

# 烟粉虱内共生菌 *groEL* 基因的原核表达条件研究\*

谭周进<sup>1</sup> 谢丙炎<sup>2\*\*</sup> 肖启明<sup>3</sup> 杨宇红<sup>2</sup> 冯兰香<sup>2</sup>

(湖南农业大学食品科技学院 长沙 410128)<sup>1</sup>

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)<sup>2</sup>

(湖南农业大学生物安全科技学院 长沙 410128)<sup>3</sup>

**摘要:** 为了获得较多的 GroEL 蛋白, 深入研究其性质, 对烟粉虱内共生菌 *groEL* 基因表达的条件进行了研究。结果表明: 诱导 *groEL* 基因原核表达的最佳 IPTG 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ ; 在 35 $^{\circ}\text{C}$  诱导培养, 能够获得较高的蛋白表达量; 最佳诱导培养时间为 4 ~ 5h; 最佳诱导培养的初始 pH 值为 8.0; 在振荡转速为 120r/min、诱导培养时间为 4 ~ 5h 时, 增大接种量, 有利于原核基因的表达; 添加少量的  $\text{NH}_4^+$  有利于提高 *groEL* 基因原核表达的量, 但  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  则抑制 *groEL* 基因的原核表达, 其中  $\text{Fe}^{3+}$  抑制作用最为强烈;  $\text{NH}_4^+$  含量过高也不利于 *groEL* 基因原核表达; 在培养基中添加少量的葡萄糖, 能够提高 *groEL* 基因原核表达, 但葡萄糖含量较高时不利于 *groEL* 基因原核表达。

**关键词:** 烟粉虱, 内共生菌, *groEL*, 原核表达, 理化因素

**中图分类号:** Q93-936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0057-05

## Studies on the Prokaryotic Expression Conditions of *groEL* from Endosymbionts in *Bemisia tabaci*\*

TAN Zhou-Jin<sup>1</sup> XIE Bing-Yan<sup>2\*\*</sup> XIAO Qi-Ming<sup>3</sup> YANG Yu-Hong<sup>2</sup> FENG Lan-Xiang<sup>2</sup>

(Hunan Agricultural University, Changsha 410128)<sup>1</sup>

(Institute of Vegetable and Flower, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)<sup>2</sup>

(College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)<sup>3</sup>

**Abstract:** The study on prokaryotic expression conditions of *groEL* from endosymbiont in *B. tabaci* was conducted. The results showed that: The optimal IPTG content for inducing prokaryotic expression of *groEL* was 100  $\mu\text{mol/L}$ . When it was induced by IPTG at 35 $^{\circ}\text{C}$ , higher GroEL product would be acquired. The optimal induced culturing time for prokaryotic expression of *groEL* was 4 ~ 5 hours. Higher inoculated quantity would benefit prokaryotic expression of *groEL*. A little  $\text{NH}_4^+$  content would improved prokaryotic expression of *groEL*, but prokaryotic expression of *groEL* would be inhibit by  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{K}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . When low content glucose was added to the LB medium, it would benefit prokaryotic expression of *groEL*. Prokaryotic expression of *groEL* would be inhibit by high content glucose.

**Key words:** *Bemisia tabaci*, Endosymbiont, *groEL*, Prokaryotic expression, Physical and chemical factor

基因工程已经开始与医药生产、疾病的治疗等有了紧密结合。如何实现外源基因在原核细胞或真核细胞中的表达是 DNA 重组技术的关键性环节<sup>[1]</sup>。外源基因在 *E. coli* 中表达水平受多种因素影响, 包括基因内部因素与外界理化因素<sup>[2]</sup>。启动子强度和载体性质<sup>[3,4]</sup>、基因的高级结构及载体菌对密码子的适应性等基因内部因素, 以及菌株类

\* 国家重点基础研究发展规划项目 (No. 2002CB111400)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-62146130, E-mail: xieby@mail.caas.net.cn

