

## 研究报告

分子伴侣共表达对嗜热环糊精葡萄糖基转移酶异源  
可溶性表达的影响郭永华<sup>1</sup> 陈济琛<sup>2</sup> 贾宪波<sup>1,2</sup> 林新坚<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建农林大学生命科学学院 福建 福州 350002)

(2. 福建省农业科学院土壤肥料研究所 福建 福州 350003)

**摘要:**【目的】通过优化表达条件,提高嗜热环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)的可溶性表达和胞外酶活性。【方法】构建含 *cgt* 基因的重组表达质粒 pET-28a(+)-ompA-*cgt*, 筛选最适诱导温度,并构建 5 种分子伴侣共表达系统(pKJE8、pKJE7、pGro7、pTf16 和 pG-Tf2, 5 种分子伴侣质粒分别与重组表达质粒 pET-28a(+)-ompA-*cgt* 共表达),筛选最适分子伴侣质粒,优化共表达条件。【结果】通过 SDS-PAGE 分析和测定胞外酶活, CGTase 基因在大肠杆菌中实现表达,且具有一定量的重组 CGTase 分泌至胞外; 25 °C 诱导时 CGTase 的可溶性表达和在胞外上清中的酶活都最高;分子伴侣质粒 pKJE8 使酶的胞外活性提高了 48.6%,效果最为显著;当 L-阿拉伯糖浓度为 0.5 g/L 时,分子伴侣质粒 pKJE8 使酶的胞外活性提高了 68.5%。【结论】通过优化表达条件及使用分子伴侣共表达系统提高了环糊精葡萄糖基转移酶的可溶性表达和胞外酶活,为该酶进一步相关研究奠定了基础。

**关键词:** 嗜热环糊精葡萄糖基转移酶, 可溶性表达, 分子伴侣, 共表达系统

Effects of chaperone co-expression on heterologous solubility  
expression of thermophilic cyclodextrin glucosyltransferaseGUO Yong-Hua<sup>1</sup> CHEN Ji-Chen<sup>2</sup> JIA Xian-Bo<sup>1,2</sup> LIN Xin-Jian<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** [Objective] To improve the soluble expression level and enzyme activity of CGTase in prokaryotic expression system, the expression conditions were optimized. [Methods] The *cgt* gene was cloned from *Geobacillus* sp. B1 and cloned into expression vector pET-28a(+). The optimum induction temperature was selected by enzyme activity assay and SDS-PAGE. The molecular chaperone co-expression system was constructed and the optimum molecular chaperone vector was screened. [Results] The results was described as follows: the *cgt* gene was amplified and cloned into vector

**Foundation item:** The Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (No. 201303094-05); Social Research in the Public Interest of Fujian Finance (No. 2060302)

\*Corresponding author: E-mail: xinjianlin@163.net

**Received:** June 11, 2015; **Accepted:** September 18, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 28, 2015

**基金项目:** 国家公益性农业科研专项项目(No. 201303094-05); 福建财政社会公益研究项目(No. 2060302)

\*通讯作者: E-mail: xinjianlin@163.net

**收稿日期:** 2015-06-11; **接受日期:** 2015-09-18; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-28

pET-28a(+) successfully, the enzyme activity and soluble expression level of CGTase was highest when induced at 25 °C; in the molecular chaperone co-expression system, the five vectors containing different molecular chaperones (pKJE8, pKJE7, pGro7, pTf16 and pG-Tf2) improved and the enzyme activity and soluble expression level of CGTase in varying degrees when co-expression with recombinant plasmid pET-28a(+)-ompA-*cgt*, and pKJE8 was confirmed to contain the optimum molecular chaperones combination and the enzyme activity of CGTase improved 48.6%. When L-Arabinose concentration of 0.5 g/L, molecular chaperone plasmid pKJE8 made extracellular enzyme activity increased 68.5%. **[Conclusion]** These results can provide a potential value for further studies of CGTase.

