

乳糖诱导重组别藻蓝蛋白基因在大肠杆菌中的表达

林 凡^{1,2}, 秦 松¹

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 以重组别藻蓝蛋白表达工程菌 JM109(DE3)/pET28-APC 作为研究对象, 对于 JM109(DE3)菌株在乳糖诱导下表达重组蛋白的规律进行了研究。比较分析了不同生长阶段进行诱导, 最佳乳糖浓度、诱导持续时间和诱导温度等参数对重组蛋白表达的影响。实验结果表明, 采用 JM109(DE3)为宿主菌, 经过条件优化, 乳糖诱导重组蛋白的表达量可以达到 IPTG 诱导的水平; 较低的诱导培养温度能有效提高可溶性重组蛋白的表达。最后在摇瓶发酵结果的基础上, 实现了乳糖诱导工程菌的 5L 全自动发酵罐培养。研究结果为在大肠杆菌大规模发酵中, 运用廉价、无毒的乳糖作为诱导剂提供了一定的借鉴。

关键词: 乳糖; 低温诱导; 别藻蓝蛋白; 大肠杆菌

中图分类号: Q31 文献标识码: A 文章编号: 1000 - 3096(2005)11 - 0022 - 06

藻胆蛋白(Phycobiliprotein)是某些藻类特有的捕光色素蛋白, 主要包括藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)、藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)、别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)和藻红蓝蛋白(Phycoerythrocyanin, PEC)^[1]。国内外研究表明藻胆蛋白具有抗菌、抗氧化、抑制肿瘤和促进细胞生长的活性^[2-5]。但现有从藻类中直接分离纯化藻胆蛋白的工艺, 其成本及产品稳定性均无法满足大规模应用的需要。因此利用基因工程技术制备重组藻胆蛋白已成为藻胆蛋白应用研究的一个重要发展方向。

异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)是 *lac* 及其衍生启动子常用的诱导剂。但由于 IPTG 价格昂贵, 较高的诱导成本不适于大规模工业化生产, 同时 IPTG 对人体具有一定毒性^[6], 难以在用人用重组蛋白质的生产中使用。目前国外已有乳糖代替 IPTG 作为诱导剂进行发酵的报道, 但迄今国内利用乳糖诱导重组产物表达的报道仍然不多, 且都集中于大肠杆菌 BL21(DE3)菌株为宿主细胞的发酵工艺研究。

作者报道了以克隆在原核表达载体 pET28(a)(Novagen, Germany)中的蓝藻别藻蓝蛋白基因为目的基因, 以大

肠杆菌 JM109(DE3)菌株为宿主菌, 对乳糖诱导重组别藻蓝蛋白(His-tag-APC, HAPC)表达的各种基本参数研究, 并初步实现了 5 L 全自动发酵罐规模的乳糖诱导培养。这有助于进一步了解乳糖诱导大肠杆菌表达重组蛋白的规律, 同时为重组别藻蓝蛋白提供一种安全、低成本的生产方式。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

宿主菌 JM109(DE3) *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_K -, m_K +), relA1, supE44 Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacI^qZAM15], λ(DE3)* 购自 Promega 公司, 重组表达质粒 pET28-*apc* 及其工程菌 JM109(DE3)/pET28-APC 由本实验室构建并保存。

收稿日期: 2004 - 05 - 20; 修回日期: 2004 - 07 - 13

基金项目: 国家 863 计划项目(2001AA620410); 中国科学院创新工程资助项目(KZCX3 - SW - 215)

作者简介: 林凡(1976 -), 男, 硕士, 研究方向: 藻类生物技术, E - mail: linfan@ms.qdio.ac.cn

1.2 试剂

酵母粉(Yeast extract)和蛋白胨(Tryptone)购自英国 OXOID 公司, IPTG 购自宝生物工程(大连)有限公司, 蛋白质分子量 Marker 购自 Promega 公司, 其余均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

美国 NBS Bio Flo 3000 型 5L 自动发酵罐, 上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂 7230G 型分光光度计, Amersham Pharmacia Biotech 公司凝胶扫描仪。

