

苧麻纤维素合酶 *BnCesA1* 高变区 蛋白的原核表达与条件优化

谢庆宁¹, 揭雨成², 周清明³, 蒋杰², 周精华², 常心海¹, 钟英丽^{1,2}

(¹ 湖南农业大学生物科学与技术学院, 长沙 410128; ² 湖南农业大学苧麻研究所, 长沙 410128; ³ 湖南农业大学农学院, 长沙 410128)

摘要: 高等植物纤维素合酶是含有多个功能结构域的糖苷转移酶, 催化合成 β -1, 4 葡萄糖苷链, 即高等植物细胞壁的重要成分之一纤维素。在同一物种例如在拟南芥中比对纤维素合酶家族各成员的序列信息, 发现其蛋白序列中存在 2 个高变区 (HVR), 其中第一个 HVR 靠近 NH_2 端 (NHVR), 富含酸性氨基酸。本研究克隆了苧麻纤维素合酶基因 (*BnCesA1*) 的 NHVR 编码序列, 并以正确的阅读框亚克隆至含有 $6 \times \text{His}$ 接头的 pQE-N1 原核表达载体, 构建了 pQE-N1-NHVR 重组表达载体。在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达的重组蛋白 His-tag-NHVR 经 Western-blotting 验证后, 正交优化得到该蛋白小量表达的最优条件组合为: 所挑取的 2 号菌落在 37°C 下, IPTG 的诱导浓度为 0.1 mmol/L , 诱导表达 4 h。本研究结果为纯化 His-tag-NHVR 融合蛋白、制备其抗体及进一步研究苧麻纤维素合酶局部功能或其组织特异性作用打下基础。

关键词: 纤维素合酶; 高变区; 原核表达; 正交优化

Prokaryotic Expression of the NH_2 -terminal Hypervariable Region of Cellulose Synthase Protein in *Boehmeria nivea* (*BnCesA1*) and the Expression Condition Optimization

XIE Qing-ning¹, JIE Yu-cheng², ZHOU Qing-ming³, JIANG Jie²,
ZHOU Jing-Hua², CHANG Xin-hai¹, ZHONG Ying-li^{1,2}

(¹ College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128;

² Institute of Ramie, Hunan Agriculture University, Changsha 410128;

³ College of Agricultural, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: Cellulose synthases of advanced plants have multiple functional domains and belong to the family of glycosyltransferases. They act as the catalyst for the transfer of the β -1, 4-glucan, and construct the cellulose molecule which is one of the important cell wall components of advanced plants. Comparison among cellulose synthase family members within one species such as *Arabidopsis* demonstrates that there are two hypervariable regions (HVR) in its protein. The first HVR lies at the NH_2 -terminal (NHVR) and is rich of acidic amino acid residues. In this study, we cloned the NHVR coding sequence of the *Boehmeria nivea* (ramie) cellulose synthase gene (*BnCesA1*). Then the gene fragment was subcloned into the prokaryotic expression vector pQE-N1 including $6 \times \text{His}$ tag in the right reading frame to construct pQE-N1-NHVR recombinant expression vector. After the confirmation of the expression of the fusion protein His-tag-NHVR by western-blotting, the expression conditions had been optimized using orthogonal array testing in *E. coli* BL21 (DE3). The results showed that the optimal combination of small-scale expression conditions was colony No. 2, with concentration of IPTG at 0.1 mmol/L , inducing time for 4 h and temperature at 37°C . Altogether, our results would benefit the subsequent purification of His-tag-NHVR fusion protein and the

收稿日期: 2013-03-24 修回日期: 2013-07-13 网络出版日期: 2013-10-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1541.013.html>

基金项目: 湖南农业大学大学生科技创新基金项目 (XCX1038); 省科技计划项目博士后专项基金 (S2010R1040); 湖南省作物种质创新与资源利用国家重点实验室培育基地一般重点项目 (09KFXM02); 湖南省科技厅重点项目 (2010TP4004-1)

通信作者: 钟英丽, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: yinglizhong@aliyun.com

preparation of its antibody, and support the further study to regional functions of *BnCesA1* and its tissue specific functions in ramie.

