

# 重组人血管内皮抑制素( rh-Endostatin )大肠杆菌表达体系发酵条件的优化

## Optimization of Fermentation of Recombinant Human Endostatin ( rh-Endostatin ) Expression in *Escherichia coli*

常国栋<sup>1</sup>, 李壮林<sup>1</sup>, 秦加阳<sup>1</sup>, 马翠卿<sup>1</sup>, 罗永章<sup>2</sup>, 许 平<sup>1\*</sup>

CHANG Guo-Dong<sup>1</sup>, LI Zhuang-Lin<sup>1</sup>, QIN Jia-Yang<sup>1</sup>, MA Cui-Qing<sup>1</sup>, LUO Yong-Zhang<sup>2</sup> and XU Ping<sup>1\*</sup>

1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2. 清华大学生物系, 北京 100084

1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2. Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**摘 要** 优化了重组人血管内皮抑制素的 *E. coli* 表达体系的发酵条件。利用 *E. coli* 表达体系得到了较高的产量, 在 9h 左右的发酵周期内达到  $OD_{600}$  值 140, 包涵体蛋白产量为 3 g/L。主要优化了异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷( Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG )的终浓度、诱导时间、培养温度、补料控制方法等条件, 并且在诱导后提高培养温度到 40°C, 在非常短的培养周期内达到了高密度培养的目的。利用 *E. coli* 表达, 继而通过复性获得有活性的重组人血管内皮抑制素, 成本低、生产过程稳定可控, 得到的蛋白性质稳定, 符合工业生产的需要。

**关键词** 重组人血管内皮抑制素, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷, 大肠杆菌, 基因工程蛋白, 高密度培养, 肿瘤

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0662-05

**Abstract** The fermentation process of recombinant human Endostatin expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was studied. The effects of factors such as concentration of IPTG, induction time, cultivation temperature and feeding strategies were investigated. Beside that, by changing the temperature to 40°C after induction, the high-density cultivation finished in a much shorter period. After 9 hours cultivation, the optical density (OD) at 600 nm reached 140 and the yield of inclusion body was 3 g/L. While *E. coli* system was used, protein with better activity and stability was obtained. The cost was much lower and the producing process was much steadier. It will meet the demands of the industrial production.

**Key words** recombinant human Endostatin, IPTG, *E. coli*, high density cultivation, genetic engineering protein, tumor

肿瘤的生长严格依赖于血液的供应<sup>[1]</sup>, Folkman 的研究表明肿瘤的血管系统可作为癌症治疗的一个靶点。1997 年, O'Reilly 等人在鼠血管内皮瘤培养物中分离出一种 20kD 的血管生成抑制剂, 称为 Endostatin。后来证实, Endostatin 是胶原 XVIII C 末端片段。用 Endostatin 进行系统的治疗, 几乎能完

全抑制肿瘤诱导生成新生血管。动物实验证实 Endostatin 能够抑制原发肿瘤和转移肿瘤的生长<sup>[2]</sup>, 也能够抑制致癌物诱发肿瘤<sup>[3]</sup>。多次重复给药后, 可使肿瘤处于持久的休眠状态, 而且不会诱发药物抗性<sup>[4]</sup>。

O'Reilly 等人利用大肠杆菌表达了以包涵体形式存在的

变性内皮抑制素蛋白,当以标准方法使内皮抑制素重新折叠并溶于组织培养基中后,即可强有力地抑制内皮细胞增殖。但不幸的是,蛋白质复性过程中有99%的蛋白质没有正确复性<sup>[1]</sup>。

*E. coli* 是常用的表达重组蛋白的宿主菌。清华大学生物系蛋白质化学实验室罗永章教授成功解决了重组人血管内皮抑制素体外大规模复性技术,使利用 *E. coli* 工业化生产重组人血管内皮抑制素成为可能。所构建的重组大肠杆菌为 BL21(DE3) pET-25b-Endostatin。它的 *lac* 操纵子为阻遏蛋白负调节与 CAP 正调节两种机制协调合作, *lac* 操纵子在 IPTG 诱导去阻遏的条件下,当没有葡萄糖及 cAMP 浓度较高时, cAMP 与 CAP 结合,然后 CAP 结合在 *lac* 启动序列附近的 CAP 位点,可刺激 RNA 转录活性提高 50 倍;当有葡萄糖存在时, cAMP 浓度降低, cAMP 与 CAP 结合受阻, *lac* 操纵子表达下降。因此我们选择了便于控制葡萄糖浓度的葡萄糖浓度反馈流加的补料方法。

