

两次诱导实现重组大肠杆菌高密度、高表达研究*

马文峰 庄英萍** 郭美锦 丁满生 储 炬 张嗣良

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室国家生化工程技术研究中心 上海 200237)

摘要: 通过不同温度诱导模式对大肠杆菌高密度、高表达的研究, 确定两次升温诱导模式实现大肠杆菌高密度、高表达重组人载脂蛋白的目的。实验证实两次诱导成功的避免了乙酸对高密度、高表达的影响, 最终发酵的细胞密度 OD_{600} 达 150, 蛋白表达量 $4.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 证明两次升温诱导的发酵方法在高密度、高表达外源蛋白上是成功的, 从而为基因工程菌规模化生产奠定了基础。

关键词: 重组大肠杆菌, ApoA-I_{Milano}, 高密度, 高表达, 两次诱导

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0054-06

Study on the Recombinant Human ApoA-I_{Milano} High Density and High Expression by Two Temperature-Shifted Induction in *Escherichia coli* *

MA Wen-Feng ZHUANG Ying-Ping** GUO Mei-Jin DING Man-Sheng
CHU Ju ZHANG Si-Liang

(East China University of Science and Technology, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, National Resrch Center for Biotechnology, Shanghai 200237)

Abstract: The temperature effect on the recombinant protein production formation was investigated in present study. The culture temperature of growth phase is 30°C , and the culture temperature of induction phase was arranged according to three modes. High cell-density and high expression culture of *E. coli* to product recombinant human apolipoprotein A-I_{Milano} by two temperature-shifted induction. Two temperature-shifted induction was carried out high density and high expression recombinant human ApoA-I_{Milano}. The recombinant protein ApoA-I_{Milano} reached $4.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with the final cell density of OD_{600} 150. And the two temperature-shifted induction avoided the acetic acid successfully to the influence of the high density and high expression. Two temperature-shifted induction was viable in high density culture and high expression of heterogenous protein in recombination *E. coli*. The study provides a basic work for production of recombinant ApoA-I_{Milano} in scale.

Key words: Recombinant *E. coli*, ApoA-I_{Milano}, High density, High expression, Two temperature-shifted induction

大肠杆菌表达异源蛋白的方式依启动子不同, 分为组成型和诱导型。组成型表达系统最为简便和经济, 但过早的表达产物往往会对细胞有毒害作用, 致使菌密度及总表达水平都不高。因而, 工程菌发酵大多采用诱导型^[1]。大批量的蛋白质制备中, 温度和 IPTG 诱导是两种广泛的使用方式, 但对于人类临床药用蛋白质的大批量制备, IPTG 由于其自身的毒性和价格昂贵, 使其不能成为理想的诱导物。所以, 在医药生产中广泛采用的是温度诱导的方式^[2]。而传统的温度诱导方式均是一步升温诱导, 由于

* 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) (No. 2002AA217021)

国家重大科技专项资助 (No. 2002AA2Z3451)

** 通讯作者 Tel: 086-21-64252234, Fax: 086-21-64253702, E-mail: YPZ@nc-bio.com

收稿日期: 2004-07-05, 修回日期: 2004-09-01

一步诱导升温后菌体耐受持续高温培养时间较短, 这样相对的菌密度及目的蛋白表达量都不如采用本发酵方法所得的菌密度及表达量高。

目前, 国内外在利用重组大肠杆菌工程菌发酵生产重组药物中未见有两步升温诱导发酵研究及相关的文献报道。

1 材料与方法

1.1 重组菌

重组菌 DH5 α /pBV220-ApoA-I_{Milano} 由本室构建和保存, 受 P_LP_R 双重启动子控制, 在 42℃ 时能诱导 ApoA-I_{Milano} 蛋白的表达, 具有氨苄抗性。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基: LB 培养基。

1.2.2 基础培养基 1: 蛋白胨 8 g, 葡萄糖 3 g, 酵母膏 8 g, 十二水磷酸氢二钾 8 g, 磷酸二氢钾 4 g, 七水硫酸镁 0.25 g, 氯化钙 0.11 g, 微量元素 4 mL · L⁻¹, 定容至 1 L。

1.2.3 补料培养基 1: 蛋白胨 8 g, 葡萄糖 3 g, 酵母膏 8 g, 七水硫酸镁 0.25 g, 定容至 1 L。

1.2.4 基础培养基 2: 葡萄糖 4 g, 十二水磷酸氢二钾 6 g, 磷酸二氢钾 6 g, 硫酸铵 3 g, 氯化铵 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 七水硫酸镁 0.25 g, 柠檬酸铵 0.8 g, EDTA 0.0084 g, 生物素 0.001 g, 硫胺素 0.02 g, 微量元素 4 mL · L⁻¹, 定容至 1 L。

