



人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白在大肠杆菌中的自诱导表达优化

顾娟 劳勋 金明飞 黄静* 吴自荣

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 考察了在大肠杆菌中自诱导表达人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白的可行性, 并对自诱导培养条件及培养基成分进行优化, 以提高蛋白产量。实验结果表明, 最优培养基成分为蛋白胨 19.17 g/L, 酵母膏 9.59 g/L, Na_2HPO_4 5.72 g/L, KH_2PO_4 5.48 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.66 g/L, NaCl 3.33 g/L, 甘油 2% (V/V), 葡萄糖 0.68 g/L, 乳糖 6.33 g/L, MgSO_4 0.24 g/L。在温度 33°C、接种量 1%、pH 7、装瓶量 20 mL/100 mL 培养条件下, 用该最优培养基自诱导表达人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白的产量可达 348.6 mg/L。

关键词: 人胰高血糖素样肽-1 突变体, 自诱导, 优化, 正交设计, 均匀设计

Auto-inducing Expression Optimization of Mutant Human Glucagon-like Peptide-1 Fusion Protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

GU Juan LAO Xun JIN Ming-Fei HUANG Jing* WU Zi-Rong

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The auto-inducing expression of mutant human glucagon-like peptide-1 fusion protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was studied. In order to increase the protein yield, we optimized both the auto-induction fermentation conditions and medium. The results showed that the optimal auto-induction medium is: tryptone 19.17 g/L, yeast extract 9.59 g/L, Na_2HPO_4 5.72 g/L, KH_2PO_4 5.48 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.66 g/L, NaCl 3.33 g/L, glycerol 2% (V/V), glucose 0.68 g/L, lactose 6.33 g/L, MgSO_4 0.24 g/L. The genetically engineered strain was cultivated at 33°C, pH 7, in a 100 mL flask containing 20 mL such medium, with the inoculum size of 1%, for 12 h. Then the yield of mutant human glucagon-like peptide-1 fusion protein reached 348.6 mg/L.

Keywords: Mutant human glucagon-like peptide-1, Auto-induction, Optimization, Orthogonal design, Uniform design

人胰高血糖素样肽-1 (Human glucagon-like peptide-1, hGLP-1)是人进食后由远端回肠、结肠和直肠的 L 细胞分泌释放的一种活性多肽激素,它通过与胰岛 β 细胞表面的受体特异性结合,使葡萄糖诱导的胰岛素分泌作用显著增强^[1]。同时,hGLP-1 还能作用于中枢神经系统抑制人的食欲^[2],具有维持并增加胰岛 β 细胞数目、抑制胃肠排空及抑制胰高血糖素的分泌等作用,可调节餐后的胰岛素水平和血糖代谢^[3-4]。hGLP-1 的肠促胰岛素作用依赖于葡萄糖的浓度,用其治疗糖尿病不会发生低血糖,在 II 型糖尿病的治疗中具有重要的价值^[5]。但是,hGLP-1 在体内极易被二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV)降解,半衰期只有 2-6 min^[6],极大地限制了其临床应用。本实验室已通过定点突变得到能够延长半衰期的人胰高血糖素样肽-1 突变体(DTrGLP-1)基因,并将其克隆到 pET-32a 载体上进行诱导表达^[7],但蛋白产量较低,有待于进一步提高。

一般 pET 系统采用非代谢性乳糖类似物异丙基- β -D-巯基半乳糖苷(IPTG)作为诱导物进行诱导,但由于 IPTG 具有潜在的毒性,对菌体生长有一定的抑制作用,且价格昂贵,目前国内外已有很多研究用乳糖代替 IPTG 作为乳糖启动子的诱导剂^[8-10]。2005 年,Studier F William 研究出一套自诱导表达系统^[11],该系统含有一定比例的葡萄糖和乳糖,葡萄糖耗尽后乳糖才被利用,目的蛋白开始表达。自诱导发酵的最终菌体密度大,蛋白产量高,但目前该系统的应用研究较少,且各菌株所需的生长条件不同,需进一步研究。本研究考察了在大肠杆菌中自诱导表达人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白的可行性,然后对培养条件及培养基成分进行优化,以提高蛋白产量、降低生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 基因工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-32a-DTrGLP-1, 由本实验室构建并保存。

