

研究报告

集胞藻 PCC 6803 蛋白 SpPhaB 和 SpPhaE 的原核表达及 结晶条件筛选

李夏¹ 刘颖慧² 刘志文^{1*} 薛松^{2*}

(1. 大连工业大学 辽宁 大连 116034)

(2. 中国科学院大连化学物理研究所 辽宁 大连 116023)

摘要 【目的】克隆蓝藻集胞藻 PCC 6803 SpPhaB 和 SpPhaE 的编码基因并构建原核表达载体, 优化培养条件以提高在大肠杆菌中可溶蛋白的表达量, 筛选 SpPhaB 结晶条件, 为 PHB 家族蛋白的结构与功能研究提供基础。【方法】克隆集胞藻 PCC 6803 PHB 合成途径的 *phaB*、*phaE* 基因, 将 *phaB*、*phaE* 基因构建到表达载体 pET28a 中, 优化 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间, 提高在大肠杆菌 BL21(DE3) 中 SpPhaB 和 SpPhaE 可溶蛋白的表达产量, 经 Ni 柱亲和层析纯化分别获得 His-SpPhaB 和 His-SpPhaE 蛋白, 进一步筛选 SpPhaB 结晶条件。【结果】构建了 pET28a-SpPhaB 和 pET28a-SpPhaE 表达载体; 优化获得 SpPhaB 可溶蛋白的最佳表达条件为: 诱导温度 37 °C、转速 220 r/min、IPTG 浓度 0.1 mmol/L、诱导时间 7 h; SpPhaE 的可溶性蛋白最佳表达条件为: 诱导温度 25 °C、转速 220 r/min、IPTG 浓度 0.5 mmol/L、诱导时间 7 h, 并获得了 SpPhaB 的结晶条件。【结论】构建了具有高效表达可溶的集胞藻 PCC 6803 SpPhaB 和 SpPhaE 的原核表达系统, 并筛选优化了 SpPhaB 的结晶条件, 为研究 SpPhaB 蛋白的结构及功能奠定了基础。

关键词: SpPhaB, SpPhaE, 聚羟基脂肪酸酯, 优化表达, 晶体

Prokaryotic expression and crystallization optimization of SpPhaB and SpPhaE from *Synechocystis* sp. PCC 6803

LI Xia¹ LIU Ying-Hui² LIU Zhi-Wen^{1*} XUE Song^{2*}

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] To investigate the structure and function of PHB synthesis family protein, we cloned the *phaB* and *phaE* of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and constructed prokaryotic expression vectors. The conditions of cell culture were optimized for improving the expression level of soluble protein and then the crystallization condition of SpPhaB was screened. [Methods] The *phaB* and

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CBA00803)

*通讯作者: 刘志文: ✉: alzw@dlpu.edu.cn

薛松: Tel: 86-411-84379069; ✉: xuesong@dicp.ac.cn

收稿日期: 2014-09-13; 接受日期: 2014-11-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-28

phaE were cloned from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by PCR and ligated to pET28a expression vector. To improve the expression of SpPhaB and SpPhaE, the culture conditions including IPTG concentration, temperature and induction time were studied. Ni-NTA resin was used to purify His-SpPhaB and His-SpPhaE protein, and initial crystal culture condition of SpPhaB was screened. **[Results]** The sequencing results showed that pET28a-SpPhaB and pET28a-SpPhaE expression vectors were constructed successfully. The optimized condition for SpPhaB expression was determined to be: induction at 37 °C using IPTG concentration of 0.1 mmol/L, the induction time was 7 h and the rotation speed was 220 r/min. The optimized condition for SpPhaE expression was determined to be: induction at 25 °C using IPTG concentration of 0.5 mmol/L, the induction time was 7 h and the rotation speed was 220 r/min. **[Conclusion]** The pET28a-SpPhaB and pET28a-SpPhaE were constructed successfully and the crystallization conditions of SpPhaB have been optimized. It provided the foundation for investigating the structure and function of SpPhaB.

