

丹参二萜合酶基因 CPS4 的原核表达体系优化及 活性蛋白纯化

靳保龙^{1,2}, 崔光红^{2,3}, 党伯岳¹, 刘世会^{1*}, 漆小泉^{2*}

(1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093;
3. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优化丹参柯巴基焦磷酸合酶基因家族新基因 CPS4 的原核表达体系并对重组蛋白进行纯化。方法: 对 2 种原核表达菌株进行比较。对诱导条件, 包括异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导浓度、诱导时宿主菌的密度 (A_{600}) 和诱导时间进行正交试验。利用 HisTrap HP 蛋白纯化柱对重组蛋白进行纯化。结果: *Escherichia coli* Tuner (DE3) 表达菌株能诱导产生更多的可溶重组蛋白。最佳诱导表达条件为诱导时宿主菌的 A_{600} 值 0.7, IPTG 浓度 0.2 mmol·L⁻¹, 诱导表达时间 10 h。HisTrap HP 蛋白纯化柱纯化时梯度洗脱能得到纯度高的重组蛋白。结论: 利用此优化体系可得到足量用于后续研究的重组蛋白, 为其他二萜类合酶基因的原核表达提供参考。

[关键词] 丹参; 原核表达; 正交试验; 纯化

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0094-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100094

Heterologous Expression and Purification of Recombinant CPS4 from *Salvia miltiorrhiza*

JIN Bao-long^{1,2}, CUI Guang-hong^{2,3}, DANG Bo-yue¹, LIU Shi-hui^{1*}, QI Xiao-quan^{2*}

(1. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences,

Beijing 100093, China; 3. National Resource Center of Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To find the optimal heterologous expression conditions and purification system for the new gene CPS4 from *Salvia miltiorrhiza*. **Method:** Compare two different prokaryotic expression strains and optimizing the induction conditions including A_{600} values of *Escherichia coli*, isopropyl- β -D-galactose and glycosides (IPTG) concentration and induction time with orthogonal experiment. The recombinant protein was purified by HisTrap HP. **Result:** *E. coli* Tuner (DE3) induced more soluble recombinant protein than BL21 (DE3). The optimal expression conditions are A_{600} is 0.7, IPTG concentration is 0.2 mmol·L⁻¹ and induction time for 10 h. The recombinant protein was purified by gradient elution with HisTrap HP. **Conclusion:** This optimal system can obtain enough protein for further study and provide a reference for the prokaryotic expression of the other diterpene synthase.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; prokaryotic expression; orthogonal experiment; purifying

[收稿日期] 20131207(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001604); 中国博士后科学基金(2012T50159); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合 ZY 字[2013]3009 号)

[第一作者] 靳保龙, 博士, 从事药物生物技术研究, Tel:18810090410, E-mail: jblhandan@163.com

[通讯作者] * 刘世会, 教授, 从事药物生物技术研究, Tel:0851-3856374, E-mail: Liush05@163.com;

* 漆小泉, 研究员, 从事植物分子生物学研究, Tel:010-62836671, E-mail: xqi@ibcas.ac.cn

牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)是植物中二萜化合物的共同前体物质,其首先通过不同的环化酶催化成环,然后进一步形成结构各异的二萜化合物^[1]。柯巴基焦磷酸合酶(copalyl diphosphate synthase, CPS)是植物三环二萜类化合物生物合成过程中起始环化酶^[2]。丹参基因组研究显示其中至少有5个CPS基因^[3],其中仅CPS1被鉴定为参与丹参酮类化合物前体次丹参酮二烯的形成^[4]。本研究组前期通过cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术,得到丹参CPS4(Genbank accession number JN831120)的全长序列,组织表达分析显示其在花萼中特异表达,推测其可能参与形成丹参中新的二萜类化合物。

大肠埃希菌是高效表达异源蛋白最常用的原核表达系统,但并非每一种基因都能在其中进行高效的表达。影响外源基因表达效率的主要因素包括载体与宿主菌的选择,培养条件与诱导方法的选择等^[5-6]。如何获得可溶并具有活性的特定重组蛋白需要将上述因素进行最佳的组合。本文将含CPS4基因的重组质粒导入大肠埃希菌*Escherichia coli*进行异源表达,并对其表达体系进行优化,为后续该基因生化功能的鉴定提供了重要的基础。

1 材料

表达宿主菌*E. coli* BL21(DE3),*E. coli* Tuner(DE3)由本实验室保存,质粒pET32-CPS4是将目的基因CPS4的全长cDNA克隆到pET32a原核表达载体中构成的重组质粒。*E. coli* [pET32-CPS4]是转化了pET32-CPS4的大肠埃希菌。仅转化pET32a质粒的大肠埃希菌*E. coli* [pET32a]为对照重组菌。

