

# 血管生成抑制素基因工程大肠杆菌的高密度发酵研究\*

周 涟 罗进贤\*\* 张添元

(中山大学基因工程教育部重点实验室 生物化学系 广州 510275)

**摘 要** 用 5L 发酵罐研究了 *E. coli* TG1/pBVA2 和 *E. coli* TG1/pBVK13 的高密度培养工艺,确定了诱导及补料策略,在不降低外源基因表达量的前提下,工程菌 TG1/pBVA2 高密度发酵菌体干重为 16.8g/L, hAGN(K1-4) 的表达量为菌体总蛋白的 24.1%,相当于 1.39 g/L;同样的方法,工程菌 TG1/pBVK13 菌体干重可达 16g/L, hAGN(K1-3) 占菌体总蛋白 25.8%,相当于 1.45 g/L。

**关键词** 大肠杆菌 工程菌 血管生成抑制素 高密度发酵

**中图分类号** :Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :1006-6179(2003)02-0228-07

基因工程菌的发酵是基因工业产业化的重要组成部分。它与传统的发酵工艺不同,要想获得大量的外源基因表达产物,需要分析影响外源基因表达的因素,摸索适于工程菌快速生长和外源基因高效表达的发酵工艺。血管生成抑制素(Angiostatin, AGN)是近年发现的分子量为 38 kD 的血管生成抑制因子,相当于血纤溶酶原(Plasminogen, PLG)的 Kringle 1-4 功能区,它能高效抑制新生血管的生成和肿瘤的生长和转移<sup>[1]</sup>。后来发现 PLG 的 Kringle 1-3 比 Kringle 1-4 具有更强的抑制血管形成和肿瘤生长的活性<sup>[2]</sup>,本课题组先后克隆和在大肠杆菌中表达了 K1-4<sup>[3]</sup>及 K1-3 功能区基因<sup>[4]</sup>。本文对分别含 K1-4 及 K1-3 基因的大肠杆菌工程菌 TG1/pBVA2 和 pBVK13 的高密度发酵做了探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$  基因型为 :*sup*E44,  $\Delta$ *lac*, U169, ( $\phi$ 80*lac*Z $\Delta$ M15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1 和 *rel*A1。 *E. coli* TG1 基因型为 :*sup*E 44, F<sup>-</sup>, *thi*-1, *thr*-1, *leu*B6, *lac*Y1, *ton*A21。以上菌株均由本室保存。重组质粒 pBVA2<sup>[3]</sup>和 pBVK13<sup>[4]</sup>由本室构建。

### 1.2 培养基

**1.2.1 种子培养基**(2 $\times$ YT):蛋白胨 16g, 酵母粉 10g, NaCl 5g, 加水定容至 1L。

**1.2.2 发酵培养基** 酵母粉 10g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1.4g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.5g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9g/L, pH7.0。用前加入无菌的 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 至 1g/L, 葡萄糖至 6g/L, Amp 至 100mg/L。

**1.2.3 补料液成分** 葡萄糖 500g/L, 酵母粉 100g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 12.5g/L, 以上成分分开灭菌,使用前再合并。

\* 广州市“225 科技工程”重大项目(99-Z-004-01)资助

\*\* 通讯作者

作者简介 周 涟(1974-)男, 湖南人, 硕士生, 主要从事工程菌发酵工作。E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

收稿日期 2002-05-31, 修回日期 2002-08-08

### 1.3 培养条件

**1.3.1 种子培养** 接种 *E. coli* TG1/pBVA2 单菌落于含  $100\mu\text{g/mL}$  Amp 的  $2\times\text{YT}$  培养液中,  $30^\circ\text{C}$  振荡培养过夜进行活化。按 1% 接种量将活化菌转移至 2 个 500mL 三角瓶中(每瓶盛  $2\times\text{YT}$  200mL, 含 Amp  $100\mu\text{g/mL}$ )  $30^\circ\text{C}$  200r/min 摇床培养 12 h, 作为种子液。

**1.3.2 发酵培养** 发酵罐为 5L, B. Braun Biostat B 型。装液量 4L, 按 10% 接种量接入种子液。发酵参数: 起始设定为 pH7.0, 搅拌转速 600r/min, 通气量 4L/min; 发酵过程中通过调节通气量和搅拌转速来控制溶氧大于 30%。

