

# 拟除虫菊酯类农药降解酯酶 EstA 融合蛋白 表达质粒的构建和诱导条件优化

刘 娜<sup>1,2</sup>, 徐汉卿<sup>2</sup>, 崔 健<sup>1</sup>, 茆灿泉<sup>1</sup>, 许 雷<sup>2\*</sup>

(1. 西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031; 2. 中国农业科学院 研究生院, 北京 100081)

**摘要:** 以前期克隆得到的拟除虫菊酯类农药降解基因 *estA* (GenBank: DQ906143) 为出发基因, 构建表达系统, 获得可溶性融合蛋白, 并通过优化诱导表达条件, 获得具有实际应用价值的相关应用参数。结果表明, 成功构建了重组表达载体 pMal-c2X-*estA* 并转化至宿主菌 BL21(DE3), 获得酯酶 *estA* 基因诱导表达系统; 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳、以  $\alpha$ -乙酸萘酯为底物的酶活性检测及 Western blot 方法, 确认外源蛋白 EstA 在大肠杆菌宿主菌中成功表达并具有酯酶活性。重组基因工程菌可溶性原核表达诱导条件的优化试验表明, 其最佳诱导表达条件是:  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 1.0 mmol/L、诱导初始 OD<sub>600</sub> 值 0.7、诱导剂 IPTG 浓度 0.1 mmol/L、诱导初始 pH 值 7、诱导温度 26 °C、诱导时间 17.5 h, 优化后的酯酶活性 (92.03 U/mg) 较优化前 (44.64 U/mg) 提高了 1 倍多。

**关键词:** 拟除虫菊酯类农药; 生物降解; 酯酶; *estA* 基因; 可溶性蛋白; 原核表达条件优化

**中图分类号:** S482.3<sup>+</sup>5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)02-0072-08

## Construction of Fusion Protein Expression Vector of Pyrethroid Pesticides-degrading Esterase EstA and Optimization of Inducible Expression Conditions

LIU Na<sup>1,2</sup>, XU Han-qing<sup>2</sup>, CUI Jian<sup>1</sup>, MAO Can-quan<sup>1</sup>, XU Lei<sup>2\*</sup>

(1. Biological Science and Engineering School of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The aim of this research was to construct an expression system by ligating the esterase gene *estA* (GenBank: DQ906143) cloned before, which could degrade pyrethroid pesticides, into the vector pMal-c2X to attain soluble protein; in addition, the expression conditions were optimized to achieve the related application parameters, which had great significance in application. The results showed that the recombinant expression vector pMal-c2X-*estA* was constructed and transformed into the host strain BL21(DE3), and the inducible expression system of *estA* gene was obtained. Through the SDS-PAGE analysis, the enzyme activity assay using the  $\alpha$ -naphthyl acetate as substrate and Western blot, it was confirmed that the target protein EstA was expressed in *Escherichia coli* and had esterase activity. Optimization of soluble prokaryotic expression conditions for the genetic engineering strain indicated that the optimal expression conditions were as follows: the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  was 1.0 mmol/L, the initial OD<sub>600</sub> value was 0.7, the concentration of IPTG was 0.1 mmol/L, the initial pH value was 7, the induction temperature was 26 °C, and the induction time was 17.5 h. Under the optimal conditions, approximately double expressed protein could be obtained compared with that before (the esterase activity was 44.64 U/mg before and 92.03 U/mg after).

收稿日期: 2013-08-12

基金项目: 国家 863 计划项目 (2011AA10A205)

作者简介: 刘 娜 (1987-), 女, 四川成都人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: liuna\_518@sina.com

\* 通讯作者: 许 雷 (1964-), 男, 江苏常州人, 研究员, 博士, 主要从事农药生物降解研究。E-mail: xulei@mail.caas.net.cn

**Key words:** pyrethroid pesticides; biodegradation; esterase; *estA* gene; soluble protein; optimization of prokaryotic expression conditions

拟除虫菊酯类农药是目前生产中广泛使用的有机农药之一。由于其具有高效、低残留和中等毒性的优势,取代了有机氯、有机磷和氨基甲酸酯类农药,于20世纪70—80年代迅速崛起<sup>[1]</sup>。我国农业生产对拟除虫菊酯类农药的依赖程度与日俱增,其直接结果是导致由该农药残留所引起的环境问题日益严重,因此,拟除虫菊酯类农药的生物降解已成为环境生物技术领域的研究热点。目前,国内外已报道的研究多集中于农药降解微生物的筛选和工程菌株的构建,而关于降解酶方面的研究较少。本实验室(中国农业科学院研究生院生物化学实验室)前期克隆了可降解拟除虫菊酯类农药的酯酶基因 *estA*,本研究拟通过构建其可溶性表达系统,直接获取可溶性目的蛋白,并摸索出其最佳诱导表达条件,对后期获得具有实际应用价值的基因工程酶产品和相关生产应用参数具有重要意义和价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 JM110、BL21 (DE3)和质粒载体 pET-*estA* 为本实验室保存;克隆载体 pGEM-T 购自天根公司;表达载体 pMal-c2X 由华大基因公司刘国正教授馈赠。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自博迈德生物公司;限制性内切酶购自 Promega 公司;DNA Marker、*Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自天根公司;抗 EstA 多克隆抗血清由北京华大蛋白质研发中心有限公司合成;辣根过氧化物酶 (HRP)标记山羊抗兔 IgG 购自北京文成变异化学研究室;IPTG、辣根显色剂 (DAB) 购自 Sigma 公司; $\alpha$ -萘酚、 $\alpha$ -乙酸萘酯、固兰 B 盐购自中国医药集团上海化学试剂有限公司;牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Amresco 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *estA* 基因的 PCR 扩增 在 GenBank 中获得 *estA* 基因的全长序列 (GenBank 登录号: DQ906143),设计 PCR 引物时,在引物 5'端引入 *Xba* I 酶切位点,3'端引入 *Hind* III 酶切位点。*estA*-F: TCTAGAATGGGTGTGTATGACTACAAGAACTTCG; *estA*-R: AAGCTTTCAGGCGATCACAATTCCATCG。