LB培养基(胰蛋白胨1.0%,酵母提取物0.5%,NaCl1.0%,pH7.0;固体培养基含1.2%琼脂)用于大肠埃希菌的培养。

羧苄青霉素和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)(Sigma公司),预装蛋白纯化柱HisTrap(GE Healthcare公司),原核表达用预染蛋白Marker((康为世纪生物科技有限公司),Brandford蛋白定量试剂盒(批号E161-01,北京康润诚业生物科技有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 原核诱导表达 将重组质粒pET32-CPS4通过热击法转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞^[7]。挑取阳性克隆单菌落,接种于10 mL LB(含50 mg·L⁻¹羧苄青霉素)液体培养基中,37℃ 200 r·min⁻¹培养

7 h,然后按照1:100稀释到200 mL LB(含50 mg·L⁻¹羧苄青霉素)液体培养基中,相同条件培养至密度(A_{600})为1.0,加入终浓度为0.4 mmol·L⁻¹的IPTG,于20℃诱导培养8 h^[6],*E. coli* [pET32a]作空白对照。诱导表达结束后,取1 mL菌液,10 000×g离心1 min,收集菌体,加50 μ L超纯水重悬,作为总蛋白待检。其余菌液4℃,2 500×g离心10 min,收集菌体,用4℃预冷的Lysis buffer(50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄,300 mmol·L⁻¹ NaCl,10%甘油,pH7.4)洗涤2次,再用其重悬沉淀,然后置于冰浴中超声破菌(超声3 s,间隔7 s,共10 min)。破碎菌液4℃,10 000×g离心20 min,取50 μ L上清液,作为可溶蛋白待检。

2.2 蛋白表达的优化

2.2.1 菌株筛选 将重组质粒pET32-CPS4分别转至*E. coli* BL21(DE3)和*E. coli* Tuner(DE3)感受态细胞,获得2种重组表达菌株,对其进行相同条件的诱导培养,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,选择可溶重组蛋白含量高的菌株进行下一步的优化。

2.2.2 诱导条件筛选 通过正交试验,对影响蛋白表达的IPTG诱导浓度、诱导时宿主菌的密度(A_{600})和诱导时间3个因素进行优化筛选。采用三因素四水平(3⁴)正交表L₁₆(3⁴),分16个组进行正交试验^[8](表1)。SDS-PAGE电泳后,用BandScan软件对蛋白条带进行定量分析。数据采用SPSS 18.0进行统计学处理,以产生最高含量可溶蛋白的条件为最佳诱导条件。

2.3 重组蛋白的纯化 利用优化后的最佳条件进行诱导,收集菌体,Binding buffer(50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄,300 mmol·L⁻¹ NaCl,20 mmol·L⁻¹咪唑,10 mmol·L⁻¹ MgCl₂,10%甘油,pH7.4)洗涤2次,菌体用15 mL Binding buffer重悬,超声破碎。破碎菌液于4℃,10 000×g离心20 min,上清液使用0.45 μ m滤膜过滤。滤液经HisTrap HP(1 mL)纯化柱纯化,Washing buffer(50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄,300 mmol·L⁻¹ NaCl,20,50,100,300 mmol·L⁻¹咪唑,10 mmol·L⁻¹ MgCl₂,pH7.4)梯度漂洗,Elution buffer(50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄,300 mmol·L⁻¹ NaCl,500 mmol·L⁻¹咪唑,pH7.4)洗脱,洗脱液通过SDS-PAGE检测。

2.4 蛋白检测和定量 重组蛋白利用SDS-PAGE进行检测,浓缩胶8%,分离胶10%。蛋白上样缓冲

液为 2 × SDS-loading buffer, 配制方法见参考文献 [9]。向待检蛋白中加入等体积的 2 × SDS-loading buffer, 煮沸 10 min, 上样 8 μL。利用考马斯亮蓝染色并照相观察, 利用 Bradford 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量^[10]。