Keywords: SpPhaB, SpPhaE, Polyhydroxyalkanoate, Expression optimization, Crystal

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)是广泛存在于多种微生物及其他生物体内的一种细胞内聚酯^[1]。PHA 家族十分庞大,目前已经发现至少有 150 种不同的 PHA 单体结构。聚 β-羟基丁酸(Poly-hydroxybutyrate, PHB)是 PHA 家族的一个成员,它由单一的 R 型 3-羟基丁酸的重复单元构成^[2],是一种可被微生物完全降解的环境友好型热塑性塑料,具有生物降解性、生物相容性、高结晶特性等优点^[3]。PHB 的这些性能使其成为生物材料领域中的研究热点,涉及 PHB 生物合成、改性及应用等方面的研究非常活跃^[4]。

PHB 生物合成途径如图 1 所示^[5], PhaB 催化 PHB 三步合成的第二步反应,即把乙酰乙酰辅酶 A (Acetoacetyl-CoA)还原成 R-3-羟基丁酰辅酶 A (R-3-Hydroxybutyryl-CoA)。PhaE 催化第三步反应,将 R-3-羟基丁酰辅酶 A 聚合成为 PHB^[6]。目前有研究表明,PhaA 和 PhaB 有助于 PHB 的快速合成^[7]。在 *Rhodospirillum rubrum* 中过表达 *phaC*、*phaA*、*phaB*

和 *phaJ* 时发现, *phaB* 在 PHB 合成中起最为关键的作用^[8]。但目前对于 PhaE 的研究较少。Han 等^[9]在 *Halobacteriaceae* 中发现 PhaC 和 PhaE 是合成聚羟基脂肪酸酯的新途径中的关键酶,合成过程中二者缺一不可,同时这两个蛋白在 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中对 PHB 的合成也十分重要^[10]。近年来,通过解析 *Ralstonia eutropha* H16 中 PhaB 蛋白及其与底物乙酰辅酶 A 复合体结构揭示了 PhaB 与底物的结合开关^[11],并通过错义突变获得了两个可以增强 PhaB 酶活性的突变株,通过比较野生型与突变体结构发现突变位点改变了 PhaB 与底物的结合能力^[12],但目前没有 PhaE 的晶体结构报道。以上研究结果表明,揭示 PHB 合成途径中关键酶的结构对于认识酶与底物结合机制、阐明催化反应机理很重要。

蓝藻作为光合微生物能够高效地利用太阳能把 CO₂ 转变成有机物,生长快速,培养周期短,被认为适合作为合成生物学中“底盘细胞”的物种之一。集胞藻 PCC6803 是蓝藻的模式藻种,本研究将

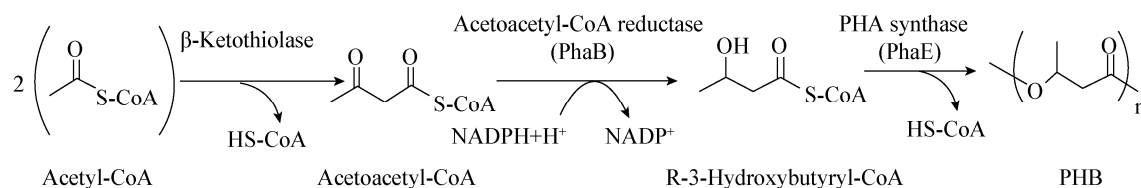


图 1 PHB 合成途径

Figure 1 Biosynthetic pathway of PHB

利用基因工程手段, 克隆并构建蓝藻集胞藻 PCC 6803 中 PHB 合成途径中关键酶 PhaB 和 PhaE (缩写为 SpPhaB 和 SpPhaE) 的原核表达载体, 进一步优化其表达条件以获得大量可溶蛋白, 筛选结晶条件。这些结果为深入了解 PhaB 和 PhaE 的结构和功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒: 原核表达载体 pET28a、连接载体 pMD18-T、大肠杆菌 Top10 感受态细胞、大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞均购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂: DL2000 DNA Marker, λ -Hind III DNA Marker, Protein Molecular Weight Marker (Low), 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I, T4 DNA Ligase, DNA 片段纯化试剂盒和 PCR 试剂[TaKaRa La Taq、10×La PCR Buffer II (Mg^{2+} Plus)、dNTPs Mixture]均购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.3 培养基: LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 完全溶解于去离子水中, 1 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 至 7.2, 定容至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 冷却至室温并加入卡那霉素至终浓度 34 mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 构建 pET28a-SpPhaB 和 pET28a-SpPhaE 原核表达载体: 根据 SpPhaB 和 SpPhaE 的基因序列设计两对引物, 上下游分别引入 *Nde* I、*Xho* I 酶切位点, 由大连 TaKaRa 公司合成。

