

鲨肝刺激物质类似物在大肠杆菌中的高密度发酵

叶波平, 潘征, 李怀标, 王颖, 郑珩, 吴梧桐

中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

摘要: 为建立重组鲨肝刺激物质类似物(r-sHSA)的高密度发酵方法, 本研究在利用单因素实验和均匀设计实验优化摇瓶发酵培养基的组成和浓度以及诱导剂(IPTG)浓度的基础上, 利用 5 L 发酵罐进行了放大试验, 探讨了补料方式、补料培养基的组成和浓度、诱导剂加入时间和诱导后菌体的收获时间对工程菌生物量和 r-sHSA 产量的影响。结果表明: 在改良 LB 培养基(0.97% 甘油, 0.91% 酵母粉, 0.72% 胰蛋白胨, 0.782% KH_2PO_4 , 0.267% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.062% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% NaCl, pH 7.0)中, 当 pH 控制在 7.0、溶氧浓度为 25%~30%的前提下, 采用指数补料方式加入优化后的补料培养基(620 g/L 甘油, 94.8 g/L 胰蛋白胨, 3.3 mL/L 微量元素, 7.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)进行培养, 在工程菌的 OD_{600} 达到 23 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后收获菌体, 菌体的生物量可达(123.27±1.184) g/L, r-sHSA 产量为(2.662±0.041) g/L, 比优化前提高了 13.7 倍。

关键词: 重组鲨肝刺激物质类似物, 高密度发酵, 均匀设计, 生物量, 表达量

High cell-density fermentation of shark hepatic stimulator analogue in *Escherichia coli*

Boping Ye, Zheng Pan, Huaibiao Li, Ying Wang, Heng Zheng, and Wutong Wu

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: The potential effects of recombinant shark hepatic stimulator analogue (r-sHSA) in liver disease have been revealed in our previous studies. In order to further evaluate its clinic application, we carried out high cell-density fermentation in 5 L fermentor to get enough products. Based on the trials in shaking flask, we optimized the parameters for 5 L fermentor, including medium composition, medium supplement, inducer concentration and induction time, etc. In detail, the improved LB medium (0.97% glycerol, 0.91% yeast extract, 0.72% tryptone, 0.782% KH_2PO_4 , 0.267% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.062% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% NaCl, pH 7.0) is chosen to cultivate the engineering bacteria with the constant fermentation condition (pH 7.0, and the dissolved oxygen concentration is about 25%–30%). When bacterial culture reaches exponential phase, the modified feeding medium (620 g/L glycerol, 94.8 g/L tryptone, 3.3 mL/L trace elements, and 7.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) is then supplied through the method of exponential fed-batch mode. After the optical density (OD_{600}) of engineering bacterial culture reaches to 23, the ultimately concentration of 0.5 mmol/L IPTG is added to induce the expression of r-sHSA for 6 h. Results show that the amount of r-sHSA production is (2.662±0.041) g/L, which is about 13.7 folds of the one optimized before.

Received: May 8, 2009; **Accepted:** June 16, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA091402), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-05-0496), National Natural Science Foundation of China (No. 30801454).

Corresponding author: Boping Ye. Tel: +86-25-83271016; Fax: +86-25-83271249; E-mail: yebp2001@yahoo.com.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA091402), 新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-05-0496), 国家自然科学基金项目(No. 30801454)资助。

Keywords: recombinant shark hepatic stimulator analogue(r-sHSA), high cell density fermentation, uniform design, biomass, expression level

重组鲨肝刺激物类似物(Recombinant shark hepatic stimulator analogue, r-sHSA)是本实验室从条纹斑竹鲨鱼(*Citharus cyllium plagiosum*)肝脏中克隆到的一个功能基因片段^[1]的原核表达产物,低浓度 r-sHSA 具有刺激肝癌细胞株增殖的活性^[2],对 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠具有明显的降酶保肝作用^[3],并可通过抑制转化生长因子(TGF- β 1)的表达以及降低肝组织中细胞外基质(ECM)的蓄积起到明显的降酶保肝作用,具有开发成抗肝纤维化药物的潜力,目前已申请国家发明专利(专利公开号:CN101041066),正在开展将其开发成抗肝纤维化药物的临床前研究工作。

