

# 产重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白的重组大肠杆菌发酵条件的优化

张伟杰<sup>1,2</sup>, 杨雨<sup>1,2</sup>, 关翔宇<sup>3</sup>, 葛宝胜<sup>4</sup>, 陈华新<sup>1</sup>, 李富超<sup>1</sup>, 秦松<sup>1</sup>

(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; 3. 中国海洋大学, 山东青岛 266003; 4. 中国石油大学, 山东青岛 266555)

**摘要:**对重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白基因工程菌在装有 150 mL 液体培养基的 250 mL 摇瓶中的发酵条件进行优化。对起始 pH 值、接种量、诱导起始时间、诱导温度和时长以及 IPTG 浓度对重组荧光蛋白表达量进行了分析。结果表明, 在装有 150 mL 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 在起始 pH 值为 7.5, 6% 接种量, 培养温度为 37℃, 培养时长为 3~5 h, 诱导温度为 22℃, IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导时长为 7~8 h 的条件下发酵重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白, 其表达量最高。

**关键词:**重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白; 发酵; 优化

**中图分类号:** TQ920.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2009)09-0057-05

藻胆蛋白(phycoobiliprotein)是某些藻类特有的捕光色素蛋白, 可以用作荧光探针。根据吸收光谱的不同, 可将藻胆蛋白分为 4 大类: 即藻红蛋白(phycoerythrin, PE,  $\lambda_{\max} = 560$  nm), 藻红蓝蛋白(phycoerythrocyanin, PEC,  $\lambda_{\max} = 567$  nm), 藻蓝蛋白(phycoocyanin, PC,  $\lambda_{\max} = 620$  nm)和别藻蓝蛋白(也称异藻蓝蛋白, allophycoocyanin, APC,  $\lambda_{\max} = 652$  nm)<sup>[1~3]</sup>。Tooley 等<sup>[4]</sup>报道了在大肠杆菌中重组出一条能合成具有荧光特性藻蓝蛋白的完整代谢途径, 包括 5 个基因: 血红素加氧酶 I 基因(*hox I*)、藻蓝素铁氧还蛋白还原酶基因(*pcyA*)藻蓝蛋白裂合异构酶 E 和 F 编码基因(*cpcE*, *cpcF*)和 *cpcA*。用类似方法本实验室构建和表达了重组光活性的藻蓝蛋白<sup>[5]</sup>。Hu 等<sup>[6]</sup>报道别藻蓝白  $\alpha$  亚基本身具有自主连接藻蓝胆素的性质, 与色基的连接不需要其他酶催化。因而我们对本实验室构建的表达 5 个基因的载体进行了简化, 去掉了原有的 *cpcE/F* 基因, 构建了表达 3 个外源基因(*apcA*, *hox1* 和 *pcyA*)的重组载体, 在大肠杆菌体内合成表达了重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白<sup>[7]</sup>。本实验拟对重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白工程菌的发酵进行工艺条件的优化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验菌种: 重组菌株 BL21(DE3)/ pCDFDuet-1-*apcA*-*hox1*-*pcyA* 由本实验室构建并保存; 培养基: LB 培养基(g/L)(蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10), pH7.0; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 由 Merck 公司提供。

### 1.2 仪器

紫外/可见分光光度计 UV-2450 (Shimadzu 公司); 超声波破碎仪 VC505 (Sonics & Materials 公司); 荧光分光光度计 F-2500 (Hitachi 公司)。

### 1.3 方法

**培养方法:**将种子液在含有壮观霉素的 LB 培养基中活化 8~10 h, 按 5% 的接种量接入培养基中, 37℃, 约 200 r/min 恒温摇床培养, 到适当  $A_{600}$  时添加 IPTG 诱导外源基因表达, 诱导一定时间后收获菌体。

