论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0896-04

重组工程菌 pET32a-CR1-SCR15-18/BL21(DE3)高密度发酵工艺研究

何 莉[1,2],鲜尽红[3],刘高科[1],杨永涛[1],汪正清[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室[1];100016 沈阳,沈阳军区总医院检验科[2];400030 重庆,重庆医药高等专科学校微生物学教研室[3])

【摘要】 目的 建立重组工程菌 pET32a-CR1-SCR15-18/BL21(DE3)的高密度发酵工艺。**方法** 以摇瓶发酵结果为基础,扩大至发酵罐发酵,对影响工程菌生长及目的蛋白表达的因素如发酵培养基、培养温度、pH 值、活化时间、诱导时间及分批补加营养物质等条件进行优化。**结果** 采用改良 M9-CA 培养基、37 ℃活化 4 h 后以 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h,以甘油为碳源,在生长期和诱导期分别以 40 ml/h 和 70 ml/h 的速率连续流加补料,全程滴加氨水保持培养基 pH 值保持在 7.5,调节转速控制溶解氧在 40% 左右。最终菌体产量提高至 40 g/L 以上,CR1-SCR15-18 蛋白表达率达 28% 以上。**结论** 高密度发酵工艺显著提高了工程菌的产量和 CR1-SCR15-18 蛋白的表达水平。

【关键词】 补体 1 型受体 SCR15-18;高密度发酵;大肠杆菌

【中图法分类号】 Q933;TQ920.6 **【文献标志码】** A

High density fermentation of recombinant bacterium pET32a-CR1-SCR15-18/BL21 (DE3)

He Li[1,2], Xian Jinhong[3], Liu Gaoke[1], Yang Yongtao[1], Wang Zhengqing[1] ([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang, Liaoning Province, 100016, [3]Department of Microbiology, Chongqing Pharmaceutical College, Chongqing, 400030, China)

【Abstract】 Objective To establish the optimal high cell-density fermentation conditions of recombinant engineering bacterium pET32a-CR1-SCR15-18/BL21(DE3) for large scale production. Methods Based on the experimental results obtained in culture bottle, the cells were transferred to fermenter culture. The effects of the culture medium, temperature, pH value, concentrations of IPTG, activation time, and induction time were analyzed and optimized. Results The bacterium was activated in modified M9-CA medium at 37 ℃ for 4 h and then induced for another 4 h in the presence of 0.2 mmol /L IPTG. Glycerol was chosen as carbon source. The flow rates of feeding at the growth and induction phases were kept at the speeds of 40 ml/h and 70 ml/h, respectively. The culture's pH value was maintained at 7.5 by adding ammonia water, while dissolved oxygen was controlled about 40% by regulating rotating speed. Under the optimal conditions mentioned above, a highest yield of over 40 g/L SCR15-18 protein was achieved, accounting 28% of the total bacterial protein. Conclusion Higher density fermentation significantly improves the production of engineering bacteria and the expression level of CR1-SCR15-18 protein.

【Key words】 soluble complement receptor type 1; high density fermentation; *Escherichia coli*

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471723) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2007BB5011). Corresponding author: Wang Zhengqing, Tel: 86-23-68752242, E-mail: wangzhengqing1953@126.com

缺血性心、脑血管病的发病率、致残率和病死率都很高。研究认为,补体系统过度激活的片段是心肌和脑内炎症反应损伤的主要始动因素之一[1-6]。目前抗补体的药物虽多,但尚无一种人工抑制补体制剂在特异性和有效性方面能满足临床应用的要求。补体Ⅰ型受体(complement receptor type 1,CR1)是 C3b/C4b 的受体,分布于多种细胞表面,由胞外区、跨膜区及胞内区组成。在人群中最常见的基因型为 F 的 CR1 胞外区由 30 个短同源重复序列(short consensus repeat, SCR)组成,每 7 个 SCR 为 1 组,构成 4 个长同源重复序列(LHRs)。LHR A 中的前 3 个 SCR 组成有功能的

【基金项目】 国家自然科学基金(30471723);重庆市自然科学基金(CSTC 2007BB5011)

