

培養溫度對於大腸桿菌異源表現重組熱穩定半乳糖苷酶rAFGAL包涵體生成的影響

Effects of cultivation temperature on the inclusion body formation of heterologous expressed thermostable α -galactosidase rAFGAL in *Escherichia coli*

摘要

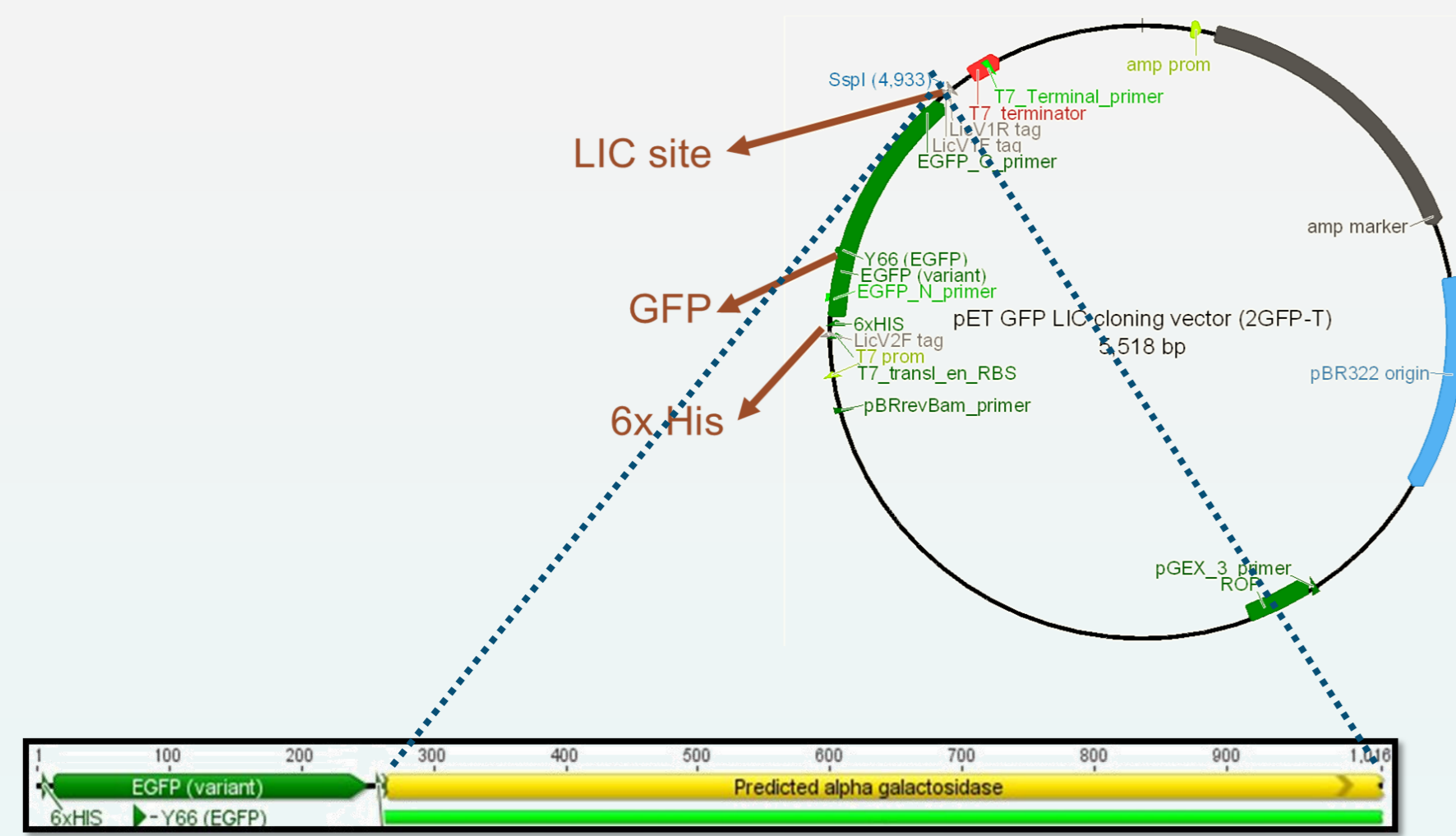
α -半乳糖苷酶具有食品、製糖、飼料、造紙與醫藥上的應用價值。前人研究發現以 pET 表現載體系統在 *E. coli* BL21 (DE3) 中所表現的 rAFGAL-GFP 同時以包涵體及可溶性蛋白的形式存在。由於可溶性蛋白較包涵體容易純化，因此本研究探討降低培養溫度是否能提升可溶性 rAFGAL-GFP 的產量以提升產率。破菌時間測試結果顯示以超音波破菌 9 分鐘後大多數大腸桿菌細胞均已破裂，並觀察到大量的內涵體釋出。雖然各個培養溫度下的 rAFGAL-GFP 總量均隨時間增加，可溶性 rAFGAL-GFP 濃度卻仍偏低 (< 2 mg/L)，多數 rAFGAL-GFP 以包涵體形式存在，顯示即使不加以誘導，降低溫度培養並無助於 rAFGAL-GFP 正確摺疊。