3 结果

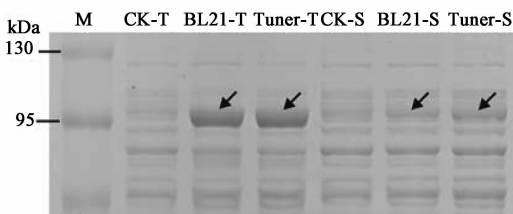
3.1 E. coli [pET32-CPS4] 的诱导表达和不同宿主菌的筛选 将重组质粒 pET32-CPS4 分别转至 *E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* Tuner (DE3) 感受态细胞, 获得 BL21 [pET32-CPS4] 和 Tuner [pET32-CPS4] 2 种重组表达菌株, 对其使用 IPTG 诱导表达重组蛋白, 总蛋白 SDS-PAGE 电泳显示在约 105 kDa 处均出现目的蛋白条带, 符合预测理论值, 而空白对照 *E. coli* [pET32a] (CK) 诱导后在相应位置未出现条带 (图 1), 表明 CPS4 基因在 *E. coli* 中能成功表达。进一步分析诱导表达的上清液发现, BL21 [pET32-CPS4] 中几乎没有可溶目的蛋白, 而 Tuner [pET32-CPS4] 中虽能发现目的蛋白条带, 但其含量极低。当以同一条件诱导表达已鉴定的 CPS1 基因时, 其重组蛋白大部分以可溶的形式存在 (图 2)。由此可见, 虽然同为丹参中的二萜合酶基因, 由于氨基酸组成及二级结构的差异, 造成其在原核表达体系中形成可溶性目的蛋白的效率存在显著差异。因此, 针对特定的基因, 需要摸索其最佳的诱导表达条件。由于 Tuner 菌株能产生较 BL21 菌株更多的可溶性重组蛋白, 因此, 以 Tuner 重组菌株继续进行表达条件的优化。

3.2 重组蛋白诱导条件的优化 低温培养条件能有效地增加可溶重组蛋白是目前较为公认的方法之一。结合其他二萜合酶的诱导表达条件, 选用 16 °C 作为优化条件的培养温度^[11]。在此基础上对 IPTG 诱导浓度、诱导时宿主菌的密度 (A_{600}) 和诱导时间 3 个因素设计正交试验进行筛选 (表 1)。结果显示, 不同处理之间诱导表达的总蛋白和上清液可溶目的蛋白均存在差异, 部分 SDS-PAGE 电泳结果见图 3。利用 BandScan 分析软件对 SDS-PAGE 电泳结果进行定量分析。对表 1 的定量结果进行极差和显著性分析发现, 不同因素对可溶性重组蛋白表达量的影响如下: 诱导时宿主菌的密度 > IPTG 浓度 > 诱导时间。其中诱导时宿主菌的密度对可溶性重组蛋白表达量影响显著 ($P < 0.05$), 而 IPTG 浓度和诱导时间对可溶性重组蛋白含量的影响没有统计学意义。最佳表达条件组合确定为诱导时宿主菌的 A_{600} 为 0.7, IPTG 浓度 0.2 mmol·L⁻¹, 诱导表达时间 10 h。

表 1 诱导表达条件的正交设计及表达结果的统计分析

No.	A_{600}	诱导时间	IPTG 浓度	可溶蛋白/%
1	1(0.4)	1(6 h)	1(0.1 mmol·L ⁻¹)	12.1
2	1	2(8 h)	2(0.2 mmol·L ⁻¹)	13.7
3	1	3(10 h)	3(0.4 mmol·L ⁻¹)	11.4
4	1	4(16 h)	4(0.8 mmol·L ⁻¹)	11.4
5	2(0.7)	1	2	13.8
6	2	2	1	12.6
7	2	3	4	12.5
8	2	4	3	12.4
9	3(1.0)	1	3	10.6
10	3	3	1	11.1
11	3	2	4	8.5
12	3	4	2	9.3
13	4(1.5)	1	4	9.3
14	4	4	1	9.9
15	4	2	3	9.3
16	4	3	2	10.9
I	12.150	11.450	11.425	
II	12.825	11.025	11.925	
III	9.875	11.475	10.925	
IV	9.850	10.750	10.425	
R	2.975	0.725	1.500	
P	0.005	0.593	0.174	

注: I. 水平 1 的平均值; II. 水平 2 的平均值; III. 水平 3 的平均值; IV. 水平 4 的平均值; R. 最大平均值与最小平均值的差值。



M. 蛋白相对分子质量标准; T. 总蛋白; S. 上清液; 箭头所指为目的蛋白 (图 2, 3 同)

图 1 不同菌株诱导表达重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳

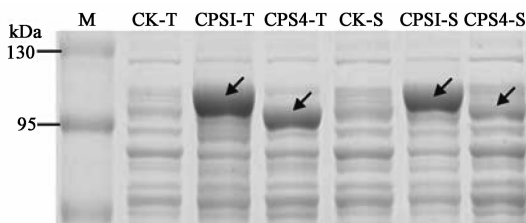


图 2 pET32-CPS1 和 pET32-CPS4 诱导表达重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳

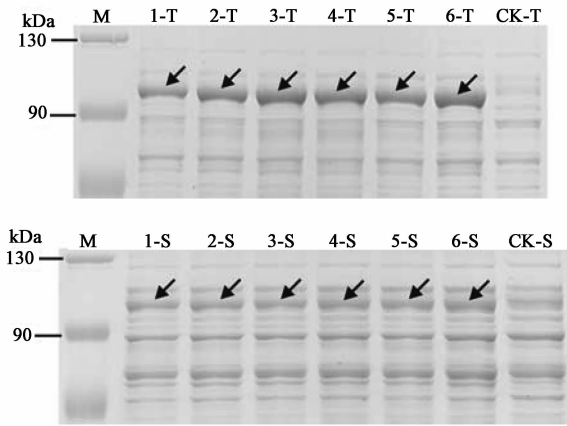
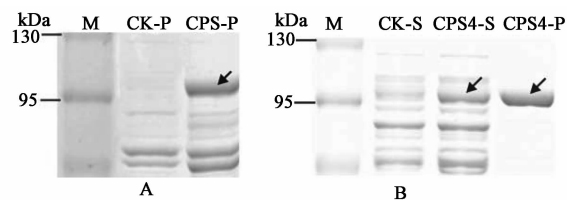


图3 pET32-CPS4 部分正交试验 SDS-PAGE 电泳

3.3 重组蛋白纯化 采用上述优化的体系进行诱导表达,利用 HisTrap HP 纯化柱进行重组蛋白的纯化。为减少杂蛋白与纯化柱树脂结合,超声破碎时重悬菌体的 Binding buffer 中含有 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的咪唑,使用 15 mL 含相同浓度咪唑的 Washing buffer 漂洗,再用 3 mL Elution buffer 洗脱,结果显示洗脱液中含有大量杂质蛋白,这些杂质蛋白在空白对照进行相同操作时同样存在,表明它们是表达体系中产生的杂质蛋白,而不是目的蛋白降解或者截断表达产生的。因此采用咪唑梯度洗脱的方法,分别将咪唑浓度提高至 $50, 100, 300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,发现含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑的 Washing buffer 能洗掉大量杂质蛋白。因此,使用 12 mL $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑的 Washing buffer 漂洗后,再用 3 mL Elution buffer 洗脱,得到了高纯度的重组蛋白(图 4)。经 Bradford 法进行蛋白定量,结果表明 200 mL 诱导菌液能得到 0.42 mg 纯化的活性重组蛋白,能满足各种酶促反应实验的需求。



A. 含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑 Washing buffer 漂洗后;
B. 含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑 Washing buffer 漂洗后
S. 诱导表达上清液;P. 纯化蛋白

图4 pET32-CPS4 重组蛋白纯化的 SDS-PAGE 电泳

4 讨论

在使用原核表达体系进行外源蛋白表达时,影响其表达效率的因素是多方面的,包括表达载体、宿主菌、培养基成分和诱导温度^[12]、IPTG 诱导浓

度^[13]、诱导时宿主菌的密度(A_{600})^[14]和诱导时间^[6]等。本实验选用的 pET32a 表达载体带有 N-端硫氧还蛋白(*trxA*·*Tag*)编码序列,外源蛋白与 *trxA*·*Tag* 序列融合后可增加其在大肠埃希菌中表达蛋白的可溶性^[15],该载体已成功用于多个二萜合酶基因的原核表达^[4,16]。笔者前期也尝试过 pET30a 和 PGEX-KG 载体,结果发现他们都不能成功的表达目的蛋白。可见,对于二萜合酶类基因的原核表达, pET32a 是一个理想的载体系统。

E. coli Tuner(DE3) 是 *lacY* 删除突变菌株,能够使 IPTG 均一渗透到所有细胞中,对整个培养体系中的细胞蛋白表达水平进行均一的调节,因此有利于提高重组蛋白的可溶性^[17]。培养条件的正交试验结果显示,有利于 CPS4 可溶蛋白表达的最佳条件为:在宿主菌生长密度(A_{600})为 0.7 时加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 后培养 10 h。这与 CPS1 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的最优诱导条件^[6]略有不同,与其相比,CPS4 诱导条件中 IPTG 浓度与诱导时宿主菌生长密度都略低,诱导时间稍长。结果表明本文采取的低温、低水平诱导表达方式有效降低了包涵体的形成,极大提高了 CPS4 可溶性重组蛋白的表达水平,为后续研究提供了基础。

[参考文献]

[1] Trapp S C, Croteau R B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications [J]. *Genetics*, 2001, 158 (2):811.