SpPhaB 上下游引物分别为 5'-CATATGTTAAG TCTTGGTTTGG-3' 和 5'-CCCCGGGTGGTGTGGA TTGAGCTC-3'。SpPhaE 上下游引物分别为 5'-CAT ATGGAATCGACAAATAAAACC-3' 和 5'-GTCTTCG TTTGGGTCCGATTGAGCTC-3'。

以蓝藻集胞藻 PCC6803 全基因组 DNA 为模板, 以上述设计的引物进行 PCR。反应体系: TaKaRa La Taq (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 10×La PCR buffer II (Mg^{2+} plus 25 mmol/L) 2 μ L, dNTPs mixture (各 2.5 mmol/L)

3.2 μ L, 模板(0.01 g/L) 2 μ L, ddH₂O 12.2 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 0.2 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 80 s, 共 35 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增后的产物。切胶回收后将目的片段连接到 PMD18-T 载体, 取连接产物转化到 Top10 感受态细胞中, 通过 M13 引物扩增鉴定阳性克隆后, 提取质粒送大连 TaKaRa 公司测序, 获得正确的克隆, 在 LB 培养基中培养过夜, 提取质粒, 用 *Nde* I、*Xho* I 酶切后通过胶回收获得基因片段, 连接到表达载体 pET28a, 连接产物转化到 Top10 感受态细胞中, 以菌落为模板, 通过 T7 引物扩增鉴定阳性克隆后, 提取质粒送大连 TaKaRa 公司测序, 获得正确的克隆, LB 培养基中培养过夜, 提取质粒, 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。

1.2.2 蛋白 SpPhaB 和 SpPhaE 在不同条件的诱导表达: (1) 不同 IPTG 浓度。分别挑取 pET28a-SpPhaB 和 pET28a-SpPhaE 阳性克隆, 接种于 100 mL 的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.5, 然后取 1 mL 菌液 12 000 r/min 室温离心 5 min, 倒掉上清, 收集菌体, 作为未诱导的对照组; 再分别向 5 个 50 mL 离心管中的 10 mL 菌液依次加入终浓度为 0.1、0.3、0.5、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG, 37 °C、220 r/min 继续诱导 3 h。收集不同 IPTG 浓度下诱导的菌体, 作为诱导的实验组, 收集方法与对照组相同。用 50 μ L B-PER buffer (50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% Triton X-100) 重悬对照组菌体, 200 μ L B-PER buffer 重悬实验组菌体, 振荡裂解菌体 2 min, 各取 20 μ L 样品, 将剩余的重悬菌体 12 000 r/min 室温离心 5 min, 分别取 20 μ L 上清样品。所有样品分别加入 20 μ L 的 2×Loading buffer, 混匀后, 95 °C 加热变性 5 min, 将样品冷却后分别离心, 12% SDS-PAGE 检测蛋白诱导情况。

(2) 不同诱导时间。分别挑取 pET28a-SpPhaB 和 pET28a-SpPhaE 阳性克隆, 培养和对照组取样方法如 1.2.2(1) 所述, 向培养 pET28a-SpPhaB 的

LB 培养基中加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG, 向培养 pET28a-SpPhaE 的 LB 培养基中加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C、220 r/min 继续诱导 3、5、7 h。取不同诱导时间的菌液 1 mL, 制样方法如 1.2.2(1)所述, 最后用 12% SDS-PAGE 检测蛋白诱导情况。

(3) 不同诱导温度。挑取 pET28a-SpPhaE 阳性克隆, 培养和对照组取样方法如 1.2.2(1)所述, 向培养 pET28a-SpPhaE 的 LB 培养基中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 分别于 16、25、30 °C 条件下以 220 r/min 继续诱导 3、5、7 h。取不同诱导时间的菌液 1 mL, 制样方法如 1.2.2(1)所述, 最后用 12% SDS-PAGE 检测蛋白诱导情况。