**Keywords:** Thermophilic cyclodextrin glucosyltransferase, Soluble expression, Molecular chaperone, Co-expression system

环糊精(CDs)被广泛应用于环保、医药、化学、食品等领域<sup>[1-2]</sup>, 具有重要的工业应用价值。它有 3 种主要的类型, 分别由 6、7、8 个葡萄糖通过  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成的  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD 组成, 内疏水外亲水的筒形结构, 主要由环糊精葡萄糖基转移酶(EC2.4.1.19; Cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)通过催化分子内的转糖基反应将淀粉和相关基质转化成而来<sup>[3]</sup>。CGTase 是微生物产生的一种多功能胞外酶、糖基水解酶  $\alpha$ -淀粉酶家族(家族 13)的重要成员, 其特别功能是催化分子内的转糖基反应生成相应的产物。近年来, 由于环糊精葡萄糖基转移酶具有较大的应用前景, 引起了广泛而深入的研究, 主要通过原核表达系统生产得到具有商业应用价值的酶制品<sup>[4]</sup>。然而, 运用这一原核表达系统时发现一些问题, 如在大肠杆菌中表达的大部分异源蛋白经常不能正确折叠形成天然构型, 易聚集形成没有活性的包涵体, 为后续研究和生产应用带来诸多不便<sup>[5-6]</sup>。大量的研究试图减少重组大肠杆菌中包涵体的形成, 结果发现分子伴侣和折叠酶作为共表达的折叠辅助蛋白, 可以在一定程度上增加异源蛋白的可溶性表达<sup>[7]</sup>。

研究表明 CGTase 在重组大肠杆菌中的表达也主要以包涵体形式存在<sup>[8]</sup>, 复性费时费力, 不适合工业化的生产应用。Jin 等<sup>[9]</sup>通过优化 pH 和添加剂在一定程度上提高了 CGTase 的可溶性表达。Wu 等<sup>[10]</sup>构建了来源于 *Paenibacillus macerans* JFB05-01 的  $\alpha$ -CGTase 基因的分泌型表达载体

pET-20b(+)/*cgt*, 发酵 90 h 后胞外酶活可达 22.5 U/mL; 张海军等<sup>[11]</sup>在原核表达体系中加入 HG-PGR07 分子伴侣质粒与重组质粒 pET-32-*pfu* 共表达, 使 HG-PGR07 表达的分子伴侣蛋白能够有效促进 *Pfu* 酶的可溶性表达和酶活性提高。万娟等<sup>[12]</sup>的研究表明, pET-28a-med-ORF8 与分子伴侣质粒 pTf16 共表达后, 有效减少了包涵体的形成, 提高了可溶性表达量。然而, 与分子伴侣共表达提高嗜热 CGTase 可溶性表达的研究在国内还罕见报道。

本文利用原核表达载体 pET-28a(+)-ompA 进行嗜热脂肪芽孢杆菌 CHB1 嗜热 CGTase 在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中的异源表达, 并进行了 CGTase 和分子伴侣蛋白(DnaK-DnaJ-GrpE、GroEL-GroES、tig)共表达的研究, 通过筛选最佳分子伴侣蛋白促进酶可溶性表达, 以及优化最适分子伴侣蛋白共表达条件, 为下一步的工业化生产应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株与质粒: 嗜热脂肪芽孢杆菌 CHB1、*E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pET-28a(+)-ompA 本实验室保存。

主要试剂和仪器: 标准分子量蛋白质、分子伴侣质粒, TaKaRa 公司; IPTG、质粒提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; L-阿拉伯糖, Sigma 公司; 卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cm)、四环素, 上海生工生物工程有限公司; 其余常用试剂均为分析纯。

## 1.2 基因克隆、pET-28a(+)-ompA-cgt 载体构建及鉴定

以嗜热脂肪芽孢杆菌 CHB1 的基因组 DNA 为模板, 根据已知的环糊精葡萄糖基转移酶基因序列, 设计引物序列: *cgt*-F: 5'-CGCGGATCCAATAAGGTAAATTTTACATCG-3', 含 *Bam*H I 酶切位点; *cgt*-R: 5'-CCGCTCGAGGTTTTGCCAATTCATAAT-3', 含 *Xho* I 酶切位点。PCR 扩增产物纯化回收后和载体 pET-28a(+)-ompA 分别进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 回收纯化后, 按载体与目的基因比 1:3 混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 16 °C 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3), 卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆。挑取单个阳性克隆子培养过夜, 提取质粒, 进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切验证, 并且将阳性克隆子送上海生工生物工程有限公司测序。

## 1.3 目的蛋白的表达与表达条件优化

**1.3.1 目的蛋白的表达:** 挑取单菌落接种于 50 mL 含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基(g/L, 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2–7.4), 37 °C、180 r/min 振荡培养至  $OD_{600}=0.6$ , 加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 72 h。10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 上清用于胞外酶活检测。菌体重悬于 50 mmol/L PBS 缓冲液中, 冰浴中超声破碎, 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表达产物。

**1.3.2 诱导温度的筛选:** *E. coli* BL21/pET-28a(+)-

*ompA-cgt* 表达菌分别在 20、25、30 和 37 °C 诱导表达 72 h。发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 上清用于胞外酶活的检测。沉淀重悬于缓冲液中, 冰浴中超声破碎, 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表达产物。

