

文章编号:1001-5132(2009)03-0343-05

重组大肠杆菌中 NTA 的发酵与表达优化

顾建雅, 夏杰, 陆兵, 徐殿胜*

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 研究诱导剂、诱导剂浓度、诱导时间、锌离子以及在发酵培养基中组合添加乳糖对提高重组新型溶栓酶外源蛋白的表达效率的作用, 结果表明: IPTG 诱导效果优于乳糖, IPTG 诱导浓度选择 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 诱导时机选择菌体 OD_{600} 接近 4.0 时, 诱导后的最佳培养时间为 6 h, 加入 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ZnCl_2 后, 外源蛋白表达可提高 40%, 发酵结果提高 29.8%。在培养基中组合加入微量的乳糖, 可以使外源蛋白的表达效率提高 10%~15%。

关键词: 重组新型溶栓酶; 发酵; 表达; 优化

中图分类号: Q789

文献标识码: A

据世界卫生组织(WHO)统计表明: 目前全世界有超过 30%的人患有心脑血管疾病, 每年死于心脑血管疾病的人有 1530 万, 占总死亡人数的 1/4^[1]。据不完全统计, 我国每年仅因中风而导致的医疗费用与误工费用就高达 100 多亿元, 发展抗血栓治疗的特异药物为各生物药物公司的首选项目, 溶栓剂的研究具有重大的经济效益和社会意义。

重组新型溶栓酶 NTA(New Thrombolytic Agent) 是一个通过重组人体基因工艺所产生的具有溶解血栓功能的酶蛋白^[2]。NTA 是经重组基因克隆所获得的新型溶栓酶, 该分子由大肠杆菌生产, 由 355 个氨基酸残基组成, 含 9 对二硫键, 相对分子质量为 39 kD。NTA 基因克隆于 T7 启动子和 lac 调控下表达^[3-4]。

基于已有的关于 NTA 发酵条件的资料, 我们希望改进发酵生产工艺, 使 NTA 尽可能多的表达, 为下一步的工业化生产打下基础。经研究发现, 通

过优化诱导系统包括确定诱导剂 IPTG 及其浓度、诱导时间、添加锌离子^[5], 以及在发酵培养基中组合添加乳糖等方法, 均可以提高外源蛋白的表达效率^[6]。

1 材料与方法

1.1 菌株

表达系统由珠海亚利生物工程有限公司提供。宿主菌为 BL21(DE3), 质粒为 PET-16b。重组蛋白 NTA 基因克隆于 lac 启动子下游噬菌体的 $\Phi 10$ 启动子控制下的上述质粒中。

1.2 培养基

种子培养基: 蛋白胨 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $5.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 青霉素 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。发酵培养基: 蛋白胨 $11.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 $11.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,

收稿日期: 2009-04-08.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

第一作者: 顾建雅(1979-), 女, 上海人, 硕士/讲师, 主要研究方向: 生物工程. E-mail: janyagu@ecust.edu.cn

*通讯作者: 徐殿胜(1965-), 男, 山东胶南人, 教授, 主要研究方向: 生物工程. E-mail: xuds@ecust.edu.cn

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g·L⁻¹, KH_2PO_4 2.7 g·L⁻¹, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.78 g·L⁻¹, 青霉素 0.1 g·L⁻¹. 金属离子溶液: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 30 g·L⁻¹, ZnCl_2 1.5 g·L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g·L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g·L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 g·L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g·L⁻¹, CaCl_2 1.0 g·L⁻¹, H_3BO_3 0.5 g·L⁻¹. 维生素溶液: VB_1 6.0 g·L⁻¹, VB_2 0.2 g·L⁻¹, VB_6 3.0 g·L⁻¹, 泛酸钙 2.7 g·L⁻¹, 生物素 0.03 g·L⁻¹, 叶酸 0.02 g·L⁻¹.