以含 *estA* 基因的 pET-*estA* 质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 20  $\mu$ L 反应体系如下: 灭菌二次纯水 15.4  $\mu$ L、pET-*estA* 质粒 1  $\mu$ L、10 $\times$ PCR Buffer (含 20 mmol/L  $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L、dNTP (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L、正向引物 (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L、反向引物 (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L、*Taq* 酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, 阴性对照将 pET-*estA* 质粒替换为灭菌的二次纯水。PCR 扩增完成后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验。

1.2.2 *estA* 基因的克隆及鉴定 将 *estA* 基因的 PCR 产物回收纯化,与 pGEM-T 载体在 4 °C 下连接过夜,转化至大肠杆菌 JM110 感受态细胞并进行蓝白斑筛选。经 PCR 及限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后,阳性克隆送公司测序。

1.2.3 表达载体的构建与鉴定 回收测序正确的克隆载体 (pGEM-T-*estA*) 的双酶切产物 (*estA* 基因片段),与经同样双酶切处理的 pMal-c2X 载体用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),蓝白斑筛选后,经 PCR 及限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。

1.2.4 *estA* 基因的诱导表达 挑取鉴定正确的重组菌株 (含 pMal-c2X-*estA*) 及空载体 pMal-c2X 菌株,接种于含有氨苄青霉素 (Amp, 100 mg/L) 的 LB 液体培养基中,200 r/min、37 °C 条件下培养过夜;以 1% 的接种量接种于含 Amp (100 mg/L) 的新鲜 LB 液体培养基中,200 r/min、37 °C 条件下摇菌培养;待菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.4 时,取 1 mL 菌液于 EP 管中,余下菌液加入 IPTG,使 IPTG 终浓度分别达到 0.1、0.3、0.5、0.8 mmol/L,200 r/min、18 °C 条件下进行诱导表达;20 h 后,取 1 mL 菌液于 EP 管中,连同诱导前样品,经处理后用于 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 Western blot 分析 蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后进行电转膜,以 1 : 500 的抗 EstA 多克隆抗血清为一抗,1 : 1 000 HRP 标记山羊抗兔 IgG 为二抗,采用 DAB 显色 3~10 min。

1.2.6 重组质粒工程菌诱导表达产物的可溶性检测及粗酶液的制备 按 1.2.4 方法进行培养,试验分为 3 组,分别为空载体对照组 (CK)、试验组 1、试验组 2;诱导时,3 组试验菌液中均加入 IPTG,终浓度为 0.3

mmol/L;另外,试验组 2 加入  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  终浓度为 1.0 mmol/L;200 r/min,18 °C 下诱导表达 20 h;将各组菌液的  $\text{OD}_{600}$  调整为 1.0,各取 1 mL 于 EP 管中,连同诱导前样品,经处理后用于 SDS-PAGE 分析。

各组量取调整  $\text{OD}_{600}$  后的菌液 50 mL,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,收集菌体,用灭菌的一次纯水清洗菌体 2 次;向菌体沉淀加入 5 mL 缓冲液(20 mmol/L Tris · HCl,200 mmol/L NaCl,pH 值 7.4),重悬菌体,−20 °C 冷冻过夜;冰水浴中解冻菌体,用超声探头破碎 3 s,间隔 17 s,全程 30 min;破碎后,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,取上清(即为粗酶液)用于酯酶活性的检测;另细胞破碎后的上清和沉淀分别留样,经处理后,用于 SDS-PAGE 分析。

### 1.2.7 各因素对融合蛋白可溶性诱导表达的影响

1.2.7.1  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 待各组菌液初始  $\text{OD}_{600}$  达到 0.5 时,加入 IPTG,终浓度为 0.5 mmol/L;各重组质粒工程菌试验组加入  $\text{CaCl}_2$ ,使  $\text{Ca}^{2+}$  终浓度分别达到 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L,CK 不加  $\text{CaCl}_2$ ;试验组及 CK 诱导初始 pH 值为 7;200 r/min、18 °C 条件下诱

导表达 20 h;测定各组终末  $\text{OD}_{600}$  并调整至 1.5~1.7;按 1.2.6 中的方法制备粗酶液,测定粗酶液中蛋白质含量及酯酶活性。

1.2.7.2 初始  $\text{OD}_{600}$  待各重组质粒工程菌试验组初始  $\text{OD}_{600}$  分别达到 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 时,加入 IPTG 进行诱导;根据 1.2.7.1 结果设置  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,其余步骤及 CK 设置同上。

1.2.7.3 IPTG 浓度 重组质粒工程菌试验组中加入 IPTG,使 IPTG 终浓度分别达到 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3 mmol/L;根据 1.2.7.2 结果设置初始  $\text{OD}_{600}$ ,其余步骤及 CK 设置同上。

