

乳糖诱导重组别藻蓝蛋白 (rAPC) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的表达*

唐志红 葛保胜 林 凡 任育红 秦 松¹⁾

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071;
烟台大学海洋学院 烟台 264005)

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071;
烟台大学生物化学系 烟台 264005)

提要 采用廉价的乳糖替代 IPTG 诱导重组别藻蓝蛋白 (rAPC) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 中表达, 对诱导产物表达的培养基、培养条件、诱导剂的浓度和诱导时机进行了优化, 将优化条件用于 5L 自控发酵罐进行高密度培养。结果表明, 对 rAPC 表达的条件进行优化后, 乳糖诱导 rAPC 的表达率可达 26.8%, 与 IPTG 的诱导结果接近; 在高密度培养中, OD_{600} 最大达 21.8。研究结果可为乳糖替代 IPTG 大规模生产 rAPC 奠定基础。

关键词 重组别藻蓝蛋白, 重组大肠杆菌, 乳糖诱导

中图分类号 Q789

藻胆蛋白是存在于蓝藻、红藻、隐藻和少数甲藻中的捕光色素蛋白, 主要包括藻红蛋白 (PE)、藻蓝蛋白 (PC)、别藻蓝蛋白 (APC) 和藻红蓝蛋白 (PEC) 四种 (Gherz 1994)。研究发现, 藻胆蛋白具有抗氧化、抗菌、抑制肿瘤和促进细胞生长的活性 (Estrada *et al.* 2001; Gonzalez *et al.* 1999; Reddy *et al.* 2000; Ramay *et al.* 2001; 刘洪艳等, 2004; 田超等, 2004)。本实验室克隆了 APC 基因, 并在大肠杆菌中实现了高效表达, 研究表明 rAPC 具有显著的抗肿瘤活性 (赵方庆等, 2003; 唐书明等, 1999)。

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 是非常有效的乳糖启动子诱导剂, 广泛用于大肠杆菌乳糖操纵子 (*lac* 及其衍生的启动子) 的诱导表达, 但由于 IPTG 具有一定毒性、而且价格昂贵, 因此将其应用于大规模生产基因工程药物还具有一定的局限性

(Gambert *et al.* 1998)。为了寻找 IPTG 的替代物, 作者尝试用乳糖作为诱导剂来启动目的基因的表达。本文中报道了大肠杆菌 JM109 菌株为宿主细胞, 以克隆在质粒 pMAL-p2-AP 中的 APC 基因为目的基因, 对乳糖诱导目的蛋白的各种基本参数进行了优化, 并摸索了以乳糖代替 IPTG 诱导 rAPC 表达的发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

宿主菌 *Escherichia coli* JM109 (DE₃) [*recA1 supE44 endA1 hsdR17 thi Δ(lac-proAB)*] 由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室保存。重组大肠杆菌 P₁ 由本实验室构建, 带有氨苄青霉素抗性和 APC 基因。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的制备、大肠杆菌感受态的制备及质粒转化 见文献 (Sambrook *et al.* 1989)。

* 国家 863 计划资助项目, 2001AA6204130 号; 中国科学院知识创新项目, KZCX3-SW-215 号。唐志红, 博士, E-mail tangzhihong7403@yahoo.com.cn

1) 通讯作者, E-mail sqin@ms.qd.cn

收稿日期: 2005-06-14 收修改稿日期: 2005-09-22

1.2.2 摇瓶培养 取出 4℃下平板保藏的菌种,挑取单菌落,接种于含 5ml LB 培养基 (含有 Amp 100μg/ml)的试管中,37℃,200r/min 培养过夜。按 5% 的接种量将活化菌种转接到含 100ml 2-YT培养基 (含有 Amp 100μg/ml)的 500ml 摇瓶中,37℃,200r/min 恒温振荡培养。

