文章编号:1000-5404(2006)22-2243-04

论著

肽抗生素 hPAB-β 制备工艺中基因工程菌的改建

张 椿,丛延广,胡福泉,饶贤才 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 通过重新构建新的3拷贝串联体基因工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15,在原有肽抗生素 hPAB-β 制备工艺路线基础上,使发酵后目的肽的最终产量得到提高。**方法** 重新构建含有重组质粒 *pQE*31- *hPAB-β*(3)的基因工程菌 M15,然后筛选出能够稳定而且高效表达目标蛋白的最佳工程菌株,进行传代稳定性分析,并明确新建工程菌中目标融合蛋白的表达形式和亲和层析的效果,最后通过相同条件下,在逐步放大的发酵规模(1 L 摇瓶,3.7 L 和 10 L 发酵罐),与以往的3拷贝串联体工程菌 *phPAB-β*(3)/*JM*109 进行对比研究(湿菌产量、目标蛋白表达率),同时观察新建工程菌在 10 L 发酵中目标蛋白的表达和遗传稳定性。**结果** 筛选出的最佳工程菌株的目标蛋白的表达效率为 34.8%,经 LB 培养传代 10 次后,点种 LB(AMP、KAN)平板,生长率为 100%,质粒保存率达 100%。在 1 L 摇瓶,3.7 L 和 10 L 发酵罐的发酵规模下,*phPAB-β*(3)/*M*15 与 *phPAB-β*(3)/*JM*109 一样,目标融合蛋白都以包涵体形式表达,亲和层析效果相近,目标蛋白表达率无显著性差异($P>0.05$),但发酵产量大于后者,有非常显著性差异($P<0.01$)。且新建工程菌在 10 L 发酵中发酵产量达到 55.15 g/L,诱导表达后的第 5 小时,蛋白表达达到高峰,蛋白表达率为 30.2%,重组质粒保存率为 100%。**结论** 新构建工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15 比起原来基因工程菌 *phPAB-β*(3)/*JM*109,是更为理想且利于肽抗生素 hPAB-β 工业生产的基因工程菌。

关键词: 肽抗生素;hPAB-β;发酵; M15
中图法分类号: Q819;Q939.1;TQ465.6 **文献标识码**: A

Reconstruction of engineered bacteria in preparing recombinant human peptide antibiotic β

ZHANG Chun, CONG Yan-guang, HU Fu-quan, RAO Xian-cai (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To reconstruct the new engineered bacteria expressing hPAB-β triploids so as to improve the outputs of recombinant human peptide antibiotic β. Methods The recombinant plasmid pQE31-hPAB-β(3) was transformed into *E. coli*. M15 to screen the new engineered bacteria expressing hPAB-β triploids. The stabilities of *phPAB-β*(3)/*M*15 were observed in continuous cultures. The expression levels of the fusion peptides of interest and the bacterial yields of the new engineered bacteria *phPAB-β*(3)/*M*15 were compared with that of *phPAB-β*(3)/*JM*109 in different fermentation scales. Results Genetic stability of the recombinant plasmid and *phPAB-β*(3)/*M*15 was 100% after 10 passages. Take bacterial yields into account, the new engineered bacteria *phPAB-β*(3)/*M*15 was better than *phPAB-β*(3)/*JM*109 at the similar expression levels of the target proteins by "*t*" test analysis ($P<0.01$). The yields of fermentation reached 55.15 g/L in 10 L fermenter, and the expression levels were up to 30.2% at 5th h after induction. During the fermentation, the recombinant plasmids were stable in culture. Conclusion The new engineered bacterium *phPAB-β*(3)/*M*15 successfully constructed was more consummate and effective on the basis of the original process.

