

乳糖诱导植物甜蛋白 *des*-pGlu1-Brazzein 在大肠杆菌中的表达 The Influences of Lactose as an Inducer on Expression of Plant *des*-pGlu1-Brazzein in *Escherichia coli*

李春丽^{1 3 *}, 陈其新^{1 2}, 何国庆³

LI Chun-Li^{1 3 *}, CHEN Qi-Xin^{1 2} and HE Guo-Qing³

1 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

2 甘肃亚盛集团博士后科研工作站北京分站, 北京 100101

3 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310019

1 College of Animal and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 Beijing Branch of Postdoctoral Workstation of Gansu Yasheng Group Company, Beijing 100101, China

3 College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

摘 要 构建了植物甜蛋白 *des*-pGlu1-Brazzein 高效表达的工程菌株, 对其乳糖诱导条件进行了优化。乳糖浓度、诱导时间和诱导温度对菌株生长和目的蛋白表达的试验结果显示, 高浓度乳糖对菌株生长有抑制作用 ($P < 0.01$), 对目的蛋白的表达无显著影响 ($P > 0.05$), 时间延长对于菌株生长有利 ($P < 0.01$), 对目的蛋白的表达因温度不同而不同。进一步的研究表明, 以 0.5% 乳糖在 28℃ ~ 30℃ 诱导 4h 对菌株生长和目的蛋白的表达有利, 目的蛋白的表达量可达 20% 左右。

关键词 植物甜蛋白, 大肠杆菌, 乳糖, 优化

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-1021-05

Abstract Expression strain of *des*-pGlu1-brazzein was constructed and the conditions using lactose as inducer was also optimized. The Influences of three factors which were lactose concentration, induction time and inducing temperature on the growth of strain and on the yield of *des*-pGlu1-Brazzein was analyzed in detail. The result indicated that high lactose concentration inhibit the growth of strain ($P < 0.01$) but made no difference on expression of target protein between 0.5% ~ 5% ($P > 0.05$), Biomass would be improved as time passed ($P < 0.01$), but the yield of target protein didn't increase obviously at 30℃ compared with at 37℃. Further result showed that the greater expressed level of *des*-pGlu1-Brazzein, as high as about 20% of total cell protein, could be achieved after the strain had been induced with 0.5% lactose under 28℃ ~ 30℃ for 4h.

Key words *des*-pGlu1-Brazzein, *E. coli*, lactose, optimization

Brazzein(巴西甜)是 Ming 等(1994)从西非植物 *Pentadiplandra brazzeana* Baillion 的果实中分离得到的一种甜蛋白, 由 54 个氨基酸组成, 分子量为

6.5kD, 该蛋白甜度极高, 以分子量为基础进行比较, 其甜度是蔗糖甜度的 2000 倍, 以重量为基础进行比较, 其甜度是蔗糖甜度的 500 倍^[1,2]。Brazzein 对热

Received: March 28, 2006; Accepted: August 6, 2006.

This work was supported by the grants from Henan Provincial Natural Science Foundation (No. 2004922043) and Doctor Foundation of Henan Agricultural University.

* Corresponding author. Tel: 86-371-63554594, E-mail: hncelli@163.com

河南省教育厅基础研究项目(No. 2004922043)和河南农业大学博士后基金资助

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

和 pH 有较宽耐受范围,80℃ 处理 4h 仍保持完整活性。Brazzein 有一个由 53 个氨基酸组成的异构体(仅仅缺乏第一个焦谷氨酸,称为 *des*-pGlu1-Brazzein),其甜度更高,是 Brazzein 的 2 倍^[2,3],是目前为止所发现甜蛋白中分子量最小、水溶性最好、甜度最高的蛋白,具有独特的研究和开发价值。虽然 *des*-pGlu1-Brazzein 具有较为广阔的潜在应用前景,但是由于受到资源、产地的限制,难以从正常的植物组织中大量分离纯化得到,又缺乏切实可行的替代途径,从而限制了其应用。我们按照细菌密码子的偏爱优化了 *des*-pGlu1-Brazzein 的编码序列,并构建其表达载体 pET-*Bra*,在大肠杆菌 BL21 中得到了表达,但是表达量较低^[4],在此基础上,采用严紧控制型菌株 BL21(DE3)_{plysS} 作为表达菌株,使 *des*-pGlu1-Brazzein 得到了高效表达,并对其乳糖诱导表达条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

