

川芎咖啡酸-3-O-甲基转移酶的原核表达与条件优化

宋 婧, 朱 建 全, 张 泉 宝, 张 赶, 周 嘉 裕

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘 要:以川芎咖啡酸-3-O-甲基转移酶基因(LCCOMT)为表达对象,将含有 6 * His 标签的 LCCOMT 基因连接 pET28a 表达载体后转化大肠杆菌 BL21,采用原核表达的方法,优化了 LCCOMT 基因的表达条件。结果表明:当诱导时间为 4 h, IPTG 终浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导温度为 37°C 时,重组 LCCOMT 蛋白的表达量达到最大。溶解性检测结果表明, LCCOMT 重组蛋白以可溶性蛋白的形式存在,占总蛋白的 9%,该试验可为 LCCOMT 的大规模表达纯化奠定基础。

关键词:川芎;咖啡酸-3-O-甲基转移酶;原核表达;条件优化

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0107-04

基于植物体内阿魏酸的合成途径,已获知咖啡酸-3-O-甲基转移酶(caffeic acid 3-O-methyl transferase, COMT)能够催化咖啡酸和以 S-腺苷甲硫氨酸为底物合成阿魏酸^[1-3]。川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)是四川省著名道地药材,其根茎是传统中药^[4-6]。阿魏酸是川芎的主要活性成分^[7-8]。因其具有独特的药理作用和

生物活性,且毒性较低,在医药、保健品、化妆品原料和食品添加剂等领域有极其广泛的应用前景。目前阿魏酸可通过提取、化学合成、水解及微生物转化等 4 类方法获得。提取法与化学合成法均会使用大量的化学溶剂,污染环境;水解法需要首先提取获得阿魏酸酯,再利用水解制备阿魏酸,也会使用大量的化学溶剂,污染环境;微生物发酵法由于体系成分复杂因而分离纯化成本高。与前几种方法相比较,酶转化法具有环境友好、成本低、产品安全性高等特点。课题组在前期研究中,已从川芎根茎中克隆获得了川芎 COMT 基因的全长 cDNA 序列(LCCOMT, GenBank 登录号 No. KR106206),构建了重组表达载体 pET28a-LCCOMT。为提高 pET28a-LCCOMT 在大肠杆菌 BL21 的表达水平,该研究参考有关文献,研究了诱导温度、起始 OD_{600} 值、IPTG 诱导浓度

第一作者简介:宋婧(1995-),女,本科,研究方向为生物学。E-mail: 1344366035@qq.com.

责任作者:周嘉裕(1976-),女,博士,副教授,研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: spinezhou@home.swjtu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31371232, 31500276);成都市科技技术研发资助项目(2015-HM01-00051-SF);国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201510613063)。

收稿日期:2016-04-22

Clone and Express Analysis of *CiCOL5a* in *Chrysanthemum lavandulifolium*

CHEN Dongliang^{1,2}, LUO Chang^{1,2}, CHENG Xi^{1,2}, HUANG Conglin^{1,2}

(1. Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097; 2. Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing 100097)

Abstract: Taking *Chrysanthemum* as test material, the *CiCOL5a* gene was cloned and analyzed. The results showed that this gene encoded a protein of 347 amino acids containing two B-Box domains and one CCT domain, which indicated that it belonged to the CO family group I. Both the results of NCBI Blastp and phylogenetic tree based on CO proteins showed it was mostly closed to *AtCOL5* gene than other member of the family, so it was named as *CiCOL5a*. Relative real time PCR analysis showed that *CiCOL5a* expressed in all the tested tissues, with the highest level in leaf. In the process of flowering, the expression of *CiCOL5a* gene was gradually increased, and reached the maximum level at pigmented stage, and then decreased gradually, which indicated that *CiCOL5a* might play an important role in the development of flower in *Chrysanthemum*.