Key words: Cellulose synthase; NHVR; prokaryotic expression; orthogonal optimization

纤维素合酶是一种重要的糖苷转移酶,催化合成的 β -1,4 葡萄糖苷链以分子间氢键构成某些细菌、真菌和大部分植物细胞壁中含量最丰富的组份纤维素^[1-3]。纤维素合酶以复合体行使这一催化功能,此复合体被认为在高尔基体中组装,然后朝细胞表面转运,插入在细胞质膜上与皮层的微管蛋白相邻,后者参与纤维素合成方向的引导^[4-6]。关于纤维素合酶具体的功能机制,40 多年的研究虽然仍未研究透彻,但关于其模型结构的细节正在慢慢地被阐释。S. Kimura 等^[7]运用免疫细胞化学方法将棉花纤维素合酶的抗体标记于细胞膜上,观察到一个呈六边玫瑰型的多聚体。根据已得到的证据,D. P. Delmer^[8]提出了纤维素合酶的三维结构模型,即 8 个跨膜结构域在细胞膜上形成一个“洞”,正在合成的 β -1,4 葡萄糖苷链经过此“洞”到达细胞外形成细胞壁。N 端形成的蛋白间互作结构域位于胞内,可以结合各种催化活性所需的因子^[9-10]。M. S. Doblin 等^[11]在 S. Kimura 等^[7]的研究和 D. P. Delmer^[8]的观点基础上提出更细致的模型结构:每个纤维合成复合体由 6 个亚基构成,每个亚基又由 6 根 *cesA* 多肽链组成,排列成 6+6 的花瓣状,每根多肽链都有 8 个跨膜螺旋结构,在质膜上形成一个通道,有利于新链从此通道穿过进入细胞壁,36 根新生链从复合体中穿出形成原纤丝。纤维素合酶基因首先是在木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*) 中被发现,在其蛋白结构中存在一些 β -糖苷转移酶的保守序列,例如 DDDQxxRW(天冬氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺-x-x-精氨酸-色氨酸)^[2,12-15]。通过保守序列同源性比较,在棉花中发现第一个植物纤维素合酶基因^[16]。目前,在拟南芥中已发现有 10 个纤维素合酶的编码基因(现命名为 *AtCes*)。纤维素合酶基因的大小为 3.5~5.5 kb,有 9~13 个内含子,转录的 mRNA 约为 3.10~3.15 kb,编码的蛋白含有 985~1088 个氨基酸,序列相似性 53%~98%^[7,17]。所有的纤维素合酶都具有跨膜蛋白的特征,具有多个跨膜区域,一般 2 个分布在 N 端,其余的分布在 C 端,其中间为亲水胞内区。以拟南芥纤维素合酶 *AtCes1* 为例,其蛋白 N 端含 2 个保守的锌指区,可能与蛋白质之间的相互作用有关^[7]。紧跟着为约 150 个氨基酸残基的高变异的区域(NHVR),富含酸性

氨基酸,其后是 N-端的两个跨膜结构域,位置在 270~300 氨基酸残基之间。650 位置为纤维素合酶的另一个 NHVR,长约 50 个氨基酸。在其两侧各有一个区域,分别称为 A 区与 B 区,现认为 A 区具有结合底物 UDP-葡萄糖的结构域,而 B 区则是催化活性结构域。在 C-端约 850 位置,还具 6 个跨膜结构域^[17-18]。

苧麻[*Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud.] 纤维是最长的自然纤维,具有坚韧、质地轻、吸湿散热快、透气性好的特点,另外还具有良好的防腐、防菌和防霉的功能,适宜纺织夏季服装。苧麻在我国栽培历史悠久,是我国特色的纤维作物。对比而言,其他作物如杨树、桉树的纤维素合酶基因的克隆和功能验证有较为深入的研究,但是关于苧麻纤维素合酶基因的研究报道还很少。田志坚等^[19]运用同源克隆的方法以栽培种湘苧 3 号为材料,通过简并引物 RT-PCR 成功克隆了苧麻纤维素合酶基因 *BnCesA1* 片段。其中包括 5'端约 450 bp 以外的全部 cDNA 序列,序列长 3276 bp,编码一段由 938 个氨基酸残基组成的蛋白质(GenBank 登录号:DQ077190)。蛋白结构分析表明苧麻纤维素合酶的蛋白结构与其他植物纤维素合酶的相类似,与拟南芥纤维素合酶 *AtCes1* 高度同源,具有类似的功能结构域,仅缺少 N-端锌指结构域。在此基础上,蒋杰等^[20]克隆了苧麻 *BnCesA1* 的全长 cDNA 编码序列,并根据 *BnCesA1* 基因序列的第一个高变区设计特异性表达检测引物,分析了该基因在湘苧 3 号各组织中的表达情况,*BnCesA1* 在苧麻各组织中均有表达,但是在茎中表达量最高,结果提示该基因可能参与普遍的苧麻细胞壁次生长。田志坚等^[19]和蒋杰等^[20]通过基因比对和蛋白结构分析虽然能够确认所克隆的基因是苧麻纤维素合酶基因,但并未见有苧麻纤维素合酶功能验证或苧麻纤维合酶特有的作用模式相关方面的报道。分段克隆苧麻纤维素合酶不同的结构域编码序列,分别表达蛋白质,以应用于免疫化学分析,可在细胞水平上对已克隆的苧麻纤维素合酶基因实现功能验证,并有助于研究其局部功能及整体分析其在苧麻植株上的表达模式和苧麻特有的纤维合成特点,指导苧麻纤维生产实践。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

