

# 透明颤菌血红蛋白的表达及对基因工程菌的影响

吴奕 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘要** 利用已克隆的透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 血红蛋白基因 (vgb), 构建了一批复制类型和抗性标记不同的 vgb 表达载体, 并就 vgb 基因表达及其对几种基因工程大肠杆菌的影响进行了初步研究。实验证明 vgb 基因的表达具有氧调控特性, 在溶氧水平下跌至 20% 饱和度时迅速合成。vgb 基因的表达产物 (*Vitreoscilla* Hemoglobin, VHb) 可促进青霉素酰化酶和 TNF、IL-2 等基因工程菌在低氧条件下细胞生长和产物表达的状况, 由于 vgb 基因的表达降低了细胞对氧的敏感程度, 可望运用它来改善发酵过程中溶氧控制裕度。这些实验结果预示着 vgb 基因在耗氧生物过程中, 如抗生素工业和基因工程菌高密度发酵, 有着良好的应用前景。

**关键词** *Vitreoscilla* 血红蛋白, 溶氧, 基因工程菌

传统的抗生素工业以及近年来发展的基因工程菌高密度发酵常受到设备供氧条件的限制, 为了使细胞处于有氧呼吸状态, 往往只能改变最适操作条件, 降低细胞生长速率或培养密度。提高供氧水平通常从设备和操作角度考虑, 例如, 改进发酵罐设计、输入富氧或纯氧、采用加压或负压操作、在发酵液中加入“氧载体”(Oxygen vector)<sup>[1]</sup>等等。这些方法都着眼于提高溶氧 (DO) 水平或气液传质系数, 虽然有一定效果, 但都不同程度地受到设备、能源或操作条件的制约。

*Vitreoscilla* 血红蛋白 (VHb) 的研究为解决供氧限制提供了一条新的途径。*Vitreoscilla* 血红蛋白基因 (*Vitreoscilla* globin gene, vgb) 的表达随溶氧水平下降而迅速增加, 对贫氧条件下细胞生长和蛋白质合成有促进作用<sup>[2,3]</sup>。因此, 在细胞中表达 VHb 可望从提高细胞自身代谢功能入手解决溶氧供求矛盾。由于 vgb 基因表达调控机制在专性或兼性好氧菌中相当保守, 目前它已在多种微生物中获得表达<sup>[4~7]</sup>, 这预示它有着广泛的应用前景。所以, 探明 VHb 的性质、功能和调控机制具有重要的理论意义和应用价值。

本文利用已克隆的 vgb 基因<sup>[8]</sup>, 构建了一批复制类型和抗性标记不同的 VHb 表达载体, 初步考察了它的表达状况及对几种基因工程大肠杆菌的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒 (表 1)

pVH1 和 pVH2 为 pUC8-vgb 上含 vgb 基因的 1.4kb Hind III-BamH I DNA 片段分别插入 pRK404 和 pOK12<sup>[9]</sup> 相应位点构建而成; pILVH 为 pUC22-vgb 上含 vgb 基因的 1.4kb BamH I-Pst I DNA 片段插入 pIL-2 的相应位点构建而成 (图 1)。

IL-2 和 TNF 基因工程菌以 JF1125 为宿主; 青霉素酰化酶 (Penicillin G acylase,

PA) 基因工程菌以 A56 为宿主; 不同的 VHb 载体转入各种基因工程菌中考察 VHb 的表达和作用。

表 1 菌种和质粒一览表  
Table 1 Strains and plasmids

(Host cells)					Origin
<i>E. coli</i> JF1125					This lab
<i>E. coli</i> A56					This lab
Plasmids	Expressed products	Vectors	Peplicons	Resistances	
pIL-2	IL-2	pBR322	Col E1	Ap	This lab
pTNF	TNF	pBR322	Col E1	Ap	This lab
pPA22	PA		pMB1	Cm	This lab <sup>(10)</sup>
pUC8-vgb	VHb	pUC8	Col E1	Ap	This lab
pUC22-vgb	VHb	pUC21 <sup>(9)</sup>	Col E1	Ap	This lab
pVH1	VHb	pRK404	RK2	Tc	This paper
pVH2	VHb	pOK12 <sup>(9)</sup>	p15A	Kan	This paper
pILVH	IL-2&VHb	pBR322	Col E1	Ap	This paper