1.4 培养基及培养方法

1.4.1 培养基

试管和摇瓶培养用 LB 培养基^[6]; 含有葡萄糖、少量无机盐(葡萄糖 5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 5g/L, pH 7.0)的 2-YT 培养基^[6]用于发酵罐培养; 补料培养基 I: 葡萄糖 100 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 16 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 5 g/L; 补料培养基 II: 酵母提取物 50 g/L, 蛋白胨 25 g/L。

1.4.2 摇瓶培养

取出平板保藏的菌种, 挑取单菌落, 接种于 5 mL LB 培养基(卡那霉素 50 mg/L)的试管中, 过夜活化。尔后按 1% 的接种量将活化的菌种接入含 100 mL LB 培养基(卡那霉素 50 mg/L)的 500 mL 摇瓶中, 220 r/min, 按实验设计要求温度振荡培养。

1.4.3 发酵罐培养

工程菌的发酵在 5 L 自动发酵罐中进行。1% 的接种量, 诱导前培养温度 37 °C, 溶氧、pH 均自动控制, 发酵开始 4 h 后, 以 0.032 g/(L·min) 葡萄糖的速率进行补料 1 h; 待菌体生长至对数生长中期, 且发酵液中葡萄糖耗尽后, 开始流加乳糖, 至终浓度 10 g/L, 28 °C 下诱导 9 h; 期间适当流加补料培养基 II。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度的测定

采用细菌光电比浊法, 用分光光度计测其 600 nm 的光吸收值。

1.5.2 重组产物表达水平分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照文献 [6] 的方法。诱导之后, 每小时取 3 mL 发酵液, 离心收集菌体。菌体以缓冲液 I (20 mmol/L 磷酸氢二钠, 500 mmol/L NaCl, pH 7.8) 洗涤 2 次后, 重悬于 1 mL 冰冷的缓冲液 I, 超声波破菌处理, 获取含全菌总蛋白

的粗提物。全菌总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 扫描凝胶, 用 Image Master 1D Elite 软件 (Amersham Pharmacia Biotech) 分析。

1.5.3 重组产物中可溶和不溶组分分析

将含全菌总蛋白的粗提物于 4 °C, 14 000 r/min 离心 30 min, 以分离组分。不溶组分振荡重悬于适量的缓冲液 I 后, 与含可溶组分的上清分别用 SDS-PAGE 凝胶电泳(如上所述)分析。

1.5.4 葡萄糖浓度的测定

采用葡萄糖测定试剂盒(青岛市北试剂厂)测定发酵液中残留葡萄糖的浓度。

2 结果

2.1 菌株不同生长阶段进行诱导对产物表达的影响

在 LB 培养基中, 将重组菌分别培养至不同生长阶段时 (A_{600} 分别为 0.179、0.682、1.107、1.245、1.700 和 1.898) 加入乳糖至终浓度为 5g/L 进行诱导, 37 °C 持续诱导 6 h 以上, 每 1 h 取样分析。实验结果表明(图 1), 在菌体生长的各个阶段加入乳糖, 均可诱导重组蛋白表达。其中以在菌体生长量达到 A_{600} 值为

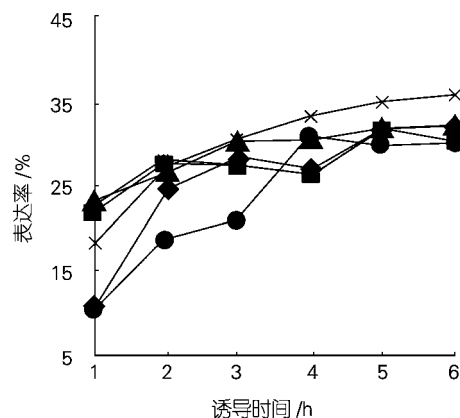


图 1 不同生长阶段加入乳糖(5g/L)后重组蛋白占菌体总蛋白百分含量的变化

Fig. 1 Effects of induction time and duration on the recombinant protein expression level lactose concentration: 5g/L.

