

文章编号: 1003-8701(2015)03-0023-03

木瓜凝乳蛋白酶基因的克隆及在原核细胞中的表达

蔡勤安¹, 于志晶¹, 尚丽霞¹, 许诺², 曾军¹, 马瑞^{1*}, 刘艳芝^{1*}

(1. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033; 2. 吉林大学生命科学学院, 长春 130012)

摘要:以青番木瓜总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术扩增出木瓜凝乳蛋白酶基因 *CHY* (*chymopapain*), 构建带有 His-tag 的原核表达载体 pEASY-E1-*CHY*。将该重组载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中, 重组菌株用 IPTG 诱导表达, 在诱导 6 h, IPTG 浓度为 0.05 mmol/L 时重组蛋白表达量最高。SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-Blot 杂交分析结果表明蛋白大小为 45 kDa。用脱脂奶粉进行凝乳分析, 证明此木瓜凝乳蛋白酶具有凝乳活性, 此结果为今后利用生物技术进行木瓜凝乳蛋白酶工程化生产奠定了基础。

关键词:木瓜凝乳蛋白酶; 基因克隆; 原核表达; 活性检测

中图分类号: Q946

文献标识码: A

DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.03.006

Cloning of Chymopapain Gene and Its Expression in E.coli

CAI Qin-an¹, YU Zhi-jing¹, SHANG Li-xia¹, XU Nuo²,

ZENG Jun¹, MA Rui^{1*}, LIU Yan-zhi^{1*}

(1. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;

2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: Chymopapain gene (*CHY*) was cloned from papaya by RT-PCR, and constructed into pEASY-E1 to generate recombinant plasmid pEASY-E1-*CHY*. The plasmid was transformed into E.coli. The expression was induced by IPTG and the induction time was optimized. The condition of suitable expression was 6h and 0.05 mmol/L IPTG. The analysis of SDS-PAGE and Western-Blot indicated that the molecular weight of protein was 45kDa. The chymopapain was expressed successfully in BL21 (DE3) and the enzyme activity was identified by curd experiment. The result will be helpful to the chymopapain engineering.

Keywords: Chymopapain; Gene cloning; Prokaryotic expression; Activity identification

木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)是木瓜乳汁中一种含半胱氨酸蛋白酶, 它不但具有蛋白酶活性还具有凝乳活性, Jansen 于 1941 年首先发现并将其命名为木瓜凝乳蛋白酶^[1]。它不仅可以用来制造干酪^[2], 嫩肉, 还可以用于治疗腰椎间盘突出症, 肿瘤的辅助治疗, Rh 血型的鉴定以及用于消炎等^[3-6]。因此木瓜凝乳蛋白酶在医药领域上的用途使其越来越受到重视。

本实验从青番木瓜中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 技术扩增出木瓜凝乳蛋白酶基因 *Chymopapain*, 并构建了 pEASY-E1-*CHY* 原核表达载体, 重组

质粒在大肠杆菌 BL21 中实现了原核表达, 并初步鉴定其具有凝乳活性, 为木瓜凝乳蛋白酶工程化生产奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和植物材料

大肠杆菌 trans-T1 感受态细胞和 BL21 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司, 青番木瓜购于沃尔玛超市。

1.1.2 酶、试剂盒和生化试剂

RNAiso Plus, 反转录试剂盒, DL2000 DNA Marker, Protein Molecular Weight Marker (Low) 购于宝生物工程(大连)有限公司; 2xTransTaq-T PCR Super Mix, pEASY-E1 Expression Kit 表达试剂盒, IPTG 购于北京全式金生物技术有限公司; Tryp-

收稿日期: 2014-11-20

作者简介: 蔡勤安(1975-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事作物基因工程研究。

通讯作者: 马瑞, 男, 研究员, E-mail: ruimaai@126.com

刘艳芝, 女, 副研究员, E-mail: liuyaz-g@126.com

tone, Yeast Extract 购于OXOID公司; NaCl 购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂粉购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 和 AxyPrep Plasmid Mini-prep Kit 购于康宁生命科学(吴江)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 木瓜 cDNA 的合成