**重组菌生长测定:**接入种子后每隔一定时间检测  $A_{600}$ 。

**重组蛋白(包括结合色基和未结合色基的蛋白)表达量的分析<sup>[8]</sup>:**收获的菌液离心得菌体, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳), 用凝胶成像分析仪测定蛋白表达量。

**重组荧光蛋白(结合色基的蛋白)表达量分析:**超声波破碎菌体, 用荧光分光光度计对裂解液以波长 580 nm 的入射光进行扫描, 检测在 647 nm 处激发荧光强度。预实验中, 重组荧光蛋白质量浓度在 2~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时荧光强度和蛋白质量浓度呈线性关系, 破碎后的菌体重组荧光蛋白质量浓度在这个

收稿日期: 2009-02-20; 修回日期: 2009-06-03

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-209, KZCX2-YW-216); 国家 863 计划项目(2006AA090303)和青岛市科技计划项目(06-2-2-12-JCH)

作者简介: 张伟杰, (1975-), 男, 河北衡水人, 博士研究生, 主要从事海洋药物研究, 电话: 0532-82898863, E-mail: brossica@163.com; 秦松, 通信作者, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

范围内,可以通过荧光强度计算蛋白质量浓度,计算公式蛋白质量浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) = 荧光强度  $\times 1.13 \times 10^2 + 9.25$ 。

## 2 结果

### 2.1 菌体和重组蛋白表达量的增长曲线

250 mL 三角瓶中装入 LB 培养基 150 mL,按 5% 的接种量接入活化种子,37°C 培养 2 h,加入 0.2 mmol/L IPTG 进行诱导,继续培养,每隔 1 h 测其  $A_{600}$ ,并取样进行电泳分析,同时破碎进行荧光测定,计算重组荧光蛋白的浓度。实验重复 3 次,数据表示为均值  $\pm$  SD。结果如图 1 所示。菌体生长呈典型的 S 型生长,2 h 后进入对数生长期,在 7 h 生物量达到最高点。重组蛋白的表达,在诱导后 7 h 达到最高,之后明显下降,而重组荧光蛋白的浓度总是低于重组蛋白的同时时间段的重组蛋白,并且浓度峰出现得稍晚一些。考虑是蛋白和色素结合是一个动态平衡,不是重组蛋白都结合色素,同时结合过程需要一定时间,是浓度峰滞后。可见要获得最大量的重组荧光蛋白,诱导时间要稍长一些。

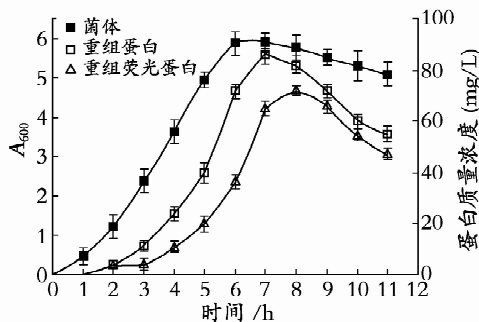


图 1 菌体和蛋白增长规律

Fig. 1 Thalii and protein amount increasing curve over time

### 2.2 诱导开始时间对重组荧光蛋白表达量的影响

250 mL 三角瓶中装入 LB 培养基 150 mL,以 5% 的接种量接入种子,在接入种子后的 1、3、5、7 h 时加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导,每隔一定时间取样破碎菌体,测定荧光强度并计算重组荧光蛋白浓度,计算重组荧光蛋白浓度。实验重复 3 次,数据表示为均值  $\pm$  SD。诱导开始时间对重组荧光蛋白表达量影响如图 3 所示。培养 1 h 开始诱导,达到最大合成量时间早,但是蛋白浓度最大值较低;培养 3 h 和 5 h 时诱导,达到最大合成量时间稍晚,蛋白质量浓度浓度最大值确实最高的;培养 7 h 开始诱导,达到最大合成量时间最晚,但是蛋白浓度最大值大大降低。培养 3~5 h 的时候是菌体生长对数期的早期,这时

