

分子伴侣共表达对核糖核酸酶 R 可溶性表达的影响

李轲, 李站胜, 韩双艳

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 核糖核酸外切酶 R (RNase R) 可降解几乎所有的线性 RNA 分子和 Y 结构 RNA, 但不易降解环形 RNA (circ RNA)、套索结构 (lariat RNA) 和 3' 突出末端少于 7 个核苷酸的双链 RNA 分子, 因此可以构建内含子 cDNA 文库用于可变剪切研究。本研究构建了含 *rnr* 基因的重组表达质粒 pET-22b (+)-*rnr*, 并将其表达产物纯化后通过 SDS-PAGE 分析和酶活性评价, 确认 *rnr* 基因在大肠杆菌中已实现表达。之后构建 4 种分子伴侣共表达系统 (pGro7、pKJE7、pTf16 和 pG-Tf2)。4 种分子伴侣质粒分别与重组表达质粒 pET-22b (+)-*rnr* 共表达, 筛选最适分子伴侣质粒, 并优化共表达条件, 提高目的蛋白可溶性表达。实验表明, 分子伴侣质粒 pGro7 使蛋白表达量提高了 43.80%, 效果最为显著; 20 °C 诱导时目的蛋白的可溶性表达最高; 当 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 mg/mL 时, 分子伴侣质粒 pGro7 使蛋白表达量提高了 54.50%。通过使用分子伴侣共表达系统及优化表达条件提高了 RNase R 的可溶性表达, 为该酶进一步研究奠定了基础。

关键词: RNase R; 可溶性表达; 分子伴侣; 共表达系统

文章编号: 1673-9078(2019)11-93-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.013

Effect of Co-expression of Molecular Chaperones on the Soluble Expression of Ribonuclease R

LI Ke, LI Zhan-sheng, HAN Shuang-yan

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Ribonucleic acid exonuclease R (RNase R) can degrade almost all the linear RNA molecules and Y-structured RNAs, but does not readily degrade circRNAs, lariat RNAs and double-stranded RNA molecules with less than 7 nucleosides. Therefore, intron cDNA library can be constructed for the intron splicing variable research. In this study, a recombinant expression plasmid pET-22b(+)-*rnr* containing RNR gene was constructed. The expression product was purified and analyzed by SDS-PAGE while the enzyme activity was also determined to confirm that the *rnr* gene has been expressed in *E. coli*. Then, four molecular chaperone co-expression systems (pGro7, pKJE7, pTf16 and pG-Tf2) were constructed. The four molecular chaperone plasmids were co-expressed respectively with the recombinant expression plasmid pET-22b(+)-*rnr*. The optimal molecular chaperone plasmid was screened and the co-expression conditions were optimized to improve the soluble expression of the target protein. The results showed that the molecular chaperone plasmid pGro7 was the most effective and could increase the expression of protein by 43.80%, with the soluble expression of the target protein reaching the highest at an inducing temperature of 20 °C. When the concentration of L-arabinose was 0.50 mg/mL, the molecular chaperone plasmid pGro7 increased the expression of protein by 54.50%. The soluble expression of RNase R could be improved by using the molecular chaperone co-expression system and optimizing the expression conditions, which laid a foundation for further study of RNase R.

Key words: RNase R; soluble expression; molecular chaperone; co-expression system

到目前为止, 已在大肠杆菌中鉴定了 7 种不同的 3'-5'RNase, 在 RNA 成熟、转换和降解中起重要作用^[1]。其中核糖核酸酶 II (RNase II), 核糖核酸酶 R (RNase R), 多核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 等都在 mRNA 降解中起作用^[2]。但这些外切核糖核酸酶的底

物特异性是不同的。RNase II 更喜欢均聚物, 如 poly(A), 而 RNase R 在 rRNA 上更具活性^[3]。RNase R 的蛋白结构分为 S1 区、CSD 区、RNB 区及其他, RNB 区包含催化中心; RNase R 在特定的 RNA 通道中降解 3'-poly(A)^[4]。尽管 RNase R 可消化几乎所有的线性 RNA 分子和 Y 结构 RNA, 但当 3' 游离末端碱基数小于 7 时 RNase R 无法降解 RNA, 所以可以用于 DNA-RNA 和 RNA-RNA 杂合子的研究^[4-6]。RNase R 处理真核细胞提取的总 RNA 样品, 可得到其无法消