参考《分子克隆实验指南》的方法分离提取番木瓜总 RNA, 将 RNA 利用反转录试剂盒反转录成 cDNA 并稀释至 50 ng/ μ L。

1.2.2 引物的设计与合成

根据 Gene Bank 中 *CHY*(ID: AJ131996.1) 的基因序列设计两条特异引物 P1, P2。上游引物 P1: 5'-ATGGCTACCATGTCAAGCATCAGC-3', 下游引物 P2: 5'-AATATACGTATGGAACCCAGATC-3'。

1.2.3 *CHY*(*chymopapain*) 原核表达载体的构建

以稀释后的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *CHY* 基因。反应在 25 μ L 体系中进行, PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收目的片段。按照 pEASY-E1 Expression Kit 说明书将回收的 PCR 产物连接到表达载体 pEASY-E1 上转化 Trans-T1, 经 amp^r 抗性的 LB 固体培养基筛选。挑取抗性重组子交由长春库美公司进行测序, 并与 Gene Bank 上已发布的序列进行比对, 将序列插入方向正确的克隆命名为 pEASY-E1-*CHY*。提取该质粒转化 BL21 感受态细胞。

1.2.4 *CHY* 基因表达条件优化

将携带原核表达载体 pEASY-E1-*CHY* 的工程菌 BL21 细胞在 LB 培养基上培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 分别加入 0、0.01、0.02、0.03、0.05、0.07、0.1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h, 并通过 SDS 电泳分析 IPTG 浓度对诱导结果的差异。并在加入 0.05 mmol/L 的 IPTG 条件下诱导 0、2、4、6、8 h, 分析不同诱导时间对诱导结果的差异。

1.2.5 目的蛋白的纯化回收

将经 0.05 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的菌液离心收集菌体, 并用 0.1 倍体积的 PBS 缓冲液重悬菌体, 超声波破碎后通过 15 000 r/min 离心 5 min 收集上清并利用 Ni 柱纯化目的蛋白。通过 SDS 电泳分析纯化结果, 利用 Bradford 法测定回收蛋白产量。

1.2.6 木瓜凝乳蛋白酶的凝乳实验

参照 Arima 方法^[7], 将脱脂乳粉用 0.01 mol/L CaCl₂ 配制 10% 复原脱脂乳溶液, 取 0.1 mL (10

mg/mL) 木瓜凝乳蛋白酶加入 1 mL 10% 复原脱脂乳中, 于 35 $^{\circ}$ C 处理 30 min 后观察是否出现凝乳现象, 并将 0.1 mL 提取缓冲液 PBS 作为阴性对照加入 1 mL 10% 复原脱脂乳中。

2 结果与分析

2.1 木瓜凝乳蛋白酶 3 的克隆与原核表达载体构建

如图 1 所示, 通过 RT-PCR 成功获得与目的基因大小相符的 DNA 片段。将该片段连接到原核表达载体 pEASY-E1 并进行测序。选择目的基因片段正确插入到原核表达载体 pEASY-E1 的重组子, 及 T7-启动子 \rightarrow SD 序列 \rightarrow Chymopapain \rightarrow T7 终止子的重组子命名为 pEASY-E1-*CHY*。

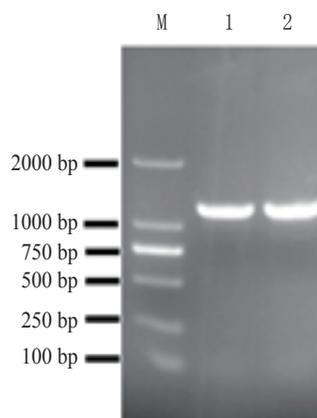


图 1 木瓜凝乳蛋白酶基因 *chymopapain* 的克隆与原核表达载体的构建

M: DL 2000

1: RT-PCR 2: 重组质粒 pEASY-E1-*CHY* PCR

2.2 *CHY* 的表达条件优化

通过对不同诱导条件的比较发现, 当加入 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L 时, 目的基因的蛋白表达量不再增加(图 2-A); 而当诱导时间达到 6 h 以后