1.2.3 大量诱导蛋白表达与纯化: 从-80 °C 取出冻存甘油菌株 取 50 μ L 加入 100 mL 的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 12–16 h, 从培养好的菌液中取出 10 mL 加入到 0.9 L 的 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.5 左右时进行诱导。SpPhaB 蛋白在 37 °C、220 r/min 和 0.1 mmol/L IPTG 的条件下, 诱导 7 h。6 500 r/min、4 °C 离心 20 min 收集菌体, -80 °C 保存。用 100 mL Lysis buffer 重悬 5 g 菌体, 置于冰上超声破碎。8 500 r/min、4 °C 离心 30 min 收集上清。镍柱预先用 10 倍柱体积的 Equilibrium buffer 平衡, 然后将超声破碎获得的上清液样品滴入到镍柱中, 再用 Wash buffer 洗脱非特异性蛋白, 最后用 Elution buffer 洗脱收集目标蛋白。将收集到的目标蛋白在 GE 公司 Prime 5 plus 上进一步通过 Superdex 200 凝胶色谱柱分离。首先用平衡缓冲液平衡柱子, 将收集到的 10 mL 目标蛋白注入进样器中。用一个柱体积的平衡液洗脱, 并自动收集洗脱液。结合紫外吸收峰和 12% SDS-PAGE 检测分离纯化效果。将蛋白浓缩至 80 g/L, 进行分装, 冻存于-80 °C, 以备结晶。

Lysis buffer: 50 mmol/L pH 8.0 磷酸钠缓冲液, 5%甘油, 0.3 mol/L 氯化钠, 2 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF 蛋白酶抑制剂。

Equilibrium buffer: 50 mmol/L pH 8.0 磷酸钠缓

冲液, 5%甘油, 0.3 mol/L 氯化钠, 5 mmol/L 咪唑。

Wash buffer: 50 mmol/L pH 8.0 磷酸钠缓冲液, 5%甘油, 0.3 mol/L 氯化钠, 25 mmol/L 咪唑或 30 mmol/L 咪唑。

Elution buffer: 50 mmol/L pH 8.0 磷酸钠缓冲液, 5%甘油, 0.3 mol/L 氯化钠, 350 mmol/L 咪唑。

平衡缓冲液: 50 mmol/L pH 8.0 Tris-Cl, 0.3 mol/L 氯化钠, 0.05 mmol/L pH 8.0 Na-EDTA, 2 mmol/L β -巯基乙醇, 5%甘油。

超声破碎: 功率 250 W, 工作时间 10 s, 间歇时间 10 s, 循环 30 次, 重复 4 次。

1.2.4 SpPhaB 和 SpPhaE 结晶条件筛选: 采用悬滴扩散法。尝试了 Hampton 公司的 Crystal Screen 1 和 2 试剂盒, 结晶试剂为 500 μ L, 在硅化后的盖玻片上依次滴加 1 μ L 的结晶试剂盒试剂, 1 μ L 蛋白溶液, 蛋白浓度分别为 10 g/L 和 20 g/L, 培养温度为 4 °C 和室温, 每隔 2 d 在显微镜下观察晶体是否长出。针对初筛获得的结晶条件, 进一步通过优化蛋白浓度, 沉降剂浓度, 盐离子浓度的方式, 最终获得了最佳的晶体培养条件。

2 结果与分析

2.1 *phaB* 和 *phaE* 基因的克隆及鉴定

将 pET28a-SpPhaB 和 pET28a-SpPhaE 的质粒用 T7 引物进行 PCR 扩增, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 000–2 000 bp 处可见一条与基因片段长度一致的条带(图未列出), 分别是 987 bp 和 1 257 bp。测序结果表明 *phaB* 和 *phaE* 基因序列完全正确, 已成功构建表达载体 pET28a-SpPhaB 和 pET28a-SpPhaE。