[2] Xu M M, Matthew L H, Sladjana P, et al. Functional identification of rice syn-copalyl diphosphate synthase and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products [J]. *Plant J*, 2004, 39 (3):309.

[3] Ma Y M, Yuan L C, Wu B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpeneoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63 (7):2809.

[4] Gao W, Hillwig M L, Huang L Q, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights [J]. *Org Lett*, 2009, 11 (22): 5170.

[5] 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.

[6] 高伟,崔光红,孔建强,等. 丹参柯巴基焦磷酸合酶基因的优化表达、纯化及抗体制备 [J]. *药学学报*, 2008,43 (7):766.

超临界 CO₂ 萃取无籽刺梨挥发油及 GC-MS 分析

吴小琼¹, 罗会^{2*}, 金吉林², 解璞², 王松松², 杨胜杰³

(1. 安顺职业技术学院, 贵州 安顺 561000; 2. 贵州省农业科学院果树科学研究所, 贵阳 550006;
3. 扬子江药业集团有限公司中药研究院, 江苏 泰州 225321)

[摘要] 目的:分析黔产无籽刺梨挥发油的化学成分,为其质量评价提供科学依据。方法:采用超临界 CO₂ 萃取法提取无籽刺梨挥发油,并通过气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪对其化学成分进行分析和鉴定,用色谱峰面积归一化法计算各组分相对含量。结果:从超临界 CO₂ 萃取法提取得到的挥发油中分离出39个组分,鉴定了其中33个化合物,已鉴定的组分占挥发油总量的91.48%,主要成分为β-谷甾醇(14.49%)、三十一烷(13.82%)、二十八烷(7.57%)、己酸(6.80%)、11-(戊烷-3-基)二十一烷(6.75%)、四十四烷(6.56%)等,另外还发现了少量的具有多种生物活性的角鲨烯(3.19%)和羽扇豆醇(1.18%)。结论:黔产无籽刺梨挥发油中含有酯、醇、烷烃、甾体等多种化学成分,分析结果为其质量控制提供依据。

[关键词] 无籽刺梨; 超临界 CO₂ 萃取; 挥发油; 气质联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0098-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100098

GC-MS Analysis of Volatile Oil from *Rosa sterilis* by Supercritical CO₂ Extraction

WU Xiao-qiong¹, LUO Hui^{2*}, JIN Ji-lin², XIE Pu², WANG Song-song², YANG Sheng-jie³

[收稿日期] 20140104(002)

[基金项目] 贵州省黔科合院所创能项目(20104009);贵州省黔科合重大专项项目(20126006)

[第一作者] 吴小琼,副教授,从事化学教学及相关研究,Tel:18785320126,E-mail:1619554820@qq.com

[通讯作者] *罗会,博士,副教授,从事中药化学成分和质量标准研究,Tel:13985542913,E-mail:luohui8732@163.com

- [7] Liu T, Zhu P, Cheng K D, et al. Molecular cloning, expression and characterization of hyoscyamine 6β-hydroxylase from hairy roots of *Anisodus tanguticus* [J]. *Planta Med*, 2005, 71 (3):249.
- [8] 徐端正. 生物统计在实验和临床药理学中的应用 [M]. 北京:科学出版社,2004:144.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:16.
- [10] Fanger B O. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents [J]. *Anal Bio Chem*, 1987, 162(1):11.
- [11] Matthew L H, Xu M M, Tomonobu T, et al. Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution [J]. *Plant J*, 2011, 68 (6):1051.
- [12] Michael J W, Maria P, Shawn R C, et al. Stabilization of apoglobin by low temperature increases yield of soluble recombinant hemoglobin in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (11):4313.
- [13] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10 (5):411.
- [14] 余光清,蒋诗琴,李雍龙. 可溶性重组日本血吸虫 26 kDa GST 的优化表达 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22 (8):770.
- [15] Yasukawa T, Kanei I C, Maekawa T, et al. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (43):25328.
- [16] Li J L, Chen Q Q, Jin Q P, et al. CPS2 is potentially involved in the biosynthesis of pharmacologically active Isodon diterpenoids rather than gibberellin [J]. *Phytochemistry*, 2012, 76 (4):32.
- [17] Hans P S, Kim K M. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *J Biotechnol*, 2005, 115 (2):113.

[责任编辑 邹晓翠]