

重组大肠杆菌表达可溶性蛋白和包涵体过程的拉曼光谱实时分析

黄庶识^{1,2} 卢明倩² 李冰³ 周冰¹ 陈丽梅^{1*}

¹ 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650500
² 广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007
³ 广西师范大学生命科学院, 广西 桂林 541004

摘要 应用激光镊子拉曼光谱系统(LTRS),实时分析不同温度下蚕豆 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白在重组大肠杆菌细胞中的动态表达水平。结果显示,14-3-3b 可溶性蛋白与包涵体蛋白有明显不同的拉曼光谱特征峰,反映出两者在主链和侧链构象上的差异性;在 28 °C 时,包涵体蛋白特征峰 900,1033,1328,1415 和 1446 cm^{-1} 强度随着诱导时间延长而增加的幅度,明显大于可溶性蛋白的特征峰 763,1002,1363,1451 和 1665 cm^{-1} 的增加幅度,16 °C 时诱导表达结果正好相反,可溶性蛋白的特征峰增强幅度显著大于包涵体蛋白,说明 28 °C 诱导培养条件下,重组菌蛋白质过量表达以形成包涵体为主,16 °C 较低温度条件下以形成可溶性蛋白为主,正确折叠蛋白增加的信息可以通过光谱变化反映出来,在该温度下,蛋白质的正确折叠有利于细胞形成稳定的可溶性蛋白;另外,重组菌在相对低温条件下更多地表达含胱氨酸的非重组蛋白,可能与蛋白质折叠相关。LTRS 技术可以在单个细胞水平上对大肠杆菌细胞过量表达可溶性蛋白和包涵体蛋白过程进行无损害、无标记的实时分析。

关键词 光谱学;拉曼光谱;单细胞分析;重组蛋白表达;可溶性蛋白;包涵体

中图分类号 Q631; O657.37 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201441.1215003

Real-Time Detection on the Expression of Soluble Protein and Inclusion Body in the Recombinant *Escherichia coli* with Laser Tweezers Raman Spectroscopy

Huang Shushi^{1,2} Lu Mingqian² Li Bing³ Zhou Bing¹ Chen Limei¹

¹ Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China

² Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

³ School of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China

Abstract Laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) is used for real-time investigation of the overexpression of broad bean 14-3-3b soluble protein and inclusion body protein in the single living *Escherichia coli* cell at different temperatures after induction with isopropyl thiogalactoside (IPTG). The results show that 14-3-3b soluble protein and inclusion body protein have significantly different Raman characteristic peaks, which reflects that the two kinds of proteins have distinct conformations in their main chains and side chains. Intensity of the characteristic peaks of the inclusion body protein, including 900, 1033, 1328, 1415 and 1446 cm^{-1} , gradually increases as the function of the culture time after IPTG is added at 28 °C, however, intensity of the peaks of the soluble protein, including 763, 1002, 1363, 1451 and 1665 cm^{-1} , increases in small increments relatively. Conversely, the growth rate of soluble protein peaks is higher than that of the inclusion body peaks obviously at 16 °C, indicating that the recombinant

收稿日期: 2014-06-19; 收到修改稿日期: 2014-07-28

基金项目: 国家自然科学基金(31260063)、广西科学院基金(13YJ22WL08)

作者简介: 黄庶识(1964—),男,硕士,研究员,主要从事应用微生物与分子光谱等方面的研究。

E-mail: hshushi@gxas.cn

* 通信联系人。E-mail: chenlimeikm@126.com

protein is mainly formed as inclusion body at 28 °C, and mainly as soluble protein at 16 °C. Under lower temperature, the information of protein folding in precision can be reflected by the spectral changes and the correct protein folding into certain configuration is conducive to the formation of soluble protein in *E. coli* cells. In addition, the non-recombinant protein of the bacteria expression at 16 °C contains more cystine, which may be associated with protein folding. The LTRS is a useful tool for nondestructive, unmarked, efficient, real-time monitoring of overexpression processes of soluble protein and inclusion body protein in a single living *E. coli* cell.

Key words spectroscopy; Raman spectroscopy; single-cell analysis; recombinant protein expression; soluble protein; inclusion body protein

OCIS codes 300.6450; 170.5660; 170.1530; 140.3550; 140.7010

1 引 言

重组菌表达的重组蛋白一般有两种类型,一种是具有生物学活性的可溶性蛋白,另一种是无生物学活性的包涵体。原核表达体系或真核表达体系高水平表达重组蛋白时,由于某些蛋白质折叠过程中缺乏所需要的酶和辅助因子,或环境不适,无法形成正确的次级键等原因,会形成包涵体^[1-3];通过选择合适的启动子,改变信号肽结构,利用融合蛋白和分子伴侣,或降低诱导培养温度等方法,可以获得正确折叠、有生物活性的可溶性蛋白。

14-3-3 蛋白是一类普遍存在于真核细胞中的高保守性调节蛋白质^[4],它以同源或异源的二聚体分子形式存在于细胞中,通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸位点与靶蛋白特异性结合,参与细胞周期、凋亡、信号转导以及线粒体/叶绿体前体蛋白跨膜转运中的调控机制等生物学功能活动^[5]。在植物中,14-3-3 蛋白在种子萌发、基础碳氮硫代谢、质子泵和离子通道活性控制以及信号转导等方面具有调节作用^[4]。14-3-3 蛋白的研究对农作物的品质改良和抗性育种等有现实意义。

14-3-3 蛋白一般用原核表达系统表达其重组蛋白。先前本课题组将重组质粒 pGEX-4T-1-14-3-3b 转入宿主菌 *Escherichia coli* BL21 构建蚕豆 14-3-3b 重组蛋白表达菌,用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导重组菌表达蚕豆 14-3-3b 蛋白时发现,包涵体的形成对诱导温度敏感,16 °C 下诱导表达 10 h,可溶性蛋白的形成量高于包涵体,28 °C 时正好相反,包涵体形成量高于可溶性蛋白。