收稿日期: 2019-01-24

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012AA022205)

作者简介: 李轲 (1993-), 男, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 韩双艳 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物酶学

化的环形 RNA (circRNA)、套索结构(lariat RNA)^[6], 由于没有线性 RNA 干扰, 以此构建的内含子 cDNA 文库用于可变剪切研究。因此我们常把 RNase R 作为一种分析真核细胞 RNA 的工具。

近些年来, RNA 研究领域特别是环状 RNA 算是目前生物医学研究领域的新兴热点方向之一, RNase R 的活性直接影响其处理后环状 RNA 的质量, 因此 RNase R 的生产和纯化值得深入的研究。RNase R 主要通过大肠杆菌表达, Cheng 等^[5]通过构建了来自 *E. coli* K12 CMA201 ($\Delta rnb201::tet$) 的 *rnr* 基因的重组质粒 pET15R, 实现了 RNase R 在 BL21(DE3)/pLys 的可溶性表达。Hossain 等^[7]通过构建了重组质粒 pET44R (D272N, D716A, E717A), 得到了定点突变的 RNase R, 并比较 RNase R 的核酸酶和解旋酶活性。原核表达系统如大肠杆菌中, 大量呈无活性包涵体形式存在的异源蛋白, 无法正确折叠形成天然构型, 可能严重制约后续研究和生产应用。研究结果表明共表达分子伴侣和折叠酶, 可以在一定程度上减少大肠杆菌中包涵体的形成, 从而增加异源蛋白的可溶性表达^[8]。如万娟等^[9]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, 提高了糖基转移酶 Med-ORF8 可溶性表达量。

本研究利用原核表达系统 *Escherichia coli* BL21(DE3)及 pET-22b(+)进行 RNase R 的高效表达, 利用亲和层析纯化了重组蛋白, 并测定其酶活性以验证该表达正确与否。为了解决蛋白折叠不正确的问题, 本研究利用 TaKaRa 公司的分子伴侣 pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16 分别和 RNase R 共表达, 从而尽可能减少包涵体产生, 促进可溶性表达。Valent Q A 等^[10]的研究表明 *dnaK* 的缺失由 *groEL* 的表达增加以及其他分子伴侣完全补偿, 大肠杆菌表达荧光素酶等在 *dnaK* 和 *groEL* 协同作用时翻译后折叠的动力学速率较慢。所以实验过程中考虑不用 *dnaK-dnaJ-grpE* 和 *groEL-groES* 共同表达的分子伴侣质粒 pG-KJE8。同时, 本研究筛选出最适分子伴侣并优化了发酵条件, 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

1.1.1 菌株与质粒

含有目的基因的菌 *E. coli* HB101 购自 GDMCC GIM1.560。

克隆宿主菌 *E. coli* Top10、表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pET-22b(+)和 pKJE7、pGro7、

pTf16、pG-Tf2 四种分子伴侣质粒由华南理工大学生物科学与工程学院微生物酶学实验室保存。

1.1.2 主要试剂和培养基

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、KOD DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNAMarker、PCR Mix 和标准分子量蛋白质购自 TaKaRa 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自 GeneRay 公司; IPTG、原核基因组提取试剂盒, 质粒提取试剂盒, 凝胶回收试剂盒, RNA 提取试剂盒购自 Magen 公司; L-阿拉伯糖, 氨苄青霉素 (Amp)、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。

Buffer A 缓冲液: 0.50 mol/L 氯化钠, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8;

Buffer B 缓冲液: 0.50 mol/L 氯化钠, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.30 mol/L 咪唑, pH 8;

LB 培养基 (g/L): 5 g 酵母粉, 10 g 蛋白胨, 10 g NaCl。

1.1.3 仪器与设备

SKY2102S 小容量恒温培养摇床, 上海速坤仪器仪表有限公司; 5804R 型高速冷冻台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; UV-2350 型分光光度计, UNICO 公司; PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; HisTrapTM FF crude 预装柱, 美国通用电气公司。

