

藻胆蛋白在大肠杆菌中的重组表达及其光谱学性质与抗氧化活性研究

朱晓文^{1,2}, 陈华新^{2,3}, 齐宏涛¹, 姜鹏^{2,3}, 李富超^{2,3}, 李荣贵¹

(1. 青岛大学生命科学学院, 山东青岛 266071) (2. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

(3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东青岛 266071)

摘要: 在大肠杆菌中进行了藻胆蛋白的重组表达, 对重组藻胆蛋白进行了分离纯化, 测定了重组藻胆蛋白的光谱学性质和抗氧化活性。结果表明, 以 IPTG 为诱导物时, 当菌液 OD₆₀₀ 为 0.95 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 和 5.0 mmol/L 的 5-氨基酮戊酸 (ALA), 在 18 °C 条件下诱导 24 h 重组蛋白可获得较好表达效果, 表达量达 149.5 mg/L; 以乳糖为诱导物时, 当菌液 OD₆₀₀ 为 1.2 时, 加入终浓度为 1.0 g/L 的乳糖和 5 mmol/L 的 ALA, 在 18 °C 条件下诱导 26 h 重组蛋白可获得较好表达效果, 表达量达 102.9 mg/L。重组藻胆蛋白最大吸收峰位于 550 nm, 最大荧光发射峰位于 562 nm, 相对于 IPTG 诱导表达的重组藻胆蛋白, 经乳糖诱导表达重组藻胆蛋白, 其 550 nm 处具有较强的光吸收, 562 nm 处具有较高荧光强度, 同时也具有较高的羟基自由基和超氧阴离子的清除能力。

关键词: 藻胆蛋白; 乳糖; IPTG; 诱导表达; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2017)7-43-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.007

Optimization of Expression of Recombinant Phycobiliproteins in *Escherichia coli* and Assessment of Their Spectral Properties and Antioxidant Activity

ZHU Xiao-wen^{1,2}, CHEN Hua-xin^{2,3}, QI Hong-tao¹, JIANG Peng^{2,3}, LI Fu-chao^{2,3}, LI Rong-gui¹

(1.College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China) (2.Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China) (3.Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract: Recombinant phycobiliproteins were expressed in *Escherichia coli*. The overexpressed phycobiliproteins were isolated and purified, and their spectral properties and antioxidant activities were determined. The optimal conditions for the induction of recombinant phycobiliproteins with isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) were identified as following: adding 0.1 mmol/L of IPTG and 5 mmol/L of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) into the growth medium at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.95 and then incubating the cells at 18 °C for 24 h. Under these conditions, the expression level of the phycobiliproteins was 149.5 mg/L. The optimal conditions for the induction of recombinant phycobiliproteins with lactose were adding 1.0 g/L of lactose and 5 mmol/L of 5-ALA to the bacterial culture at an OD₆₀₀ of 1.2, followed by incubation at 18 °C for 26 h. The expression level in this case was 120.9 mg/L. The recombinant phycobiliproteins exhibited maximum absorbance at 550 nm and maximum emission at 562 nm. Compared to recombinant proteins obtained upon induction by IPTG, the recombinant proteins obtained upon induction by lactose had a higher absorbance at 550 nm, higher fluorescence emission at 562 nm, and higher hydroxyl radical and superoxide anion-scavenging activities.

Key words: phycobiliprotein; lactose; isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG); inducible expression; antioxidant activity

收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41276164); 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA11030404); 863 计划项目 (2014AA093505、2014AA093501)

作者简介: 朱晓文 (1989-), 女, 硕士生, 研究方向: 微生物学

通讯作者: 陈华新 (1976-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋生物学;

李荣贵 (1966-), 男, 博士, 研究方向: 微生物学

藻胆蛋白(phycobiliproteins)是某些藻类特有的捕光色素蛋白, 主要存在于蓝藻、红藻、隐藻和少数一些甲藻中, 由开链吡咯结构的藻胆素(phycobilin)和脱辅基蛋白通过硫醚键共价结合而成^[1,2]。藻胆蛋白含有丰富的必需氨基酸^[3], 并且具有抗氧化和清除自由基的作用^[4,5], 在体内和体外都可以防止脂质体过氧

化。因此,可以将藻胆蛋白和其成分制成药品或者口服液,这在“功能食品”、“保健食品”和“设计食品”中都将具有广泛的应用前景。此外,现代医学研究发现,人工合成色素有增加人类致癌几率的危险,而藻胆蛋白是一种安全无毒的天然色素,可取代人工合成的色素和染料,用作食品和化妆品的添加剂^[6]。