上述碳源、氮源、无机盐溶液和维生素溶液分别配制灭菌, 金属离子溶液和维生素溶液用无菌过滤除菌. 蛋白胨、酵母膏均为 Oxoid 试剂, 其余均为国产 AR 级、BR 级试剂.

1.3 仪器与设备

SCS-24 摇床、GL-21M 型冷冻离心机, 上海市离心机械研究所生产. DY-A 电泳仪, 北京市六一仪器厂生产. Unico UV-型分光光度计、Unico 比色皿(玻璃), Unico 仪器有限公司生产(上海). pH B-4 型 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司生产.

1.4 培养方法

甘油管保藏菌种, 用接种针从甘油管中挑取少量的菌种, 在平板上划线分离, 37 °C 摇瓶培养 12 h 后, 挑取单克隆, 转入含有 0.1 g·L⁻¹ 氨苄青霉素的种子培养基中进行培养. 37 °C 摇瓶培养 12 h 后, 按照 1% 的接种量转入二级摇瓶中. 单克隆菌种在 0.1 g·L⁻¹ 氨苄青霉素条件下接种培养, 每 1 h 取样测定 OD_{600} . 种子培养液在培养 8 h 后, 按照 2.5% 的接种量转入发酵培养基中, 接种后每 1 h 测定 1 次 OD_{600} .

1.5 分析方法

菌浓度与湿重量的测定: 菌体浓度稀释至 OD 值 0.1~0.5, 在 Unico UV-型分光光度计上于 600 nm 读取 OD 值, 培养物在 $8 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后称重.

NTA 表达量测定: 用分离胶浓度为 10%、浓缩胶浓度为 6% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 然后利用软件 TotalLab V1.11 扫描目标蛋白灰度和样品各组成的灰度, 通过灰度比例, 可计算得到细胞抽提

液总蛋白中 NTA 所占比例.

2 结果与讨论

2.1 NTA 发酵与表达中诱导系统的优化研究

降低诱导系统的成本是工业化微生物的关注点之一, 一些新的诱导剂逐渐引起了人们的关注, 如在 Lac 启动子控制下的表达, 用 IPTG 作为诱导物能起到较好的诱导效果, 用乳糖作为诱导物因为能兼做碳源而大大地降低了成本. 诱导剂 IPTG、乳糖和操纵元的阻遏蛋白结合, 使阻遏蛋白的空间构象变化, 四聚体解聚成单体, 失去与操纵子特异性紧密结合的能力, 从而解除了阻遏蛋白的作用, 使其后的基因得以转录合成利用乳糖的酶类.

2.1.1 用 IPTG 做诱导剂对发酵结果的影响

不改变其他培养条件, 当培养液 OD_{600} 为 4.0 时, 加入 IPTG 诱导, 诱导浓度分别为 0.5 mmol·L⁻¹, 1.0 mmol·L⁻¹, 1.5 mmol·L⁻¹, 2.0 mmol·L⁻¹, 2.5 mmol·L⁻¹, 3.0 mmol·L⁻¹, 3.5 mmol·L⁻¹, 4.0 mmol·L⁻¹, 继续培养 6 h 后的发酵结果如图 1 所示.

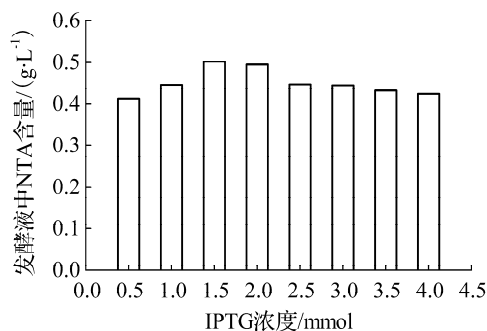


图 1 不同 IPTG 诱导浓度对发酵结果的影响

从图 1 可知, 随着 IPTG 浓度的增大, 蛋白表达量逐渐增大, 但当 IPTG 浓度大于 2.0 mmol·L⁻¹ 时, 随着 IPTG 浓度的不断增大菌体的最终浓度有所降低, 蛋白表达量也不断降低. 因此, 选择 1.5 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 浓度进行诱导效果最佳, NTA 发酵表达达到了 0.50 g·L⁻¹.