1.2 方法

1.2.1 pET-22b(+)-*rnr* 载体构建及鉴定

从 NCBI 上找到该基因的序列 (Gene ID: 948692), 利用 SnapGene 对 *rnr* 和 pET-22b(+)进行分析, 在基因的上下游分别引入 *Bam*H I (GGATCC) 和 *Xho* I (CTCGAG) 这两个限制性内切酶位点 (下划线标出), 为了增加 6*His-Tag 去除目的基因末尾的 TAG, 在酶切位点外端添加保护碱基, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。引物序列: *rnr* S: 5'-CGGGATCC GTCACAAGATCCTTTCCA-3'; *rnr* A: 5'-CCG CTCGAGCTCTGCCACTTTTTTC-3'。含目的基因 *rnr* 的菌体 *Escherichia coli* HB 101 用摇瓶培养过夜, 提取基因组待用。

以提取的细菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增目的基因, 经过凝胶电泳鉴定后, 用凝胶回收试剂盒纯化回收。目的基因 *rnr* 和载体 pET-22b(+)分别进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 凝胶电泳鉴定后切胶回收。基因和线性化载体加 T4 DNA 连接酶, 16 °C 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆。

挑取单菌落进行菌落 PCR, 凝胶电泳鉴定阳性转化子。之后将阳性转化子培养过夜, 提取质粒, 然后进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切验证, 并且将其送上海生工生物工程有限公司测序。将鉴定后的质粒转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞, 在氨苄青霉素抗性平板上挑取单菌落培养, 提取质粒并双酶切鉴定, 将验证正确的菌种-80℃甘油管保藏。

1.2.2 目的蛋白的表达、纯化及 SDS-PAGE 分析

挑取活化的重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET22b(+)-*rnr* 单菌落于 10 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min, 培养 12~16 h。将过夜培养的菌液按 1:100 接种量转接至 100 mL 的 LB 液体培养基 (含 50 μg/mL 氨苄青霉素) 中, 37℃, 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.60~0.80。加入 1 mol/L IPTG 至终浓度为 0.80 mmol/L, 20℃, 250 r/min 条件下诱导培养 3 h。

将发酵液 5000 r/min 离心 15 min, 除去上清后, 用蒸馏水将菌体洗涤两次后加入 Buffer A 缓冲液悬浮细胞。在冰浴条件下利用超声波细胞粉碎机对重组大肠杆菌进行破碎, 破碎条件: 6 mm 变幅杆, 60 min, 50 mL 菌体悬浮液。对破碎后的悬浮液进行冷冻离心处理, 10000 r/min, 4℃, 60 min, 分离上清和沉淀, 4℃保存待用。

利用 Ni 亲和层析的方法, 对预处理后的菌体破碎上清进行纯化。安装好 Ni 柱 (His TagTMFF), 分别用 4 倍柱体积的超纯水、Buffer B、Buffer A 清洗至基线平, 然后以恒定 3 mL/min 的流速上样, 最后以一定浓度的 Buffer B (预实验中成比例稀释, 确定最佳浓度) 将目的蛋白洗脱并收集, 分别用 5 倍柱体积的超纯水、

20%乙醇清洗至基线平, 关闭系统, 卸下柱子并置于 4℃冰箱保存。Ni 柱纯化后的样品中含有较高浓度的咪唑等离子, 对于酶学性质的分析存在一定的影响, 需对纯化后样品进行脱盐处理, 利用 Sephadex G-200 分子筛层析对上述纯化样品进行脱盐并可以达到进一步纯化蛋白的目的。

取粗酶液、Ni 柱纯化样品和分子筛层析样品进行 SDS-PAGE 分析, 并确定其纯度。

1.2.3 分子伴侣共表达系统的构建

把 pKJE7、pGro7、pTf16、pG-Tf2 四种分子伴侣质粒 (表 1) 分别转化新制备的 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 20 mg/L 氯霉素的平板筛选阳性克隆, 获得含分子伴侣质粒的基因工程菌。分子伴侣重组菌制备感受态细胞, 之后将重组质粒 pET22b(+)-*rnr* 转化新制备的感受态细胞, 用含有 20 mg/L 氯霉素和 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆, 获得同时含 pET22b(+)-*rnr* 和分子伴侣质粒的基因工程菌。将只含重组质粒 pET22b(+)-*rnr* 的表达菌株作为阴性对照。

1.2.4 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 氨苄青霉素和 20 mg/L 氯霉素的 10 mL LB 培养基中, 37℃、200 r/min 过夜培养后, 接种于新鲜培养基中, 待菌液 OD₆₀₀ 约为 0.60~0.80 时加入 0.80 mmol/L IPTG 和 10 μg/L 的四环素或 1 mg/mL 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), 30℃诱导 3 h, 发酵液 5000 r/min 离心 5 min, 弃去上清。菌体处理及 SDS-PAGE 分析参照方法 “1.2.2”。