收稿日期: 2004-10-07, 修回日期: 2004-12-01

型、培养基类型与浓度、诱导温度、诱导时间等外部因素,都在一定程度上影响着外源基因的原核表达水平。相对来说,外部因素的影响比基因内部因素显得更不稳定,影响不同外源基因在同一载体、表达菌株中的表达因素不同。一般来说,营养成分丰富的培养液,易于细菌的生长和表达<sup>[5]</sup>。体外翻译系统中,理想的条件是含有适量的  $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $NH_4^{+}$ 、较高浓度  $Ca^{2+}$  和多胺类,充足的 ATP 和 GTP,这样可以显著降低蛋白质合成的错读<sup>[6]</sup>。培养过程中的氧化还原电位对工程菌表达目标蛋白的量以及表达产物的活性等都有影响<sup>[7,8]</sup>。我们将 *groEL* 基因克隆到了一个特定载体,在大肠杆菌 JM109 菌株中得到了表达<sup>[9]</sup>,本文报道原核表达理化影响因素的优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

表达菌株的构建与筛选见参考文献 [9],含目的片段质粒的菌株命名为 PinXaGROEL 菌株,含对照片段质粒的菌株命名为 PinXacontrol 菌株。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株的活化和菌浓度的检测:** LB 培养基用蒸馏水配制, pH 7.0, 6 层纱布过滤,分装在 150 mL 三角瓶中,封口膜包扎,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min, 冷却后,加入 100  $\mu$ g/mL Amp 或 2  $\mu$ mol/L 生物素。将 PinXaGROEL 菌株与 PinXacontrol 菌株在含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养基平板上的新鲜菌落分别接种在加有 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养液中, 37℃ 200 r/min 振荡培养过夜 (14 ~ 15 h)。用 LB 培养液做空白对照, 取诱导培养完后的菌悬液用 LB 培养液适当稀释后, 在 600 nm 波长下进行比色, 读取 OD 值。

**1.2.2 原核表达产物的检测:** 取 150  $\mu$ L 菌悬液 13,000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 沉淀用  $1 \times$  上样缓冲液重新悬浮, 95℃ 水浴 5 min, 瞬时离心。采用 8% SDS-PAGE、考马斯亮兰 R-250 染色、脱色, 用 SynGene GeneGenius 系统通过全自动光密度扫描分析和计算目标融合蛋白的表达量, 换算成 OD 菌体中目标蛋白的量, 即: 表达量 = 目标蛋白相对含量/菌体量 (OD)。以 PinXacontrol 菌株做为对照。

**1.2.3 各种因素对 *groEL* 质粒表达的影响:** 将菌株活化后, 按 1% 接种量在分别含 2  $\mu$ mol/L 生物素和 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养液中 200 r/min 震荡培养 2 h 后, 分别加入 0  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L、400  $\mu$ mol/L、800  $\mu$ mol/L IPTG, 诱导培养 5 h, 检测 IPTG 浓度对 *groEL* 原核表达的影响; 加入 100  $\mu$ mol/L IPTG 分别诱导培养 2 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h, 检测 *groEL* 原核表达的动态; 按 0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10% 接种量检测接种量对 *groEL* 原核表达的影响; 用 HCl 或 NaOH 调节成 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 等 7 个初始 pH 值检测其对 *groEL* 原核表达的影响; 阳离子对 *groEL* 原核表达的影响使用  $MgCl_2$ 、KCl、 $NH_4Cl$ 、 $CaCl_2$  和  $FeCl_3$ , 终浓度为 0.01%, 以加无菌蒸馏水做对照;  $NH_4^{+}$  浓度对 *groEL* 原核表达的影响设 0、0.01%、0.02%、0.04%、0.05%、0.1%、0.2% 等  $NH_4Cl$  浓度梯度; 葡萄糖浓度对 *groEL* 原核表达的影响设 0、0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6% 等浓度梯度; 设 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃ 等诱导培养温度检测温度对 *groEL* 原核表达的影响。150 mL 三角瓶装液量为 20 mL, 设 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 IPTG 浓度对 *groEL* 原核表达的影响