### 1.4 菌体浓度的测定

以光密度(OD)表示, 发酵液稀释后, 以培养基为对照, 于波长 600nm 测定吸光度。

### 1.5 蛋白含量的测定

总蛋白的测定用 Bradford 方法<sup>[5]</sup>, 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。

### 1.6 细胞干重的测定方法

取 10mL 发酵液, 离心收菌, 菌体于  $105^\circ\text{C}$  烘至恒重, 测其重量, 即为细胞干重。

### 1.7 葡萄糖浓度的测定

采用碘量法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 培养基的筛选

除了采用营养丰富的  $2\times\text{YT}$  培养基为种子培养基外, 重点研究了高密度发酵培养基。在参考了一些有关工程菌发酵的文献<sup>[7~8]</sup>的基础上, 设计了如下发酵培养基。

培养基 A: 每 L 含  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.3g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  4g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2g, Citric acid 1.7g, 微量元素。

培养基 B: 每 L 含有  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.33g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  15g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g, 微量元素。

培养基 C: 每 L 含有 Yeast Extract 10g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.4g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  7g, 微量元素。

培养基 D: 每 L 含有 Yeast Extract 10g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.33g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5.5g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g。

培养基 A1、A2、A3 分别表示在培养基 A 中含葡萄糖的浓度为 20g/L、10g/L、6g/L。B1~3、C1~3、D1~3 照此类推。

上述 12 种培养基接种 TG1/pBVA2 后,  $30^\circ\text{C}$  摇瓶培养, 每 2h 取样测菌体光密度, 连续测 8h, 以  $\ln(OD_{600})$  对培养时间按方程  $\ln(OD_{600}) = \mu \cdot t - c$  作直线回归, 计算比生长速率  $\mu$ , 观察不同的培养基对菌体比生长速率的影响, 如图 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 和 D3, 研究其对 hAGN 表达的影响。接种

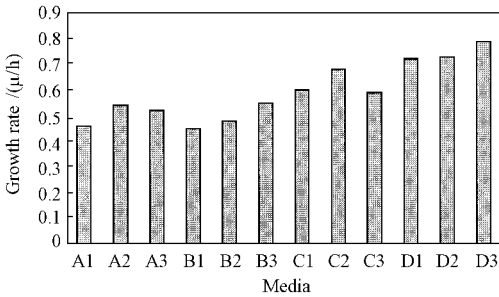


图1 不同培养基对工程菌 TG1/pBVA2 比生长速率的影响

Fig.1 Effect of culture media on the growth rate of *E. coli* TG1/pBVA2

含有 5g/L 的乙酸。接种后 30℃ 培养,每小时取样测菌体光密度  $OD$  值,连续测 4h。计算比生长速率  $\mu$ ,观察不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长的影响。结果如图 2。

按以上组合接种后 30℃ 培养至  $OD_{600}$  接近 0.6 42℃ 诱导 3h,测 hANG (K1—4) 的表达水平,结果如图 3。

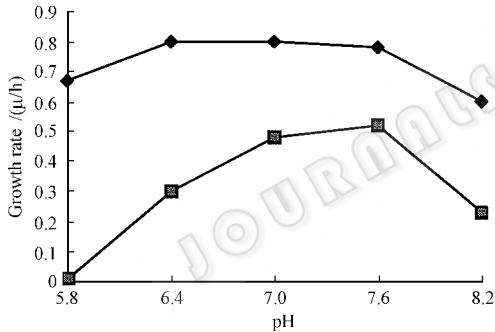


图2 不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长的影响

Fig.2 Effect of acetate on the growth rate of *E. coli* TG1/pBVA2 at various pH  
◆ 0g/L acetic acid ; ■ 5g/L acetic acid.