1.2.7.4 初始诱导 pH 值 将重组质粒工程菌试验组诱导初始 pH 值分别调至 4、5、6、7、8、9、10;根据 1.2.7.3 结果设置 IPTG 浓度,其余步骤及 CK 设置同上。

1.2.7.5 温度和时间 按表 1 进行不同温度及不同时间条件下的诱导表达,其中重组质粒工程菌试验组初始诱导 pH 值的设置参照 1.2.7.4 结果,CK 在不同温度条件下均表达最长时间,其余步骤及设置同上。

表 1 诱导表达的温度及时间

温度/°C	重组质粒试验组诱导时间/h							空载体诱导时间/h
	1	2	3	4	5	6	7	
15	0	3	9	15	21	27	33	33
18	0	4	12	20	28	36	44	44
22	0	3	9	15	21	27	33	33
26	0	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5	27.5	27.5
30	0	1.5	3	4.5	6	7.5	9	9
34	0	1	2	3	4	5	6	6
38	0	1	2	3	4	5	6	6

注:不同温度下重组质粒试验组根据诱导时间不同均设 7 个处理,分别以 1~7 编号。

### 1.2.8 粗酶液中蛋白质含量及酯酶活性测定方法

1.2.8.1 蛋白质标准曲线及  $\alpha$ -萘酚标准曲线的绘制 蛋白质标准曲线的绘制,参照 Bradford<sup>[2]</sup> 的方法,用 BSA 制作。将不同浓度的  $\alpha$ -萘酚溶液于 25 °C 水浴中反应 20 min 后,加入显色液,在分光光度计上测定  $\text{OD}_{600}$ ,以浓度为横坐标, $\text{OD}_{600}$  值为纵坐标作图,得  $\alpha$ -萘酚标准曲线。

### 1.2.8.2 粗酶液中蛋白质含量及酯酶活性的测定

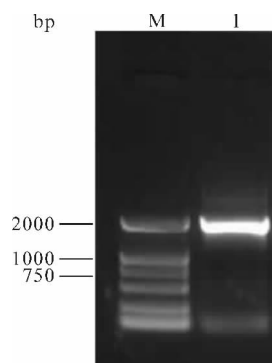
在试管中加入  $\alpha$ -乙酸萘酯( $3 \times 10^{-4}$  mol/L)底物后,置于 25 °C 平衡 5 min;加入粗酶液(空白组以缓冲液代替),置于 25 °C 反应 20 min;加入显色液,终止反应并显色;10 min 后,待出现稳定的蓝绿色,在分光光度计上测定  $\text{OD}_{600}$ ,重复 3 次,取平均值,对

照  $\alpha$ -萘酚标准曲线即可得到产生  $\alpha$ -萘酚的量。对照蛋白质标准曲线测定粗酶液中蛋白质含量后,计算酯酶的活性。定义 1 U 为特定条件下,单位时间(1 min)内粗酶液与底物反应产生 1  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -萘酚;以比活力即单位时间(1 min)内单位质量(1 mg)酶蛋白所对应的反应产物增加量表示各诱导条件下的酶活性(U/mg)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *estA* 基因的扩增结果

以 pET-*estA* 质粒为模板,用正、反义引物(*estA*-F/*estA*-R)扩增出 1 条约 1 800 bp 的条带(图 1),与预期大小相一致。

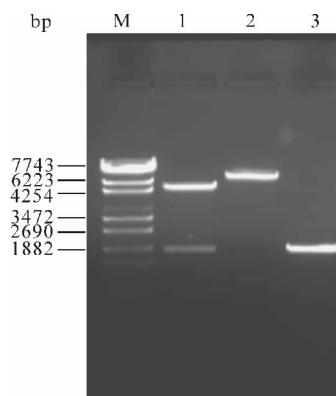


M, DNA Marker; 1, PCR 产物

图 1 *estA* 片段的 PCR 结果

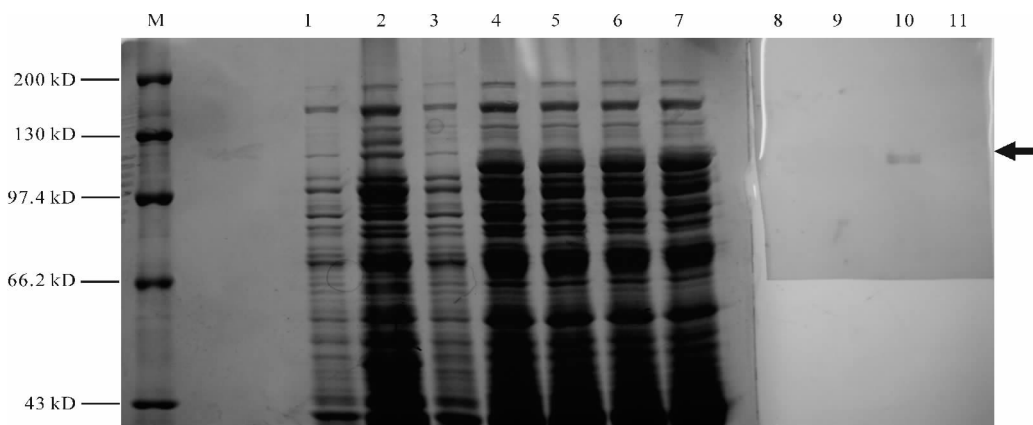
## 2.2 重组表达质粒的鉴定

如图 2 所示,重组质粒 pMal-c2X-*estA* 经 *Hind* III 单酶切后发生线性化,经 *Hind* III、*Xba* I 双酶切后,产生约 1 800 bp 的条带;且 PCR 验证也获得约 1 800 bp 的条带。测序结果与 GenBank 中 *estA* 基因的全长序列(登录号:DQ906143)相符。