1.2.3 发酵罐培养 试管培养的过夜菌以 5% 接种于 100ml LB 摇瓶,37℃,200r/min 培养 8h后按 3% 接种于发酵罐,工程菌 JR₁ 的高密度发酵在 NBS BioFlo 3000 型 5L 自动发酵罐中进行。整个过程用 2mol/L HCl 和 5mol/L NaOH 控制 pH = 7.0。第一种培养方案是在菌体生长至 OD₆₀₀约为 1 时,开始流加乳糖,流加速率为 0.2g/(min·L),共流加 5h;第二种培养方案是在开始时流加葡萄糖,流加速率为 0.2g/(min·L),共流加 3h 搅拌速率不变,溶解氧反而上升时,开始流加乳糖,流加速率为 0.2g/(min·L),共流加 5h。

1.2.4 菌体培养浓度及 rAPC 表达量的测定 见参考文献 (赵方庆等, 2003); 菌体总蛋白含量的测定见参考文献 (Bradford 1976)。

2 结果

2.1 rAPC在基因工程菌株 JR₁ 中的表达

重组质粒 pMAL-p2-AP (7.76kb) 转化 *E. coli* JM 109 (DE₃) 后,进行单菌落培养,根据 SDS-PAGE,筛选出工程菌株 JR₁。在 LB 培养基中进行表达, IPTG 诱导将菌体超声破碎后进行 SDS-PAGE,转移至硝酸纤维素膜上,Western blot 鉴定 (图 1),诱导后的菌体裂解液在膜上出现了明显的条带,说明 rAPC 在工程菌 JR₁ 中得到了表达。

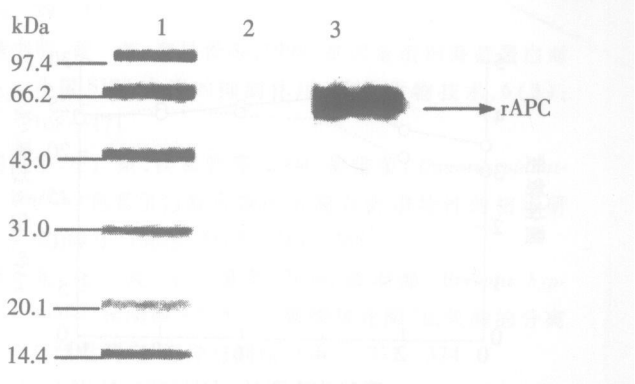


图 1 rAPC在基因工程菌 JR₁ 中表达的免疫印迹分析

Fig. 1 Western blot analysis of rAPC expressed in JR₁

1. Marker; 2 未诱导的 JR₁ 裂解液;
3 诱导后的 JR₁ 裂解液

2.2 不同培养基对菌体生长和 rAPC 表达的影响

将工程菌株 JR₁ 分别接入 LB、2-YT、M₉ 培养基中,以乳糖作为诱导剂。结果如表 1 所示,不同培养基对 rAPC 表达和菌体生长有很大的影响。在三种培养基中, rAPC 在 LB 中的表达最好,而在 2-YT 培养基中,不见有 rAPC 的表达,这可能是由于 2-YT 培养基中含有葡萄糖,菌体不能利用乳糖所致。工程菌 JR₁ 在 LB 培养基中生长最好,OD₆₀₀最终达 4.08 而 JR₁ 在 M₉ 中生长最差,OD₆₀₀值仅为 0.78。JR₁ 在 2-YT 中的生长情况介于前两者之间,OD₆₀₀为 3.73。通过比较工程菌株 JR₁ 在不同培养基中的生长情况及 rAPC 在不同培养基中的表达情况,发现在 LB 培养基中所获得的生物量最高,因此,相对于其它两种培养基而言, LB 培养基更适合用于工程菌株 JR₁ 的培养。

表 1 不同培养基对重组菌生长及 rAPC 表达量的影响

Tab 1 Effects of media on the recombinant *E. coli* and the expression level of rAPC

培养基	最终菌体浓度 (OD ₆₀₀)	rAPC 表达率 (%)	rAPC 生物量 (g/L)
LB	4.08	21.0	0.17
2-YT	3.12	0.0	0.00
M ₉	0.78	18.2	0.04

