

## 牛凝乳酶原基因在大肠杆菌中的表达

张渝英 周 炜 刘年娟 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以Tac为启动子构建了牛凝乳酶原B基因表达质粒pTaAC, 转化大肠杆菌 JM105, 对数生长期加入 0.1mmol/L IPTG 能明显诱导凝乳酶原的产生。基因表达除受 IPTG 的影响外, 也受温度的调节控制。在30℃培养, IPTG存在时, 凝乳酶原产量极低; 在42℃无IPTG的条件下, 基因也能表达。按电泳扫描计算凝乳酶原蛋白占细胞可溶性总蛋白量的12-19%, 按ELISA法测定凝乳酶原产量为 80-100mg/L, 经变性、复性及酸化有活性的凝乳酶产量为 14-20mg/L。

**关键词** 牛凝乳酶原; 基因表达

利用基因工程菌生产凝乳酶是解决凝乳酶供不应求的理想途径。1984年 Marston<sup>[1]</sup>等, 1987 Kawaguchi等<sup>[2]</sup>报道根据电泳扫描凝乳酶原基因在大肠杆菌中的表达水平为总蛋白的8%和10-20%。1986年Uozumi和Beppu<sup>[3]</sup>, 1989年Sadlacek等(私人通信)报道从每升发酵醪液的菌体中可分别获得13.6mg和16mg有活性的凝乳酶。本实验室在完成牛凝乳酶原mRNA的分离、cDNA库的构建以及cDNA全序列分析<sup>[4,5]</sup>的基础上, 构建了牛凝乳酶原基因的表达质粒, 探讨了高效表达条件。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

1. 菌种培养和质粒: *E. coli* JM105, TG1 均在 LB 培养基上培养。pDR540, pUC19 购自华美生物工程公司。pCT15, pChyp6 为本实验室构建<sup>[4,5]</sup>。

2. 酶和试剂: 限制酶、T4DNA 连接酶为 Boehringer mannheim 公司产品。凝乳酶抗体由本实验室制备。辣根过氧化物酶标记的牛凝乳酶抗体由北京生化

免疫制剂中心制备。IPTG为Sigma产品。

#### (二) 方法

1. 质粒提取: 按 Maniatis等<sup>[6]</sup>方法。

2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照 Sambrook 等<sup>[7]</sup>方法, 考马斯亮蓝染色后用CS930扫描仪进行光密度扫描。