M, Lambda/DNA *Hind* III Marker; 1, *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切; 2, *Hind* III 单酶切; 3, 菌液 PCR 验证图 2 重组 pMal-c2X-*estA* 质粒的酶切及 PCR 验证结果

## 2.3 *estA* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达和 Western blot 鉴定

含重组质粒 pMal-c2X-*estA* 的宿主菌经 20 h 的诱导表达,在不同浓度的 IPTG 诱导下,均表达出分子量约 107.1 kD 的融合蛋白(图 3)。Western

M, Marker; 1-7, SDS-PAGE 检测结果; 8-11, Western blot 检测结果; 1,9, 空载体 pMal-c2X 未诱导全蛋白; 2,8, 空载体 pMal-c2X 诱导 20 h 全蛋白; 3,11, 重组载体 pMal-c2X-*estA* 质粒未诱导全蛋白; 4-7, 重组载体 pMal-c2X-*estA* 诱导 20 h 全蛋白(IPTG 浓度分别为 0, 1, 0.3, 0.5, 0.8 mmol/L); 10, 重组载体 pMal-c2X-*estA* 诱导 20 h 全蛋白图 3 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 pMal-c2X-*estA* 表达的融合蛋白

blot 结果显示,诱导产生的重组 *EstA* 蛋白可以与其抗体结合,约在 110 kD 处出现阳性条带;而空载体 pMal-c2X 未诱导全蛋白、空载体 pMal-c2X 诱导 20 h 全蛋白和重组载体 pMal-c2X-*estA* 质粒未诱导全蛋白均没有出现目的条带。说明大肠杆菌细胞成功表达 MBP-*EstA* 融合蛋白。

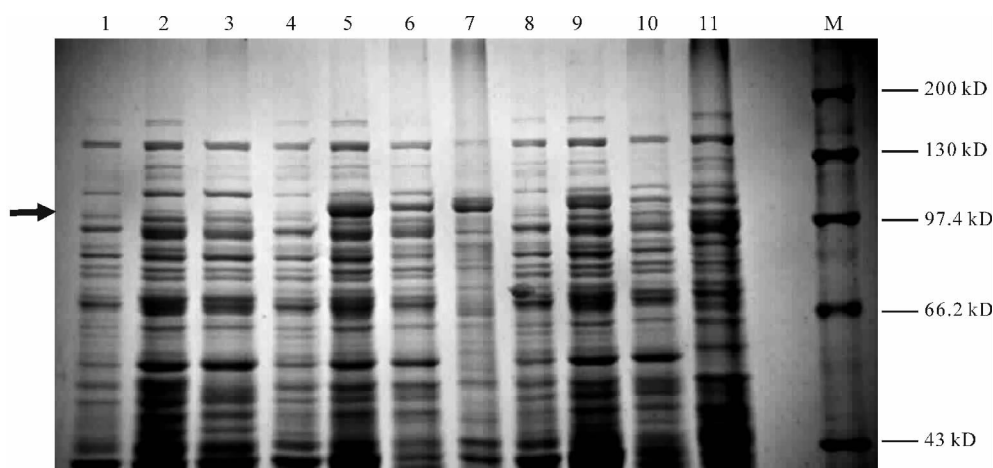
## 2.4 重组质粒工程菌诱导表达产物的可溶性检测

菌体全蛋白及菌体细胞破碎后的上清和沉淀分别经 SDS-PAGE 分析,如图 4 所示,虽在沉淀中有目的蛋白存在,但破壁上清液中也含有目的蛋白,表明该融合蛋白可存在于细胞液中,具有一定的可溶性。如图 5 所示,与空白组相比较,对照组(空载体 pMal-c2X)的细胞上清液未出现明显的变化,表明

空载体未表达具有酯酶活性的目的蛋白;试验组 1(未加  $\text{Ca}^{2+}$ )、试验组 2(加  $\text{Ca}^{2+}$ )细胞上清液颜色均发生明显变化,证明粗酶液具有酯酶活性,再次验证了其可能含有可溶性目的蛋白且该目的蛋白具有酯酶活性。

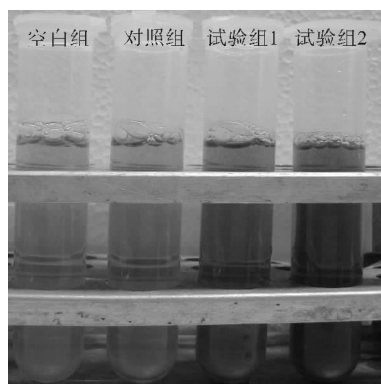
## 2.5 各因素对融合蛋白可溶性诱导表达的影响

2.5.1  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 如图 6 所示,当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 1.0 mmol/L 时,酯酶活性最大,为 44.64 U/mg;不加入  $\text{Ca}^{2+}$  时,诱导产生的目的蛋白仍具有酯酶活性,但与前者相比,活性降低,证明  $\text{Ca}^{2+}$  的存在可以促进目的蛋白的可溶性表达。菌体生长受  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响,随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的上升,其对菌体生长的抑制作用加大, $\text{Ca}^{2+}$  浓度与菌体生长之间呈负相关关系。