研究方法

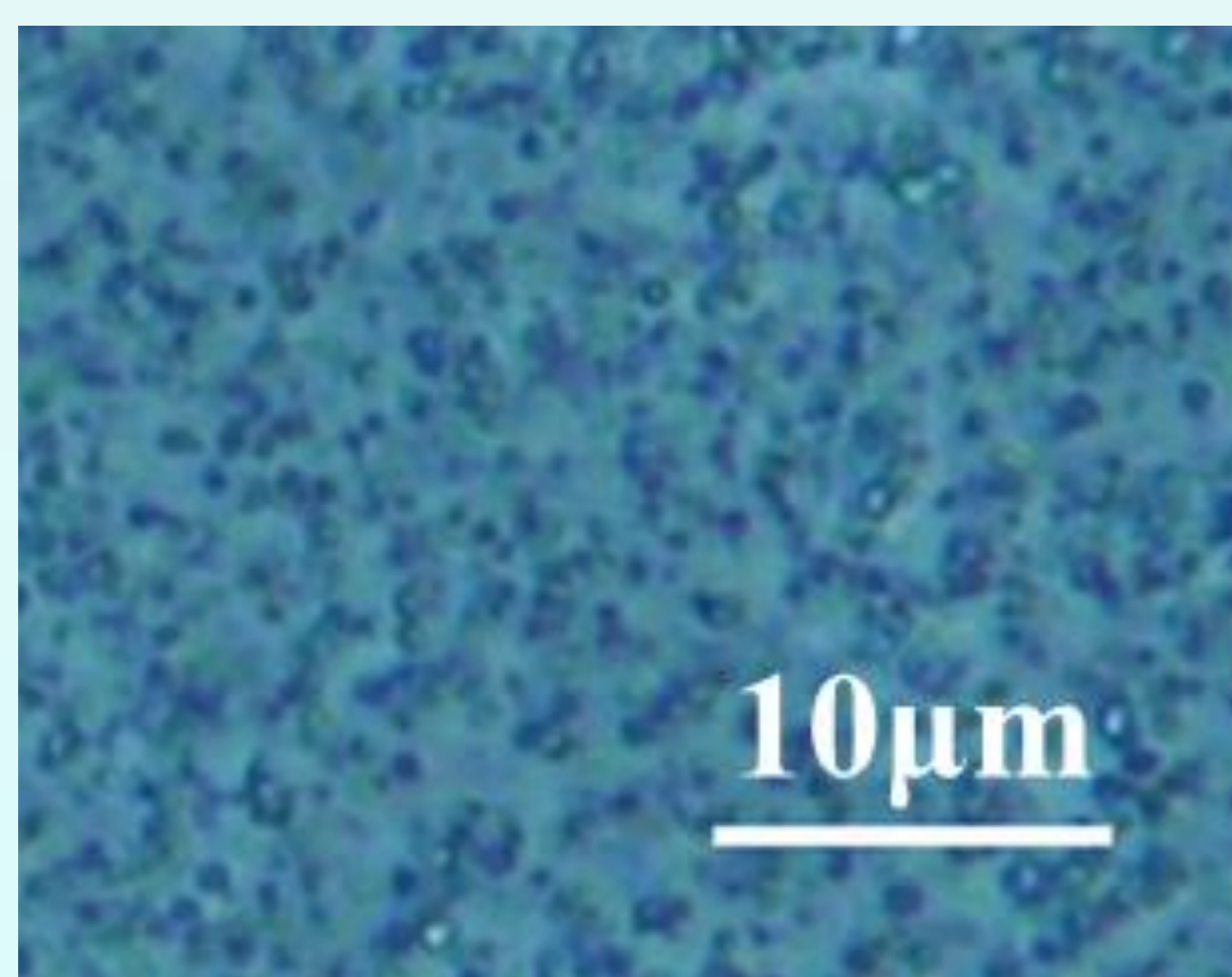
首先由 20、28、37°C 三個溫度下 150 rpm 搖瓶培養的生長曲線選取靜止期前期時間點評估取樣時間。接著測試超音波破菌時間的測試，並以顯微鏡觀察破菌的效果決定破菌的時間。本研究共分析 20、28、37°C 三個溫度下分別培養 12、21 及 30 小時後的 rAFGAL 分別在可溶/不可溶蛋白中的比例。培養液破菌完成後將樣品離心，分為可溶性與不可溶性蛋白兩個部分，並進行 SDS-PAGE 電泳分析，再由影像分析、菌體乾重以及蛋白質濃度測定推算出 rAFGAL 分別在可溶與不可溶性蛋白中的比例。