1.1.2 培养基: 种子培养基: LB 培养基; 自诱导培养基: ZYP 培养基[蛋白胨 10 g/L, 简称 Z; 酵母膏 5 g/L, 简称 Y; Na_2HPO_4 7.1 g/L, KH_2PO_4 6.8 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.3 g/L, 三者合并简称 P; 另含甘油 0.5% (V/V), 葡萄糖 0.5 g/L, 乳糖 2 g/L, MgSO_4

0.24 g/L]^[11]。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化: 取-70℃ 保存的甘油种划线, 37℃ 培养 16 h; 挑单菌落接种于 LB 液体培养基, 37℃、210 r/min 培养 12 h, 即成为活化种子。

1.2.2 自诱导培养条件: 2% (V/V)转接活化菌种至 pH 7、装瓶量 20 mL/100 mL 的自诱导培养基中, 37℃、210 r/min 培养。

1.2.3 菌体密度的测定: 发酵液稀释合适倍数, 用分光光度计测定 600 nm 处的吸光值, 其与稀释倍数的乘积即发酵液的菌体密度(OD_{600})。

1.2.4 目的蛋白表达量的测定: 发酵液稀释至 $OD_{600} = 6$ 后进行 15% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色脱色后用凝胶成像系统分析目的蛋白占总蛋白的百分比。

1.2.5 目的蛋白产量的计算: 目的蛋白产量 = 菌体湿重 \times 每克湿菌体含总蛋白量 \times 目的蛋白表达量/菌液体积。

2 结果与讨论

2.1 发酵时间的选择

用 ZYP 自诱导培养基对重组 DTrGLP-1 基因工程菌进行自诱导发酵, 每小时取样测 OD_{600} 并进行电泳。结果如图 1 所示, 在 0-5 h 内菌体密度呈对数增长, 5 h 后增长缓慢; 目的蛋白从 4 h 时开始表达, 4-6 h 内表达量急剧升高, 9 h 时达到最高表达量, 之后表达量逐渐降低; 目的蛋白产量在 4-6 h 内迅速增加, 6 h 后增长缓慢, 12 h 时达到最大值, 之后稍微有所下降, 因此确定发酵时间为 12 h。

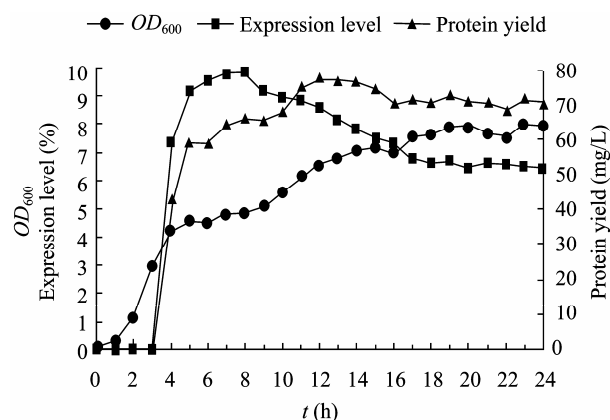


图1 不同发酵时间的菌体密度、目的蛋白表达量及产量
Fig. 1 Cell density, target protein expression level and yield in different fermentation time

2.2 培养基的改进

在以 Studier^[11]给出的 ZYP 培养基对重组 DTrGLP-1 基因工程菌进行自诱导发酵时,发现在培养基中添加 NaCl (终浓度 5 g/L)后不但最终菌体密度有所增加,而且目的蛋白表达量显著提高。这说明适量的 NaCl 对该菌株的生长及目的蛋白表达有促进作用。因此,我们在 ZYP 培养基中添加 NaCl 至终浓度 5 g/L,并将这种培养基命名为 ZYPB 培养基(B 表示 NaCl 5 g/L)。