候营养充足蛋白表达质量较好,重组蛋白和色素结合较多,重组荧光蛋白浓度较高;过早菌体生长速度慢,蛋白表达量低,过晚蛋白表达质量不好,或者形成包涵体,影响和色素结合,使重组荧光蛋白浓度太低。因此,培养 3~5 h 时诱导为最佳诱导开始时间。

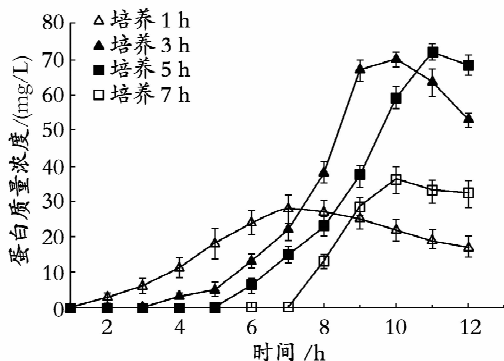


图 2 诱导开始时间对重组荧光蛋白表达量的影响

Fig. 2 Affection of induction starting time on recombinant fluorescent protein amount

### 2.3 诱导温度和时长对重组荧光蛋白表达量的影响

250 mL 三角瓶中装入 LB 培养基 150 mL,以 5% 的接种量接入种子,在接入种子后的 3 h 时加入 0.2 mmol/L IPTG,将菌体放在 37、32、27、22、17、12°C 下诱导,每隔一定时间取样破碎菌体,测定荧光强度并计算重组荧光蛋白浓度,计算重组荧光蛋白浓度。实验重复 3 次,数据表示为均值  $\pm$  SD,结果如图 3 所示。随着温度逐渐降低,重组荧光蛋白达到最大值的时间逐渐延长,达到最大值后,浓度又逐渐下降。在 22°C 诱导 7~8 h 后,重组荧光蛋白浓度达到最大值,这就是最佳诱导的温度和时长。

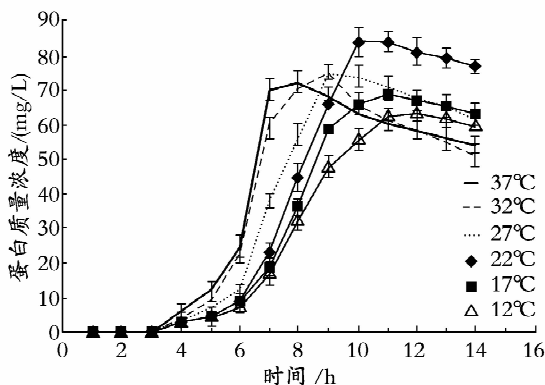


图 3 诱导温度和时长对重组荧光蛋白表达量的影响

Fig. 3 Affection of inducing temperature and duration on recombinant fluorescent protein amount

### 2.4 起始 pH 值对重组荧光蛋白表达量的影响

配制不同起始 pH 的培养基,接入 5% 的活化种

子,37℃培养 3 h 时,加入 0.2 mmol/L IPTG 在 22℃进行诱导,不同时间取样测定  $A_{600}$ ,在诱导 7 h 时,收获菌体进行电泳分析,同时进行荧光分析并计算重组荧光蛋白浓度。实验重复 3 次,数据表示为均值±SD。对于工程菌的生长,起始 pH 为 6.0、6.5、7.0 时,菌体的生长没有明显差异,pH7.5 时的菌体产量较高,pH8.0 时最低(如图 4)。这说明该工程菌适于中性稍偏碱性的环境中生长。起始 pH 为 6.0、6.5、7.0 时重组蛋白的表达量彼此间没有明显差异,起始 pH 为 7.5 重组蛋白表达量达到最高,到 pH 为 8.0 时又降低。随着 pH 值增加,重组荧光蛋白对重组蛋白的比例逐渐增加,说明 pH 值增高有助于重组蛋白和色基结合。重组蛋白表达量最高的起始 pH 值为 7.5。