## 1.4 分子伴侣共表达系统的构建和可溶性表达条件优化

**1.4.1 重组质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 与分子伴侣共表达体系的构建:** 将 *E. coli* BL21/pET-28a(+)-ompA-cgt 重组菌接种于含 100 mg/L 卡那霉素的液体 LB 培养基中于 37 °C、180 r/min 振荡培养, 待细菌生长到  $OD_{600}$  约为 0.4–0.6 时, 用常规  $CaCl_2$  方法制备感受态细胞。把 pKJE8、pKJE7、pGro7、pTf16、pG-Tf2 五种分子伴侣质粒(表 1)分别转化新制备的感受态细胞, 用 20 mg/L 氯霉素和 100 mg/L 卡那霉素的平板筛选阳性克隆, 获得同时含 pET-28a(+)-ompA-cgt 和分子伴侣质粒的基因工程菌。将含重组质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 的表达菌株作为阴性对照。

**1.4.2 目的蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 电泳分析:** 挑取共表达菌株的阳性转化子接种于含 100 mg/L 卡那霉素和 20 mg/L 氯霉素的 50 mL LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 8 h 后, 接种于新鲜培养基中, 待菌液  $OD_{600}$  约为 0.5–1.0 时加入 0.6 mmol/L IPTG 和 10  $\mu$ g/L 的四环素或 1 g/L 的 L-阿拉伯糖以诱导分子伴侣合成(pG-Tf2 用四环素诱导, pKJE7、pGro7 和 pTf16 用 L-阿拉伯糖诱导, pKJE8 用四环素和 L-

表 1 表达载体及分子伴侣质粒  
Table 1 Expression vector and molecular chaperone plasmid

质粒 Plasmid	分子伴侣组合 Molecular chaperone	启动子 Promoter	诱导物 Inducer	抗性标记 Resistant
pET-28a(+)-ompA	—	T7	IPTG	卡那霉素
pKJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL-tig	araB	L-阿拉伯糖 四环素	氯霉素
pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	araB	L-阿拉伯糖	氯霉素
pGro7	groES-groEL	araB	L-阿拉伯糖	氯霉素
pTf16	tig	araB	L-阿拉伯糖	氯霉素
pG-Tf2	groES-groEL-tig	Pzt1	四环素	氯霉素

阿拉伯糖诱导), 25 °C 诱导 72 h, 发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 上清用于检测胞外酶活性, 沉淀重悬于冰预冷的裂解缓冲液冰浴中超声破碎, 12 000 r/min 离心 3 min 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表达产物。以重组质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 转化表达宿主 BL21(DE3)作为对照, 分离胶浓度为 15%的 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白可溶性表达情况。

**1.4.3 共表达系统的最佳诱导温度确定:** 将共表达菌分别在 20、25、30 和 37 °C 诱导表达 72 h, 10 000 r/min 离心 5 min 收集等量菌体, 上清液用于胞外酶活的检测, 菌体重悬于冰预冷的裂解缓冲液冰浴中超声破碎, 12 000 r/min 离心 3 min 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表达产物。

**1.4.4 共表达系统的最佳诱导剂浓度确定:** 在共表达菌株诱导起始时, 分别加入 0.25、0.50、1.00、1.50 g/L 的 L-阿拉伯糖, 加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG, 25 °C、180 r/min 诱导表达 72 h, 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 上清用于酶活的检测, 菌体置于冰上超声破碎, SDS-PAGE 分析可溶性表达情况。

## 1.5 酶活测定及蛋白表达量测定

重点考虑环糊精葡萄糖基转移酶  $\alpha$ -环化活力, 参照 Lejeune 等<sup>[13]</sup>方法, 以 3% (质量体积比)可溶性淀粉为底物进行环糊精葡萄糖基转移酶  $\alpha$ -环化活力测定。一个酶活力单位定义为在最适反应条件下每分钟生成 1  $\mu$ mol  $\alpha$ -环糊精所需的酶量。

参照 Bradford<sup>[14]</sup>方法进行蛋白浓度测定。

应用软件 Bandscan 5.0 分析 SDS-PAGE 电泳图谱中蛋白条带进行灰度扫描, 测定各泳道中目的蛋白表达比率和灰度值, 计算可溶性蛋白占总蛋白的比例。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 的构建及鉴定