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、蛋白质免疫印迹法、质谱是研究重组蛋白在重组菌表达过程的常用方法,这些方法操作繁杂,耗时耗力,样品需要染色标记,甚至破碎细胞^[6]。激光镊子拉曼光谱系统 (LTRS) 可以实时检测溶液中单个活细胞的生理生化变化过程^[7-8],因此可以利用 LTRS 研究重组菌表达重组蛋白的过程。Chan

等^[9]首次应用 LTRS 诱导单个重组大肠杆菌细胞表达骨磷脂少突细胞重组糖蛋白 (MOG); Xie 等^[10]利用 LTRS 技术成功快速地检测出斑马鱼 β 新垂体重组蛋白在大肠杆菌和毕赤酵母单个细胞中的表达情况;本课题组之前利用 LTRS 实时检测了甲酸脱氢酶重组蛋白在大肠杆菌中的表达水平^[6],分析不同温度 (16 °C 和 28 °C) 下 IPTG 诱导重组大肠杆菌表达 14-3-3b 可溶性蛋白与包涵体蛋白的拉曼光谱特征^[11]。LTRS 技术具有不需要破碎细胞、不用染色标记、样品用量少、快速检测的优势。

本文应用 LTRS 研究重组菌 *E. coli* BL21 在 28 °C 和 16 °C 条件下, IPTG 诱导 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白的表达过程,通过不同时间点蛋白质特征峰强度变化的趋势,了解这两种蛋白基于温度影响的表达形式以及表达机制。

2 实 验

2.1 材 料

2.1.1 实验菌株

空载菌 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1)、重组菌 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1-14-3-3b) 来自昆明理工大学生物工程技术研究中心。

2.1.2 激光镊子拉曼光谱系统

实验系统如文献^[12]描述,由尼康倒置生物显微镜 (TE2000U, Nikon) 配备波长为 780 nm 的半导体激光器 (SACHER, Tapered Laser Head in Littrow Configuration, 775 ~ 790 nm, 500 mW), 拉曼光谱仪 (SpectraPro2300 i, Acton), 电荷耦合器件 (CCD) (Spec-10, Princeton Instruments), 摄影像机系统 (VC), 干涉陷波滤波器 (HNF), 台式电脑, 监视显示器以及系列透镜组成, 系统分辨率为 6 cm⁻¹。

2.2 方 法

2.2.1 重组蛋白的表达

重组菌 *E. coli* BL21 复苏、活化后,按 1% 接种量接种于含有氨苄青霉素 (Amp) 的 500 mL LB 液体培

培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.4, Amp 100 mg/L)中, 37 °C、200 r/min培养, OD₆₀₀ 约为 0.6 时加入 IPTG(终浓度为 1 mM), 分别在 16 °C 和 28 °C、100 r/min 诱导培养表达可溶性蛋白和包涵体蛋白, 培养 24 h 后, 1500 r/min 离心 5 min, 去上清液, PBS 缓冲液(NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L)清洗, 破碎细胞, 提取总蛋白用于分离纯化; 其中 28 °C 培养液分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时间点取样提取总蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 电泳。以相同方法培养空载菌 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1)作为对照。

2.2.2 重组 14-3-3b 蛋白的纯化

原核表达载体 pGEX-4T-1 中有谷胱甘肽-S 转移酶(GST)标签, 14-3-3b 可溶性重组蛋白利用 GST 亲和层析柱分离纯化。

包涵体蛋白为不溶性蛋白, 用割胶回收方法纯化。

2.2.3 纯化后的可溶性蛋白和包涵体蛋白的拉曼光谱测定

可溶性重组蛋白用水溶解, 包涵体蛋白用 Tris-Gly 电泳缓冲液(Tris 30.2 g/L, 甘氨酸 188 g/L, SDS 14 g/L, pH 值 8.3)溶解, 蛋白质含量大约为 20%; 分别取 50 μL 蛋白质溶液, 置于样品池内, 100 倍油镜下, 光镊子聚焦点随机测定拉曼光谱, 激光激发功率为 15 mW, 积分时间为 60 s, 相同条件下测定水的光谱, 作为可溶性蛋白的背景, 测定 Tris-Gly 电泳缓冲液光谱作为包涵体蛋白背景。

2.2.4 大肠杆菌同步细胞分离与拉曼光谱测定

将重组型大肠杆菌按照 2.2.1 方法培养, 加入

IPTG 后分别在 16 °C 和 28 °C 诱导的不同时间点 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 取样, 按照文献[6,13]描述的方法用 Percoll 密度梯度离心法分离大肠杆菌的同步细胞。

参考文献[14]方法, 取 200 μL 同步细胞悬浮液置于样品池内, 100 倍油镜下, 光镊子随机囚禁单个大肠杆菌细胞, 测定单个细菌拉曼光谱, 积分时间为 30 s, 激光激发功率为 15 mW, 在细胞附近以相同条件测定拉曼光谱作为背景, 每个样品测定 30 个细胞, 用含有空载菌 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1)的悬浮液作为对照。

2.2.5 数据处理

按照文献[6,14]描述的方法处理光谱数据, 将记录的 spe 格式数据直接导入 Micro-Origin 8.0 软件进行前处理, 然后用 Matlab 自编程序处理背景数据, 5 点平滑获得平均背景光谱, 用样品光谱减背景光谱, 得到样品真实光谱, 基线校正后截取信号峰集中的 600~1800 cm⁻¹ 的指纹区作图分析。

