

基于响应面分析方法的钩端螺旋体三联属特异性蛋白抗原原核表达条件的优化

王江^{1,2**}, 罗冬娇³, 孙爱华^{4**}, 严杰^{1,2*}

(¹ 浙江大学附属第一医院传染病诊治国家重点实验室, 杭州 310009)

(² 浙江大学医学院病原生物学系, 杭州 310058)

(³ 杭州师范大学钱江学院, 杭州 310012)(⁴ 浙江医学高等专科学校, 杭州 310053)

摘要: 脂蛋白 LipL32 和 LipL21 及穿膜蛋白 OMPL1 是问号钩端螺旋体 (简称钩体) 属特异性表面抗原, 可作为通用型钩体基因工程疫苗抗原。【目的】在我们的研究中, 为了获得使得重组人工融合基因 lipL32/1-lipL21-ompL1/2 获得较高的表达水平, 我们优化了重组宿主大肠杆菌的表达条件。【方法】我们采用了基于中心复合设计 (CCD) 的响应面分析方法 (RSM)。影响重组大肠杆菌生长的主要因素包 pH、诱导剂 IPTG 浓度、诱导前培养实践、诱导时间以及诱导温度。响应面分析方法可以从这些因素中找到适合目的蛋白表达的最优表达条件。【结果】我们的结果显示在 pH7.9、0.20 mmol/L IPTG、诱导前培养时间 2.5 h、诱导时间 5.83 h、诱导后温度 31 °C 条件下, 可获得目的重组蛋白 37.78 mg/L 的最大表达量。【结论】实验结果表明采用基于中心复合设计的响应面分析方法能够较大地提高目的产物的产量。利用统计方法不但可以减少试验的次数, 而且还能够从影响蛋白的因素中找出最重要的影响因素, 因此该方法不仅对重组蛋白表达条件的优化有用, 而且是一种很好的筛选方法。

关键词: 问号钩端螺旋体; 原核表达; 响应面分析; 表达条件的优化

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0893-07

接种疫苗是预防问号钩端螺旋体 (简称钩体) 感染引起的钩体病最为有效的措施。现行钩体疫苗为多价全菌死疫苗, 接种后副作用很大。由于钩体血清群、型众多以及抗体交叉保护作用较弱, 故疫苗中未包含的钩体血清群、型可引起钩体病暴发流行。近年国外及我们的研究资料显示, 钩体具有属特异性表面蛋白抗原 (Genus-specific antigens, GPAG)^[1]。采用 GPAG 研制多价重组基因工程疫苗, 极有可能发展出一种免疫效果好、副作用小的新一代钩体疫苗。

重组抗原表达量往往较低, 是目前困扰重组基因工程疫苗研制主要问题之一。较之真核表达系统, 原核表达系统具有易构建、产量高、成本低等优点^[2-4]。

然而, 除基因本身原因外, 重组蛋白原核表达条件也对产量有较大影响^[5]。对重组蛋白表达条件优化的经典方法是单因素分析, 但影响因素较多时该方法受到很大限制^[6]。应用响应面分析相关数理统计方法, 可从有限的预实验数据中了解重组蛋白表达影响因素之间关系, 同时通过建立数学模型对最佳表达条件进行预测, 如此可经较少的实验次数而获得重组蛋白表达条件的优化^[7-9]。本研究中, 我们采用属于响应面分析 (response surface methodology, RSM) 的中心复合设计 (central composite design, CCD)^[10, 11], 建立了预测目的重组蛋白 rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 最佳表达条件的数学模型, 对重组蛋白表达量有重要影

基金项目: 浙江省科技计划国际合作重点项目 (2006C24003)

*通讯作者: Tel: +86-571-88208297; E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

**作者简介: 对本文有同等贡献。王江 (1982-), 男, 甘肃嘉峪关人, 硕士, 主要从事病原微生物分子致病机制及基因工程疫苗研究, E-mail: Med_bp@zju.edu.cn; 孙爱华 (1968-), 女, 浙江省诸暨市人, 硕士, 主要从事医学生物化学和医学分子标记的研究, E-mail: med_bp@zju.edu.cn