Key words: peptide antibiotics; hPAB-β; fermentation; M15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171119);全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z070);国家"863"项目(2002AA214211)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30171119), the Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (01Z070) and the National "863" Key Research Project of China (2002AA214211)
作者简介:张 椿(1977-),男,安徽省安庆市人,博士研究生,医师,主要从事抗生物感染方面的研究。电话:13193111993
通讯作者:饶贤才,电话:(023)68752834,E-mail:raoxiancai@126.com
收稿日期:2006-02-20;**修回日期**:2006-06-28

肽抗生素[1]（peptide antibiotics）是近年来发现的生物体基因编码的具有抗微生物活性的小肽，通常是由12～60个氨基酸组成，分子量 $< 10 \times 10^3$，是生物体天然免疫的重要组成部分。它作为一种新型的抗感染制剂，具有广谱、高效的杀菌活性，在传统抗生素耐药性问题日益严重的今天，已成为抗生素研发中的一个热点之一。本实验室在过去5年围绕重组肽抗生素hPAB-β[2]的研发中已经初步确立了1条生产工艺路线，然而在中试放大（10 L发酵罐）过程中，发现原工程菌 *phPAB-β*(3)/*JM*109 的发酵产量欠佳，发酵产量最高只能达到39.2 g/L，与理想的高密度发酵[3]中的菌体产量相比，有一定差距，以致最终目的肽的制备产量也不尽人意。因此，本研究拟通过重新构建 *phPAB-β*(3)/*M*15 作为新的基因工程菌，进一步提高发酵产量，实现重组肽抗生素 hPAB-β 制备的最大化。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

重组质粒 *pQE*31- *hPAB-β*(3)、*phPAB-β*(3)/*JM*109、M15（pREP4）感受态细胞皆由本室制备并保存。

1.2 主要试剂

质粒提取试剂盒（上海华舜），限制性内切酶（*Bam*HⅠ），溶菌酶（河南华美公司），尿素、咪唑（美国BBI），Ni-NTA agarose（德国Qiagen），KAN、AMP（西南制药），IPTG（北京赛百盛），Tricine、PMSF、β-ME、TritonX-100（美国Amresco分装）。

1.3 主要仪器设备

3.7 L发酵罐（瑞士Bioengineering AG），10 L发酵罐（德国B. Brawn Biotech），JY92-2D超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技公司），高压匀浆机（丹麦Bio STAT. C），GL20C高速冷冻离心机（中科院武汉科学仪器厂），Power PAC300电泳仪、凝胶成像仪、BioLogic LP层析仪、Mini PROTEAN电泳装置（美国Bio-Rad）。

1.4 实验方法

1.4.1 *phPAB-β*(3)/*M*15 基因工程菌的构建　取1 μl重组质粒 *pQE*31- *hPAB-β*(3) 转化入100 μl M15感受态细胞中，再取50 μl转化产物涂布LB（AMP）平板，37 ℃孵育16～20 h。随机挑取3个菌落，分别接种于3 ml LB（AMP）液体培养基，37 ℃，160 r/min振摇培养16～20 h。然后用试剂盒提取质粒，各取5 μl提取质粒和阳性重组质粒 *pQE*31- *hPAB-β*(3)，用*Bam*HⅠ酶切后，行0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4.2 优势菌株的筛选和遗传稳定性分析　①将阳性菌接种到含AMP（100 μg/ml）及KAN（25 μg/ml）的LB平板，37 ℃孵箱培养过夜后，随机挑取10个单菌落，分别接种于10 ml LB（AMP、KAN）液体培养基中，37 ℃摇床160 r/min过夜培养。再取上述菌液各100 μl加入到2 ml的LB（AMP、KAN）试管中，37 ℃摇床160 r/min培养3.5 h[$D(600) \approx 0.5$]，加入IPTG（终浓度为1 mmol/L）诱导表达，继续培养4.5 h后，对各菌液行14% SDS-PAGE电泳分析目标蛋白表达情况。②取10 μl筛选出的高表达菌株转种普通LB液体培养基，37 ℃摇床160 r/min过夜培养，反复传代10 d，再取等量稀释菌液涂LB平板，过夜培养后挑取100个单菌落，点种于LB（AMP、KAN）平板上，培养过夜后计数菌落生长率，同时随机挑取10个菌落增菌后用质粒小量抽提试剂盒提取质粒，取样行0.8%琼脂糖凝胶电泳观察质粒保存情况。