3 结果与讨论

3.1 重组大肠杆菌表达重组蛋白 14-3-3b 的 SDS-PAGE 电泳

图 1 是 IPTG 诱导 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1-14-3-3b) 表达 14-3-3b 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。重组菌在 28 °C 不同时间点(0, 2, 4, 6, 8, 10 h) 表达 14-3-3b 蛋白, 空载菌作为对照(CK)(用 IPTG 诱导培养 10 h), 提取重组菌和空载菌的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。和 CK 相比, 重组菌在 56 kDa 处出现明显的 14-3-3b 重组蛋白条带, 通过

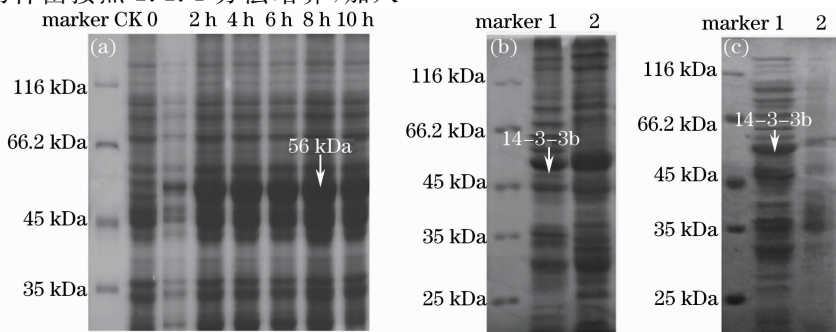


图 1 (a) IPTG 28 °C 诱导重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1-14-3-3b) 在不同时间点表达 14-3-3b 总蛋白的 SDS-PAGE 图; 分别在 (b) 28 °C 和 (c) 16 °C 诱导 10 h 表达 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白的 SDS-PAGE 图。1: 上清(可溶性蛋白); 2: 沉淀(包涵体)

Fig. 1 (a) SDS-PAGE images of total 14-3-3b protein from the overexpression of recombinant *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1-14-3-3b) as a function of time following IPTG induction at 28 °C; soluble protein and inclusion body protein of 14-3-3b protein from the overexpression of *E. coli* BL21 induced for 10 h at (b) 28 °C and (c) 16 °C. 1: Recombinant protein in the supernatant; 2: recombinant protein in the precipitation

0, 2, 4, 6, 8, 10 h 不同时间点的诱导表达, 发现条带逐渐加宽颜色加深, 说明随着诱导时间的增加重组蛋白表达量也随之增多, 当诱导时间达到 10 h 的时候, 重组蛋白表达浓度最高[图 1(a)]。重组菌在 28 °C 诱导表达 10 h 时, 在细胞上清液和沉淀中都表达了 14-3-3b 重组蛋白, 但是沉淀中的含量相对较多[图 1(b)], 表明在 28 °C 诱导表达 14-3-3b 重组蛋白主要以包涵体形式存在。将温度降到 16 °C 诱导表达 10 h 时, 14-3-3b 重组蛋白在上清的蛋白质几乎占 80%, 而沉淀的蛋白量很少[图 1(c)], 说明 14-3-3b 重组蛋白在 16 °C 的诱导表达过程中主要形成可溶性蛋白。

3.2 重组菌表达 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白的拉曼光谱

图 2 是纯化后重组大肠杆菌表达 14-3-3b 可溶性蛋白、包涵体蛋白的拉曼光谱图, 具体每个峰的归属如表 1 所示。纯化后的 14-3-3b 可溶性蛋白特征峰包括 763, 1002, 1066, 1363, 1451 和 1665 cm^{-1} (图 2 中 a 谱线), 包涵体蛋白特征峰有 900, 1033, 1328, 1415 和 1446 cm^{-1} (图 2 中 b 谱线), 两者的拉曼光谱峰有明显的差异, 反映出这两种成分在结构上的差异性。

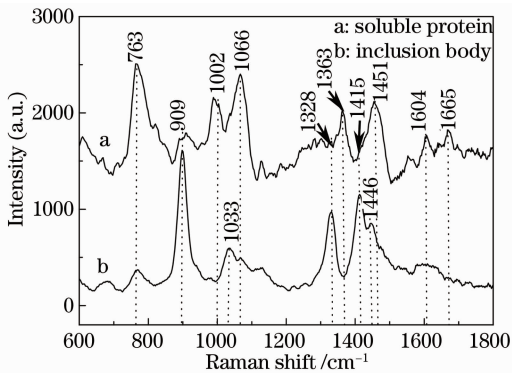


图 2 纯化后重组大肠杆菌 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白的拉曼光谱图

Fig. 2 Raman spectra of 14-3-3b soluble protein and inclusion body protein of *E. coli* BL21

蛋白质主链构象的拉曼光谱主要由肽键、C—C 骨架振动和 C—N 伸缩振动引起。谱线 900 cm^{-1} 是蛋白质中 C—C 键伸缩振动峰; 1066 cm^{-1} 归属于肽键的 C—N 伸缩振动, 对蛋白主链骨架盘曲方式较敏感^[15]; 1665 cm^{-1} 归属于酰胺 I, 是蛋白质主链结构中对结构变化敏感的谱带, 属于无规则卷曲、 β -折叠或 β -回折构象^[16]; 和 14-3-3b 可溶性蛋白相比, 包涵体的拉曼光谱在 900 cm^{-1} 有很强的信号峰, 归属构象灵敏骨架 C—C 伸缩振动, 属于 α -螺