1—3 依次为空载体 pMal-c2X 未诱导全蛋白、空载体 pMal-c2X 诱导 20 h 全蛋白、空载体 pMal-c2X 诱导 20 h 破壁粗酶液；  
4—7 依次为重组载体 pMal-c2X-estA 未诱导全蛋白、重组载体 pMal-c2X-estA 加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 全蛋白、  
重组载体 pMal-c2X-estA 加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 破壁粗酶液、重组载体 pMal-c2X-estA 加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 破壁后胞内沉淀；  
8—11 依次为重组载体 pMal-c2X-estA 未诱导全蛋白、重组载体 pMal-c2X-estA 未加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 全蛋白、  
重组载体 pMal-c2X-estA 未加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 破壁粗酶液、重组载体 pMal-c2X-estA  
未加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 破壁后胞内沉淀；M. Marker

图 4 重组菌 pMal-c2X-estA 诱导表达产物的可溶性检测



空白组. 以缓冲液替代粗酶液；对照组. 空载体 pMal-c2X 诱导 20 h 破壁粗酶液；  
试验组 1. 重组载体 pMal-c2X-estA 未加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 破壁粗酶液；  
试验组 2. 重组载体 pMal-c2X-estA 加  $\text{Ca}^{2+}$  诱导 20 h 破壁粗酶液

图 5 重组菌 pMal-c2X-estA 诱导表达产物的酶活性检测

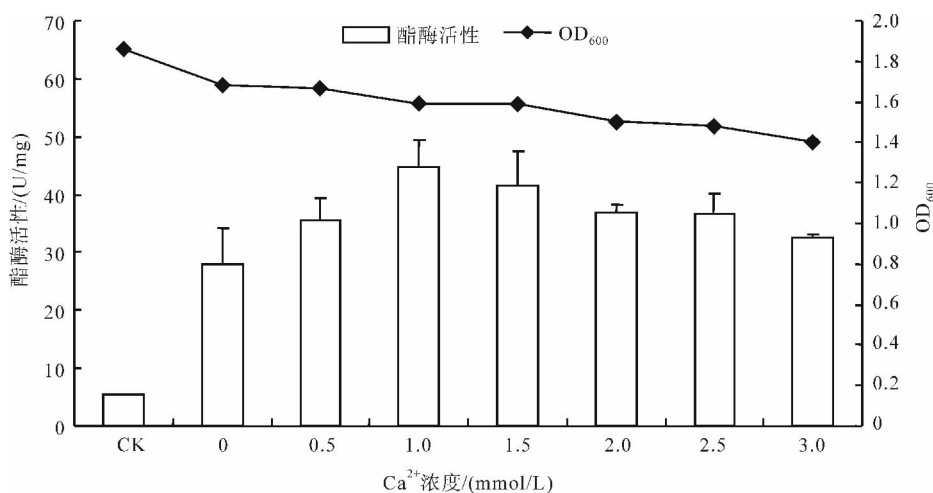


图 6  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对 EstA 酯酶活性及菌体生长情况的影响

2.5.2 初始  $OD_{600}$  如图 7 所示,当初始  $OD_{600}$  达到 0.7 时,酯酶活性最大,为 48.47 U/mg;当初始  $OD_{600}$  较小( $OD_{600}=0.4$ )或较大( $OD_{600}=1.0$ )时,诱导产生目的蛋白的酯酶活性与前者相比有所下降。菌体生长受初始  $OD_{600}$  的影响,在诱导时间相同的情况下,随着初始  $OD_{600}$  的上升,其对菌体生长的促进作用加大,两者呈正相关关系。

2.5.3 IPTG 浓度 如图 8 所示,当 IPTG 浓度为

0.1 mmol/L 时,诱导产生目的蛋白的酯酶活性最大,为 54.86 U/mg,之后随着 IPTG 浓度的增加酯酶活性呈现下降趋势,说明低浓度的诱导剂可能对目的蛋白的可溶性表达具有促进作用。菌体生长受 IPTG 浓度的影响较小,随着浓度的上升,其对菌体生长呈现略微抑制作用,IPTG 浓度与菌体生长情况之间呈微弱负相关关系。总体来说,IPTG 浓度在 0.1~0.3 时,酯酶活性较高。