用 ZYPB 培养基对重组 DTrGLP-1 基因工程菌进行自诱导发酵,蛋白产量可达 190.8 mg/L,是用 ZYP 培养基发酵产量的 2.5 倍(图 2)。

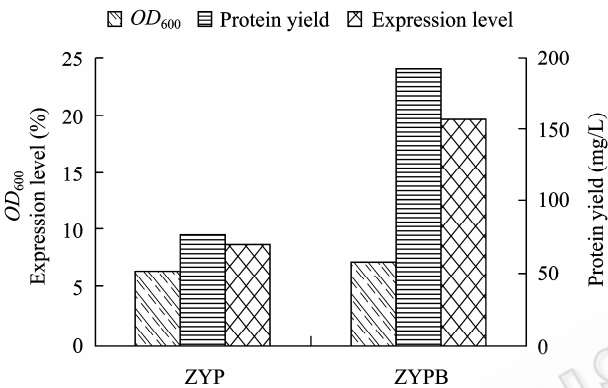


图 2 ZYP 及 ZYPB 自诱导培养基发酵的菌体密度、目的蛋白表达量及产量
Fig. 2 Cell density, target protein expression level and yield in auto-induction media of ZYP and ZYPB

2.3 培养条件的优化

2.3.1 单因素实验优化培养条件: 选择影响发酵的 4 种培养条件: 温度、接种量、pH、装瓶量分别进行单因素实验,各因素取值及结果见表 1。

实验结果表明,28℃ 时,自诱导发酵重组 DTrGLP-1 基因工程菌的最终菌体密度、目的蛋白表达量及产量最高;接种量、pH 对菌体生长、目的蛋白表达量及产量影响较小;随着装瓶量的增加,目的蛋白表达量增加,但最终菌体密度降低,导致蛋白产量降低。

通过前面的实验可知,菌体密度及蛋白表达量共同影响着蛋白的最终产量。因为优化的最终目的是提高蛋白产量,所以之后的实验以蛋白产量为指标,省略菌体密度及蛋白表达量数据。

2.3.2 正交设计实验优化培养条件: 以温度、接种量、pH、装瓶量为研究对象,在前期单因素实验的

表 1 培养条件单因素实验设计及结果 Table 1 Single factor experiments design and results				
因素 Factors	水平 Levels	OD ₆₀₀	蛋白表达量 Expression level (%)	蛋白产量 Protein yield (mg/L)
温度 Temperature (°C)	18	6.43	13.98	123.8
	28	8.60	23.81	281.9
	37	7.17	17.93	177.1
	42	6.51	14.59	130.8
接种量 Inoculum size (%)	1	8.22	23.34	264.3
	2	8.45	23.74	276.2
	5	8.49	21.28	248.9
	8	8.58	20.91	247.0
pH	10	8.47	21.18	247.1
	5	8.31	22.92	262.5
	6	8.57	22.77	268.9
	7	8.25	23.01	261.5
装瓶量 Liquid volume (mL/100 mL)	8	8.36	22.55	259.7
	9	8.04	22.06	244.4
	5	11.79	18.02	292.6
	10	9.61	19.72	261.0
	20	8.18	22.55	254.0
	40	5.64	23.72	184.2
	50	4.95	24.86	169.7

基础上各选择 3 个合适的水平进行 4 因素 3 水平正交设计实验,实验设计及结果分析见表 2。

由表 2 可知,4 种培养条件对蛋白产量的影响由大到小依次为: 装瓶量、温度、pH、接种量,最优培养条件为: 温度 33℃、接种量 1%、pH 7、装瓶量 5 mL/100 mL。但考虑到在摇瓶发酵中 5 mL/100 mL 的装瓶量不便于实际操作,且较浪费实验资源,所以后续实验采用 20 mL/100 mL 的装瓶量,其他实验条件不变。