目前藻胆蛋白主要是从蓝藻和红藻中提取,藻胆蛋白的制备需要经过藻种选育、培养、回收与纯化等过程,时间及经济成本高。利用代谢工程的方法实现藻胆蛋白在大肠杆菌体内的生物合成^[1],为藻胆蛋白的制备提供了一种新的途径^[1,2]。本实验室在大肠杆菌中构建了嗜热聚球藻别藻蓝蛋白 α 亚基生物合成途径,不仅实现了脱辅基蛋白的高效表达,而且实现了藻红胆素与脱辅基蛋白的共价结合,重组藻胆蛋白呈现出鲜亮的红色。

重组藻胆蛋白的重组表达主要是通过通过在培养液中添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)来诱导目的蛋白的表达,但是 IPTG 作为一种化学试剂,不能被菌体所代谢,后期去除困难,影响藻胆蛋白后续的加工利用;其次 IPTG 本身具有的潜在毒性和高昂的购买价格也限制了其大规模应用。乳糖是一种无毒且廉价易得的可被菌体作为碳源代谢利用的替代诱导物,被称作是工业上最有潜力替代 IPTG 的诱导物^[7]。本研究确定了重组藻胆蛋白的表达条件,对重组藻胆蛋白进行了分离纯化,并分析了其光谱学性质和抗氧化活性,为重组藻胆蛋白的制备和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

载体 pCDF-apcA-cpcS 和 pRSF-PEB、大肠杆菌菌株 *E.coli* BL21(DE3),由中国科学院实验海洋生物学重点实验室构建和保藏;卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、乳糖、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、Tris-HCl、EDTA、硫酸亚铁、盐酸、氯化钠、5-氨基酮戊酸(ALA)、过氧化氢、邻二氮菲(1,10-phenanthroline)和邻苯三酚等试剂,均为分析纯。

TB 发酵培养基:酵母提取物 24 g/L、胰蛋白酶 12 g/L、甘油 4 mL,用去离子水定容至 900 mL,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。磷酸盐缓冲液:2.31 g 磷酸二氢钾,12.54 g 磷酸氢二钾,调节 pH 至 8.0,定容至 100 mL,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。摇瓶发酵均采用 50 mL 三角瓶,每瓶装 13.5 mL 的 TB 和 1.5 mL 磷酸缓冲液。

1.2 主要仪器设备

超净工作台(AIR TECH 型,苏净集团安泰公司),恒温培养振荡器(ZWY-100H 型,上海智城分析仪器制造有限公司),立式压力蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-75S11 型,上海博讯实业有限公司),超声波细胞粉碎机(JY92-II DN 型,宁波新芝超声波仪器厂),高速冷冻离心机(3K15,德国 Sigma 公司),电热恒温培养箱(HH.B11.420 型,上海跃进医疗器械厂),pH 计(TOLEDO 型,METTLER 集团),荧光分光光度计(F4500, HITACHI),紫外-可见分光光度计(UV 1801,北分利瑞),蛋白分离纯化系统(AKTAavant25, GE)。

1.3 试验方法

1.3.1 羟基自由基清除率的测定(邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法)^[8]

取 0.75 mol/L 邻二氮菲溶液 1 mL 于试管中,依次加入磷酸缓冲液(pH 7.4) 2 mL 和超纯水 1 mL,充分混匀后,加入 0.75 mmol/L 硫酸亚铁 1 mL,混匀,加 0.01% H_2O_2 1 mL,于 37 °C 下温育 60 min,536 nm 处测其吸光度 A_p 。用 1 mL 超纯水代替 1 mL H_2O_2 ,测得的吸光度 A_B ,分别加入蛋白样品 100、200、300、400、500 μL 用超纯水补齐至 1 mL,测得的吸光度位 A_S ,清除率(D)计算公式:

$$D(\%)=(A_S-A_p)/(A_B-A_p)\times 100\%$$

1.3.2 清除 $\text{O}_2\cdot$ 能力的测定(邻苯三酚自养化法)^[9]

取 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2) 4.5 mL,置于 25 °C 水浴中预热 20 min,分别加入蛋白样品 200、400、600、800、1000 μL 用超纯水补齐至 1 mL,加入 0.4 mL、25 mmol/L 邻苯三酚溶液,混匀后于 25 °C 水浴中反应 5 min,加入 8 mol/L HCl 1 mL 终止反应,299 nm 处测定吸光度(A_i),空白对照组以相同体积的超纯水代替样品,测定吸光度(A_0),清除率(D)计算公式:

$$D(\%)=(A_0-A_i)/A_0\times 100\%$$

1.3.3 蛋白浓度定量

考马斯亮蓝染色法测定蛋白浓度。标准曲线的绘制:参照标准曲线制作方法的步骤,测定光密度值(OD_{595}),按公式计算可溶蛋白的含量。

1.3.4 诱导表达条件的优化

三角瓶加入 15 mL 的 TB 发酵培养基,过夜的种子液按照 2% 的接种量接种,37 °C,200 r/min 摇菌。诱导物浓度的优化:菌体生长到对数期 OD_{600} 等于 1.0