3. Western blot: 参照 Burnette<sup>[8]</sup>方法。

4. 凝乳酶原包含体的变性、复性和酸化: 基本上按Marston等方法<sup>[1]</sup>。

5. ELISA 法测凝乳酶: 参照北京生化免疫制剂中心的抗体酶联药盒使用说明, 以纯化的牛凝乳酶为标准样品。

6. 凝乳酶活性测定: 参照 Emtage 等方法<sup>[9]</sup>。以纯化的牛凝乳酶为标准样品。

### 结果与 讨论

#### (一) 含Tac启动子凝乳酶原 cDNA 表达质粒的构建

构建表达质粒的过程见图1。

1. 将pDR540中Tac启动子(Hind

本文于1990年8月28日收到。

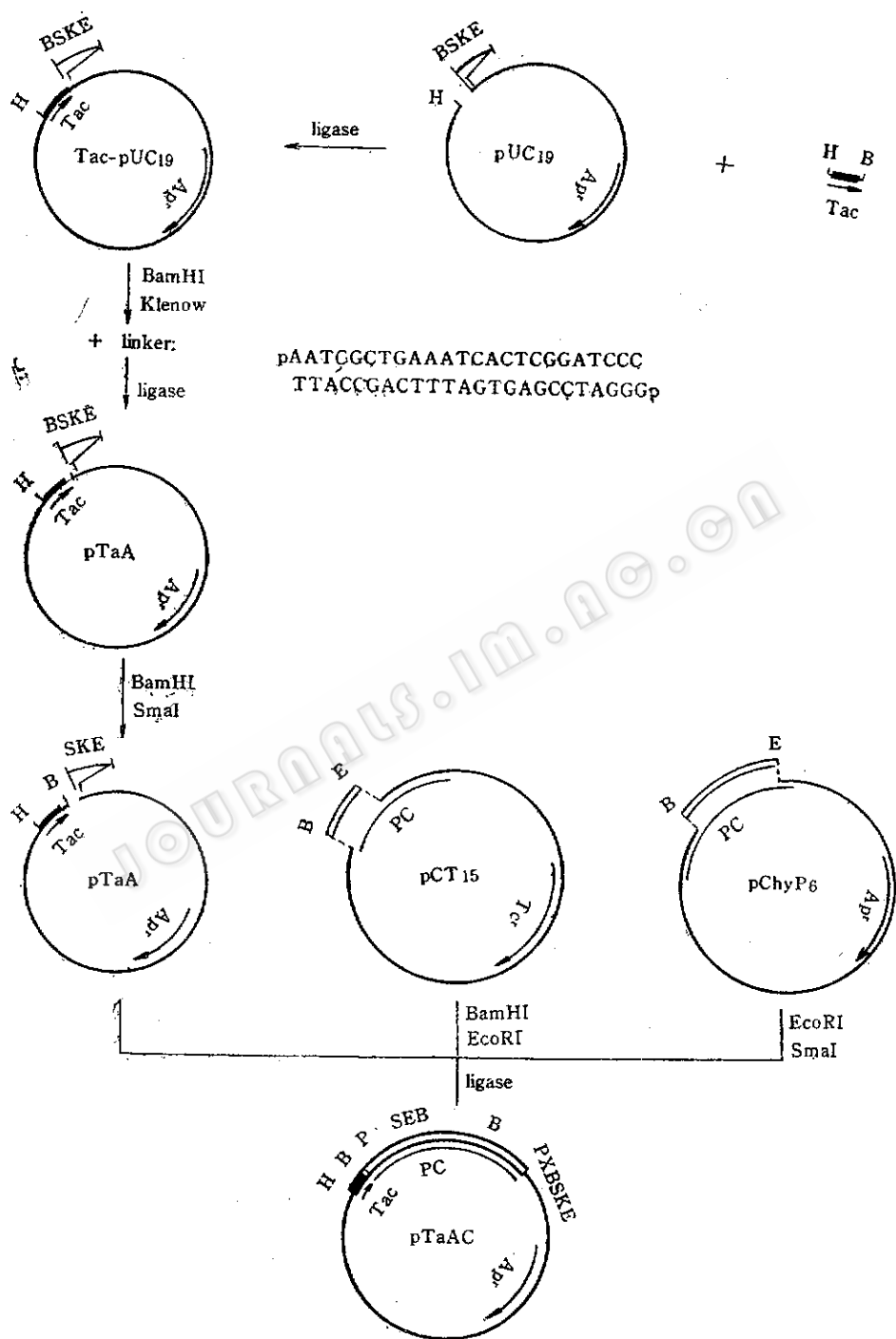


图 1 质粒pTaAC的构建

Fig.1 Construction of plasmid pTaAC

B. BamHI; E. EcoRI; H. HindIII; K. KpnI; P. PstI; S. SmaI; X. XbaI

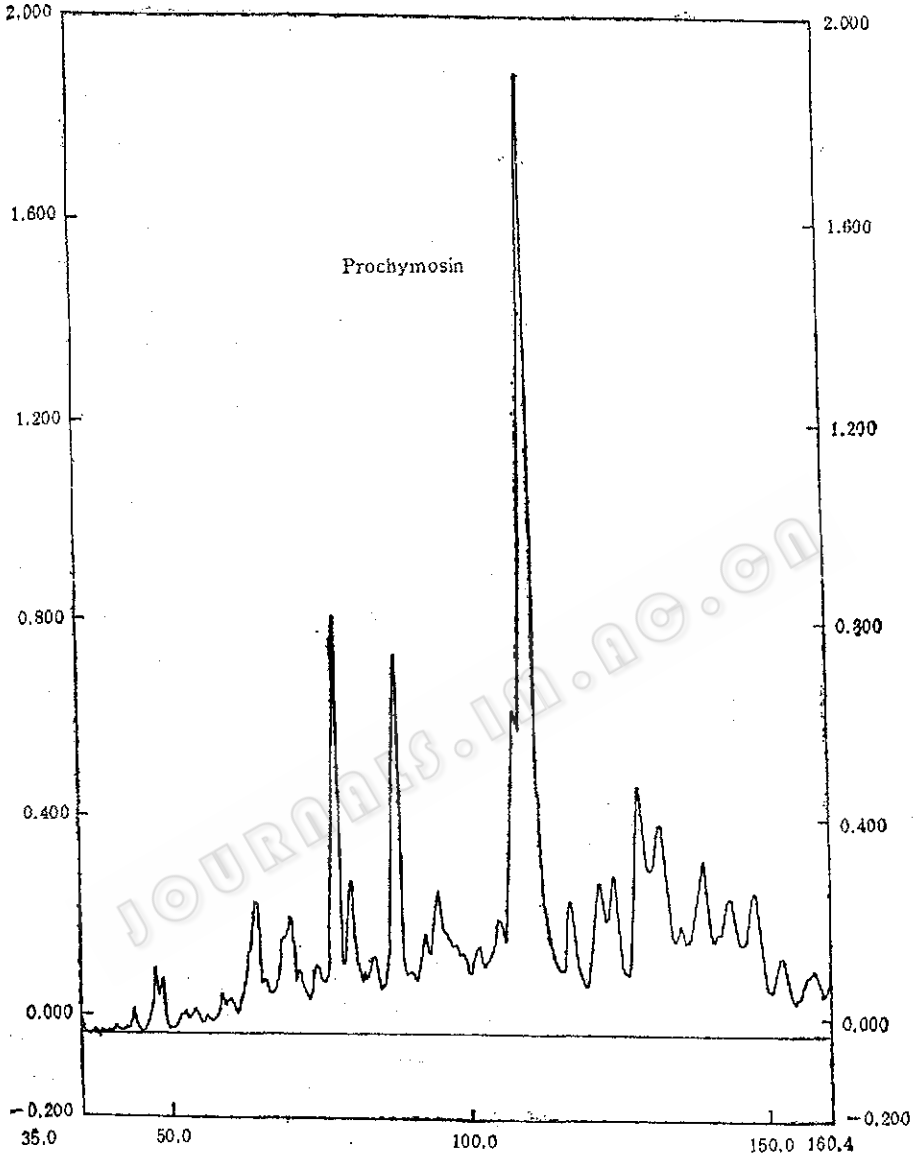


图 2 pTaAC5的产物的SDS电泳扫描

Fig.2 Densitometric scanning of pTaAC5 product on SDS-PAGE

III -Bam HI片段)插入pUC19, 得到Tac-pUC19, 再用 BamHI 切开, Klenow 大片段补齐, 与人工接头 (含有起始密码子 ATG, 凝乳酶原前 5 个氨基酸的编码区以及 BamHI 切点) 连接, 得到 pTaA。

2, 从 pCT15 和 pChyp6中截取凝

乳酶原 5'端序列, 和 3'端序列二者同时插入 pTaA 的相应酶切位点, 得到质粒 pTaAC。