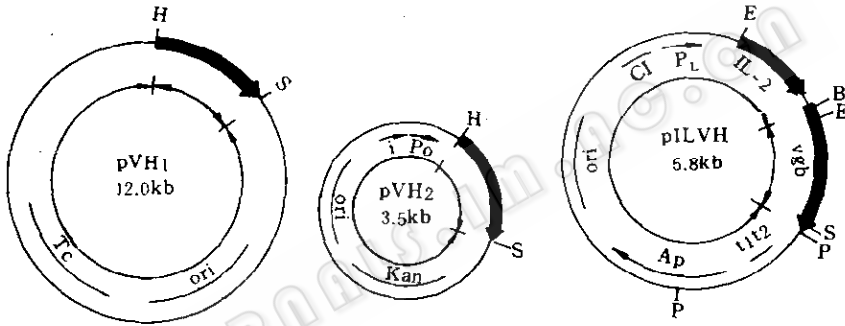


图 1 pVH1, pVH2 和 pILVH 的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid map of pVH1, pVH2 and pILVH

B. BamH I, E. EcoR I, H. Hind III, P. Pst I, S. Sal I

## 1.2 质粒构建

常规操作。限制酶为 Boehringer Mannheim 或 Promega 的产品; 余均为国产试剂。

## 1.3 培养条件

IL-2 和 TNF 基因工程菌的培养基组成 (g/L) 为:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3; NaCl 0.5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1; Tryptone 3; Yeast extract 1.5; pH7.0, 细胞在 30℃ 生长; 当生长至指数期中期 ( $\text{OD}_{600}$  约 0.6~0.8) 培养温度升至 42℃, 可诱导 IL-2 和 TNF 合成, 继续培养 4h 后测定产物的表达量。摇瓶培养通过调节装量和摇床转速 (NBS 往复式) 改变供氧条件。发酵罐采用 2.5L 发酵罐 (MBR BIOREACTOR LTD. SWITZLAND)。

青霉素酰化酶基因工程菌培养基组成为 (g/L): Yeast extract 30; NaCl 5, 苯乙酸 2; pH8.0, 培养温度为 22℃; 培养 96h 后测定青霉素酰化酶酶活; 摇瓶培养通过调节装量和摇床转速改变供氧条件。

Tryptone 和 Yeast extract 为 Unipath LTD. England 产品。

## 1.4 检测方法

1.4.1 细胞密度:由测定培养液的  $OD_{600}$  值确定,使  $OD_{600}$  值不超过 0.35。

1.4.2 IL-2 和 TNF 表达量的测定:取培养液 100 $\mu$ l,离心后弃去上清液,用 0.5ml 50mmol/L Tris (pH7.4) 洗涤后加入 20 $\mu$ l 上样缓冲液,经振荡和 5min 沸水浴后由 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测细胞蛋白,凝胶浓度为 15%。凝胶经考马斯亮蓝 (R250) 染色和脱色后,用激光扫描仪定量测定产物含量。

1.4.3 青霉素酰化酶酶活测定:以 3-苯乙酰氨基-6-硝基苯甲酸 (NIPAB) 为底物测定青霉素酰化酶活力<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 VHb 的表达

VHb 的表达受溶氧水平的调控,图 2 是 JF1125 (pVH1) 在发酵罐维持一定供氧条件下 (500r/min, 0.4vvm), 细胞生长、VHb 表达和 DO 三者之间的关系。当细胞由迟滞期转为指数生长期时,代谢水平迅速提高,比生长速率激增导致溶氧水平快速下跌。当溶氧跌入 20% 饱和度以下时, VHb 开始合成,其表达量随溶氧下降而增加,发酵后期溶氧维持在 5% 饱和度以下的低水平, VHb 浓度则保持高水平。