建立稳定的 r-sHSA 发酵工艺,制备合格的原料药中试产品是开展将 r-sHSA 开发成抗肝纤维化药物临床前研究工作的前提。基于均匀设计法的“均匀分散,整齐可比”优点以及在多因素多水平实验条件优化方面的高效率特点^[4],本研究考查了培养基组成、诱导剂的浓度以及补料方式和补料培养基的成分等对 r-sHSA 工程菌发酵以及重组产物产量的影响,建立了稳定的发酵工艺,为后续对 r-sHSA 的开发奠定了一个良好的工作基础,并为原核表达的基因工程类产品的生产和制备提供了有益的参照。

1 材料与方法

1.1 工程菌、培养基、试剂及主要仪器

基因工程菌 *E. coli* BL21/pET28a-sHSA 由本实验室构建,甘油管中 -70°C 保存。

Luria-Bertani(LB)培养基(W/V): 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl (pH 7.0)。分批发酵培养基(W/V): 0.97% 甘油, 0.91% 酵母粉, 0.72% 胰蛋白胨, 0.782% KH_2PO_4 , 0.267% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.062% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% NaCl(pH 7.0)。初始补料培养基(W/V): 15.7% 甘油, 10% 胰蛋白胨, 0.75% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。微量元素母液: 0.91 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.5 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.91 g/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1 g/L H_3BO_3 , 0.91 g/L $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.2 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14.5 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.8 g/L CaCl_2 。

胰蛋白胨和酵母提取物为 Oxoid 公司产品;丙

烯酰胺、双叉丙烯酰胺为 BBI 公司产品;卡那霉素(Kan)和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)为 Amresco 公司产品;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,其余试剂均为国产分析纯。

L-1523 型自动发酵罐(5 L)购自瑞士比欧公司。

1.2 种子培养

将在 -70°C 、15%甘油中保存的工程菌株接种于 LB 平板上, 37°C 培养 12 h。在平板上挑取单菌落,接种到 LB 斜面,于 37°C 再活化 12 h。从斜面中挑取单菌落,接种到 20 mL LB 液体培养基中(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37°C 、200 r/min 摇床中培养 12 h,使菌体 OD_{600} 达到 3.2~3.5 之间,作为一级种子液。将一级种子液以 0.5%(750 μL)接种到装有 150 mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)的 500 mL 三角瓶中,在 37°C 、200 r/min 条件下培养 10 h,当其 OD_{600} 达到 3.8~4.1 之间时作为二级种子液。

1.3 摇瓶发酵初始条件

将一级种子液以 2%(V/V)接种到装有 50 mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)的 250 mL 三角瓶中。在 37°C 、200 r/min 条件下培养至菌体 OD_{600} 为 1.0 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后收集菌体,测定 r-sHSA 表达量和菌体湿重。

1.4 外加碳源的优化

在 LB 液体培养基中分别加入 0.4%的葡萄糖、甘油或蔗糖,按 1.3 的方法分析诱导后重组蛋白表达量和测定菌体湿重,实验重复 6 次,用软件数据处理系统(DPS7.05)的多元方差分析处理结果。

1.5 外加无机氮源的优化

在 LB 液体培养基中分别加入 0.2%的硫酸铵或硝酸钾,按 1.3 的方法分析诱导后重组蛋白表达量和测定菌体湿重,实验重复 6 次,用软件数据处理系统(DPS7.05)的多元方差分析处理结果。