2.2 蛋白 SpPhaB 和 SpPhaE 的表达优化

2.2.1 不同 IPTG 浓度诱导对 SpPhaB 和 SpPhaE 蛋白表达的影响: 如图 2 所示, 在 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导条件下, 总蛋白在大约 28 kD 处出现特异条带, 与预期的 His-SpPhaB 融合蛋白理论分子量相符。与对照组相比, 此为诱导表达的目标蛋白。比较不同 IPTG 浓度下蛋白表达情况, 发现其表达量无明显差异。因此, 确定 SpPhaB

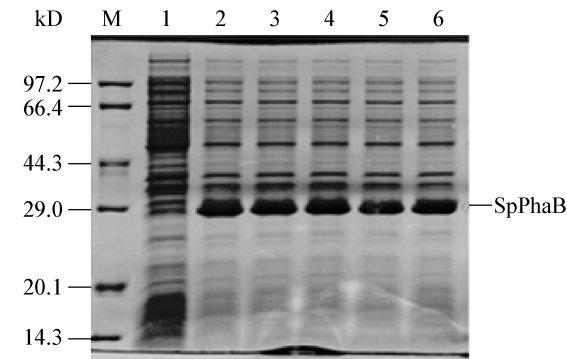


图 2 不同 IPTG 浓度下 SpPhaB 表达情况
Figure 2 Expression of SpPhaB protein under different IPTG concentrations

注：M：Protein molecular weight marker (Low)；1：未诱导的对照组总蛋白；2：0.1 mmol/L IPTG 条件下的实验组总蛋白；3：0.3 mmol/L IPTG 条件下的实验组总蛋白；4：0.5 mmol/L IPTG 条件下的实验组总蛋白；5：0.8 mmol/L IPTG 条件下的实验组总蛋白；6：1.0 mmol/L IPTG 条件下的实验组总蛋白。

Note: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: Total protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid without induction; 2-6: Total protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid after induction with 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mmol/L IPTG, respectively.

在 0.1 mmol/L IPTG 条件下进行诱导。而 SpPhaE (40 kD)的表达量是在 0.5 mmol/L IPTG 条件下达到最高值(图未列出),因此,确定 SpPhaE 在 0.5 mmol/L IPTG 条件下进行诱导。

SpPhaB 和 SpPhaE 蛋白在不同 IPTG 浓度诱导下的表达情况说明,不同 IPTG 浓度对相同蛋白的诱导表达有显著影响,不同蛋白的最佳 IPTG 浓度也存在差异,例如:蛋白 SpPhaB 在 0.1 mmol/L IPTG 处理下即可获得较好的效果,但是蛋白 SpPhaE 在 0.5 mmol/L IPTG 条件下的表达量最高。因此,优化 IPTG 浓度可以获得较好的蛋白诱导表达效果。

2.2.2 不同诱导时间对蛋白 SpPhaB 和 SpPhaE 表达的影响:如图 3 所示,在 0.1 mmol/L 的 IPTG、37 °C、220 r/min 条件下诱导 3、5、7 h,与对照组相比,总蛋白在约 28 kD 处出现诱导表达的目标蛋白 SpPhaB。在 3 h 和 5 h 诱导时间下,目标蛋白在上清蛋白的比例少于总蛋白中目标蛋白的含量,而 7 h 诱导时间下目标蛋白在上清蛋白和总蛋白中的比例相同,这表明了 SpPhaB 在 7 h 下所表达的蛋白均以可溶蛋白形式表达。因此,在 37 °C、220 r/min

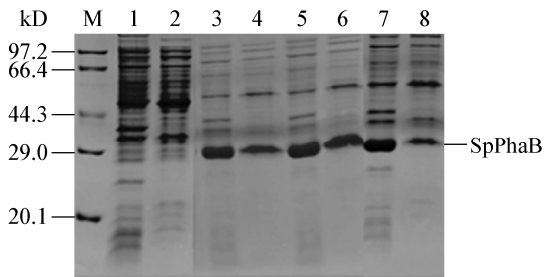


图 3 不同诱导时间下 SpPhaB 蛋白的表达情况
Figure 3 Expression of SpPhaB protein at different induction times

注：M：Protein molecular weight marker (Low)；1：未诱导的对照组总蛋白；2：未诱导的对照组上清蛋白；3：诱导 3 h 后的实验组总蛋白；4：诱导 3 h 后的实验组上清蛋白；5：诱导 7 h 后的实验组总蛋白；6：诱导 7 h 后的实验组上清蛋白；7：诱导 5 h 后的实验组总蛋白；8：诱导 5 h 后的实验组上清蛋白。

Note: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: Total protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid without induction; 2: Soluble protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid without induction; 3, 5, 7: Total protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid after induction for 3, 7, and 5 h, respectively; 4, 6, 8: Soluble protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid after induction for 3, 7, and 5 h, respectively.