PCR 扩增 CGTase 基因片段, 分子量在 2 000 bp 左右, 与预期基因长度大小一致, PCR 产物与

pET-28a(+)表达质粒经双酶切, 纯化酶切产物经 T4 连接酶连接后转入 *E. coli* BL21 中, 经菌液 PCR 验证, 条带在 2 000 bp 左右; 重组质粒双酶切验证, 出现两个片段, 分别与目的基因和载体的大小一致 (图 1); 另外, 测序结果经比对显示序列正确, 证明重组质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 构建成功, 抗性平板上长出来的菌落即为阳性克隆。

### 2.2 CGTase 的诱导表达及鉴定

重组菌株 pET-28a(+)-ompA-cgt/BL21(DE3)经诱导剂诱导表达 72 h 后, 离心发酵液, 收集菌体, 细胞破碎后离心分离上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳分析 (图 2), 结合图 2 的结果表明重组 CGTase 的相对分子质量在 75 kD 左右, 符合预期目的蛋白大小。CGTase 得到了大量表达, 但是可溶性的蛋白含量很少, 大部分是以不溶性的包涵体形式存在于沉淀中。以 3% (质量体积比)可溶性淀粉为底物测细胞胞外上清酶活, 结果显示酶活只有 6.69 U/mL (表 2)。

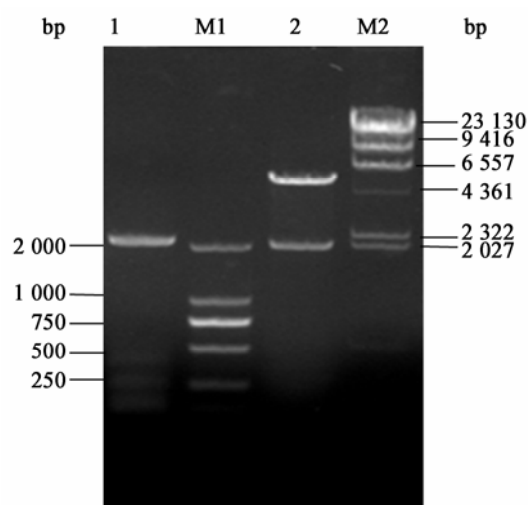


图 1 CGTase 基因 PCR 产物和重组表达质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 的酶切验证

Figure 1 PCR product of *cgt* gene and the restriction analysis of recombinant plasmid pET28a(+)-OmpA-cgt

注: M1: DL2000 DNA 标准分子量; 1: *cgt* 基因; M2:  $\lambda$ /Hind III DNA 标准分子量; 2: 重组质粒 pET-28a(+)-ompA-cgt 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切验证。

Note: M1: DL2000 DNA marker; 1: *cgt* gene; M2:  $\lambda$ /Hind III DNA marker; 2: pET-28a(+)-ompA-cgt digestion by *Bam*H I and *Xho* I.

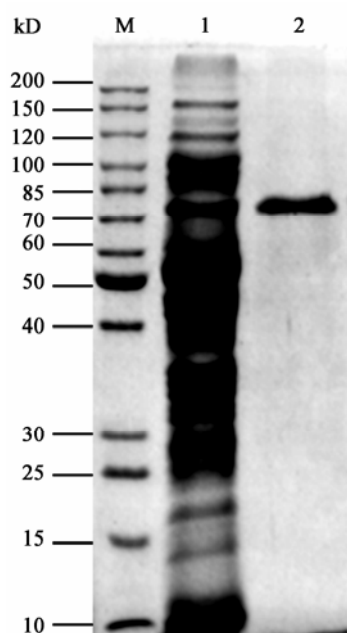


图2 纯化CGTase的SDS-PAGE检测

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purified CGTase

注: M: 标准量分子蛋白; 1: 未纯化的CGT酶; 2: 纯化的CGT酶。

Note: M: Protein marker; 1: Crude enzyme; 2: Purified CGTase.

### 2.3 CGTase 的表达纯化

重组菌经诱导表达后, 收集菌体, 低温超声波破碎, 离心后取上清, 过 Ni-IDA 柱, 收集洗脱液, SDS-PAGE (图 2) 分析显示经镍柱纯化后的蛋白纯度达到 95% 以上。

### 2.4 诱导温度的筛选

将 *E. coli* BL21/pET-28a(+)-ompA-cgt 分别于

20、25、30 和 37 °C 诱导表达 72 h, 表达产物经酶活测定和 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示, 胞外酶活和目的蛋白的可溶性表达量在诱导温度为 25 °C 时达到最大; 诱导温度低于或高于 25 °C 都不利于重组 CGTase 的胞外表达, 可溶性目的蛋白占总蛋白比例减少, 胞外酶活性降低, 因此选择 25 °C 为最适诱导温度。