1.6 无机盐的均匀设计

在 LB 液体培养基中添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 和 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 这 3 种无机盐,使用 DPS7.05 对这 3 种无机盐和 LB 中原有的 NaCl 设计 4 因素 3 水平的混合水平的均匀试验 $U_9(3^4)$,因素水平见表 1。按

1.3 的方法分析诱导后菌体湿重和重组蛋白表达量, 实验重复 3 次。用 DPS(7.05)分析结果, 建立回归方程, 求得优化条件。

1.7 碳/氮比的均匀设计

在确定无机盐的组成和浓度基础上, 使用 DPS7.05 对优化培养基中的蛋白胨、酵母提取物和甘油设计 3 因素 3 水平的混合水平的均匀试验 $U_6(3^3)$, 因素水平见表 2。按 1.3 的方法分析诱导后菌体湿重和重组蛋白表达量, 实验重复 3 次。用 DPS(7.05)建立回归方程, 求得优化条件。

表 1 无机盐优化的水平和因素

Table 1 Factors and levels of experiment for inorganic salts

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
X_1 (NaCl, g/L)	5	10	15
X_2 (MgSO ₄ ·7H ₂ O, g/L)	0.25	0.5	1
X_3 (KH ₂ PO ₄ , g/L)	2	4	8
X_4 (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O, g/L)	2	4	8

表 2 碳/氮比优化的水平和因素

Table 2 Factors and levels of experiment for carbon-nitrogen ratio

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
Z_1 (Glycerol, g/L)	5	10	20
Z_2 (Yeast extract, g/L)	2.5	5	10
Z_3 (Tryptone, g/L)	5	10	20

1.8 IPTG 浓度的确定

在确定培养基的组成后, 按 1.3 的方法培养工程菌至菌体 OD_{600} 达到 1.0 时, 分别加入 0.25、0.5、0.75、1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h, 测定菌体 r-sHSA 表达量。

1.9 高密度发酵条件优化

将优化后的培养基在 5 L 发酵罐中进行放大实验。发酵总体积为 3.5 L, 将 1.2 中的二级种子液以 5%接种量接入发酵罐中(含 50 mg/L 卡那霉素)。发酵过程中用 25%(V/V)氨水和 40%(V/V)磷酸维持发酵液的 pH 在 7.0 左右; 调节通气量和转速, 使溶氧保持在 25%~30%。每小时取样测定菌体密度。当 OD_{600} 达到最大 OD 值的 1/3 处时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导, 直至菌体 OD 值不再增加或补料结束为止, 测定菌体湿重和重组蛋白浓度。

1.9.1 补料方式的选择

发酵 3 h 40 min 后开始补料, 补料体积为 500 mL,

补料量以甘油浓度来计算, 分别以恒速和指数补料流加。恒速补料速度为 4.5 mL/min; 指数补料速度根据公式^[5]: $F=(uX_0V_0/YS_F)e^{ut}$ 控制流加速度, 其中: F 为培养基流速; u 为比生长速率, 控制在 0.3 左右; V_0 为补料时发酵液体积, 本研究中设置为 3 L; Y 为菌体对底物的得率系数, 为 0.43^[6]; X_0 为补料开始时菌体浓度, 设置为 4 g; S_F 为甘油浓度(g/L); t 为补料时间(h)。根据甘油的浓度计算每小时的流量。

1.9.2 补料培养基的优化

先对补料液中的碳源、氮源和微量元素的浓度进行单因素优化, 再设计 3 因素 3 水平的混合水平的均匀实验 $U_6(3^3)$, 以确定补料培养基的成分和浓度。在本研究中, 当菌体 OD_{600} 达到 16 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后, 测定菌体的生物量和 r-sHSA 的表达量。

1.9.3 IPTG 诱导条件的优化

当菌体 OD_{600} 达到 23、28 和 35 时分别加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 直至补料结束。在 IPTG 加入后, 每隔 1 h 时取样 1 次至补料结束, 测定菌体 OD_{600} 和重组蛋白浓度。

