

GABA_A 受体蛋白片段在大肠杆菌细胞表达条件研究*

肖亚中¹ 杭俊² 薛红³

(安徽大学生命科学学院 合肥 230039)¹ (中国科技大学生命科学院 合肥 230026)²
(香港科技大学生化系 香港清水湾)³

摘要: 为了提高 GABA_A 受体 α₁ 蛋白片段在大肠杆菌中表达量, 研究了重组菌的发酵条件, 包括培养基、接种量、温度、摇床转速、pH、诱导培养时间和诱导剂 IPTG 使用浓度等对 GABA_A 受体蛋白片段表达的影响。结果表明重组菌以 LB 培养基为发酵基质, 按 3% 接种量, 37℃ 培养细胞 3.5h 后 IPTG 32℃ 诱导 5h, 菌体生物量为 3.25g/L, 目标蛋白表达量达 95mg/L。用 16L 发酵罐进行放大培养, 菌体生物量达 4.95g/L, 发酵周期 5.5h, 最高目标蛋白表达量达到 136mg/L。

关键词: GABA_A 受体蛋白, 大肠杆菌, 表达条件

中图分类号: TQ92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0068-04

STUDIES ON THE EXPRESSION CONDITION OF SEGMENT OF GABA_A RECEPTOR α₁ SUBUNIT IN *E. COLI*

XIAO Ya-Zhong¹ HANG Jun² XUE Hong³

(School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039)¹

(School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)²

(Department of Biochemistry, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Hong Kong)³

Abstract: In order to improve the expression level of segment of GABA_A receptor α₁ subunit in *E. coli*, growth conditions of the recombatant, which influence the final yield of protein expression, including growth medium, inoculation ratio, temperature, pH, rotation speed, inducing time and concentration of IPTG and so on, were studied in shaking flasks. The results indicated that, with 3% inoculation ratio, cultured 3.5 hours at 37℃, and then induced 5 hours by IPTG at 32℃, the yield of GABA_A receptor protein was 95mg/L and the biomass was 3.25 g/L. In contrast, using a 16 L stirred fermentor instead of shaking flasks, the highest level of the protein expression, 136mg/L with 4.95g/L of biomass, was achieved after fermenting 5.5 hours.

Key word: GABA_A Receptor protein, *E. coli*, Expression condition

A 型 gamma-氨基丁酸 (简称 GABA_A, 下同) 受体属于配体门控离子通道受体超家族, 是许多重要神经活性药物作用的靶位点^[1-2], 在神经中枢信号传递、膜受体作用机理和神经活性药物筛选等方面有重要研究价值。近年来, 对 GABA_A 受体蛋白和基因的分子生物学有了较深入了解, 有许多不同来源的 GABA_A 受体蛋白基因被克隆, 部分基因片段已在爪蟾细胞进行异源表达^[3-5], 但表达量不能满足制备需要, 严重影响了对其结构和功能的研究。

为了克服真核细胞外源表达 GABA_A 受体蛋白周期长、产量低的缺陷, 我们将编码

* 香港政府工业署资助项目 (ISF grant AF/140/96)

收稿日期: 2001-05-11, 修回日期: 2001-09-04

GABA_A受体蛋白 α_1 亚基的基因片段 Cys¹⁶⁶-Leu²⁹⁶ 克隆至大肠杆菌表达载体 pTrcHisB, 构建重组表达菌株, 并在大肠杆菌实现非融合重组表达^[6-7]。本文报道为获取较高蛋白表达量而进行的重组菌发酵条件研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 重组菌株: *E. coli* NovaBlue /pTrcGABA166-296。

1.1.2 培养基: LB 和 2×YT 按文献[8]配制, 发酵时加入氨苄青霉素至终浓度 100 μ g/L。

1.1.3 主要试剂: 标准分子量蛋白, IPTG, 溶菌酶和其它试剂购自于 Sigma, Merck 或 GIBCO BRL 等公司。

1.2 方法

培养条件研究按单因子顺序进行, 每项优化结果用于后续实验, 各项实验至少重复3次, 取其平均值。

1.1.1 种子培养: 从重组菌单菌落挑取一环, 接种于加有氨苄青霉素抗性的 100mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 250r/min 振荡培养过夜, 培养物用于培养条件研究。