时添加 IPTG 诱导物至终浓度为 (mmol/L): 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0; 乳糖组添加不同量乳糖至终浓度为 (g/L): 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16、20。于 18 °C 条件下 200 r/min 培养 24 h, 取发酵液 1 mL 离心收集菌体, 磷酸缓冲液悬浮菌体冰水浴中超声破碎, 离心收集上清, 样品用磷酸缓冲液稀释 370 倍后检测荧光值。

最佳诱导时机的优化: 按上述方法接种, 分别在不同 OD₆₀₀ 值下取出三角瓶, 20 °C 水浴降温, 分别加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 和 1.0 g/L 的乳糖, 18 °C, 200 r/min 培养 24 h, 按上述方法取样处理后测其荧光值。

最佳诱导温度的优化: 在最佳诱导时机和最佳诱导物浓度条件下, 分别在 15、18、21、24、27 °C 温度条件下, 200 r/min 继续培养 24 h, 按上述方法取样处理后测其荧光值。

最佳 ALA 浓度的优化: 菌体生长到最佳 OD 值时, 在各组分分别添加 ALA 至终浓度为 (mmol/L): 0、1、5、10、15 和 20。分别加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 和 1.0 g/L 的乳糖后在 18 °C、200 r/min 继续培养 24 h, 按上述方法取样处理后测其荧光值。

最佳诱导时间的优化: 在最佳诱导条件下, 在 200 r/min 下诱导至 18 h 后开始每隔 2~4 h 取出 1 mL 菌液离心, 弃上清菌体于 -20 °C 保存, 待取样时间达 30 h 后结束取样处理并检测其荧光值。

最佳诱导条件下重组藻胆蛋白的表达效果比较: 分别以 IPTG 和乳糖为诱导物, 在最适诱导条件下诱导藻胆蛋白的表达, 每组设置三个平行。待发酵结束后, 每样各取出 1 mL 菌液按上述相同方法处理后测其荧光值。在最佳诱导条件下大量发酵, 发酵菌液经离心后加入一定量的磷酸缓冲液悬浮冰浴条件下超声波破碎, 4 °C 条件下 6500 r/min 离心收集菌体, 结合缓冲液悬浮菌体, 冰水浴超声破碎 30 min, 4 °C 条件下 9500 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 细胞破碎沉淀用磷酸缓冲液悬浮取 1 mL 备用。根据目的蛋白所带 His 标签利用金属螯合亲和层析纯化重组藻胆蛋白。分别取 160 μL 的细胞破碎沉淀液、上清液、和纯化后蛋白液作 SDS-PAGE 电泳, 并通过考马斯亮蓝染色法对纯化后蛋白浓度进行蛋白定量, 分别测定纯化后蛋白的吸收光谱、荧光发射光谱和抗氧化活性。

2 结果与讨论

2.1 诱导物浓度对重组蛋白表达的影响

IPTG 和乳糖是两种常见的诱导物, 图 1 为两种诱导物在不同浓度下诱导藻胆蛋白的表达情况。由图

1a 可以看出添加少量浓度的 IPTG 即可显著增加重组藻胆蛋白表达量, 当诱导物浓度为 0.1 mmol/L 时, 诱导重组藻胆蛋白的表达量最高, 继续增加 IPTG 浓度导致重组蛋白表达量下降。IPTG 可以进入菌体内部发挥诱导作用, 但高浓度 IPTG 对细胞会有一定的毒害作用^[10], 随着 IPTG 浓度不断增加会降低细胞生长而使蛋白的表达量减少; 同时高浓度的 IPTG 还会增加发酵成本。图 1b 为添加不同浓度的乳糖诱导重组藻胆蛋白的表达效果, 添加乳糖量达 1.0 g/L 时即可有效诱导重组藻胆蛋白的表达, 随着乳糖浓度的不断增加其表达量反而会有下降的趋势, 这与乳糖的利用方式有关, 大肠杆菌以主动运输的方式将乳糖转运进入细胞, 而主动运输方式需要消耗大量的质子推动力^[11], 过高浓度的乳糖会导致菌体能量浪费而造成其蛋白表达量的降低。因此, 根据上述实验结果, IPTG 和乳糖最适的诱导浓度分别确定为 0.1 mmol/L 和 1.0 g/L。