1.10 菌体生物量和重组产物的产量计算

菌体密度 OD_{600} 测定: 取 1 mL 发酵液, 稀释至适当倍数, 于 600 nm 波长处测定吸光值。

菌体湿重测定: 菌液以 6000 r/min 离心 10 min 后, 收集沉淀, 晾干后称重。

r-sHSA 表达量的测定: 表达产物的 SDS-PAGE (12%)电泳检测参照文献[7], 用 Bio-Rad 凝胶成像仪扫描成像分析结果。

r-sHSA 产量测定: $r\text{-sHSA 产量(g/L)} = \text{总蛋白浓度} \times \text{表达量} \times \text{每升菌体湿重} \times \text{菌体稀释倍数}$ 。总蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法, 按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 摇瓶发酵条件下的培养基组成

2.1.1 外加碳源对工程菌的生长及 r-sHSA 表达量的影响

与 LB 液体培养基相比, 本研究中添加的 3 种碳源(0.4%的葡萄糖、甘油或蔗糖)均能促进工程菌的生长, 其中 0.4%的葡萄糖和 0.4%的甘油能显著提高

工程菌的生物量和 r-sHSA 的表达量($P<0.001$), 并以 0.4%甘油为碳源的 LB 液体培养基为最佳(表 3), 故在后续的发酵中加入 0.4%的甘油。

2.1.2 外加无机氮源的优化

与 LB 液体培养基相比, 本研究中添加的 2 种氮源(0.2%硫酸铵或硝酸钾)对工程菌生物量的增加以及 r-sHSA 的表达无明显的改善(表 4), 故确定在后续的发酵过程中不添加无机氮源。

表 3 碳源对工程菌生物量及 r-sHSA 表达量的影响
Table 3 Effect of carbon sources on the biomass of engineering bacteria and r-sHSA expression level

Carbon sources	Biomass (g/L)	Expression level (%)
LB	6.52±0.24	22.47±0.34
LB+0.4% glucose	7.92±0.51**	23.75±0.65**
LB+0.4% sucrose	6.92±0.32	23.67±0.40
LB+0.4% glycerol	8.31±0.58**	24.08±0.51**
<i>F-value</i>	22.4155	12.4578
<i>P</i>	0.0001	0.0001

** $P<0.001$, vs LB.

表 4 无机氮源对工程菌生物量及 r-sHSA 表达量的影响
Table 4 Effect of inorganic nitrogen sources on the biomass of engineering bacteria and r-sHSA expression level

Inorganic sources	Biomass (g/L)	Expression level (%)
LB	6.49±0.25	22.30±1.17
LB + 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄	6.45±0.30	22.00±1.69
LB + 0.2% KNO ₃	6.49±0.25	22.20±1.25
<i>F-value</i>	0.036	0.0726
<i>P</i>	0.9647	0.9303

2.1.3 无机盐优化结果

按表 5 的均匀设计方案, 考察了 NaCl(X_1)、MgSO₄·7H₂O(X_2)、KH₂PO₄(X_3)和 K₂HPO₄·3H₂O(X_4)

表 5 无机盐对工程菌生物量及 r-sHSA 表达量的影响

Table 5 Effect of inorganic salts on the biomass of engineering bacteria and r-sHSA expression level

Trial No.	X_1	X_2	X_3	X_4	Expression level (%) Y_1	Biomass (g/L) Y_2	Y_1
1	10	1	8	8	24.50	9.49	232.572
2	5	0.5	2	8	24.37	9.35	227.775
3	15	1	2	4	24.97	9.06	226.147
4	15	0.25	4	8	24.90	9.28	230.957
5	10	0.25	2	2	25.10	8.70	218.261
6	5	1	4	2	24.40	9.57	233.391
7	10	0.5	4	4	24.43	9.78	239.022
8	5	0.25	8	4	24.40	10.00	244.000
9	15	0.5	8	2	24.80	9.49	235.420