1.2.5 补料培养基 2: 葡萄糖 500 g, 柠檬酸铵 0.8 g, 七水硫酸镁 0.25 g, 定容至 1 L。

注: 微量元素储备液: 七水硫酸镁 1 g, 一水硫酸锰 1 g, 七水硫酸锌 2.78 g, 六水氯化钼 2 g, 二水钼酸钠 2 g, 五水硫酸铜 1.85 g, 硼酸 0.5 g, 定容至 1 L。在灭菌时培养基中葡萄糖、七水硫酸镁、微量元素等单独消毒。

1.3 发酵调控方法

1.3.1 5 L 发酵罐补料分批发酵方法: 在 5 L 发酵罐中加入 2.5 L 补料分批培养的基础培养基, 灭菌后, 将 200 mL 摇瓶种子菌接种入其中, 整个发酵过程根据培养基中的残糖浓度 0.1 g · L⁻¹ 控制补料。生长阶段将 pH 值控制在 7.0, 诱导后 pH 升高至 7.4。溶解氧的控制, 通过调整搅拌速度使溶解氧在整个发酵过程中控制在 30% 以上; 温度控制为生长阶段 30℃, 诱导阶段控制 42℃。

1.3.2 两次诱导补料分批高密度、高表达发酵方法: 在 5 L 发酵罐中加入 2.5 L 补料分批培养的基础培养基, 灭菌后, 将 200 mL 种子菌接种入其中, 整个发酵过程根据培养基中的残糖浓度 0.1 g · L⁻¹ 控制补料。生长阶段将 pH 值控制在 7.0 左右, 诱导后 pH 控制在 7.4 左右。溶解氧的控制, 通过调整搅拌速度使溶解氧在整个发酵过程中控制在 30% 以上。在发酵过程中, 温度的控制是生长阶段控制 30℃, 待菌体生长进入对数生长中期时, 开始第 1 次 Q 升温诱导, 诱导阶段温度控制为 42℃, 3~4 h 后, 降低温度到 37℃ 左右, 恒温培养。待菌体的生长又进入对数中期时, 再第 2 次升温到 42℃, 进行第 2 次诱导表达, 持续诱导表达 5~6 h, 发酵结束。

1.4 测定方法

1.4.1 细胞密度测定: 分光光度计测定 OD₆₀₀ 值^[3]。

1.4.2 发酵液中葡萄糖浓度的测定: 菲林试剂法^[4]。

1.4.3 发酵液中乙酸浓度的测定: 气相色谱法^[5]。

1.4.4 目的蛋白表达量测定：抗体夹心 ELISA 对目的蛋白进行定量的分析^[6]。

2 结果与讨论

2.1 不同温度诱导模式对生长及表达的影响

常规诱导一般有如下两种模式，即生长阶段控制温度为 30℃，到菌体长到一定密度升温至 42℃ 恒温诱导；生长阶段控制温度为 30℃ 到菌体长到一定密度升温至 42℃ 诱导一段时间后又降低温度。目前为止，尚未有采用两次升温诱导的发酵报道，为此，本研究对以上 3 种不同温度诱导模式进行了试验。

温度的控制方式是将菌体生长阶段温度设定为 30℃，在升温诱导阶段（诱导阶段设计了 3 种不同的模式 [1、2 种模式使用复合培养基 1.2.2、1.2.3；第 3 种模式使用合成培养基 1.2.4、1.2.5（复合培养基中菌体的生长和目的蛋白的表达要好于合成培养基，数据未列出）]：1 是恒定 42℃ 诱导，按 1.3.1 控制方法，结果见图 1；2 是先控制在 42℃ 诱导 3 h，再降温至 30℃ 培养至发酵结束，按 1.3.1 控制方法，结果见图 2；3 是两次诱导，按 1.3.2 控制方法，结果见图 3。

从图 1 中可知，恒温 42℃ 诱导 5~6 h，菌体密度和 ApoA-I_{Milano} 表达量均达到量大，继续诱导 ApoA-I_{Milano} 表达量下降，菌体浓度也明显下降。