将pTaAC转化大肠杆菌JM105, 经酶切鉴定, 从89个转化子中选出11个转化子均含有凝乳酶原 cDNA, 表达的蛋白经

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 验证确为凝乳酶原(数据未给出)。ELISA 表明11个克隆的细胞裂解液均为

阳性反应,其中9个的测定结果见表1。5\*、12\*、36\*克隆产酶量最高。以下实验均以5\*克隆pTaAC5为研究对象。

表 1 不同克隆凝乳酶原产量测定 (ELISA法)

Table 1 ELISA estimation of prochymosin produced by different clones

抗原稀释度 Dilution of antigen	不 同 克 隆 Different clones*								
	4	5	12	18	34	36	58	65	66
1:1	1.12	1.50	1.60	1.26	1.48	1.62	1.24	1.39	1.52
1:2	0.65	1.01	1.06	0.79	0.84	1.10	0.59	0.68	0.89
1:4	0.29	0.61	0.66	0.44	0.45	0.61	0.19	0.39	0.50
1:8	0.09	0.56	0.50	0.23	0.41	0.53	—	0.19	0.37

\*A<sub>492</sub>

### (二) 诱导剂剂量与诱导时间对凝乳酶原基因表达的影响

pTaAC5在37℃培养达到对数生长期时分别加入0.125—4mmol/L 9种不同浓度的IPTG,继续培养6h收获菌体。菌体裂解液经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色,结果如图版I-A所示。不加IPTG的菌体在相当于凝乳酶原的位置有一条微弱的蛋白条带;经0.05mmol/L IPTG诱导,蛋白条带的颜色明显加深;0.1mmol/L IPTG诱导效果更为