表 1 表达载体及分子伴侣质粒

Table 1 Expression vector and molecular chaperone plasmid

质粒	分子伴侣组合	启动子	诱导物	抗性标记
pET22b(+)- <i>rnr</i>	-	T7	IPTG	氨苄青霉素
pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	araB	L-阿拉伯糖	氯霉素
pGro7	<i>groES-groEL</i>	araB	L-阿拉伯糖	氯霉素
pTf16	<i>tig</i>	araB	L-阿拉伯糖	氯霉素
pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	Pzt1	四环素	氯霉素

1.2.5 共表达系统的最佳诱导条件

参照方法 “1.2.2”, 并在共表达菌诱导起始时加入 0.50 mg/mL 的 L-阿拉伯糖, 分别在 16、20、25、30 和 37℃诱导表达 4 h, 5000 r/min 离心 5 min 收集等量菌体, 重悬于冰预冷的裂解缓冲液冰浴中超声破碎, 12000 r/min 离心 3 min 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表达产物。

在共表达菌株诱导起始时, 分别加入 0.25、0.50、0.75、1 mg/mL 的 L-阿拉伯糖, 加入终浓度为 0.80 mmol/L 的 IPTG, 20℃、200 r/min 诱导表达 4 h, 5000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 置于冰上超声破碎, SDS-PAGE 分析可溶性表达情况。

1.2.6 酶活力评价及蛋白表达量测定

RNase R 酶活检测是以提取酵母细胞 RNA 为底

物, RNase R 将其转化成酸溶核苷酸, 通过检测寡核苷酸在凝胶电泳时的变化确定。酵母细胞 RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒说明开展。反应体系为 10×RNaseR Reaction Buffer(GESENEED 公司)2 μL、重组 RNase R 1 μL、Total RNA 10 μL, DEPC 水补足 20 μL, 37 °C 孵育 10 min, 85 °C 水浴 3 min 使酶灭活, 将混合物进行 RNA 非变性凝胶电泳, 照胶仪上成像并在 Image J 上处理。

参照 Bradford^[11]方法进行蛋白浓度测定。

应用软件 Image J 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-22b(+)-*rnr* 的构建及鉴定

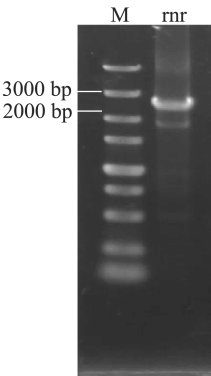


图 1 基因 PC 鉴定结果

Fig.1 Identification of gene by PCR

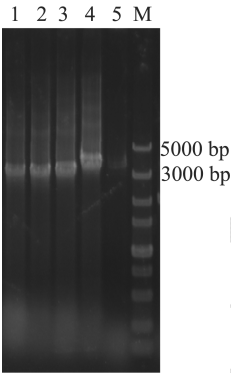


图 2 菌落 PCR 结果

Fig.2 Colony PCR results

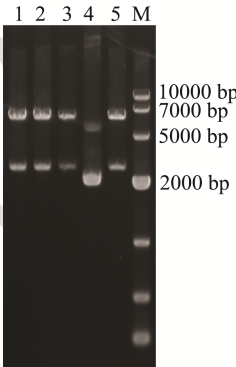


图 3 双酶切鉴定结果

Fig.3 Identification of enzyme digestion

以 *E.coli* HB101 基因组作为模板, 通过 PCR 扩增

得到一定浓度的基因片段。PCR 扩增结果如下图 1 所示。从图中可以看出 *rnr* 回收样品得条带单一且明亮, 可知样品比较纯。目的基因 *rnr* 的长度介于 3000 bp 和 2000 bp 之间, 与预期结果 2500 bp 相符。