【通信作者】 汪正清,电话:(023)68752242,E-mail:wangzhengqing1953@126.com

位点Ⅰ,而LHR B和LHR C有相同的功能,都称为位点Ⅱ。LHR-A中有1个C4b结合位点,LHR-B和LHR-C有C3b结合位点。研究证实[7-8],C4b的结合残基在SCR 1-3,C3b的结合残基在SCR8-10或15-17。我们成功地克隆了小分子CR1-SCR 15-18基因片段,研究表明,CR1-SCR 15-18具有结合C3b和抑制C3/C5转换酶生物活性[9];能明显减轻补体介导的大鼠心肌[10]和脑缺血再灌注炎症损伤[11],具有广阔的开发应用前景。本研究在此基础上应用发酵罐高密度发酵对影响工程菌的产量和蛋白表达率的发酵条件进行优化,为CR1-SCR 15-18的研究及规模生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 重组工程菌质粒pET32a-CR1-SCR15-18由本室构建并保存,宿主菌大肠杆菌*E. coli*. BL21(DE3)为本室保存。

1.1.2 仪器和主要试剂 发酵罐为瑞士Bioenginering公司KLF2000型3.75 L,蛋白胨、酵母抽提物购自OXOID公司,IPTG购自Sigma公司,其他试剂为国产和进口分装分析纯。LB、LB/G、2YT、M9-CA培养基配制方法参考《分子克隆》,改良M9-CA为本实验室改良配方:海升培养基含磷酸氢二钠6 g,磷酸二氢钾3 g,氯化钠0.5 g,氯化铵1 g,酸水解酪蛋白2 g,酵母粉6 g,高压后再加入2 mmol/L氯化镁2 ml,20%葡萄糖20 ml,微量元素200 μl。补料配方:海升含120 ml甘油,80 g蛋白胨,40 g酵母提取物。除特殊说明外培养基pH值全部调为7.5,培养基高压冷却后加入终浓度为100 μg/ml的氨苄青霉素。

1.2 方法

1.2.1 工程菌的筛选和保存 将重组工程菌pET32a-CR1-SCR15-18/BL21(DE3)涂布于含氨苄青霉素(Ampicillin,AMP)的LB平板培养,挑取单个菌落37 ℃分别振荡培养,IPTG诱导表达,12% SDS-PAGE电泳,凝胶扫描分析仪检测目的蛋白表达率。挑选表达量最高菌落扩大培养,取新鲜饱和的培养液(培养至对数生长期)后,按8∶2比例加入甘油,-70 ℃小剂量保存,每次发酵取1支,保持菌种的稳定性。

1.2.2 菌种的活化 取-70 ℃甘油保存的菌种接种至含AMP的LB液体培养基中,37 ℃,160 r/min振荡过夜培养,此为一级种子。取一级种子按1%比例接种到相同培养基中相同条件培养4 h,此为二级种子,直接用于发酵,4 ℃保存。

1.2.3 培养基的筛选 分别采用LB、LB/G、2YT、M9-CA、改良M9-CA培养基筛选发酵最适宜的培养基。菌种活化后按1%接种至各种培养基中,37 ℃生长3 h后,0.4 mmol/L IPTG诱导表达5 h,分别测定菌湿质量和蛋白表达率。

1.2.4 最适温度的选择 将菌种活化后按1%接种至培养基中,分别在30、37、42 ℃条件下摇瓶培养3 h,0.4 mmol/L IPTG诱导表达5 h,分别测定菌湿质量和蛋白表达率。

1.2.5 最适pH值的选择 将菌种活化后按1%接种至pH值为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的LB培养基中,37 ℃振荡培养3 h,分别加入终浓度为0.4 mmol/L的IPTG诱导表达5 h,分别测定菌湿质量和蛋白表达率。

1.2.6 最适IPTG浓度的选择 将菌种活化后按1%接种至培养基中,37 ℃生长3 h后,分别加入终浓度为0、0.1、0.2、0.4、0.6 mmol/L的IPTG诱导表达5 h,分别测定菌湿质量和蛋白表达率。

1.2.7 发酵罐高密度发酵条件的研究 根据摇瓶摸索条件,将温度设置为37 ℃,通过补加浓氨水控制发酵罐中的pH值为7.5,调节搅拌速度(400~1 200 r/min),控制发酵过程中溶氧指数在40%以上。在细菌生长2.5 h后开始滴加补料,速度为40 ml/h,诱导后速度调为70 ml/h。分别在工程菌生长3、4、5 h后用0.2 mmol/L IPTG诱导表达,分别取样测定菌湿质量和蛋白表达率;诱导1~5 h后分别取样,测定菌湿质量和蛋白表达率。

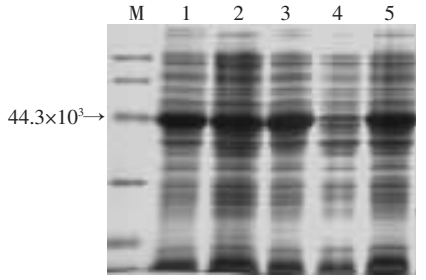
1.2.8 分析方法 发酵后取菌液4 ℃,10 000×*g*离心15 min,弃上清后称质量为菌湿质量。取发酵后菌液制备样品,行SDS-PAGE电泳后用凝胶扫描分析仪扫描,Quantity-One软件分析目的蛋白表达率。