明显,进一步提高剂量,效果基本相同。经Western blot验证,该蛋白条带能与凝乳酶原抗体呈阳性反应(数据未给出);说明0.1mmol/L IPTG足以诱导凝乳酶原基因在JM105受体菌中明显表达。

继而在大肠杆菌不同生长期加入0.4mmol/L IPTG,6h后收集菌体。根据电泳扫描结果,在整个对数生长期加入IPTG均有明显诱导效果。凝乳酶原蛋白占细胞总蛋白的13%左右。静止期加入IPTG无明显诱导作用(表2)。

表 2 不同生长时间加入IPTG对凝乳酶原基因表达的影响

Table 2 Prochymosin gene expression induced by IPTG added at different time after inoculation

时间 (min)	0	35	75	90	120
A <sub>600nm</sub>	0.13	0.35	0.71	1.1	1.2
表 达 水 平 Expression (%)	13.2	12.1	12.8	10.9	4.3

### (三) 培养温度对凝乳酶原基因表达的影响

pTaAC5克隆分别在30、37、42℃培养,对数生长期时加入0.4mmol/L IPTG,等量菌体裂解液经电泳和Western blot验证,在30℃培养,即使有IPTG的存在,凝乳酶原产量也很低(图版I-2通道1),随着培养温度的提高,凝

乳酶原的产量增加(图版I-B通道2,6)。按电泳扫描结果计算,37℃和42℃培养所产生的凝乳酶原蛋白占细胞总蛋白的14%和19%。

据文献报道<sup>[10]</sup>,外源基因在大肠杆菌中表达所形成的包含体与培养温度有关,在30℃以下很少形成包含体,温度提高有利于包含体的形成。为了区别上述结

果是由于培养温度影响基因表达还是温度影响包含体的形成从而影响裂解后蛋白质的回收,取不同温度培养后的菌体分别裂解,按Marston等<sup>[1]</sup>的方法将上清液与包含体分开,进行电泳,并对包含体进一步变性、复性、活化及测凝乳酶活力。实验证明,30℃培养的裂解液,无论是上清液还是沉淀部分,均无可检测到的凝乳酶原。37、42℃培养的菌体所产生的凝乳酶原均以包含体形式存在。二者变性、复性及活化后的活力回收水平相同(数据未给出),说明在诱导剂IPTG存在的条件下,凝乳酶原基因在30℃表达极低,在42℃所形成的包含体其变性、复性、活化等特性与37℃中的产物无区别。

在实验中我们还发现,在42℃培养即使不加IPTG凝乳酶原基因也能表达,表达产物占细胞总蛋白的12.5%。如将细菌先在37℃培养,对数生长前期转入42℃,其表达水平较在对数生长后期转入42℃高出50%。将表达质粒pTaAC5转化大肠杆菌TG1,在42℃培养不加IPTG也能产生凝乳酶原,其表达水平与JM105相近。以上实验提示,在37℃培养能产生一种阻遏蛋白,妨碍凝乳酶原基因的表达,提高温度能阻止这种蛋白的产生。

#### (四) 凝乳酶原包含体的变性、复性

#### 与活化

为了获得有活性的凝乳酶,对基因工程菌所产生的凝乳酶原包含体的变性、复性与活化进行了一系列试验。变性按Marston等<sup>[1]</sup>的方法,复性分别在10.0、10.4、10.7和11.0四个不同的pH下进行,实验结果证明,在pH10.7—11.0的条件下可获得较高的活力回收(数据未给出)。

酸化时间对凝乳酶原转化的影响见图版I-C。在室温下经过2h酸化大部份凝乳酶原转化为假凝乳酶(有活性凝乳酶的一种型式),延长至16h才能全部转化,这与天然牛凝乳酶原在低浓度条件需要长时间酸化的特性是一致的<sup>[11]</sup>。但是2h酸化与长时间酸化凝乳活性基本相同,这很可能与低浓度酶长时间在酸性条件下容易失活有关。

在上述一系列实验基础上,选择适当培养条件,通过相差显微镜检查,绝大多数JM105/pTaAC5细胞中均含有包含体(图版I-D)。表达产物的电泳扫描结果见图2。所获得的凝乳酶原经ELISA法测定产量为80—100mg/L,变性、复性及酸化后有活力凝乳酶的产量为14—20mg/L,说明凝乳酶基因得到了高效表达。