旋构象^[16], 在 1066 cm^{-1} 和 1665 cm^{-1} 处的强度很弱(图 2), 显示出两者之间主链构象上有明显差别。

从侧链构象来看, 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白的侧链构象也有明显差异。蛋白质侧链敏感的拉曼谱峰有二硫键(S—S)、C—S 键、巯基(—SH)、酪氨酸的对羟苯基环以及色氨酸的吲哚环, 可溶性蛋白的 763 cm^{-1} 和 1363 cm^{-1} 色氨酸侧链峰信号很强, 763 cm^{-1} 对于色氨酸的吲哚环水化环境较敏感^[17], 1363 cm^{-1} 峰对环境和聚集状态的改变敏感, 这个峰的出现说明色氨酸埋藏在分子内部^[18], 包涵体没有 1363 cm^{-1} 谱峰, 提示色氨酸残基是外翻的(图 2 中 a 谱线)。归属苯丙氨酸的谱线有 1002 cm^{-1} 和 1033 cm^{-1} , 1002 cm^{-1} 构象不灵敏, 若蛋白质没有共价键的断裂, 可以作为内标^[15], 可溶性蛋白的拉曼光谱出现 1002 cm^{-1} 这个强峰, 而包涵体蛋白的这个谱峰强度却很弱, 说明包涵体蛋白的共价键断裂。此外, 包涵体的谱峰出现 C—H 变形的 1328 cm^{-1} 以及表征蛋白质氨基酸侧链上羧基 CO₂—的对称伸缩振动模式的 1415 cm^{-1} ; 构象不灵敏的 CH₂ 弯曲振动 1451 cm^{-1} 在可溶性蛋白光谱中出现很强的峰, 而在包涵体蛋白光谱中 1451 cm^{-1} 位移到了 1446 cm^{-1} , 也说明包涵体蛋白质有共价键的断裂或交联^[16]。包涵体出现的几个强的信号峰, 可能与重组大肠杆菌过量表达包涵体过程中在细胞内的非特异性堆积有关。大肠杆菌体内缺乏蛋白二硫异构酶(PDI)和肽基脯氨酸顺反异构酶(PPI), 在肽链快速折叠成蛋白质高级结构的过程中, 阻碍表达产物折叠成具有正确空间结构和特定生物功能的蛋白质。所以, 包涵体几乎没有生物活性, 主链和侧链的一些蛋白质特征峰也几乎没有。

图 3 是分别在 16 °C 和 28 °C 条件下, IPTG 诱导 10 h 后大肠杆菌细胞 14-3-3b 蛋白表达拉曼光谱图以及与 0 时间点的差谱图。结果显示, 两种温度条件下, 都出现可溶性蛋白特征峰 763, 900, 1002, 1328, 1446, 1451 和 1665 cm^{-1} , 也有包涵体的特征峰 900, 1033, 1328, 1415 和 1446 cm^{-1} , 是两种成分拉曼峰的叠加; 比较 10 h 与 0 时间点的差谱图, 在 28 °C 条件下, 包涵体几个特征峰 900, 1033, 1328, 1415 和 1446 cm^{-1} 峰强度大于 16 °C 的峰强度, 而可溶性蛋白的特征峰 763, 900, 1002, 1328, 1446, 1451 和 1665 cm^{-1} 峰强度小于 16 °C 的峰强度, 说明 28 °C 条件下主要表达 14-3-3b 包涵体蛋白时, 也有部分可溶性蛋白表达, 同样, 在 16 °C 诱导主要表达 14-3-3b 可溶性蛋白时, 也有包涵体蛋白表达, 和 SDS-

表 1 14-3-3b 可溶性蛋白、包涵体蛋白以及重组菌在不同温度表达重组蛋白的拉曼光谱归属^[16,19-22] (* 表示峰强度较明显的拉曼谱峰)

Table 1 Raman bands of pure soluble protein, inclusion body protein and expression in *E. coli* BL21 cells at 16 °C and 28 °C, and their assignments^[16,19-22] (* denotes Raman peaks with higher intensity)

Raman shift /cm ⁻¹	Soluble protein	<i>E. coli</i> at 16 °C	Inclusion body	<i>E. coli</i> at 28 °C	Assignment
763	*	*			Tryptophan
900			*	*	C—C stretch
1002	*	*		*	Phenylalanine
1033			*	*	Phenylalanine
1066	*				C—N stretch
1328		*	*	*	C—H deformation
1363	*	*			Tryptophan
1415		*	*	*	CO ₂ — stretch
1446		*	*	*	C—H ₂ deformation
1451	*	*			C—H ₂ deformation
1665	*	*		*	Amide I

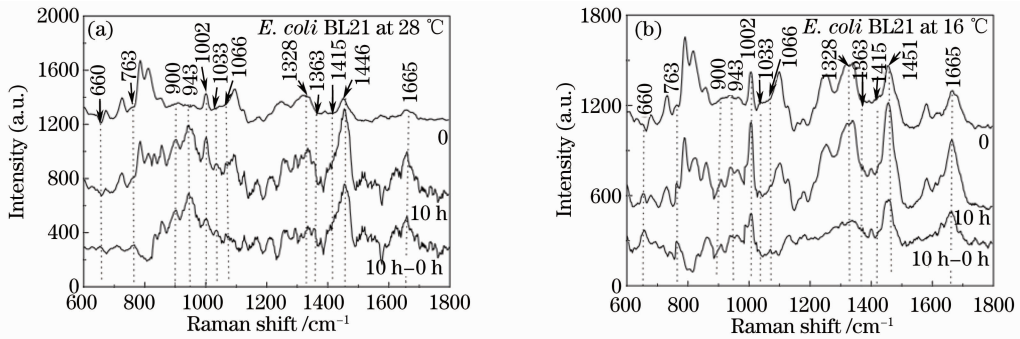


图 3 重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 在(a) 28 °C和(b) 16 °C诱导表达 10 h后的拉曼光谱图以及 与 0 时间点的差谱图

Fig. 3 Raman spectra of recombinant proteins of *E. coli* BL21 induced at (a) 28 °C and (b) 16 °C for 10 h and their difference spectra with 0 point