在发酵培养中,对 IPTG 的浓度、诱导时间、葡萄糖浓度对诱导的影响、培养温度等条件进行了摸索,得到了较高的培养密度和蛋白表达率,对后续的纯化、复性步骤打下良好的基础。

有报道使用 *Pichia pastoris* 克隆和表达可溶形式的重组内皮抑制素<sup>[5,6]</sup>,还有人利用其他真核细胞系表达内皮抑制素<sup>[7,8]</sup>。经比较, *E. coli* 表达的 rh-Endostatin 的性质更稳定,成本更低,有更好的体内稳定性和生物学活性,大大降低了临床用药量(数据未发表),为最终实现内皮抑制素的临床应用提供了条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

从人肝 cDNA 扩增 Endostatin 基因,在 N 端连接一段附加序列,然后接入 pET-25b 载体,转化 BL21(DE3),挑选的转化子测序验证正确后,用来表达 rh-Endostatin。

### 1.2 主要试剂

IPTG 为 BIOSCENTIFIC 产品, Yeast extract powder、Tryptone 为 DIFCO 产品,其他均为国产分析纯试剂。

### 1.3 培养基

**1.3.1 摇瓶培养基** 摇瓶培养使用 LB 培养基。

**1.3.2 发酵培养基** Tryptone 10 g/L, Yeast extract powder 5g/L, NaCl 1g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 6g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.01g/L, Glucose 5g/L。将 Tryptone、Yeast extract powder、NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 配好后注入发酵罐中灭菌,其他单独配制,分别灭菌。

### 1.4 培养方法

**1.4.1 摇瓶培养** 将构建的重组大肠杆菌接种于 LB 固体斜面上, 37℃ 培养 8h, 转接入 30mL LB 液体培养基( Ampicillin sodium 0.1mg/mL ) 37℃、200r/min 摇床培养,待 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 左右时加入 IPTG 进行诱导,继续培养 4h。

**1.4.2 发酵罐培养** 将构建的重组大肠杆菌接入 LB 液体培养基,作为一级种子。LB 液体培养基 50mL,含 100mg/L 氨苄西林钠, pH 值 7.2, 37℃ 培养 4h, 摇床转速 220r/min, OD<sub>600</sub> 值应达到 4~6。第二级是在摇瓶中放大, LB 液体培养基 500mL, 标准同一级种子。然后转接入 B. Braun B5 发酵罐中。

发酵罐培养时控制 pH 值为 7.2, 37℃ 培养, 并根据溶氧值不断调整通气流量和搅拌转速, 控制溶氧 20% 以上。每小时取样测 OD<sub>600</sub> 值和葡萄糖浓度。发酵进行 3h 左右时培养基初糖基本耗尽, 开始用 600g/L 的葡萄糖溶液补糖。补糖的速率应根据测得的糖浓度调整, 使培养基中的糖浓度保持在 0.5%~1%。补料用的 500g/L Tryptone 溶液在 3h 后开始连续流加。

当 OD<sub>600</sub> 值达到需要的数值时加入 80mg IPTG。诱导后要降低糖浓度, 以利于目的蛋白的表达。

### 1.5 检测方法

**1.5.1 葡萄糖浓度测定** 使用 SBA-40C 生物传感器测定葡萄糖浓度。

**1.5.2 表达率测定** :15% SDS-PAGE 电泳。电泳胶用 Kodak 凝胶成像分析系统扫描确定目的蛋白表达率。

**1.5.3 目的蛋白量确定** :将重组大肠杆菌所取发酵液样品离心, 得到的菌体直接用包涵体溶解液(含 8mol/L 尿素)溶解, 0.45μm 膜过滤出去杂质, 然后在 ACTA-Explore 上用 Ni-NTA 柱纯化, 目的蛋白洗脱液紫外法测蛋白浓度<sup>[10]</sup>。测量目的蛋白洗脱液体积, 计算出目的蛋白总量。

**1.5.4 菌体干重测量方法** 参照 Seeger 等的方法<sup>[11]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 IPTG 浓度的确定

试验在摇瓶中进行, 待 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 左右时加入 IPTG 进行诱导, 继续培养 4h。分别设定 IPTG 终浓度为 0、2、8、20、40、80、160、300、1000μmol/L, 培养结束后测定 OD<sub>600</sub> 值和蛋白表达率(图 1)。