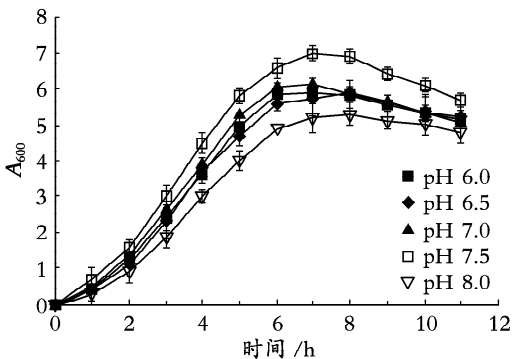


图 4 起始 pH 值对菌体生长的影响

Fig. 4 Affection of initial pH value on the bacteria growth

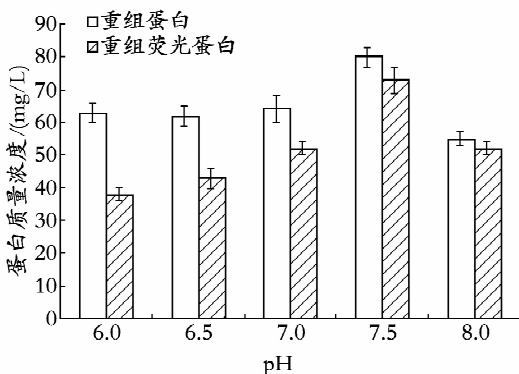


图 5 起始 pH 值对重组蛋白和重组荧光蛋白表达量的影响

Fig. 5 Affection of initial pH value on recombinant protein and recombinant fluorescent protein amount

## 2.5 接种量对重组荧光蛋白表达量的影响

按 2%、4%、6%、8%、10% 不同接种量接入活化种子,37℃培养 3 h 时,加入 0.2 mmol/L IPTG 在 22℃进行诱导,在诱导 7 h 时,收获菌体进行电泳分析,同时破碎菌体进行荧光分析,计算重组蛋白浓

度。实验重复 3 次,数据表示为均值±SD。从图 6 可见,随着接种量的增大重组蛋白和重组荧光蛋白浓度逐渐增加,接种量为 6% 时,蛋白浓度达到最高,再增加接种量并不能增加蛋白的最高浓度,反而使之下降。因此,选择 6% 的接种量为最优值。

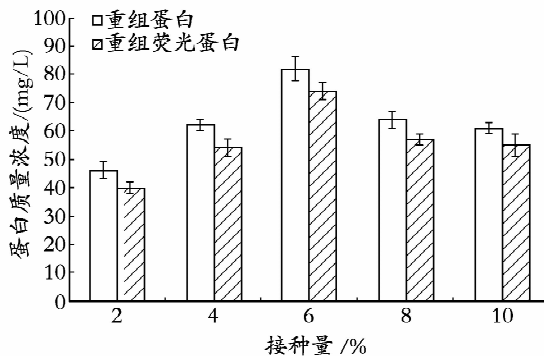


图 6 接种量对重组蛋白和重组荧光蛋白表达量的影响

Fig. 6 Affection of inoculum on recombinant protein and recombinant fluorescent protein amount

## 2.6 IPTG 浓度对重组荧光蛋白表达量的影响

250 mL 三角瓶中装入 LB 培养基 150 mL,以 5% 的接种量接入种子,在接入种子后的 3 h 时加入 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mmol/L IPTG,将菌体放在 22℃下诱导 7 h,取样破碎菌体,测定荧光强度并计算重组荧光蛋白浓度,计算重组荧光蛋白浓度。实验重复 3 次,数据表示为均值±SD,结果如图 7 所示。重组荧光蛋白浓度在 0.2~1.6 mmol/L IPTG 表达量最高,在这个范围内各用量无明显差异,低于或者高于这个范围都将是重组荧光蛋白表达量降低。为节约成本,选择 0.2 mmol/L 这个浓度作为最优诱导浓度。