pET-*Bra* 载体和 BL21(DE3)_{plysS} 菌株均由本实验室构建和保存。种子培养基和摇瓶发酵培养基均为 LB 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 表达菌株的检测和诱导 pET-*Bra* 载体转化大肠杆菌 BL21(DE3)_{plysS},提取重组质粒进行酶切检测,进一步进行测序检测。完全参照分子克隆实验操作进行诱导表达^[5],15% SDS-PAGE 凝胶电泳分析表达结果,蛋白活性的检测采用品尝的方法^[4],通过与蔗糖甜度的比较,确定其甜度。

1.2.2 菌种活化和培养 将 -70℃、15% 甘油保存的菌种接种于含 Kan 的 LB 固体培养基平板上培养过夜。取单菌落接种于含 50mL LB 液体培养基的 250mL 锥形瓶中,250r/min 培养过夜后成为活化种子,以 1.5% 的接种量接入含 100mL 液体培养基的 500mL 锥形瓶中进行培养和诱导。

1.2.3 乳糖浓度、诱导时间和温度的优化 当菌液浓度 OD_{600} 达到 0.6~1.0 进行诱导表达,取常用的温度 30℃ 和 37℃ 以不同的乳糖浓度进行诱导表达,终浓度分别为 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%。诱导至 4h、6h 分别取样进行菌体浓度测定和融合蛋白表达量测定,每个实验 2 个重复,求平均值并进行方差分析,以确定适合菌株生长和目的蛋白表达的乳糖浓度、诱导时间和温度。最后再在一定范围内与 IPTG 的诱导效果进行比较分析。

1.2.4 菌体生物量的测定 取培养菌液测定其 600nm 光吸收值,作为菌体生物量的指示。

1.2.5 融合蛋白表达量的测定 采用多功能荧光分析系统及软件对 SDS-PAGE 的电泳结果进行分析(购自美国冷泉港仪器公司),灰度扫描测定目的蛋白的百分比含量及 OD 值,以确定目的蛋白表达的相对含量和绝对含量。

1.2.6 数据的分析 所得数据采用 SPSS 11.0 软件对所得数据进行单因素或两因素的分差分析(one-way anova),并进行多重比较(Duncan)。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-*Bra* 的检测

将质粒 pET-*Bra* 转化 BL21(DE3)_{plysS} 后,提取质粒进行双酶切鉴定,得到与目的片段大小一致的 DNA 片段,如图 1 箭头所示。进一步的测序结果证明所得的目的片段与设计的序列完全一致。

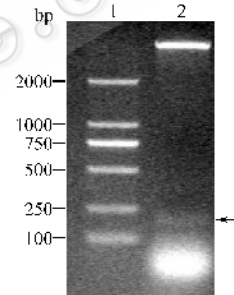


图 1 双酶切电泳

Fig.1 Double digestion electrophoretogram of PET-*Bra*

1: marker; 2: PET-*Bra*.

2.2 目的蛋白的表达及其活性检测

IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳的结果如图 2 所示。BL21-pET-*Bra* 比对照菌株和没有诱导的表达

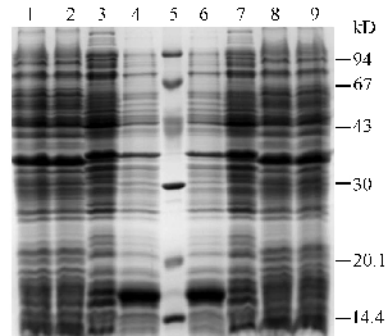


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of BL-pET-*Bra*

1,9: BL-pET30a culture after various time (3h, 4h); 2,8: BL-pET30a induction after various time (3h, 4h); 3,7: BL-pET-*Bra* culture after various time (3h, 4h); 4,6: BL-pET-*Bra* induction after various time