这 4 种无机盐对工程菌生长和 r-sHSA 表达的影响, 以菌体湿重和 r-sHSA 表达量之积(Y_1)作为回归方程的分析指标。利用 DPS(7.05)对获得的数据进行二次多项式逐步分析后得出回归方程为: $Y=174.3975+98.8663X_2+14.1456X_3+0.0736X_1X_1-75.3561X_2X_2-0.7466X_3X_3-0.4048X_1X_3-0.7210X_2X_3$, 回归方程的相关系数 $R=0.9994$, $F=118.0384$, $p=0.0708$, $S=0.7369$, $F>F_{7,1}(0.1)=58.9000$, F 检验通过($\alpha=0.1$)。软件的理论优化值如下: 当 $X_1=5.00$ 、 $X_2=0.62$ 、 $X_3=7.82$ 、 $X_4=2.67$ 时, $Y_{\max}=254.211$ 。

按上述优化条件重复 3 次实验, 获得的 Y_1 的平均值为 254.82, 与理论值接近。

2.1.4 碳氮比优化结果

在确定培养基无机盐组分的基础上, 对甘油(Z_1)、酵母提取物(Z_2)和胰蛋白胨(Z_3)进行了优化, 按表 6 的均匀设计方案制备培养基考察了它们对工程菌的生物量和 r-sHSA 表达量的影响。以菌体湿重和重组蛋白表达量之积(Y_1)作为回归方程的分析指标, 利用 DPS(7.05)对获得的数据进行分析后得出回归方程为: $Y=235.2400+6.9811Z_2-0.4038Z_2Z_2-0.0158Z_3Z_3+0.0339Z_2Z_3$, 回归方程的相关系数 $R=0.9999$, $F=1530.2116$, $S=0.2355$, $p=0.0192$, $F>F_{4,1}(0.01)=563.0000$, F 检验通过($\alpha=0.01$)。

在上述回归方程中, Z_1 (蛋白胨)并未列入方程中, 这可能是由于蛋白胨和酵母粉都可以作为氮源, 在计算时可能是作为一个整体进行的, 但在计算结果中给出了蛋白胨的配比, 理论优化值如下: 当 $Z_1=7.2$, $Z_2=9.1$, $Z_3=9.7$ 时, $Y_{\max}=266.833$ 。按上述优化条件重复 3 次实验, 获得 Y_1 的平均值为 272.694, 比理论值略高。

2.2 IPTG 诱导浓度的选择

根据 2.1 的优化的结果, 确定了工程菌培养的改良 LB 培养基组成(W/V): 0.97% 甘油, 0.91% 酵母粉, 0.72% 胰蛋白胨, 0.782% KH_2PO_4 , 0.267% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.062% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% NaCl, pH 7.0。与 LB 培养基相比, 工程菌在改良 LB 培养基中

生长时的对数生长期明显延长(图 1A)。在改良 LB 培养基中, 当菌体 OD_{600} 达到 1.0 时, 分别加入终浓度为 0.25、0.5、0.75、1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后, 测定 r-sHSA 表达量, 发现当 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时, r-sHSA 的表达量最高(图 2B), 故确定 IPTG 的诱导浓度为 0.5 mmol/L。

表 6 碳氮比对工程菌生物量及 r-sHSA 表达量的影响

Table 6 Effect of carbon-nitrogen ratio on the biomass of engineering bacteria and r-sHSA expression level

Trial No.	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Expression level (%) Y ₁	Biomass (g/L) Y ₂	Y _t
1	20	2.5	5	25.77	9.71	250.198
2	10	5	10	26.00	10.00	260.000
3	5	2.5	20	26.07	9.42	245.556
4	10	5	10	26.03	10.00	260.333
5	5	10	5	25.67	10.36	265.966
6	20	10	20	25.77	10.29	265.135