● ▲ × ◆ ■ * 分别在 $A_{600}=0.179$ 、0.682、1.107、1.245、1.700 和 1.898 时进行诱导
● ▲ × ◆ ■ * induced at $A_{600}=0.179$, 0.682, 1.107, 1.245, 1.700 and 1.898

1.245 时, 添加乳糖诱导产生的重组蛋白含量最高, 可达菌体总蛋白的 35.55%。同时结合诱导后菌体的生长状况 (图 2), 比较而言在菌体生长量达到对数生长中期时添加乳糖是比较理想的。此时加入乳糖进行诱导, 既可以获得较高的重组蛋白表达量, 又可获得较高的菌体密度。

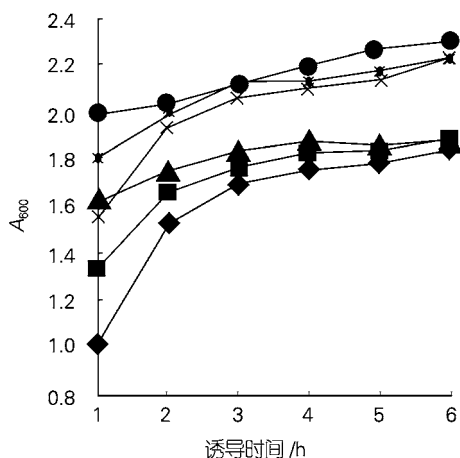


图 2 不同生长阶段加入乳糖(5g/L)后菌体生长随诱导时间延长的变化

Fig. 2 Effects of induction time and duration on the growth of *Escherichia coli* JM109(DE3)/pET28-APC lactose concentration: 5g/L.
 ● ▲ × ◆ ■ * 分别在 $A_{600}=0.179$ 、0.682、1.107、1.245、1.700 和 1.898 时进行诱导
 ● ▲ × ◆ ■ * induced at $A_{600}=0.179$, 0.682, 1.107, 1.245, 1.700 and 1.898

2.2 乳糖诱导浓度对产物表达的影响

根据 2.1 节的结果, 在菌体对数生长中期 (A_{600} 约为 1.2) 加入不同浓度的乳糖于 37℃ 进行诱导, 观察不同诱导剂浓度对重组蛋白表达情况的影响, 同时以加入 IPTG (终浓度=1 mmol/L) 的为对照组。实验结果表明, 当加入乳糖终浓度为 0.05 g/L 时即能诱导重组蛋白的表达; 当乳糖终浓度大于 0.5 g/L 后, 重组蛋白占菌体总蛋白的百分含量稳定于 35% 左右, 其中 10 g/L 终浓度的乳糖诱导效果最佳 (可达 36.6%), 与对照组 IPTG 诱导效果相当。但当乳糖浓度达到 20 g/L 时, 则对重组蛋白的表达起到抑制作用。

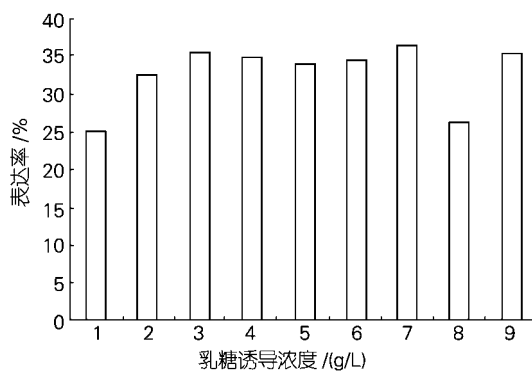


图 3 乳糖诱导浓度对产物表达的影响

Fig. 3 Effect of lactose concentration on the recombinant protein expression level

2.3 不同诱导温度对表达产物分布的影响

诱导温度是影响重组蛋白表达的一个重要因素。因此根据 2.1 和 2.2 节结果, 在 37℃ 下培养工程菌至对数生长中期 (A_{600} 约为 1.2), 加入乳糖 (终浓度为 10 g/L) 进行诱导。尔后将菌体分别在 37、28、20℃ 下进行培养, 持续 10 h 以上。每 1 h 取样分析。按照 1.5.3 所述实验方法分析乳糖诱导表达产物的分布情