Keywords: *Chrysanthemum*; *Constans like* gene; flowering regulation; express analysis

及诱导时间对蛋白表达的影响,进行了优化试验。

1 材料与方法

1.1 试验材料

重组质粒与转化菌:含重组质粒 pET28a-LCCOMT 的 BL21 菌种由课题组构建完成并保存。

试剂与培养基:Bradford 蛋白定量试剂盒为天根生物公司产品,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自 MEKER 公司,DL 2 000 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品,26610 型蛋白 Marker 购自 Thermo 公司,卡那霉素购自生工生物工程有限公司,其余试剂均为分析纯,LB 培养基(液)用于培养大肠杆菌。

1.2 转化菌的培养和诱导表达

将转化成功的重组菌株接种在含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素(Kan)的 LB 液体培养基中,培养至 OD_{600} 值大于 0.6 时,加入 IPTG 使终浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,培养温度为 30°C ,摇床转速为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,诱导 BL21 菌株高效表达 COMT 蛋白。培养 8 h 后取样进行蛋白电泳检测。同时用转化 pET28a 空载体的 BL21 菌株和未经 IPTG 诱导的重组菌株为对照。

1.3 诱导适宜时间的筛选

重组菌株在 37°C 下培养至 OD_{600} 值为 0.6 后,加入 IPTG 至终浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 30°C 下诱导表达,分别在 1、2、4、8、12、24 h 6 个时间点取样进行蛋白电泳检测。同时以转化 pET28a 空载体的 BL21 菌株和未经 IPTG 诱导的重组菌株为对照。

1.4 IPTG 浓度的筛选

重组菌株在 37°C 下培养至 OD_{600} 值为 0.6 时,分别在 5 个相同的培养瓶中加入不同浓度的 IPTG,使 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 30°C 下诱导表达 8 h 后取样进行蛋白电泳检测。同时分别取带有空 pET28a 载体的 BL21 菌株和未加 IPTG 诱导的重组菌株为对照。

1.5 诱导培养温度的筛选

重组菌株在 37°C 下培养至 OD_{600} 值为 0.6 后,加入 IPTG 使终浓度达到 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别在 17、22、27、30、32、 37°C 6 个条件下进行诱导表达,8 h 后取样进行蛋白电泳检测。同时以转化 pET28a 空载体的 BL21 菌株和未经 IPTG 诱导的重组菌株为对照。

1.6 表达产物的可溶性检测

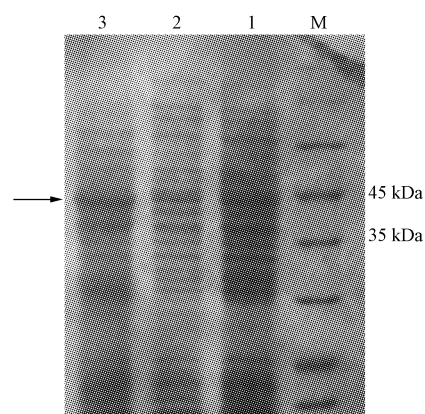
取 30°C 诱导表达后的菌液,在超声波细胞破碎仪上进行菌体破碎,释放蛋白。用液氮冻融 1 次,收集上清和沉淀分别进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 川芎 COMT 诱导表达的 SDS-PAGE 检测

由图 1 可知,重组质粒经诱导后相较于 2 个对照样

品,出现 1 条新的蛋白条带,分子量为 43 kDa。由于 pET-28a 载体上带有 3 kDa 的 $6 \times \text{His}$ 标签序列,因此新的蛋白条带的分子量大小为 $(39.932 + 3) \text{ kDa}$,与预测的大小一致,表明在 IPTG 的诱导下,LCCOMT 重组蛋白在大肠杆菌中成功地得到了表达。



注:M. 蛋白 Marker;1. 加 IPTG 诱导的 pET-28a 空载菌;2. 未加 IPTG 诱导的重组菌;3. 加 IPTG 诱导的重组菌。箭头处表示新出现的条带。

Note:M. Protein Marker;1. Add IPTG induction of pET-28a no-load bacteria;2. Without the recombinant strains induced by IPTG;3. Add IPTG induction of recombinant bacteria. Arrow indicates the emergence of new strip.