### 2.5 分子伴侣与目的蛋白共表达

转入了重组质粒和分子伴侣质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 经双抗性培养基筛选, 并提取质粒进行验证和蛋白表达鉴定, 表明 5 种分子伴侣分别与重组质粒共存于同一个表达菌株中。如图 4 所示, pET-28a(+)-ompA-cgt 与 5 种分子伴侣质粒共表达时, 目的蛋白的可溶性表达量出现不同的情况。经软件 Bandscan 5.0 灰度扫描 (表 2), *E. coli* BL21/pET-28a(+)-ompA-cgt 单独表达时, 目的蛋白在上清中的含量为 5.8%, 与 pKJE8、pKJE7、pGro7、pTf16、pG-Tf2 分子伴侣质粒分别共表达后, 可溶性蛋白的量各为 7.0%、9.1%、7.4%、6.4% 和 6.9%。其中与 pKJE7 分子伴侣质粒共表达后目的蛋白的可溶性表达量提高最为明显, 提高了 56.9%。

通过测定其胞外酶活, 结果发现重组质粒与分子伴侣共表达后, 胞外酶活出现不同程度的提高, 其中 pKJE8 和 pGro7 质粒对提高酶活性的程度比较大, 分别提高了 48.6% 和 48.0%。而分子伴侣质粒 pKJE7 对提高 CGTase 胞外活性影响最少, 酶活仅提高了 6.1%。

表 2 5 种分子伴侣质粒共表达辅助目的蛋白 CGTase 的表达检测  
Table 2 The expression level of the target protein CGTase aided by the co-expression with five molecular chaperones

分子伴侣质粒 Molecular chaperone plasmid	可溶性蛋白占总蛋白比例 Soluble protein of total protein (%)	胞外上清酶活 Extracellular enzyme activity (U/mL)
pET-28a(+)-ompA-cgt	5.8	6.65
pKJE8/pET-28a(+)-ompA-cgt	7.0	9.94
pKJE7/pET-28a(+)-ompA-cgt	9.1	7.10
pGro7/pET-28a(+)-ompA-cgt	7.4	9.90
pG-Tf2/pET-28a(+)-ompA-cgt	6.4	7.23
pTf16/pET-28a(+)-ompA-cgt	6.9	8.20

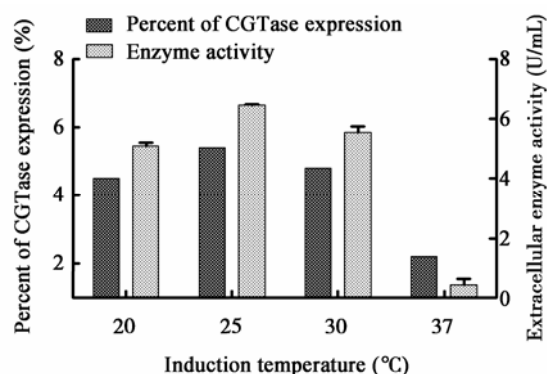


图3 不同诱导温度下目的蛋白 CGTase 可溶性表达和胞外酶活的检测

Figure 3 Effects of different induction temperature on soluble expression and extracellular enzyme activity of recombinant CGTase

## 2.6 诱导共表达条件优化

**2.6.1 温度对共表达的影响：**如图5所示，在不同温度下对双质粒重组菌株进行发酵培养，在培养至72 h后，CGTase 与分子伴侣质粒 pKJE8 的共表达，胞外酶活最高达 9.94 U/mL，说明 25 °C 是最适共表达温度；发酵温度为 20 °C 和 37 °C 时，胞外酶

活明显降低，胞外酶活只有 4.68 U/mL 和 1.29 U/mL。结果表明，当温度较高时，虽然适合菌株的生长，但 CGTase 的表达受到明显抑制；当温度太低时，菌体生长速率较慢，导致重组 CGTase 合成速率较低，不利于酶的表达和分泌。原因可能是：(1) 高温条件下，质粒的丢失率上升，影响重组酶的生产；(2) 较高的发酵温度使得重组酶的合成速率太快，不利于酶的正确折叠，而较低的温度，酶的合成速率也低。

**2.6.2 L-阿拉伯糖浓度对共表达的影响：**在发酵过程中加入不同浓度的 L-阿拉伯糖进行分子伴侣的诱导，结果如图6所示，L-阿拉伯糖浓度影响 CGTase 共表达。当 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 g/L 时，与分子伴侣质粒 pKJE8 共表达后，胞外酶活达到 11.2 U/mL，提高了 68.5%；当 L-阿拉伯糖浓度达到 1.50 g/L 时，与分子伴侣 pKJE7 共表达菌株的胞外酶活最低只有 3.2 U/mL。胞外酶活在 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 g/L 时达到最大，说明最适的 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 g/L。L-阿拉伯糖浓度低于或高于 0.50 g/L