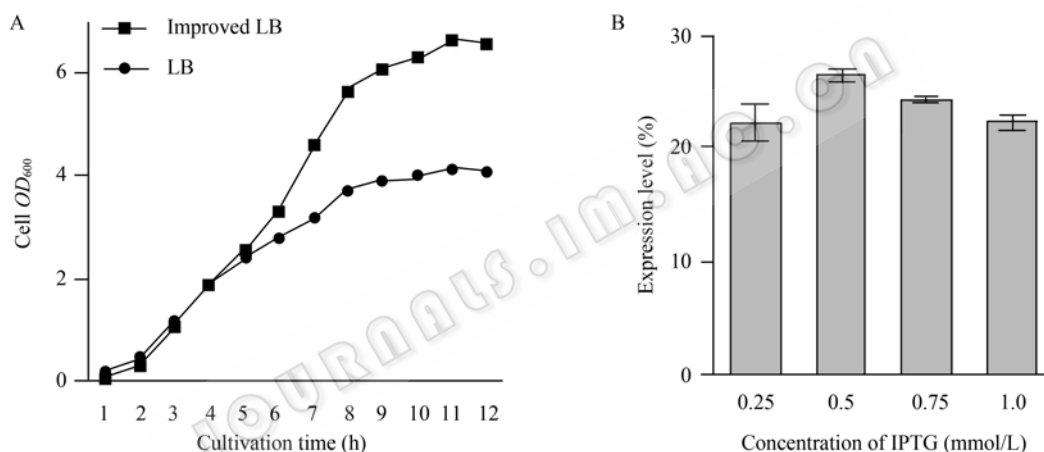


图 1 工程菌在 LB 和改良 LB 培养基中的生长曲线(A)及不同浓度 IPTG 诱导下的 r-sHSA 表达量(B)

Fig. 1 Growth curve of the engineering bacteria in LB and improved LB (A) and the expression level of r-sHSA induced by different concentration of IPTG (B).

2.3 补料方式的选择

在摇瓶发酵条件优化的基础上, 本研究进一步考察了恒速和指数 2 种补料方式对工程菌在 5 L 发酵罐中发酵时生物量及 r-sHSA 表达量的影响, 结果显示: 在发酵过程中采用流加补料方式补充培养基可明显提高工程菌的生物量和 r-sHSA 的产量(表 7), 故确定在后续的发酵过程中采用指数补料的方式流加培养基。

2.4 补料培养基的单因素优化

在确定指数补料方式后, 对补料培养基中的碳源(甘油)设置 3 个浓度(620、550、480 g/L)进行了单因素试验。结果表明: 当甘油浓度为 550 g/L 时工程菌的

生物量和 r-sHSA 的产量相对最高(表 8)。

将初始补料培养基的甘油浓度设置为 550 g/L, 对 3 种浓度的胰蛋白胨(100、80 和 60 g/L)进行了单因素实验。结果表明: 当胰蛋白胨为 100 g/L 时工程菌的生物量和 r-sHSA 的产量相对最高(表 9)。

表 7 分批发酵和补料分批发酵对 r-sHSA 产量的影响

Table 7 Effect of fed-batch and batch fermentation on r-sHSA production

Feeding pattern	Biomass (g/L)	Expression level (%)	r-sHSA concentration (g/L)
Constant	40.5	24.1	0.561
Exponent	60.11	24.7	0.987
No feeding	19.43	23.2	0.194

将初始补料培养基的甘油和胰蛋白胨分别设置为 550 g/L 和 100 g/L, 考察了微量元素对工程菌生长及 r-sHSA 表达的影响(表 10), 结果表明: 添加微量元素尽管在一定程度上可以降低 r-sHSA 的表达量, 但可明显提高工程菌的生物量(与表 8 和表 9 中的数据相比), 从而最终提高 r-sHSA 的产量。