菌株多表达了一条大小约为 17kD 的外源蛋白质 ,此
为带有 His·Tag 的 *des-pGlu1-Bra* 融合蛋白。该蛋白
在诱导表达 3~4h 表达量较高。其它杂蛋白的含量
明显降低 ,经亲和层析纯化后的融合蛋白如图 3 所
示 ,通过品尝检测 ,其甜度约是蔗糖甜度的 400 倍 ,
且口味纯正 ,甜味持久。

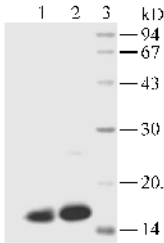


图 3 SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein
1 2 purified fusion protein ; 3 marker.

2.3 乳糖浓度、诱导时间和温度的确定

2.3.1 乳糖浓度、诱导时间和温度对菌株生长的影响
在 30℃ 和 37℃ 培养温度下分别诱导至 4h、6h 时测
菌液的 OD_{600} ,结果如图 4 所示。方差分析显示 ,温
度、时间、乳糖浓度对于菌株的生长均有极显著的影响
($P < 0.01$) ,30℃ 优于 37℃ ,这和常规大肠杆菌在
37℃ 生长较好不一致 ,插入的外源基因可能影响了菌
体的一些生理特征 ,乳糖浓度对于菌株有明显的抑制作
用(4h , $P < 0.01$ 6h , $P < 0.05$) ,多重比较分析得知 ,
0.5%、1%、2%、3% 之间无显著差异 ,4% 和 5% 也无
显著差异。其他浓度之间有极显著差异。

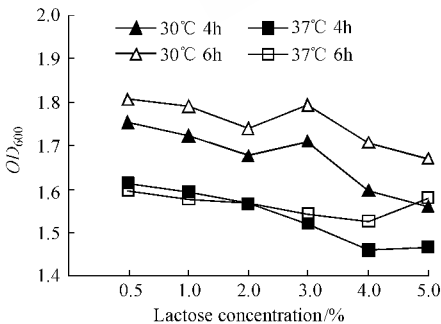


图 4 不同温度和乳糖浓度诱导所收获的生物量

Fig.4 Biomass achieved when induced with
different concentration of lactose
at different temperature

2.3.2 乳糖浓度和温度对目的蛋白表达的影响 :以
不同的乳糖浓度和温度诱导至 4h 时取样进行 SDS-
PAGE 电泳结果如图 5 所示 ,箭头所指是目的蛋白
(6h 时的诱导结果与 4h 类似 ,图略) 。对其目的蛋
白的扫描分析结果显示 ,温度对目的蛋白的表达有

极显著影响 ,30℃ 优于 37℃ ($P < 0.01$) ,所取的乳糖
浓度范围对目的蛋白表达无显著影响($P > 0.05$) ,
因此可采用低浓度的乳糖进行诱导 ,又因为高浓度
乳糖对于菌株的生长有一定的抑制作用 ,以 0.5%
的浓度诱导比较合适。

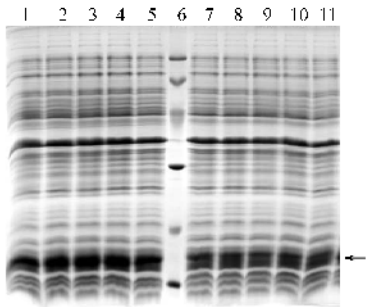


图 5 不同乳糖浓度和温度诱导 4h
时的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression protein induced
for 4h with different concentration
of lactose at different temperature

1~5 induced with different concentration at 30℃ (0.5% ,1% ,
2% ,3% ,4%) ; 7~11 , induced with different concentration
at 37℃ (0.5% ,1% ,2% ,3% ,4%) ; 6 :marker.