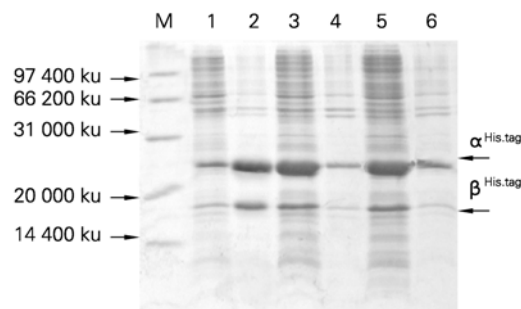


图 4 加入乳糖(10 g/L)后, 不同诱导温度下菌体蛋白可溶性与不溶性组分电泳图

Fig. 4 The measure of soluble and insoluble proteins by SDS-PAGE

M: 蛋白质分子质量标准; 1、3、5 分别为在 37、28、20℃ 下诱导的菌蛋白可溶性组分; 2、4、6 分别为在 37、28、20℃ 下诱导的菌体蛋白不溶性组分

M: Molecular weight marker; 1,3,5 Soluble proteins from bacteria induced at 37, 28, 20℃, respectively; 2,4,6 Insoluble proteins from bacteria induced at 37, 28 and 20℃, respectively

式存在。其中诱导温度为 28 °C 和 20 °C 时，重组蛋白以可溶性蛋白形式表达为主；而诱导温度为 37 °C 时，重组蛋白主要以包涵体形式存在。同时结合菌体的生长状况(图 5)，添加乳糖进行诱导后，采用 28 °C 的培养温度是最适宜的。在此温度下诱导表达，既可减少包涵体的产生，又可获得较高的菌体生长密度。

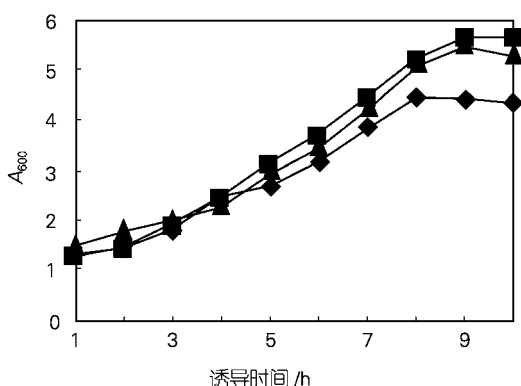


图 5 加入乳糖(10g/L)后，不同诱导温度下菌体生长随诱导时间延长的变化情况

Fig. 5 Effects of induction temperature and duration on the growth of *E.coli* JM109(DE3)/pET28-APC in LB medium lactose concentration: 10g/L

◆ — 分别在 37、28、20°C 条件下诱导
 ◆ — 分别在 37、28、20°C 条件下诱导

2.4 乳糖最佳诱导浓度的表达动力学研究

根据上述实验结果，当工程菌在 LB 培养基中生长至对数生长中期时，加入乳糖至终浓度 10 g/L, 28 °C 持续诱导 10 h, 每隔 1h 取样测定菌体浓度并留样电泳，检测可溶性重组蛋白的表达情况。实验结果表明，在加入乳糖诱导后 1 h，即有可溶性重组蛋白表达，尔后可溶性重组蛋白的表达量随着诱导时间的增加而增加，在诱导后 8 h 达到高峰（占菌体可溶性蛋白的 40%），之后可溶性重组蛋白的表达量不再有明显的增加。而从菌体生长曲线可以看到，在诱导后 9 h，菌体培养浓度达到最高值，尔后菌体生长变缓，由于自溶等原因浓度开始下降。两者结合分析表明，在实验室小规模培养过程中，诱导后 9 h 收获重组蛋白最为有利。