TG1/pBVA2 后,待  $OD_{600}$  长至 0.6 时,42℃ 诱导 3h,测 hANG 的表达水平,观察不同培养基对 hANG 表达的影响。结果表明,工程菌的表达水平在 3 种培养基中差别不大(图略),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。

2.2 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 组做两个平行试验,其中摇瓶一个不含乙酸,另一个

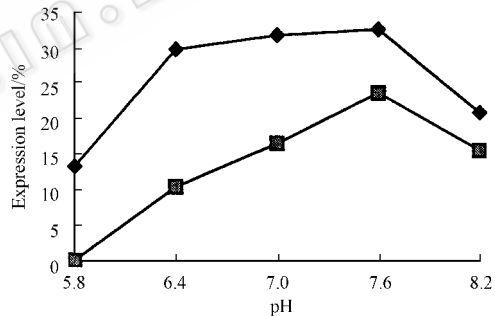


图3 不同 pH 的培养基中乙酸对 hAGN 表达的影响

Fig.3 Effect of acetate on hAGN (K1—4) expression at various pH  
◆ 0g/L acetic acid ; ■ 5g/L acetic acid.

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,无乙酸存在时,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 能降低乙酸对表达的抑制作用。

2.3 补料时机的确定

在分批培养过程中,一般在罐中葡萄糖耗尽后开始补料,这样就可通过控制补料速度来控制菌体的比生长速率。采用 5L 的发酵罐,装料 4L,培养温度 30℃,pH 设定为 7.0,溶氧由在线控制。前 2h 通气量设为 2L/min,之后定为 6L/min。定时取样,观察其  $OD_{600}$  及残

糖的变化。结果如图 4,当糖耗尽后,菌体基本上停止生长,此时溶氧也会突然回升。由于测残糖需要较长时间,我们采取溶氧突然回升 20% 作为补料开始的时间。

2.4 指数补料

在补料培养中,控制补料速度与菌体消耗葡萄糖的速度持平,使培养基中葡萄糖浓度近似为零;补料的体积很小,可以基本忽略补料引起的培养基体积变化,则在生长期菌体的生长和补料速率符合下列关系

$$F \cdot C = (\mu/Y_{X/S} + \mu_{Hac}/Y_{Hac/S}) \cdot X(t) \cdot V \tag{1}$$

$$X(t) = X(t_0) \exp[\mu \cdot (t - t_0)] \tag{2}$$

F:补料流速(L/h);C:补料液浓度(g/L); $\mu$ :设定控制的比生长速率( $h^{-1}$ ); $Y_{X/S}$ :菌体得率系数( $OD_{600} \cdot L/g$ ); $\mu_{Hac}$ :乙酸的比生长速率( $g/OD_{600} \cdot h$ ); $Y_{Hac/S}$ :乙酸得率系数( $g/g$ ); $X(t)$ :t时刻的菌体浓度( $OD_{600}$ );V:发酵液的体积(L); $X(t_0)$ : $t_0$ 时刻的菌体浓度( $OD_{600}$ )  
 $\mu_{Hac}$ 随比生长速率的变化而变化,当没有乙酸积累时 $\mu_{Hac} = 0$ ,此时(1)(2)式可简化为:

$$F = \{\mu \cdot X(t_0) \cdot \exp[\mu \cdot (t - t_0)] \cdot V\} / (C \cdot Y_{X/S}) \tag{3}$$

采用(3)式可确定没有乙酸积累时,控制特定比生长速率所需的补料速度,此时菌体的生长与糖耗成正比。当有乙酸积累时,由于部分葡萄糖转化为乙酸,实际比生长速率小于设定比生长速率。而且随乙酸积累, $\mu_{Hac}$ 也会变化,因而菌体生长不再与补料速度呈正比。由于菌体浓度测定和补料速度的控制都是1~2h完成一次的,因而这里控制的比生长速率是在一定时间间隔内的平均比生长速率。

当发酵罐中葡萄糖耗尽后,按照设定比生长速率为 $0.12h^{-1}$ 进行补料,观察工程菌TG1/pB-VK13的生长,如图5。本文通过控制补料速度来控制菌体的比生长速率,其中 $Y_{X/S}$ 的值为1.1~1.6(根据数批发酵罐中的数据推导得来)。而实际的比生长速率的值为 $0.08h^{-1} \sim 0.25 h^{-1}$ 。