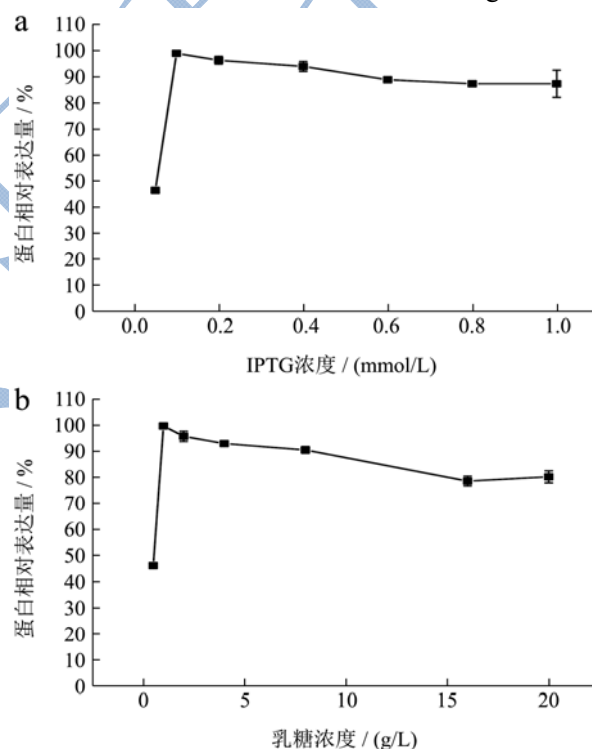


图 1 IPTG (a) 和乳糖 (b) 浓度对重组藻胆蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of IPTG (a) and lactose (b) concentrations on the expression of recombinant proteins

2.2 诱导时机对重组蛋白表达的影响

图 2 为诱导时机对重组藻胆蛋白表达量的影响。从图 2 可以看出, 诱导时机对重组蛋白的表达具有显著的影响; 如图 2a 所示, 在菌液 OD₆₀₀ 达到 0.95 时, IPTG 具有最佳的诱导效果, 过早或过晚加入诱导物均显著的降低重组蛋白表达量。如图 2b 所示, 在菌液 OD₆₀₀ 值为 1.20 时加入乳糖诱导重组蛋白可达到最大

表达量, 小于或大于 1.2 时均显著降低重组蛋白的表达。因此, 当 OD₆₀₀ 为 0.95 和 1.20 时作为 IPTG 和乳糖的最佳诱导时机。

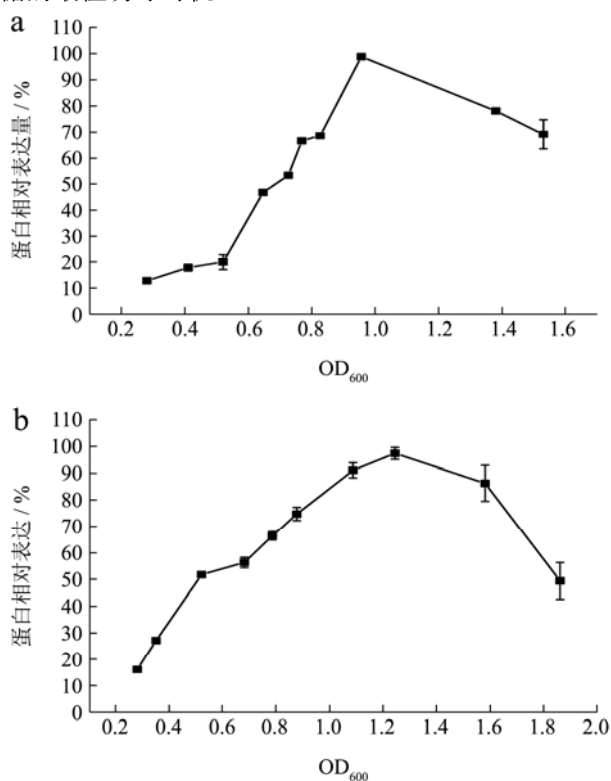


图2 诱导时机对重组藻胆蛋白蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of induction start time on the expression of recombinant proteins

注: a 表示 IPTG; b 表示乳糖。

2.3 诱导温度对重组藻胆蛋白表达的影响

图 3 为最适诱导温度的优化。温度是诱导蛋白表达的重要因素之一, 特别是可溶蛋白的表达。较高的温度有利于菌体细胞的大量增殖, 但是外源蛋白表达过快容易形成不溶性包涵体, 较低的诱导温度虽然会导致目的蛋白合成速率降低, 但是有利于多肽链正确折叠形成有活性的蛋白^[12]。从图 3 可以看出不论是 IPTG 诱导还是乳糖诱导最适温度均为 18 °C, 而随着温度的升高和降低均降低重组藻胆蛋白的表达。