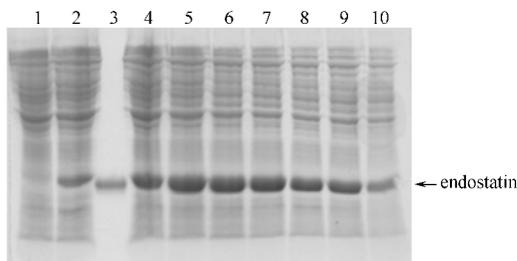


图 1 不同 IPTG 浓度诱导的菌体电泳

Fig. 1 SDS-PAGE (15%) of different concentration of IPTG

3: endostatin marker; Others: protein expressed at different concentration of IPTG. The concentrations were in turn: 0, 2, 8, 20, 40, 80, 160, 300 and 1000 μmol/L.



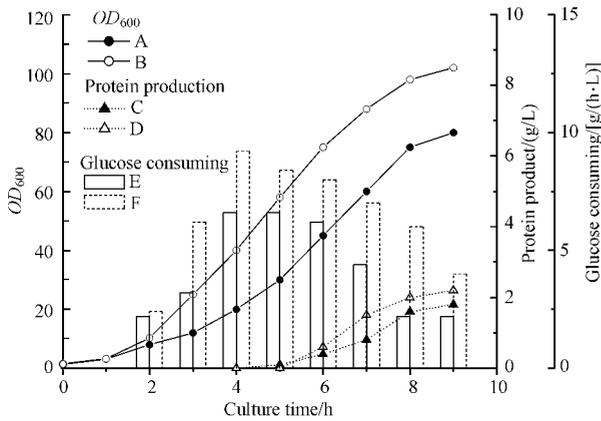


图5 高溶氧传递对生长和表达的影响

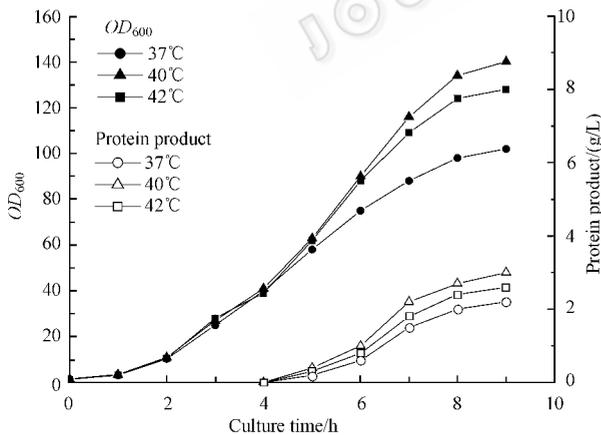
Fig. 5 Influence of high resolved oxygen concentration on cell growth and protein expression

A, C, E: cultivation without pure oxygen; B, D, F: cultivation with pure oxygen.

### 2.5 诱导后提高培养温度

在前面的实验中发现,通过供应充足的氧增加比生长速率,得到较高的菌体密度,同时表达率也没有受到影响,所以考虑继续提高比生长速率,以便在较短的培养时间内获得更高的菌体密度。考虑到升高温度有利于包涵体的形成,所以比较了 37℃、40℃、42℃ 生长和目的蛋白表达的情况。

42℃ 培养时表达率没有明显的降低,而且 40℃ 时表达率还略有增加,同时 40℃ 培养得到菌体密度最大,所以得到的包涵体蛋白总量最多。发酵周期 9 h  $OD_{600}$  值达到了 140,测量菌体干重为 51 g/L,包涵体蛋白为 3 g/L(图 6)。

图6 培养温度对菌体密度( $OD_{600}$ )蛋白表达量的影响Fig. 6 Influence of temperature after induction on  $OD_{600}$  and protein expression

## 3 讨论

实验表明 IPTG 浓度达  $80 \mu\text{mol/L}$  以上对菌体的生长已经有明显的影响。因此选取合适的 IPTG 浓度非常重要。Kim 的研究证明 D-乳糖可以代替 IPTG 的作用,既可避免 IPTG 对菌体生长的毒害作用又可降低成本<sup>[13]</sup>。

诱导后提高培养温度到 40℃,目的蛋白表达率升高,可能是由质粒稳定性提高所致,有报道温度对质粒稳定性有一定的影响<sup>[14]</sup>。较低的比生长速率有利于菌体较长时间维持良好的生长状态,并有利于菌体目的蛋白的表达。但培养时间过长会引起菌体质粒的丢失,造成目的蛋白表达量下降。过低的比生长速率虽然使培养过程中很少产生乙酸积累,但会降低产物的表达<sup>[9]</sup>。因此需要选取合适的比生长速率。我们的实验结果表明,较高的比生长速率不仅没有降低表达率,而且在很短的生长周期内达到较高的菌体密度,在工业大规模生产中有非常重要的意义。

