

乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响

张 毅 屈贤铭 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 将重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子/白细胞介素-3(GM-CSF/IL-3)融合蛋白表达菌 BL21(DE3)(pFu) 作为研究对象,对于以乳糖作为诱导剂时重组目的产物的诱导表达规律进行了深入的研究。分析比较了不同培养基中,不同生长阶段进行诱导对于产物表达的影响。对诱导所需的乳糖浓度、诱导持续时间长短等因素亦进行了研究。实验结果表明,在对诱导条件进行优化控制的前提下,利用乳糖作为诱导剂可以达到与 IPTG 类似的诱导效果。随后的研究中,将乳糖作为诱导剂应用于高密度发酵过程。这些研究结果为乳糖作为诱导剂最终应用于重组基因工程药物的工业化生产提供了有益的参考和借鉴。

关键词 大肠杆菌 发酵 诱导 乳糖

中图分类号 Q816 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0464-05

IPTG 是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂。然而由于 IPTG 对于人体具有潜在的毒性,当利用 IPTG 诱导表达应用于人体的重组药物时,有可能对最终的产品带来一些不利影响。另一方面, IPTG 的价格也较为昂贵,尤其是在较大体积的发酵罐中进行诱导时, IPTG 的应用会造成发酵成本的增加。

乳糖是一种二糖,没有毒性,另外,由于其低廉的价格,使其有可能成为替代 IPTG 的诱导剂。乳糖本身作为一种碳源,可以被菌体所代谢利用,同时,作为一种糖类物质,它的存在亦会导致菌体的生理及生长特性发生变化。与 IPTG 所不同的是,乳糖自身无法进入到菌体细胞的内部,它需要借助于乳糖透过酶(Permease)的作用,乳糖的转运因此受多种因素的影响。另外,乳糖进入细胞后仍然不能诱导 Lac 启动子的启动。它需要经过 β -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖(Allolactose)才会起到诱导剂的作用^[1,2]。总之,与 IPTG 相比,利用乳糖作为诱导剂其诱导过程更为复杂和麻烦,也正因为如此,迄今为止仅有少量的利用乳糖作为诱导剂诱导重组产物表达的研究报道,而在高密度发酵中应用乳糖诱导产物表达的研究则少见报道。尽管如此,乳糖所具有的无毒及价格低廉的特性,使得利用乳糖作为诱导剂的研究对于重组基因工程药物的工业化生产

具有十分重要的意义。

1 实验材料与方法

1.1 所用主要试剂及来源

蛋白胨(Polypepton)购自日本制药株式会社,酵母粉购自英国 OXOID 公司, IPTG 购自 Promega 公司,葡萄糖测定试剂盒购自卫生部上海生物制品研究所,乙酸测定试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司,丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺购自 Fluka 公司, TEMED 购自 MERCK 公司,其余试剂均购自上海化学试剂采购供应站。

1.2 所用主要仪器及设备

美国 NBS 温控摇床,德国 B. Braun Biostat E 15L 发酵罐,美国 Bio-Rad Mini2D 电泳仪, Beckman 公司 DU7500 分光光度计, LKB 公司凝胶扫描仪。美国 Forma Scientific 公司超低温冰箱。

1.3 所用培养基及其配方

摇瓶培养基:LB 培养基, M9 培养基, 2YT 培养基 配方参考文献 [3]

发酵培养基:a. 起始培养基(g/L):葡萄糖 5, 酵母粉 5, K_2HPO_4 7, KH_2PO_4 8, $(NH_4)_2SO_4$ 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2, 氨基青霉素(Ap) 0.1。b. 补料培养基 I(g/L):葡萄糖 400, $(NH_4)_2SO_4$ 100,

MgSO₄·7H₂O 10. c. 补料培养基 II 酵母粉 100g/L。

1.4 菌种及保藏

1.4.1 菌种 大肠杆菌 BL21(DE3) (pFu) 由本实验室构建^[4]。

1.4.2 菌种保藏: 将鉴定好的工程菌接入含 100μg/mL Ap 的 LB 的培养基中, 摇床 37℃, 250r/min 培养, 至生长对数期中后期(OD₆₀₀ 约为 1~1.5) 时取出, 将此菌液各取 0.8mL, 加入到已灭菌且含有 0.2mL 甘油的 1.5mL 离心管中, 混匀后置于 -70℃ 低温冰箱中保存备用。

1.5 测定方法

a. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 参照文献[3] b. 菌体培养浓度的测定采用读取 OD₆₀₀ 的值。c. 葡萄糖浓度测定参照试剂盒说明书。d. 重组产物占菌体总蛋白百分含量的测定通过诱导后菌体的全菌 SDS-PAGE 电泳经扫描后读出。e. 发酵代谢副产物乙酸的测定参照 Boehringer Mannheim 公司乙酸测定试剂盒说明书。

2 实验结果与讨论

2.1 LB 培养基中产物表达的研究

在 LB 培养基中, 分别在重组菌生长至 OD₆₀₀ 为 0.285, 0.962, 1.727 (即菌体生长对数期的初期、中期和末期) 时加入 10g/L 的乳糖进行诱导, 持续诱导 6h 以上, 每隔一定时间取样测定菌体浓度并留样电泳。

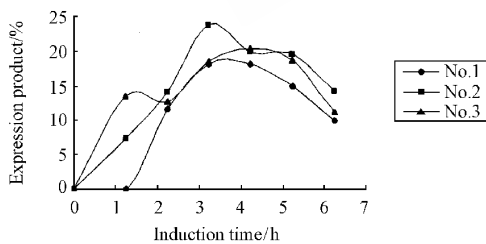


图 1 LB 培养基中菌体不同生长阶段(对数期初期、中期、后期) 加入乳糖(10g/L) 进行诱导后目的产物占菌体总蛋白百分含量随诱导时间延长的变化情况

Fig.1 Effect of induction time and duration on the recombinant protein expression level in LB medium

(lactose concentration :10g/L. No. 1, No. 2, No. 3 : induced at OD₆₀₀ = 0.285, 0.962 and 1.727)

实验结果表明(图 1, 图 2), 在菌体生长的各个阶段加入乳糖进行诱导, 均可诱导出重组产物的表达。持续诱导 3h 左右重组产物的表达水平达到最高, 之后开始下降。与 IPTG 相比, 乳糖诱导的重组

蛋白的表达量稍低(占菌体总蛋白 20% 左右)。另外, 乳糖的加入造成菌体生长的迟滞。由于乳糖的转运是一种主动运输的过程, 这一过程会造成细菌质子推动力的暂时消耗^[5], 并竞争性的利用菌体的能量^[6]。菌体生长的迟滞可能与此有关。比较而言, 在菌体对数生长期的末期诱导相对较好, 此时既可以得到较高的产物表达, 又可获得较高的菌体密度。

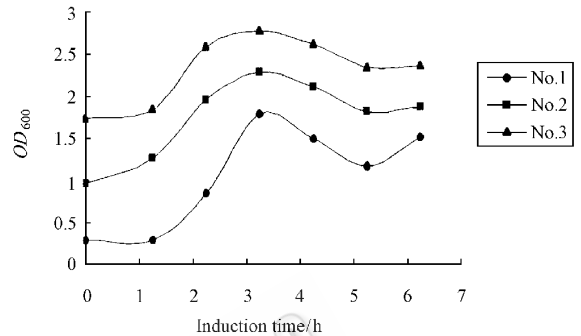


图 2 LB 培养基中菌体不同生长阶段加入乳糖(10g/L) 进行诱导后菌体的生长随诱导时间延长的变化情况

Fig.2 Effect of induction time and duration on the growth of *E. coli* BL21(DE3) (pFu) in LB medium (lactose concentration :10g/L. No. 1, No. 2, No. 3 : induced at OD₆₀₀ = 0.285, 0.962 and 1.727)

2.2 M9 培养基中产物表达的研究

在菌体培养过程中, 葡萄糖的存在对于乳糖的吸收及诱导作用有很大的影响。当培养基中同时存在葡萄糖、乳糖等几种糖类时, 菌体首先选择利用葡萄糖、乳糖及其它非磷酸转移酶系统(Phosphotransferase system) 糖类的跨膜转运将被抑制, 这一现象又被称为糖介导的诱导物的排除^[7]。在大肠杆菌高密度发酵中, 葡萄糖是一种十分常用的碳源物质。因此, 分析和探讨在以葡萄糖为主要碳源成分的培养基中乳糖的诱导作用及效果, 对于乳糖作为替代诱导剂应用于重组药物的发酵生产十分必要。

2.2.1 在菌体生长不同阶段进行诱导对产物表达的影响: 将 -70℃ 保存的甘油菌接入含 100μg/mL Ap 的 M9 培养基中, 摇床 37℃, 250r/min 培养过夜, 分别转接于 6 瓶含 Ap 的 M9 培养基中, 接种量分别为 0.25%, 1.25%, 5%, 10%, 20%, 40%, 37℃ 培养约 2.5h 后, 测定每瓶中的菌体浓度分别为: 0.027, 0.185, 0.595, 0.930, 1.340, 1.866。此时在每瓶中分别加入 20% 的乳糖至终浓度为 10g/L, 进行产物的诱导研究。每隔一定时间取样, 立刻放入 -70℃ 冰箱中保存备用。同时测定菌体生长的即

时浓度。

由实验结果可以看出(图3及图4),在含有葡萄糖的M9培养基中,乳糖可以诱导重组蛋白产物的表达。与LB培养基相比,在M9培养基中重组产物的表达规律有一定的差异。在对数期初期加入乳糖不能诱导重组产物的表达,对数中期加入虽可诱导产物的表达,但需要经过较长时间的迟滞期,且产物表达量相对较低。对数末期乃至即将进入稳定期时进行诱导效果最好,产物的表达最高可达到20%以上。在对数期末期,培养基中葡萄糖的浓度已接近于零,此时乳糖的利用不再受到葡萄糖的抑制。

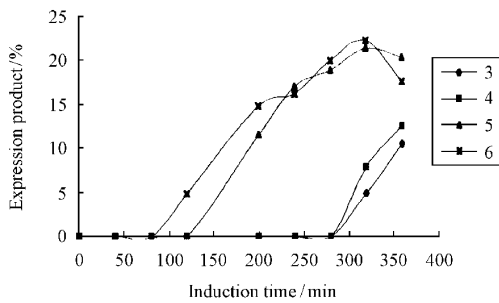


图3 M9培养基中,在不同菌体生长阶段加入乳糖(10g/L)进行诱导时,目的产物占菌体总蛋白百分含量随诱导时间延长的变化情况

Fig.3 Effect of induction time and duration on the recombinant protein expression level in M9 medium

(lactose concentration :10g/L. 1,2,3,4,5,6 :induced at $OD_{600} = 0.026, 0.185, 0.595, 0.930, 1.350$ and 1.727) 1,2 was not induced by lactose

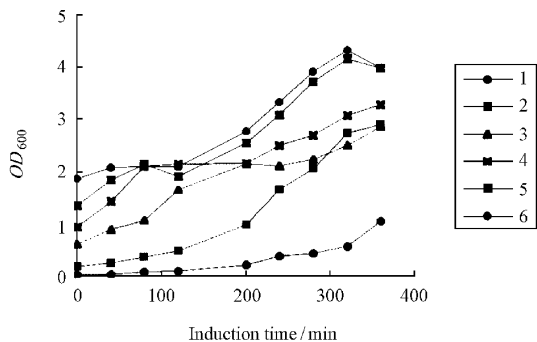


图4 在M9培养基中,乳糖诱导浓度为10g/L,在不同生长阶段加入诱导剂后菌体的生长随诱导时间延长的变化情况

Fig.4 Effect of induction time and duration on the growth of *E. coli* BL21 (DE3) (pFu) in M9 medium

(lactose concentration :10g/L. 1,2,3,4,5,6 :induced at $OD_{600} = 0.026, 0.185, 0.595, 0.930, 1.350$ and 1.727)

加入乳糖后菌体的生长及重组蛋白的表达均有一段长时间的迟滞期。这可能是由于需要一定的时间充分诱导和激活乳糖透过酶,以使乳糖进入细胞^[8]。另外,乳糖的转运需要消耗菌体的能量,能量供应的不足亦有可能造成菌体生长及重组蛋白表达的迟滞。

2.2.2 乳糖浓度对于目的产物表达的影响:根据2.2.1节的结果,在菌体对数生长期末期加入不同浓度的乳糖进行诱导,观察重组产物的表达情况及其对于菌体生长的影响。

取 -70°C 保存的甘油菌接入含有Ap的M9培养基中, 37°C ,250r/min培养过夜后,取30mL菌液作为种子转接于200mL相同培养基中。 37°C 培养约3h左右,测定菌体浓度 OD_{600} 约为1.70,将此培养液分装于5个无菌三角瓶中(每瓶30mL),分别加入乳糖至终浓度各为1,2.5,5,10,20g/L进行诱导,每隔一定时间间隔取样置于 -70°C 保存备电泳,同时取样测定其菌体生长密度。

实验结果显示(图5),在一定范围内,乳糖浓度愈高,重组产物的表达量也愈高。10g/L终浓度的乳糖可以诱导重组产物的表达量达到占菌体总蛋白20%以上。加入乳糖后,重组产物的表达随诱导时间的增加而增加,至4~5h达到最高,之后产物表达不再增加甚至有所下降。不同诱导浓度的乳糖均表现出类似的产物表达的趋势。与IPTG有所不同的是,乳糖诱导后产物的表达有2h以上的迟滞期。这一结果与文献报道的结果相一致^[9]。

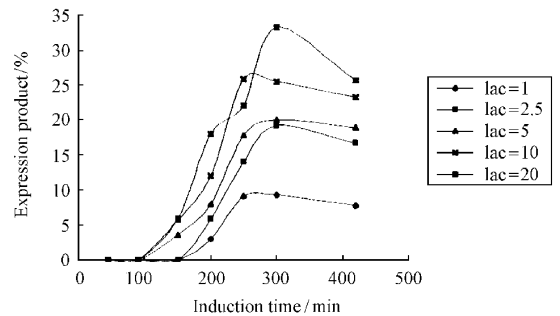


图5 不同浓度的乳糖对于目的产物表达的影响:目的产物占菌体总蛋白百分含量随诱导时间延长的变化情况

Fig.5 Effect of the lactose concentration on the expression level of the recombinant proteins in M9 medium

图6为加入不同浓度的乳糖诱导后菌体的生长曲线。可以看出,当乳糖加入后,菌体生长均出现一段较长时间的迟滞期。另外,当加入乳糖的量为10g/L以上时,菌体的培养浓度达到 OD_{600} 值4.0,以

上, M9 培养基所含的 2g/L 的葡萄糖仅可使菌体密度生长至 OD_{600} 为 2.0 左右, 可以推断, 菌体最终开始利用部分乳糖作为碳源用于菌体的生长。

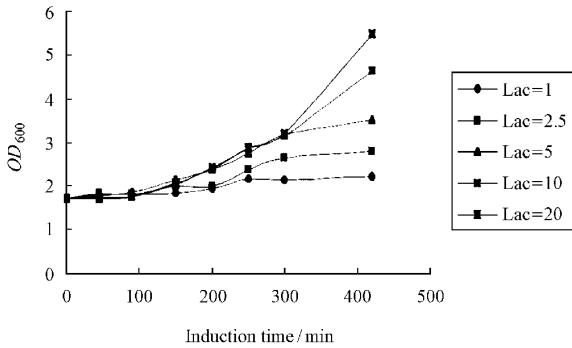


图6 不同浓度的乳糖对于目的产物表达的影响: 菌体生长随诱导时间延长的变化曲线

Fig.6 Effect of the lactose concentration on the growth of *E. coli* BL21(DE3)(pFu) in M9 medium

2.3 以乳糖为诱导剂的重组菌高密度发酵研究

根据以上的实验结果, 我们尝试将乳糖作为诱导剂, 应用于高密度发酵中, 研究在高密度发酵的条件下乳糖诱导对于重组产物表达的影响。

将 -70°C 保存的甘油菌接入含有 $100\mu\text{g/mL}$ Ap 的 2YT 培养基中, 37°C 250r/min 培养过夜, 将此过夜菌转接于三瓶含有 200mL 2YT 培养基(含 Ap $100\mu\text{g/mL}$) 的摇瓶之中, 接种量 1%, 继续培养 8h, 将其作为种子接入发酵罐中, 开始上罐培养。随着菌体的生长, 菌体密度不断提高, 发酵罐中的溶氧持续下降, 至培养约 4h 左右时(此时 OD_{600} 约为 5.0 左右), 溶氧开始迅速上升。菌体对于氧气需求的迅速减少, 表明此时发酵罐中的营养物质已基本用尽, 开始进行补料(补料培养基 I, 见材料与方法)。一旦补料开始, 发酵罐中的溶氧迅速下降, 菌体重新进入快速生长阶段。在补料培养基 I 中含有一定比例的葡萄糖(碳源)及硫酸铵(无机氮源), 由于这一菌体对于硫酸镁的特殊需求, 在补料培养基 I 中补充一定量的硫酸镁。整个培养过程中用 6mol/L NaOH 调节发酵罐中 pH, 使其保持在 6.8~7.2 之间。通过控制补料培养基流加的速度控制菌体的比生长速率保持在 0.2~0.3 之间。在开始诱导之前 0.5 h 停止加入补料培养基 I (即以葡萄糖为主的碳源浓缩液, 见材料与方法), 同时开始补加补料培养基 II (有机氮源培养基)。当菌体生长至 OD_{600} 值接近 40 时(OD_{600} 为 37) 加入 20% 的无菌

乳糖溶液至发酵罐中进行诱导, 乳糖终浓度为 10g/L 。发酵过程中菌体的生长曲线如图 7 所示。在加入乳糖诱导的前后分别取样测定发酵罐中乙酸的含量。由测定的数据可知, 乙酸的浓度仅为约 0.6g/L 左右。而且随着培养时间的延续, 由于诱导后不再加入葡萄糖, 乙酸的浓度持续降低。这种情况出现的原因可能是由于已生成的乙酸被菌体作为碳源重新加以利用。重组产物占菌体总蛋白百分含量随诱导时间的变化的曲线如图 8。由以上结果可以看出, 菌体最终密度为 OD_{600} 值 40 以上, 产物表达占菌体总蛋白的百分含量在 15% 左右。

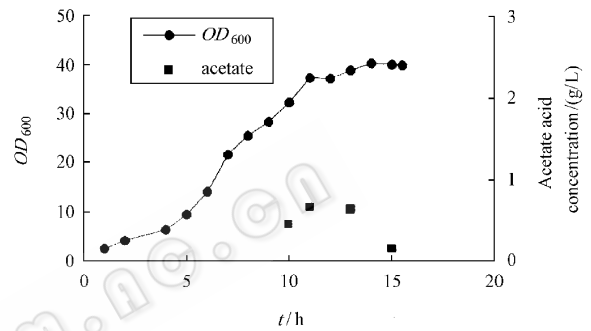


图7 *E. coli* BL21(DE3)(pFu) 高密度发酵培养的菌体生长曲线

Fig.7 Profiles of accumulated acetate acid and growth curve of *E. coli* BL21(DE3)(pFu) under high cell density culture conditions

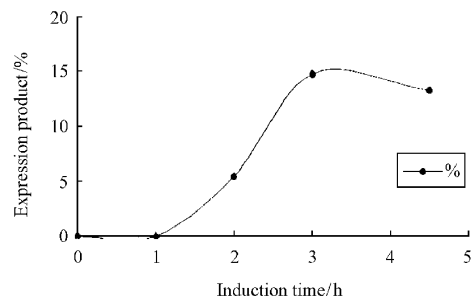


图8 乳糖诱导后目的产物占菌体总蛋白百分含量随诱导时间延长的变化情况

Fig.8 Profile of recombinant protein expression level under high cell density culture conditions

3 结论

乳糖以其无毒、价廉的特点, 使得人们期望能够利用乳糖用作为 IPTG 的替代诱导物。然而, 由于乳糖本身会引起细胞在转运以及生理代谢等方面的一系列复杂的变化, 需要对菌体生长及诱导条件进

行更为精细的研究及优化^[10,11]。本文深入研究了以乳糖作为诱导剂时,对于 T7 启动子调控的重组产物表达及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及诱导物浓度。在此基础上,将乳糖作为诱导剂,应用于重组菌的高密度培养的研究中。菌体培养的最终密度达到 OD_{600} 值为 40 以上,重组蛋白产物占菌体总蛋白的 15%。发酵密度及产物的表达量均低于 IPTG 作为诱导剂时的

结果,表明乳糖的诱导效果不及 IPTG。然而,正如前面所提及的,乳糖所具备的无毒及价廉的优点,使其在重组蛋白的发酵生产中,仍具有其优于 IPTG 的潜在价值及优势。本文的实验结果表明,乳糖可以作为诱导剂应用于 T7 启动子调控表达的重组蛋白的发酵生产中。这些研究结果为乳糖作为诱导剂最终应用于重组基因工程药物的工业化生产提供了有益的参考和借鉴。

参 考 文 献

- [1] Jobe A ,Bourgeois S. *J Mol Biol* ,1972 ,**69** :397~408
- [2] Muller-Hill B ,Rickenberg H V ,Wallenfels K. *J Mol Biol* ,1964 ,**10** :303~318
- [3] Sambrook J ,Frisch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* ,2nd Edition ,Cold Spring Harbor Laboratory Press ,New York ,1989
- [4] 张 毅 ,屈贤铭 ,杨胜利. *生物工程学报* ,2000 ,**16** :24~27
- [5] Ahmed D ,Booth I R. *J Gen Microbiol* ,1983 ,**129** :2521~2529
- [6] Straight J V ,Ramkrishna D. *Biotechnol Bioeng* ,1989 ,**34** :705~716
- [7] Postma P W ,Broekhuizin C P ,Geerse R H. *FEMS Microbiol Rev* ,1989 ,**63** :69~80
- [8] Kapralek F ,Jecmen P ,Sedlacek J *et al.* *Biotechnol Bioeng* ,1991 ,**37** :71~79
- [9] Neubauer P ,Hoffmann K ,Holst O *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol* ,1992 ,**36** :739~744
- [10] Lin L L ,Hsu W H. *Lett Appl Microbiol* ,1997 ,**24** :365~368
- [11] Gombert A K ,Kilikian B V. *J Biotechnol* ,1998 ,**60** :47~54

The Influences of Lactose as an Inducer on the Expression of the Recombinant Proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3)

ZHANG Yi QU Xian-Ming YANG Sheng-Li

(Shanghai Research center of Biotechnology ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200233)

Abstract The possibility of using lactose as an inducer to substitute the common inducer IPTG in the fermentation process of the recombinant microorganism was deeply investigated. The influences of culture conditions such as lactose concentration ,growth medium composition ,the point of induction and the duration of the induction phase on the expression of the recombinant protein were analyzed and studied in detail. In the following experiments ,lactose was then used in the high cell density culture process of *E. coli* BL21(DE3)(pFu). The final cell density(OD_{600}) was over 40. The expression level of recombinant protein was about 15% of the total cellular protein. Both the culture density and foreign protein expression level were lower than those induced by IPTG. However ,because of the potential toxicity to human beings and the high cost of IPTG ,the use of lactose might provide an alternative means of inducing foreign protein expression. This would be more attractive in industrial scale productions of recombinant proteins. The results confirmed that lactose could be used as an inducer in the fermentation process.

Key words *Escherichia coli* , fermentation , induction , lactose