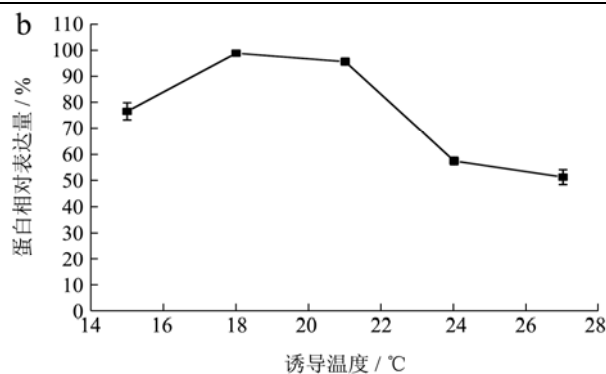
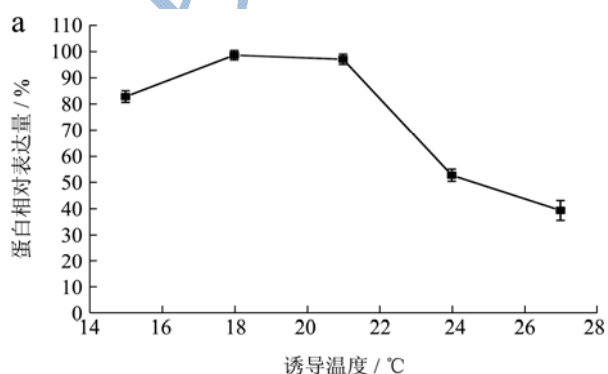


图3 诱导温度对重组蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of induction temperature on the expression of recombinant proteins

注: a 表示 IPTG; b 表示乳糖。

2.4 5-氨基酮戊酸(ALA)浓度对重组蛋白表达的影响

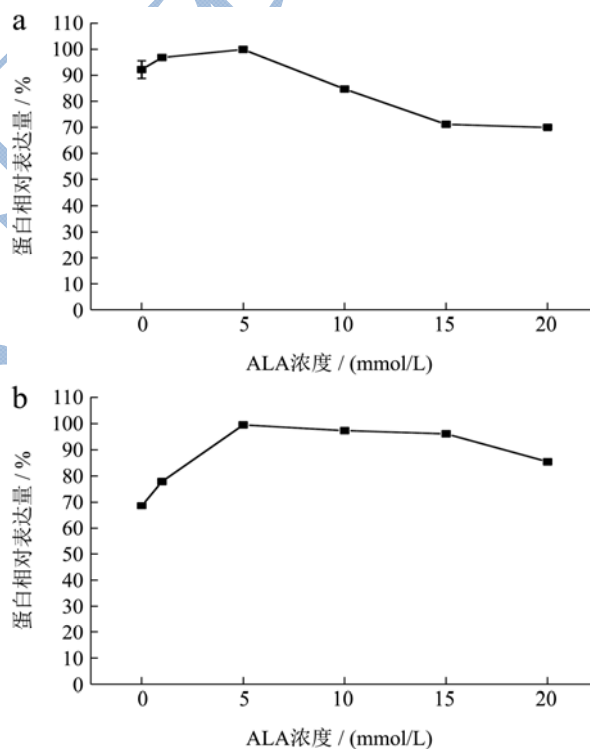


图4 5-氨基酮戊酸(ALA)浓度对重组蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of ALA concentration on the expression of recombinant proteins

注: a 表示 IPTG; b 表示乳糖。

在本研究中, 藻胆色素是以大肠杆菌中的血红素为前体, 在血红素加氧酶和胆绿素还原酶的作用下生产的。已有研究表明, 在培养基中加入血红素生物合成的前体 ALA 可以促进血红素的生物合成^[13,14], 因此本研究尝试通过添加 ALA, 促进藻胆色素的生物合成, 进而提高重组蛋白的表达量。图 4 是添加不同浓

度的 ALA 对重组蛋白表达的影响,以 IPTG 为诱导剂时,添加 ALA 浓度在低于 5 mmol/L 时随着添加浓度的增加其重组蛋白的表达量略有上升,而高于 5 mmol/L 时随着浓度继续增加而显著抑制其表达(图 4a)。以乳糖为诱导剂时,当添加 ALA 浓度低于 5 mmol/L 时随浓度的增加重组蛋白表达量显著增加,继续增加 ALA 浓度对重组蛋白表达无显著影响,当升高到 20 mmol/L 后 ALA 反而会对重组藻胆蛋白的表达产生抑制作用(图 4b)。

2.5 诱导时长的优化

图 5 为诱导时长的优化结果。IPTG 是小分子物质可以直接进入细胞内,诱导蛋白表达机制简单;而乳糖诱导蛋白表达机制比较复杂,乳糖需在细胞本底表达的 β -半乳糖苷透过酶作用下进入细胞,然后在 β -半乳糖苷酶作用下进一步转化为异乳糖才能发挥诱导作用。较短的诱导时间不利于外源蛋白的高效表达,而较长的诱导时间不仅会增加能耗,还会因细胞裂解导致重组蛋白表达量的下降。从图 5a 看出,以 IPTG 为诱导物,诱导时长在 18~24 h 时,重组藻胆蛋白的表达量快速积累,继续诱导其表达量不再增加反而会出现一定的降低。由图 5b 结果显示,当以乳糖为诱导物时,诱导时长在 18~26 h 时重组藻胆蛋白的表达量呈明显的线性增加,在 26 h 时重组蛋白表达量达到最高值。由图 5 结果可知,无论是以 IPTG 为诱导物还是以乳糖为诱导物,其诱导时长过短或过长都不利于重组藻胆蛋白表达量的累积。最终确定 IPTG 为诱导