和 0.1 mmol/L IPTG 的条件下,诱导 7 h 可得到大量 SpPhaB 蛋白,成功优化了表达条件(表 1)。而蛋白 SpPhaE 在 0.5 mmol/L 的 IPTG、37 °C、220 r/min 条件下培养不同时间,其上清蛋白中未出现目标蛋白(图未列出)。

比较 SpPhaB 和 SpPhaE 蛋白在不同诱导时间下可溶性表达情况,说明不同蛋白所需诱导时间不同。如:SpPhaB 在 3、5、7 h 诱导下的总蛋白含量差异不明显,在 7 h 处可溶蛋白量明显增多,因此 7 h 为此条件下最佳诱导时间。但是,SpPhaE 总蛋白随着时间延长而明显增多,并无可溶蛋白,因此需要进一步进行诱导温度的优化。

表 1 蛋白 SpPhaB 和 SpPhaE 的最佳表达条件				
Table 1 The optimized condition for SpPhaB and SpPhaE expression				
蛋白名称	IPTG 浓度	温度	时间	转速
Protein	IPTG concentration (mmol/L)	Temperature (°C)	Time (h)	Revolution (r/min)
SpPhaB	0.1	37	7	220
SpPhaE	0.5	25	7	220

2.2.3 不同诱导温度对 SpPhaE 蛋白的表达影响:

如图 4 所示,在 0.5 mmol/L 的 IPTG,16 °C 和 30 °C,220 r/min 条件下培养 3、5、7 h。目标蛋白 SpPhaE 在上清蛋白中表达量很低(图未列出),说明 16 °C 和 30 °C 不是 SpPhaE 获得大量可溶蛋白的最佳温度条件。但是,当诱导温度为 25 °C 时,诱导时间为 7 h 的目标蛋白在上清蛋白和总蛋白中的比例比 3 h 和 5 h 更高。这表明 SpPhaE 在 7 h 下大部分以可溶蛋白形式表达。

比较 SpPhaE 蛋白在不同诱导温度下可溶性表达情况,说明温度对于蛋白可溶性表达有重要影响。在 37 °C 条件下,SpPhaE 可溶蛋白很少,因此尝试在低温 16 °C 下进行诱导,发现总蛋白量增多,但并无可溶蛋白。于是继续优化温度条件,尝试在 30 °C 和 25 °C 温度条件下诱导,发现在 25 °C、220 r/min 和 0.5 mmol/L IPTG,诱导时间为 7 h 条件下产生一定量可溶蛋白,可以进行大量诱导与纯化(表 1)。

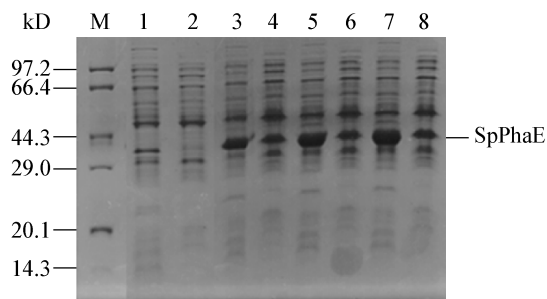


图 4 25 °C 时 SpPhaE 蛋白的表达情况

Figure 4 Expression of SpPhaE protein under 25 °C

注: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: 未诱导的对照组总蛋白; 2: 未诱导的对照组上清蛋白; 3: 诱导 3 h 后的实验组总蛋白; 4: 诱导 3 h 后的实验组上清蛋白; 5: 诱导 5 h 后的实验组总蛋白; 6: 诱导 5 h 后的实验组上清蛋白; 7: 诱导 7 h 后的实验组总蛋白; 8: 诱导 7 h 后的实验组上清蛋白。

Note: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: Total protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid without induction; 2: Soluble protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid without induction; 3, 5, 7: Total protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid after induction for 3, 5, and 7 h, respectively; 4, 6, 8: Soluble protein from BL21(DE3) containing recombinant plasmid after induction for 3, 5, and 7 h, respectively.