1.4.3 目标融合蛋白表达形式鉴定和亲和层析纯化效果观察　①将诱导表达后的工程菌离心（8 000 r/min×10 min）收集沉淀，以TBS500缓冲液重悬菌体，按每克湿菌，在悬液中加入8 μl 50 mmol/L PMSF、80 μl 10 mg/ml溶菌酶，采用超声法[4,5]或者高压匀浆法破菌。用显微镜观察破菌情况。18 000 r/min离心30 min，收集上清和沉淀，再以含0.5% Triton X-100的TBS500缓冲液洗涤沉淀，18 000 r/min离心30 min，收集上清和沉淀，反复2次后，在沉淀中加入8 mol/L尿素和β-ME（两者比例为3 ml∶10 μl），置4 ℃冰箱，静置过夜，对其溶解情况进行评估。对菌体裂解液、裂解上清、沉淀尿素溶解液取样行15% Tricine-SDS-PAGE电泳。②采用Ni-NTA agarose柱进行亲和层析纯化。采用8 mol/L尿素平衡柱子后，取经0.22 μm滤膜过滤的包涵体溶解液上清3 ml上样，持续以5 mmol/L咪唑冲洗杂蛋白，待UV值回归基线，用20 mmol/L咪唑洗脱结合不牢固的杂蛋白，直至UV值回归基线，再用150 mmol/L咪唑洗脱目标融合蛋白，收集UV>0.05的峰，最后用500 mmol/L咪唑洗脱全部结合物质，以净化柱子。对穿过峰、各洗脱峰取样行15% Tricine-SDS-PAGE电泳。

1.4.4 *phPAB-β*(3)/*M*15 和 *phPAB-β*(3)/*JM*109 发酵产量和蛋白表达率的比较　①取3拷贝串联体工程菌 *JM*109 和 *M*15 最佳表达工程菌，分别转种5 ml改良M9-CA（AMP）和改良M9-CA（AMP、KAN）液体培养基，37 ℃摇床160 r/min振摇培养过夜，作为发酵用种子菌。②摇瓶发酵：采用含0.1%葡萄糖、10^{-7} mol/L微量元素和2 mol/L $MgCl_2$ 的改良M9-CA（AMP）和改良M9-CA（AMP、KAN）培养基，分别接种2%种子菌，在37 ℃条件下培养至$D(600) \approx 2.5$（对数后期）时，以终浓度为100 μmol/L的IPTG诱导表达5 h。③发酵罐发酵：采用含0.1%葡萄糖、10^{-7} mol/L微量元素和2 mol/L $MgCl_2$ 的改良M9-CA（AMP）和改良M9-CA（AMP、KAN）培养基，分别接种7%（3.7 L发酵罐）和10%（10 L发酵罐）种子菌，在37 ℃、pH 7.4、PO_2控制在30%～40%条件下，培养至$D(600) \approx 2.2$（对数后期）时，以0.7 ml/min的初速度，0.01 ml/min^{2}的加速度的匀加速方式，加3倍体积补料，在对数后期（PO_2由下降转为上升）加终浓度为100 μmol/L的IPTG诱导5 h，同时以0.5 ml/min的初速度，匀速持续补料，直到发酵结束。④发酵菌离心后称取各次湿菌发酵产量，比较两者在相同发酵规模下的发酵产量差异。⑤发酵后，分别取相同规模下两者各次的工程菌行14% SDS-PAGE电泳，比较目标蛋白表达率。

1.4.5 发酵中目标蛋白的表达和遗传稳定性分析[6]　①于发酵开始后的第1.5、3、4.5、6、7、8、9、10小时各取样1次，行15% Tricine-SDS-PAGE电泳，了解工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15 在发酵中目标蛋白的表达情况。②于发酵过程中1～10 h内取样（1次/h），涂普通LB平板，37℃孵育过夜，次日挑取单菌落，增菌后提取质粒，行0.8%琼脂糖凝胶电泳，分析重组质粒在发酵