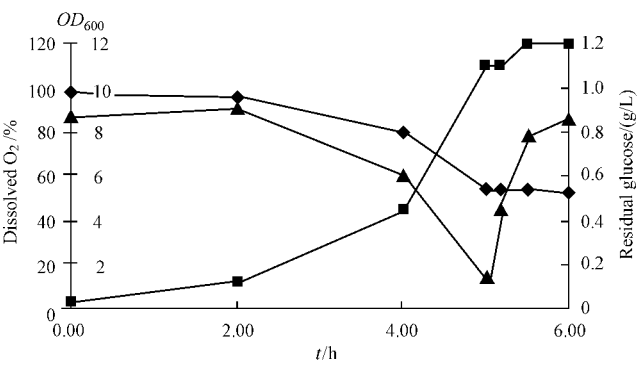


图 4 分批培养中工程菌的生长曲线  
Fig.4 Growth rate of recombinant *E. coli* in batch fermentation  
■ Cell density (  $OD_{600}$  ); ▲ Dissolved oxygen ; ◆ Residual glucose.

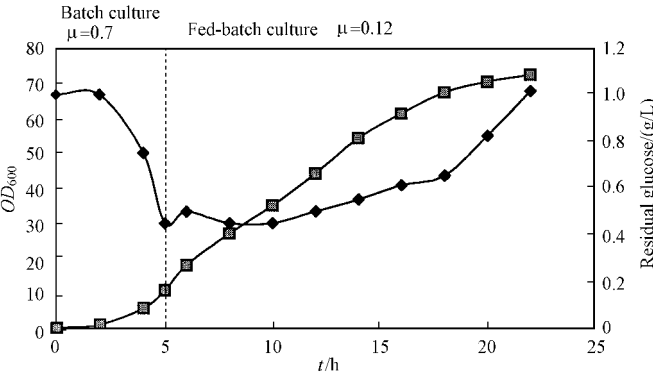


图 5 指数补料时工程菌 TG1/pBVA2 的生长曲线  
Fig.5 Growth rate of recombinant *E. coli* TG1/pBVA2 at exponential feeding  
■ Cell density (  $OD_{600}$  ); ◆ Residual glucose.

2.5 工程菌 TG1/pBVK13 高密度发酵的条件

pBV220 是温度诱导型表达载体 ,当升温至 42℃ 诱导后 ,工程菌在诱导后的第 1h 内保持较高的比生长速率 ,然后逐渐降低 ,在诱导 2h 后 ,菌体的生长基本停止。根据菌体诱导后的生长特性 ,诱导开始时按  $\mu = 0.2\text{h}^{-1}$  进行指数补料控制 ,2h 后按  $2.5\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$  的速度进行恒速补料。

2.5.1 诱导时机对工程菌 TG1/pBVK13 发酵的影响 :分别在工程菌 TG1/pBVK13 对数生长的前期(  $OD_{600} = 0.2 \times 50$  ) 中期(  $OD_{600} = 0.6 \times 50$  ) 后期(  $OD_{600} = 0.5 \times 100$  )开始诱导 , hAGN( K1 - 3 )的表达量见表 2 ,可见从前期开始诱导时 ,4h 后 hAGN 的表达量为总蛋白的 15% ,而从中期开始诱导时 ,hAGN 的表达量仅为总蛋白的 6.9%。从对数生长的后期开始诱导时 ,外源基因没有表达。

表 2 诱导的时期对 hAGN 表达量的影响

Table 2 Effect of induction at various stages of growth on hAGN expression

Induction stage	Induced time/h	hAGN expression level/%	Final biomass/ $OD_{600}$
Early log phase ( $OD_{600} = 0.2 \times 50$ )	4	15	$0.42 \times 50$
Mid log phase ( $OD_{600} = 0.6 \times 50$ )	4	6.9	$0.38 \times 100$
Late log phase ( $OD_{600} = 0.5 \times 100$ )	4	No expression	$0.58 \times 100$

2.5.2 诱导时间及 pH :在工程菌 TG1/pB-VK13 生长的对数中期时开始诱导 ,4h 后 ,调节 pH 至 7.6 ,继续诱导至 10h ,观察 hAGN ( K1 - 3 )表达量的变化 ,如图 6。诱导 4h 后调节 pH 至 7.6 ,有利于 hAGN 的表达 ,调 pH 在 1h 内 hAGN 的表达量从 6.9% 提高至 16.5% ,10h 后 ,表达量达到了 25.1%。