2.3.3 诱导时间对目的蛋白表达的影响 :为了减少
试验误差 ,将同一温度下以不同乳糖浓度诱导至
4h、6h 的结果在同一块胶上进行比较 ,以确定适合
的时间 ,30℃ 诱导时的电泳结果见图 6 ,箭头所指是
目的蛋白(37℃ 的结果与 30℃ 的结果类似 ,图略) 。
对其扫描分析结果分析显示 ,30℃ 时 ,诱导时间对于
目的蛋白表达无显著影响。37℃ 时 ,6h 明显优于 4h
($P < 0.05$) ,可能是因为菌株在 37℃ 的生长较 30℃
延迟。

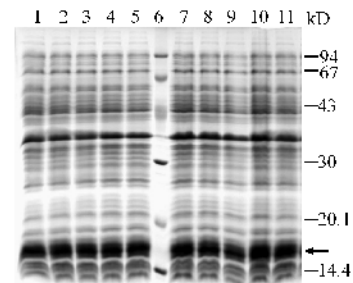


图 6 30℃ 时不同乳糖浓度诱导不同
时间的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of expression protein
induced at 30℃ with different
concentration of lactose for different time

1~5 : induced with different concentration for 4h (0.5% ,1% ,2% ,
3% ,4%) ; 7~11 : induced with different concentration for 6h (0.5% ,
1% ,2% ,3% ,4%) ; 6 :marker.

2.4 与 IPTG 诱导效果的比较

为了比较乳糖和 IPTG 诱导的结果,选择一系列温度,采用 0.2mmol/L IPTG 和 0.5% 的乳糖分别诱导 4h 后对收获的生物量和目的蛋白表达量进行比较。结果如图 7、8 所示。从图 7 可以看到,以乳糖为诱导剂菌株生长优于以 IPTG 为诱导剂。方差分析表明,诱导剂和温度对菌株生长均有极显著影响 ($P < 0.01$)。菌株在 28℃ ~ 32℃ 之间有良好生长。从图 8 可以看到,乳糖诱导时杂蛋白明显要比 IPTG 诱导时多,对其扫描结果进行分析表明,温度和诱导剂对目的蛋白的表达有极显著影响 ($P < 0.01$),以 IPTG 为诱导剂明显优于以乳糖为诱导剂,无论是 IPTG 诱导还是乳糖诱导,菌株在 28℃ ~ 30℃ 诱导时目的蛋白的表达优于其它温度。

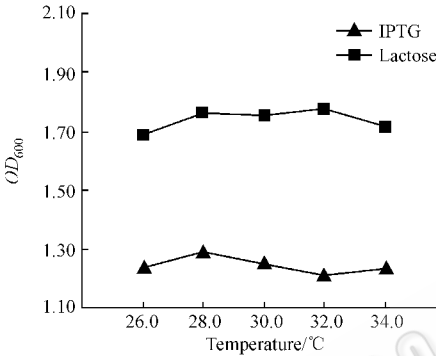


图 7 不同温度和诱导剂诱导 4h 时所获得的生物量

Fig.7 Induced with different lactose concentration at different temperature for 4h

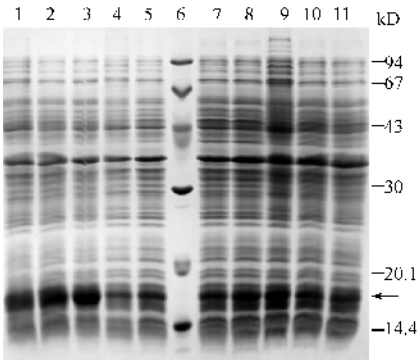


图 8 不同温度下分别以 IPTG 和乳糖诱导的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.8 SDS-PAGE analysis of expression protein induced by IPTG or lactose at different temperature

1 ~ 5 :induced with IPTG at different temperature (26℃ ,28℃ ,30℃ , 32℃ ,34℃) ,7 ~ 11 :induced with lactose at different temperature(26℃ , 28℃ ,30℃ ,32℃ ,34℃).

