

培养条件对含血管生成抑制素工程菌生长和表达的影响及乙酸的控制作用^{*}

周 涟, 罗进贤, 张添元, 孙慈煌, 陈 宏

(基因工程教育部重点实验室 // 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 血管生成抑制素是新近发现的一种血管生成抑制因子。摸索了含人血管生成抑制素基因的大肠杆菌 *E. coli* 工程菌的培养条件, 确定了合适的宿主菌、培养基及培养的 pH, 发现适当的提高 pH, 能有效减少代谢副产物乙酸的抑制作用。

关键词: 大肠杆菌 *E. coli*; 血管生成抑制素; 培养条件; 乙酸

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 01-0055-04

人血管生成抑制素 (hAGN) 是新发现的血管生成抑制因子, 是人血纤溶酶原的一个内片段, 相当于其 kringle1-4。它能特异地抑制内皮细胞的增殖, 并高效地抑制血管的生成和肿瘤的生长和转移, 有开发和应用前景。后来发现 kringle1-3 比 kringle1-4 有更强的抑制肿瘤及血管的形成的活性^[1]。但来源于自然界的 hAGN 资源非常有限, 因此采用基因工程技术生产 hAGN 非常必要。大肠杆菌是最常用的表达异源蛋白的原核系统。当合适的表达系统建立后, 通过高密度发酵技术, 可以极大的提高外源基因的表达量, 而大肠杆菌在生长时往往会产生副产物乙酸, 随着发酵密度的提高, 乙酸的积累对菌体的生长和表达有明显的抑制作用, 逐渐成为制约大肠杆菌工程菌高密度发酵的最主要因素^[2]。基因工程教育部重点实验室先后构建了能表达 hAGN (kringle1-4) 和 hAGN (kringle1-3) 的大肠杆菌工程菌^[3,4]。本文报道宿主菌及发酵培养基的选择, 培养条件的优化并着重探讨了如何减少乙酸的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

E. coli DH5 α (supE44, ∇ lac, U169, (φ 80lacZ ∇ M15), hsdR17, recA1, end A1, gyrA96, thi 1 和 relA1)。 *E. coli* TG1 (supE 44, F⁻, thi 1, thr 1, leuB6, lacY1, tonA21) 以上菌株均由本室保存。重组质粒 pBVA2, pBV49-1 由本室构建, 表达质粒 pBV220 由中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室构建, 中山大学生物防治国家重点实验室转赠。

1.2 培养基

2 $\times$ YT 培养基: $w = 1.6\%$ 蛋白胨, $w = 1\%$ 酵母膏, $w = 0.5\%$ NaCl, pH 7.0。2 $\times$ YT 固体培养基为含 $w = 1.5\%$ 琼脂的 2 $\times$ YT 培养基。

1.3 种子制备

取甘油种子接于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 2 $\times$ YT 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 活化培养过夜, 作为培养种子。

1.4 发酵培养

种子液按 $\varphi = 10\%$ 接种量转接于适当体积 (500 mL 三角烧瓶中盛 50 mL 2 $\times$ YT 为宜) 含 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的新鲜 2 $\times$ YT 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 振荡培养 2~3 h, 至 $A_{600} = 0.6$ 时, 转移至 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴诱导培养 3 h, 离心收集菌体。

1.5 菌体浓度的测定

以吸光度表示, 发酵液稀释后, 以培养基为对照, 于波长 600 nm 测定吸光度 (A_{600})。

1.6 蛋白含量的测定

总蛋白的测定用 Bradford 方法, SDS-PAGE 凝胶光密度积分扫描分析在 Kodak 公司的 EDAS 120 型凝胶成像系统上进行, 其扫描分析采用 Pharmacia Biotech 公司的 ImageMaster 软件。

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 分析

诱导表达的菌体经超声波破碎后, 离心收取上清液, 按文献 [5] 的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌工程菌 TG1/pBVA2 和 TG1/pBVK13 的表达鉴定

两株工程菌在 2 $\times$ YT 培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至

* 收稿日期: 2002-04-11

基金项目: 广东省重点科技资助项目 (2KM02502G); 广州市“225 科技工程”重大资助项目 (99-Z-004-01)

作者简介: 周涟 (1974 年生), 男, 硕士生; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

A_{600} 后 42 ℃诱导 3 h。细胞裂解液进行 SDS PAGE。结果如图 1。重组转化菌 TG1/pBVA2 和 TG1/pBVK13 分别在 45 000 及 40 000 bp 附近出现了一条蛋白带, 对照菌则没有。免疫印迹实验结果显示: 40 000及 45 000 bp 两条蛋白带都能与人纤溶酶原抗血清特异结合 (图略), 说明血管生成抑制素 (kringle1-4) 和 (kringle1-3) 在大肠杆菌 TG1 中得到了表达。