图 1 重组 LCCOMT 蛋白在 BL21 中的表达

Fig. 1 Expression of LCCOMT protein in BL21

2.2 诱导时间对重组蛋白表达的影响

由图 2 可知,加入 IPTG 诱导 1 h 后即开始有重组 LCCOMT 蛋白的表达,在 4 h 时达到最大值,随后趋于平稳。表明 4 h 后重组蛋白的表达量并没有明显的增加,因此在其它条件不变的情况下,重组 LCCOMT 蛋白的最佳诱导时间为 4 h 左右。

2.3 IPTG 浓度对 LCCOMT 重组蛋白表达的影响

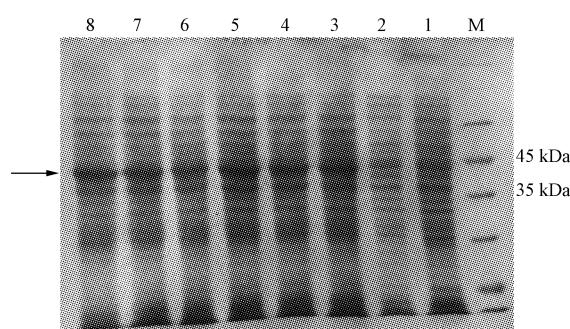
由图 3 可知,IPTG 终浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,表达量最大。IPTG 终浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即有重组蛋白开始表达,IPTG 浓度的增加并没有对蛋白表达的量产生明显的影响。

2.4 温度对 LCCOMT 重组蛋白表达的影响

由图 4 可知,重组菌株在 17°C 条件下诱导即有重组蛋白的表达。随着温度的增加,蛋白表达量有所增加,在 37°C 条件下诱导表达的量最大。表明 37°C 为诱导表达的最佳温度。

2.5 重组蛋白的可溶性检测

菌液经超声和冻融处理后,菌体破裂。菌中的蛋白释放至 PBS 溶液中,可溶性蛋白溶解在上层溶液中,非可溶性蛋白则留在沉淀中。蛋白的可溶性通常与蛋白的折叠正确与否相关。因此对表达蛋白的可溶性检测可以对蛋白正确折叠有一定的说明作用,同时对后期的蛋白纯化打下一定的基础。由图 5 可知,上清和沉淀中

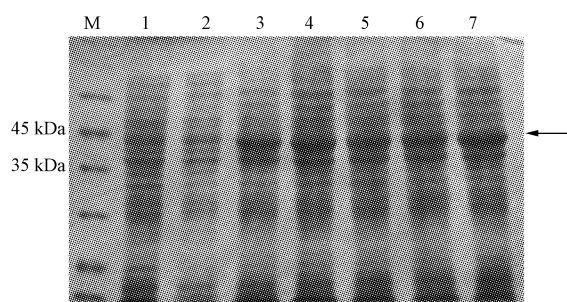


注:M. 蛋白 Marker;1. 加 IPTG 诱导的 pET-28a 空载菌;2. 未加 IPTG 诱导的重组菌;3. 诱导 1 h;4. 诱导 2 h;5. 诱导 4 h;6. 诱导 8 h;7. 诱导 12 h;8. 诱导 24 h. 箭头处表示重组 LCCOMT 蛋白。

Note:M. Protein Marker;1. Add IPTG induction of pET-28a no-load bacteria;2. Without the recombinant strains induced by IPTG;3. Induction for 1 hour;4. Induced for 2 hours;5. Induced for 4 hours;6. Induced for 8 hours;7. Induction for 12 hours;8. Induction for 24 hours. Arrow means LCCOMT protein.