物的最适诱导时长为 24 h,而以乳糖为诱导物的最适诱导时长为 26 h。

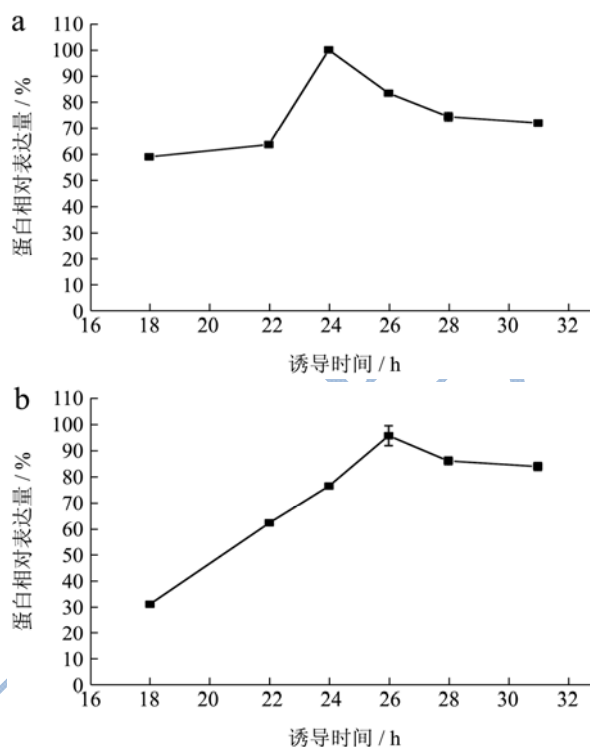


图 5 诱导时长对重组藻胆蛋白表达影响
Fig.5 Effects of post-induction time on the expression of recombinant proteins

注: a 表示 IPTG; b 表示乳糖。

2.6 重组藻胆蛋白的表达与分离纯化

表 1 IPTG 和乳糖诱导重组藻胆蛋白表达的最佳条件

Table 1 Optimal conditions for the expression of recombinant proteins with IPTG or lactose as inducer

诱导剂	诱导剂浓度	OD ₆₀₀	ALA 浓度/(mmol/L)	诱导温度/°C	诱导时间/h	蛋白表达量/(mg/L)
IPTG/(mmol/L)	0.1	0.95	5	18	24	149.5
乳糖/(g/L)	1.0	1.20	5	18	26	102.9

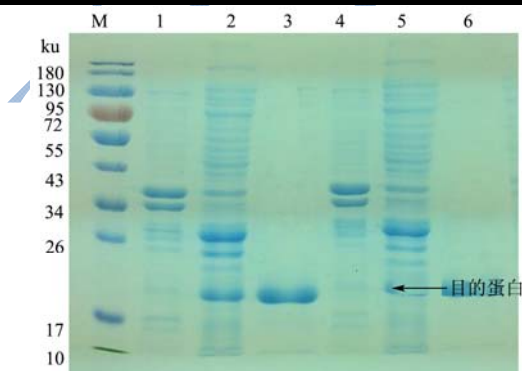


图 6 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis

注:泳道 M-蛋白 Mark;泳道 1-IPTG 诱导沉淀;泳道 2-IPTG 诱导上清;泳道 3-IPTG 诱导纯化液;泳道 4-乳糖诱导沉淀;

泳道 5-乳糖诱导上清;泳道 6-乳糖诱导纯化液。

根据以上实验的优化结果,确定了 IPTG 和乳糖作为诱导剂的最佳发酵条件见表 1。

采用最佳表达条件进行重组藻胆蛋白的表达,用考马斯亮蓝染色法计算纯化后的藻胆蛋白浓度,并分别计算重组藻胆蛋白的表达量,以 IPTG 作为诱导物诱导重组藻胆蛋白表达量为 149.5 mg/L,高于当乳糖作为诱导物时诱导重组藻胆蛋白的表达量(102.9 mg/L)。

根据目的蛋白所带 His 标签利用金属螯合亲和层析纯化重组藻胆蛋白,纯化后蛋白样品经 SDS-PAGE 检测。根据 SDS-PAGE 结果分析(图 6),在 17 ku 和 26 ku 中间有一明显的蛋白条带,根据碱基数量推断目