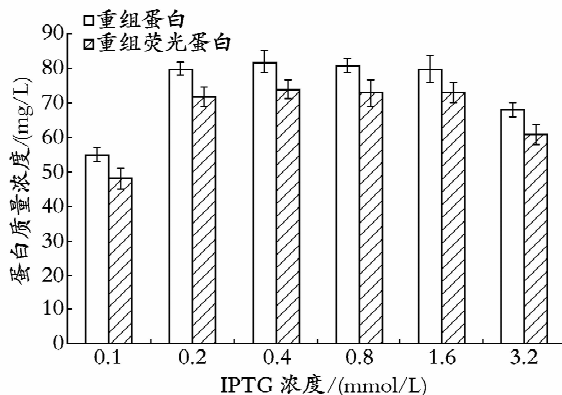


图 7 IPTG 诱导浓度对蛋白表达量的影响

Fig. 7 Affection of IPTG concentration on recombinant protein and recombinant fluorescent protein amount

### 3 讨论

基因工程菌株发酵条件不同于野生菌株,除了考虑温度、酸碱度等条件外,还需要考虑外源蛋白表达的诱导时间、诱导剂的浓度等条件。另外,外源蛋白的表达往往与菌体生长形成矛盾,因为外源蛋白的合成常常会抑制菌体生长,特别是某些对菌体产生毒性的蛋白或可分解菌体蛋白的蛋白酶;自催化重组荧光蛋白表达后还要和色基结合,色基结合的最适条件有和菌体生长的最有条件存在差异,从图 1 看出,菌体生长和重组蛋白以及重组荧光蛋白的积累存在不同规律,因此发酵条件的优化就更为重要。幸运的是,由于重组荧光蛋白的荧光特性,我们可以直接估算不同条件下重组荧光蛋白的浓度,而不需要综合菌体量和蛋白表达量进行综合分析。

在自催化重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白的发酵中,IPTG 诱导的开始时间和菌体收获时间都极为重要。在细菌生长对数中、前期诱导,蛋白产量都较好,IPTG 浓度在一个较宽的范围内对产物表达没有显著影响,这与以前一些有关工程菌发酵的研究结论相似<sup>[9,10]</sup>。诱导温度也是影响蛋白表达的一个重要因素<sup>[11,12]</sup>,诱导温度太高时蛋白表达量高,但是易于形成包涵体<sup>[13]</sup>,蛋白不能正常折叠,因此也不能和色基结合,因此 22℃,虽然菌体生长相对较慢,但是蛋白折叠质量好,重组荧光蛋白的产量最高。培养基的最适起始 pH 因个体而异,针对本实验工程菌 BL21(DE3)/pCDFDuet-1-*apcA*-*hox1*-*pcyA* 而言,pH7.5,但是同时在实验中发现,在较高 pH 值下蛋白和色基可能更容易结合,如图 5 所示,pH 为 8.0 时重组荧光蛋白占重组蛋白的比例最高,虽然如此,重组荧光蛋白总量仍低于 pH7.5 时,所以 pH7.5 为最佳起始 pH 值。实验表明,选择大接种量利于菌体快速生长。因为种子量大,种子液中含有大量的水解酶,利于分解培养基成分而使菌体能快速吸收养分<sup>[14,15]</sup>。但接种量过大时,细菌很快进入对数生长期,继而进入平台期,2 h 时菌体已处于生长后期,不是诱导表达重组荧光蛋白的最佳时间;同时菌体生长过快,大量消耗养分,则没有养分用于外源蛋白的表达,因此选择适当的接种量利于外源蛋白的表达。