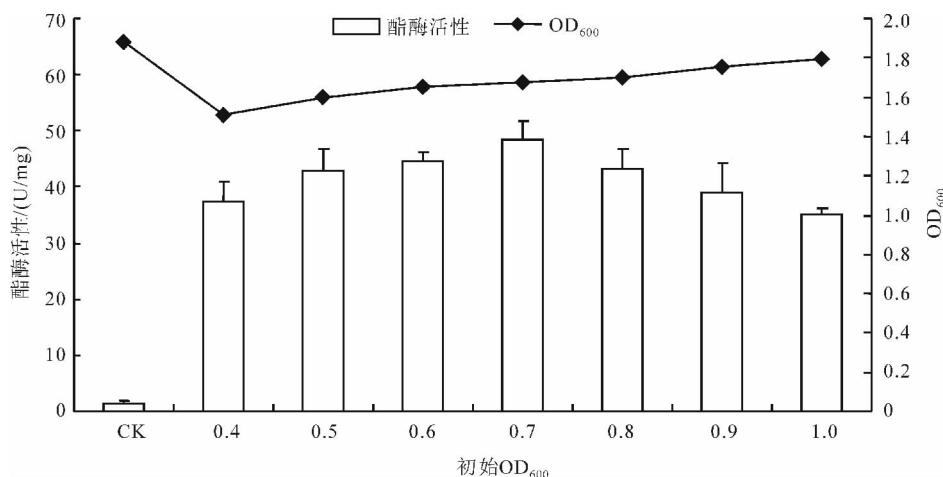


图 7 诱导初始  $OD_{600}$  对 EstA 酯酶活性及菌体生长情况的影响

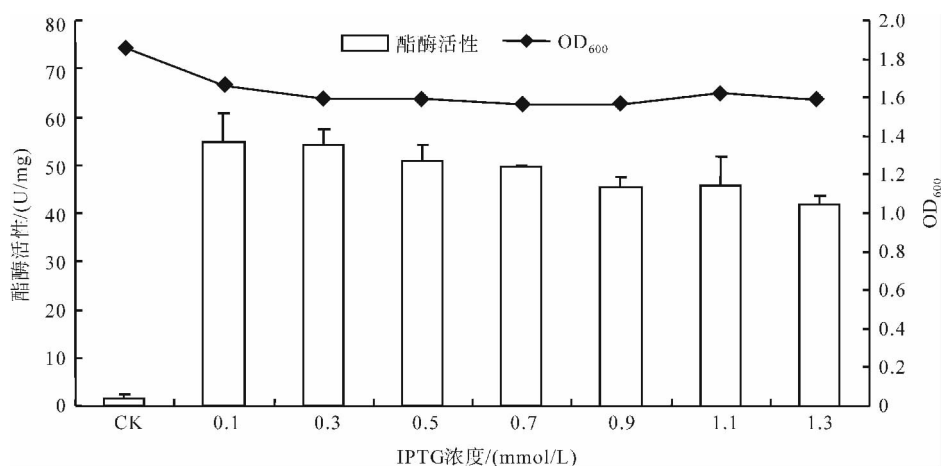


图 8 诱导剂 IPTG 对 EstA 酯酶活性及菌体生长情况的影响

2.5.4 初始 pH 值 如图 9 所示,当诱导初始 pH 值达到 7 时,酯酶活性最大,为 52.34 U/mg;当诱导初始 pH 值较大(10)或较小(4、5)时,诱导产生的目的蛋白其酯酶活性与前者相比有所下降。菌体生长受诱导初始 pH 值的影响,随着初始 pH 值的上升,菌体生长呈抛物线趋势,中性及弱碱性环境较适合菌体生长。

2.5.5 温度及时间 如图 10 所示,在 26 °C 下诱导

17.5 h 左右,酯酶蛋白 EstA 可溶性表达的效果最好,酶活性为 92.03 U/mg,温度较高或较低都会影响其表达效果。各温度下,达到最佳诱导状态的时间不同,38、34、30、26、22、18、15 °C 下,最佳诱导时间分别为 3、4、7.5、17.5、15、20、15 h,整体来看,随着温度的下降,达到最佳诱导状态的时间增长。从菌体生长情况来看,在各温度下的最佳诱导时间时,菌体生长情况大致相同, $OD_{600}$ 基本维持在 1.4~1.6。