計算公式：
$$\frac{TSg \times S\%}{((dcw \times 0.55) - TSg) \times IS\% + TSg \times S\%}$$

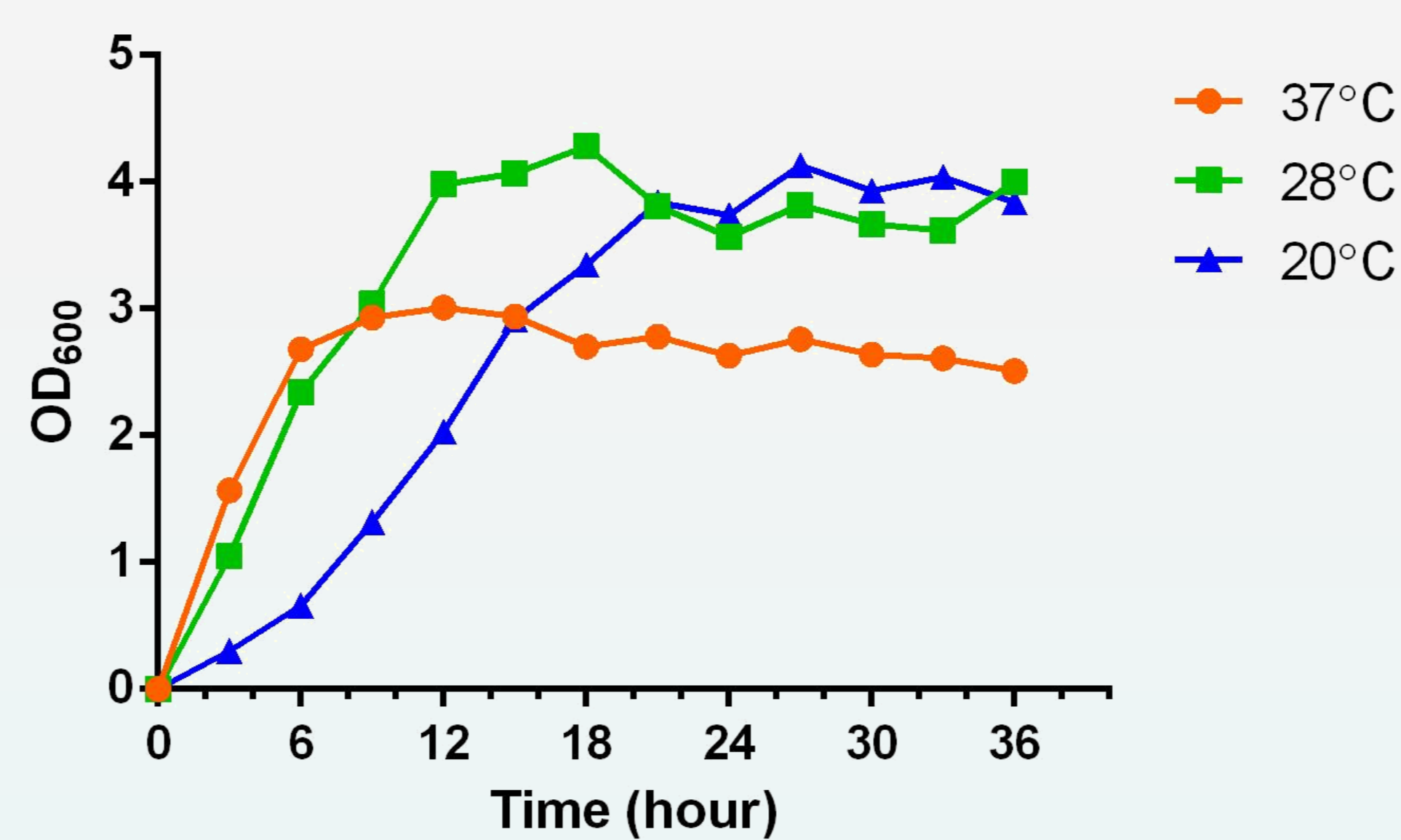