湘苈 3 号苈麻单链 cDNA 在本实验室由苈麻顶芽组织的 mRNA 反转录得到; DNA Marker、高保真 *Taq* 酶、DNA 聚合酶、Transfer-T1 感受态细胞、菌种 BL21 (DE3)、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 TransGen Biotech; pMD19T 载体购自 TaKaRa 公司; *Bgl* II、*Kpn* I、*T*₄ DNA 连接酶购自 Fermentas; 蛋白质 Marker PR1600 购自 Solarbio 公司; Anti-His-tag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶耦连的羊抗鼠二抗、DAB 显色液、PVDF 膜购自碧云天公司; 表达载体 pQE-N1 由湖南师范大学生科院基因功能研究室赠送。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 高变区域的确定及引物设计 苈麻 *BnCesA1* 基因序列 (Genebank: DQ077190) 从 1 bp 至 452 bp 编码 NHVR。根据该高变区序列设计引物, 分别在引物 5' 端引入 *Bgl* II 和 *Kpn* I 的酶切位点: NHVRF5'-agatctATTCCTCCTCACCAATGG-3', NHVRR5'-gggtaccGTTGCACGGTATTGTAAGAAGA-3'。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.2 NHVR 区域基因片段的克隆 以湘苈 3 号苈麻单链 cDNA 为模板, 扩增目的片段。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72 °C 再延伸 7 min。PCR 反应体系为: 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 引物 F、R 各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, 高保真 *Taq* 酶 0.125 μL, ddH₂O 补充至 25 μL。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收 PCR 目的产物, 通过 TA 克隆连接至 pMD19T 载体, 热激法转化至 Trans-T1 感受态; 以 NHVRF、NHVRR 为引物, 经菌落 PCR 检测, 挑选阳性克隆送至上海生工测序。

1.2.3 原核表达载体的构建及鉴定 经测序验证的 pMD19T-NHVR 重组质粒用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳后回收 NHVR 片段; pQE-N1 原核表达载体用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳后回收载体大片段。然后将目的片段和质粒载体按 1:6 用 *T*₄ DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。将连接产物用热激法转化至 Trans-T1 感受态; 菌落 PCR 检测后挑选阳性克隆送至上海生工测序。

1.2.4 His-NHVR 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 的表达 经测序验证后, 将构建好的 pQE-N1-NHVR 重组质粒通过热激法转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 挑取

单克隆至 5 mL 2 × YT (含 AMP 50 μg/mL) 液体培养基中, 37 °C 摇床培养 8 h。然后按 1:100 稀释, 培养 2 h 至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右后取样 1 mL, 剩余的培养液加 125 μg/mL 的 IPTG 诱导培养; 诱导 2 h、4 h、6 h 分别取样 1 mL。

1.2.5 Western-blot 鉴定 His-NHVR 的表达 对所取菌液样品 10000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 用 PBS 稀释后测 OD₆₀₀, 取与诱导前等量菌体重悬, 加入 6 × SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 冰上冷却, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 然后用半干式转印槽转 PVDF 膜。一抗 anti-His-tag 单克隆抗体用封闭液 (含 5% 的脱脂奶粉的 PBS) 稀释 400 倍, 将膜在 37 °C 一抗溶液中孵育 1 h。PBST 洗膜 4 次。辣根过氧化物酶耦连的羊抗鼠二抗用封闭液稀释 5000 倍, 在 37 °C 与膜共同孵育 45 min。PBST 洗膜 4 次。DAB 底物显色。