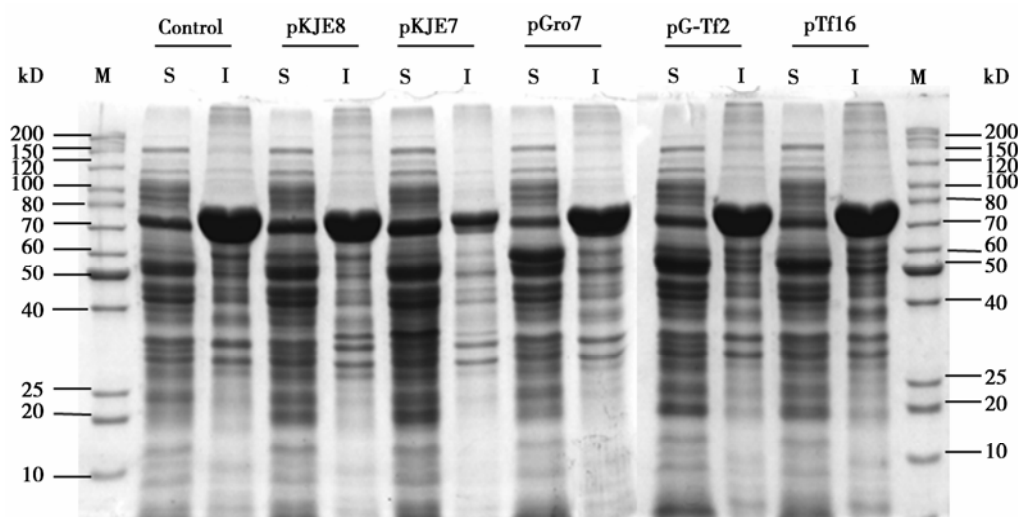


图4 5种分子伴侣共表达系统中目的蛋白 CGTase 表达水平的检测

Figure 4 SDS-PAGE analysis of expression products in five co-expression systems

注：M：标准量分子蛋白；S：可溶性部分；I：不可溶性部分。

Note: M: Protein maker; S: Soluble fraction; I: Insoluble fraction.

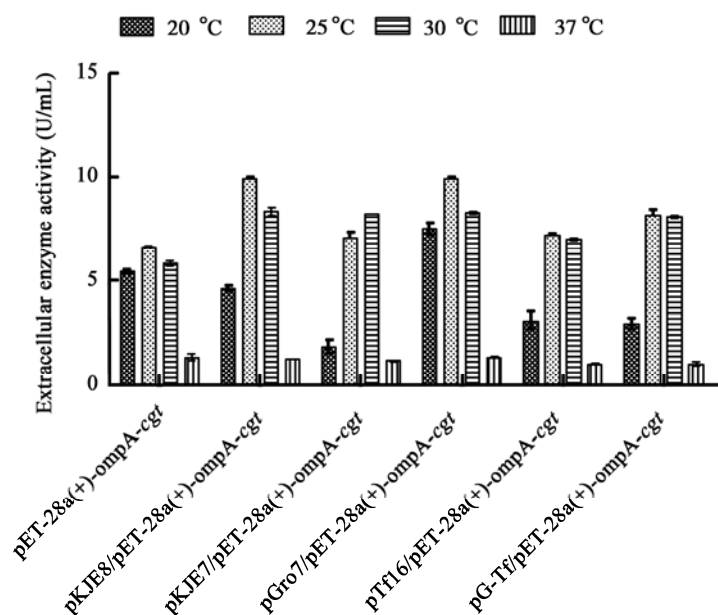


图 5 不同温度对 5 种分子伴侣共表达系统的胞外酶活检测

Figure 5 Different temperature for five molecular chaperone co-expression system in terms of extracellular enzyme activity