2.6 工程菌 TG1/pBVK13 和 TG1/pBVA2 的高密度发酵

综合以上结果 ,工程菌的发酵方案如下所述 :选取新鲜转化菌种 ,划线保存于  $2 \times \text{YT}$  琼脂平板 ,接种于  $2 \times \text{YT}$  液体培养基中 , $30^\circ\text{C}$  摇床培养过夜作为种子液。发酵罐为 5L 的 B. Braun 型 ,装料 4L。在按 10% 的接种量接种后 , $30^\circ\text{C}$  培养 ,控制 pH 为 7.0 ,溶氧大于 30% ,当发酵罐基质中葡萄糖耗尽后 ,通过指数补料控制菌体的生长 ,控制菌体的比生长速率约为 0.12 ,当菌体稀释 50 倍测  $OD_{600}$  约为 0.6 时 ,开始升温至  $42^\circ\text{C}$  诱

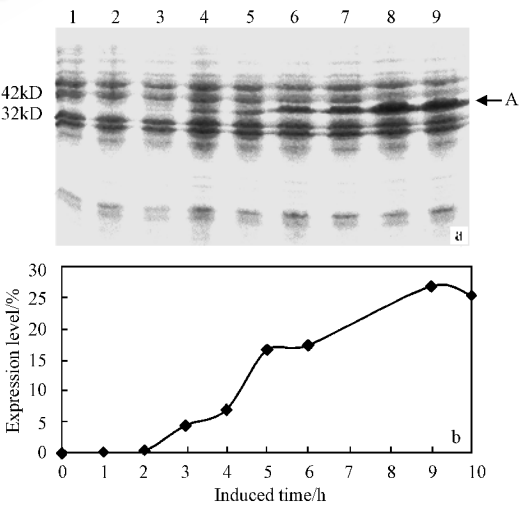


图 6 pH 及诱导时间对工程菌 TG1/pBVK13 表达的影响

Fig.6 Effect of pH and induction time on hAGN expression in TG1/pBVK13.  
1. non - induced ; 2 ~ 9. induced 1h , 2h , 3h , 4h , 5h , 6h , 9h , 10h .  
The pointer A indicates the band of hAGN( k1 - 3 ) expression .  
( a ) SDS - PAGE ( b ) 光密度积分扫描 .

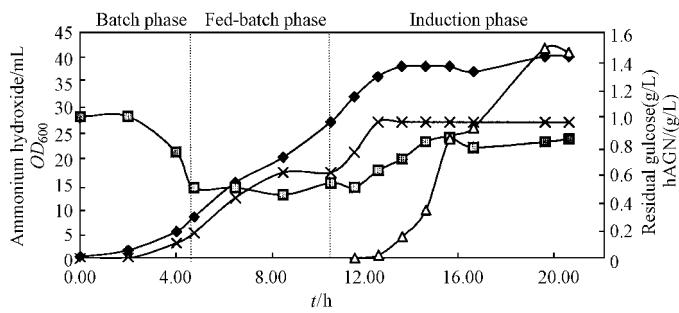


图 7 高密度培养时工程菌 TG1/pBVK13 的生长和表达曲线

Fig.7 Growth and gene expression of *E. coli*

TG1/pBVK13 in high cell density culture

◆. Cell density ; × . Ammonium hydroxide □. Residual glucose △. hAGN.

导,诱导 4h 后,调节 pH 至 7.6 继续诱导至 10h。诱导后定时取样进行 SDS - PAGE 分析。工程菌 TG1/pBVK13 的表达产物电泳结果见图 6,生长和表达曲线如图 7。按以上条件,诱导 10h 后菌体密度达到了  $OD_{600} = 0.4 \times 100$ ,细胞干重为 16g/L,按 1.5 节的方法检测到总蛋白含量为 5.6g/L hAGN 的表达量占总蛋白的 25.8% 相当 1.45g/L。工程菌 TG1/pBVA2 的表达产物电泳结果如图 8。pH7.6 时诱导 7h 的条件下基因表达的水平最高。菌体密度为  $OD_{600} = 0.42 \times 100$ ,测得 hAGN(K1 - 4)占菌体总蛋白的 24.1% 细胞干重为 16.8g/L,菌体总蛋白为 5.8g/L, hAGN(K1 - 4)的表达量相当于 1.39g/L。