PAGE 电泳分析结果一致。

3.3 28 °C 条件下 IPTG 诱导大肠杆菌表达重组蛋白过程的拉曼光谱

图 4 是 28 °C 培养、IPTG 诱导条件下,重组菌和空载菌在 2,4,6,8,10 h 不同时间点与 0 时间点的差异光谱图,结果显示,重组菌拉曼谱峰强度随着诱导时间的延长而增强[图 4(a)],这些峰强度的增强与重组菌受诱导表达 14-3-3b 蛋白的积累有关,因为重组菌重组蛋白的过量表达量大约占总蛋白量的 30%~50%。而空载菌的差异光谱结果显示,14-3-3b 重组蛋白特征峰强度没有随着诱导时间的增加而增强,这是由于空载菌携带的空载体不含 14-3-3b 蛋白的编码基因,因此用 IPTG 诱导不会表达 14-3-3b 重组蛋白[图 4(b)]。拉曼光谱测定结果与 SDS-PAGE 检测结果一致[图 1(a)]。比较重组

菌细胞包涵体和可溶性蛋白的特征峰结果显示,包涵体的特征峰 900,1033,1328,1415 和 1446 cm⁻¹ 强度随着诱导时间的增加而明显增强[图 4(a)、(c)],可溶性蛋白特征峰 763,1002、1066,1363 和 1665 cm⁻¹ 强度增加幅度远低于包涵体蛋白[图 4(a)、(d)];相对于 0 时间点,包涵体主要特征峰 1446 cm⁻¹ 和 900 cm⁻¹ 的强度在 2,4,6,8,10 h 分别增加大约 70%,140%,200%,280%,340%,可溶性蛋白主要特征峰 763,1066 和 1665 cm⁻¹ 的强度在 2,4,6,8,10 h 分别增加大约 50%,60%,70%,75%,80%,表明重组菌在 28 °C 培养、IPTG 诱导下,表达的蛋白以形成 14-3-3b 包涵体蛋白为主,同时也有部分形成可溶性蛋白。表明在该高温条件下,有利于不可溶的包涵体蛋白产生。

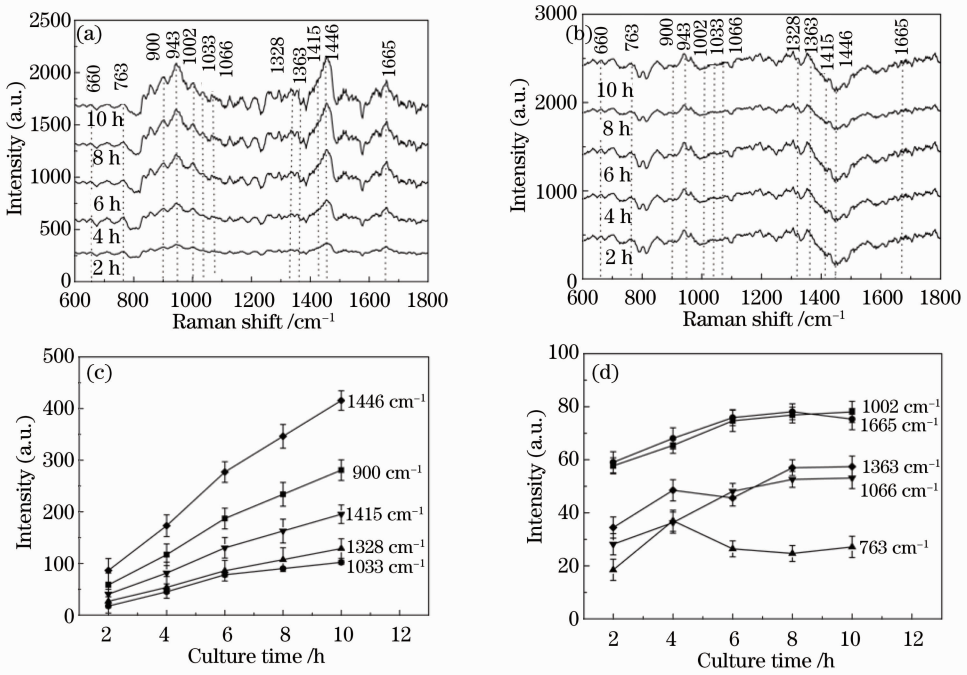


图 4 (a) *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1-14-3-3b)重组大肠杆菌和(b) *E. coli* BL21(pGEX-4T-1)空载菌在 28 ℃下培养、用 IPTG 在 2,4,6,8,10 h 不同时间点诱导表达 14-3-3b 包涵体蛋白与 0 时间点的差异光谱图; (c) 14-3-3b 包涵体蛋白特征峰变化趋势图; (d) 可溶性蛋白特征峰变化趋势图

Fig. 4 Difference Raman spectra of (a) the recombinant *E. coli* BL21 and (b) the blank vector *E. coli* BL21 at the time points of 2, 4, 6, 8 and 10 h cultured at 28 ℃ after IPTG induction, in which every average spectrum acquired at the time points of 2~10 h is subtracted by the spectrum of 0 point; band height trends of (c) inclusion body protein and (d) soluble protein as a function of time following IPTG induction at 28 ℃

3.4 16 ℃ 条件下 IPTG 诱导大肠杆菌表达重组蛋白过程的拉曼光谱

图 5 是 16 ℃ 培养条件下,重组菌和空载菌不同时间点与 0 时间点的差异光谱图。与 28 ℃ 诱导条件相同,重组菌细胞的拉曼峰强度也是随着诱导时间的增加而增强[图 5(a)],空载菌没有随着诱导时间的增加而增强[图 5(b)]。但是,可溶性蛋白和包涵体蛋白特征峰的变化趋势与 28 ℃ 的趋势正好相反,即可溶性蛋白特征峰 763,1002,1363,1451 和 1665 cm⁻¹ 的强度随着诱导时间的增加而增强[图 5 (a)、(c)],增强幅度大,主要特征峰 1002,1451 和 1665 cm⁻¹ 在不同时间点增加值分别为大约 60%, 90%, 120%, 150%, 200%; 包涵体特征峰 900, 1033,1328 和 1415 cm⁻¹ 的强度也同步增强,但增强幅度较小[图 5(a)、(d)],主要特征峰增加值分别是 30%,40%,55%,60%,63%,说明低温利于可溶性蛋白的形成。