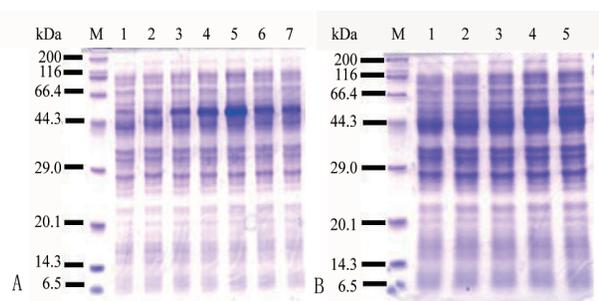


图 2 SDS-PAGE 检测 *chymopapain* 的表达

A: 不同 IPTG 浓度对 *Chymopapain* 表达的影响, M: Premixed Protein Marker (Broad), 1~7: IPTG 浓度为 0、0.01、0.02、0.03、0.05、0.07、0.1 mmol/L; B: 不同时间对 *Chymopapain* 表达的影响, M: Premixed Protein Marker (Broad), 1~5: 0、2、4、6、8 h

目的基因的蛋白表达量也没有显著变化(图2-B)。可以推断最佳诱导条件为37℃,0.05 mmol/L IPTG诱导6 h。

2.3 目的蛋白的纯化回收

如图3所示,SDS-PAGE结果表明,经Ni柱纯化的洗脱液中含有一条分子量大小为45kDa的蛋白条带。

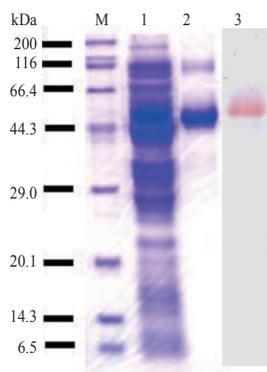


图3 木瓜凝乳蛋白酶的纯化与鉴定

M: Premixed Protein Marker(Broad), 1: 大肠杆菌总可溶蛋白, 2: 纯化的 Chymopapain 蛋白, 3: Western 杂交

2.4 木瓜凝乳蛋白酶凝乳实验

如图4所示,当脱脂乳中加入重组木瓜蛋白酶,于30 min后完全凝乳,而添加不含重组凝乳酶的缓冲液做对照时,脂乳未出现凝乳现象。实验结果表明:重组的木瓜蛋白酶具有明显的生物活性。

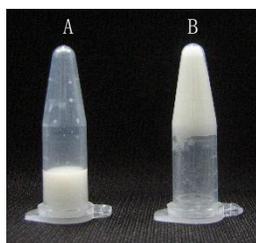


图4 凝乳酶的凝乳实验

A: 对照 B: 凝乳实验

3 讨论与结论

作为食品添加剂,凝乳酶在1990年就被美国食品和药物管理局注册通过,最先在美国使用,随后陆续被其他国家和地区认可^[8]。近年来随着对凝乳酶研究的深入,发现凝乳酶中的木瓜凝乳蛋白酶与菠萝蛋白酶、胰蛋白酶制成的复合酶对肿瘤细胞有杀伤作用^[9-11],说明木瓜凝乳蛋白酶在医药领域也具有应用潜力。

原核表达系统可以在短时间内生产出大量的目标产物而受到欢迎,同时又有遗传背景清晰,

周期短,易于工程化等优点,而且调节表达条件可以使蛋白以可溶的形式产生。本研究发现在加入0.5 mmol/L的IPTG,在温度为37℃,培养6 h蛋白以可溶性形式存在,较少形成包涵体。生产的蛋白不用经过复性处理。简化了生产程序,提高了蛋白产率。便于在酶活测定时计算产量和活性的关系。因此,以原核表达系统生产木瓜凝乳蛋白酶是很好的工程化生产方式。