目前在使用 *Pichia pastoris* 表达的重组人血管内皮抑制素进行的肿瘤临床治疗试验中<sup>[15]</sup>,用药量高达 240 ~ 600  $\text{mg/m}^2/\text{人}$ 。如此大的用药剂量,显然给生产造成巨大的压力。*Pichia pastoris* 发酵系统设备投入大、产量低、发酵周期长,同时 *Pichia pastoris* 表达的 Endostatin,有一部分蛋白的 N 末端会有 2 ~ 4 个氨基酸被切除,从而导致其  $\text{Zn}^{2+}$  结合位点的丢失。目前大家倾向于认为  $\text{Zn}^{2+}$  结合位点与 Endostatin 活性密切相关,所以 *Pichia pastoris* 表达的 Endostatin 蛋白的活性不均一,这也是造成 *Pichia pastoris* 表达 Endostatin 用药量大的原因之一。鉴于这些问题,有必要研究一种生产效率高、成本低、产物的体内稳定性好的生产方法和产品,从而提高重组人血管内皮抑制素治疗肿瘤和其他血管发生相关疾病的临床应用效果。

研究中发现,在 *E. coli* 表达系统中以高产率生产以包涵体形式存在的变性蛋白,不存在末端氨基酸缺失现象。纯化后经复性能够得到高产量的重组人血管内皮抑制素,活性测定结果表明,这种方法生产的 Endostatin 的生物活性高于酵母表达的 Endostatin(相关数据尚未发表)。经比较,大肠杆菌表达系统为酵母表达系统产率的 3 倍以上。而且,目前尚未发现 Endostatin 的活性和糖基化等翻译后修饰有关,所以在生产重组人血管内皮抑制素时 *E. coli* 表达系统优于 *Pichia pastoris* 表达系统。

致谢 非常感谢龚海涛老师和赵群、林军在这项研究中的大量工作和建设性的意见。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 1995, **333**: 1757 - 1763
- [2] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, **88**: 277 - 285
- [3] Perletti G, Concarri P, Giardini R *et al.* Antitumor activity of Endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res*, 2000, **60**: 1793 - 1796
- [4] Boehm T, Folkman J, Browder T *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug

- [ 5 ] Dhanabal M , Ramchandran R , Volk R *et al.* Endostatin : Yeast production , mutants , and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res* , 1999 , **59** : 189 – 197
- [ 6 ] Sim KL , Fogler WE , Zhou XH *et al.* Zinc ligand-disrupted recombinant human Endostatin : potent inhibition of tumor growth , safety and pharmacokinetic profile. *Angiogenesis* , 1999 , **3** : 41 – 51
- [ 7 ] Lo KM , Sudo Y , Chen J *et al.* High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng* , 1998 , **11** : 495 – 500
- [ 8 ] Hohenester E , Sasaki T , Olsen BR *et al.* Crystal structure of the angiogenesis inhibitor Endostatin at 1.5 Å resolution. *Embo* , 1998 , **17** : 1656 – 1664
- [ 9 ] Li M (李民) , Chen CQ (陈常庆) . Progress studies of high cell-density culture of recombinant *Escherichia coli*. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志) , 2000 , **20** : 26 – 31
- [ 10 ] Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochem* , 1967 , **6** : 1948 – 1954
- [ 11 ] Seeger A , Schneppe B , McCarthy JEG *et al.* Comparison of temperature and IPTG induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* , 1995 , **17** : 947 – 953
- [ 12 ] Allen B , Lulli GW. A gradient-feed process for *E. coli* fermentations. *Biopharm Manuf* , 1987 , **1** : 38 – 41
- [ 13 ] Kim CH , Lee JY , Kim MG. Fermentation strategy to enhance plasmid stability during the cultivation of *Escherichia coli* for the production of recombinant levansucrase. *J Ferm Bioeng* , 1998 , **86** : 391 – 394
- [ 14 ] Gupta R , Sharma P , Vyas VV. Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid pCCPS-31 in *Escherichia coli*. *J Biotech* , 1995 , **41** : 29 – 37
- [ 15 ] ASCO Annual Meeting Report , [www.entremed.com](http://www.entremed.com) , 2001 , 2002