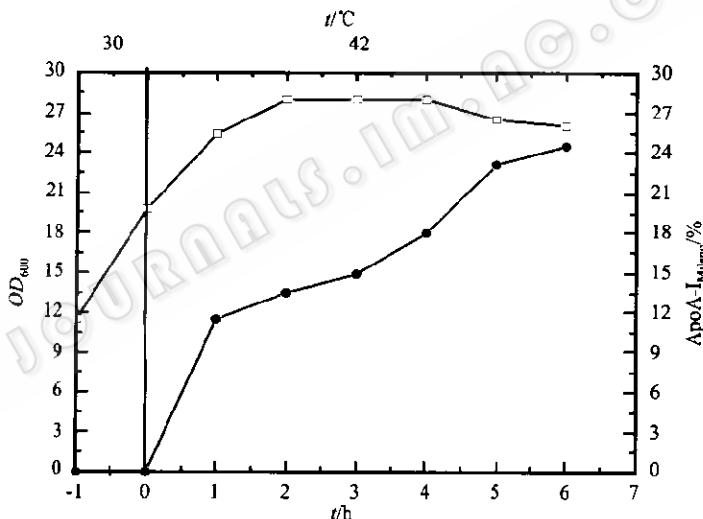


图 1 恒温诱导培养对菌体生长及目的蛋白表达的影响

□—OD₆₀₀, ●—ApoA-I_{Milano} / %

第 2 种模式是升温后再降温至 30℃ 继续培养，菌体的生物量有所回升，但 ApoA-I_{Milano} 的合成量却一直下降（图 2），可能是因为温度降低不利于包涵体的形成^[7]，造成目的蛋白表达量降低。

采取第 3 种两次升温诱导模式如图 3，菌体浓度在两次升温诱导过程中继续生长，菌体浓度 OD₆₀₀ 最大达 150，ApoA-I_{Milano} 的表达量达到 24.13%，远远高于第一种诱导模式的菌体浓度（OD₆₀₀ = 28），即同第一种模式相比，虽然目的蛋白表达率基本相同，但目的蛋白总产量提高了 4.27 倍，目的蛋白 ApoA-I_{Milano} 的产量达 4.8 g · L⁻¹。