2.5 工程菌的 5L 全自动发酵罐培养

根据上述实验结果,在摇瓶培养的基础上,进行工

程菌 JM109(DE3)/pET28-APC 的 5L 全自动发酵罐培养。在大肠杆菌发酵过程中，最终菌体密度和重组蛋白的表达水平是两个必须兼顾的指标。葡萄糖是大肠杆菌发酵中最常用的碳源，培养基中添加适量的葡萄糖能有效提高菌体密度。但发酵液中葡萄糖的存在会抑制乳糖的诱导作用。因此实验中在培养初期添加一定量的碳源（葡萄糖）和氮源；待葡萄糖耗尽后，即在发酵液中的葡萄糖残糖量为零，并在菌体生长处于对数生长中期时，开始流加乳糖(终浓度 10g/L)进行诱导。诱导后根据菌体生长情况，适当补充氮源。这样既可提高菌体密度，又可避免葡萄糖对乳糖诱导效果的影响。本实验最终菌体 A_{600} 达 26.25，可溶性重组蛋白的表达率为 31%。

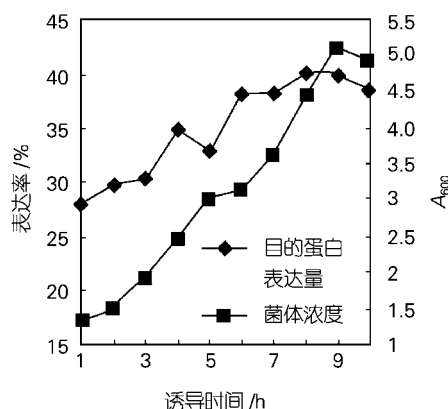


图 6 加入乳糖 (10g/L) 进行诱导后可溶性重组蛋白占菌体可溶性蛋白比例及菌体生长随时间延长的变化情况

Fig. 6 Effects of induction time and duration on the growth of *E.coli* JM109(DE3)/pET28-APC (lactose concentration: 10g/L. Induced at 28°C)

3 讨论

诱导型表达是目前在大肠杆菌中克隆表达重组蛋白最常用和有效的策略。该策略的一个重要优点是可通过添加诱导剂与否来控制目的基因的表达。*lac* 及其衍生启动子控制下的诱导系统是受半乳糖调节的。IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)作为一种半乳糖的类似物，是该类启动子最常用的诱导剂。但是由于其昂贵的价格和毒性，使得它不适用于大规模的表达生产。乳糖以其无毒、价廉的优点令人们希望利用它作为 IPTG 的替代诱导物。但采用乳糖诱导相对 IPTG 而言在调控方面有一定的复杂性^[7]，主要表现为：乳糖

必须在细胞本底水平表达的 β -半乳糖苷透过酶的作用下才能进入细胞,且在转运过程中受到多种因素的影响。进入细胞后,乳糖还需在 β -半乳糖苷酶的作用下分解产生异乳糖后才能发挥诱导作用。同时作为菌体的一种可利用碳源,乳糖是一种代谢性的诱导物,其浓度随着菌体的生长而不断发生变化^[8]。

作者探讨了以 JM109(DE3)作为表达宿主菌,采用乳糖为诱导剂时,对于 T7 启动子调控的重组蛋白表达和菌体生长的影响及其规律,从中分析并找出适宜的诱导条件。结果表明:在 JM109(DE3)/T7 的表达体系中,乳糖可以达到与 IPTG 相似的诱导效果,并且没有出现其它文献报道的 BL21(DE3)/T7 表达体系在乳糖诱导初期菌体生长迟滞现象^[8-10]。利用大肠杆菌表达目的基因,宿主菌与培养条件的组合是影响表达量的关键因素之一。目前国内利用乳糖诱导重组蛋白表达的报道都集中于大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主菌的发酵工艺研究方面,多数实验结果表明乳糖在该宿主菌中的诱导效果低于 IPTG。JM109(DE3)是 JM109 的诱变株,它的基因组含有 *lacUV5* 启动子控制下的 T7 RNA 聚合酶基因。乳糖在细胞内分解产生的异乳糖可诱导 JM109(DE3)合成大量的 T7 RNA 聚合酶。该酶特异性结合于 pET28(a)载体的 T7 启动子,使 T7 启动子下游的目的基因高效表达。Denice 等^[11]报道了在 JM109(DE3)/T7 体系中以乳糖为诱导剂时取得了与 IPTG 相似的诱导效果。本实验结果也提示以乳糖为诱导剂时该体系所具有的优势与价值。