3.5 两种温度条件下 IPTG 诱导大肠杆菌表达非重组蛋白的拉曼光谱

重组菌细胞在两种温度条件下,有 2 个非重组蛋白峰 660 cm⁻¹ 和 943 cm⁻¹,强度随着诱导时间的增加其变化幅度明显不同(图 6)。在 28 ℃ 培养条件下,943 cm⁻¹ 增加幅度最大,相对于 0 时间点,在 2~10 h 分别增加大约 30%,120%,220%,330% 和 410%,660 cm⁻¹ 峰高的绝对值远低于 943 cm⁻¹,峰强度几乎没有增加。在 16 ℃ 条件下,660 cm⁻¹ 和 943 cm⁻¹ 随着诱导时间的延长而增强,943 cm⁻¹ 增强幅度分别是 6%,21%,150%,156% 和 286%,660 cm⁻¹ 增强幅度分别是 20%,23%,60%,150% 和 230%。660 cm⁻¹ 归属胱氨酸 C—S 伸缩振动,是蛋白质侧链基团,943 cm⁻¹ 是蛋白质 C—C 伸缩振动^[16]。16 ℃ 条件下,660 cm⁻¹ 随着诱导时间的延长而增强,表明重组菌在相对低温条件下更多表达含胱氨酸的蛋白质,可能与蛋白质折叠相关。

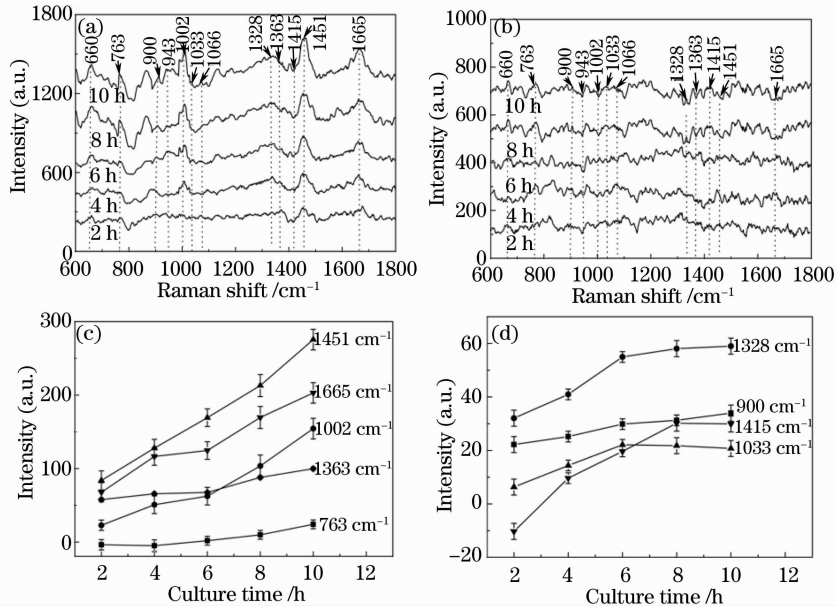


图 5 (a)重组菌 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1-14-3-3b)和(b)空载菌 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1) 在 16 °C 用 IPTG 在 2,4,6, 8,10 h 不同时间点诱导表达 14-3-3b 可溶性蛋白与 0 时间点的差异光谱图；(c)14-3-3b 可溶性蛋白特征峰变化趋势图；(d)包涵体蛋白特征峰变化趋势图

Fig. 5 Difference Raman spectra of (a) the recombinant *E. coli* BL21 and (b) the blank vector *E. coli* BL21 at the time points of 2, 4, 6, 8 and 10 h cultured at 16 °C after IPTG induction, in which every average spectrum acquired at the time points of 2~10 h is subtracted by the spectrum of 0 point; band height trends of (c) inclusion body protein and (d) soluble protein as a function of time following IPTG induction at 16 °C

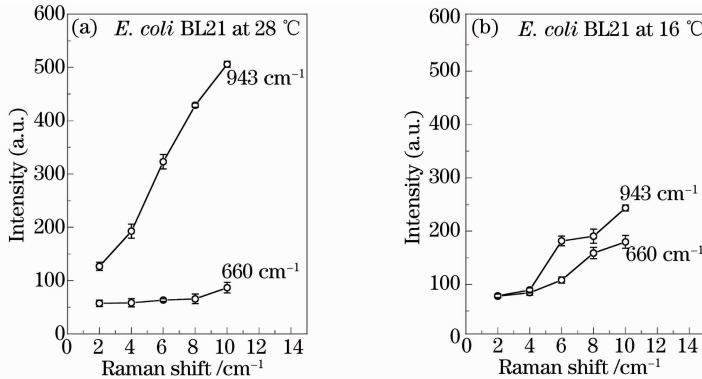


图 6 重组菌 *E. coli* BL21 在(a)28 °C和(b)16 °C表达的非重组蛋白拉曼谱峰变化趋势图

Fig. 6 Band height trends of non-recombinant protein of *E. coli* BL21 cultured at (a) 28 °C and (b) 16 °C as a function of time following IPTG induction

3.6 讨论

重组菌在表达重组蛋白过程中,环境的胁迫、宿主代谢系统受干扰以及重组蛋白的过量表达等原因,通常会产生高比例的不溶性包涵体蛋白,这些蛋白由于错误的折叠,往往不具备生物学活性。降低培养温度、改变培养基组成、选择合适表达菌株、使用共表达分子伴侣、融合标签等方法,可以减少包涵体的表达,增加有生物活性的可溶性蛋白表达量^[23]。