2.1.2 用乳糖做诱导剂对发酵结果的影响

同样不改变培养条件, 当培养液 OD_{600} 为 4.0

时, 加入乳糖诱导, 诱导浓度分别为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 6 h 后的发酵结果如图 2 所示。

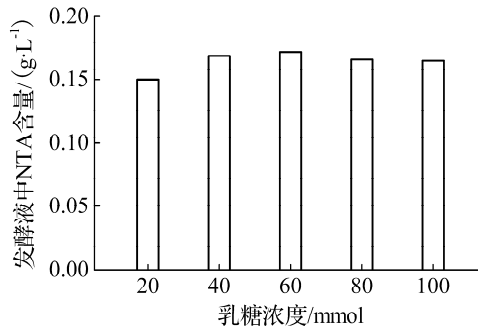


图2 不同乳糖浓度诱导对发酵结果的影响

在实验过程中测试了5组乳糖浓度, 结果发现5组发酵结果相差不大, 蛋白表达没有明显的差异, 选用乳糖作为诱导剂的蛋白表达量明显低于 IPTG, 其 NTA 发酵表达仅为 $0.17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 为 IPTG 诱导结果的 40% 左右, 所以在后续的实验中, 我们确定使用 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 浓度进行诱导。

2.1.3 诱导时机的确定

诱导时机的选择对外源蛋白的表达影响较大, 对最终菌体密度的影响较小。一般来说在菌体的指数生长期, 生长状态良好, 此时诱导易于合成外源蛋白。过早诱导可能会导致菌体生长来不及达到稳定状态, 而外源蛋白过早表达会使代谢负荷加重, 菌体的正常代谢发生紊乱, 从而使表达量下降。而诱导时间较晚, 则菌体的生长旺盛期已过, 各种代谢副产物已经有所积累, 营养物质则消耗到较低水平, 这样的生长状态对外源蛋白的表达也是不利的。

一般来说, 重组菌的诱导通常要在对数生长期进行, 其最佳诱导起始时间需要针对不同的宿主菌及不同的质粒体系加以变化。我们主要考察大肠杆菌对数生长期的不同阶段诱导, 即当 OD_{600} 为 3.0, 4.0, 5.0 时最终的菌体密度及 NTA 表达的结果, 见表 1。

实验结果证明, 在菌体 OD_{600} 接近 4.0 时进行诱导培养 6 h 的效果最佳。最终蛋白的产量相对于

其他 2 个诱导时间最高提高了 15%。

表 1 不同诱导时机对发酵结果的影响

诱导时菌体密度 OD_{600}	3.0	4.0	5.0
最终菌体密度 OD_{600}	10.62	10.88	11.98
每克干菌体中 NTA 质量/g	0.033 1	0.037 1	0.031 2
每升发酵液中 NTA 含量/g	0.363	0.418	0.389

2.1.4 诱导时间的确定

诱导时间对外源蛋白表达有着重要的影响, 随着诱导时间的延长, 外源蛋白的表达量增加, 但外源蛋白在细胞内的积累, 对重组菌产生毒性, 合成速率下降, 甚至产物被分解。

为提高 NTA 蛋白的表达量, 需要确定适当的诱导时间。在不改变培养条件的情况, 在吸光度为 4.0 时, 用 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 进行诱导, 培养 4~10 h 后, 结果见表 2、图 3 和图 4。