1.1.2 GABA_A受体 α_1 亚基蛋白在大肠杆菌中表达: 摇瓶实验采用 1000mL 三角瓶, 根据需要装入适量培养液, 重组菌接种后振荡培养 3.5h ($OD_{600} \approx 1.0$), 加入 IPTG 诱导一定时间, 收获培养物用于目标蛋白制备。优化发酵条件放大实验在 16L 全自动发酵罐中进行 (BIOSTAT E, B. Braun Diessel Biotech), 发酵装液 10L。

1.1.3 细胞生物量测定: 湿重法 (g/L)。

1.1.4 表达蛋白的分离纯化及鉴定: 表达蛋白的分离纯化按文献 [9], 重折叠蛋白分析鉴定通过 N-末端序列分析和 SDS-PAGE 电泳法进行。

1.1.5 蛋白含量测定: Lowry 法, 以每升发酵液所得 SDS-PAGE 均一蛋白计算 (mg/L)。

2 结果

2.1 摇瓶发酵条件

2.1.1 培养基对重组菌生长和 GABA_A受体 α_1 亚基蛋白表达的影响: 实验使用了 4 种不同发酵培养基, 即 LB, LB+0.5%甘油, LB+1.0%甘油和 2×YT, 分别对表达蛋白进行分离制备, 结果表明使用 LB 培养液在加入 IPTG 诱导培养 4h 获得的蛋白表达量最高, 另 3 种培养基虽然能获得较高的生物量, 但 GABA_A受体 α_1 亚基蛋白表达量并没有明显提高。图 1 是从 LB 培养菌制备的目标蛋白 SDS-PAGE 图。

2.1.2 pH 对 GABA_A受体 α_1 亚基蛋白表达的影响: 将 LB 培养液的 pH 分别调至 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 8.5, 接种重组菌进行发酵和诱导培养, 结果在 pH7.0 时蛋白表达量最高。pH 在 6.0 和 6.5 时菌体生物量较高, 但蛋白质表达量却降低。当培养液 pH 大于 7.0 时, 菌体生物量和蛋白表达量均有所下降。

2.1.3 培养和 IPTG 诱导温度对重组菌生长和蛋白表达的影响: 将重组菌接种于 LB 培

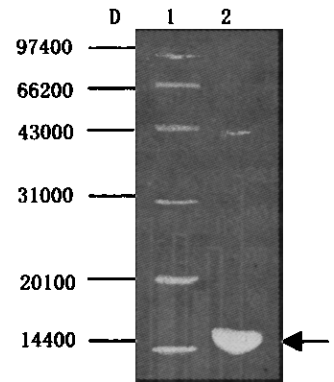


图 1 重组菌表达的目标蛋白 SDS-PAGE 图谱
1 标准分子量蛋白, 2 目标蛋白

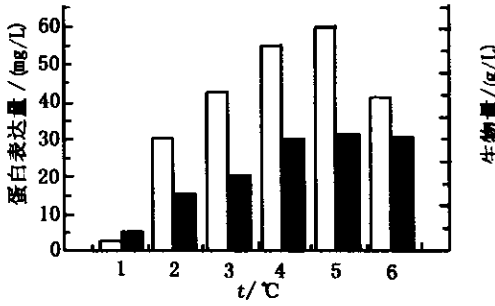


图2 不同培养温度对重组菌生长及目标蛋白量的影响
(□目标蛋白 ■生物量)