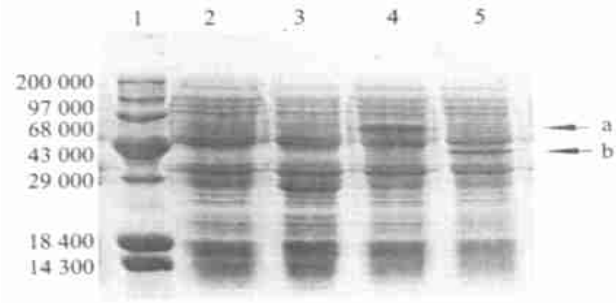


图 1 工程菌 TG1/pBVA2 和 TG1/pBVK13 表达产物的 SDS-AGE 分析

Fig 1 SDS-PAGE analysis of expression products from *E. coli* TG1/pBVA2 and TG1/pBVK13

1: Protein marker; 2: TG1/pBVA2 non-induced; 3: TG1/pBV220 induced; 4: TG1/pBVA2 induced; 5: TG1/pBVK13 induced

箭头 a 指的是 hAGN k1-4 蛋白的表达位置; 箭头 b 指的是 k1-3 蛋白的表达位置

2. 2 宿主菌的选择

大肠杆菌的不同种和亚种由于所含的蛋白酶不一样, 其生理因素, 如产酸等, 对外源基因的表达有不同的影响^[9]。本论文比较了 DH5 α 和 TG1 两种大肠杆菌菌种作为宿主菌的生长和表达特性。图 2 表明, 在 2 $\times$ YT 培养基中, TG1 的比生长速率 μ 为 0.71, DH5 α 的 μ 为 0.43。可见在 2 $\times$ YT 培养基中 TG1 的 μ 远大于 DH5 α 。

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

其中, x 指的是细胞浓度, 由 $\ln A_{600}$ 对培养时间 (前 3 h), 按方程 $\ln A_{600} = \mu \cdot t - c$ 作直线回归得到。

hAGN (k1-4) 及 hAGN (k1-3) 在 *E. coli* DH5 α 和 TG1 中的表达情况如图 3。光密度积分扫描结果显示: hAGN (k1-4) 在 TG1 中表达量占总蛋白的 17.5%, 在 DH5 α 中为 18.8%; hAGN (k1-3) 在 TG1 中表达量占总蛋白的 15.4%, 在 DH5 α 中为 11.1%。

综合以上结果, 宿主菌 DH5 α 和 TG1 对 hAGN 的表达影响不大, 但在 2 $\times$ YT 培养基中 TG1 的 μ 远大于 DH5 α , 因此采取 TG1 作为宿主菌。

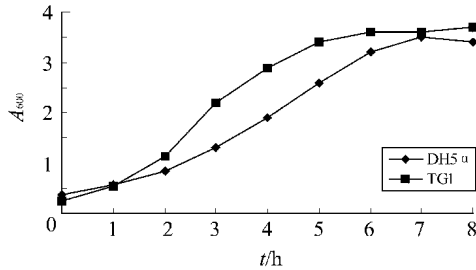


图 2 *E. coli* TG1 和 DH5 α 的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *E. coli* TG1 and DH5 α

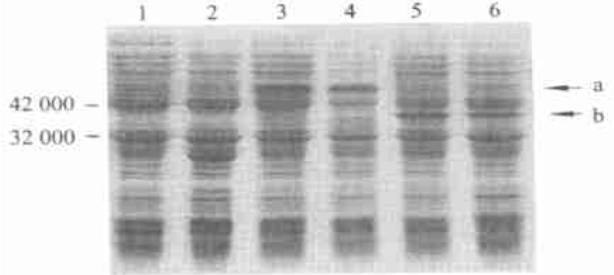


图 3 宿主菌 (DH5 α , TG1) 对 hAGN (k1-3) 和 hAGN (k1-4) 表达的影响

Fig 3 Expression of hAGN (k1-3) and hAGN (k1-4) in *E. coli* TG1 and DH5 α

1: DH5 α /pBVA2 non-induced; 2: TG1/pBV220 induced; 3: TG1/pBVA2 induced; 4: DH5 α /pBVA2 induced; 5: TG1/pBVK13 induced; 6: DH5 α /pBVK13 induced