应用 LTRS 单细胞分析技术分析重组菌表达的蛋白,结果显示 14-3-3b 可溶性蛋白与包涵体蛋

白有明显不同的拉曼光谱特征峰,可溶性蛋白特征峰是 763,1002,1363,1451 和 1665 cm^{-1} ,包涵体蛋白特征峰为 900,1033,1328 和 1415 cm^{-1} 。从蛋白质的拉曼光谱可以得到其一级和二级结构的信息,包括主链、侧链的构象,还有芳香族氨基酸的信息^[16]。两者拉曼光谱峰的差异,反映了它们在构象上的差异性,可溶性蛋白主链构象属于无规则卷曲、 β -折叠或 β -回折,包涵体 900 cm^{-1} 信号峰很强,属于 C-C 伸缩振动构象敏感的 α -螺旋构象。在侧链构象上,可溶性蛋白归属于色氨酸 763 cm^{-1} 和

1363 cm^{-1} 的敏感峰信号很强,表明色氨酸埋藏在分子内部,包涵体色氨酸残基是外翻的,反映出两种蛋白的折叠是不同的;比较 1002, 1033, 1415 和 1446 cm^{-1} 的差异,说明包涵体蛋白质有共价键的断裂或交联。因此,LTRS 技术可以用于检测 14-3-3b 可溶性蛋白和包涵体蛋白^[11]。

SDS-PAGE 电泳结果表明,重组菌 *E. coli* BL21 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下,诱导过量表达形成的重组蛋白主要是包涵体形式,将温度降到 16 $^{\circ}\text{C}$ 时进行诱导表达,可溶性蛋白几乎占目标蛋白的 80%。在单细胞水平上,应用 LTRS 分析大肠杆菌在 16 $^{\circ}\text{C}$ 和 28 $^{\circ}\text{C}$ 两种温度下,重组蛋白在不同时间点的表达水平,结果显示在两种温度条件下,都出现可溶性蛋白和包涵体特征峰。但是,16 $^{\circ}\text{C}$ 时可溶性蛋白特征峰 763,1002,1363,1451 和 1665 cm^{-1} 的强度随着诱导时间的延长而增加,增加幅度远大于包涵体蛋白的 900,1033,1328 和 1415 cm^{-1} 特征峰,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养的结果正好相反,包涵体蛋白增加值大于可溶性蛋白,说明在 16 $^{\circ}\text{C}$ 相对低温培养条件下,重组菌表达的蛋白主要是可溶性蛋白,也有少量包涵体蛋白,而在较高温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 时主要形成包涵体蛋白,也有部分可溶性蛋白,说明在 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养重组菌过程中表达的蛋白有利于 14-3-3b 可溶性蛋白的形成,且随着诱导时间的增加其含量也增多,结果与 SDS-PAGE 电泳分析一致。

低温会降低蛋白质合成的速率,但是可以改变多肽折叠的动力学,使正确折叠的蛋白增加^[24-25]。在较低温度下,与蛋白质折叠以及聚合相关的蛋白表达更有利于菌体形成稳定的可溶性蛋白^[26]。而在相对高温条件下,重组蛋白合成速度快,高水平表达使新生肽链的聚集速率超过蛋白正确折叠的速率^[27-28],二硫键不能正确配对,过多的蛋白肽链在折叠过程中容易形成错误的折叠,导致大部分生成不可溶的包涵体蛋白^[23]。16 $^{\circ}\text{C}$ 低温诱导大肠杆菌表达重组蛋白过程的拉曼光谱结果显示,可溶性蛋白主链中归属肽键 C-N 伸缩振动的 1066 cm^{-1} 以及酰胺 I 的 1665 cm^{-1} ,侧链中归属色氨酸的谱峰 763 cm^{-1} 和 1363 cm^{-1} 以及苯丙氨酸谱峰 1002 cm^{-1} ,这些峰强度随时间延长的增加幅度远大于 28 $^{\circ}\text{C}$ 时的增加幅度,而包涵体蛋白谱峰,包括归属 C-C 键伸缩振动峰的 900 cm^{-1} ,苯丙氨酸的 1033 cm^{-1} ,C-H 变形的 1328 cm^{-1} 和羧基(CO₂-)对称伸缩振动的 1415 cm^{-1} ,其变化趋势正好相反,说明温度的变化改变了多肽折叠的动力

学^[29],蛋白质分子侧链所处的微环境变化对蛋白分子的特性有大的影响^[30],低温下正确折叠蛋白增加的信息可以通过光谱变化反映出来。另外,归属蛋白质侧链基团的胱氨酸 C-S 伸缩振动峰 660 cm^{-1} ,在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,也随着诱导时间的延长而明显增加,是否与蛋白质折叠相关,有待深入研究。

4 结 论

LTRS 能够从单个活细胞中获得无标记的生化结构信息,可以应用于重组菌细胞动态表达重组蛋白的过程研究,推测重组蛋白的主要表达形式。该技术方法具有无侵害性和无标记性,是快速实时监测重组蛋白在单个宿主细胞中表达的一种有效技术。