1.2.6 表达条件的正交优化 经 Western-blotting 检测显阳性后, 取保存的含 pQE-N1-NHVR 重组质粒的 BL21 (DE3) 菌种涂布至 2 × YT (含 AMP 50 μg/mL) 固体培养基平板, 37 °C 培养过夜后, 挑选 3 个单菌落 (记为菌落 1、2、3 号) 分别至 5 mL 2 × YT (含 AMP 50 μg/mL) 液体培养基中, 37 °C 摇床培养 8 h。按 1:100 稀释, 培养 2 h 后测 OD₆₀₀。条件优化时 IPTG 诱导温度设 16 °C、28 °C、37 °C; IPTG 的浓度设 0.01 mmol/L、0.1 mmol/L、1 mmol/L; 诱导时间设 4 h、6 h、8 h。空白对照用 2 号菌落以无菌水替代 IPTG, 分别在 16 °C、28 °C、37 °C 下培养 4 h 取样。诱导完毕后取 10 μL 样品, 用 90 μL 无菌水稀释, 用考马斯亮蓝 G250 法测定样品所含总蛋白的浓度; 即取 0.1 mL 蛋白样品加于 3 mL 新配置的考马斯亮蓝 G250 溶液中, 震荡摇匀后测 OD₅₉₅, 以调节使 SDS-PAGE 电泳点样前各样品总蛋白浓度基本一致。样品处理后, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 电泳图片利用 Gel-pro Analyzer 软件处理, 得到目标条带的光密度, 即 OD 值, 以衡量目标蛋白的表达量。总蛋白浓度相同时, 目标蛋白的表达量即相当于目标蛋白的获得率。

2 结果与分析

2.1 NHVR 区域基因片段的克隆

以湘苈 3 号苈麻 cDNA 为模板, 根据 *BnCesA1* 基因的 NHVR 序列设计引物, PCR 扩增目的片段, 在退火温度为 59 °C 有明显的、特异性较强的 DNA

扩增亮带(图 1A),与预期大小相吻合。回收目的片段后,连接至 pMD19T 载体,转化到 Trans-T1 感受态,涂布平板后恒温培养,待长出菌落后,挑选单克

隆进行菌落 PCR 检测(图 1B)。送阳性克隆到上海生工测序,测序结果正确,表明成功扩增 NHVR 区域基因片段。

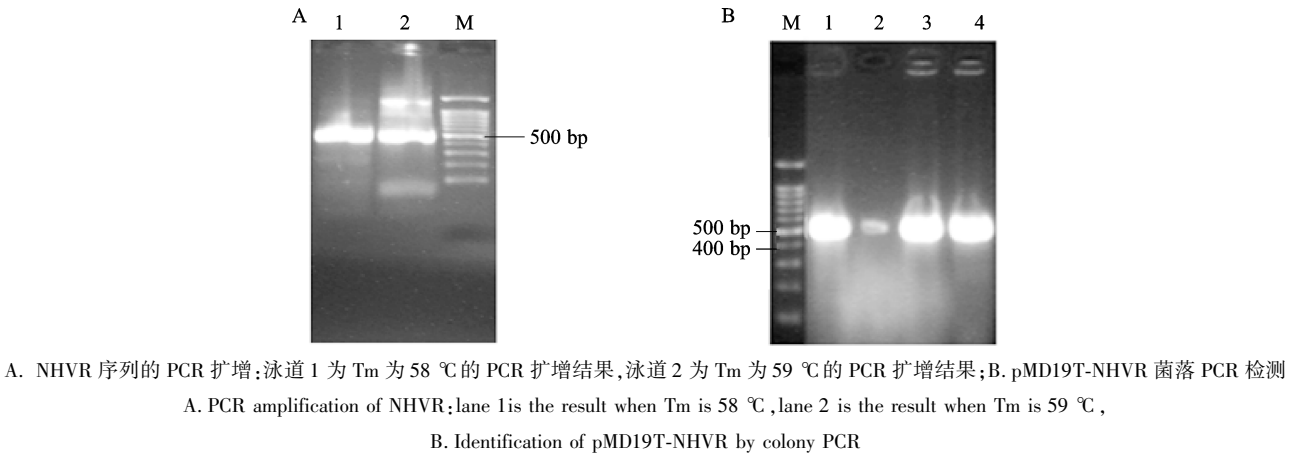


图 1 NHVR 序列的 T 载体克隆

Fig. 1 T Vector clone of NHVR sequence

2.2 原核表达载体的构建及鉴定

经测序验证的 pMD19T-NHVR 重组质粒和原核表达载体 pQE-N1 都经 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳(图 2A),回收目的片段,经 *T*₄ DNA 连接酶连接,然后转化到 Trans-T1 感受