罐发酵过程中的遗传稳定性。

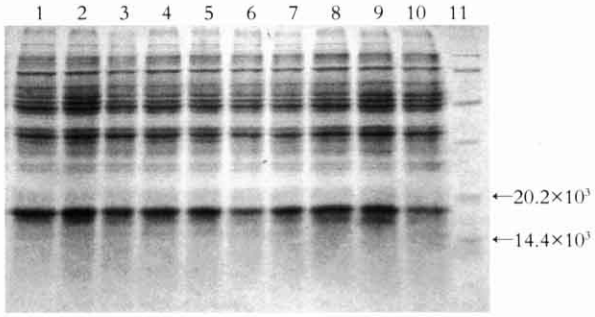
1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　*phPAB-β*(3)/*M*15 的构建、高表达菌株的筛选及传代稳定性分析

通过重新提取转化入感受态细菌 M15 的重组质粒 *pQE*31-*hPAB-β*(3)，与原重组质粒经 *Bam*H Ⅰ 酶切后，在 0.8% 琼脂糖电泳对照下，可见提取质粒与原质粒条带带谱一致，另外由图 1 所示的 14% SDS-PAGE 电泳图谱可见，随机挑取的 10 个菌落均可表达分子量约 17 $\times 10^3$ 的蛋白质，与预期目标蛋白分子量大小相符，说明我们成功构建了新的 *phPAB-β*(3)/*M*15 基因工程菌。利用凝胶成像仪中灰度分析功能，得出其目标蛋白表达率为 24.6% ~34.8%，选取表达率最高的菌株 2#(34.8%)，进行传代稳定性分析，结果显示，经普通 LB 培养传代菌，传代 10 次后，点种 LB(AMP、KAN)平板，生长率为 98%，生长出菌落的质粒保存率达 100%。结合以前 *phPAB-β*(3)/*JM*109 的传代稳定性实验结果，提示 *phPAB-β*(3)/*M*15 无论平板生长率还是质粒保存率都略高于 *phPAB-β*(3)/*JM*109，经 F 检验，两者无显著性差异($P > 0.05$)，表明基因工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15 和 *phPAB-β*(3)/*JM*109 一样，都具有良好的传代稳定性，是适合我们融合蛋白表达的理想的基因工程菌。



1－10：10 个单菌落；11：蛋白质分子量标准

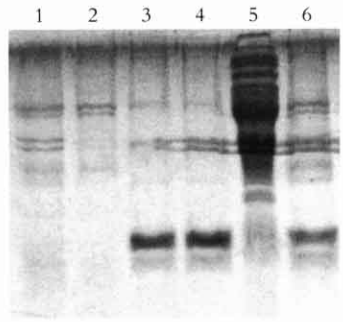
图 1　*phPAB-β*(3)/*M*15 的 SDS-PAGE

2.2　目标融合蛋白表达形式鉴定和亲和层析纯化效果观察

①15% 的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图 2 显示，*phPAB-β*(3)/*M*15 在菌体裂解液的上清中未见 3 拷贝蛋白表达，而在8 mol/L 尿素溶解沉淀后的溶解液中可见到条带深染的 17 $\times 10^3$ 左右的蛋白表达带，同时在洗涤裂解后沉淀，再次洗涤的沉淀中亦未见相应位置的表达条带，说明 *phPAB-β*(3)/*M*15 也以包涵体的形式表达。②Ni 柱的亲和层析纯化中 150 mmol/L 的咪唑竞争洗脱，得到 3 拷贝的目标融合蛋白，而在穿过以及 5、20 mmol/L 的洗脱液中未发现目的蛋白条带。说明工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15 和 *phPAB-β*(3)/*JM*109 的层析效果相同。

2.3　*phPAB-β*(3)/*M*15 与 *phPAB-β*(3)/*JM*109 发酵产量和目标蛋白表达率的比较

①工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15 在 3 种发酵规模下的发酵产量，都优于 *phPAB-β*(3)/*JM*109，经 t 检验，两者差异非常显著($P < 0.01$)，且在 10 L 发酵罐中的发酵产量达到了 55.150 g/L。②工程菌 *phPAB-β*(3)/*M*15 在发酵放大过程中的融合蛋白表达率和 *phPAB-β*(3)/*JM*109 相似，没有降低，经 t 检验，两者无显著性差异($P > 0.05$)(表 1)。