Escherichia coli str.K-12 substr.MG1655 chromosome,complete genome
Sequence ID:CP032667.1 Length:4639694 Number of Matches:1
Range 1:4114083 to 4116526 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
4514 bits(2444)	0.0	2444/2444(100%)	0/2444(0%)	Plus / Minus
Query 20	AGATGTCACAAAGATCCTTTCCAGGAACGCGAAGCTGAAAAATACGCGAATCCCATCCCTA	79		
Sbjct 4116526	AGATGTCACAAAGATCCTTTCCAGGAACGCGAAGCTGAAAAATACGCGAATCCCATCCCTA	4116467		
Query 80	GTCGGGAATTTATCCTCGAACATTTAACCAAACTGAAAAACCGCCAGCCGTGATGAGC	139		
Sbjct 4116466	GTCGGGAATTTATCCTCGAACATTTAACCAAACTGAAAAACCGCCAGCCGTGATGAGC	4116407		
Query 140	TGGCGGTAGAACTGCACATTGAAGGCGAAGAGCAGCTTGAAGGCCTGCGTCGCCGCTGC	199		
Sbjct 4116406	TGGCGGTAGAACTGCACATTGAAGGCGAAGAGCAGCTTGAAGGCCTGCGTCGCCGCTGC	4116347		
Query 200	GCGCGATGGAGCGCGATGGTCAACTGGTCTTCACTCGTCGTCAGTGCTATGCGCTGCCGG	259		
Sbjct 4116346	GCGCGATGGAGCGCGATGGTCAACTGGTCTTCACTCGTCGTCAGTGCTATGCGCTGCCGG	4116287		
Query 260	AACGCCCTCGACCTGGTGAAAGGTACCGTTATTGGCCACCGTGATGGCTACGGCTTTCTGC	319		
Sbjct 4116286	AACGCCCTCGACCTGGTGAAAGGTACCGTTATTGGCCACCGTGATGGCTACGGCTTTCTGC	4116227		
Query 320	GGGTTGAAGGCGTAAAGATGATTTGTATCTCTCCAGCGAGCAGATGAAAACCTGCATTTC	379		
Sbjct 4116226	GGGTTGAAGGCGTAAAGATGATTTGTATCTCTCCAGCGAGCAGATGAAAACCTGCATTTC	4116167		
Query 380	ATGGCGATCAGGTGCTGGCTCAGCCGCTGGGTGCTGACCGTAAAGGTGCTGCTGAAGCGC	439		
Sbjct 4116166	ATGGCGATCAGGTGCTGGCTCAGCCGCTGGGTGCTGACCGTAAAGGTGCTGCTGAAGCGC	4116107		
Query 440	GTAATTGCCCGCTACTGGTGCCAAAAACCAAGCAGATTGTTGGTCGCTACTTTACCGAAG	499		
Sbjct 4116106	GTAATTGCCCGCTACTGGTGCCAAAAACCAAGCAGATTGTTGGTCGCTACTTTACCGAAG	4116047		
Query 500	CGGGCGTCGGCTTTGTGGTTCTTACGACAGCCGCTCTGAGCTTCGATATCTTAATCCCGC	559		
Sbjct 4116046	CGGGCGTCGGCTTTGTGGTTCTTACGACAGCCGCTCTGAGCTTCGATATCTTAATCCCGC	4115987		

图 4 测序结果与比对

Fig.4 Sequencing results and comparison

*Bam*H I 和 *Xho* I 分别对基因 *rnr* 和质粒 pET-22b(+)进行双酶切,纯化回收之后利用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化 *E.coli* TOP10 感受态细胞,利用 LBA 平板进行抗性筛选,菌落 PCR 鉴定阳性转化子。菌落 PCR 鉴定结果如图 2 所示。从图中可以看出,编号 1、2、3 的基因片段的长度介于 3000 bp 和 2000 bp 之间,与预期结果相符,初步判断 pET-22b(+)对应的转化子已构建成功。

菌落 PCR 鉴定的阳性转化子,将其转接至 LBA 液体培养基中培养,保藏菌种并提取重组质粒进行双酶切鉴定,结果如图 3 所示。从图中能看出编号 1、2、3、5 的菌株,酶切两条带大小约为 5500 bp 和 2500 bp,符合预期结果,可以初步判断为重组质粒构建成功。

将编号 1、2、3、5 的质粒,送至上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果与目的基因 *rnr* 比对结果如图 4 所示,可以得出结论 pET-22b(+)-*rnr* 已构建成功。