收稿日期: 2007-10-30; 修回日期: 2008-03-30

响的诱导剂 IPTG 浓度、诱导温度和时间、培养基 pH 等条件进行了优化和实验考核。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、表达载体和培养基: 表达宿主菌大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 和原核表达载体 pET42a 均购自 Novagen 公司。含 3 种钩体 GPAG 编码基因的人工融合基因 lipL32/1-lipL21-ompL1/2 表达载体由本实验室构建, 3 个基因间的是通过一段重复 3 次的编码柔性肽 GGGGS 的碱基序列连接的。构建好的三联体基因插入到 pPET-42a 载体多克隆位点 *Xho* 和 *Nde* 两个位点之间。然后将构建好的质粒转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中

1.1.2 主要试剂: LB 培养基购自 Oxoid 公司, 其 pH 根据实验需要另行调整, 灭菌后加入 30 $\mu\text{g/ml}$ 过滤除菌的卡那霉素 (Sigma)。IPTG 购自上海衡泽生物技术有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。兔抗钩体黄疸出血群赖型赖株全菌抗血清购自北京中国药品生物制品检定所, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Jackson ImmunoResearch。

1.2 重组大肠杆菌的摇瓶培养

挑取新鲜培养的单个工程菌菌落, 接种于含 30 mL 培养基的 150 mL 摇瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 旋转培养 12 h 以获得菌种液, 然后以 1% (V/V) 接种量接种于含 100 mL 培养基的 250 mL 摇瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 旋转培养, IPTG 诱导浓度、诱导前后培养时间和温度均根据实验需要或其结果设定。

1.3 目的重组蛋白的鉴定和定量分析

将诱导表达后的菌液冰浴 15 min 后摇匀, 10000 \times g 离心 10 min。弃上清, 沉淀用 0.01 mol/L、pH8.0 的 PBS 重悬, 按上法离心。取沉淀溶于 1 \times 上样缓冲液中, 沸水浴 5 min, 然后采用 8% 分离胶进行 SDS-PAGE。电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色及脱色后, BioRad 凝胶图象分析系统 (BioRad Agarose Image Analyser) 及其 Quantityone 软件进行光密度扫描, 以测定目的重组蛋白 rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 的含量。实验中用已知浓度的 BSA 作为蛋白含量测定中的参考标准品。

1.4 目的重组蛋白 CDD 方案的确定

我们在预试验中发现, 诱导前培养时间 (D1)、诱导时间 (D2)、IPTG 浓度 (C)、诱导后温度 (T)

和 pH (H) 是影响目的重组蛋白表达量的主要因素。根据我们预实验结果及文献资料^[12], 获得用于 CDD 中各培养条件变量水平的数据 (表 1)。采用 CDD 软件 SAS v8.0, 获得及应做的 52 次试验, 其中 42 个析因试验、10 个为中心点处重复试验。

表 1 表达条件相关的变量名称、符号和水平 ($\alpha=2.366$)
Table 1 The names, signs and levels of independent variables relative to culture conditions

Independent variable	Signs	Variable levels				
		$-\alpha$	-1	0	1	α
Induction start time/h	D1	0.8	1.6	2.4	3.2	3.6
Post-induction time/h	D2	1.3	4	6	8	10.7
c(IPTG)/(mmol/L)	C	0.08	0.15	0.2	0.25	0.32
Post-induction temperature/h	T	21	26	30	34	39
pH	H	6.5	7.2	7.8	8.4	9.0

1.5 重组蛋白表达条件优化数学模型建立和实验鉴定

根据上述 CDD 方案进行实验所获得的重组蛋白表达实际值和统计分析中的编码值存在着以下关系: $X_i = A_i - A_0 / \Delta A$ (A_i 是 A_i 中心点处真实值, ΔA 是变量的级差), 获得用于建立重组蛋白表达条件优化数学模型的变量编码值 (X_i)。利用存在的以下公式: $Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum \sum b_{ij} x_i x_j$ (Y 响应值, X_i 是变量, b_0 是常数项, b_i 、 b_{ii} 和 b_{ij} 分别是线性、平方和乘积系数)^[12], 获得了本研究所需的目的重组蛋白表达条件优化的数学模型。根据该模型计算获得最佳表达条件的预测值进行目的重组蛋白表达实验, 以评估预测值的准确性。

1.6 重组蛋白表达条件优化数学模型的统计学评价

用 SAS v8.0 软件中方差分析, 可通过改模型的决定系数 R^2 值大小来判断模型的好坏, 较高的 R^2 表示该模型可以解释引起该模型绝大部分变异是由于变量的变化导致的, 可反映该模型的可行性和适用性^[13]。