由图 1 可以看出, 诱导 *groEL* 原核表达的最佳 IPTG 浓度为  $100\mu\text{mol/L}$ 。并且, 在不加 IPTG 进行诱导的情况下, *groEL* 重组菌株也能够进行低量表达。

### 2.2 *groEL* 原核表达的动态

由图 2 可知, 加入 IPTG 诱导培养 4 ~ 5h, 融合蛋白的产生最高。由图 3 可知, 重组菌株进行高量表达时正处于对数生长盛期, 并非生长后期。微生物合成次级代谢产物不在生长期, 而在对数生长期后 (稳定期) 进行<sup>[10]</sup>。次级代谢作用的重要特征是产物的生成只有在生产菌处于低的生长速率时才进行。并且其合成只受生长速率影响, 而与营养限制因素无关。可以认为次级代谢是一个以初级代谢产物为前体, 合成一些对微生物的生命活动没有明确功能的物质的过程<sup>[11]</sup>。可见, 重组菌株表达 GroEL 蛋白时是作为一种初级代谢产物进行合成, 并非作为次级代谢产物进行合成。

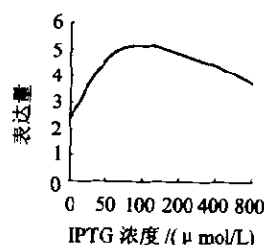


图 1 IPTG 浓度对 *groEL* 原核表达的影响

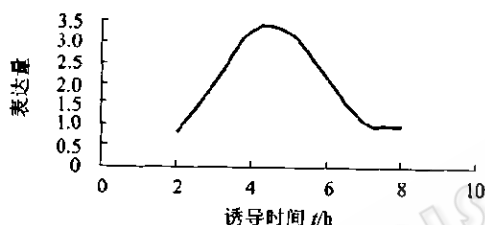


图 2 *groEL* 原核表达的动态

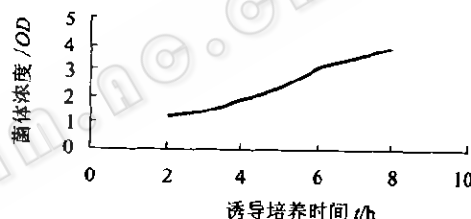


图 3 菌株生长动态

### 2.3 接种量对 *groEL* 原核表达的影响

在保证菌的生产力保持在最佳状态和具备适当的生产条件的前提下, 菌量越多, 代谢产物的产量也越大。由图 4 可以看出: 增加接种量可以提高 *groEL* 基因的原核表达量。有报道<sup>[12]</sup>, 种子菌量少, 发酵后工程菌总数偏低, 如种子菌液量偏高, 则发酵培养液中能源与氧气均不能充分满足大量增殖的工程菌生长的需求, 会影响细胞的代谢及重组质粒的稳定, 不利于表达。但本研究中的结果说明: 在较高的振荡速度条件下, 可以满足工程菌株大量快速生长对氧气的需要, 由于培养基营养成分比较丰富, 菌株进行高量表达时, 刚进入对数生长盛期, 营养物质还很丰富, 代谢废物未大量积累, 可以满足大量菌在短时间内旺盛生长代谢的要求。

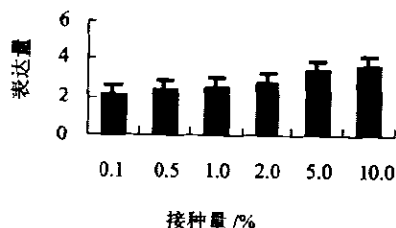


图 4 接种量对 *groEL* 基因原核表达的影响

### 2.4 初始 pH 值对 *groEL* 原核表达的影响

由图 5 可知, 在初始 pH 值为 8.0 时, *groEL* 的原核表达量最高, 在偏酸初始 pH 值条件下, *groEL* 基因的原核表达量都比较低。这是由于大肠杆菌的最适生长 pH 值为 7.2 左右, 当培养基初始 pH 为 8.0 时, 经过高温灭菌后, pH 值有所下降, 接近生长最