1.2.9 统计学方法 计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,用SPSS 13.0软件对数据中各组之间进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 发酵用培养基的筛选

从图1和表1可见,用改良M9-CA培养基获得的菌湿质量显著高于其他4种培养基($P<0.01$),并且重组蛋白表达率也较高($P<0.05$,$P<0.01$)。虽然2YT的重组蛋白表达率最高,但菌湿质量太低,故选择改良M9-CA为发酵用培养基。



M:蛋白标准;1~5:重组蛋白分别在LB、LB/G、2YT、M9-CA、改良M9-CA培养基中诱导表达

图1 SDS-PAGE检测重组蛋白在不同培养基中诱导表达

表1 不同培养基菌体产量和重组蛋白表达率($n=3$,$\bar{x} \pm s$)

培养基类型	菌湿质量(g/L)	蛋白表达率(%)
LB	4.12±0.04[a]	26.6±0.3[b]
LB/G	4.74±0.03[a]	23.0±0.2[a]
2YT	3.72±0.04[a]	29.0±0.3[a]
M9-CA	2.82±0.03[a]	12.1±0.3[a]
改良M9-CA	5.88±0.06	26.4±0.4

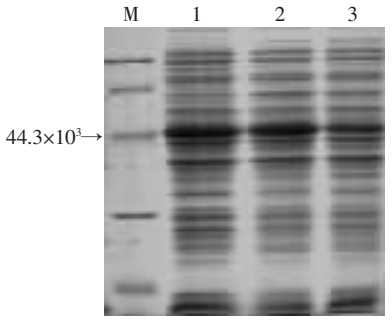
a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与改良M9-CA比较

2.2 发酵最适温度的选择

从图2和表2可见,37 ℃的菌湿质量和重组蛋白表达率均较30 ℃和42 ℃高,故选择37 ℃作为发酵用温度。

2.3 最适pH值的选择

从图3和表3可见,不同pH值条件下,pH 7.5时重组蛋白表达率最高,同时菌湿质量较大,综合两者,故选择pH 7.5作为发酵用pH值。



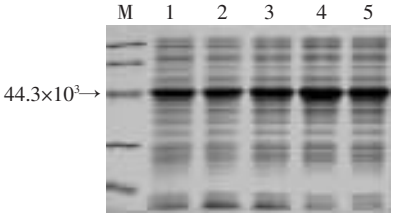
M：蛋白标准；1～3：重组蛋白分别在30、37、42 ℃诱导表达

图2 SDS-PAGE检测重组蛋白在不同温度下诱导表达

表2 不同温度下菌体产量和重组蛋白表达率($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

温度	菌湿质量(g/L)	蛋白表达率(%)
30 ℃	3.60±0.05[a]	25.2±0.1[b]
37 ℃	4.16±0.26	25.9±0.3
42 ℃	2.90±0.26[a]	20.6±0.1[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与37 ℃比较



M：蛋白标准；1～5：重组蛋白在pH值6.0、6.5、7.0、7.5、8.0诱导表达

图3 SDS-PAGE检测重组蛋白在不同pH值下诱导表达

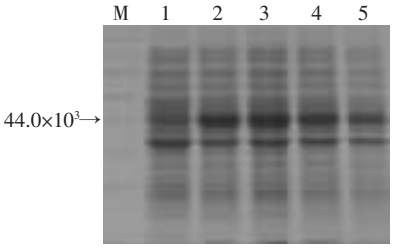
表3 不同pH值下菌体产量和重组蛋白表达率($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

pH值	菌湿质量(g/L)	蛋白表达率(%)
6.0	4.10±0.44[a]	21.8±0.2[a]
6.5	4.26±0.40	21.7±0.2[a]
7.0	4.35±0.06	22.3±0.2[a]
7.5	4.31±0.03	26.5±0.2
8.0	4.23±0.04[a]	25.5±0.2[b]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与pH 7.5比较

2.4 最适IPTG浓度的选择

从表4、图4可见，在IPTG浓度为0时，重组蛋白表达率很低，在IPTG浓度大于0.2 mmol/L后，重组蛋白表达率下降，同时菌湿质量也降低。IPTG浓度为0.1 mmol/L和0.2 mmol/L时菌湿质量几乎没有差异，0.2 mmol/L时重组蛋白表达率稍高，综合两者，选择最适IPTG浓度为0.2 mmol/L。