1.7 Western blot

以 1:1000 稀释的钩体全菌抗血清为一抗, 1:4000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 采用 SDS-PAGE 和 Western blot 对目的表达产物条带进行核实。

2 结果

2.1 基于 CDD 的表达试验

42 个析因试验 (1~42) 和 10 个中心点处重复试

验 (43~52) 的目的重组蛋白 rLlipL32/1-LipL21-OmpL1/2 表达量见表 2。实验中发现, 根据目的重组蛋白表达预实验数据设计的 10 个中心点处重复试验, 较其它试验获得更高的表达产量。

表 2 的重组蛋白 CDD 相关试验及其表达产量
Table 2 The tests based on CDD and the output of the target recombinant protein

Run	H	D1	D2	C	T	Output/(mg/L)
1	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	16.37
2	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	21.31
3	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	19.29
4	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	22.16
5	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	18.80
6	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	21.86
7	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	24.14
8	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	20.58
9	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	23.84
10	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	22.45
11	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	26.52
12	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	25.91
13	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	19.89
14	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	18.54
15	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	21.84
16	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	22.66
17	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	21.63
18	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	24.56
19	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	22.03
20	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	24.02
21	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	23.76
22	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	22.80
23	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	18.79
24	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	24.78
25	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	28.83
26	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	30.61
27	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	23.19
28	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	28.61
29	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	22.40
30	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	22.17
31	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	22.56
32	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	27.72
33	-2.366	0.000	0.000	0.000	0.000	15.39
34	2.366	0.000	0.000	0.000	0.000	18.52
35	0.000	-2.366	0.000	0.000	0.000	22.54
36	0.000	2.366	0.000	0.000	0.000	26.62
37	0.000	0.000	-2.366	0.000	0.000	20.42
38	0.000	0.000	2.366	0.000	0.000	17.95
39	0.000	0.000	0.000	-2.366	0.000	20.23
40	0.000	0.000	0.000	2.366	0.000	22.98
41	0.000	0.000	0.000	0.000	-2.366	21.72
42	0.000	0.000	0.000	0.000	2.366	26.42
43	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	33.20
44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	37.26
45	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	34.59
46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	38.18
47	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	36.07
48	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	41.43
49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	34.95
50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	34.09
51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	35.66
52	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	38.61

2.2 影响目的重组蛋白表达主要因素

根据 CDD 相关 52 个表达试验 (43~52) 结果经计算得到各种因素的回归系数 (表 3)。其中单一 H、D1 或 T 对表达产量的影响非常显著 ($P < 0.01$)、D2

较为显著 ($P < 0.05$), 单一 C 无显著影响 ($P > 0.05$)。然而, 采用不同 D1 和 D2 值时对表达产量有显著影响 ($P = 0.0036$), 提示诱导前后时间之间存在交互作用。

表 3 基于 CDD 相关表达试验的各因素回归系数和统计学分析结果

Table 3 Results of the regression coefficients of factors and their statistical analysis based on the CDD-associated expression tests

Source	DF	SS	MS	t	Pr> t	Estimate	Std Err
H	1	57.219	57.219	3.707	0.0008	1.1509325	0.31046
D1	1	59.094	59.094	3.767	0.0007	1.169631	0.31046
D2	1	26.564	26.564	-2.526	0.0168	-0.784195	0.31046
C	1	10.698	10.698	1.603	0.1191	0.4976513	0.31046
T	1	33.377	33.377	2.831	0.0081	0.879023	0.31046
H×H	1	691.128	691.128	-12.884	0.0001	-3.466545	0.31046
H×D1	1	1.349	1.349	0.569	0.5733	0.2053125	0.269057
H×D2	1	2.514	2.514	-0.777	0.4430	-0.280312	0.360705
H×C	1	19.704	19.704	-2.175	0.3734	-0.784688	0.360705
H×T	1	9.364	9.364	1.500	0.1438	0.5409375	0.360705
D1×D1	1	254.706	254.706	-0.7822	0.0001	-2.010444	0.360705
D1×D2	1	41.246	41.246	-3.147	0.0036	-1.135313	0.269057
D1×C	1	0.970	0.970	0.483	0.6328	0.1740625	0.360705
D1×T	1	1.829	1.829	-0.663	0.5124	-0.239062	0.360705
D2×D2	1	541.4129	541.4129	-11.404	0.0001	-3.068185	0.269057
D2×C	1	3.585	3.585	0.928	0.3606	0.3346875	0.360705
D2×T	1	2.527	2.527	-0.779	0.4420	-0.280937	0.360705
C×C	1	399.593	399.593	-9.797	0.0001	-2.635884	0.269057
C×T	1	2.709	2.709	0.807	0.4261	0.2909375	0.360705
W×W	1	277.236	277.236	-8.160	0.0001	-2.195545	0.269057
Model	20	1926.533	96.327	25.768	0.0001		
Error	31	129.067	4.163				
Total	51	2055.601					