結果



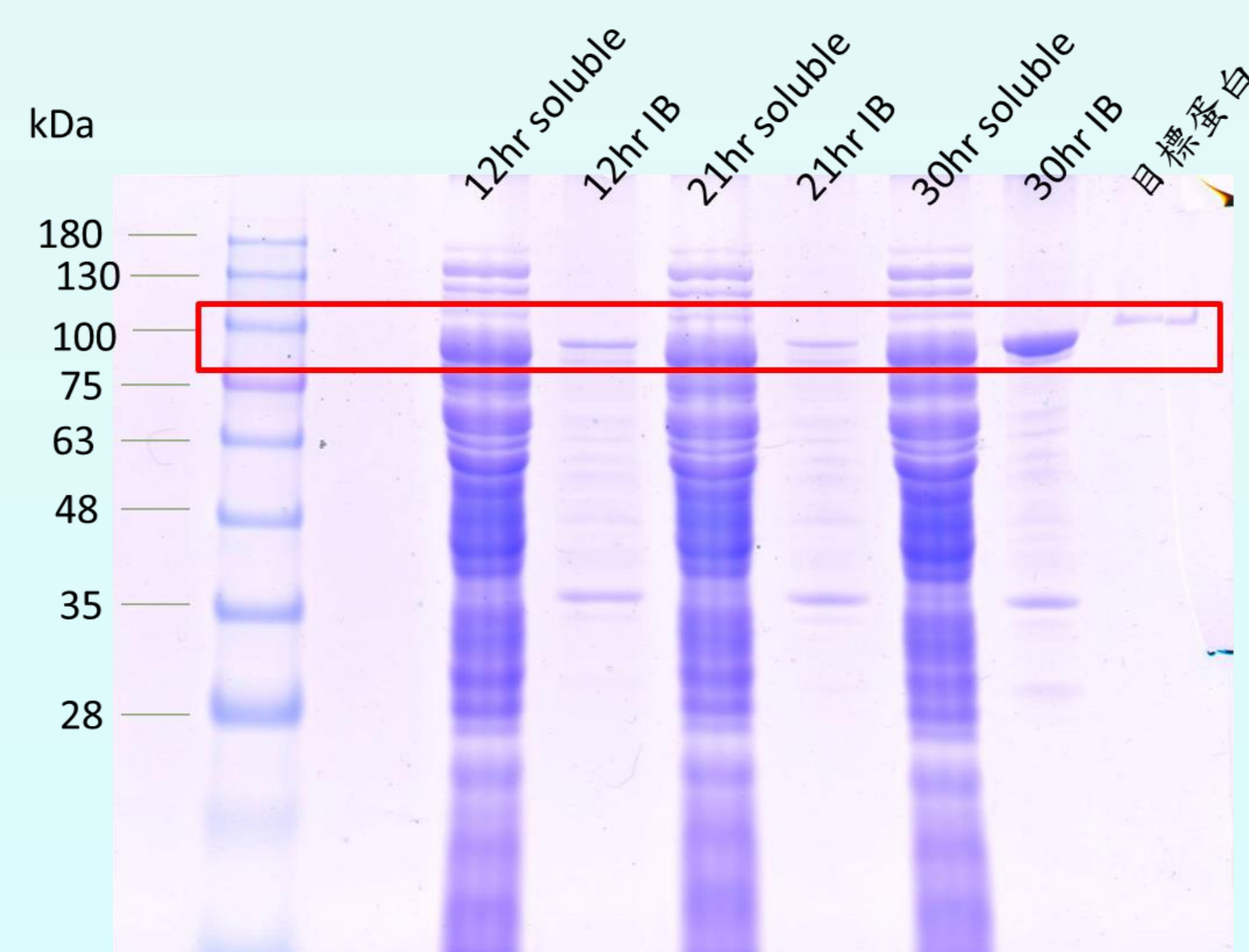
圖一、表現載體。pET GFP LIC (2GFP-T) rAFGAL。GFP 與 6x His-tag 位於 rAFGAL C 端。