适 pH 值。大肠杆菌在生长的过程中会导致培养基 pH 值的改变, 这些改变势必会影响基因的原核表达, 因此找到其最适过程 pH 值将有利于基因的原核表达。

2.5 阳离子对 *groEL* 原核表达的影响

由图 6 可知,  $\text{NH}_4^+$  能够提高 *groEL* 的原核表达量, 说明增加培养基的含氮量有利于蛋白质的表达。这是由于在培养基中加入少量的  $\text{NH}_4^+$  后, 有利于工程菌株优先利用而生长, 并且, 由于表达产物是蛋白质, 培养基中适当的高 C/N 将有利于蛋白质的合成。而  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  则抑制 *groEL* 的原核表达, 以  $\text{Fe}^{3+}$  抑制作用最为强烈, 这与这些离子对酶活性的影响以及基因表达的调控有关, 其具体原因有待进一步研究。

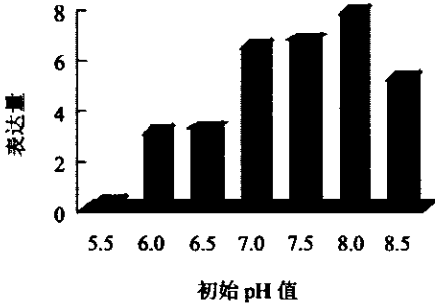


图 5 初始 pH 对 *groEL* 基因原核表达的影响

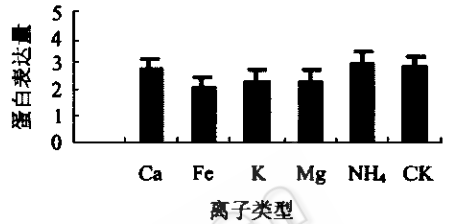


图 6 几种离子对 *groEL* 基因原核表达的影响

2.6  $\text{NH}_4^+$  浓度对 *groEL* 原核表达的影响

由图 6 与图 7 可知, 在培养基中加入少量的  $\text{NH}_4^+$  能够满足工程菌株早期生长对氮源的需要, 但培养基中加入的  $\text{NH}_4^+$  量较高时, 反而会抑制 *groEL* 基因的原核表达, 并且随着  $\text{NH}_4^+$  浓度的增高, 其抑制作用更强。可见, 虽然蛋白质的合成需要氮, 但是只有当培养基中的其它成分协调存在时, 才能获得较高的表达产物。过高浓度  $\text{NH}_4^+$  对基因原核表达的影响原因还有待进一步研究。

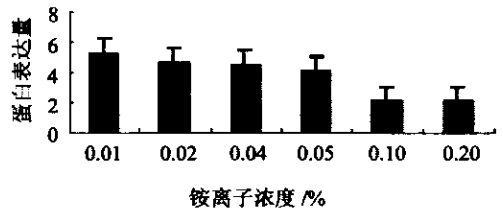


图 7 铵离子浓度对 *groEL* 基因原核表达的影响

2.7 葡萄糖对 *groEL* 原核表达的影响

葡萄糖作为一种易被利用的碳源, 会促进菌的生长, 使表达产物降低。由图 8 可知, 在 LB 培养基中添加少量葡萄糖, 有利于 *groEL* 基因的原核表达, 但是添加葡萄糖的量较多时, 反而不利于 *groEL* 基因的原核表达。这可能是因为少量的葡萄糖为菌株生长提供了充足的能量, 但是当葡萄糖用量过高时, 使培养基中 C/N 提高, 不利于含氮物质的合成。同时, 过高的葡萄糖含量会对载体中的某些启动子造成遏制, 影响基因的表达。