2.3 表达条件优化数学模型及其与 CDD 表达实验结果比较

根据上述获得的回归系数，目的重组蛋白 rLlipL32/1-LipL21-OmpL1/2 表达条件优化数学模型（公式 1），该模型 R^2 值高达 87.83%，该模型对 CCD 相关 52 个表达试验的预测值与实际表达值十分接近，显示该模型能够解释绝大部分目的蛋白产量变异。该模型预测值与 CDD 设计的 52 个试验所获得的实际表达值十分接近（表 4），预测值和实际值之间的吻合度也较高（图 1）。从图中可以看出表示数学模型预测得到的结果的点与实际实验结果很接近，表明该数学模型能很好的解释和预测我们目的蛋白在 pH、诱导前培养时间、诱导时间、IPTG 含量和诱导温度这些条件变化时对蛋白产量的影响。

$$Y (\text{expression predict values}) = 36.4099 + 1.1509325 \times H + 1.169631 \times D1 - 0.784195 \times D2 + 0.4976513 \times C + 0.879023 \times T - 3.466545 \times H \times H + 0.2053125 \times H \times D1 - 0.280312 \times H \times D2 - 0.784688 \times H \times C + 0.5409375 \times H \times T - 2.010444 \times D1 \times D1 - 1.135313 \times D1 \times D2 + 0.1740625 \times D1 \times C - 0.239062 \times D1 \times T - 3.068185 \times D2 \times D2 + 0.3346875 \times D2 \times C - 0.280937 \times D2 \times T - 2.635884 \times C \times C + 0.2909375 \times C \times T - 2.195545 \times T \times T \quad (1)$$

表 4 基于 CDD 设计的重组目的蛋白的实验值与预测值

Table 4 The tests based on CDD and the output of the target recombinant protein

Run	Output / (mg/L)	Predict / (mg/L)	Run	Output / (mg/L)	Predict / (mg/L)
1	16.37	18.95	27	23.19	25.56
2	21.31	20.08	28	28.61	29.06
3	19.29	19.91	29	22.40	22.53
4	22.16	22.21	30	22.17	23.75
5	18.80	20.10	31	22.56	22.39
6	21.86	20.11	32	27.72	22.77
7	24.14	22.41	33	15.39	14.28
8	20.58	23.58	34	18.52	19.73
9	23.84	23.28	35	22.54	22.39
10	22.45	23.45	36	26.62	27.92
11	26.52	24.93	37	20.42	17.39
12	25.91	26.28	38	17.95	20.48
13	19.89	19.89	39	20.23	22.83
14	18.54	18.94	40	22.98	22.04
15	21.84	22.89	41	21.72	26.2
16	22.66	23.11	42	26.42	36.41
17	21.63	21.89	43	33.20	36.41
18	24.56	25.18	44	37.26	36.41
19	22.03	19.71	45	34.59	36.41
20	24.02	24.17	46	38.18	36.41
21	23.76	21.92	47	36.07	36.41
22	22.80	24.09	48	41.43	36.41
23	18.79	21.08	49	34.95	36.41
24	24.78	24.42	50	34.09	36.41
25	28.83	27.04	51	35.66	36.41
26	30.61	29.38	52	38.61	36.41

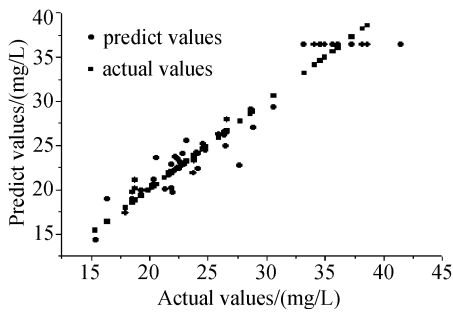


图 1 预测值和实际值的吻合度
Fig. 1 Fit degree between the predict and actual values. The linear correlation between the predict and actual values.