1：穿过峰；2：20 mmol/L 咪唑洗脱；3，4：150 mmol/L 咪唑洗脱；5：裂解上清；6：8 mol/L 尿素溶解液

图 2　*phPAB-β*(3)/*M*15 中目标蛋白表达形式的鉴定及亲和层析后的效果

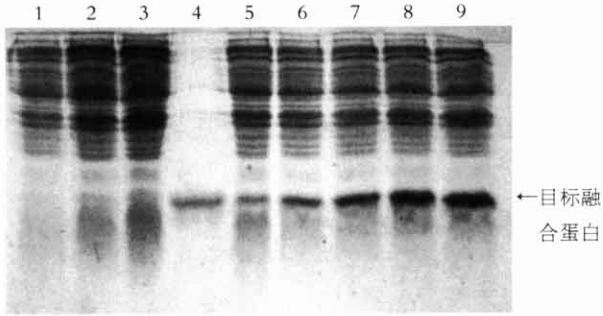
表 1　3 种发酵规模下的细菌发酵产量和目标融合蛋白表达率的比较($\bar{x} \pm s$)

发酵菌	n	*phPAB-β*(3)/*JM*109		*phPAB-β*(3)/*M*15	
		细菌湿重 (g/L)	蛋白表达率 (%)	细菌湿重 (g/L)	蛋白表达率 (%)
1 L 摇瓶	5	7.48 ±0.56	30.64 ±4.79	9.26 ±0.24[a]	32.30 ±2.51
3.7 L 发酵罐	3	14.88 ±0.53	29.02 ±2.35	24.25 ±1.47[a]	29.58 ±4.29

a：$P < 0.01$，与 *phPAB-β*(3)/*JM*109 组比较

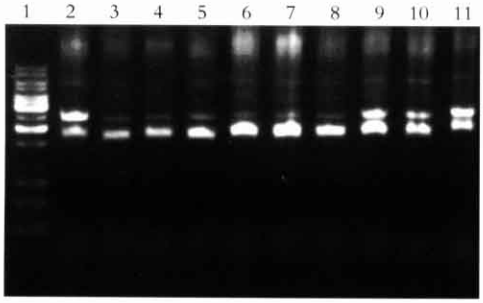
2.4　*phPAB-β*(3)/*M*15 在发酵中的蛋白表达情况和遗传稳定性分析

①从图 3 可以看出，在加入 IPTG 之前 3 拷贝融合蛋白无表达，但在 IPTG 诱导后有目的蛋白条带出现，且随着时间的延长，蛋白的表达逐渐增加，直到诱导后的第 5 小时，蛋白表达达到高峰，蛋白表达率为 30.2%。②发酵过程中各菌提取质粒与发酵前菌提取质粒带谱一致，表明重组质粒在发酵过程中具有良好的遗传稳定性，见图 4。