2.2 两次升温诱导过程中的生理参数分析

采用两次升温诱导发酵模式时，从图 4 可观察到诱导后的比生长速率（μ）和产物

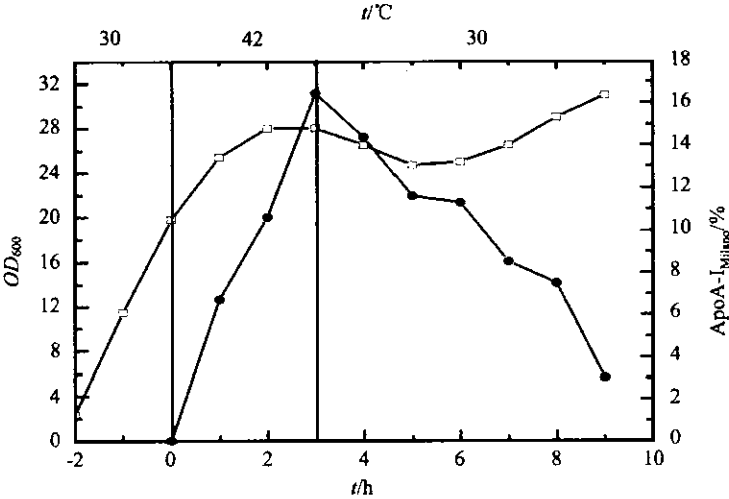


图 2 一次诱导后降温培养对菌体生长及目的蛋白表达的影响

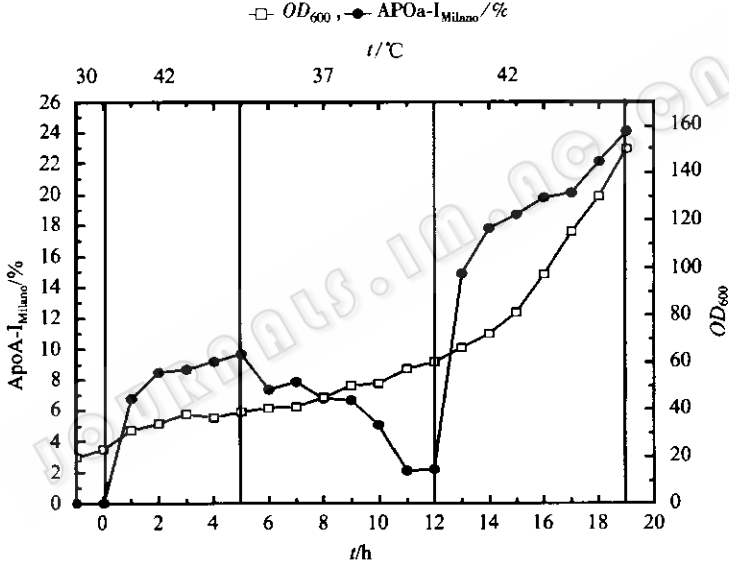


图 3 两次升温诱导模式对菌体生长及目的蛋白表达的影响

比形成速率 (Q_p) 及基质的比消耗速率 (Q_s) 呈相关关系。在诱导后的 1 h 内, 由于温度的升高导致菌体生长速度的加快, 因此 μ 和 Q_s 都增大, Q_p 在诱导的 2 ~ 3 h 也逐渐增加, 因此产物的积累逐渐增加, 但细胞持续在 42℃ 高温诱导, 容易造成菌体代谢负担的加重, 并且一些属于蛋白水解酶的应激蛋白也同时在大量积累, 引起 μ 降低, 同时 Q_s 和 Q_p 降低, 产物浓度下降。所以, 此时将温度降低至 37℃, 以减轻持续高温给菌体带来的不利因素, 结果表明尽管降温对目的产物的合成不利, 但 μ 和 Q_s 开始第 2 次增大。在 37℃ 持续培养 7 h 后第 2 次升温至 42℃ 诱导, 此时, Q_p 又开始增大, 诱导结束时, 目的蛋白的表达率比第 1 次诱导的表达率高近 1 倍。因此, 通过两次诱导发酵, 调整了工程菌 μ 和 Q_p 及 Q_s , 即良好的生理状态是实现菌体高密度和外源蛋白高表达的一个关键因素。

那么在两次升温诱导过程中怎样保证菌体有一个良好的生理状态呢？实验证实温度变化及时间的控制是关键。

从图 1 中可以看出，持续诱导 5~6 h 以后，菌体活力降低，最终导致菌浓及目的蛋白的表达量均下降。所以，在两次升温诱导过程中，在开始第 1 次升温诱导 3~4 h 后就降温到 37℃ 培养，可避免持续高温表达时间太长所导致菌体活力降低的不可逆性。待菌体的生长又进入对数中期时，再第 2 次升温到 42℃，进行第 2 次诱导表达，持续诱导表达 6~7 h。

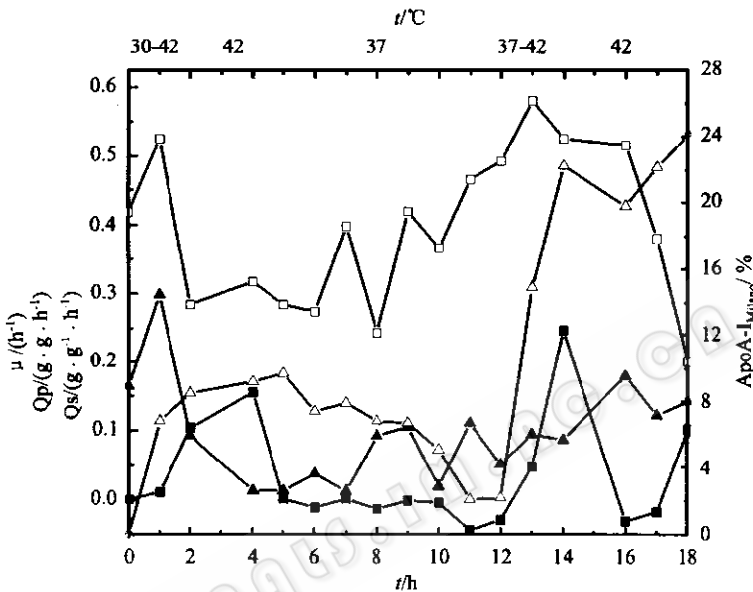


图 4 两次诱导比生长速率 μ 、产物比生成速率 Q_p 、基质比消耗速率 Q_s 和表达量 $ApoA-I_{Milano}$ 的关系

▲ 比生长速率 μ/h^{-1} , ■ 产物比生成速率 $Q_p/(g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1})$,
□ 基质比消耗速率 $Q_s/(g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1})$, -△- $ApoA-I_{Milano}/\%$

2.3 两次升温诱导发酵乙酸对菌体生长及 $ApoA-I_{Milano}$ 表达的影响

乙酸的形成是 *E. coli* 利用葡萄糖为碳源发酵的特点，随着发酵的进行乙酸不断地形成^[8]。一次诱导无法实现菌体的高密度及高表达，这可能是由于高浓度的乙酸对大分子如 DNA、RNA、蛋白质、及脂质的合成具有抑制作用^[9]的结果。但两次诱导实验结果却明显好于一次升温诱导结果。