2.4 表达条件优化数学模型预测值及其表达实验结果
响应面分析结果显示, pH7.9、诱导前培养时间为 2.5 h、诱导时间为 5.83 h、IPTG 浓度为 0.20 mmol/L、诱导后温度为 31 时,最大的目的重组蛋白表达量预测值可达 36.91 mg/L (图 2)。图 2 是响应面图,从中可以看出,目的蛋白产量的最高点均在我们实验设计的中心点附近,在图中,为了观察五个因素对蛋白产量的影响,我们分别将其中的 3 个因素的值设定在最优的水平时观察其余两个因素变化对目的蛋白产量的影响,在曲面图的最高点也就是最大的蛋白产量,该点对应的各因素的值就是最优的蛋白表达条件。

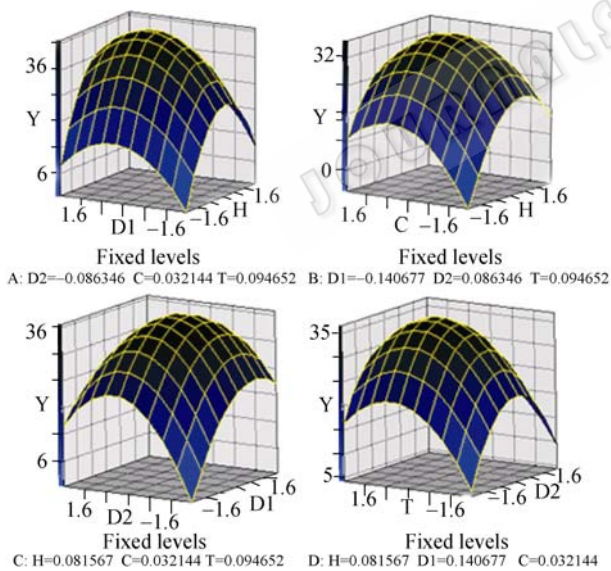


图 2 E. coli DE3 表达的融合蛋白浓度的响应面图
Fig. 2 Response surface plot of fusion protein concentration by E. coli DE3. A: pH(H) vs. induction start time(D2) with constant levels of post-induction time (D2), IPTG concentrations(C) and post-induction temperature(T); B: IPTG concentrations vs pH with constant levels of induction start time, post-induction time and post-induction temperature; C: induction start time vs post-induction time with constant levels of IPTG concentrations, pH and post-induction temperature; D: post-induction time vs post-induction temperature with constant levels of IPTG concentrations, pH and induction start time.

表达实验结果证实,在上述最佳条件下,能获得最大的蛋白产量,通过实际实验验证发现该条件下我们获得的蛋白产量为 37.78 mg/L。Western 结果证实目的表达产物可与钩体全菌抗血清发生结合反应(图 3)。有目的蛋白泳道的 Western 结果显示有特异性的印记,阴性对照没有条带出现也表明该重组蛋白在未诱导条件下表达量很低或不表达。

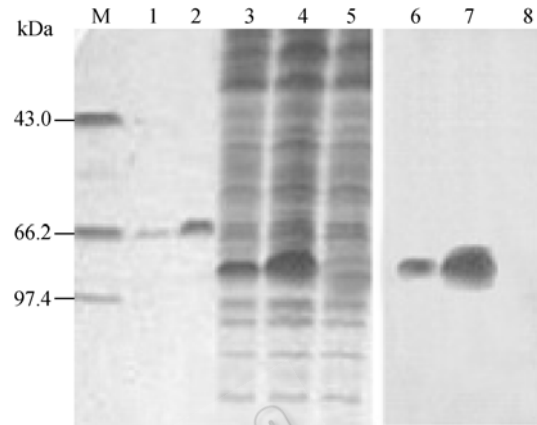


图 3 表达条件优化前后目的重组蛋白产量变化
Fig. 3 Changes of the target recombinant outputs before and after the optimization of expression conditions. M. marker; 1 and 2. the 0.1 and 0.5 μ g BSA, respectively; 3 and 4. the lower expression level before the optimization and the higher expression level after the optimization, respectively; 5. the non-induced control; 6 and 7. the Western Blot results of the lower and higher expressed recombinant proteins, respectively; 8: the negative control for Western blot assay.