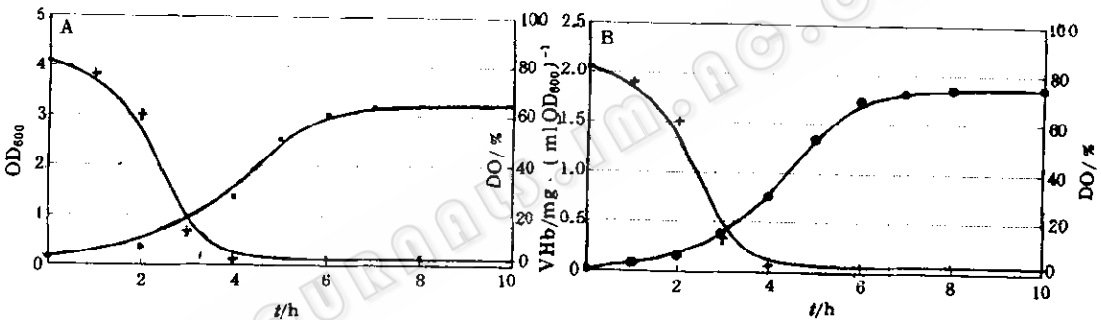


图 2 A. 细胞生长与溶氧 (DO) 的关系; B. VHb 表达量与溶氧 (DO) 的关系

Fig. 2 A. Relationship between DO and growth; B. Relationship between DO and VHb expression  
—+— $OD_{600}$ , —\*—DO, —o—VHb

表 2 列举了 VHb 在几种不同载体上经 16h 摇瓶培养后的表达量。根据复制类型比较, RK2 型的 pVH1 质粒拷贝数最低而 Col E1 型的 pILVH 最高。结果表明 VHb 的表达量与基因剂量有明显的关系, 提高基因剂量可获得较高的 VHb 表达量。

表 2 VHb 在不同表达载体上的表达量

Table 2 VHb expression amount using different vector

Plasmids	Replication origins	VHb expression amount/mg · (ml $OD_{600}$ ) <sup>-1</sup>
pVH1	RK2	$1.85 \times 10^{-2}$
pVH2	p15A	$3.25 \times 10^{-2}$
pILVH	ColE1	$5.80 \times 10^{-2}$

### 2.2 VHb 对青霉素酰化酶基因工程菌产酶量的影响

将 VHb 表达质粒 pVH2 转化入 A56 (pPA22), 比较了在一系列供氧 (用 250ml 的摇瓶) 条件下 VHb 的表达对青霉素酰化酶基因工程菌产酶量的影响。结果 (见图 3) 表明在供氧低于某一临界值时, VHb 的表达明显提高细胞产酶量, 青霉素酰化酶比活可达

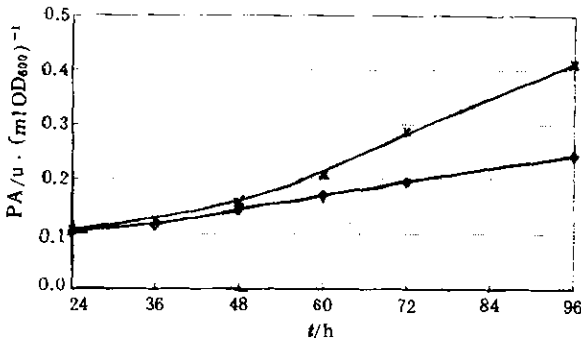


图 3 Vhb 表达对青霉素酰化酶基因工程菌产酶量的影响  
Fig. 3 Effect of Vhb on the activity of Penicillin G acylase

—\*—A56 (pPA22&pVH2), —o—A56 (pPA22&pOK12)

原基因工程菌的 2 倍, 而当供氧条件高于该临界值时, Vhb 的作用不显著, 见表 3。对青霉素酰化酶基因 (pac) 的研究表明 pac 基因严格受氧调控<sup>[10]</sup>, 故青霉素酰化酶的表达对溶氧十分敏感, 要求溶氧水平控制在低氧区域 (0~10% 饱和度) 某一数值, 过高或偏低都对产物合成产生明显负作用, 因此给发酵过程中溶氧的控制造成困难, 表 3 的数据显示 Vhb 的表达大大降低了产物合成对氧的敏感程度, 扩大了发酵操作裕度。

表 3 不同供氧条件下 Vhb 对青霉素酰化酶表达量的影响

Table 3 Effect of VHB on the activity of Penicillin G acylase at different aeration conditions

Conditions of aeration		Activity of penicillin G acylase/u (ml · OD <sub>600</sub> ) <sup>-1</sup>	
Rotation/r · min <sup>-1</sup>	Working volume/ml	I	II
80	150	0.450	0.842
90	150	0.814	1.140
110	150	1.287	1.397
110	120	1.115	1.140
110	50	0.560	0.600