图 2 诱导时间对 LCCOMT 重组蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of induction time on LCCOMT recombinant protein expression



注:M. 蛋白 Marker;1. 加 IPTG 诱导的 pET-28a 空载菌;2. 未加 IPTG 诱导的重组菌;3. $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导;4. $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导;5. $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导;6. $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导;7. $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导。箭头处表示重组 LCCOMT 蛋白。

Note:M. Protein Marker;1. Add IPTG induction of pET-28a no-load bacteria;2. Without the recombinant strains induced by IPTG;3. $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG induction;4. $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG induction;5. $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG induction;6. $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG induction;7. $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG induction. Arrow means LCCOMT protein.

图 3 IPTG 浓度对 LCCOMT 重组蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of IPTG concentration on LCCOMT

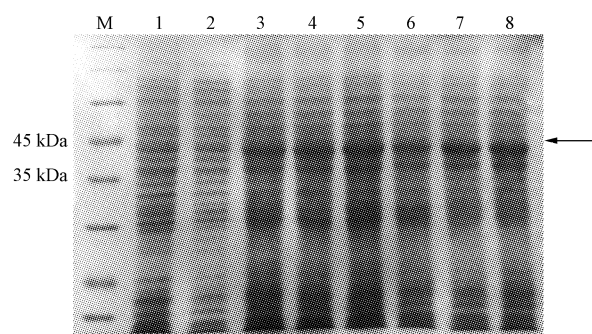
recombinant protein expression

均有重组蛋白出现,而上清中重组蛋白的量要多于沉淀中的蛋白量。说明在 30°C 条件下,IPTG 诱导的重组蛋白以可溶性蛋白的形式存在。

3 结论与讨论

由于密码子偏好性原因,选择原核寄主表达来源于真核生物的基因,会使表达量极低甚至不表达,因此该研究首先分析 LCCOMT 基因的密码子偏爱性,结果发现,大肠杆菌是 LCCOMT 基因表达的合适载体。进一步的试验结果表明,当诱导时间为 4 h,IPTG 终浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,诱导温度为 37°C 时,LCCOMT 重组蛋白的表达量最大,可使目的蛋白的含量提高。

IPTG 是乳糖类似物,少量的 IPTG 即能够诱导乳



注:M. 蛋白 Marker;1. 加 IPTG 诱导的 pET-28a 空载菌;2. 未加 IPTG 诱导的重组菌;3. 17°C 下诱导;4. 22°C 下诱导;5. 27°C 下诱导;6. 30°C 下诱导;7. 32°C 下诱导;8. 37°C 下诱导。箭头处表示重组 LCCOMT 蛋白。

Note:M. Protein Marker;1. Add IPTG induction of pET-28a no-load bacteria;2. Without the recombinant strains induced by IPTG;3. Induction under 17°C ;4. Induction under 22°C ;5. Induction under 27°C ;6. Induction under 30°C ;7. Induction under 32°C ;8. Induction under 37°C . Arrow means LCCOMT protein.

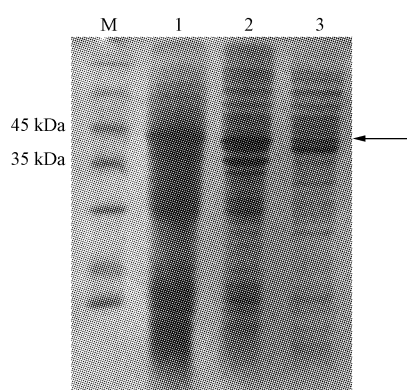
图 4 温度对 LCCOMT 重组蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of temperature on LCCOMT

recombinant protein expression

糖操纵子,然而过高浓度的 IPTG 会对细菌产生毒害作用,导致表达量下降,比如赤桉 COMT 在 37°C , $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 4 h 后达到表达峰值^[9]。杨山酥梨 COMT 在 37°C , $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 1.5 h 达到表达峰值^[12]。该研究结果表明,当 IPTG 终浓度是 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,LCCOMT 即开始表达,说明重组菌对 IPTG 较为敏感;当 IPTG 终浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,仍然能够高效诱导目的基因的高效表达,表明该重组菌对 IPTG 的耐受性较强,但具体原因有待进一步研究。

提高重组蛋白的可溶性,能够避免后期繁琐的蛋白质复性,对于降低试验成本,提高可操作性发挥了重要作用。有研究表明,较低的诱导温度能够有利于重组蛋



注:M 蛋白 Marker;1. 重组菌株;2. 上清;3. 沉淀。箭头处表示重组 LCCOMT 蛋白。

Note: M. Protein Marker; 1. The recombinant strains; 2. Supernatant; 3. The precipitation. Arrow means LCCOMT protein.