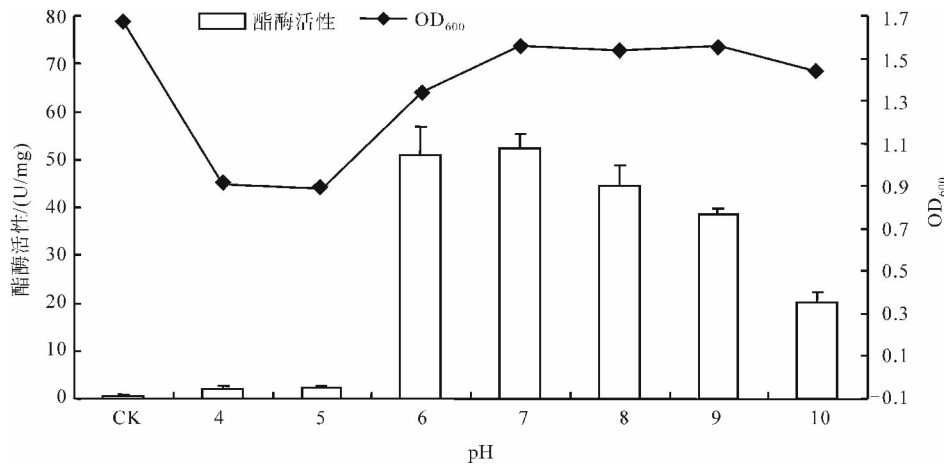


图 9 诱导初始 pH 值对 EstA 酯酶活性及菌体生长情况的影响

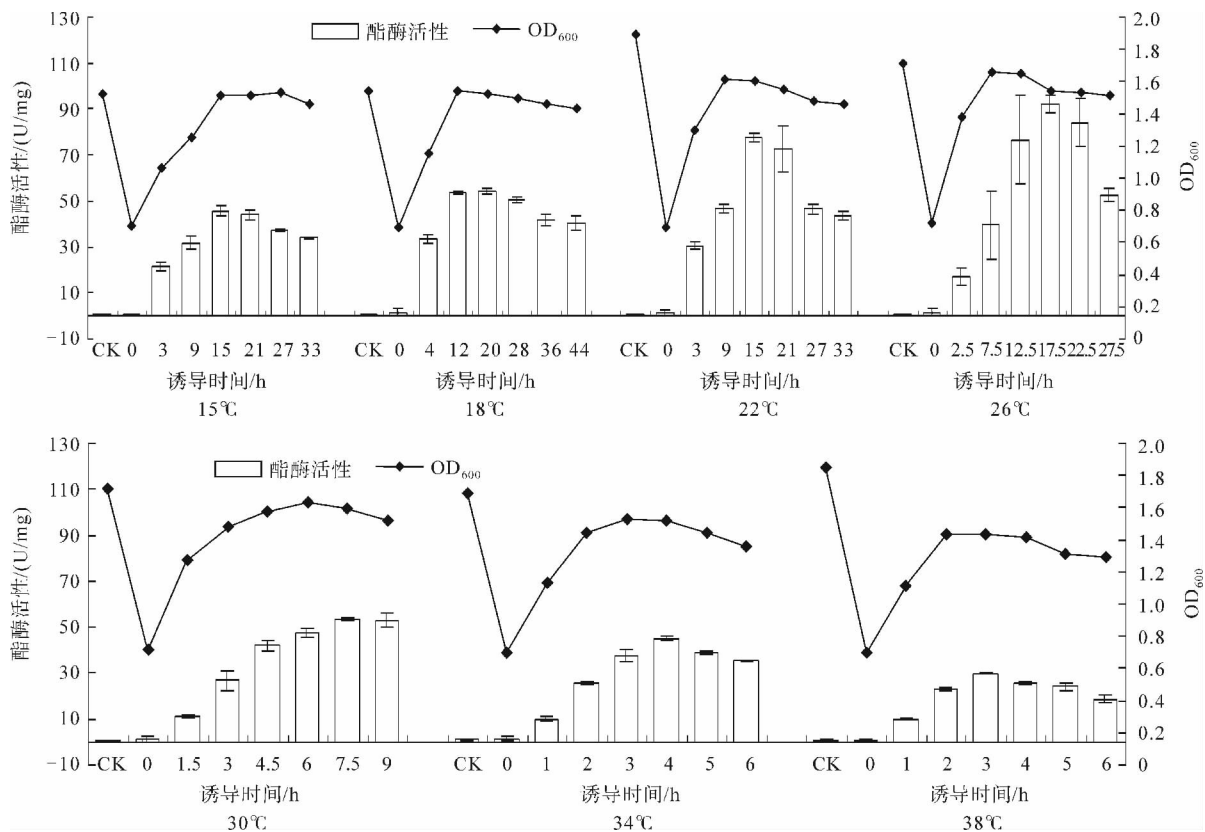


图 10 不同温度下不同诱导时间对 EstA 酯酶活性及菌体生长情况的影响

### 3 讨论

微生物降解的实质是酶促降解,微生物体内存在各种酶,其具有专一选择性;其中,酯酶能够作用于拟除虫菊酯类农药的酯键部位使酯键断裂。

本试验将酯酶基因 *estA* 连于 pMal-c2X 载体,该载体采用 tac 启动子,与 T7 启动子相比,强度较低,可使诱导过程具有与表达能力相匹配的翻译速度<sup>[3]</sup>。该载体所采用的融合蛋白标签麦芽糖结合蛋白(MBP),是用于可溶性融合表达的最佳标签蛋白之一<sup>[4]</sup>,因外源蛋白与溶解性好的蛋白融合表达,可避免融合蛋白聚

集成包涵体<sup>[3]</sup>。

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳、酶活性检测及 Western blot,确认酯酶 EstA 在宿主菌中成功表达。据文献报道<sup>[5]</sup>及本实验室前期复性试验结果显示,某些酶的正确折叠和空间结构的稳定性需  $\text{Ca}^{2+}$  参与。本试验中,重组载体在无  $\text{Ca}^{2+}$  参与诱导的情况下也能表达出具有酯酶活性的融合蛋白。这可能与外源蛋白 EstA C 端结构域的 247 个氨基酸残基有关,该结构域主要由重复的 RTX 构成,充当了 EstA 蛋白的分子内伴侣,参与蛋白质的正确折叠<sup>[6]</sup>;因而推断,使用 pMal-c2X 系列载体,在可溶性蛋白标签的共同作用下,外源蛋白正

确形成分子内伴侣,促使其在无  $\text{Ca}^{2+}$  参与的情况下也能进行可溶性表达即正确折叠并表现出蛋白活性。融合蛋白虽能成功诱导表达,但从凝胶电泳的结果来看,可溶性蛋白的含量较低,需进一步优化诱导条件。

影响重组大肠杆菌诱导表达的培养条件有很多,本试验就不同的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度、诱导初始  $\text{OD}_{600}$ 、诱导剂浓度、诱导 pH 值、诱导温度、诱导时间,进行单因素诱导表达条件的优化。