3 讨论

Brazzein 是一种高甜度、低热值的非糖甜味剂。由于发现较晚,对于其基因工程的研究还较少,2000 年,Assadi-Porte 等将 Brazzein 基因在大肠杆菌中融合表达得到了具有活性的蛋白^[2]。2004 年李光林等克隆表达了 Brazzein 基因,表达量可达 25%^[6]。2005 年李春丽等优化了 des-pGlu1-Brazzein 的编码序列,在 BL21 中得到了表达^[4],但是,总体而言,普遍存在着表达量不高,活性偏低等问题。在前期研究的基础上采用严紧控制型菌株 BL21(DE3)pIysS 作为表达菌株,使 des-pGlu1-Brazzein 的表达量得到了提高,目的蛋白占菌体总蛋白的 35%,但是融合蛋白的活性只有蔗糖甜度的 400 倍,比报道的结果要低一些^[2],可能是融合蛋白在空间结构上与天然蛋白有一定的差异,具体原因还有待于进一步分析。

IPTG 是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂,但是由于 IPTG 对于人体具有潜在的毒性,并且价格昂贵,在大规模发酵生产中,通常不用 IPTG 诱导。乳糖是乳糖操纵子的天然诱导物,与 IPTG 不同的是乳糖必须借助于乳糖通透酶的作用进入细胞,并经 β-半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖后起诱导作用^[7]。其诱导过程更为复杂,诱导效果也不及 IPTG,尽管如此,乳糖因其无毒、廉价的优点对基因工程产品的工业化生产具有重要的意义。本文深入研究了以乳糖为诱导剂时,影响菌株生长和目的蛋白表达的浓度、诱导时间和温度等因素,从中分析并寻找适合菌株 BL21-pET-*bra* 生长和诱导的条件。结果表明,28℃ ~ 30℃ 以 0.5% 的乳糖诱导 4h 对于菌株的生长、诱导非常有利,目的蛋白的表达量可达 25% 左右。一般以乳糖诱导表达的结果在 20% 左右,如张毅等以乳糖诱导白细胞介素 3 的表达量可达总菌体的蛋白的 15%,刘永庆等以乳糖诱导生长抑素的表达量在 20% 左右^[8,9],这可能和携带的目的基因不同有关,也可能与起始的 OD₆₀₀ 不同有关。本实验兼顾了表达量和菌体的收获量,有利于提高单位体积设备的生产能力。为了减少实验的误差,本实验尽量在条件一致的情况下比较结果,并采用了统计方法分析结果,使得结果更为可靠,为在发酵罐内进行分批发酵和补料发酵提供了参考。

REFERENCES(参考文献)

[1] Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweetening-tasting proteins. *Applied*

- [2] Assadi-porte FM , Aceti DJ , Cheng H *et al.* Efficient production of recombinant Braxsein , a small , heat-stable , sweet-tasting protein of plant origin. *Archives of Biochemistry Biophysics* , 2000 , **376**(2) : 252 – 258
- [3] Assadi-porter FM , Aceti DJ , Markley JL. Sweetness of determinant sites of Brazzein , a small , heat-stable , sweet-tasting protein. *Archives of Biochemistry Biophysics* , 2000 , **376**(2) : 259 – 265
- [4] Li CL(李春丽) , He GQ(何国庆) , Ruan H(阮晖) *et al.* Construction of expression vector of *des*-pGlu1-Brazzein gene and its recombinant expression in *Escherichia coli* . *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报) , 2005 , **13**(1) : 38 – 41
- [5] Sambrook J , Russell DW. *Molecular Cloning : A laboratory Manual* . Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001
- [6] Li GL(李广林) , Guo AG(郭蔼光) , Fan SH(范三红) . Cloning and expression of brazzein gene. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报) , 2004 , **24**(7) : 1271 – 1274
- [7] Wong P , Gladney S , Keasling JD. Mathematical model of the lac operon : inducer exclusion , catabolite repression and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechnol Prog* , 1997 , **13**(2) : 132 – 143
- [8] Zhang Y(张毅) , Qu XM(屈贤铭) , Yang SL(杨胜利) . The influences of lactose as an inducer on the expression of the recombinant proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) . *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 2000 , **16**(4) : 464 – 468
- [9] Liu YQ(刘永庆) , Liu WB(刘文波) , Pan JY(潘杰彦) *et al.* Cloning and expression of somatostatin(SS) gene in *E. coli* pET-32 expression system. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报) , 2003 , **26**(1) : 61 – 65