3 讨论

脂蛋白 LipL32 和 LipL21 及穿膜蛋白 OMPL1 是问号钩端螺旋体(简称钩体)属特异性表面蛋白抗原[国外 LipL32, OMPL1, LipL21 文献],因而可作为通用型钩体基因工程疫苗抗原。钩体血清群、型众多,强毒力的黄疸出血群赖型在我国流行最广(75%~80%),其次是弱毒力的流感伤寒群、秋季群、秋季型、澳洲群、澳洲型、波摩那群、波摩那型等^[14]。我们以往的研究结果证实, lipL21 无基因型差别,流感伤寒群型、秋季群、秋季型含 ompL1/1 基因型,上述其它钩体血清群、型含 ompL1/2 基因型,所有上述钩体血清群、型均含 lipL32/1 基因型^[15~17]。因此,我们选择 lipL21、lipL32/1 和 ompL1/2 基因及其表达产物作为基因工程疫苗抗原,有实验依据。为了减少表达次数以降低成本,同时还能采用多抗原以提高免疫效果,我们构建了 lipL32/1-lipL21-ompL1/2 人工融合基因。为了使目的重组表达产物 rLipL32/1-LipL21-

OmpL1/2 有较好的空间构型,我们在各基因之间加入了柔性肽序列。

无论是原核或真核表达,常遇到产量较低的情况,显然不利于相关产品开发及实际应用。重组蛋白原核表达条件往往对产量有较大影响^[18]。根据文献资料及我们的预实验结果,影响目的重组产物表达量的主要因素是诱导剂 IPTG 浓度、诱导前培养时间和诱导后时间、诱导后温度和 pH。为了高效率地实现上述 rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 表达条件优化,我们采用了新近发展起来的 RSM 中 CCD 法。

根据 CDD 设置的表达试验结果表明,在上述 5 个影响因素中,pH、诱导前培养时间或诱导后温度可明显影响 rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 表达产量 ($P < 0.01$),单一 IPTG 浓度却无明显影响 ($P > 0.05$),这显然与传统实验中往往通过加大 IPTG 浓度以获得高表达有所不同。同时我们还发现,诱导前和诱导时间之间可能存在交互作用,这难以被传统的单素分析试验所发现。

本研究中,我们建立的重组蛋白 rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 表达条件优化数学模型有较高的预测准确性和适用性,表现为代表匹配程度的较高 R^2 值以及预测值和实际值之间高吻合度。通过响应面分析,我们发现 pH7.9、诱导前时间为 2.5 h、诱导后时间为 5.83 h、IPTG 浓度为 0.20 mmol/L、诱导后温度为 31 时,最大的重组蛋白表达量预测值可达 36.91 mg/L,而在此条件下实际目的重组蛋白表达量为 37.78 mg/L,约是未优化前表达产量 2.7 倍。Western blot 结果显示,钩体全均抗血清能识别目的表达产物并为之发生免疫结合反应,提示我们表达的 rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 有良好的免疫反应性,同时也对 SDS-PAGE 中的目的条带进行的鉴定。

综上所述,基于 RSM 的 CCD 法可简便、高效地对目的重组蛋白表达条件进行优化,达到了明显提高表达产量的作用,同时也可为目的重组蛋白中试发酵时获得高产量提供重要的参考依据。

参 考 文 献

- [1] Faine S, Adler B, Bolin C. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd edition, Melbourne: MedSci, 1999.
- [2] Ko YF, Bentley WE, Weigand WA. The effect of cellular energetics on foreign protein production. *Appl Biochem Biotechnol*,