温度对工程菌的生长及诱导效果影响很大。温度较高时,外源蛋白大量表达,极易影响菌体对蛋白的正确折叠,从而导致包涵体的形成,因此,降低温度将更有利于可溶性蛋白的合成<sup>[7]</sup>。热休克蛋白在外源蛋白诱导表达的同时随之产生,低温下其活性降低,可大大减弱外源蛋白在菌体内的降解<sup>[8-9]</sup>。降低培养温度虽然使得重组蛋白有更充分的时间折叠,利于其可溶性表达,但在低温下,促进外源蛋白空间折叠的大肠杆菌伴侣蛋白活力下降,例如 GroEL/ES,在 12 °C 下的活力较 30 °C 时下降 70%<sup>[10]</sup>。由此推测,本试验中,当温度低于 26 °C 时,加之培养基中金属离子  $\text{Ca}^{2+}$  对菌体生长的抑制作用,菌体内伴侣蛋白活性下降,导致可溶性蛋白合成随之减弱。因此,优化得到的 26 °C 诱导温度既能使外源蛋白具有充分时间折叠成正确的空间结构,同时维持了大肠杆菌分子伴侣蛋白的较高活性,促进目的蛋白的可溶性表达。

最佳诱导表达时间与诱导温度密切相关。就具体某一温度单独来看,诱导初始,菌体内可溶性蛋白处于一个持续积累的过程;但随着时间的延长,加之菌体内聚集的外源蛋白开始对其产生“毒害”作用,菌体出现老化、死亡,这些聚集在菌体内的外源蛋白也随之降解,酯酶活性下降。所以,诱导时间过短或者过长,都会影响可溶性外源蛋白在菌体内的积累。

$\text{Ca}^{2+}$  的添加对酯酶的可溶性表达影响较大。从试验结果来看,虽然 1.0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  使菌体生长受到抑制,但较未添加  $\text{Ca}^{2+}$  的试验组,其酯酶活性有显著提升,这可能与  $\text{Ca}^{2+}$  在酯酶空间结构的正确折叠及保持蛋白稳定性上所发挥的作用密不可分。

诱导剂浓度对目的蛋白的产量也有影响。从试验结果来看,最佳的 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L,随着其浓度的增加,菌体生长略微受到抑制,酯酶活性有所下降,这可能与 IPTG 本身具有“毒性”有关;IPTG 存在时,携带含有强启动子重组质粒的菌体将会调动其体内所有资源用于外源蛋白的合成而忽略维持菌体自身生长的需求<sup>[11]</sup>,因而较高浓度的 IPTG 虽可使外源蛋白高水平表达,但容易造成菌体自身资源的过度消耗,导致菌体生长受到抑制;以及造成包涵体形成,使可溶性表达下降。

诱导初始  $\text{OD}_{600}$  对酯酶诱导表达的影响也较为明显。本试验中  $\text{OD}_{600} = 0.7$  时,菌体处于指数生长期后期,生命活动旺盛。由于外源基因的表达受强启动子驱动,诱导表达时会对菌体造成很大的负担,因此,若在  $\text{OD}_{600}$  较低时表达,菌体自身资源几乎全部用于外源蛋白的表达<sup>[11]</sup>,在菌体量较少的情况下自身生长受到严重影响,能获得的蛋白表达量便随之减少;若在  $\text{OD}_{600}$  较高时表达,虽可获得高产量的表达产物,但细胞表达外源蛋白的时间减少,获得的外源蛋白总量并未增多<sup>[12]</sup>。

培养基的 pH 值也会影响可溶性蛋白的表达,最佳 pH 值随菌体和重组蛋白的特点不同而不同。当 pH 值与重组蛋白等电点相差较大时,表达的蛋白产物不易形成包涵体。李会成等<sup>[13]</sup>研究发现,基因工程菌细胞生长的最佳 pH 值为 6.8~7.4,基因表达的最佳 pH 值为 6.0~6.5。虽然本试验所用的培养基中含有  $\text{Ca}^{2+}$ ,但探讨的最佳诱导 pH 值(6.0~7.0)与其基本相符。

对于每一类蛋白的表达有不只一种的表达系统及表达条件可以选择,因此,选择最佳的一组表达系统和表达条件对于研究者获得所需要的表达产物是至关重要的。

#### 参考文献:

- [1] 余慧群,廖艳芳,周海,等.拟除虫菊酯杀虫剂研究进展[J].企业科技与发展,2010(20):46-49.
- [2] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-253.
- [3] 谢磊,孙建波,张世清,等.大肠杆菌表达系统及其研究进展[J].华南热带农业大学学报,2004,10(2):16-19.
- [4] Kataeva I, Chang J, Xu H, et al. Improving solubility of *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium thermocellum* JW-20 proteins expressed into *Escherichia coli* [J]. J. Proteome Res, 2005, 4: 1942-1951.
- [5] Kuwahara K, Angkawidjaja C, Matsumura H, et al. Importance of the Ca-binding sites in the N-catalytic domain of a family I.3 lipase for activity and stability[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2008, 21(12): 737-744.
- [6] 许玮.拟除虫菊酯农药降解基因的表达、纯化及活性分析[D].北京:中国农业科学院,2011.
- [7] Weickert M J, Doherty D H, Best E A, et al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7: 494-499.
- [8] Hunke S, Betton J M. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2003, 50: 1579-1589.
- [9] Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein[J]. Cell, 1999, 97: 339-347.
- [10] Ferrer M, Chernikova T N, Yakimov M M, et al. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(11): 1266-1267.
- [11] Weickert M J, Doherty D H, Best E A, et al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7(5): 494-499.
- [12] 许崇利,杨梅,许崇波.大肠杆菌表达系统的影响因素[J].中国动物检疫,2010,27(8):66-67.
- [13] 李会成.基因工程菌的发酵研究[J].生物工程进展,1997(17):40-43.