M：蛋白标准；1～5：重组蛋白在0、0.1、0.2、0.4、0.6 mmol/L IPTG浓度下诱导表达

图4 SDS-PAGE检测重组蛋白在不同IPTG浓度下诱导表达

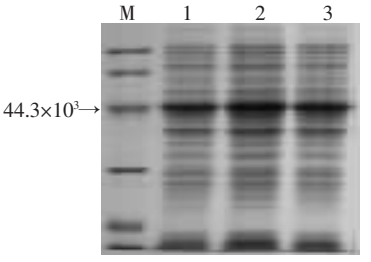
表4 不同IPTG浓度下菌体产量和重组蛋白表达率($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

IPTG浓度(mmol/L)	菌湿质量(g/L)	蛋白表达率(%)
0	4.40±0.15	6.2±0.3[a]
0.1	4.33±0.15	25.5±0.3[a]
0.2	4.32±0.05	26.6±0.2
0.4	4.29±0.02	25.3±0.2
0.6	4.19±0.04[b]	24.0±0.2

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与0.2 mmol/L IPTG比较

2.5 诱导时机的选择

从表5、图5可见，活化3 h后进行诱导，菌体产量和重组蛋白表达率都最低；活化4 h后诱导，虽然菌体产量最高，但重组蛋白表达率较活化4 h组低，综合两者，选择在活化4 h后开始诱导表达。



M：蛋白标准；1～3：重组蛋白在生长3、4、5 h诱导表达

图5 SDS-PAGE检测重组蛋白在不同时间的诱导表达

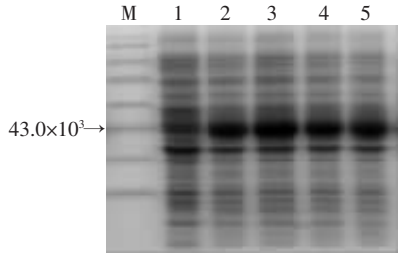
表5 不同诱导时机菌体产量和重组蛋白表达率($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

生长时间	菌湿质量(g/L)	蛋白表达率(%)
3 h	31.49±0.06[a]	26.2±0.2[a]
4 h	42.35±0.76	28.3±0.3
5 h	44.85±0.11[a]	26.7±0.3[a]

a：$P<0.01$，与生长4 h比较

2.6 诱导时间的选择

从表6、图6可见，随着诱导时间的延长菌体产量和重组蛋白表达率逐渐升高，蛋白表达率在3 h时最高，后逐渐降低。菌体产量在4 h达到高峰，后逐渐降低。综合两者，选择诱导时间为4 h。



M：蛋白标准；1～5：重组蛋白诱导1、2、3、4、5 h后表达

图6 SDS-PAGE检测重组蛋白在不同诱导时间的表达

表6 不同诱导时间菌体产量和目标蛋白表达率($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

诱导时间	菌湿质量(g/L)	蛋白表达率(%)
1 h	28.00±0.12[a]	8.1±0.3[a]
2 h	33.10±0.19[a]	28.4±0.2[a]
3 h	34.90±0.44[a]	30.7±0.4[a]
4 h	44.98±0.12	28.9±0.3
5 h	37.18±0.07[a]	27.8±0.1

a：$P<0.01$，与诱导4 h比较

3 讨论

重组 DNA 技术和大规模培养技术的有机结合，使原本无法大量获得的重组蛋白可以大量的生产。为了提高菌体产量和重组蛋白表达率，除了选择理想的表达载体和宿主菌外，还需优化其诱导表达条件。高密度发酵工艺是通过对重组菌生产过程的优化，提高工程菌的产量和重组蛋白表达率的技术[12-13]。为达到此目的，需要对重组菌的生长条件和表达时机，以及溶解氧和营养物质的流加条件进行优化。

本实验首先针对重组菌生长的最适生长条件在摇瓶水平进行逐一摸索，通过对单因素的逐个优化，选择了适宜的培养基，培养温度，pH 值和诱导剂浓度，然后通过控制发酵过程中的溶氧量和通气量，分段控制添加补料等手段在发酵罐水平对诱导时机和诱导时间进行了优化。通过测定重组工程菌菌体产量和重组蛋白表达率，结果显示：改良的 M9-CA 培养基效率明显高于其他四种培养基，在高菌体产量的同时获得了较高的蛋白表达率。2YT 培养基虽然蛋白表达率最高，但是菌产量太低，所以不适用于此工程菌的发酵用。3 种发酵温度以 37 ℃时菌体产量和蛋白表达率都最高，因此选择 37 ℃作为发酵温度。5 种 pH 值在 pH 7.5 时重组蛋白表达率最高，且菌体产量较高，故选其为发酵用 pH 值。常用的 IPTG 浓度为 0.1 ~ 1.0 mmol/L，由于高浓度的 IPTG 一方面会增加成本，另一方面会抑制细菌的生长，因此，在不影响重组蛋白表达的前提下，尽量降低 IPTG 的浓度，我们观察了 IPTG 浓度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6 mmol/L 时的表达情况，发现当 IPTG 为 0 时重组蛋白的表达量非常少，而当 IPTG 浓度达到 0.2 mmol/L 时重组蛋白的表达量最大，浓度再增加后重组蛋白表达率下降，且菌体产量逐渐降低。因此，最佳的 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L。诱导剂的诱导时机很关键，诱导过早会抑制细菌生长，导致细菌浓度太低；诱导过晚，细菌容易老化，不利于蛋白的表达，因此我们选择在工程菌生长 2.5 h 之后，开始滴加补料，保证在诱导前有一个较高的细菌浓度，而菌体又不会老化。经测定，在发酵 4 h 后开始诱导能获得最理想的菌体产量和蛋白表达率。随着诱导时间的延长，菌浓度和重组蛋白表达率都逐渐增高，两者在诱导 4 h 时达到高峰，随后蛋白表达率趋于平稳，不再增加，而菌浓度开始下降，因此选择诱导 4 h 后结束发酵。此外，大肠杆菌的高密度发酵还有一个关键问题是尽量减少乙酸的产生，因为高浓度的乙酸会严重抑制细菌生长和重组蛋白的表达。因此采用产生乙酸量较少的甘油代替葡萄糖作为碳源，按一定速率逐步添加到发酵罐中，减少乙酸的积累，这样不仅防止底物积累到毒性水平，也使细胞不会处于饥饿状态，保证了细菌保持较高的活性状态。通过对发酵条件的优化，重组工程菌 pET32a-CR1-SCR15-18/BL21 的产量提高至 40 g/L 以上，pET32a-CR1-SCR15-18 表达率可达到 28%，为下一步的实验研究和大规模生产打下了基础。

参考文献：

[1] Diepenhorst G M, Van-Gulik T M, Hack C E. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies[J]. Ann Surg, 2009, 249(6): 889-899.

[2] Bjerre M, Hansen T K, Flyvbjerg A. Complement activation and cardiovascular disease[J]. Horm Metab Res, 2008, 40(9): 626-634.

[3] Komotar R J, Starke R M, Arias E J, *et al*. The complement cascade: new avenues in stroke therapy[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2009, 7(3): 287-292.

[4] Arumugam T V, Woodruff T M, Lathia J D, *et al*. Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy[J]. Neuroscience, 2009, 158(3): 1074-1089.

[5] Harhausen D, Khojasteh U, Stahel P F, *et al*. Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia in mice[J]. J Neuroinflammation, 2010, 7: 15.

[6] Szeplaki G, Szegedi R, Hirschberg K, *et al*. Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes[J]. Atherosclerosis, 2009, 204(1): 315-320.

[7] Smith B O, Mallin R L, Krych-Goldberg M, *et al*. Structure of the C3b binding site of CR1 (CD35), the immune adherence receptor[J]. Cell, 2002, 108(6): 769-780.

[8] Furtado P B, Huang C Y, Ihyembe D, *et al*. The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits access to its C3b and C4b ligands[J]. J Mol Biol, 2008, 375(1): 102-118.

[9] 谭兵，张德纯，汪正清. 重组人可溶性补体受体 1 型 SCR15-18 片段表达纯化及生物活性鉴定[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：892-895.

[10] 谭兵，兰阳军，张德纯，等. 重组人可溶性补体受体 1 型 SCR15-18 片段对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华心血管病杂志，2007，35(11)：1037-1040.

[11] 何莉，杨永涛，郭光金，等. sCR1-SCR15-18 蛋白减轻补体介导的大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志，2009，25(12)：2436-2440.

[12] Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development[J]. Biotechnol Adv, 2005, 23(5): 345-357.

[13] 胡沛臻，温江田，路凡，等. 溶氧反馈-补料分批技术高密度培养基因重组 MAGE1/HSP70/MAGE3 工程菌[J]. 第三军医大学学报，2007，29(16)：1576-1579.

（收稿：2010-10-25 修回：2010-12-06）

（编辑 张 维）