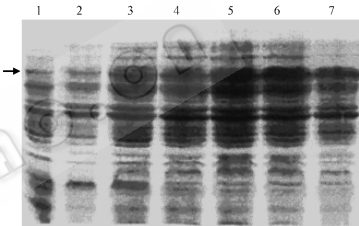


图 8 pH 和诱导时间对工程菌 TG1/pBVA2 表达的影响

Fig.8 Effect of pH and induction time on hAGN(K1 - 4) expression

1. TG1/pBVA2 non-induced ;  
2 ~ 7. TG1/pBVA2 induced 2h , 4h , 5h ,  
7h , 8h , 9h. The pointer indicates  
the band of hAGN(K1 - 4) expression.

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. *Cell* , 1994 , **73** : 315 ~ 328.

[ 2 ] Cao Y , Ji R W , Davidson D , *et al.* Kringle domains of human angiostatin. *J Biol Chem* , 1996 , **271** : 29461 ~ 29467.

[ 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 . 自然科学进展 , 2000 , **10** ( 1 ) : 49 ~ 53.

[ 4 ] 陆幸妍 , 盛节 , 张添元 , 等 . 人纤溶酶原 K1 - 3 区基因在大肠杆菌中的表达 . 中山大学学报 , 2001 , **40** : 63 ~ 65.

[ 5 ] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* , 1976 , **72** : 248 ~ 254.

[ 6 ] Liu J Z , Huang Y Y , Liu J , *et al.* Effects of metal ions on simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Asperillus niger*. *Letters in Applied Microbiology* , 2001 , **32** : 16 ~ 19.

[ 7 ] Korz D J , Rinas U , Helmrich K , *et al.* Simple fed - batch technique for high cell density cultivation of *E. coli* . *Biotechnol* , 1995 , **39** : 59 ~ 65.

[ 8 ] Panda A K , Khan R H , 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 Biotechnol* , 1999 , **75** : 161 ~ 172.

High Cell Density Culture of the Engineered *Escherichia coli*  
Strain Haboring hAGN Gene

Zhou Lian   Luo Jinxian\*   Zhang Tianyuan

( *The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education and*

*Department of Biochemistry , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China )*

**Abstract :** The high cell density cultivation techniques of *E. coli* strains TG1/pBVA2 and TG1/pB-VK13 was studied and the induction and fed-batch conditions were determined. Without decreasing the expression level of foreign genes , the cell density of TG1/pBVA2 reaches  $OD_{600} = 0.42 \times 100$  , the expressed hAGN( K1-4 ) constitutes 24.1% of the total bacterial protein corresponding to 1.39g/L. With the same method , the biomass of TG1/pBVK13 is  $OD_{600} = 0.40 \times 100$  , and hAGN( K1-3 ) was estimated at 25.1% of the total bacterial protein that corresponds to 1.45g/L.

**Key words :** *E. coli* , Engineered strains , Angiostatin , High cell density culture

\* Corresponding author.

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

Li Jilun   Academician

( *College of Biology , Chinese Agricultural University ,Beijing 100094 ,China )*

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

Tan Huarong   Professor

( *Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China )*

Lu Deru   Professor

( *Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shaihai 200433 ,China )*

Wao Aoquan   Professor

( *Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China )*

Qu Yinbo   Professor

( *School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 ,China )*

Xu Jianguo   Professor

( *National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention ,Beijing 102206 , China )*

MEMBERS OF THE BOARD

Fan Yunliu	Tien Po	Zhai Zhonghe	Qian Shijun	Huang Li
Tang Hong	Lu Chengping	Cai Yongfeng	Zheng Tianling	Guo Jun
Chen Yongqing	Zhu Baoquan	Hu Fuquan	Zhuge Jian	Yang Susheng
Cheng Chi	Shao Yiming	Xie Hong	Min Hang	Hu Yuanyang
Dong Xiuzhu	Wang Ping	Sheng Jun		