2.2 目的蛋白的诱导表达及纯化

参照方法“1.2.2”对核糖核酸酶重组菌进行发酵,取重组菌 BL21(DE3)/pET22b(+)与 BL21(DE3)/pET-22b(+)-*rnr* 发酵液离心后的菌体,直接 SDS-PAGE 鉴定,结果如图 5 所示,可以看出 BL21 (DE3)/pET-22b(+)-*rnr* 在 100 ku 处出现了相应的条带,而 BL21(DE3)/pET22b(+)并无此条带,与预期结果一致,即初步说明重组菌株表达出 RNase R。

将细胞破碎液在 10000 r/min, 4 °C 条件下离心 60 min,并收集离心上清液。上清液利用 AKTA 蛋白纯化系统进行纯化,其中 80% Buffer B (咪唑浓度为 240 mmol/L)条件下洗脱的收集液为酶液。分别对粗酶液、Ni 柱纯化样品、分子筛处理后样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析,测定目的蛋白的纯度,结果如图 6 所示,分析可知 SDS-PAGE 电泳胶图 100 ku 处有一蛋白条带,且无明显杂带,纯化效果较好。后续实验检测显示镍柱纯化后的蛋白纯度达到 95%以上。

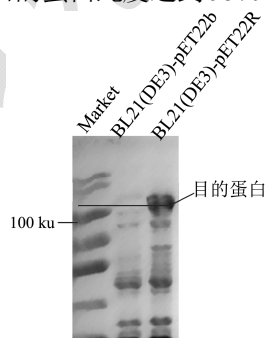


图 5 蛋白鉴定结果

Fig.5 Protein identification results

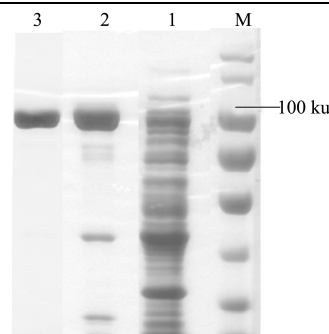


图 6 重组 RNase R 在不同纯化步骤的 SDS-PAGE 图

Fig.6 SDS-PAGE pattern of RNase R samples from different steps of purification

注: M: protein maker; 1: 粗酶液; 2: Ni 柱亲和层析; 3: Sephadex G-200 分子筛层析。

2.3 共表达菌的构建

分别转入四种分子伴侣质粒的 *E.coli* BL21(DE3)经抗性平板筛选,挑取单菌落培养并提取质粒进行验证,电泳结果如图 7 所示,图中 pGro7、pKJE7、pTf16、pG-Tf2 大小符合预期,表明 4 种分子伴侣已转入表达菌株中。

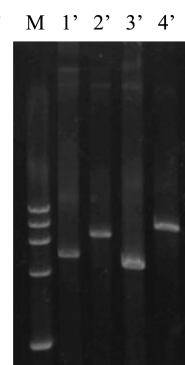


图 7 酶切鉴定结果

Fig.7 Identification of enzyme digestion

注: M: DL10000 DNA Maker; 1'~4'分别为 pGro7、pKJE7、pTf16、pG-Tf2。

2.4 分子伴侣与目的蛋白共表达

分别将 4 种分子伴侣质粒共表达菌诱导表达目的蛋白,蛋白表达情况如图 8 所示, pET-22b(+)-*rnr* 与 4 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 Image J 灰度扫描, *E.coli* BL21(DE3)/pET-22b(+)-*rnr* 单独表达时,目的蛋白在上清中的含量为 16%,与 pGro7、pKJE7、pTf16、pG-Tf2 分子伴侣质粒分别共表达后,可溶性蛋白的量各为 23%、21%、16%和 16%。其中与 pGro7 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 43.8%。