态,涂布平板后恒温培养,待长出菌落后,挑选单克隆进行菌落 PCR 检测,在 500 bp 附近有明显的 DNA 扩增亮带则为阳性菌落(图 2B)。送阳性克隆到上海生工测序,测序结果显示读码框吻合,序列正确,表明 pQE-N1-NHVR 原核表达载体构建成功。

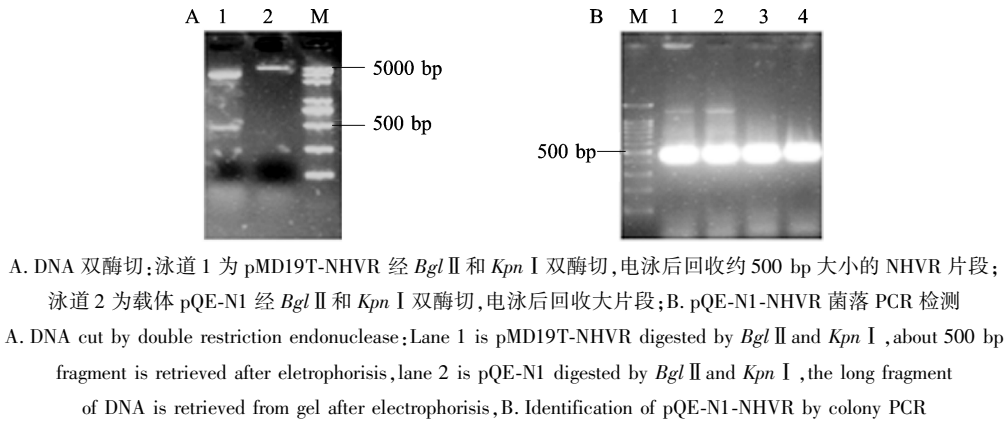


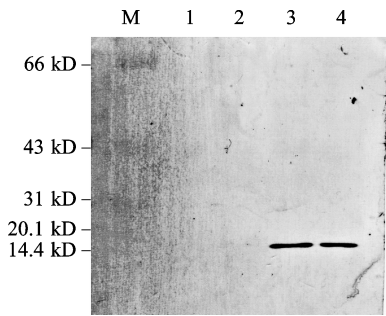
图 2 NHVR 表达载体的构建

Fig. 2 Construction of NHVR expression vector

2.3 His-NHVR 融合蛋白的原核表达

将构建成功的 pQE-N1-NHVR 原核表达质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)。挑取单菌落进行蛋白诱导表达。取诱导前,诱导 2 h、4 h、6 h 的菌液,测定 OD₆₀₀ 光密度值;取等菌数直接加入 SDS 上样缓冲液裂解细菌提取总蛋白。因 pQE-N1 空载体在 *Plac* 启动子后直接连接 6 × His-tag 的表达序列,所以 pQE-N1-NHVR 重组质粒对其后连入的阅读框正确的 NHVR 编码序列可表达在组氨酸接头之后形成融合蛋白 His-NHVR。诱导表达前和不同诱导时

间的蛋白用 SDS-PAGE 分离,凝胶转膜后可用 anti-His-tag 抗体对融合蛋白的表达进行检测(图 3)。可见未诱导及诱导 2 h 的细菌蛋白中并未检测到目标蛋白。而诱导 4 h 和 6 h 的细菌有融合蛋白的表达,目标蛋白的分子量约为 18 kD,与图 3 中蛋白质标准指示的位置基本相符合。可以认为 His-NHVR 融合蛋白表达成功,但是该蛋白在大肠杆菌中的积累并不随诱导时间的延长而增大比率,初步判断外源蛋白 His-NHVR 的表达可能对细菌本身产生毒性,其表达的条件需要进行优化。



