白酶的表达量为 21.5%,与 30℃ 时的表达量仅仅相差 0.7%。考虑到低温诱导会对酶的活性更有利,故选择 28℃ 为最适诱导温度。

3 结 论

用 PCR 方法扩增得到中性蛋白酶基因,并利用表达载体 pET-22b(+) 在 *E. coli* BL21(DE3) 中实现了高效表达。试验表明,当初始 OD_{600} 值为 0.6~0.8, IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L, 28℃ 诱导 7 h 后收获菌体,在此条件下重组菌 pET22b-npr/BL21 的中性蛋白酶表达量最高,可达到 21.5% 左右,中性蛋白酶的活力达到了 21 240 U/mL,比出发菌株提高了近 10 倍,为该酶的大规模工业生产奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 刘白玲,张义正. 枯草杆菌中性蛋白酶基因在大肠杆菌中

的表达[J]. 生物工程学报, 1997, 13(3): 304~308

- 2 Donovan W P, Tan Y, Slaney A C. Cloning of the *nprA* Gene for Neutral Protease A of *Bacillus thuringiensis* and Effect of *In Vivo* Deletion of *nprA* on Insecticidal Crystal Protein [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(6): 2311
- 3 Bach H J, Errampalli D, Leung K T, et al. Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 3 226~3 228
- 4 许 波,黄遵锡,陈金全,等. 枯草芽孢杆菌 AS1. 398 中性蛋白酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2005, 25(3): 51~56
- 5 Wang L F, Ekkel S M, Devenish R J. Expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus subtilis* neutral protease gene (NPPE) lacking its ribosome binding site. J Biochemistry International, 1990, 22: 1 085~1 093
- 6 杨开宇,孟广震,吴汝平,等. 基因表达调控与生物技术中的酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1990, 169~198
- 7 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南(第 3 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002, 1 713~1 720
- 8 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 292~299

Research on Expression Condition of Neutral Protease in the *E. coli*

Zhang Min^{1,2}, Zhao Cong¹, Lu Fuping¹, Zhao Hongkun¹, Du Lianxiang¹

1(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

2(College of Engineering, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

ABSTRACT The neutral protease gene from *Bacillus subtilis* was amplified by PCR and cloned into pET-22b plasmid to create the recombinant plasmid pET22b-npr. Then we got the recombinant strain by transforming pET22b-npr into *E. coli* BL21. When it was induced by IPTG, the neutral protease could be produced with a high level. In this study, the optimal condition of expression was obtained. When the OD_{600} of culture reached 0.6~0.8, IPTG was added to give a final concentration of 0.8 mmol/L. Incubating the culture at 28℃ for 7h, the expression content of neutral protease reached the most. The specific protein band about 43 ku was shown in the SDS-PAGE gel.

Key words *Bacillus subtilis*, *E. coli*, neutral protease, induced expression

政策
法规
标准

日本修订苯菊酯等的残留限量

2007 年 9 月 17 日,日本发布 G/SPS/N/JPN/196 号通报,修订食品卫生法项下食品与食品添加剂标准规范(修订杀虫剂残留标准),拟定苯菊酯(Bifenthrin)、百治磷(Dicrotophos)、三唑类磺胺(Penoxsulam)及双唑草腈(Pyraclonil)的残留限量(MRLs)。

涉及的产品有:肉及可食用内脏;乳及蛋类;可食用蔬菜及某些根茎、块茎植物;可食用水果及坚果、柑橘/瓜;香料;粮食;碾磨产品;油籽及油果;杂粮;种子与果实。这些拟订标准经一定宽限期后生效。