的蛋白条带大小结果与实验结果一致, 可以确定其为目的蛋白。经柱纯化后目的蛋白的纯度较高, 符合后续实验的纯度要求。

2.7 重组藻胆蛋白的光谱学性质和抗氧化活性

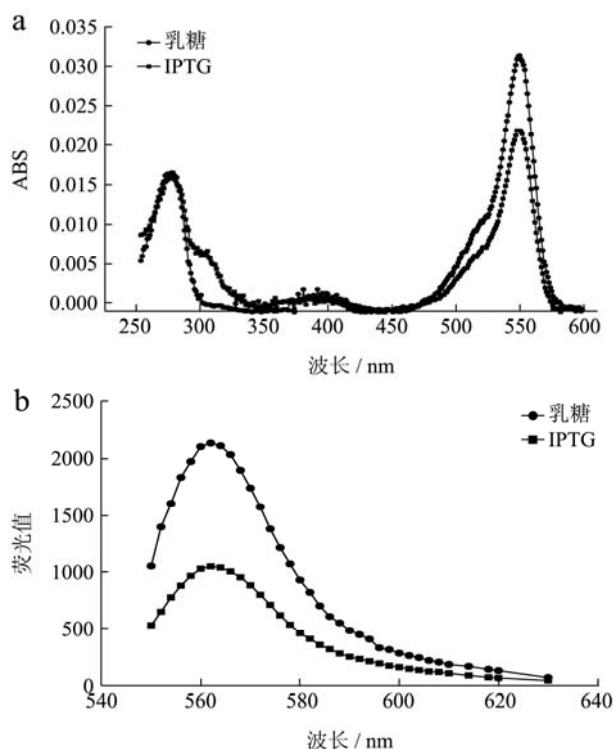


图7 重组藻胆蛋白的吸收光谱和荧光发射光谱

Fig.7 UV-Vis absorption spectra and fluorescence emission spectra of the recombinant proteins expressed under IPTG or lactose induction

注: a, 吸收光谱; b, 荧光发射光谱。

分别对 IPTG 和乳糖最佳诱导条件下表达的重组藻胆蛋白进行吸收光谱和荧光发射光谱的检测。图 7a 是相同蛋白浓度下重组藻胆蛋白的吸收光谱, 重组藻胆蛋白最大吸收峰位于 550 nm, 最大荧光发射峰位于 562 nm。在相同蛋白浓度相同的情况下, 经过乳糖诱导表达藻胆蛋白在 550 nm 处的吸收值明显高于 IPTG 诱导表达蛋白; 根据图 7b 结果显示, 乳糖诱导的重组藻胆蛋白的 562 nm 荧光发射峰值要高于 IPTG 组。结果表明, 用乳糖诱导表达重组藻胆蛋白具有更高的藻胆色素结合率。

图 8 是分别用 IPTG 和乳糖作为诱导物时重组藻胆蛋白的抗氧化活性实验结果。图 8a 是重组藻胆蛋白清除羟自由基的实验结果, 重组藻胆蛋白对·OH 的清除率与蛋白浓度在 0~120 μg/mL 范围内呈现较好的量效关系; 图 8b 是重组表达藻胆蛋白对超氧阴离子的清

除率实验, 实验结果显示当蛋白浓度在浓度 0~100 μg/mL 范围内, 随浓度增加, 重组藻胆蛋白对 O₂⁻ 的清除率明显增强, 但当其浓度在高于 100 μg/mL 时, 随浓度的增加, 对 O₂⁻ 的清除作用变化不明显。整体而言, 经乳糖诱导表达重组藻胆蛋白的抗氧化活性优于 IPTG 诱导表达效果。

已有研究表明, 藻胆蛋白的抗氧化活性主要是由于其含有的藻胆色素发挥作用^[15], 而本文前面的实验结果表明乳糖诱导藻胆蛋白的藻胆色素的结合率高于 IPTG, 因此, 乳糖诱导表达蛋白的抗氧化活性自然会高于 IPTG 的诱导效果, 这也与该实验结果相符。

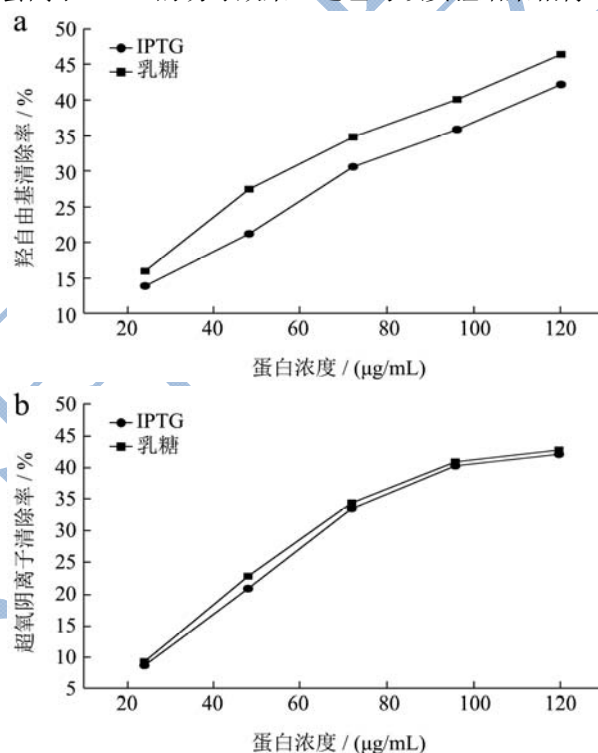


图8 IPTG 和乳糖诱导表达的重组藻胆蛋白抗氧化活性比较

Fig.8 Comparison of the antioxidant activities of recombinant proteins expressed under IPTG or lactose induction