2.4 培养基成分的优化

自诱导培养基中的各成分对于菌株的生长和目的蛋白的表达有着不同的作用,因此需要摸索一个合适的配方用于该菌株的自诱导发酵。

2.4.1 单因素实验优化培养基成分: 以 ZYPB 自诱导培养基中的各成分: Z、Y、P、B、甘油、葡萄糖、乳糖、MgSO₄为研究对象进行单因素实验,其中 Z 和 Y 既可作为碳源又可作为氮源,所以将二者合并为一个因素进行研究,称之为 ZY。研究某成分时,以 ZYPB 自诱导培养基中该成分浓度为基准,将该成分终浓度设置为 0.25、0.5、1、2 和 4 倍,其

表 2 $L_9(3^4)$ 正交设计表及结果分析
Table 2 The $L_9(3^4)$ orthogonal design table and the analysis of results

因素 Factors	温度 Temperature (°C)	接种量 Inoculum size (%)	pH	装瓶量 Liquid volume (mL/100 mL)	蛋白产量 Protein yield (mg/L)
Test 1	23	1	5	5	352.9
Test 2	23	2	6	10	259.6
Test 3	23	3	7	20	228.4
Test 4	28	1	6	20	257.3
Test 5	28	2	7	5	397.9
Test 6	28	3	5	10	357.4
Test 7	33	1	7	10	375.8
Test 8	33	2	5	20	270.3
Test 9	33	3	6	5	390.9
蛋白产量 Protein yield (mg/L)	k1	280.300	328.667	326.867	380.567
	k2	337.533	309.267	302.600	330.933
	k3	345.667	325.567	334.033	252.000
	极差 R	65.367	19.400	31.433	128.567

他成分浓度不变。实验结果表明, ZYPB 自诱导培养基中各成分浓度对蛋白产量均有影响, 其影响从大到小依次为: ZY、P、B、甘油、乳糖、葡萄糖、 $MgSO_4$ 。

2.4.2 均匀设计实验优化培养基成分: 通过均匀设计实验不但可以找到最优的实验组合, 而且还可建立能定量描述指标和因素间关系的数学模型。因此本研究在 2.4.1 实验结果的基础上, 排除影响较小的因素—— $MgSO_4$, 选取 ZY、P、B、甘油、葡萄糖、乳糖 6 个因素为研究对象进行均匀设计实验。通过单因素结果可知, 各因素对蛋白产量的影响可拟合为二次函数, 所以在进行均匀设计建模分析时对各因素均采用二次多项式回归模型。

本实验采用 $U_{28}(28^8)$ 均匀设计表, 各因素浓度以 ZYPB 自诱导培养基中各成分浓度为基准, 下限设为 0.25 倍, 上限设为 4 倍, 各因素水平数相等, 均等于实验次数, 实验设计及结果见表 3。

用均匀设计软件对实验结果进行全回归分析, 得出蛋白产量与自诱导培养基各因素关系的方程: $y = 317 + 81.9 X_1 - 20.6 X_2 - 54.7 X_3 + 1.91 X_4 - 29.8 X_5 + 11.5 X_6 - 18 X_1^2 - 10.4 X_2^2 + 3.9 X_3^2 + 0.846 X_4^2 + 7.13 X_5^2 - 2.83 X_6^2$, 决定系数 $R^2 = 0.9526$, 显著性水平 $\alpha = 0.05$, 检验值 $F_t = 25.13$, 临界值 $F_0 = 2.475$, $F_t > F_0$, 回归方程显著。据模型预测, 当 ZY 为 2.275