#### 参 考 文 献

- [1] Marston, F. A. O. et al.; *Bio/Technology*, 2:800—804, 1984.
- [2] Kawaguchi, Y. et al.; *Agr. Biol. Chem.*, 51(7):1871—1877, 1987.
- [3] Beppu, T. et al.; *Agr. Biol. Chem.*, 50(2): 499—500, 1986.
- [4] 谭思元等; *生物工程学报*, 4(2):91—97, 1988.
- [5] 谭思元等; *生物工程学报*, 5(4):328—332, 1989.
- [6] Maniatis, T. et al.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [7] Sambrook, J. et al.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [8] Burnette, W. N.; *Anal. Biochem.*, 112:195—203, 1981.
- [9] Emtage, J. S. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3671—3675, 1983.
- [10] Schein C. H. and Noteborn, M. H. M.; *Bio/Technology*, 6:291—294, 1988.
- [11] Pedersen, N. B. et al.; *Eur. J. Biochem.*, 94:573—580, 1979.

## Expression of Calf Prochymosin in *Escherichia coli*

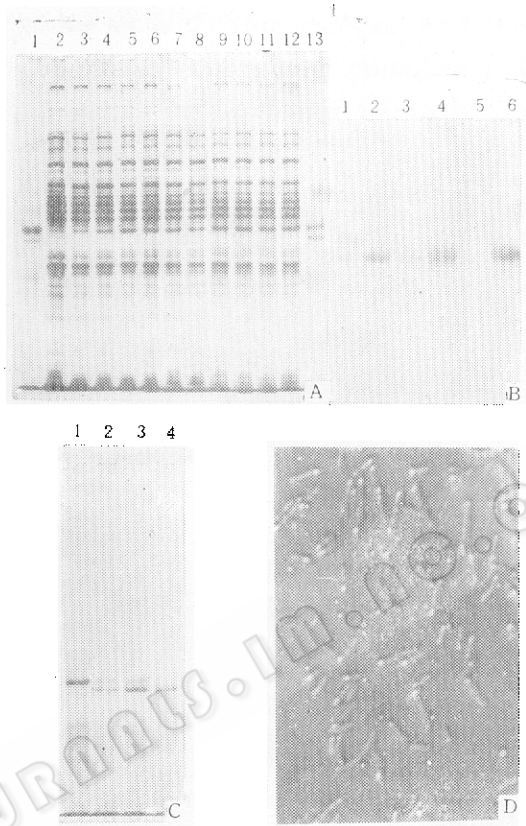
Zhang Yuying Zhou Wei Liu Nianjuan Yang Kaiyu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The expression plasmid pTaAC containing Tac promoter and calf prochymosin B gene was constructed and transformed into *E. coli* JM 105. Addition of 0.1mmol/L IPTG into the culture at logarithmic phase induced the production of prochymosin markedly. The expression of prochymosin gene was regulated by temperature in addition to the inducer IPTG. At 30°C in the presence of IPTG prochymosin was barely detected, whereas at 42°C in the absence of IPTG a relatively high level of prochymosin was found. The expressed protein was estimated to be 12—19% of total cell proteins by electrophoresis analysis or 80—100mg/L by ELISA. The yield of active chymosin was 14—20mg/L after denaturation, renaturation and activation.

### Key words

Calf prochymosin; gene expression



**A. 凝乳酶原基因表达对IPTG浓度的依赖关系**

Dependence of prochymosin gene expression on the concentration of IPTG

1,13; Authentic prochymosin

2: 0; 3: 0.0125; 4: 0.025; 5: 0.05; 6: 0.1; 7: 0.2; 8: 0.4;

9: 1; 10: 2; 11: 3; 12: 4. (m mol/L)

**B. 不同培养条件下产生凝乳酶原的Western blot分析**

Western blot analysis of prochymosin produced under different conditions

1. pTaAC5 30°C (+IPTG);

2. pTaAC5 37°C (+IPTG);

3. pTaAC5 37°C (-IPTG);

4. Authentic prochymosin;

5. pTaA 37°C (+IPTG);

6. pTaAC5 42°C (+IPTG)

**C. pH2处理不同时间对凝乳酶活化的影响**

Activation of prochymosin treated at pH 2 for different time

1. 0 min; 2. 35 min; 3. 2 h; 4. 16 h

**D. JM105/pTaAC5相差显微镜照片**

Phase contrast micrograph of *E. coli* JM105 cells producing prochymosin