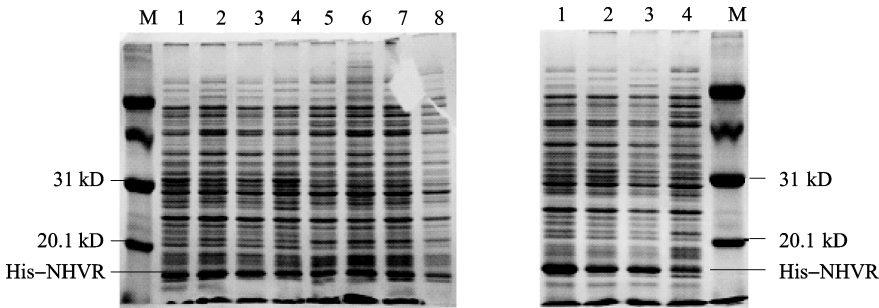
M 为预染色蛋白分子量标准,泳道 1 为诱导前取样,泳道 2、3、4 分别是 IPTG 诱导 2 h、4 h、6 h 取样
M: Prestained protein molecular weight standard. Lane 1 is the sample before the induce, lane 2, 3, and 4 is the sample with IPTG inducing 2 h, 4 h, and 6 h, respectively

图 3 免疫印迹法鉴定蛋白 His-NHVR 的表达
Fig. 3 Detection of His-NHVR expression by western-blotting

2.4 His-NHVR 融合蛋白小量表达条件的正交优化

按设计的正交试验方案安排试验(表 1)。诱导

前测定各试验组的 OD₆₀₀ 的平均数在 0.574 左右,标准差为 0.071,菌体浓度相差并不明显。诱导完毕后,根据各样品的 OD₆₀₀ 值,取等量菌体后裂解得到细菌总蛋白;经考马斯亮蓝 G250 测定,总蛋白浓度基本一致后进行 SDS-PAGE 电泳(图 4)。推导的重组蛋白的分子量约为 18 kD,试验组样品在其附近都检测到目标蛋白条带。同时,3 个对照样品在 18 kD 附近也都检测到蛋白条带。但是,除总蛋白的浓度明显偏小的 8 号样品外,试验组的目标蛋白条带要明显比对照组的强。这表明大肠杆菌自身表达了与重组蛋白分子量相近的蛋白质。利用 Gel-pro Analyzer 软件分析目标条带的光密度,得到其 OD 值,并直观分析正交试验结果(表 1)。各样品总蛋白浓度一致,但是试验组目标蛋白条带的 OD 值差异明显。通过分别比较相同因素下的各水平平均数 R 确定各因素的最优水平,确定最优组合 2 号菌落在 37℃ 下,IPTG 的诱导浓度为 0.1 mmol/L,诱导时间为 4 h。



左边:1~8 泳道分别为 1、4、7 号试验组,16℃、28℃ 对照和 2、5、8 号试验组;右边:1~4 泳道分别为 9、6、3 号试验组,37℃ 对照;M 为蛋白分子量标准
Left panel: Lane 1-8 is case No. 1, 4, 7, control at 16℃, at 28℃ and case No. 2, 5, 8, respectively, right panel: lane 1-4 is case No. 9, 6, 3 and control at 37℃, respectively, M is the protein molecular weight standard

图 4 His-NHVR 重组蛋白的原核表达的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression of His-NHVR recombinant protein

3 讨论

植物纤维素合酶基因组成一个庞大的基因家族,众多家族成员存在的理由可能是不同的成员在植物中的表达具有组织特异性^[7];也可能不同的纤维素合酶基因成员编码不同的同形物而发挥不同的功能^[11]。目前高变异编码序列只在植物纤维素合酶基因中被发现,而在细菌、真菌纤维素合酶基因中并未发现此高变区编码序列,表面高变区的存在与植物纤维素合酶的物种特异性有关^[11]。早期由于纤维素合酶蛋白序列的稀缺,这些高变异区域呈明显的多样性,因而这些区域曾经被认为对纤维素合酶的催化作用不

重要^[16],但是现在这些区域在禾本科和双子叶植物物种间也表现出一定的保守性,形成一个独特的亚进化分支结构。而且,这些区域包含保守的胱氨酸残基,碱性赖氨酸和精氨酸残基簇和酸性的天冬氨酸和谷氨酸残基簇,可能存在着亚结构域水平上的蛋白质间相互作用^[2,21]。因此,分段克隆并表达高等植物纤维素合酶基因的高变异区域,对研究植物纤维素合酶基因的组织特异性或物种特异性可能有重要意义。本研究着重于研究纤维素合酶在苧麻植株上的表达模式和苧麻特有的纤维合成特点。通过克隆苧麻 *BnCesA1* 基因的 NHVR 序列,构建 pQE-N1-NHVR 原核表达载体,并正交优化了其在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达条件。