在图 5 中，在第 1 次诱导后，乙酸浓度平均为 $4.56 g \cdot L^{-1}$ ，且瞬间乙酸的比形成速率为 $7.05 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ， OD_{600} 最大达 39，表达率最高 9.7%，第 1 次诱导目的蛋白的最高产率为 $0.5 g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ；第 2 次升温诱导后，乙酸浓度平均为 $4.2 g \cdot L^{-1}$ ，但瞬间乙酸的比形成速率为 $1.45 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ，且菌体细胞密度 OD_{600} 达 150 和 $ApoA-I_{Milano}$ 的表达率为 24.1%，目的蛋白的产率达 $4.8 g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ，明显分别高于第 1 次升温诱导结果。

原因可能是两次诱导使得菌体的生理活性得到恢复，相对一次诱导而言，菌体对能量的需求降低，从而乙酸循环途径减弱，即相对一次诱导而言，乙酸的比产率降低。因此，两次升温诱导发酵可成功的避免乙酸对高密度、高表达的影响。

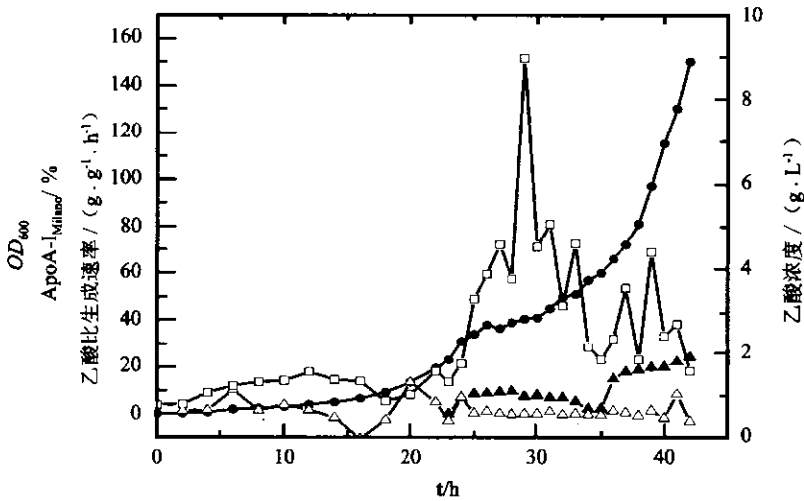


图 5 两次升温诱导的菌浓、目的蛋白表达量、乙酸比产率、乙酸浓度之间的关系

● OD_{600} , ▲ $ApoA-I_{Milano}/\%$
△ 乙酸比生成速率/ $(g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1})$, □ 乙酸浓度/ $(g \cdot L^{-1})$
注：图中箭头分别表示第 1 次、第 2 次诱导的开始

2.4 小结

通过对工程菌 DH5 α /pBV220 的诱导过程中培养的温度诱导模式的优化，确定了两次升温诱导的控制方法，实现了工程菌高密度、高表达，目的蛋白在 5 L 发酵罐的全合成培养基上表达量高达 $4.8 g \cdot L^{-1}$ ，比文献报道^[10]的用复合培养基培养在 3.5 L 发酵罐上的表达量 $4.4 g \cdot L^{-1}$ 提高了 9.1%。而且，本研究的是采用的是全合成培养基，可有效的降低生产成本，更有利于大规模生产。

参 考 文 献

[1] 孙志贤, 汲言山, 王升启, 等. 现代生物化学理论与研究技术. 北京: 军事医学科学出版社, 1995.
[2] 吴乃虎. 基因工程原理 (第二版) (下册). 北京: 科学出版社, 2001.
[3] Yang Y T, Bennett G N, San K Y. Metab Eng, 2001, 3: 115 ~ 123.
[4] 无锡轻工业学院, 大连轻工业学院, 华南理工大学. 工业发酵分析, 北京: 中国轻工业出版社, 1980.
[5] Martin J. J Sci Food Agric, 1985, 36: 638 ~ 644.
[6] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 1998.
[7] Lee S Y. 国外医学. 1997, 20: 67 ~ 70.
[8] Shiloach J, Kaufman K, Guillard A S, et al. Biotechnol Bioeng, 1996, 49: 421 ~ 428.
[9] Cherrington C A, Hinton M, Chopra I. J Appl Bacteriol, 1990, 68: 69 ~ 74.
[10] PN: US5, 876, 968.