参 考 文 献

- 1 Z Y Li, C P Liu, L Q Zhu, *et al.*. The chaperone activity of trigger factor is distinct from its isomerase activity during co-expression with adenylate kinase in *Escherichia coli* [J]. FEBS Lett, 2001, 506(2): 108-112.
- 2 H Lilie, E Schwarz, R Rudolph. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* [J]. Curr Opin Biotech, 1998, 9(5): 497-501.
- 3 M Gribskov, R R Burgess. Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase [J]. Gene, 1983, 26(2): 109-118.
- 4 Zhou Ying, Li Bingying, Li Xuebao. Roles of 14-3-3 proteins in regulating plant development [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2012, 47(1): 55-64.
周 颖, 李冰樱, 李学宝. 14-3-3 蛋白对植物发育的调控作用 [J]. 植物学报, 2012, 47(1): 55-64.
- 5 Wu Jiafa, Wu Qiao. Regulatory mechanism and biological function of 14-3-3 protein family [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2005, 27(2): 101-104.
伍家发, 吴 乔. 14-3-3 蛋白家族的调控机制和生物学功能 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(2): 101-104.
- 6 Lu Mingqian, Dong Rong, Wen Shunhua, *et al.*. Detection of formate dehydrogenase protein expression in single living *Escherichia coli* cells by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(12): 1845-1851.
卢明倩, 董 蓉, 温顺华, 等. 单细胞激光拉曼光谱检测重组大肠杆菌细胞表达甲酸脱氢酶 [J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1845-1851.
- 7 C Xie, Y Li. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. J Appl Phys, 2003, 93(5): 2982-2986.
- 8 W Huang, A D Ward, A S Whiteley. Raman tweezers sorting of single microbial cells [J]. Env Microbiol Rep, 2009, 1(1): 44-49.
- 9 J W Chan, H Winhold, M H Corzett, *et al.*. Monitoring dynamic protein expression in living *E. coli* bacterial cells by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. Cytom Part A, 2007, 71(7): 468-474.
- 10 C Xie, N Nguyen, Y Zhu, *et al.*. Detection of the recombinant

- proteins in single transgenic microbial cell using laser tweezers and Raman spectroscopy[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(24): 9269–9275.
- 11 Zhou Bing, Lu Mingqian, Zhao Liwei, *et al.*. Detection of expression of broad bean 14-3-3b soluble and inclusion body protein in single living *Escherichia coli* cell by laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(12): 1789–1794.
周冰, 卢明倩, 赵丽伟, 等. 激光镊子拉曼光谱检测重组大肠杆菌表达蚕豆 14-3-3b 可溶性蛋白与包涵体蛋白[J]. *分析化学*, 2013, 41(12): 1789–1794.
- 12 Qin Zhaojun, Lai Junzhuo, Liu Bin, *et al.*. Raman spectroscopic analysis of ethanol fermentation at various initial pH levels[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(2): 0215001.
覃赵军, 赖钧灼, 刘斌, 等. 不同初始 pH 值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析[J]. *中国激光*, 2013, 40(2): 0215001.
- 13 C Allen, S Büttner, A D Aragon, *et al.*. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures[J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(1): 89–100.
- 14 Sun Meijuan, Jiang Yuling, Lai Aihua, *et al.*. Analysis of lipid and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* using laser tweezer Raman spectroscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(3): 033001.
孙美娟, 蒋玉凌, 张爱华, 等. 激光镊子拉曼光谱技术分析圆红冬孢酵母生成油脂和类胡萝卜素[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(3): 033001.
- 15 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质的分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 238–240.
- 16 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 17 W S Craig, B P Gaber. Laser Raman scattering from an enzyme of well-documented structure, human carbonic anhydrase B[J]. *J Am Chem Soc*, 1977, 99(12): 4130–4134.
- 18 Luo Xia, Yang Zhirong, Zhu Wen, *et al.*. Studies on structure of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, 27(1): 68–71.
罗霞, 杨志荣, 朱文, 等. 类产碱假单胞菌杀虫蛋白的激光拉曼光谱研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(1): 68–71.
- 19 G Shetty, C Kendall, N Shepherd, *et al.*. Raman spectroscopy: Elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus[J]. *Brit J Cancer*, 2006, 94(10): 1460–1464.
- 20 I Notingher. Raman spectroscopy cell-based biosensors [J]. *Sensors*, 2007, 7(8): 1343–1358.
- 21 Niu Liyuan, Lin Manman, Li Xue, *et al.*. Raman spectroscopy analysis of single white blood cell of DM mouse *in vivo*[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, 49(6): 063001.
牛丽媛, 林漫漫, 李雪, 等. 活体糖尿病小鼠中单个白细胞的拉曼光谱分析[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, 49(6): 063001.
- 22 I Notingher, S Verrier, S Haque, *et al.*. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells[J]. *Biopolymers*, 2003, 72(4): 230–240.
- 23 Jing Mingyan, Sun Jianyi. Protein folding and the formation of inclusion bodies[J]. *Journal of Zhejiang University*, 2004, 30(6): 690–696.
井明艳, 孙建义. 蛋白质的折叠调控与包涵体的形成[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 30(6): 690–696.
- 24 Zhu Hongyu, Li Qiang. Strategies for expression of soluble heterologous proteins in *Escherichia coli*[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2006, 6(1): 150–155.
朱红裕, 李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略[J]. *过程工程学报*, 2006, 6(1): 150–155.
- 25 R S Donovan, C Robinson, B Glick. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter[J]. *J Ind Microbiol*, 1996, 16(3): 145–154.
- 26 P Carter, R F Kelley, M L Rodrigues, *et al.*. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment[J]. *Nat Biotechnol*, 1992, 10(2): 163–167.
- 27 Fang Min, Huang Hualiang. Advances in *in vitro* refolding of inclusion body proteins[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(6): 608–612.
方敏, 黄华梁. 包涵体蛋白体外复性的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(6): 608–612.
- 28 D Ami, A Natalello, P Gatti-Lafranconi, *et al.*. Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(16): 3433–3436.
- 29 M K Shaw, J L Ingraham. Synthesis of macromolecules by *Escherichia coli* near the minimal temperature for growth[J]. *J Bacteriol*, 1967, 94(1): 157–164.
- 30 Wang Huimin. Raman Spectroscopic Studies of Human Stomach Tissues and the Interaction of Fibrinogen with Spermine[D]. Shanghai: East China Normal University, 2006. 27–29.
王慧敏. 拉曼光谱研究胃组织及纤维蛋白原与精胺相互作用[D]. 上海: 华东师范大学, 2006. 27–29.

栏目编辑:吴秀娟