2. 3 培养基的筛选

培养基优化是高密度发酵的关键之一。大肠杆菌工程菌的高密度发酵要获得高生物量和高表达产物, 需要投入几倍于生物量的基质, 以满足细菌生长繁殖及表达外源基因产物的需要, 根据在基本培养基中的菌体生长量可以推导出每种元素获得 1 g/L 的大肠杆菌菌体所需的无机盐 (L^{-1}): 0.77 g NH_4Cl , 0.125 g KH_2PO_4 , 17.5 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 7.5 mg K_2SO_4 , 0.64 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4 mg $CaCl_2$ ^[6]。除了采用营养丰富的 2 $\times$ YT 培养基 ($w = 1.6\%$ 蛋白胨, $w = 1\%$ 酵母粉, $w(NaCl) = 0.5\%$) 为种子培养基外, 重点研究了高密度发酵培养基。在参考一些大肠杆菌工程菌高密度发酵文献^[7, 8]的基础上, 设计了发酵培养基。

培养基 A1, A2, A3 成分(L^{-1}): KH_2PO_4 13.3 g、 $(NH_4)_2HPO_4$ 4 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2 g、Citric acid 1.7 g、微量元素, 其中 A1, A2, A3 葡萄糖的质量浓度分别为 20, 10, 6 g/L。

培养基 B1, B2, B3 成分(L^{-1}): NH_4Cl 1.33 g、 KH_2PO_4 3 g、 K_2HPO_4 15 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g、微量元素, 其中 B1, B2, B3 葡萄糖的质量浓度分别为 20, 10, 6 g/L。

培养基 C1, C2, C3 成分(L⁻¹): Yeast 10 g、MgSO₄ · 7H₂O 2.4 g、NH₄Cl 0.2 g、KH₂PO₄ 4 g、K₂HPO₄ 4 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 7 g、微量元素, 其中 C1, C2, C3 葡萄糖的质量浓度分别为 20, 10, 6 g/L。

培养基 D1, D2, D3 成分(L⁻¹): Yeast 10 g、NH₄Cl 1.33 g、NaH₂PO₄ 5.5 g、Na₂HPO₄ 9 g、MgSO₄ · 7H₂O 1 g, 其中 D1, D2, D3 葡萄糖的质量浓度分别为 20, 10, 6 g/L。

2.4 不同的培养基对菌体生长和基因表达的影响

上述 12 种培养基接种 TG1/pBVA2 后, 30 ℃培养, 每 2 h 取样测菌液光密度, 连续测 8 h, 以 ln A₆₀₀对培养时间按方程 ln A₆₀₀ = μ · t - c 作直线回归, 计算 μ, 观察不同的培养基对菌体比生长速率的影响, 结果如表 1。E. coli TG1/pBVA2 在 D3 培养基中有最高的比生长速率。

取具有较高比生长速率的培养基 B3、C3、D3, 研究其对 hAGN 表达的影响。接种 TG1/pBVA2 后, 待 A₆₀₀长至 0.6 时, 42 ℃诱导 3 h, 测 hANG 的表达水平, 观察不同培养基对 hANG k1-4 表达的影响。表 1 的结果表明, 工程菌的表达水平在 3 种培养基中差别不大, 但由于工程菌在 D3 培养基中有更高的比生长速率, 因而在后续的高密度培养中取 D3 为发酵培养基。

表 1 不同培养基对工程菌 TG1/pBVA2 比生长速率及表达水平的影响

Tah 2 Effect of culture media on the growth rate and protein expression level of E. coli TG1/pBVA2

培养基	A1	A2	A3	B1	B2	B3
μ/h ⁻¹	0.46	0.54	0.52	0.45	0.48	0.55
表达水平/%	—	—	—	—	—	21.1
	C1	C2	C3	D1	D2	D3
	0.60	0.68	0.59	0.72	0.73	0.79
	—	—	23.5	—	—	23.3

2.5 不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长和 hAGN 表达的影响

采用 D3 作为发酵培养基, 调节 pH 分别为 5.8、6.4、7.0、7.6、8.2, 在每个 pH 做 1 组 2 个摇瓶, 其中 1 个不含乙酸, 另 1 个含有 5 g/L 的乙酸。接种后, 30 ℃培养, 每小时取样测菌液 A₆₀₀值, 连续测 4 h。以 ln A₆₀₀对培养时间按方程 ln A₆₀₀ = μ · t - c 作直线回归, 计算 μ, 观察不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长的影响 (图 4)。