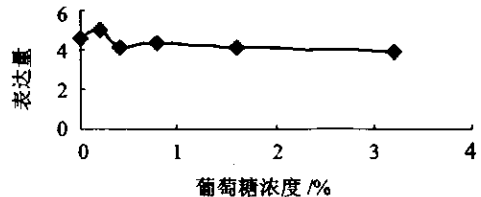


图 8 葡萄糖浓度对 *groEL* 基因原核表达的影响

## 2.8 温度对 *groEL* 原核表达的影响

温度对微生物生长的影响,是综合影响各种代谢反应的结果,但就某物质代谢来说,其菌体生长的最适温度不一定是某物质合成的最适温度<sup>[11]</sup>。由图 9 可知,在所设温度范围下, *groEL* 基因原核表达的最佳温度为 35℃,与大肠杆菌生长的最适温度相一致。

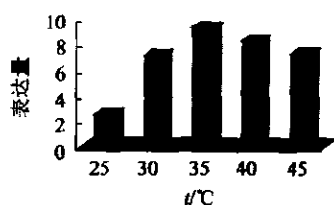


图 9 温度对 *groEL* 基因原核表达的影响

## 3 小结与讨论

本研究的结果表明:培养基中的碳源浓度、 $\text{NH}_4^+$  浓度、金属离子、pH、温度等都会影响 *groEL* 的原核表达。这说明基因工程和细胞工程可提供具有医药等意义的优良遗传性状,发酵工程可以使优良遗传性状得到高效表达。工业化生产中, IPTG 用量很大,成本很高,本研究中所构建的 *groEL* 原核表达系统能够在无 IPTG 诱导的情况下进行表达,这对工业化生产获得大量的产物提供了有利条件,关于无 IPTG 诱导的生产条件及相关高效表达载体的构建还有待于进一步研究。综上所述,培养基中添加一定量的葡萄糖和  $\text{NH}_4^+$  将有利于基因表达,但添加量过高不利于基因的表达。在保障氧气的前提下,增加接种量,有利于获得较多的表达产物。但是,生产中,种子菌的生产是较为苛刻的,过大的接种量将不利于生产成本的降低。培养基中的离子会对原核表达产生抑制,好的水源、水质将为获得高量的产物提供前提条件。原核表达受培养基中 pH 的影响,并且发酵过程 pH 的恒定,对发酵水平的提高具有相当重要的意义。研究最佳发酵过程 pH 及其控制方法,对获得高量的表达产物将有较高的价值。如何进一步优化组合各个因素,获得高效表达产物的发酵条件,还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 吴加金,李伍举,王嘉玺. 生物工程学报, 1996, 12 (增): 92~96.
- [2] 隋广超,胡美浩. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21 (2): 128~132.
- [3] Yoshida Y, Hamada H. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 230 (2): 426~30.
- [4] Chao Y P, Chiang C J, Hung W B. Biotechnol Prog, 2002, 18 (2): 394~400.
- [5] Harder M P F, Sanders E A, Wingender E, et al. J Biotechnol, 1994, 32: 157~164.
- [6] Jelenc P C, Kurland C. Proc Natl Acad Sci, USA, 1979, 76: 3174~3178.
- [7] Kallio P T, Kim D J, Tsai P S, et al. Eur J biochem, 1994, 219: 201~208.
- [8] Kaur R, Pathania R, Sharma V, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (1): 152~160.
- [9] 谭周进,谢丙炎,肖启明,等. 植物病理学报, 2004, 34 (4): 314~318.
- [10] 储炬,李友荣. 现代工业发酵调控学. 北京: 化学工业出版社, 2002. 1, 165.
- [11] 李季伦,张伟心,杨启瑞,等. 微生物生理学. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 12.
- [12] 钱民章. 遵义医学院学报, 1994, 1: 1~3.