注: a, 清除·OH 活性的量效关系; b, 清除 O₂⁻ 活性的量效关系。

3 结论

IPTG 和乳糖均可作为重组藻胆蛋白的有效诱导物。以 IPTG 为诱导物时的最优条件是: 菌体 OD₆₀₀ 为 0.95 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 和 5 mmol/L 的 ALA 在 18 °C 分别诱导 24 h 后可达到其最佳表达效果, 重组蛋白表达量达到 149.5 mg/L; 以乳糖为诱导物时最优条件是: 菌体 OD₆₀₀ 为 1.2 时加入终浓度为 1.0 g/L 的乳糖和 5 mmol/L 的 ALA 在 18 °C 诱导 26 h 后可达到其最佳表达效果, 重组藻胆蛋白表达量达到 102.9 mg/L。相对于 IPTG 诱导表达的重组

蛋白,经乳糖诱导表达重组藻胆蛋白,其 550 nm 处具有较强的光吸收,562 nm 处具有较高荧光强度,同时也具有较高的抗氧化活性。

参考文献

- [1] Chen H X, Lin H Z, Li F C, et al. Biosynthesis of a stable allophycocyanin beta subunit in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(5): 485-489
- [2] Biswas A, Vasquez Y, Dragomani T, et al. Biosynthesis of cyanobacterial phycobiliproteins in *Escherichia coli*: chromophorylation efficiency and specificity of all bilin lyases from *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(9): 2719-2739
- [3] 陈必链,林跃鑫,黄健.坛紫菜的营养评价[J].中国海洋药物,2001,20(2):51-53
CHEN Bi-lian, LIN Yue-xin, HUANG Jian. Nutritional evaluation of *Porphyra haitanensis* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2001, 20(2): 51-53
- [4] Guan X Y, Zhang W J, Zhang X W, et al. A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant α -phycoyanin of spirulina [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4): 1093-1100
- [5] Zhang W J, Guan X Y, Yang Y, et al. Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin α -subunits by autocatalysis in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2009, 52(2): 135-40
- [6] Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(2): 113-136
- [7] 贾敏,江波,张晓鸣,等.乳糖诱导 D-塔格糖 3-差向异构酶基因在大肠杆菌中的表达[J].食品工业科技,2013,34(13): 143-146,152
JIA Min, JIANG Bo, ZHANG Xiao-ming, et al. Expression of recombinant D-tagatose 3-epimerase in *E.coli* BL21/(DE3) induced by lactose [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(13): 143-146, 152
- [8] 凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004
LING Guan-ting. Antioxidant food and health [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2004
- [9] 范晓,严晓军,房国明,等.高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究[J].水产生物学报,1999,23(5):494-496
FAN Xiao, YAN Xiao-jun, FANG Guo-ming, et al. Antioxidative properties of high molecular weight polyphenols from brown seaweed [J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(5): 494-496
- [10] 王贺,杨瑞金,华霄,等.密苏里游动放线菌葡萄糖异构酶基因 xylA 的克隆表达及其表达条件的优化[J].食品科学, 2010,31(15):171-176
WANG He, YANG Rui-jin, HUA Xiao, et al. Cloning of glucose isomerase gene from *Actinoplanes missouriensis* and its expression in *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2010, 31(15): 171-176
- [11] Jorunn B, Stensvandt A. The effect of β -galactosides on the proton motive force and growth of *Escherichia coli* [J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(8): 2521-2529
- [12] Knappik A, Krebber C, Pluckthunin A. The effect of folding catalysts on the *in vivo* folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology, 1993, 11(1): 77-83
- [13] Michener J K, Nielsen J, Smolke C D. Identification and treatment of heme depletion attributed to overexpression of a lineage of evolved P450 monooxygenases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(47): 19504-19509
- [14] Ramzi A B, Eun H J, Han S O. Improved catalytic activities of a dye-decolorizing peroxidase (DyP) by overexpression of ALA and heme biosynthesis genes in *Escherichia coli* [J]. Process Biochemistry, 2015, 50(8): 1272-1276
- [15] 周站平,陈秀兰,陈超,等.藻胆蛋白脱辅基蛋白对其抗氧化活性的影响[J].海洋科学,2003,27(5):76-80
ZHOU Zhan-ping, CHEN Xiu-lan, CHEN Chao, et al. Effect of apoprotein on antioxidant activity of phycobiliproteins [J]. Marine Sciences, 2003, 27(5): 76-80