按以上组合接种后 30 ℃培养至 A₆₀₀ 0.6, 42 ℃诱导 3 h, 测 hANG (k1-4) 的表达水平, 结果如图 4。

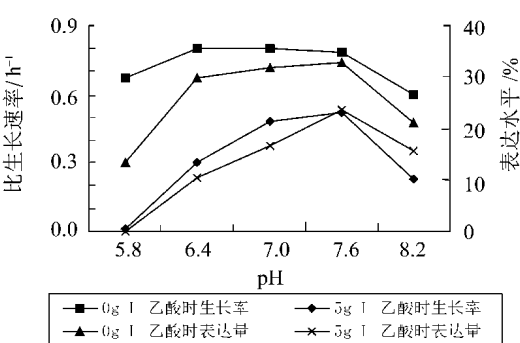


图 4 不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长和蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of acetate on the growth rate and expression level of E. coli TG1/pBVA2 at various pH

以上结果表明: 当 pH 过高和过低时, 对工程菌的生长和表达都不利, 没有乙酸存在时, pH 为 6.4、7.0 及 7.6, 对菌体的生长和表达区别不大。而有乙酸存在时, 菌体的生长和表达水平下降, 但随 pH 提高, 蛋白表达量有明显提高, 表明提高 pH 能降低乙酸的抑制作用。

参考文献:

[1] O'REILLY M S, HOLMGREN L, SHING Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma[J]. Cell, 1994, 73: 315—328.

[2] 张惟才, 朱厚础. 重组大肠杆菌的发酵和代谢工程 [J]. 微生物学通报, 1999, 26(4): 289—293.

[3] 罗进贤, 卢文菊, 李文清, 等. 人血管生成抑制素基因克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达[J]. 自然科学进展, 2000, 10: 49—53.

[4] 卢文菊, 罗进贤, 李文清. 人血管生成抑制素基因在大肠杆菌中的融合表达[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37: 88—91.

[5] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[6] REILING H E, LAURIAL H, FIECHTER A. Mass culture of E. coli: Medium development for low and high density culture of E. coli in minimal and complex media[J]. J Biotechnol. 1985, 2(3): 191—206.

[7] KORZ D J, RINAS U, HELMUCH K, et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli[J]. Biotechnol, 1995, 39: 59—65.

[8] PANDA A K, KHAN RH, RAO K B, et al. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of E. coli expression of ovine growth hormone [J]. J Biotechnol, 1999, 75: 161—172.

(下转第 61 页)

789; 69—73.

[8] CARUSO C, RUTIGLIANO B, ROMANO M, et al. The hemoglobins of the cold-adapted Antarctic teleost *Cygnodraco mawsoni*[J] . *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1078: 273—282.

[9] VANSTONE W E, ROBERTS E, TSUYUKI H. Changes in the multiple hemoglobin patterns of some Pacific salmon, genus *Oncorhynchus*, during the parr-smolt transformation[J] . *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1964, 42: 697—703.

[10] MIWA S, INUI Y. Thyroid hormone stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder [J] . *J Experimental Zoology*, 1991 , 259: 445—451.

Cloning and Sequencing of Hemoglobin β-Chain cDNA from Orange spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

YIN Zhi xin, HE Jian guo
(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Phage clones were randomly selected from leukocytes cDNA library of orange spotted grouper and used as templates for PCR amplification using λTriplEx 5’&3’ LD Insert Screening Amplimers. Then the expression sequence tags (ESTs) were sequenced. The hemoglobin β chain cDNA was isolated from the library. It consists of the longest open reading frame of 444 bp that encodes of 147 amino acids. Using a computer software (Compute pI/MW at <http://www.expasy.cn/>), the calculated relative molecular mass of the hemoglobin β chain is 16 544, with the pI of 6.95. It shows a 73.0% amino acid sequence identity with common carp beta globin type 3. The distal and proximal histidine residues at the heme binding region were conserved. The functionally important residues that are involved in the contacts with the heme and contacts between subunits were highly conserved.

Key words: orange spotted grouper; hemoglobin β chain; expression sequence tags (ESTs); cDNA library

(上接第 57 页)

Effect of Culture Condition on the Growth and Expression of Recombinant *E. coli* (hAGN) and on the Control of Acetate

ZHOU Lian, LUO Jin xian, ZHANG Tian yuan, SUN Ci huang, CHEN Hong
(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education // School of Life Sciences, Sun Yat sen University Guangzhou 510275, China)

Abstract: The cultural condition of recombinant *E. coli* (hAGN) was studied. The appropriate host strain, culture media, and pH was determined and found that the inhibition of acetate on gene expression could be decreased by increasing pH.

Key words: *E. coli*; angiostatin; culture condition; acetate