2.3 加入无机盐对 rAPC 产率的影响

文献报道 (赵方庆等, 2003) 无机盐对于质粒的稳定性有一定的影响,因此有必要找出其合适的浓度。本文作者研究了磷酸盐对工程菌株 JR₁ 培养的影响。从图 2 可以看出,当磷酸盐浓度小于 4g/L 时,随其浓度升高,菌体最终的 OD₆₀₀ 值

也随之升高;当磷酸盐浓度大于 4g/L 时,菌体最终的 OD₆₀₀ 有所降低。当磷酸盐浓度小于 8g/L 时,浓度升高, rAPC 的表达率增加;当磷酸盐浓度大于 8g/L 时, rAPC 的表达率有所减少。综合分析,当磷酸盐浓度为 4—8g/L 时,最终所获得的生物量较多。

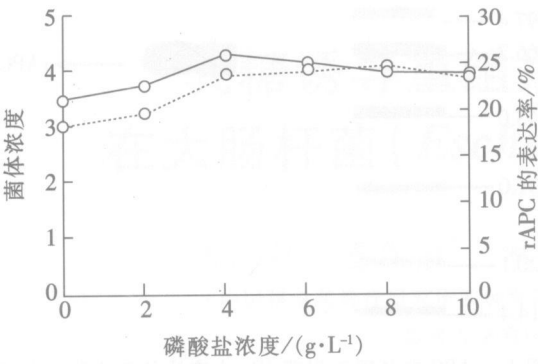


图 2 磷酸盐浓度对工程菌 JR₁ 生长及 rAPC 表达的影响

Fig 2 Effects of different PO₄³⁻ on the growth of JR₁ (OD₆₀₀) and expression of rAPC (%)

—○— JR₁ 生长; —○— rAPC 表达

菌体浓度用 OD₆₀₀ 值表示

表 2 乳糖浓度对重组菌生长及 rAPC 表达量的影响

Tab 2 Effects of lactose concentration on the growth of the recombinant *E. coli* and the expression level of rAPC

乳糖浓度 (g/L)	最终菌体浓度 (OD ₆₀₀)	rAPC 表达率 (%)	rAPC 生物量 (g/L)
0	3.05	0.0	0.000
2	3.46	18.5	0.152
4	3.56	23.7	0.164
6	3.72	26.8	0.179
8	3.70	26.5	0.173
10	3.60	26.7	0.169

2.6 诱导后基因工程菌 JR₁ 持续时间对表达的影响

如图 3 所示, 加入适宜的诱导剂浓度诱导培养 4h 后, rAPC 的表达量就达到最大值, 此时菌体仍保持较高的比生长速率, 故发酵液中 rAPC 的含量仍在增加, 诱导培养 5h 后, 菌体生长的比生长速率下降至较低水平, rAPC 表达总量不再增加。所以诱导 rAPC 表达的时间宜控制在 5h 左右。

2.7 不同诱导剂对 rAPC 表达的影响

乳糖诱导时 rAPC 的表达及总的生物量略低于 IPTG 的诱导 (结果未列出), 但乳糖所具备的无毒和价廉的优点, 使得其在 rAPC 的大规模发酵生产中, 仍具有优于 IPTG 的潜在价值和优势。

2.8 基因工程菌 JR₁ 的发酵罐培养

根据以上实验结果, 在摇瓶培养的基础上进

2.4 起始诱导时机的优化

参照文献 (叶姣等, 2001) 中诱导剂的用量, 分别在工程菌生长至 OD₆₀₀ 值为 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 时加入诱导剂, 结果表明, 在菌体生长期的各个阶段加入乳糖均有 rAPC 的表达。当菌体生长至对数生长中期 (OD₆₀₀ 约为 0.8) 时, 加入适当浓度的乳糖, rAPC 的表达最高, 这可能是在对数生长后期, 营养的消耗和生长环境的恶化导致外源基因的表达能力降低。