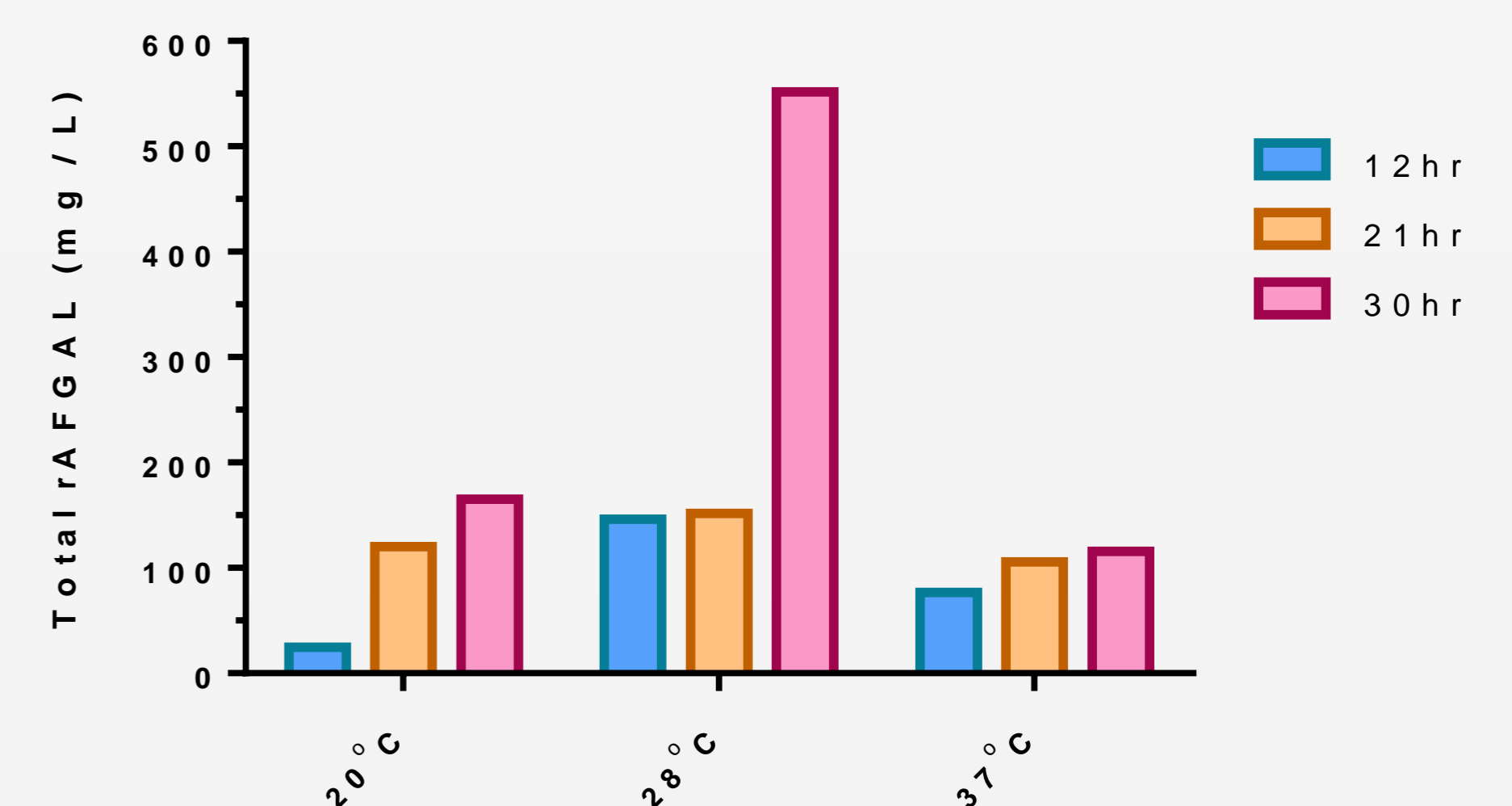
圖三、重組大腸桿菌超音波破菌結果。由顯微鏡影像估計，破菌九分鐘後大部分的菌體都已破碎，圖中球形顆粒即為 rAFGAL 蛋白內涵體。