1 24℃, 2 28℃, 3 32℃, 4 37℃, 5 37℃/32℃, 6 37℃/28℃

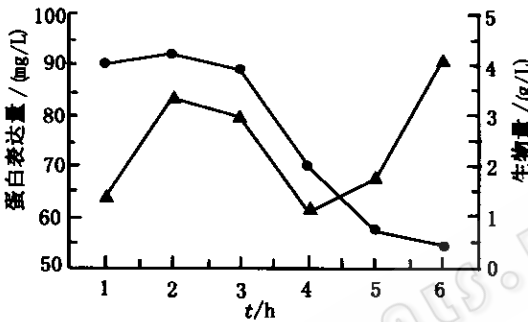


图3 IPTG 诱导时间对重组菌生长及目标蛋白表达量的影响

▲ 生物量, ● 目标蛋白

1 4h, 2 6h, 3 8h, 4 10h, 5 12h, 6 24h

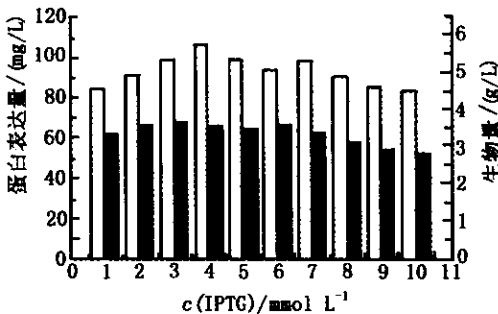


图4 不同 IPTG 浓度对重组菌生长及目标蛋白表达量的影响

□目标蛋白, ■生物量

1 0.1, 2 0.2, 3 0.4, 4 0.5, 5 0.8, 6 1.0, 7 1.2, 8 1.4, 9 1.6, 10 1.8

养液, 分别在 24℃, 28℃, 32℃, 37℃ 进行连续培养诱导和 37℃ 培养 28℃ 诱导, 37℃ 培养 32℃ 诱导, 进行蛋白表达研究, 结果显示温度对 GABA_A 受体 α₁ 亚基蛋白表达量有显著影响 (图 2)。较低培养温度时重组菌生长缓慢, 不利于获得目标蛋白。采用 37℃ 培养 3.5h 后, 改用 32℃ IPTG 诱导 4h, 能获得较高蛋白表达量。

2.1.4 接种量对重组菌生长和蛋白表达的影响: 分别采用 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7% 和 10% 的接种量接种发酵摇瓶, 进行摇瓶培养实验。结果表明摇瓶接种量对重组菌生长和 GABA_A 受体 α₁ 亚基蛋白表达量影响不显著, 以选择 3% 接种量为宜。

2.1.5 装液量和转速对重组菌生长和蛋白表达的影响: 分别采用 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 和 70% 摇瓶装液量, 接种重组菌进行摇瓶培养。当装液量为 30% 时, 可获得较高的菌体生物量和目标蛋白表达量。设置 100r/min, 150r/min, 200r/min, 250r/min, 300r/min 和 350r/min 的摇瓶转速进行实验, 结果显示: 转速越高, 获得的菌体生物量和目标蛋白量越高。

2.1.6 IPTG 诱导培养时间和使用浓度对重组菌生长和蛋白表达的影响: IPTG 是重组菌表达目标蛋白的诱导剂, 在重组菌接种摇瓶振荡培养 3.5h 后, 加入 IPTG, 降低培养温度至 32℃, 分别诱导 4, 6, 8, 10, 12 和 24h。收获细胞进行蛋白分析, 测试结果表明, 诱导培养 6h 可获得较高的目标蛋白质表达量 (图 3)。试验了使用不同浓度 IPTG 对重组菌表达目标蛋白的影响, 图 4 显示 0.4mmol/L 的 IPTG 能获得最佳诱导效果, 在优化条件下, 摇瓶发酵培养可以