图 5 LCCOMT 重组蛋白的可溶性检测

Fig. 5 The solubility detection of LCCOMT recombinant protein

白的折叠,形成正确的立体结构^[11],因此该试验选择较低的诱导温度(30℃)来考察 LCCOMT 重组蛋白的可溶性,结果表明,LCCOMT 重组蛋白在该诱导温度下,能够以可溶性蛋白的形式存在,推测其具有生物学活性,这为后期的纯化及功能鉴定奠定了良好的基础。

该研究是以小量振荡培养方式,来摸索 LCCOMT 蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达的 IPTG 诱导浓度、诱导温度与合适诱导时间等表达条件。试验中,由

于培养基的体积小、培养条件的限制等会影响筛选结果,有待于在放大生产中做进一步的探索。

参考文献

- [1] 李波,倪志勇,王娟,等.木质素生物合成关键酶咖啡酸-O-甲基转移酶基因(COMT)的研究进展[J].分子植物育种,2010,8(1):117-124.
- [2] WEITING N, NANCY L, PAIV A, et al. Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene[J]. Transgenic Research, 1994, 3(2): 120-126.
- [3] UPENDRA N, DWIVED I, WILBUR H, et al. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(1): 61-71.
- [4] 周时. 中药川芎中有效成分的药理作用研究[J]. 内蒙古中医药, 2015, 2(5): 157-170.
- [5] 张文海. 川芎的药理作用及临床应用[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(26): 117-118.
- [6] 金玉青, 洪远林, 李建蕊, 等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 44-48.
- [7] 黄珍辉, 盛文兵, 傅榕庚, 等. 阿魏酸酯类衍生物的药理作用及合成研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(19): 8-10.
- [8] 林君容, 金鸣, 吴春敏. 阿魏化学成分与药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2014, 26(5): 1-3.
- [9] 谷振军, 章怀云, 张党权, 等. 赤桉木质素合成途径 OMT 基因家族的原核表达与纯化研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 34(6): 24-27.
- [10] NORIKO Y, MASAKO F, HIROAKI O, et al. Molecular cloning and characterization of O-methyltransferases from the flower buds of *Iris hollandica*[J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165: 415-422.
- [11] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(4): 482-485.

Optimization of Prokaryotic Expression of Recombinant Caffeic Acid 3-O-methyltransferase From *Ligusticum chuanxiong* in *E. coli*

SONG Jing, ZHU Jianquan, ZHANG Quanbao, ZHANG Gan, ZHOU Jiayu

(College of Life Sciences and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

Abstract: In order to efficiently express *Ligusticum chuanxiong* caffeic acid 3-O-methyltransferase (LCCOMT) in *E. coli*, pET28a-LCCOMT expression vector, which contained LCCOMT gene with 6 × His labels, was transformed into *E. coli* BL21. The expression conditions of LCCOMT gene were optimized. The results showed that when the induction time was 4 hours, IPTG concentration was 2.0 mmol · L⁻¹ and temperature was 37℃, the expression of LCCOMT recombinant protein might reach the maximum. Furthermore, solubility test results showed that the LCCOMT recombinant protein existed in the form of soluble protein. Therefore, this research laid a foundation for the future large-scale expression and purification of LCCOMT protein.

Keywords: *Ligusticum chuanxiong*; caffeic acid 3-O-methyltransferase; prokaryotic expression; conditions optimization