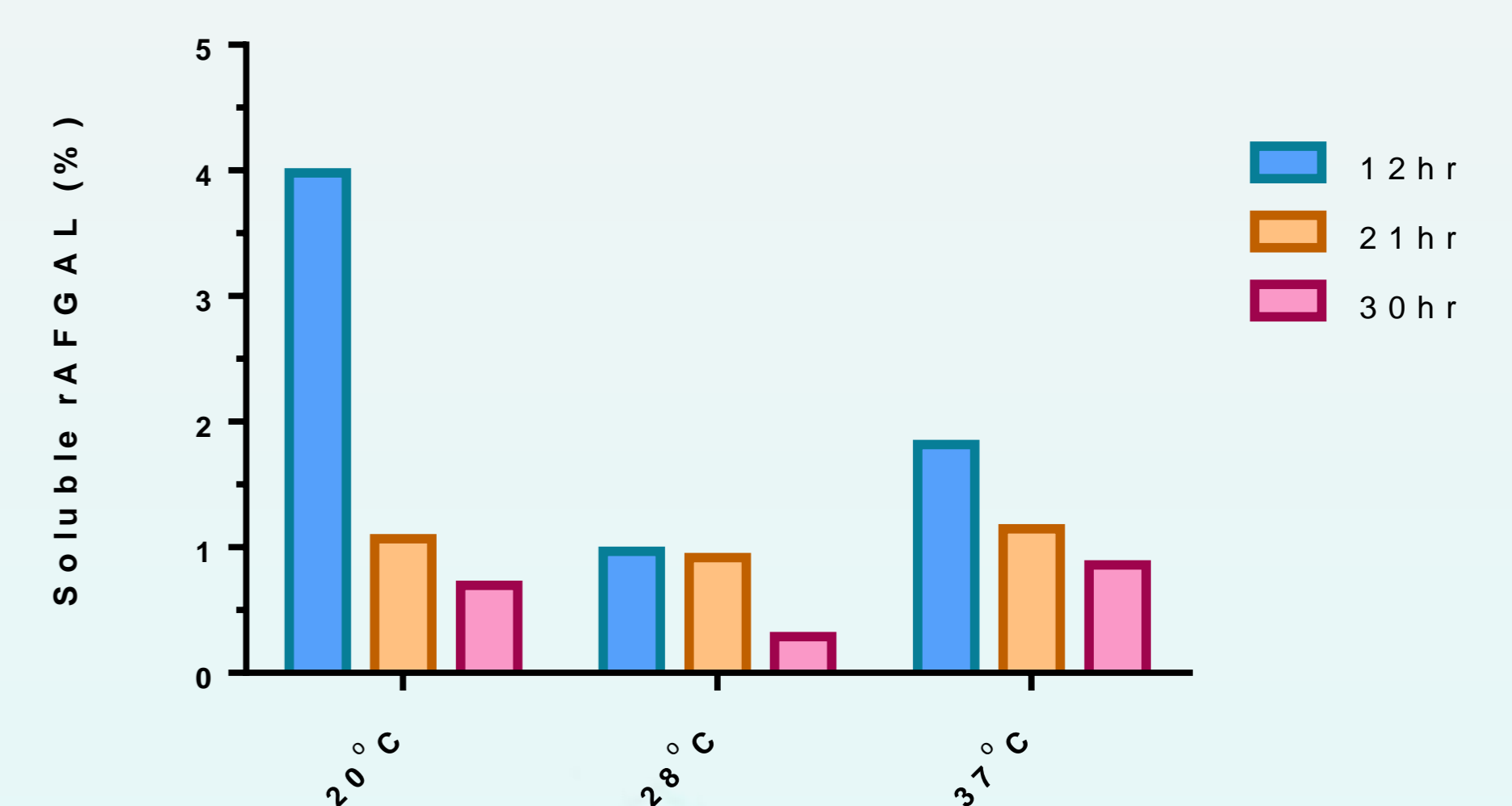
圖二、20、28、37°C 三個溫度下重組大腸桿菌的生長曲線。在 20°C 下約 21 小時達到生長靜止期，在 37°C 下約 8 小時達到生長靜止期，而 28°C 下約 12 小時達到生長靜止期。