倍、P 为 0.25 倍、B 为 0.25 倍、甘油为 4 倍、葡萄糖为 4 倍、乳糖为 2.032 倍时蛋白产量最高, 预测值为 (418 ± 53.6) mg/L。按该预测最优配方进行实验验证, 目的蛋白产量为 318.1 mg/L, 这与预测值有一定偏差, 可能是由于蛋白表达量较高时, 目的蛋白在 SDS-PAGE 中聚集成团, 凝胶成像系统分析胶图时, 分析值会略小于实际值。但根据均匀设计实验点布点均匀、代表性强的特性, 可用直接观察法从实验中挑选表现最好的实验条件组合。本研究中最优配方为均匀设计表实验 13 的配方, 即: 蛋白胨 19.17 g/L, 酵母膏 9.59 g/L, Na_2HPO_4 5.72 g/L, KH_2PO_4 5.48 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2.66 g/L, NaCl 3.33 g/L, 甘油 2% (V/V), 葡萄糖 0.68 g/L, 乳糖 6.33 g/L, $MgSO_4$ 0.24 g/L。

2.5 重组 DTrGLP-1 基因工程菌在 4 种培养基中的发酵情况的比较

用优化后的 ZYPB 自诱导培养基对重组 DTrGLP-1 基因工程菌进行自诱导发酵, 并以 IPTG 诱导的 LB 培养基、文献[11]给出 ZYP 自诱导培养基及 Novagen 公司推荐的 Overnight Express Instant TB Medium 为对照进行比较。结果见表 4, 优化后的 ZYPB 自诱导培养基的发酵产量最高, 依次是 LB、ZYP、Instant TB 培养基发酵产量的 13.2、4.6、2.3 倍。

表 3 $U_{28}^*(28^8)$ 均匀设计表及结果
Table 3 The $U_{28}^*(28^8)$ uniform design table and results

因素 Factors	ZY	P	B	甘油 Glycerol	葡萄糖 Glucose	乳糖 Lactose	蛋白产量 Protein yield (mg/L)
Test 1	0.2500	2.3330	1.0830	2.8890	3.3060	3.4440	131.3
Test 2	0.3889	0.5278	2.0560	1.6390	2.4720	2.7500	198.5
Test 3	0.5278	2.7500	3.0280	0.3889	1.6390	2.0560	81.5
Test 4	0.6667	0.9444	4.0000	3.1670	0.8056	1.3610	188.0
Test 5	0.8056	3.1670	0.9444	1.9170	4.0000	0.6667	183.1
Test 6	0.9444	1.3610	1.9170	0.6667	3.1670	4.0000	243.3
Test 7	1.0830	3.5830	2.8890	3.4440	2.3330	3.3060	71.1
Test 8	1.2220	1.7780	3.8610	2.1940	1.5000	2.6110	176.2
Test 9	1.3610	4.0000	0.8056	0.9444	0.6667	1.9170	117.3
Test 10	1.5000	2.1940	1.7780	3.7220	3.8610	1.2220	243.8
Test 11	1.6390	0.3889	2.7500	2.4720	3.0280	0.5278	264.9
Test 12	1.7780	2.6110	3.7220	1.2220	2.1940	3.8610	98.9
Test 13	1.9170	0.8056	0.6667	4.0000	1.3610	3.1670	348.6
Test 14	2.0560	3.0280	1.6390	2.7500	0.5278	2.4720	165.7
Test 15	2.1940	1.2220	2.6110	1.5000	3.7220	1.7780	269.0
Test 16	2.3330	3.4440	3.5830	0.2500	2.8890	1.0830	27.2
Test 17	2.4720	1.6390	0.5278	3.0280	2.0560	0.3889	313.9
Test 18	2.6110	3.8610	1.5000	1.7780	1.2220	3.7220	86.4
Test 19	2.7500	2.0560	2.4720	0.5278	0.3889	3.0280	188.5
Test 20	2.8890	0.2500	3.4440	3.3060	3.5830	2.3330	243.0
Test 21	3.0280	2.4720	0.3889	2.0560	2.7500	1.6390	235.9
Test 22	3.1670	0.6667	1.3610	0.8056	1.9170	0.9444	294.5
Test 23	3.3060	2.8890	2.3330	3.5830	1.0830	0.2500	104.0
Test 24	3.4440	1.0830	3.3060	2.3330	0.2500	3.5830	231.7
Test 25	3.5830	3.3060	0.2500	1.0830	3.4440	2.8890	177.9
Test 26	3.7220	1.5000	1.2220	3.8610	2.6110	2.1940	290.9
Test 27	3.8610	3.7220	2.1940	2.6110	1.7780	1.5000	35.1
Test 28	4.0000	1.9170	3.1670	1.3610	0.9444	0.8056	143.4