2.3 Vhb 的表达对 IL-2, TNF 基因工程菌生长和产物表达的影响

图 4 比较了 Vhb 表达对 IL-2 基因工程菌生长曲线的影响。培养初期几乎没有差异, 培养中后期溶氧下跌使 Vhb 大量合成, Vhb 的表达延长了细胞生长期, 并获得较高的培养密度。Vhb 的表达对 TNF 基因工程菌生长曲线的影响也显示类似的实验结果 (数据未列出)。通过调节摇瓶装量和摇床转速改变供氧条件, 发现在供氧条件较差时 Vhb 的表达对 IL-2 和 TNF 的合成也有促进作用, 而且供氧条件愈差, 作用愈显著。见表 4。

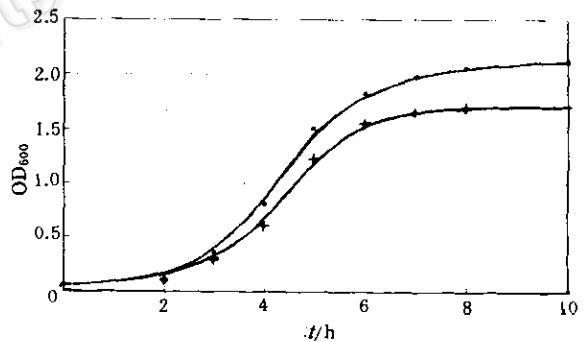


图 4 Vhb 的表达对基因工程菌细胞生长的影响  
Fig. 4 Effect of Vhb on the cell growth of recombinant *E. coli*

—\*—JF1125 (pIL-2&pVH1) —o—JF1125 (pIL-2&RK404)

表 4 不同供氧条件下 Vhb 对 IL-2 和 TNF 表达量的影响

Table 4 Effect of Vhb on expression of IL-2 AND TNF at different conditions of aeration

Conditions of aeration		Expression amount of IL-2 or TNF (t. c. p.) / %			
Rotation/r · min <sup>-1</sup>	Working volume/ml	I	II	III	IV
100	50/250	54.2	56.7	60.2	63.5
60	50/250	42.8	47.2	51.0	55.5
60	100/250	35.4	41.9	44.7	53.5

I, JF1125 (pIL-2&pRK404); II, JF1125 (pIL-2&pVH1); III, JF1125 (pTNF&pRK4040); IV, JF1125 (pTNF&pVH1).

另一方面, 由于表达 *vgb* 的需要在基因工程菌中引入另一个表达质粒, 这可能增加细胞的生理负担。表 5 考察了质粒复制和外源基因表达对宿主细胞生长的影响, 结果表明在同样的培养条件下质粒复制和外源基因的表达对细胞生长不利, 尤其在双质粒系统; 加入另一质粒表达 VHb 对原目的基因的表达也有不利影响。从表 5 的数据中还可发现提高基因剂量使 VHb 过量表达并不能进一步提高它的促进作用。

表 5 不同 VHb 表达质粒对细胞生长和产物表达的影响

Table 5 Effect of VHb cell growth and production using different expression plasmids

Expression systems	Cell density after 16h cultivation/OD <sub>600</sub>	Expression of VHb/mg (ml · OD <sub>600</sub> ) <sup>-1</sup>	Expression of IL-2 (t. c. p.) /%
A	2.5	/	/
B	2.2	/	58.0
C	1.9	/	53.2
D	2.8	1.8 × 10 <sup>-2</sup>	56.7
E	2.7	23.15 × 10 <sup>-2</sup>	55.8
F	2.8	5.4 × 10 <sup>-2</sup>	57.4

A, JF1125, B, JF1125 (pIL-2), C, JF1125 (pIL-2&pRK404), D, JF1125 (pIL-2&pVH1), E, JF1125 (pIL-2&pVH2), F, JF1125 (pILVH).

### 3 讨 论

*vgb* 基因的氧调控特性使 VHb 在溶氧下跌时迅速合成, 其最适表达的溶氧水平低于 5% 饱和度。在细胞培养过程中可能有多种因素会造成供氧不足, 使溶氧处于低水平。在对 IL-2 和 TNF 基因工程菌的实验中供氧不足主要是由分批发酵中指数期高生长速率造成, 低溶氧水平使 VHb 大量合成。与不含 *vgb* 基因的对照菌株相比, VHb 的表达使细胞生长期延长并获得较高的细胞密度。VHb 改善细胞在贫氧环境中生长的作用也可望在高密度发酵和耗氧量高的抗生素工业中得到应用。