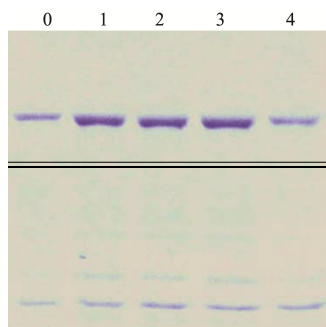


图8 分子伴侣共表达系统中目的蛋白表达水平

Fig.8 Expression of target protein in molecular chaperone co-expression system

注: 0: 无分子伴侣; 1~4: 分别为 pGro7、pKJE7、pTf16、pG-Tf2。

2.5 酶活性检测

挑取酵母菌 GS115 的单菌落进行摇瓶培养, 20~24 h 后取部分菌液离心并收集菌体, 按照试剂盒说明提取 RNA, 将不加 RNase R 的反应体系作阴性对照组, 加 RNase R (GESENEED 公司) 的反应体系作阳性对照组, 和加入本实验表达纯化的 RNase R 的反应体系对比, 进行 RNA 非变性凝胶电泳, 结果如下图 9 所示, 图 9 可以看出阴性对照组无明显变化, 说明在 RNase R 缺失的情况下, 反应体系中其它成分不具备降解 RNA 的能力。而泳道 1 显示实验组的 RNA 完全降解, 表明 RNA 降解是 RNase R 作用的结果。对比阳性对照组和实验组, 在相同反应条件下 RNA 显示均无残留, 表明本实验表达制备的 RNase R 酶活性接近或超过商业酶。

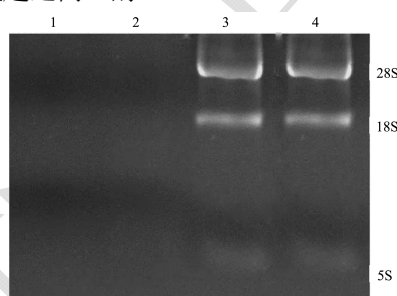


图9 RNA 非变性凝胶电泳

Fig.9 RNA non-deformed gel electrophoresis

注: 1: 实验组, 2: 阳性对照组, 3: 阴性对照组, 4: RNA。

2.6 共表达系统的最佳诱导温度

如图 10 所示, 以不加分子伴侣质粒的菌株作对照, 分别在在 37 °C、30 °C、25 °C、20 °C、16 °C 等不同温度下对重组菌株进行发酵培养, 得到纯化的 RNase R, 用 Bradford 法测其含量, 其中 RNase R 与

分子伴侣质粒 pGro7 共表达时, 蛋白表达量明显提高; 当发酵温度为 20 °C 时蛋白表达量最高达 0.08 mg/mL, 而发酵温度较高 (37 °C、30 °C) 和较低 (16 °C) 时, 蛋白表达量有所降低, 即最适的温度为 20 °C。

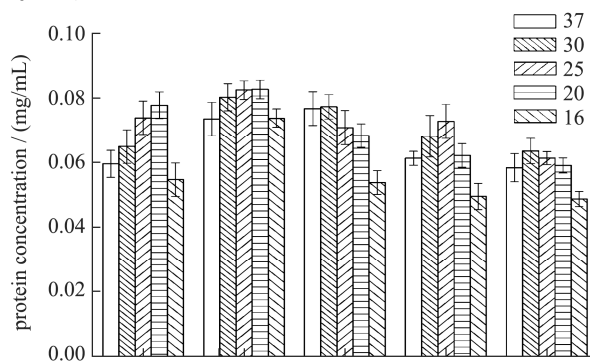


图10 不同温度下共表达系统中目的蛋白表达水平

Fig.10 The expression level of target protein in co-expression system at different temperatures

注: 0: 对照组, 1~4: 分别代表 pGro7、pKJE7、pTf16、pG-Tf2 共表达系统。

2.7 L-阿拉伯糖浓度对共表达的影响

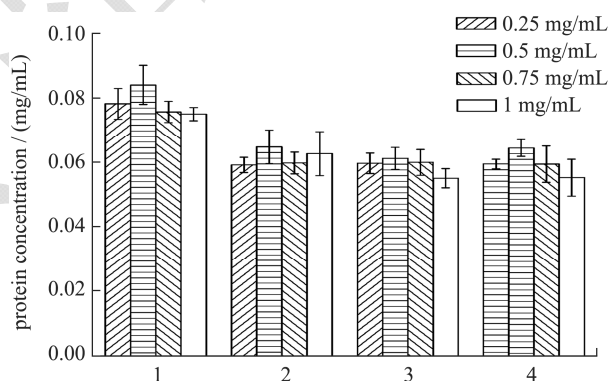


图11 不同浓度 L-阿拉伯糖时共表达系统中目的蛋白表达水平

Fig.11 The expression level of target protein in co-expression system of L-arabinose at different concentrations