2.5 诱导剂乳糖浓度的优化

在合适的起始诱导时机, 向培养液中加入乳糖, 使其终浓度为 0、2、4、6、8 和 10g/L。结果发现高浓度的乳糖对菌体生长有一定的抑制作用, 乳糖加入的浓度过高或过低, 均不利于菌体的生长及目的产物 rAPC 的表达 (表 2)。在摇瓶培养中, 6g/L 乳糖浓度诱导较为适宜。

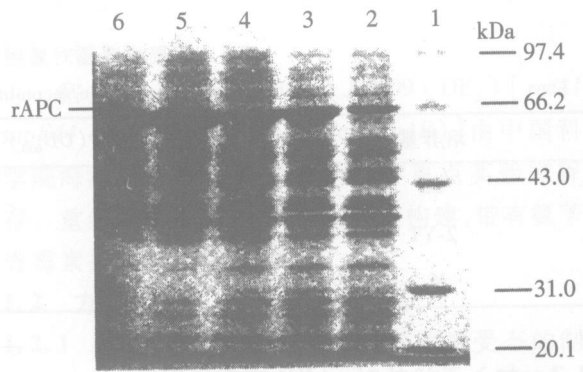


图 3 诱导时间对 rAPC 表达的影响

Fig 3 Effects of induction time on the expression level of rAPC

1. Marker 2、3、4、5 和 6 分别为乳糖诱导 1h、2h、3h、4h 和 5h 后 rAPC 的表达情况

行工程菌 JR₁ 的 5L 全自动发酵罐高密度培养。在高密度发酵过程中, 考虑到乳糖在有葡萄糖存在的情况下不会发挥诱导剂的作用, 作者采用了两种方案, 第一种只是在培养的过程中添加乳糖进行诱导; 第二种在培养的初期添加一定量的碳源 (葡萄糖) 和氮源, 待葡萄糖耗尽后, 即在发酵过程中当搅拌速率下降, 溶氧值上升时, 开始流加乳糖。结果表明, 第二种方案最终的菌体浓度和 rAPC 的表达均好于第一种方案。采用第二种方案, 菌体最终 OD₆₀₀ 达 21.8, rAPC 表达率为 23%, 总生物量约为 0.92g/L 发酵液。

3 讨论

乳糖除作为诱导剂外, 它本身也是一种碳源, 可以被菌体所代谢利用, 它的存在会引起菌体的生理及生长特性发生变化。同时因乳糖只有借助于乳糖透酶的作用才能进入到菌体细胞内, 并经过 β-半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖才能起到诱导剂的作用, 它的转运和诱导也受多种因素的影响, 如分解代谢阻遏、糖类调节的诱导剂排斥等。作者在实验中发现, 如果培养基中存在着葡萄糖, 乳糖就不能起到诱导剂的作用, 这可能是由于基因工程菌在葡萄糖存在时, 总是优先利用葡萄糖而乳糖不能被菌体吸收造成。然而为了使菌体达到较高的密度, 就需要添加适量的葡萄糖, 所以在高密度发酵过程中控制好葡萄糖和乳糖加入的时间非常重要。

参 考 文 献

叶 姣, 陈长华, 杨雅琴等, 2001 乳糖诱导重组人 SOD 基因在大肠杆菌中的表达. 中国医药杂志, 32(12): 536—539
赵方庆, 唐志红, 林 凡等, 2003 表达 rAPC 大肠杆菌的高密度发酵及纯化产物的抑瘤活性. 高技术通讯, 2

29—32
唐书明, 黄 芳, 窦昌贵等, 1999 基因重组别藻蓝蛋白对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用. 药物生物技术, 6(3): 168—171
刘洪艳, 王广策, 侯和胜等, 2004 裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 色素蛋白复合物的分离及光谱特性的初步研究. 海洋与湖沼, 35(3): 284—288
田 超, 张 炎, 王广策等, 2004 鲜羽藻 (*Bryopsis hypnoides*) 核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶的分离与活性测定. 海洋与湖沼, 35(4): 371—374
Bradford M M, 1976 A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248—254
Estrada P, Bescos B P, Villar del Fresno A M, 2001 Antioxidant activity of different fractions of spirulina platensis protein extract. IL FARMACO, 56: 497—500
Glaizer A N, 1994 Phycobiliproteins—a family of valuable widely used fluorophores. J Appl Phycol 6: 105—112
Gambert A K, Kilikian B V, 1998 Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. J Biotechnol 60: 47—54
Gonzalez R, Rodriguez S, Romay C *et al*, 1999 Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. Pharmacol Res 39: 55—59
Reddy C M, Bhat V B, Kiranmai G *et al*, 2000 Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by G-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. Biochem Biophys Res Commun, 277: 599—603
Romay C, Delgado R, Ramirez D *et al*, 2001 Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-α and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. Arzneimittel Forschung 51: 733—736
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*, 1989 Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19—22, 55—56