2.3 SpPhaB 和 SpPhaE 蛋白的大量诱导与纯化

SpPhaB 在 37 °C、220 r/min 和 0.1 mmol/L IPTG 的条件下诱导 7 h,从 2 L 的 LB 培养基中获得约 5 g 菌体。经由镍柱亲和层析和 FPLC 纯化后,获得大约 10 mg SpPhaB 蛋白,即每升菌体获得约 5 mg 蛋白。纯化后进行 12%的 SDS-PAGE 检测,如图 5 所示,说明纯化获得高于 95%纯度的 SpPhaB 蛋白。SpPhaE 在 25 °C、220 r/min 和 0.5 mmol/L IPTG 的条件下诱导 7 h,从 2 L 的 LB 培养基中获得约 5 g 菌体。经由镍柱亲和层析和 FPLC 纯化后,获得 SpPhaE 蛋白 5.85 mg 蛋白,即每升菌体获得约 2.925 mg 蛋白,纯化后进行 12%的 SDS-PAGE 检测(图未列出),结果显示获得高于 95%纯度的 SpPhaE 蛋白。

2.4 SpPhaB 和 SpPhaE 结晶

经过结晶试剂盒筛选,SpPhaB 在 4 °C 和室温环境下培养 2 d 后,在 Crystal 1 试剂盒的 18 号条件下(0.2 mol/L Magnesium acetate tetrahydrate,0.1 mol/L Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5,18% PEG8000)长出细小的晶体,如图 6A 所示。在此基础上,通过

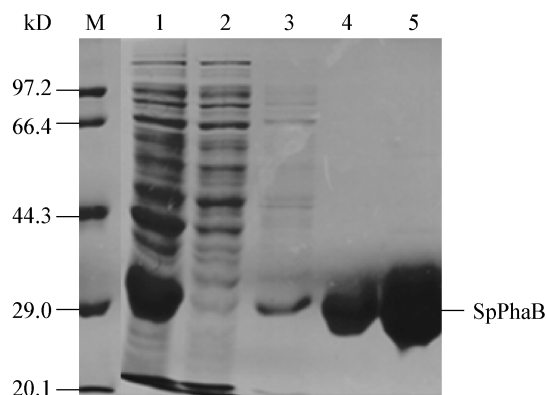


图 5 SpPhaB 蛋白的纯化

Figure 5 Purification of SpPhaB protein

注: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: Lysis buffer 超声破碎菌体后离心的上清液; 2: 上清液流过 Ni 柱的收集液; 3: Wash buffer 洗脱 Ni 柱的收集液; 4: Elution buffer 洗脱下的目标蛋白液; 5: FPLC 收集到的目标蛋白液。

Note: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: Supernatant after ultrasonication and centrifuging; 2: Supernatant flowing through Ni-NTA; 3: Solution after Wash buffer flowing through Ni-NTA; 4: Solution after Elution buffer flowing through Ni-NTA; 5: Solution after FPLC.

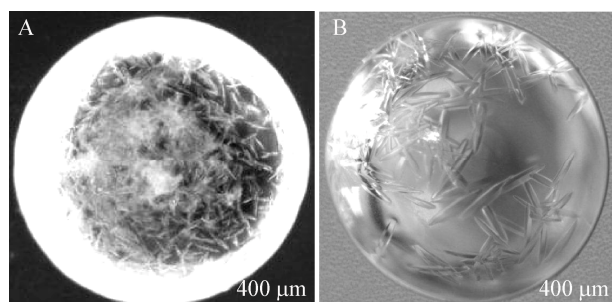


图 6 SpPhaB 晶体的光学显微镜照片

Figure 6 Optical microscope photo of SpPhaB crystal

注：A：在 18 号条件下得到的 SpPhaB 晶体；B：优化结晶条件后得到的 SpPhaB 晶体。

Note: A: The SpPhaB crystal under the 18th crystallization conditions; B: The SpPhaB crystal under the crystallization conditions optimized.