包涵体的产生是大肠杆菌表达外源基因常遇到的问题。许多情况下,包涵体在立体构象上是错误的,没有生物活性;要经过复杂、低得率的体外复性过程才能得到具有生物活性的重组蛋白。改变大肠杆菌的生长条件被认为是解决这一问题的有效手段之一^[12]。本研究发现:在乳糖诱导条件下,较低的诱导温度可减少重组别藻蓝蛋白包涵体的形成;同时与常规的 37 °C 诱导培养条件相比,更有利于菌体生长,能达到更高的生长密度。这可能是在低温下,蛋白质的合成速度减慢,有利于合成的重组蛋白正确折叠,从而减少包涵体的形成,增加表达产物中有活性的可溶性蛋白含量^[13]。

以上研究结果表明, JM109(DE3)/T7 是一种适宜

于采用乳糖为诱导剂的表达系统。这有助于深入了解大肠杆菌中,乳糖诱导表达重组蛋白的规律;同时提供了一种安全、低成本的生产重组别藻蓝蛋白方式。

参考文献:

- [1] Glazer A N. Phycobiliproteins—a family of valuably, widely used fluorophores[J]. *J Appl Phycol*, 1994, 6:105-112.
- [2] Estrada P, Bescos B P, Villar del Fresno A M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protein extract[J]. *Farmaco*, 2001, 56:497-500.
- [3] Gonzalez R, Rodriguez S, Romay C, *et al.* Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats[J]. *Pharmacol Res*, 1999, 39:55-59.
- [4] Reddy C M, Bhat V B, Kiranmai G, *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277:599-603.
- [5] Romay C, Delgado R, Ramirez D, *et al.* Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin[J]. *Arzneimittelforschung*, 2001, 51: 733-736.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 1 595-1 597, 1 713-1 723, 1 828.
- [7] Donovan R S, Robinson C W, Glick B R. Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 16:145-154.
- [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[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 464-468.
- [9] 吴一凡, 张双全, 高秀玉, 等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2002, 25(1): 89-93.
- [10] 叶姣, 陈长华, 杨雅琴, 等. 乳糖诱导重组人 SOD 基因在大肠杆菌中的表达[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(12): 536-539.
- [11] Denice W, Jill R. Cupp-Vickery, Enhanced expression of cytochrome P450s from *lac* Based Plasmids using lactose as the inducer[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,

- 2001, **338**(2): 276-280.
- [12] 方敏, 黄华梁.包涵体蛋白体外复性的研究进展[J].生物工程学报, 2001, **17**(6): 608-612.
- [13] Michael J W, Maria P, Shawn R C, *et al.* Stabilization of apoglobin by low temperature increases yield of soluble recombinant hemoglobin in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(1) : 4 313-4 321.

Lactose-induced expression of recombinant allophycocyanin in *Escherichia coli* JM109(DE3)

LIN Fan^{1,2}, QIN Song¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: May,20,2004

Key word: Lactose; low-temperature induction; Allophycocyanin; *Escherichia coli*

Abstract: The expression recombinant allophycocyanin gene in *Escherichia coli* JM109(DE3) using lactose as the inducer was optimized. The influences of culture conditions, including the point of induction, the lactose concentration, the duration of induction phase and the induction temperature were analyzed. Finally the recombinant *E.coli* was cultured in a 5L fermentor. The result showed that lactose could be used to induce recombinant allophycocyanin expression to concentrations exceeding the level achieved by using with IPTG as an inducer. After adding lactose, the low culture temperature could increase the expression level of soluble target protein.

(本文编辑：张培新)