获得 95mg/L 的 GABA_A 受体 α₁ 亚基蛋白表达。

2.2 发酵罐放大培养条件

将上述摇瓶优化的重组菌表达 GABA_A 受体 α_1 亚基蛋白条件应用于发酵罐放大实验。发酵罐体积 16L, 实验装液 10L, 接种量 3%, 转速 300r/min。接种后 37℃ 培养 1.5h 改用 32℃ IPTG 诱导, 同时记录溶解 O₂ 和发酵液 pH。定时取样, 进行菌体生物量和表达蛋白分析测试, 重组菌生长及表达 GABA_A 受体 α_1 亚基蛋白动态如图 5。与摇瓶发酵不同, 重组菌在发酵罐中的延滞期缩短, 生长速率明显提高, 在接种后 1.5h 生物量即达 2.5g/L, 诱导培养 4h 时生物量为 4.95g/L, 继续诱导培养 4h, 溶菌作用加强, 生物量递减明显。与此同时, 发酵液 pH 值逐步升高, 溶解 O₂ 显著增加。重组菌表达 GABA_A 受体 α_1 亚基蛋白量与其生长成正相关, 在最大生物量时可获得最高蛋白表达量, 达到 136mg/L, 是摇瓶初始表达量的 2.4 倍, 且整个发酵周期 5.5h, 比摇瓶发酵缩短 3~3.5h。

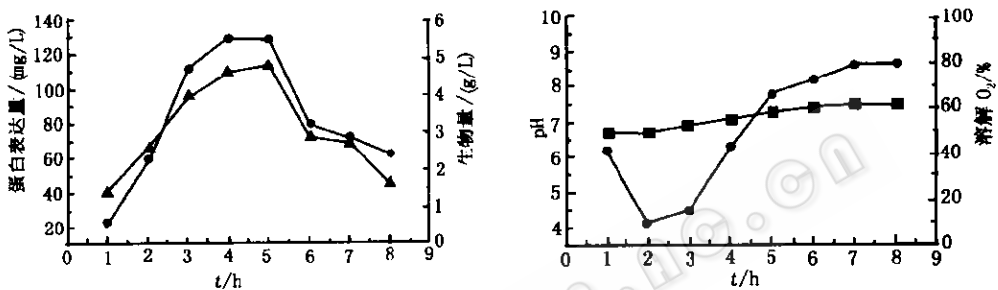


图 5 重组菌在发酵罐中生长和蛋白表达曲线

● 目标蛋白, ▲ 生物量, ■ pH, ◆ O₂

3 讨论

应用重组 DNA 技术将外源基因转入适当宿主细胞进行异源高效表达, 是制备稀有蛋白和肽类物质的有效方法。但由于不同生物间 (如真核和原核) 在基因结构和表达调控等方面存在较大差异性, 致使某些克隆基因在异源表达时存在较大差异, 有时很难获得满意结果。克隆化基因在宿主细胞中表达量受多种因素影响, 如启动子启动强度、DNA 转录起始序列、密码子使用习惯、mRNA 分子二级结构、表达质粒拷贝数和稳定性, 以及宿主细胞的生理生化状态等。本文研究了培养和诱导条件对重组菌 *E. coli* NovaBlue /pTrcGABA166-296 菌株生长和表达 GABA_A 受体 α_1 亚基片段蛋白的影响, 研究表明, 通过优化培养和诱导条件可以有效提高重组菌对目标蛋白表达量。在实验范围内, 目标蛋白表达量依赖于重组菌生物量的提高, 摇瓶条件下溶解 O₂ 是提高细胞生物量的主要限制因素, 采用不连续培养和诱导温度有利于提高单位生物量目标蛋白的表达效率。实验结果预示, 采用高密度发酵培养有可能进一步提高目标蛋白表达量。

参考文献

- [1] Smith G B, Olsen R W. Trends Pharmacol Sci, 1995, 16: 162~168.
- [2] Sieghart W. Pharmacol Rev, 1995, 47: 181~234.
- [3] Hadingham K L, Harkness P C, Mckernan R M, et al. Proc Natul Acad Sci USA, 1992, 89: 6378~6382.
- [4] Pritchett D B, Luddens H, Seeburg P H. Science, 1989, 245: 1389~1392.
- [5] Carter D B, Thomsen D R, Im W B, et al. Bio/Technology, 1992, 10: 679~681.
- [6] Xue H, Chu R, Hang J, et al. Protein Sci, 1998, 7: 216~219.
- [7] Xue H, Hang J, Chu R, et al. J Mol Biol, 1999, 285: 55~61.
- [8] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989.
- [9] Hang J, Shi H, Li D, et al. J Biol Chem, 2000, 275: 18818~18823.