优化蛋白浓度，沉降剂浓度，盐离子浓度的方式最终获得的最佳结晶条件为 4 °C、0.22 mol/L Magnesium acetate tetrahydrate、0.1 mol/L Sodium cacodylate trihydrate、pH 6.5、18% PEG8000 的结晶培养液，蛋白浓度为 10 g/L，1.5 μL 蛋白液与 1.5 μL 的晶体培养液混合。在此培养条件下获得单晶，呈长方形，如图 6B 所示，为后续 X-ray 衍射解析蛋白结构提供材料。然而，SpPhaE 蛋白经过试剂盒筛选，以及改变各种结晶培养条件目前均未获得结晶(数据未显示)。蛋白结晶必要的前提条件是纯度高于 95% 且均一性高。通过粒度分析检测纯化蛋白的均一性发现，SpPhaB 蛋白的均一性较高，而 SpPhaE 蛋白可能出现二聚体(数据未显示)，这可能是导致 SpPhaE 蛋白无法结晶的原因之一。

3 结论

本研究对蓝藻集胞藻 PCC 6803 PHB 合成途径中的关键酶 SpPhaB 和 SpPhaE 进行了蛋白的异源表达载体的构建和优化。研究发现，在 37 °C、220 r/min 和 0.1 mmol/L IPTG，诱导 7 h 条件下，SpPhaB 蛋白可溶性最好；在 25 °C、220 r/min 和 0.5 mmol/L IPTG 诱导 7 h 条件下，SpPhaE 蛋白可溶性最好，并筛选得到可用于 X-射线衍射的 SpPhaB 蛋白晶体。以上结果为后续研究 SpPhaB 的结构和功能，并以此进

行酶的定向进化提高催化效率奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rehm BHA, Steinbüchel A. PHA Synthases: The key enzyme of PHA synthesis[A]//Biopolymers volume 3a: Polyesters I-Biological Systems and Biotechnological Production[M]. Beijing: Chemical Industry Press: 183-227 (in Chinese)
- [2] Chen Q. Pathway construction and metabolic engineering for production of short-chain-length polyhydroxyalkanoates PHB and PHBV in recombinant *E. coli*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2011 (in Chinese)
- [3] 陈泉. 重组大肠杆菌生产短链聚羟基脂肪酸酯 PHB 及 PHBV 的途径构建与代谢改造[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2011
- [4] Lauzier GC, Revol JF, Debzi EM. Hydrolytic degradation of isolated poly (β -hydroxybutyrate, PHB) granules[J]. Polymer, 1994, 35(19): 4156-4162
- [5] Tsai C, Chang C. Polymer blends of PBT and PP compatibilized by ethylene-co-glycidyl methacrylate copolymers[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1996, 61(2): 321-332
- [6] Taroncher-oldenburg G, Nishina K, Stephanopoulos G. Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific- β -ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4440-4448
- [7] Osanai T, Oikawa A, Azuma M, et al. Genetic engineering of group 2 σ factor SigE widely activates expressions of sugar catabolic genes in *Synechocystis* species PCC 6803[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(35): 30962-30971
- [8] Bowien B, Kusian B. Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178: 85-93
- [9] Jin H, Nikolau BJ. Evaluating PHA productivity of bioengineered *Rhodospirillum rubrum*[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96621
- [10] Han J, Hou J, Liu H, et al. Wide distribution among *Halophilic archaea* of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(23): 7811-7819
- [11] Xie J, Zhou J, Zhang H, et al. Increasing reductant NADPH content via metabolic engineering of PHB synthesis pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(7): 998-1004
- [12] Kim J, Chang JH, Kim EJ, et al. Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from *Ralstonia eutropha*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 443(3): 783-788
- [13] Matsumoto K, Tanaka Y, Watanabe T, et al. Directed evolution and structural analysis of NADPH-dependent acetoacetyl coenzyme A (acetoacetyl-CoA) reductase from *Ralstonia eutropha* reveals two mutations responsible for enhanced kinetics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6134-6139