青霉素酰化酶基因工程菌是产物合成对氧敏感的典型例子, 这类生产菌株发酵过程中溶氧控制往往成为难题, 这里的研究表明 VHb 的表达可降低 *pac* 基因表达对氧的敏感程度, 对改善发酵操作过程大有帮助。Magnolo<sup>(7)</sup> 也发现 VHb 的表达可降低链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 生产放线菌紫红素 D (Actinorhodin D) 中产物合成对氧的敏感程度, 从而提高过程产率。这些实验都表明 VHb 可在这类发酵过程中发挥显著作用, 同时也暗示 VHb 可能参与了细胞初级代谢和次级代谢中某些与氧有关的步骤。

VHb 能提高贫氧条件下基因工程菌目的产物的表达, 这在 IL-2、TNF 和青霉素酰化酶基因工程菌的实验中均得到证实, 只是对后者的作用较为显著。造成这一差异的原因可能是: IL-2 和 TNF 原有表达水平很高, 达菌体总蛋白的 50%~60%, 继续提高外源基因的表达量必然会受到细胞对外源蛋白承受能力的限制; 另外, 由  $\lambda$ P<sub>L</sub> 启动子控制的 IL-2 和 TNF 表达条件为 42℃ 诱导, 研究表明这一温度对细胞代谢产生严重影响, 如合成一条列热休克蛋白, 质粒稳定性大大下降, 细胞生长受到抑制, 等等, 这些因素也可能限制了 VHb 的作用。

*vgb* 基因剂量的增加可提高 VHb 的表达量。*vgb* 在 *Vitroscilla* 染色体 DNA 中只有一个拷贝<sup>(8)</sup>, Dikshit<sup>(12)</sup> 和 Khosla<sup>(2,12)</sup> 都发现在大肠杆菌中用质粒表达 VHb 的表达量大

大超过它的 VHb 中的表达 (约 4~7 倍), 造成这一差异主要也是由于基因剂量不同。另外, 基因剂量不但与质粒拷贝数有关, 还与质粒稳定性有关, 但我们的实验表明 VHb 的过量表达并不能增进它的生理功能, 是不必要的。而且, 在基因工程菌中用双质粒系统表达, 可能造成细胞生理负担过重; 而 VHb 不必要的过量表达也可能对细胞代谢和目的基因表达带来不利影响。改进 VHb 的表达体系, 构建 vgb 基因的整合型载体可望消除这些不利因素。

### 参 考 文 献

- [1] Rols J L, Condoret J S, Fonade C *et al.* *Biotechnology and Bioengineering* 1990, **35**: 427~435.
- [2] Khosla C, Bailey J E. *Nature* 1988, **331**: 633~635.
- [3] Khosla C, Bailey J E. *Bio/Technology* 1990, **8**: 849~853.
- [4] Demodena J A, Gutierrez S, Velasco J. *Bio/Technology* 1993, **11**: 926~929.
- [5] Dikshit K L, Dikshit R P, Webster D A. *Nuc Aci Res* 1990, **18**: 4149~4155.
- [6] Khosravi M, Webster D A, Stark B C. *Plasmid* 1990, **24**: 190~194.
- [7] Magnolo S K, Leenutaphong D L, De modena J A *et al.*, *Bio/Technology* 1991, **9**: 473~475.
- [8] Dikshit K L, Webster D A. *Gene* 1988, **70**: 377~386.
- [9] Vieira J, Messing J. *Gene* 1991, **100**: 189~194.
- [10] 杨胜利, 吴汝平, 姜增莲等. *生物工程学报*, 1985, **1**: 29~35.
- [11] Dikshit K L, Webster D A. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2601~2609.
- [12] Khosla C, Bailey J E. *Mol Gen Genet*, 1988, **214**: 158~161.

## Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene (vgb) and Its Effects on Several Strains of Recombinant *Escherichia coli*

Wu Yi Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

**Abstract** A series of expression vectors of *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb) has been constructed with different replication origins and resistance. The expression of vgb and its effects on several recombinant strains were studied. The results verify that the expression of vgb was regulated by the level of dissolved oxygen (DO), which increased rapidly as DO dropped below 20% of its saturation. The expressed *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in engineered *Escherichia coli* of IL-2, TNF and penicillin acylase could improve the cell growth and desired products in the oxygen-limited condition. It also showed that the DO control of fermentation could become easier due to the lower sensitivity to oxygen of the cells with vgb expressed and suggested that vgb could be further applied in the oxygen-limited bioprocesses.

**Key words** *Vitreoscilla* hemoglobin, dissolved oxygen, recombinant *Escherichia coli*.