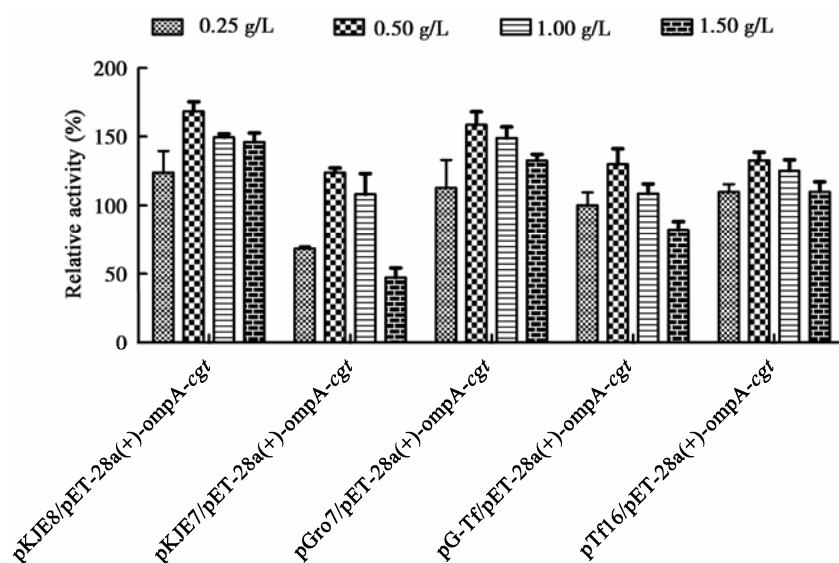


图 6 不同浓度 L-阿拉伯糖对 5 种分子伴侣共表达系统的胞外酶活检测

Figure 6 Different concentration of L-Arabinose for five molecular chaperone co-expression system in terms of extracellular enzyme activity

都不利于重组 CGTase 的可溶性表达,可能高浓度的 L-阿拉伯糖会导致分子伴侣的过度表达,使得菌体压力过大,不利于可溶性酶的分泌;相反,在加入较低浓度 L-阿拉伯糖时,分子伴侣的表达量较低,对重组 CGTase 的辅助折叠作用较弱,因此重组 CGTase 的可溶性表达量低。

### 3 讨论

采用大肠杆菌表达系统对本实验室筛选到的一株嗜热芽孢杆菌 CHB1 环糊精葡萄糖基转移酶进行表达,研究发现 25 °C 诱导能够改善目的蛋白的可溶性表达。究其原因,可能由于较低的生长温度降低了无活性聚集体形成的速率和疏水相互作用,从而减少了包涵体的形成。优化诱导温度在一定程度上可以提高 CGTase 的可溶性表达,但重组 CGTase 仍大多以包涵体形式存在,可溶性部分极少,可见提高蛋白的可溶性表达是大肠杆菌系统实用性的关键问题。为此,通常采用的措施:(1) 选择适合的表达宿主<sup>[15]</sup>;(2) 优化表达条件,如降低培养温度;(3) 分子伴侣、融合蛋白、折叠酶的共表达<sup>[16]</sup>;(4) 化学物质的添加,如培养基中加入山梨醇提高渗透压蛋白产物的可溶性<sup>[9]</sup>。

分子伴侣是一类能够协助其它蛋白质进行正确折叠、组装、转运、降解的重要因子,它们在细胞内帮助其它蛋白质的结构完成正确构象的形成,而且在行使功能后与之分离,不构成这些蛋白质执行功能的组分<sup>[17]</sup>。目前,大肠杆菌中存在 3 种主要的分子伴侣体系: DnaK-DnaJ-GrpE、GroEL-GroES 和 TF,它们在蛋白折叠过程中起着相互独立又相辅相成的作用<sup>[18]</sup>,实验过程中可以通过不同分子伴侣的组合以获得最佳效果。本研究引入了分子伴侣共表达系统,采用了 5 种分子伴侣质粒(pKJE8、pGro7、pKJE7、pG-Tf2 和 pTf16)分别与 pET-28a(+)-ompA-cgt 进行共表达。SDS-PAGE 分析结果显示,共表达不同分子伴侣的情况下,目的蛋白的可溶性表达量获得了不同程度的提高,并且胞外酶活也有了不同程度的提高。说明了不同的分子伴侣可能对

提高目的蛋白质可溶性表达的程度有所不同<sup>[19-20]</sup>。其中,pKJE8 分子伴侣质粒共表达后,CGTase 的可溶性表达量和胞外酶活性提高最为明显。由此可见,就 CGTase 而言,pKJE8 质粒含有最佳的分子伴侣组合,减少了 CGTase 包涵体的形成,显著促进了 CGTase 的可溶性表达。pKJE8 分子伴侣质粒携带 3 种分子伴侣基因,同时表达 3 种分子伴侣蛋白(DnaK-DnaJ-GrpE、GroEL-GroES 和 TF)有关,这 3 种蛋白相互协作促进目的蛋白的正确折叠、组装、转运,而其它分子伴侣质粒可能只表达一种或两种分子伴侣蛋白,这可能就是 pKJE8 分子伴侣质粒能较好地提高目的蛋白可溶性表达效果的原因。然而,分子伴侣蛋白共表达系统对提高胞外酶活性有限,大肠杆菌异源表达 CGTase 普遍存在形成大量包涵体的问题<sup>[9-10]</sup>,有待筛选合适的表达宿主如通过穿梭质粒在嗜热芽孢杆菌 CHB1 中进行表达,或者通过蛋白质工程方法改变酶的空间结构减少包涵体形成等方法进一步提高胞外酶活性。