表 2 不同诱导时间下 NTA 的表达情况

诱导后培养时间/h	4	5	6	7	8	9	10
NTA 所占比例/%	20.4	25.6	28.8	29.1	29.8	30.9	29.4

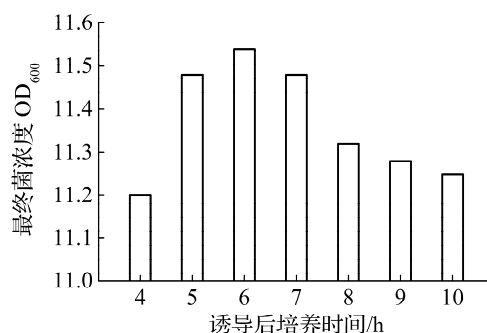


图 3 诱导时间对菌体浓度的影响

根据图 3, 诱导后培养 5 h, 菌体浓度基本达到平稳, 培养 6 h 左右, 菌体浓度开始出现下降, 推测这与培养基中营养物质消耗殆尽有关。

据表 2 和图 4, 通过电泳分析发现, 在加入诱导剂 4~6 h 之内, 蛋白表达量上升较快, 呈线形平稳上升趋势。在诱导 6 h 后, 表达量开始趋于平稳。

尽管 IPTG 诱导培养 6 h 后, 蛋白的表达就趋于稳定, 但是培养 6 h 之后, 可能是由于营养物质

消耗殆尽, 菌体浓度开始下降, 因此, 最后确定诱导后的最佳培养时间为 6 h.

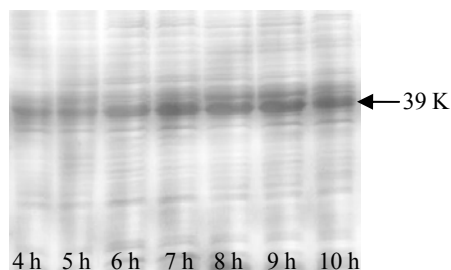


图4 诱导时间对 NTA 表达的影响

2.2 锌离子对蛋白表达的影响

根据文献[4], 金属锌离子对部分重组蛋白的表达、以及对蛋白活性有一定的影响作用, 适宜的锌离子浓度对蛋白的形成及结构稳定性有明显的改进作用.

实验中, 在发酵培养基中分别加入 $0.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ZnCl_2 溶液进行培养, 对发酵结果进行比较, 结果如图 5 所示.

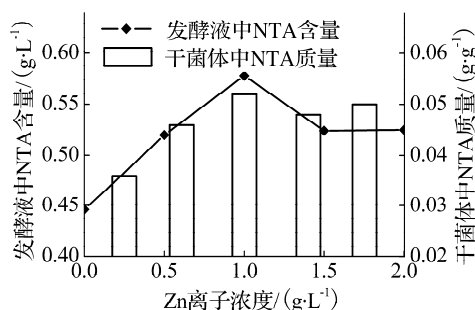


图5 添加 Zn 离子对发酵结果的影响

从图 5 可以发现, 在相同培养条件下, 锌离子的适当加入能较大幅度地提高外源蛋白的表达程度. 但是与此同时随着锌离子的加入, 出现了菌体被抑制生长的情况, 菌体浓度明显下降.

在未加入锌离子的空白对照组中, 每升发酵液 NTA 含量为 0.445 g , 而培养基中加入 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ZnCl_2 后, 每升发酵液中 NTA 的含量为 0.578 g , 发酵结果提高了 29.8%; 每克干菌体中 NTA 含量达到 0.052 g , 外源蛋白表达提高 40%. 实验证明, 适当的锌离子浓度对 NTA 蛋白的表达有着良好的促进作用.

2.3 发酵培养基中加微量乳糖对蛋白表达的影响

IPTG 比乳糖能更好的诱导 NTA 蛋白的表达 (IPTG 诱导表达得 NTA 比乳糖诱导高出 2.5 倍), 因此我们选择 IPTG 作为诱导剂.

但是乳糖兼具诱导和作为细胞生理代谢碳源或能源的双重作用. 因此在实验中, 我们尝试以 IPTG 作为诱导剂, 同时在培养基中加入不同浓度的乳糖, 观察 NTA 表达的效果.