本研究与张俊瑞^[12],普燕^[13]等人研究结果基本一致,但是在IPTG诱导浓度、诱导时间有一定的差异,差异可能与处理条件、离子浓度、表达的重组凝乳酶的来源以及修饰差别有关,具体原因需进一步研究。

本实验成功克隆了木瓜凝乳蛋白酶基因,可以在原核中表达,在37℃,0.05 mmol/L IPTG诱导条件下表达6 h,表达量最大,产物以可溶形式存在。经SDS-PAGE和Western-Blot分析分子量约为45 kDa。凝乳实验结果表明表达产物具有生物学活性。

参考文献:

- [1] E F Jansen, A K Balls. Chymopapain: a new crystalline proteinase from papaya latex[J]. *Biol Chem*, 1941(137): 4592-4601.
- [2] 张旭,高鑫,徐德昌.木瓜凝乳蛋白酶及在微生物中表达研究进展[J]. *中国甜菜糖业*, 2008(4): 41-43.
- [3] Timothy J, David J W. Papaya as a Medicinal Plant[J]. *Genetics and Genomics of Papaya*, 2014(10): 391-407.
- [4] Mariam J, Humera A, Mohammed A, et al. A review on antiulcer drugs of natural origin[J]. *International Journal for Pharmaceutical Research and Review*, 2013(1): 380-390.
- [5] Vickie A, Vaclavik Elizabeth W C. Meat, Poultry, Fish, and Dry Beans[M]. *Essentials of Food Science*, 2014: 133-172.
- [6] Aravind G, S Duraivel, Harish G. Health Benefits and Medicinal Properties of Carica papaya[J]. *Bitterroot*, 2013, 2(2): 156-162.
- [7] Hideyuk ik, Kazuo M. Rapid and Large Scale Isolation of Chymosin by Pepstatin-aminohexyl Agarose[J]. *Agric Bid Chem*, 1978, 42(2): 2227-2231.
- [8] Jacob M, Jaros D, Rohm H. Recent Advances in Milk Clotting Enzymes[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2011, 64(1): 14-30.
- [9] Wald M, Olejar T, Pouckova P, et al. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma[J]. *Life Sci*, 1998, 63(3): 43-48.
- [10] Martin W, Tomáš Olejár, Veronika Šebková, et al. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2001, 47(Suppl1): s16-s22.

(下转第79页)

抗褐纹病育种具有深远的意义。掌握丰富的抗性资源是研究抗病育种工作的首要前提,目前对茄子褐纹病抗源的研究及育种工作仍向纵深方向继续发展,未来的研究工作应在及时监测生理小种的变化同时,进一步寻找新的、有效的褐纹病抗源,更加深入地了解抗原抗病的机理,并有效地利用抗源开展育种工作。只有在茄子育种专家、病理学家、生物技术专家等多方面的密切协作,推动茄子的生物科学技术研究迅猛发展,才能进一步有效地加快茄子品种改良的进程,推动具有优良商品性状茄子的大规模栽培和生产。

参考文献:

- [1] 中国农作物病虫害编辑委员会编. 中国农作物病虫害[M]. 北京:农业出版社,1979:1403.
- [2] 王洪久. 蔬菜病虫害原色图谱[M]. 济南:山东科学技术出版社,1994:11.
- [3] 马珂,丁克坚,汪爱娥. 茄褐纹病研究进展[J]. 安徽农业科学,2005,33(1):130-131.
- [4] 华中农学院,东北农学院主编. 蔬菜病理学[M]. 北京:农业出版社,1979:149-151.
- [5] 甘芳. 茄子褐纹病的发生与防治[J]. 安徽农业,2004(4):13.
- [6] 傅淑珍. 茄子杂种优势的研究[J]. 吉林农业科学,1982(2):82-87.
- [7] 成玉梅,杜爱玲,韦玉霞. 褐纹病菌粗毒素对茄子的致病性研究[J]. 河南农业科学,2004(8):71-75.
- [8] 魏小伞,曹必好,雷建军,等. 茄子抗病育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2010(10):1-8.
- [9] 北京农业大学主编. 农业植物病理学(第2版)[M]. 北京:农业出版社,1979:445-447.
- [10] 吴仁锋,杨绍丽,杨德枝. 茄子褐纹病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国蔬菜,2013(8):80-85.
- [11] 王凯,贾广泉. 茄褐纹病的诊断及防治技术[J]. 西北园艺,2007(3):1.
- [12] 甘芳. 茄褐纹病的防治[J]. 湖南农业,2002(3):14.
- [13] 范玉香. 设施栽培中茄子三大主要病害的防治[J]. 吉林蔬菜,2013(10):36-37.
- [14] Kalda T S. Studies on resistance to Phomopsis blight in eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Vegetable Science(Indian), 1976, 3(1): 65-70.
- [15] Kalda T S. Resistance to Phomopsis blight in eggplant[J]. Vegetable Science(Indian), 1977, 4(2): 90-101.
- [16] 刘学敏,任锡伦,李润霞. 茄子对褐纹病(*Phomopsis vexans*)的抗性遗传研究[J]. 吉林农业大学学报,1998,20(4):1-7.
- [17] Clark MS(英). 植物分子生物学-实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998:4-7.
- [18] 朱华武,姚元干,刘志敏,等. 茄子抗青枯病基因的 RAPD 标记研究[J]. 园艺学报,2005,32(2):321-323.
- [19] 曹必好,王勇,雷建军,等. 茄子抗青枯病遗传规律及分子标记筛选研究[J]. 园艺进展,2008(8):492-496.
- [20] 高玉梅. 茄子青枯病抗性的遗传规律分析及抗性基因的 AFLP 分子标记[D]. 北京:中国农业科学院,2006.
- [21] 任锡伦,张汉卿. 茄子对褐纹病(*Phomopsis vexans*)抗性的鉴定研究[J]. 吉林农业大学学报,1993,15(2):34-39.
- [22] 张瑞霞. 安茄2号的选育及配套技术的研究[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [23] 吴治国,金龙,杨小亮,等. 天水航天茄子新品种对比试验[J]. 农业科技通讯,2014(2):114-117.
- [24] 任锡伦,张汉卿. 茄子褐纹病抗源 83-02 的抗病机制研究-组织解剖学研究[J]. 种子,1994,6(74):8-12.
- [25] 高梅秀,李树和,刘玉芹,等. 不同砧木对茄子抗病性、生理活性及产量的影响[J]. 园艺学报,2001,28(5):463-465.
- [26] 谢艳华,苏志强,曹学文. 不同砧木嫁接对茄子生长及抗褐纹病的影响[J]. 广东农业科学,2014(15):29-32.
- [27] 方向前,赵洪祥,高德全,等. 离子体处理茄子种子对产量及产值的效果分析[J]. 吉林农业科学,2009,34(4):49-50,55.
- [28] 陈庆英,杨文夺. 茄子数量性状遗传力估算结果与分析[J]. 吉林农业科学,1994(2):66-69.

(上接第25页)

- [11] Mohamed E, Mohamed S, Aishah A. Carica papaya as a source of natural medicine and its utilization in selected pharmaceutical applications[J]. Int J Pharm Pharm Sci, 2014, 6(1): 880-884.
- [12] 张俊瑞,马夏吟,张红星,等. 牛凝乳酶原基因在大肠杆菌

中的高效表达及活性检测[J]. 中国乳品工业,2012,40(3):4-6.

- [13] 普燕,李铁杰,张富春. 原核表达重组牛凝乳酶原及重组牛凝乳酶酶学特性[J]. 食品与发酵工业,2013,39(8):13-19.