综上所述,在装有 150 mL 培养基装入 250 mL 三角瓶中,自催化重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白基因工程菌发酵的优化条件为:起始 pH 为 7.5,按 6% 接入活化种子,37℃ 培养 3~5 h,转入 22℃ 培养,同时加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,诱导 7~8 h 后,收获菌体。通过用摇瓶发酵体系的分析,发现诱导温度、起始 pH 值等条件有较独特的要求,这些结

果为放大到发酵罐进行大规模和高密度发酵大量生产重组别藻蓝蛋白类荧光蛋白提供了依据。

#### 参考文献:

- [1] Gantt E. Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae [J]. *Int Rev Cytol*, 1980, 66: 45-48.
- [2] Grossman A R, Schaefer M R, Chiang G G, *et al.* The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions [J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 725-749.
- [3] Maccoll R. Cyanobacterial phycobilisomes [J]. *J Struct Biol*, 1998, 124: 311-339.
- [4] Tooley A J, Cai Y A, Glazer A N. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo- $\alpha$  subunit in a heterologous host [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10 560-10 565.
- [5] Guan X, Qin S, Su Z, *et al.* Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo- $\alpha$ -phycocyanin in *E. coli* [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2007, 142(1): 52-59.
- [6] Hu I C, Lee T R, Lin H F, *et al.* Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin  $\alpha$ -subunits by autocatalytic bilin attachment [J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 7 092-7 099.
- [7] Zhang W, Guan X, Yang Y, *et al.* Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin alpha-subunits by autocatalysis in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(Pt 2): 135-140.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1992. 880-887.
- [9] Sakamoto S, Terada I, Iijima M, *et al.* Fermentation conditions for efficient production of thermophilic protease in *Escherichia coli* harboring a plasmid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42(4): 569-574.
- [10] Fieschko J, Ritch T. Production of human alpha consensus interferon in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Chem Eng Commun*, 1986, 45: 229-240.
- [11] Herendeen S L, Van Bogelen R A, Neidhardt F C. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperature [J]. *J Bacteriol*, 1979, 139: 185-194.
- [12] Shiloach J, Bauer S. High-yield growth of *E. coli* at different temperature in a batch scale fermentor [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1975, 17: 227-239.
- [13] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli* [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1 399-1 408.
- [14] 刘文波, 柴同杰. 大肠杆菌高密度发酵研究 [J]. 动物科学与动物医学, 2001, 18(1): 27-29.
- [15] 谢秋玲, 廖美德, 余榕捷, 等. 基因重组 hEGF 融合蛋白的发酵条件优化 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(12): 600-602, 635.

# Optimization of fermentation conditions for producing allophycocyanin alike recombinant fluorescent protein in *Escherichia coli*

ZHANG Wei-jie<sup>1,2</sup>, YANG Yu<sup>1,2</sup>, GUAN Xiang-yu<sup>3</sup>, GE Bao-sheng<sup>4</sup>, CHEN Hua-xin<sup>1</sup>, LI Fu-chao<sup>1</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 4. China University of Petroleum, Qingdao 266555, China)

**Received:** Feb. , 20, 2009

**Key words:** allophycocyanin alike recombinant fluorescent protein; fermentation; optimization

**Abstract:** In present study, fermentation conditions of allophycocyanin alike recombinant fluorescent protein engineering bacteria in 250 mL shaking flask with 150 mL medium were optimized. Affections of inoculation volume, initial acidity-basicity, starting time, temperature and duration of inducement, and IPTG concentration on allophycocyanin alike recombinant fluorescent protein produce were analyzed. The result showed that the highest output of recombinant fluorescent protein could be achieved under the following conditions: 6% inoculum volume, initial medium pH7.5, incubation temperature 37°C, incubation duration 3~5 h, induction temperature 22°C, IPTG concentration 0.2 mmol/L, and induction duration 7~8 h. All these conditions provided a reference for a large-scale and high-density fermentation of allophycocyanin alike recombinant fluorescent protein engineering bacteria.

(本文编辑:康亦兼)