- 1995, 50(2): 145-159.
- [3] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(2): 98-105.
- [4] Li R, Zhang HX, heng Qi QS. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 2007, 98(12): 2313-2320.
- [5] Wen-Li Y, Li-Sheng P, Xiao-Fen Z, et al. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. *Toxicon*, 2003, 41(6): 713-721.
- [6] Saudagar PS, Singhal RS. A statistical approach using L (25) orthogonal array method to study fermentative production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* MTCC 1142. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 136 (3): 345-359.
- [7] Wang X, Wang XW, Yin MX, et al. Production of uridine 5'-monophosphate by *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 using a statistically improved biocatalytic process. *Appl Microbiol Blot*, 2007, 76(2): 321-328.
- [8] Ma X, Zheng W, Wang T, et al. Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and GM1 binding ability of purified rHLT-B. *J Microbiol*, 2006, 44(3): 293-300.
- [9] de Faveri D, Torre P, Aliakbarian B, et al. Response surface modeling of vanillin production by *Escherichia coli* JM109pBB1. *Biochem Eng J*, 2007, 36(3): 268-275.
- [10] Balaraman K, Mathew N. Optimization of media composition for the production of cyclosporin A by *Tolypocladium* species. *Indian J Med Res*, 2006, 123(4): 525-530.
- [11] Wu QL, Chen T, Gan Y, et al. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(4): 783-794.
- [12] Aravindan R, Viruthagiri T. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. *Can J Microbiol*, 2007, 53(5): 643-55.
- [13] Wang YH, Jing a CF, Yang B, et al. Production of a new sea anemone neurotoxin by recombinant *Escherichia coli*: Optimization of culture conditions using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2721-2728.
- [14] 严杰, 戴保民, 于恩庶. 钩端螺旋体病学, 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2006, 155-187.
- [15] 范兴丽, 严杰, 毛亚飞, 等. 中国主要问号钩端螺旋体血清群 LipL32 基因型分析和表达系统构建及其重组蛋白的免疫学鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志(Chinese Journal of Microbiology and Immunology)*, 2004, 24 (2): 92-97.
- [16] 丁威, 严杰, 毛亚飞, 等. 中国主要问号钩端螺旋体血清群外膜蛋白 OMPL1 基因型原核表达系统构建表达及免疫性鉴定.

中华微生物学和免疫学杂志(*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2004, 24 (6): 439–444.

免疫学杂志(*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2006, 26(11): 979–984.

[17] 罗冬娇, 胡野, 孙百莉, 等. 我国主要问号钩端螺旋体血清群 lipL21 基因序列及其产物免疫反应性分析. 中华微生物学和

[18] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51(4): 422–430.

Optimization of prokaryotic expression conditions of *Leptospira interrogans* trigeminy genus-specific protein antigen based on surface response analysis

Jiang Wang^{1, 2**}, Dongjiao Luo³, Aihua Sun^{4**}, Jie Yan^{1, 2*}

⁽¹⁾National Key Laboratory of Infectious Disease Diagnosis and Therapy, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

⁽²⁾Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

⁽³⁾Qianjiang College, Hanzhou Normal University, Hangzhou 310012, China)

⁽⁴⁾Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Lipoproteins LipL32 and LipL21 and transmembrane protein OMPL1 have been confirmed as the superficial genus-specific antigens of *Leptospira interrogans*, which can be used as antigens for developing a universal genetic engineering vaccine. **[Objective]** In order to obtain high expression of an artificial fusion gene lipL32/1-lipL21-ompL1/2, we optimized prokaryotic expression conditions. **[Methods]** We used surface response analysis based on the central composite design to optimize culture conditions of a new antigen protein by recombinant *Escherichia coli* DE3. The culture conditions included initial pH, induction start time, post-induction time, Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration, and temperature. **[Results]** The maximal production of antigen protein was 37.78mg/l. The optimal culture conditions for high recombinant fusion protein was determined: initial pH 7.9, induction start time 2.5 h, a post-induction time of 5.38 h, 0.20 mM IPTG, and a post-induction temperature of 31 °C. **[Conclusion]** Surface response analysis based on CCD increased the target production. This statistical method reduced the number of experiments required for optimization and enabled rapid identification and integration of the key culture condition parameters for optimizing recombinant protein expression.

Keywords: *Leptospira interrogans*; prokaryotic expression; surface response analysis; expression condition optimization

Supported by the Key International Cooperation Program of Science and Technique Plan of Zhejiang Province of China (2006C24003)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88208297; E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

**These authors contributed equally to this work.

Received: 30 October 2007/ Revised: 31 March 2008

《微生物学报》投稿方式

2007年12月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登录本刊网站【<http://journals.im.ac.cn>】进入《微生物学报》,点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先“注册”,注册成功后再进行投稿。如果您曾在本刊使用过网上投稿的,则可使用原来的“用户名”和“口令”直接投稿。如果忘了用户名和口令,请联系本刊编辑部,可以找回。
- (2) 邮寄纸样:在接到编辑发出的“稿件受理通知”的E-mail后,请作者邮寄1份纸稿、介绍信。
- (3) 稿件受理费:对于本刊受理的稿件,需交纳100元受理费,请通过邮局汇款,切忌随信邮寄!【注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号(如果有)”】。