1－3：诱导前的 3 h；4：目标融合蛋白对照；5－9：诱导后的 5 h

图 3　*phPAB-β*(3)/*M*15 中目标蛋白在发酵过程中的表达



1：1×10^3 分子量标准；2－10：发酵 2－10 h；11：重组质粒对照

图4 *phPAB-β*(3)/*M15* 中重组质粒发酵中遗传稳定性分析

3 讨论

QIA 表达系统[7]是 Qiagen 公司的一个 6×His 标签蛋白的表达与纯化系统，它是由 pQE 质粒为表达载体，原核或真核细胞为宿主以及 Ni-NTA 为色谱介质的亲和层析所组成。通过这个系统我们实现了基于 6×His 为标签的肽抗生素 hPAB-β3 拷贝串联体的快速高效表达与纯化。通常诸如大肠埃希菌 XL1 Blue，JM109 和 TG1 等染色体上都携带有 lacIq 基因，lacIq 基因是 lacI 基因的突变子，它可以产生一定量的阻遏蛋白来阻断重组蛋白的转录，因而这些菌株常常被用来表达一些非毒性的重组蛋白，同时也是保存和扩增 pQE 质粒的良好宿主菌。然而在表达一些对宿主菌有毒性的重组蛋白时，往往会因为对转录阻断的不彻底，导致工程菌的生长缓慢或不生长，甚至于生长出一些突变的菌株，而非携带有正确质粒的工程菌。因此在对这些毒性蛋白的表达时，可以采用拥有 pREP4 质粒的宿主菌如大肠埃希菌 M15（pREP4）和 SG13009（pREP4）等，pREP4 质粒[8]来源于 pACYC，含有 p15A 复制子，具有卡那霉素抗性，宿主菌中该质粒多拷贝的存在，能编码并高水平表达 lacI 阻遏蛋白，严密结合 lacO 操纵基因序列，从而使 lac 操纵基因几乎完全被抑制，使工程菌的本底表达降到最低程度。

本实验设计的是肽抗生素 hPAB-β 的原核表达，在过去的研究中我们将重组质粒转化到 JM109 细菌中，所构建的工程菌能表达预期的目的融合蛋白，尽管融合蛋白以 3 拷贝串联体和包涵体的形式表达，但是不能排除它在特定的环境和构象下，仍然具有一定的杀菌活性，尤其是在 IPTG 诱导表达之前，极少量蛋白的“渗漏”表达，就可能会凭借细胞质中足够的空间，依靠分子间二硫键的正确折叠产生极少量结构比较松散，在亲水一端形成天然的 α 螺旋活性区域，对宿主菌造成毒害。故在发酵过程中，细菌的产量最高只达到 39.2 g/L，与理想的发酵菌产量（50～80 g/L）有较大差距。在本研究中，将重组质粒转化到 M15 大肠埃希菌中，没有改变原有的包涵体表达形式，却降低了工程菌在发酵过程中的“渗漏”表达，进而提高了工程菌发酵产量和目标蛋白表达率。实验结果表明：我们新构建的基于 M15 菌株的工程菌与原先基于 JM109 菌株的工程菌相比，在 10 L 发酵罐中目标融合蛋白表达率有了一定程度提高（平均从 29.4% 上升到 30.2%）的同时，发酵产量（湿重）从原先的最高产量 39.2 g/L 上升到 55.15 g/L，有了非常显著的提高（$P<0.01$）。因此对于以包涵体为表达物存在形式的发酵过程，在表达量没有降低的情况下，细菌产量越高，则最终获得产物的量也就越高。故重新构建并筛选的基于 M15 菌株的工程菌更适合我们制备肽抗生素 hPAB-β。

参考文献：

[1] REDDY K V, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24(6): 536－547.

[2] 胡金川，饶贤才，黎 庶，等. 人肽抗生素 hPAB-β 重组质粒的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. 解放军医学杂志，2004，29(2)：113－115.

[3] 孟洁如，颜 真，赵 宁，等. 导向性人干扰素 α2a 工程菌的高密度发酵[J]. 第四军医大学学报，2004，25(23)：2144－2147.

[4] AKIYAMA N, HIJIKATA M, KOBAYASHI A, *et al*. Anti-tumor effect of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyldihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel anti-bacterial substance from an insect[J]. Anticancer Res, 2000, 20(1A): 357－362.

[5] LEEM J Y, JEONG I J, PARK K T, *et al*. Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, Acantholyda parki S[J]. FEBS Lett, 1999, 442(1): 53－56.

[6] 曹军卫，马辉文. 微生物工程[M]. 北京：科学出版社，2002：45－47.

[7] QIAGEN Companies. The QIA expressionist™, Fifth Edition, 2003, 6.

[8] GOTTESMAN S, HALPERN E, TRISLER P. Role of sulA and sulB in filamentation by lon mutants of Escherichia coli K-12[J]. J Bacteriol, 1981, 148(1): 265－273.

（编辑 王 红）