注: 1~4: 分别代表 pGro7、pKJE7、pTf16、pG-Tf2 共表达系统。

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表达, 其终浓度分别为 0.25、0.50、0.75、1 mg/mL, 结果如图 11 所示, L-阿拉伯糖浓度影响 RNase R 表达。当 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 mg/mL 时, 与分子伴侣质粒 pGro7 共表达后, 蛋白表达量最高达到 0.08 mg/mL; 当 L-阿拉伯糖浓度达到 1 mg/mL 时, 与分子伴侣 pGro7 共表达菌株的蛋白表达量最低只有 0.05 mg/mL。RNase R 表达量在 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 mg/mL 时达到最大, 说明最适的 L-阿拉伯糖浓度为 0.50 mg/mL。L-阿拉伯糖浓度较高时不利于目

的蛋白的可溶性表达,可能高浓度会导致分子伴侣的过度表达,使得菌体压力过大,不利于目的蛋白的表达。

3 结论

3.1 环形 RNA 越来越受到研究者的重视,是 RNA 研究领域继 miRNA 后又一大热点。因此 RNase R 诱导表达和纯化分析就值得深入研究。本研究通过高效表达菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)得到了有外切酶活性的 RNase R,并摸索了蛋白纯化的最佳条件。为了解决诱导表达时产生的大量包涵体,本研究引入了分子伴侣共表达系统,采用了 4 种分子伴侣质粒(pGro7、pKJE7、pG-Tf2 和 pTf16)分别与 pET-22b(+)-*rnr* 进行共表达。SDS-PAGE 分析结果显示,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。其中, pGro7 分子伴侣质粒共表达后, RNase R 的可溶性表达量提高最为明显。质粒 pGro7 表达的分子伴侣组合 GroEL-GroES 在大肠杆菌中是经典组合,由 ATP 协同帮助蛋白质的正确折叠,促进蛋白的可溶性表达。但 pTf16 质粒表达出的 *tig* 未使蛋白表达明显提高,这说明每种分子伴侣组合可能对特定的一类的蛋白起作用。Teter S A 等^[12]的研究表明 *tig* 是与新生链结合的分子伴侣,能阻止其他蛋白质与短新生链的相互作用,所以 *groEL-groES* 促进重组蛋白 RNase R 的正确折叠,但 pG-Tf2 质粒表达分子伴侣组合 *groES-groEL-tig* 后蛋白表达未有明显提高。对共表达体系进行发酵条件优化,研究发现诱导温度为 20℃、L-阿拉伯糖浓度为 0.50 mg/mL 时,明显改善目的蛋白的可溶性表达,蛋白表达量提高了 54.50%,达到 0.08 mg/mL,酶活性达到商业酶水平。

3.2 尽管采用分子伴侣蛋白共表达和优化表达条件促使更多包涵体正确折叠,但是提高大肠杆菌异源蛋白的可溶性表达仍有待进一步研究^[13],如通过蛋白质工程方法改变酶的空间结构从而减少包涵体形成等方法提高蛋白表达量。本研究为获得大量可溶性 RNase R、进行工业化生产应用研究奠定了良好基础。

参考文献

- [1] Kaberdin V R, Singh D, Linchao S. Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria [J]. Journal of Biomedical Science, 2011, 18(1): 23
- [2] Deutscher M P, Li Z. Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism [J]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 2001, 66: 67-105
- [3] Cheng Z F, Deutscher M P. Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. comparison with RNase II. [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(24): 21624
- [4] Vincent H A, Deutscher M P. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(40): 29769-29775
- [5] Susana Domingues, Ricardo N, Moreira, et al. The role of RNase R in trans-translation and ribosomal quality control [J]. Biochimie, 2015, 114: 113-118
- [6] Suzuki H, Zuo Y, Wang J, et al. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(8): e63
- [7] Hossain S T, Malhotra A, Deutscher M P. How RNase R degrades structured rna: role of the helicase activity and the S1 domain [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(15): 7877-7887
- [8] Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, et al. Chaperone co-expression 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 & Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1694-1699
- [9] 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
WAN Juan, DENG Hui-qun, ZHANG Bi-qian, 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
- [10] Bhandari V, Houry W A. Substrate interaction networks of the *Escherichia coli* chaperones: trigger factor, DnaK and GroEL [J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2015, 883: 271-94
- [11] Kruger N J. The Bradford Method for Protein Quantitation [M]. Basic Protein and Peptide Protocols, 1994
- [12] Teter S A, Houry W A, Ang D, et al. Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains [J]. Cell, 1999, 97(6): 755
- [13] Wu J, Li Z, 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: S719-S720