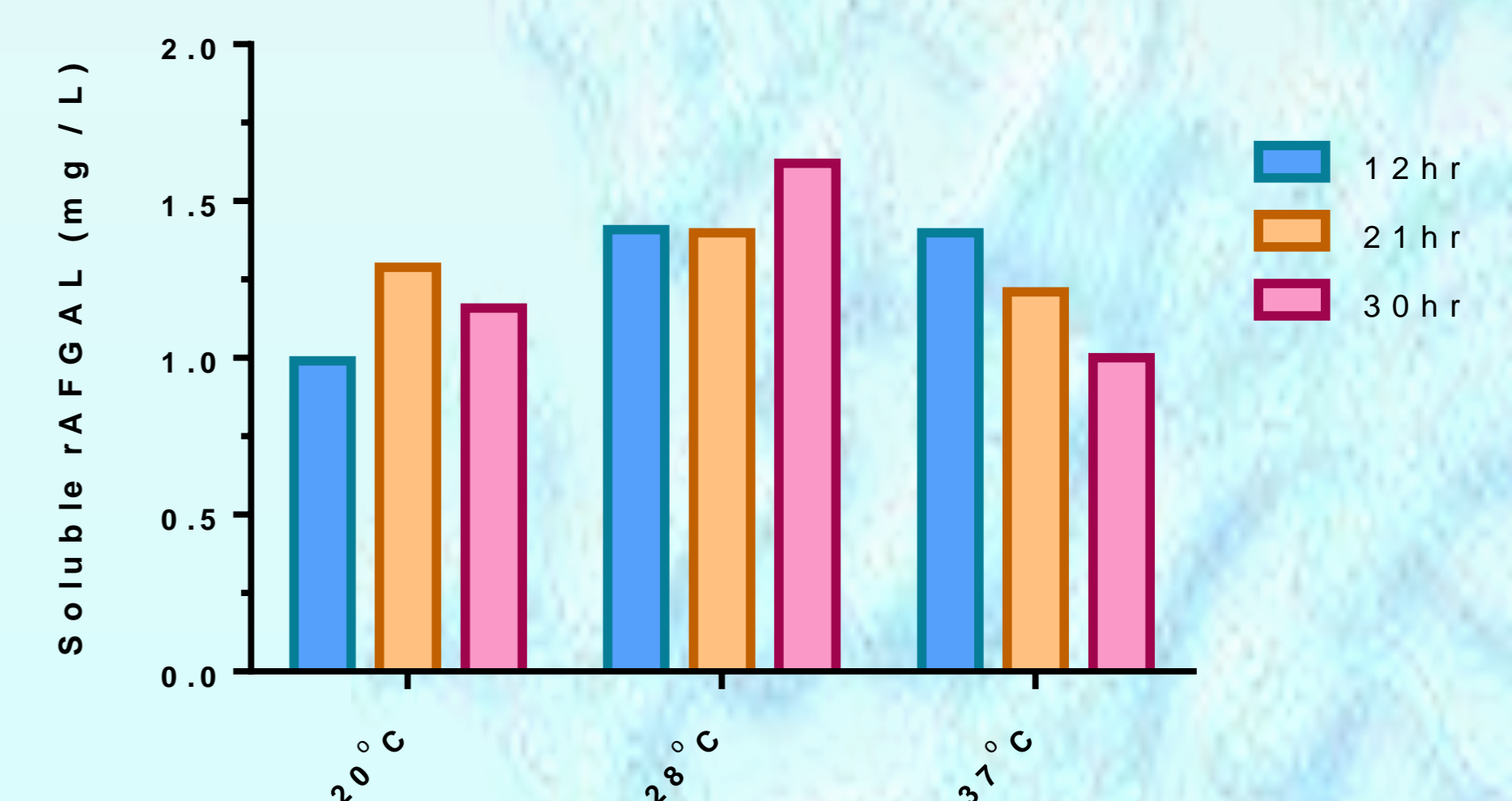
圖四、28°C 下培養重組大腸桿菌的 SDS-PAGE 分析。紅色框為 rAFGAL 蛋白。IB 為內涵體。



圖五、總 rAFGAL 產量。rAFGAL 產量以 28°C 下培養 30 小時最高，各溫度下表現的 rAFGAL 均有隨時間增加的趨勢。



圖六、可溶性 rAFGAL 占 rAFGAL 總量比例。低溫 rAFGAL 均有隨時間增加的趨勢。



圖七、可溶性 rAFGAL 產量。可溶性 rAFGAL 產量在不同培養溫度下皆偏低。