表 1 原核表达试验的正交设计及结果分析

Table 1 Orthogonal design and analysis of the result of the experiments of the prokaryotic expression

列号 Series	菌落 Colony		温度 (℃) Temperature	IPTG 浓度 (mmol/L) IPTG concentration	诱导时间 (h) Induce time	水平组合 Conditions combination	目标条带光密度 Optical density of target band
试验号	1	1	16	0. 01	4	A1B1C1D1	468. 93
	2	1	28	0. 1	6	A1B2C2D2	728. 453
	3	1	37	1	8	A1B3C3D3	594. 183
	4	2	16	0. 1	8	A2B1C2D3	1077. 7
	5	2	28	1	4	A2B2C3D1	568. 731
	6	2	37	0. 01	6	A2B3C1D2	596. 764
	7	3	16	1	6	A3B1C3D2	783. 297
	8	3	28	0. 01	8	A3B2C1D3	211. 697
	9	3	37	0. 1	4	A3B3C2D1	1721. 97
各因素同水平之和	T1	1791. 566	2329. 927	1277. 391	2759. 631		
	T2	2243. 195	1508. 881	3528. 123	2108. 514		
	T3	2716. 964	2912. 917	1946. 211	1883. 58		
各水平平均数	$\overline{x_1}$	597. 1887	776. 6423	425. 797	919. 877		
	$\overline{x_2}$	747. 7317	502. 9603	1176. 041	702. 838		
	$\overline{x_3}$	199. 0629	970. 9723	648. 737	627. 86		
最大平均数差值	R _{max}	548. 6688	922. 9723	750. 244	292. 017		

表中下划线_表示某个因素的最佳水平

In the table,underline marks the best level for one condition

大肠杆菌 BL21 是 lon 蛋白水解酶、ompT 外膜蛋白水解酶缺陷型,所以在该体系中表达的外源蛋白具有较好的稳定性。BL21 (DE3)则是在 BL21 菌株的基因组上整合一种携带有 *T7* RNA 聚合酶基因和 *lacI* 基因的 λ 噬菌体 DE3。 λ 噬菌体 DE3 在可被 IPTG 诱导的 *lac* UV5 启动子的控制下表达合成 *T7* RNA 聚合酶^[22],后者可以高水平转录含有 *T7* 启动子的质粒基因。本试验在对 pQE-N1-NHVR 重组表达载体表达条件优化时,挑选 3 个菌落作为正交设计的一个因素,发现菌落之间表达目标蛋白的能力差异较显著,R_{max} (A) 大于 R_{max} (D),表明其显著性甚至超过 IPTG 诱导时间对目标蛋白表达的影响程度,也就是说,在不同菌落同一诱导时间时目标蛋白表达量的差异比在不同诱导时间同一菌落时目标蛋白表达量的差异要更为显著。由此可以推出菌落合成目标蛋白的速率普遍较低,而且目标蛋白在不同菌落间的合成速率相差较大。而对含有高效 *T7* RNA 聚合酶的 BL21 (DE3) 菌株体系而言,由 *T7* RNA 聚合酶合成的 mRNA 能迅速达到相对于其体内 rRNA (翻译机器) 的饱满水平,目标蛋白的合成速率主要取决于此 mRNA 被翻译的速率^[23]。所以,

对试验结果一种可能解释是被转化有重组质粒的菌种的保存不同程度地在翻译水平影响了宿主菌表达目标蛋白的能力。因此有必要在进行大量表达前重新提取重组质粒,然后再次转化。

IPTG 的浓度对目标蛋白表达的影响也非常显著,其最优浓度为 0. 1 mmol/L,高浓度的 IPTG 反而不利于目标蛋白的表达^[24]。对比而言,IPTG 诱导的时间对目标蛋白的影响则并不那么显著,但是若时间过短,会使得目标蛋白来不及高效表达(图 3)。最佳的诱导时间为 4 h,要好于 8 h;与优化试验之前的推测相符——可能是外源蛋白的表达对宿主有毒性^[22,25],所以不随时间的延长而积累表达。最佳诱导温度是 37 ℃,温度通过对大肠杆菌的生产繁殖和目标蛋白表达的双重影响而影响目标蛋白的最终得率,因而温度的影响在 4 个因素中最为显著。

原核宿主细胞本身也有可能表达与目标蛋白分子量大小相近的蛋白质或多肽,为下一步提纯工作带来麻烦。本试验 3 个对照样品在 18 kD 附近也都检测到蛋白条带,表明 BL21 (DE3) 本身表达了与 NHVR 重组蛋白分子量大小相当的蛋白质或多肽。但是,除 8 号样品外,各试验组目标蛋白条带的光密