表 4 四种培养基发酵的菌体密度、目的蛋白表达量及产量

Table 4 Cell density, target protein expression level and yield in four types of media

培养基 Medium	OD_{600}	蛋白表达量 Expression level (%)	蛋白产量 Protein yield (mg/L)
LB	1.85	10.38	26.5
ZYP	6.38	8.59	75.5
Instant TB	9.60	11.65	154.0
ZYPB	10.43	24.26	348.6

3 结论

(1) 用 ZYP 培养基自诱导表达人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白的产量(75.5 mg/L)是用 IPTG 诱导的 LB 培养基产量(26.5 mg/L)的 3 倍, 说明在大

肠杆菌中自诱导表达人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白具有可行性。

(2) ZYP 培养基改进为 ZYPB 培养基后, 蛋白产量可从改进前的 75.5 mg/L 提高到改进后的 190.8 mg/L。说明在自诱导发酵中, 适量的 NaCl 对于该菌株的生长及目的蛋白表达有促进作用。

(3) 经过优化得出最优培养基成分为: 蛋白胨 19.17 g/L, 酵母膏 9.59 g/L, Na_2HPO_4 5.72 g/L, KH_2PO_4 5.48 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2.66 g/L, NaCl 3.33 g/L, 甘油 2% (V/V), 葡萄糖 0.68 g/L, 乳糖 6.33 g/L, $MgSO_4$ 0.24 g/L。在温度 33°C、接种量 1%、pH 7、装瓶量 20 mL/100 mL 培养条件下, 用该最优培养基自诱导表达人胰高血糖素样肽-1 突变体融合蛋白的

产量可达 348.6 mg/L, 且高于 Novagen 公司推荐的 Overnight Express Instant TB Medium 发酵产量, 这不仅降低了生产成本, 为大规模生产提供了理论依据, 还为自诱导在其他蛋白生产上的应用提供了参考。

参 考 文 献

- [1] Ahren B, Pacini G. Dose-related effects of GLP-1 on insulin secretion, insulin sensitivity, and glucose effectiveness in mice. *Am J Physiol*, 1999, **277**(6): E996–E1004.
- [2] Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, *et al.* A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 1996(379): 69–72.
- [3] Parkes DG, Pirrner R, Jodka C, *et al.* Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 *in vivo* and *in vitro*. *Metab*, 2001, **50**(5): 583–589.
- [4] Toft-nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86**(8): 3853–3860.
- [5] Drucker MD. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2003, **26**(10): 2929–2940.
- [6] Hansen L, Deacon CF, Orskov C, *et al.* Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*, 1999, **140**(11): 5356–5363.
- [7] 金明飞. 口服胰高血糖素样肽-1 的筛选和应用研究. 华东师范大学博士学位论文, 2008.
- [8] 张毅, 屈贤铭, 杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响. *生物工程学报*, 2000, **16**(4): 464–468.
- [9] 陈亮, 任随周, 许枚英, 等. 乳糖替代 IPTG 诱导脱色酶 TpmD 基因在大肠杆菌中的高效表达. *微生物学通报*, 2009, **36**(4): 551–556.
- [10] Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *J Biotechnol*, 1998, **60**(1/2): 47–54.
- [11] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 2005, **41**(1): 207–234.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“文件下载”专区下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部。联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn。