

抗菌肽 Adenoregulin 基因工程菌培养条件的优化及分批发酵研究 Optimization of Cultural Condition of Genetic Engineering Strain for Antibiotic Peptide Adenoregulin and Research on its Fed-batch Cultivation

周宇荀, 曹 巍, 魏东芝*, 罗清平, 王锦之

ZHOU Yu-Xun, CAO Wei, WEI Dong-Zhi*, LUO Qing-Ping and WANG Jin-Zhi

华东理工大学生物反应器国家重点实验室, 鲁华生物技术研究所, 上海 200237

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, New World Institute of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

摘 要 Adenoregulin(ADR)是来源于南美树蛙 *Phyllomedusa bicolor* 皮肤的含有 33 个氨基酸的抗菌肽,在非极性环境中形成 α -螺旋型结构,具有抗菌活性强、抗菌谱广的特点。将 ADR 基因克隆于 pET32a 载体上,转化大肠杆菌 BL21(DE3),对这一工程菌株的培养条件进行了优化。通过正交试验,考察诱导时机、诱导剂量和诱导时间三个因素的不同水平对蛋白表达的影响,结果发现诱导时机的影响尤为显著,考察了 9 种不同培养基对表达量的影响,发现培养基中加入葡萄糖对目标蛋白的稳定表达起了重要的作用,确定最佳培养条件为:培养基为 $2 \times \text{YT} + 0.5\%$ 葡萄糖,诱导时机为 $OD_{600} = 0.9$ 左右,诱导剂 IPTG 加入的终浓度为 0.1 mmol/L ,诱导时间为 4h。采用前期恒 pH、后期指数流加的策略进行工程菌 BL21(DE3)_{pET32a-adr} 的高密度培养,在整个流加过程中,通过控制葡萄糖的加入量,将菌株的比生长速率控制在 0.15 h^{-1} ,乙酸浓度也被控制在较低的水平 ($< 2 \text{ g/L}$),但是质粒丢失严重,在发酵结束时,约有 40% 的大肠杆菌中不带质粒,这导致了目标蛋白的表达量下降严重,但是表达的目标蛋白 90% 以上为可溶性形式。表达的融合蛋白无抑菌活性,而裂解后得到的 ADR 单体具有明显的抑菌活性。

关键词 adenoregulin, 大肠杆菌, 重组表达, 优化, 高密度

中图分类号 TQ 920.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0615-07

Abstract 33 amino acid antibiotic peptide adenoregulin(ADR), which were firstly isolated from the skin of South America arboreal frog *Phyllomedusa bicolor*, forms α -helix amphipathic structure in apolar medium and has a wide spectrum of antimicrobial activity and high potency of lytic ability. ADR gene was cloned in pET32a and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The cultural and inductive conditions of *E. coli* BL21(DE3)_{pET32a-adr} have been optimized. The effect of three factors which were time point of induction, concentration of IPTG in the culture and time of induction on the expression level of Trx-ADR was investigated. The results indicated that the expression level was affected by the time point of induction most predominantly. 9 varieties of media in which BL21(DE3)_{pET32a-adr} was cultured and induced were tested to achieve high expression level of target protein. It was found that glucose in the medium played an important role in keeping stable and high expression level of Trx-ADR. The optimal inductive condition is as follows: the culture medium is $2 \times \text{YT} + 0.5\%$ glucose, the time point of induction is $OD_{600} = 0.9$, the final concentration of IPTG in the culture is 0.1 mmol/L and the induction time is 4h.

Revised: January 19, 2005; Accepted: April 4, 2005.

This work was supported by a grant from Shanghai-SK Research & Development Foundation (No. 2002005-S).

* Corresponding author. Tel: 86-21-64252078; E-mail: dzhwei@ecust.edu.cn

上海-SK 研究与发展基金资助项目(No. 2002005-S).

BL21(DE3) pET32a-adr was cultivated according to the strategy of constant pH at early stage and exponential feeding at later stage to obtain high cell density. During the entire fed-batch phase, by controlling the feeding of glucose, the specific growth rate of the culture was controlled at about 0.15h^{-1} , the accumulation of acetic acid was controlled at low level ($< 2\text{g/L}$), but the plasmid stability could not be maintained well. At the end of the cultivation, 40% of the bacteria in the culture lost their plasmids. As a result, the expression level of the target protein declined dramatically, but 90% of Trx-ADR was in soluble form. The expressed fusion protein showed no antibacterial activity, while the native form of ADR lysed from Trx-ADR showed distinct antibacterial activity.

Key words adenoregulin, *Escherichia coli*, recombinant expression, optimization, high cell density

近些年来,病原菌产生的日益严重的抗药性使越来越多的抗生素被淘汰,抗性抗生素被淘汰的速度远远快于新的抗生素被开发的速度,因此寻找新来源的抗生素成为医药研究开发人员所面临的紧迫课题。多肽抗生素由于其结构与作用方式和传统抗生素有根本的区别,极有可能成为一种新的对付抗性致病菌的长效治疗药物。抗菌肽 Adenoregulin 是从南美树蛙 *Phyllomedusa bicolor* 皮肤中分离的含有 33 个氨基酸的多肽,经肽链及结构分析发现,与 Dermaseptin b 具有相似的前体结构和抗菌谱,是 Dermaseptin 家族中的一员^[1]。Dermaseptins 是具有广谱抗菌活性的多肽家族,一般具有 27~34 个氨基酸,它们是首个发现的伴随免疫缺陷综合症和使用免疫抑制药物而出现的丝状真菌感染具有致命效应的脊椎动物多肽^[2-3]。初步研究表明,Adenoregulin 的抗菌谱与 Dermaseptin b 相似,对一些致病真菌的致死浓度低于后者,而且对哺乳动物细胞无毒,是一种极有前途的抗真菌多肽药物^[4]。

抗菌肽具有潜在的重要临床应用价值,但获得大量天然产物面临着巨大的困难,利用基因工程的方法来生产抗菌肽是降低成本的一条有效途径。迄今为止,已有大量抗菌肽在各种表达体系如大肠杆菌、酵母、昆虫等获得表达,但其普遍存在的表达水平低、多肽纯化困难等问题仍待解决^[5-7]。*E. coli* 表达系统是基因工程产业化中理想的系统。因 *E. coli* 培养方便、周期短、成本低廉而倍受人们的青睐。重组蛋白在大肠杆菌表达系统中能否获得高产受诸多因素的影响。首先是菌种与载体,不同菌种在相同的条件下,表现出的特性迥然不同。有的菌种可达到较高的菌体密度,如 JM105 能达到 30g/L ;有的产酸较多,在相同条件下,*E. coli* JM109 的产酸量是 BL21 的 4 倍^[8]。质粒载体的拷贝数及稳定性对外源基因的表达也产生很大影响。具有强启动子的质粒载体能以较高水平表达外源蛋白,但高表达会引发包涵体的大量生成。因此,选择合适的菌

种和载体是发酵能否达到高产的前提条件。其次是培养基的成分与配比^[9],为满足工程菌发酵中能量、元素和特殊养分的需求,培养基除含有一定的 C、N 源外,盐类分子及微量元素也是不可缺少的。另外,如何诱导对外源基因的表达水平有着关键性的作用^[10]。综合考虑诱导时机、诱导剂量和诱导时间,不但可获得较高的蛋白表达水平,同时可一定程度上影响目标蛋白中可溶性蛋白的含量,提高纯化的效率与回收率。本实验中所采用的是高拷贝的 pET32a 质粒,带有 T7 启动子和 109 个氨基酸残基的硫氧还蛋白融合部分和多聚组氨酸的纯化标签,是一个适合高效表达可溶性外源蛋白的载体。

1 材料与方法

1.1 菌株

抗菌肽 Adenoregulin 大肠杆菌表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) pET32a-ADR, 本实验室构建(图 1)。抗菌肽活性测试菌株 *E. coli* K12D31 由本室保存。

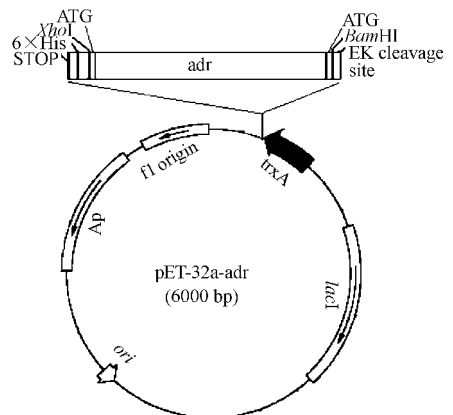


图 1 pET32a-adr 的主要特征

Fig.1 Schematic representation of relevant features of pET32a-adr

1.2 培养基

LB、2xYT、M9 等培养基配方参见文献[11],种子培养基为 LB 培养基,分批发酵培养基(g/L):蛋

白肱 10 酵母粉 10 ,葡萄糖 10 , K_2HPO_4 4 , $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7 (NH_4)₂ SO_4 1.2 , NH_4Cl 0.2 和微量元素溶液 ,该溶液中含有(g/L): $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001 , $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.004 , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 , $ZnCl_2$ 0.002 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001 , H_3BO_4 0.0005 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3。补料培养基(g/L):葡萄糖 700 酵母粉 175 ,蛋白胨 175 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 培养液的 pH 值全部调为 7.0。高密度发酵培养基同上。高密度发酵补料培养基(g/L):葡萄糖 200 酵母粉 70 蛋白胨 70 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.7 ,培养液的 pH 值全部调为 7.0。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养:发酵菌种要用新近转化和鉴定的菌株。从平板中挑取单菌落于 5 mL LB 培养基中 37℃ 培养过夜。

1.3.2 摇瓶发酵:将过夜培养的种子液以 2% 接种量接入到含 30 mL $2 \times$ YT 培养基的 250 mL 摇瓶中 ,37℃ 220r/min 培养。

1.3.3 分批补料发酵:发酵采用 Bioengineering 公司 KLF2000 3.7L 发酵罐 ,初始工作体积为 1.6 L ,按 5% 接种量接入种子液 ,发酵温度为 30℃ ,培养分分批培养(Batch)和分批补料(Fed-batch)两个阶段。第一阶段溶氧逐渐下降 ,通过提高转速控制溶氧在 30% 以上 ,当培养基中葡萄糖耗尽 ,溶氧和 pH 上升后 ,串联(cascade)溶氧和搅拌转速 ,控制溶氧 20% 并采用指数流加的方式补料。流加过程中 ,根据菌体生长需要和发酵体积的变化 ,在恒定溶氧的条件下 ,指数流加葡萄糖和氮源 ,控制平均比生长速率在 $0.15 h^{-1}$ 。待 OD_{600} 达到 90 左右开始诱导 ,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L ,培养 3 ~ 4 h。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度测定:测定发酵液在波长 600 nm 处的吸光度 ,确定菌浓。

1.4.2 抗菌肽 ADR 融合蛋白表达量的测定:菌液经离心后 ,进行 12% SDS-PAGE 分析 ,采用 FR-980 凝胶成像系统(上海复日公司)分析目标蛋白表达量。

1.4.3 葡萄糖及乙酸浓度的测定:发酵液中残留葡萄糖浓度测定采用葡萄糖测定试剂盒操作。乙酸浓度采用 HPLC 法测定^[12] ,无水乙酸钠作为标准品 ,浓度分别为 0、1、5、10、15、20g/L。高效液相色谱分析采用 Agilent zorbox SB-Aq C18 分析柱(Agilent 公司 ,ZORBAX SB-Aq , 4.6mm \times 250mm) ,流动相为

pH2.6 的 0.1% 磷酸溶液 ,用紫外检测器在 210nm 检测 ,流速为 1mL/min ,分离时间为 8min。标准曲线以标准品的浓度为横坐标 ,以峰面积为纵坐标绘制。

1.4.4 工程菌质粒稳定性的检测^[13] :在发酵过程中 ,每隔 2h 取样 ,测其 OD_{600} 值 ,然后将菌液以灭菌的 PBS 稀释至 $OD_{600} = 0.2$ 左右 ,再将该稀释度的菌液稀释 10^5 倍 ,各取 100 μ L 菌液涂布不含氨苄青霉素和含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板 ,置于 37℃ 培养箱中培养 16h ,计算在两种平板上的菌落数 ,质粒的稳定性由以下算式确定 :

$$\text{质粒稳定性} = \frac{\text{Amp} + \text{平板上的菌落数}}{\text{Amp} - \text{平板上的菌落数}} \times 100\%$$

1.4.5 抗菌肽抑菌活性的测定:取对数生长期的 *E. coli* $K_{12}D_{31}$ 细菌培养液经磷酸缓冲液洗涤 2 次后定 OD_{600} 至 0.3 ,将 15 μ L 的菌液与 285 μ L LEG 培养基(1% 蛋白胨 ,0.5% 酵母浸出物 ,0.02% $MgSO_4$,0.2% 柠檬酸 ,1% K_2HPO_4 ,0.2% 葡萄糖)混合 ,加入 200 μ L 不同的待测样品 ,在 37℃ 恒温摇床中温育 140min 后以冰水浴冷却 ,以 OD_{600} 测定 *E. coli* $K_{12}D_{31}$ 的生长。阳性对照为终浓度为 200 μ g/mL 的氨苄青霉素 ,阳性对照为 PBS 缓冲液。

2 结果

2.1 工程菌 BL21(DE3)pET32a-adr 的生长曲线

将 BL21(DE3)pET32a-adr 与对照菌株 BL21(DE3)pET32a 在 37℃ 下进行培养 ,每小时取样测 A_{600} 绘制生长曲线(图 2)。由图可知 ,ADR 基因的导入对工程菌的前期及中期生长有微弱的抑制作用 ,但不很显著 ,在生长后期与对照菌达到一致的菌浓。说明以融合蛋白的形式表达抗菌肽可以降低其对宿主菌的毒害作用 ,未明显增加宿主菌的代谢负担。

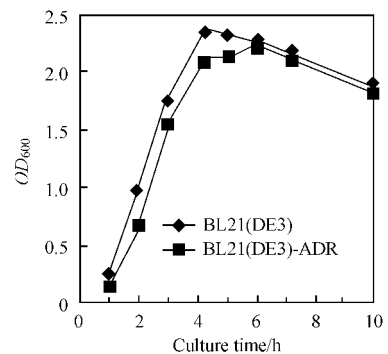


图 2 抗菌肽工程菌 BL21(DE3)pET32a-ADR 及 BL21(DE3)pET32a 的生长曲线

Fig.2 Growth curves of BL21(DE3)pET32a

2.2 正交试验确定最佳诱导条件

菌体诱导后,物质能量代谢及生理生化状态都发生了巨大的变化。外源蛋白的表达将与宿主本身代谢所需要的前体和能量进行竞争,若诱导过早或过晚,由于菌体早期活力不足或晚期有害代谢产物的积累都会使外源蛋白表达急剧下降;若诱导剂量过大,会导致菌体生长受到抑制甚至发生死亡;若诱导时间过长,目标蛋白会被大量降解,严重影响产率。由此看出,诱导时机、诱导剂量和诱导时间对外源蛋白的表达均具有不同程度的影响。通过正交试验考察诱导时机、诱导剂量和诱导时间三个因素的不同水平对蛋白表达的影响,结果发现诱导时机的影响尤为显著(表1)。在确定最佳诱导时机为 $OD_{600} = 0.9$ 左右,为降低生产成本选取较低的诱导剂量—— 0.1 mmol/L IPTG,诱导时间确定为 4 h ,最终蛋白表达量提高到 23% (图3)。

表1 正交试验优化工作及结果

Table 1 Multi-effectors on the expression of fusion protein of Trx-ADR

	OD_{600}^a	IPTG(mmol/L)	Time/h ^b	Blank	Pro/ % ^c
	1	2	3	4	
1	0.900	0.1	3	1	23.2
2	0.864	0.5	4	2	18.3
3	0.924	1	5	3	19.9
4	1.056	0.1	4	3	17.8
5	0.996	0.5	5	1	22.1
6	0.996	1	3	2	15.6
7	1.296	0.1	5	2	16.9
8	1.302	0.5	3	3	8.4
9	1.236	1	4	1	11.4
K_{j1}	61.4	57.9	47.2	56.7	$K = 153.6$
K_{j2}	55.5	48.8	47.5	50.8	$P = 2621.44$
K_{j3}	36.7	46.9	58.9	46.1	
Q_j	2732.4	2644.5	2651.1	2640.2	$Q = 2803.88$
S_j	111.0	23.1	29.7	18.8	$S_T = 182.6$

^a OD_{600} at which the bacteria was induced; ^b OD_{600} at which the induction was terminated; ^c percentage of target protein in bacteria protein analyzed by Smartviewer software on SDS-PAGE.

2.3 培养基对 ADR 融合蛋白表达的影响

培养基的成分与配比对工程菌的代谢和蛋白表

表2 培养基优化工作及结果

Table 2 Optimization of culture medium

Culture medium	LB	LB + M9	2 × YT + M9	2 × YT + G 0.5%(W/V)	2 × YT + G 1.0%(W/V)	2 × YT + G 1.5%(W/V)	2 × YT + G 2.0%(W/V)
Target Pro/ % ^a	19.2	28.1	29.8	26.1	34.8	34.1	37.8

^a analyzed by Smartviewer software on SDS-PAGE

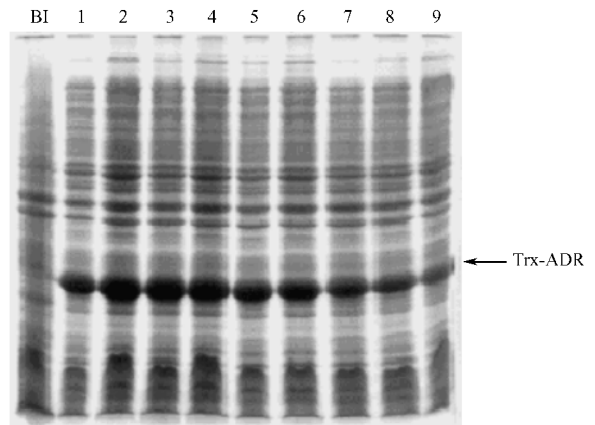


图3 正交试验各组蛋白表达情况

Fig.3 The SDS-PAGE analysis of the expression of fusion protein

达具有关键性的作用,尤其在发酵过程中可以通过控制 C、N 源的比例及微量元素、盐类分子的含量等降低有害代谢产物的积累,增强菌体活力,提高外源蛋白的表达水平。

通过尝试不同的合成培养基,在上述最优条件下进行诱导表达,最终目标蛋白含量达到 28% 左右,同时使破壁上清中杂蛋白的含量降低,简化了后续的纯化。通过在原有培养基的基础上添加一定浓度的葡萄糖,解决了外源蛋白本底表达高的问题,同时进一步丰富了培养基的营养,使菌体生长快速终密度增加,提高并稳定外源蛋白的表达量在 35% 左右(图4)。

2.4 分批补料发酵

参考摇瓶实验的结果,采用分批补料的方式培养重组大肠杆菌 BL21(DE3) $pET32a\text{-adr}$ 生产抗菌肽融合蛋白。结果发现蛋白表达水平相对于摇瓶发酵明显降低。分析原因:发酵过程中几次较大的 pH 波动使菌体产生应急反应,影响了其正常的生理代谢;由于罐上发酵较摇瓶操作时间长,因此质粒的稳定性直接影响目标蛋白的表达(图5)。

2.5 高密度发酵

采用前期恒 pH、后期指数流加的策略进行工程菌 BL21(DE3) $pET32a\text{-adr}$ 的高密度发酵。由两次失败的发酵实验得知,补料流加若不加以控制会导致

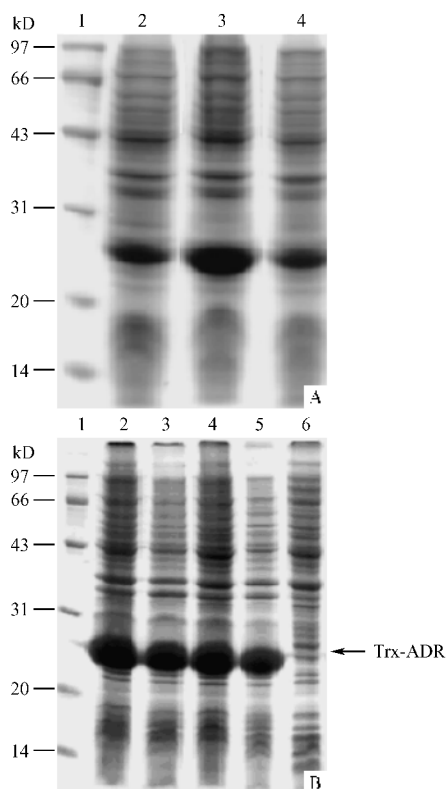


图4 不同培养基的蛋白表达情况

Fig.4 The analysis of the fusion protein expression in different culture medium

A. lane1 : protein marker ; lane 2 : LB ; lane 3 : LB + M9 ; lane 4 : 2 × YT + M9. B. lane 1 : protein marker ; lane 2 : 2 × YT + 0.5% G ; lane 3 : 2 × YT + 1.0% G ; lane 4 : 2 × YT + 1.5% G ; lane 5 : 2 × YT + 2.0% G ; lane 6 : before induction.

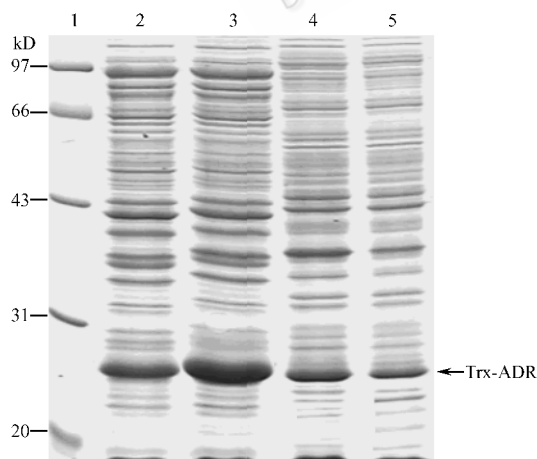


图5 摇瓶发酵与分批补料发酵中目标蛋白表达的比较

Fig.5 Comparison of target protein expression in shake flask culture with fed-batch fermentation

Lane 1 : protein marker ; lane 2 : 3 h after induction in shake flask culture ; lane 3 : 4 h after induction in shake flask culture ; lane 4 : 3 h after induction in fed-batch fermentation ; lane 5 : 4 h after induction in fed-batch fermentation.

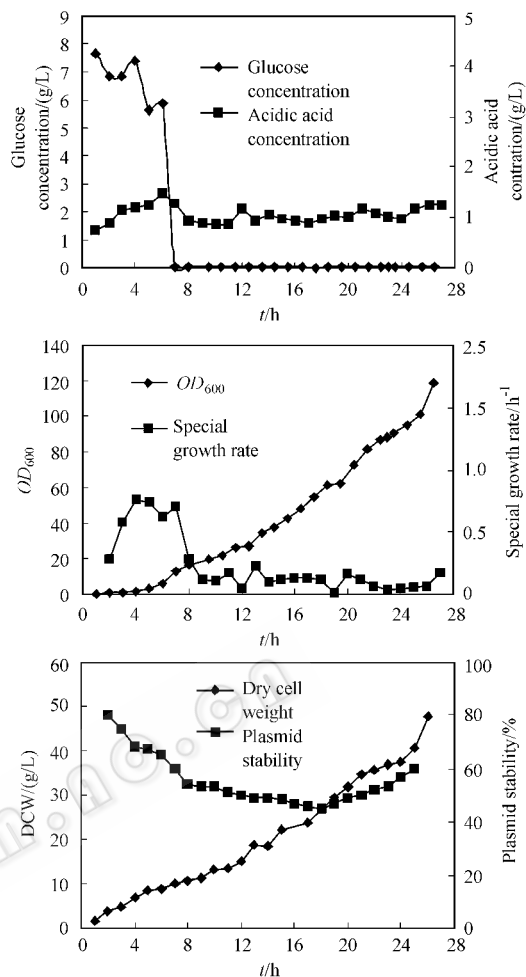


图6 高密度培养中各参数的变化曲线

Fig.6 Time course of high density cultivation of recombinant Escherichia coli BL21(DE3)pET32a-adr

A : glucose and acidic acid concentration ; B : optical density at 600nm and special growth rate of the culture ; C : dry cell weight and plasmid stability of the culture.

菌体生长过快而发生溶菌,因此采用指数流加的策略严格控制菌体的比生长速率。当发酵罐中的初始葡萄糖(10 g/L)在培养6h耗尽的时候,开始进行指数流加补料,在整个流加阶段,葡萄糖的浓度控制在1.0 g/L以下以避免培养液中乙酸的生成和积累,乙酸的累计量在整个发酵过程中控制在较低的水平(<1.5 g/L),比生长速率也控制在 0.15 h^{-1} 。虽然采取了丰富的培养基和严格的发酵控制,但结果发现,目标蛋白的本底表达严重,最终蛋白表达量很低。发酵进行27h后最终菌体密度达到 $OD_{600} = 119$ 细胞密度达到40 g/L DCW,目标蛋白表达量为5%左右。但是有40%的大肠杆菌失去了质粒(图6)。质粒的不稳定是导致蛋白表达急剧下降的主要原因。虽然产量不高,但经后续处理发现,目标蛋白

90%以上都以可溶的形式存在,这在一定程度上简化了后续纯化并提高了蛋白纯化回收率。同时表明,若能提高质粒稳定性,可溶性目标蛋白在高密度培养时获得高水平表达具有较大潜力。

2.6 重组抗菌肽 Adenoregulin 的抑菌活性测定

对经镍螯合层析纯化的重组融合蛋白 Trx-ADR、经 CNBr 裂解后的反应混合物及纯化后的 ADR 单体,考察它们对 *E. coli* K12D31 生长的抑制活性,结果表明,融合蛋白没有抑菌活性,而融合蛋白的裂解混合物和纯化后重组 ADR 表现出明显的抑菌活性(图 7 图 8)。

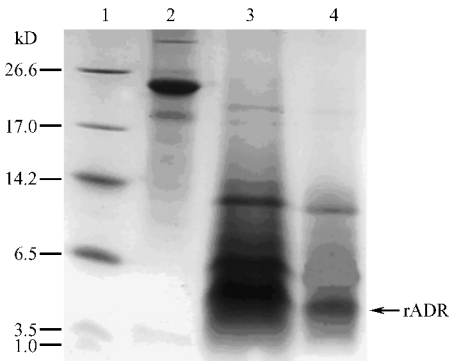


图 7 融合蛋白 Trx-ADR 的溴化氰裂解及纯化

Fig.7 Tricine-SDS-PAGE analysis of Trx-ADR cleaved by CNBr and purified rADR

1: peptide markers; 2: Trx-ADR purified by Ni^{2+} -chelating chromatography; 3: peptide mixture lysed by CNBr; 4: rADR purified by cationic ion-exchange resin.

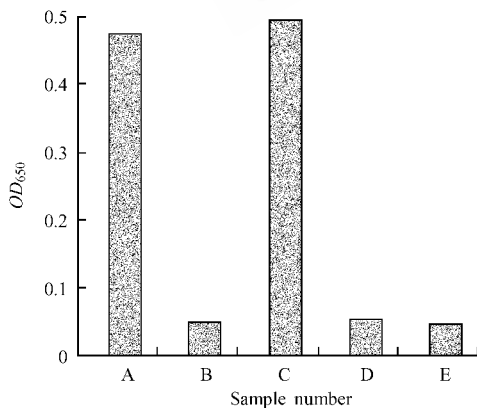


图 8 重组融合蛋白 Trx-ADR 及 ADR 的抑菌活性测定

Fig.8 The antibacterial activity assay of recombinant fusion protein Trx-ADR and ADR

A: negative control; B: positive control; C: purified fusion protein; D: fusion protein cleaved by CNBr; E: purified rADR.

3 讨论

由于抗菌肽分子中富含碱性氨基酸,更易受到

胞内胰酶样蛋白酶的攻击,分子中过多的正电荷会与带负电的 DNA 和 RNA 发生相互作用,从而干扰 DNA 的复制和 RNA 的转录^[14],几乎所有的研究都表明抗菌肽必须以融合蛋白的形式才能在大肠杆菌中实现表达^[12],而且对与其融合的载体蛋白有选择性^[6-7,15]。本实验研究的蛙皮抗菌肽 Adenoregulin 是一个在 33 个氨基酸中含有 6 个赖氨酸的抗菌肽,等电点为 9.7,它比同一家族的其它 dermaseptins 含有更多的碱性氨基酸,可能会更深地破坏膜的稳定性,从而表现出更强的抗菌活性^[4],但是这也可能成为它在大肠杆菌中表达更为困难的原因,以前的实验也证实了这一点。经过筛选,得到了能在大肠杆菌中高效稳定表达 adenoregulin 的菌株 BL21(DE3)/pET32a-adr,但是与没有外源基因的菌株 BL21(DE3)/pET32a 相比,它对培养和诱导条件仍然更为敏感和苛刻,培养基中的碳源、氮源的含量对表达的影响至关重要,在 LB 培养基中,目标蛋白的表达量只占菌体蛋白的不到 20%,而在添加了葡萄糖的 2 × YT 培养基中,这个数字可达到 37% 以上,而 BL21(DE3)/pET32a 中表达的 TrxA 载体蛋白的量的变化就小得多。另一方面,诱导剂 IPTG 的加入时机对目标蛋白 Trx-ADR 表达量的影响也不容忽视,当 BL21(DE3)/pET32a-adr 的 OD_{600} 在 0.8 ~ 1.0 之间时加入诱导剂,目标蛋白可以正常得到表达,而在此范围以外,融合蛋白表达急剧降低,甚至不表达;而对载体蛋白 TrxA 来说, OD_{600} 在 0.6 ~ 1.2 之间时加入诱导剂,表达量的变化不大。

尽管在整个发酵过程中,葡萄糖浓度、乙酸浓度、比生长速率的控制都比较理想,但是,质粒的丢失仍比较严重,在最初的 20h,大约 60% 的大肠杆菌丢失了质粒,但是到发酵结束时,含有质粒的细菌恢复到了 60%。在摇瓶培养中,较低的温度对 pET32a-adr 质粒在 *E. coli* BL21(DE3)中的稳定存在是有利的,因此将上罐发酵的温度确定为 30℃。在罐上培养的早期,融合蛋白 Trx-ADR 的本底表达可以完全得到抑制,一些研究者认为诱导外源蛋白的表达会使质粒不稳定,这可能是由于外源蛋白对宿主菌产生毒性^[16,17]。Trx-ADR 的本底表达可能具有同样的影响。但是随着发酵的进行,细菌代谢产物和细胞自溶外泻的蛋白在发酵液中积累,不含质粒的细胞似乎变得对不利的环境更加地敏感,因此在发酵后期,含有质粒的细胞的比生长速率超过了不含质粒细胞的比生长速率,其中 Trx-ADR 的本底表达在这个过程中扮演了重要的角色。有实验表

明,对 lac 启动子的诱导方式可以影响质粒的稳定性,用 IPTG 诱导比用乳糖更易导致质粒的丢失^[18]。在批次发酵中提高菌株 BL21(DE3)pET32a-adr 质粒分配稳定性的工作还需进一步地完善,溶氧、培养基组成、流加方式以及诱导方式的改变都可以被作为改进的因素加以考虑^[19]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Amiche M, Ducancel F, Lajeunesse E. Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of adenoregulin from frog skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **191**: 983 - 990
- [2] Brand G D. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 49332 - 49340
- [3] Feder R, Dagan A, Mor A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 4230 - 4238
- [4] Mor A, Amiche M, Nicolas P. Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 1994, **33**: 6642 - 6650
- [5] Katia MS, Cabral MS, Almeida APV *et al.* Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin I (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Pro Exp Purif*, 2003, **31**: 115 - 122
- [6] Rao XC, Li S, Hu JC *et al.* A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Pro Exp Purif*, 2004, **36**: 11 - 18
- [7] Lee JH, Kim JH, Hwang SW *et al.* High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **227**: 575 - 580
- [8] Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1004 - 1011
- [9] Gupta JC, Pandey G, Mukherjee KJ. Two-stage cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to enhance plasmid stability under non-selective conditions: experimental study and modeling. *Enzyme Microb Technol*, 2001, **28**: 89 - 94
- [10] Mari YM, Espinosa AE, Ubieta R *et al.* Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **258**: 29 - 31
- [11] Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989
- [12] Seeger A, Schneppe B, McCarthy JEG *et al.* Comparison of temperature and isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 1995, **17**: 947 - 953
- [13] Hu SY, Wu JL, Huang JH. Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2004, **107**: 161 - 171
- [14] Lee JH, Minn IL, Park CB *et al.* Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Pro Exp Purif*, 1998, **12**: 53 - 60
- [15] Zhang L, Falla T, Wu M *et al.* Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**: 674 - 680
- [16] Tiemy Y, Hounsa CG, Hornez JP. Effects of a recombinant gene product and growth conditions on plasmid stability in pectinolytic *Escherichia coli* cells. *Microbios*, 1999, **97**: 39 - 43
- [17] Chaves AC, Abath FGC, Lima-Filho JL *et al.* Studies on growth kinetics and plasmid stability of a recombinant *Escherichia coli* expressing a *Schistosoma mansoni* antigen. *Bioprocess Eng*, 1999, **21**: 355 - 361
- [18] Mari YM, Espinosa AE, Ubieta R *et al.* Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **258**: 29 - 31
- [19] Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv Biochem Engin/ Biotechnol*, 2004, **86**: 47 - 82