度 OD 值比对照组的都大。进一步 μ 检验试验组和对照组 2 个样本平均数的差异:8 号试验因总蛋白浓度太小而使得目的条带的光密度 OD 过小,不具有检验性,所以不被检验,得到 $\mu = 2.73 > 2.58$,即 $P(|\mu| > 2.73) < P(|\mu| > 2.58) = 0.01$,表明 2 个样本的平均数的差异达到极显著水平。这也进一步证实了虽然宿主菌本身也表达有相似分子量大小的蛋白质,但是试验组确实表达了目标蛋白。这提示了下一步目标蛋白提纯的方法选择。

参考文献

[1] Somerville C. Cellulose synthesis in higher plants[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2006,22:53-78

[2] Carpita N C. Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis:How plants make cellulose and other (1→4)- β -D-Glycans[J]. Plant Physiol,2011,155(1):171-184

[3] Endler A,Persson S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*[J]. Mol Plant,2011,4(2):199-211

[4] Crowell E F,Bischoff V,Desprez T,et al. Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell,2009,21(4):1141-1154

[5] Gutierrez R,Lindeboom J J,Paredes A R,et al. *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments[J]. Nat Cell Biol,2009,11(7):797-806

[6] Bringmann M,Li E,Sampathkumar A,et al. POM-POM2/cellulose synthase interacting1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell,2012,24(1):163-177

[7] Kimura S,Laosinchai W,Itoh T,et al. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in vascular plant *vigna angularis*[J]. Plant Cell,1999,11(11):2075-2086

[8] Delmer D P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study[J]. Annu Rev Plant Biol,1999,50:245-27

[9] Saxena I M,Brown R M Jr. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts[J]. Ann Bot,2005,96(1):9-12

[10] Guerriero G,Fugelstad J,Bulone V. What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? [J]. J Integr Plant Biol,2010,52(2):161-175

[11] Doblin M S,Kurek I,Jacob-Wilk D,et al. Cellulose biosynthesis

in plants;from genes to rosettes[J]. Plant Cell Physiol,2002,43(12):1407-1420

[12] Saxena I M,Brown R M Jr. Identification of a second cellulose synthase gene (*acsA II*) in *Acetobacter xylinum*[J]. J Bacteriol,1995,177(18):5276-5283

[13] Saxena I M,Lin F C,Brown R M J. Identification of a new gene in an operon for cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*[J]. Plant Mol Biol,1991,16(6):947-954

[14] Wong H C,Fear A L,Calhoon R D,et al. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1990,87(20):8130-8134

[15] Saxena I M,Brown R M J,Fevre M,et al. Multidomain architecture of β -glycosyl transferases; implications for mechanism of action[J]. J Bacteriol,1995,177(6):1419-1424

[16] Pear J R,Kawagoe Y,Scheckengost W E,et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(22):12637-12642

[17] Richmond T A,Somerville C R. The cellulose synthase superfamily[J]. Plant Physiol,2000,124(2):496-498

[18] 魏建华,宋艳茹. 植物纤维素合酶基因研究进展[J]. 植物学通报,2002,19(6):641-649

[19] 田志坚,易蓉,陈建荣,等. 苧麻纤维素合成酶基因 cDNA 的克隆及表达分析[J]. 作物学报,2008,34(1):76-83

[20] 蒋杰,揭雨成,周清明,等. 苧麻纤维素合酶基因 *BnCesA1* 全长 cDNA 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5):851-857

[21] Vergara C E,Carpita N C. β -D-Glycans synthases and the *CesA* gene family: lessons to be learned from the mixed-linkage (1→3),(1→4) β -Dglucan synthase[J]. Plant Mol Biol,2001,47(1-2):145-160

[22] Miroux B,Walker J E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*; mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels[J]. J Mol Biol,1996,260(3):289-298

[23] Studier F W,Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes[J]. J Mol Biol,1986,189(1):113-130

[24] Patnaik P R. Investigation of induction effect on the steady state performance of a continuous fermentation for recombinant β - galactosidase[J]. Process Biochem,2001,11(36):1069-1074

[25] Studier F W,Rosenberg A H,Dunn J J,et al. Use of T7RNA polymerase to direct expression of cloned genes[J]. Methods Enzym,1990,185:60-89