在发酵培养基中分别加入 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳糖进行培养, 并在在吸光度为 4.0 时, 用 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 进行诱导, 继续培养 6 h, 比较发酵表达结果, 如图 6 所示.

从图 6 可以发现, 微量的乳糖加入后可以最终使外源蛋白的表达效率提高 10%~15%, 而菌体浓度几乎保持不变, 发酵结果有所提高.

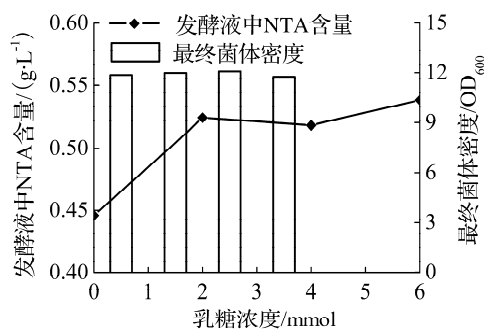


图6 添加微量乳糖对发酵结果的影响

3 结论

实验所研究的 NTA 由青岛海澜德医药科技有限公司与华东理工大学生物工程学院过程工程实验室共同研发, 主要基于摇床上的发酵培养, 对重组大肠杆菌表达 NTA 进行了发酵培养条件的优化, 提高工程菌培养密度, 提高目标蛋白表达效率, 使最终发酵结果有所提高. 通过优化诱导系统, 确定 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 作为诱导剂, 诱导时机选择菌体 OD_{600} 接近 4.0 时, 诱导后的最佳培养时间为 6 h, 优化后 NTA 发酵表达达到了 $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 相同培养条件下, 乳糖诱导结果仅为其 40%.

此外, 在发酵培养基中添加锌离子, 组合添加乳糖等方法均可以有效提高外源蛋白的表达效率. 在培养基中加入 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ZnCl_2 后, 外源蛋白的表达程度较空白组提高了40%, 发酵最终结果较空白组提高了29.8%. 以IPTG作为诱导剂, 同时在培养基中组合加入微量的乳糖, 可以使外源蛋白的表达效率提高 10%~15%.

参考文献:

- [1] 杜平中. 溶栓药物的研究进展[J]. 国外医药·合成药·生化药, 1998, 19(2):67-71.
- [2] 窦献德. 重组新型溶栓酶: 中国, 00112980.5[P]. 2000-06-02.
- [3] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, et al. Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes [J]. *Methods Enzymol*, 1990, 185:60-89.
- [4] Neubauer P, Hofmann K, Holst O, et al. Maximizing the expression of a recombinant gene in *E. coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 36:739-744.
- [5] 孙爱友, 魏东芝. 大肠杆菌高效表达可溶性 TRAIL 及其代谢工程研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2006.
- [6] 陆兵, 夏杰, 徐殿胜, 等. 10 启动子驱动大肠杆菌中 rhNTA 表达的乳糖诱导[J]. 华东理工大学学报, 2001, 27(2):131-134.

Optimization of Fermentation Condition and Expression of NTA in Recombinant *Escherichia coli*

GU Jian-ya, XIA Jie, LU Bing, XU Dian-sheng*

(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The study is conducted on inducing agent, inducer concentration, induction time, zinc ion and lactose added to fermentation medium to improve the expression of the New Thrombolytic Agent. The test results show that IPTG induced is more effective than lactose, inducer concentration is $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ with bacterial OD_{600} being close to 4.0. The optimal culture time after the induction is found to be 6 hours. By adding $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of ZnCl_2 , the expression of exogenous protein increases by 40%, and fermentation increases by 29.8%. With addition of slight amount of lactose in the fermentation medium, the efficiency of protein expression is found to increase by 10%~15%.

Key words: New Thrombolytic Agent(NTA); fermentation; expression; optimization

CLC number: Q789

Document code: A

(责任编辑 史小丽)