EXPRESSION OF rAPC (RECOMBINANT ALLOPHYCOCYANIN) IN *ESCHERICHIA COLI* USING LACTOSE AS INDUCER

TANG ZhiHong, GE Bao-Sheng, LIN Fan, REN Yuhong, QIN Song

(Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao,
266071; Marine College, Yantai University, Yantai 264005)

(Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology,
Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;
Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai, 264005)

Abstract Phycobiliprotein is a type of photosynthetic antenna pigment found in cyanobacteria, rhodophytes, cryptophytes and certain dinoflagellates. According to their visible absorption properties, the phycobiliprotein family can be classified into four sub-families: phycoerythrocyanin, phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin. Phycobiliproteins have also been found to have anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-tumor and cell-growth promoting activities. An APC (allophycocyanin) gene from cyanobacterium *Anacystis nidulans* UTEX625 was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli*. Mouse efficacy study showed that rAPC could inhibit tumor remarkably. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) is an effective inducer for lac promoter derived expression systems. However, IPTG is toxic and comparably expensive, which is impracticable in large-scale production of genetically engineered drugs. To discover a low-cost technique for efficient production of rAPC, in this paper, the possibility of using lactose as an inducer to substitute IPTG in the expression of rAPC in *E. coli* JR₁ was investigated. At first, the recombinant pMAL-p2-AP (7.76kb) was transformed into *E. coli* JM109 (DE₃). Western blot analysis revealed that the rAPC could be expressed successfully in the recombinant *E. coli* JR₁. The growth of the recombinant *E. coli* and the expression of rAPC were significantly affected by cultivation media. Shake-flask cultivations in different media (LB, 2-YT, M₉) showed that LB medium is the most appropriate for the production of rAPC with lactose as an inducer. The final cell density OD₆₀₀ reached 4.08 and the expression of rAPC amount to 21.8% of the total protein in LB medium, which was much higher than those in 2-YT and M₉. Mineral salt media is often used to improve growth and the stability of plasmid, therefore, shake-flask optimization experiments were performed with different combinations of mineral salt media. Relatively good growth of the recombinant *E. coli* was achieved by using phosphate (4–8g/L). The feeding strategy of inducer is important in the expression of recombinant protein. Experiments were conducted to find out the optimal conditions for induction time, inducer concentration, and total induction time of the expression of rAPC. The highest expression rate of rAPC was measured in the cultivations induced when OD₆₀₀ was about 0.8 (phase II). The concentration of 2, 4, 6, 8 and 10g/L lactose was selected separately to evaluate advantageous conditions for the induction. The concentration of lactose 6g/L resulted in higher production of rAPC. At 4h after the induction, the highest biomass of rAPC (0.23g/L) was achieved, while the OD₆₀₀ did not increase after 5h induction. Therefore, the time of the expression of rAPC should be controlled at about the 5th h. Finally, the recombinant *E. coli* JR₁ was cultured in a NBS Bifb3000 5L fermentor. The expression of rAPC reached 23%, being similar to that with IPTG, and the OD₆₀₀ reached 20 in high cell density culture. The results suggested that rAPC could be expressed in *E. coli* JM109 (DE₃) with lactose as a substitute inducer. The cultivation method by lactose induction can reduce the cost of the production of rAPC.

Key words Recombinant allophycocyanin (rAPC), Recombinant *Escherichia coli*, Lactose induction