综上所述,本研究对嗜热芽孢杆菌 CHB1 的 CGTase 进行了原核表达,发现 CGTase 在 25 °C 低温诱导时可溶性表达量最高;当发酵温度为 25 °C 和 L-阿拉伯糖浓度为 0.5 g/L 时,与分子伴侣质粒 pKJE8 共表达能够显著提高 CGTase 的可溶性表达量和胞外酶活。本研究为获得大量可溶性 CGTase、开展 CGTase 的工业化生产应用研究奠定了良好基础。

### 参考文献

- [1] Szenté L, Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(3/4): 137-142
- [2] Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3(12): 1023-1035
- [3] Uitdehaag JCM, van der Veen BA, Dijkhuizen L, et al. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the  $\alpha$ -amylase family[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(3): 295-304
- [4] Mergulhao FJM, Monteiro GA, Cabral JMS, et al. Design of bacterial vector systems for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 14(1): 1-14
- [5] Kane JF, Hartley DL. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechnology, 1988, 6(5): 95-101



- [6] Mitraki A, Fane B, Haase-Pettingell C, et al. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation[J]. Science, 1991, 253(5015): 54-58
- [7] Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, et al. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1694-1699
- [8] Han RZ, Li JH, Shin H, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(2): 415-428
- [9] Jin HH, Han NS, Kweon DH, et al. Effects of environmental factors on *in vivo* folding of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 11(1): 92-96
- [10] Wu J, Li ZF, Li B, et al. A new strategy for efficient secretory expression of extracellular proteins into culture medium of *E. coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136(S): S719-S720
- [11] Zhang HJ, Yang J, Liu XG, et al. Expression and enzyme activity assay of *pfu* with molecular chaperone[J]. Acta Botanica Yunnanica, 2009, 31(6): 499-503 (in Chinese)  
张海军, 杨君, 刘晓光, 等. 应用分子伴侣共表达系统表达 *pfu* 基因及酶活性测定[J]. 云南植物研究, 2009, 31(6): 499-503
- [12] Wan J, Deng HQ, Zhang BQ, et al. Prokaryotic expression of a glycosyltransferase Med-ORF8 involved in an antitumor antibiotic medermycin biosynthesis aided by the molecular chaperone[J]. Microbiology China, 2011, 38(2): 221-227 (in Chinese)  
万娟, 邓会群, 张碧乾, 等. 分子伴侣协助下抗肿瘤抗生素美达霉素生物合成中的糖基转移酶 Med-ORF8的原核表达[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 221-227
- [13] Lejeune A, Sakaguchi K, Imanaka T. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose ( $\alpha$ -cyclodextrin) glucanotransferase[J]. Analytical Biochemistry, 1989, 181(1): 6-11
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [15] Seddi R, Chaix JC, Puigserver A, et al. Expression of a soluble and activatable form of bovine procarboxypeptidase A in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 27(2): 220-228
- [16] Huang HR, Dong X, Zhang ZD, et al. Co-expression of protein of *M. tuberculosis* with molecular chaperone[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2009, 31(2): 76-79 (in Chinese)  
黄海荣, 董旭, 张宗德, 等. 应用分子伴侣共表达系统表达结核分枝杆菌编码蛋白[J]. 中国防痨杂志, 2009, 31(2): 76-79
- [17] Ellis RJ. The molecular chaperone concept[J]. Seminars in Cell Biology, 1990, 1(1): 1-9
- [18] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. Science, 2002, 295(5561): 1852-1858
- [19] Huang P, Fan SL, Ling M, et al. Recombination and expression of hepatocellular carcinoma associated antigen SMP30 and exploration of co-expressed system with molecular chaperones[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(4): 170-175 (in Chinese)  
黄朋, 范升龙, 凌敏, 等. 肝癌相关抗原 SMP30重组基因的构建、表达及分子伴侣共表达系统的探索[J]. 生物技术通报, 2012(4): 170-175
- [20] Choi MS, Saxena A, Chilukuri N. A strategy for the production of soluble human senescence marker protein-30 in *Escherichia coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 393(3): 509-513