表 8 甘油浓度对 r-sHSA 产量的影响

Table 8 Effect of the glycerol concentration on r-sHSA production

Glycerol (g/L)	Biomass (g/L)	Expression level (%)	r-sHSA concentration (g/L)
620	80.26	24.5	1.671
550	80.49	24.3	1.715
480	77.62	24.3	1.376

表 9 胰蛋白胨浓度对 r-sHSA 产量的影响

Table 9 Effect of the tryptone concentration on r-sHSA production

Tryptone (g/L)	Biomass (g/L)	Expression level (%)	r-sHSA concentration (g/L)
100	80.72	24.1	1.704
80	80.46	24.2	1.694
60	77.22	24.1	1.530

表 10 微量元素浓度对 r-sHSA 产量的影响

Table 10 Effect of the trace metals concentration on r-sHSA production

Trace metals (mL/L)	Biomass (g/L)	Expression level (%)	r-sHSA concentration (g/L)
2	115.90	22.6	2.364
3	118.54	23.1	2.375
4	120.66	22.3	2.380

在上述工作的基础上, 利用 $U_6(3^3)$ 均匀设计方案安排 6 次试验考察了甘油(T_1)、胰蛋白胨(T_2)和微

量元素(T_3)对工程菌生长和 r-sHSA 表达的影响。在菌体 OD_{600} 达到 23 时加入 0.5 mmol/L IPTG(终浓度)诱导 6 h 后收集菌体, 测得 r-sHSA 产量(表 11)作为回归方程的分析指标。将获得的数据取平均值后, 应用 DPS(7.05) 进行分析得出回归方程为 $Y=0.643500+0.031564T_2-0.000208T_2T_2+0.000013T_1T_2$, 回归方程的相关系数为 $R=0.9570$, $F=7.2573$, $S=0.0585$, $p=0.1235$, $F>F_{3,2}(0.25)=3.1500$, F 检验通过($\alpha=0.25$)。

在回归方程中, 微量元素(T_3)没有列入方程, 说明其浓度为 2 mL/L 以上时对工程菌生长和 r-sHSA 表达的影响很小。根据回归方程, 利用软件获得的理论优化值如下: 当 $T_1=620$, $T_2=94.8$, $T_3=3.3$ 时, $Y_{\max}=2.5106$ 。

按照优化的补料培养基(甘油 620 g/L, 胰蛋白胨 94.8 g/L, 微量元素 3.3 mL/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.5 g/L)进行了实验验证, 获得的菌体生物量为 124.1 g/L, r-sHSA 的产量达到了 2.657 g/L。

2.5 IPTG 诱导条件

在 5 L 发酵罐中, 用优化后的补料培养基指数流加培养, 在菌体 OD_{600} 为 23、28 和 35 时分别加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导至补料结束(分别诱导了 6 h、5 h 和 4 h)。结果发现: 当 OD_{600} 为 23 时, r-sHSA 的产量达到最高, 为 2.657 g/L(表 12)。

在 OD_{600} 为 23 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 每隔 1 h 取样 1 次至补料结束, 结果证明诱导 6 h 时的菌体生物量和产量是最高的(图 2)。

表 11 补料培养基组成及浓度对 r-sHSA 产量的影响

Table 11 Effect of the feeding medium's composition and concentration on r-sHSA production

Trial No.	T_1	T_2	T_3	Biomass (g/L)	Expression level (%)	r-sHSA concentration (g/L)
1	550	80	3	118.54	22.3	2.453
2	480	60	4	113.05	21.4	2.152
3	480	100	2	115.15	22.4	2.328
4	620	100	4	122.67	22.5	2.504
5	550	80	3	119.27	21.0	2.336
6	620	60	2	116.11	21.5	2.261

表 12 诱导时间对 r-sHSA 产量的影响

Table 12 Effect of the induction time on r-sHSA production

OD ₆₀₀	23	28	35
Expression level (%)	24.1	23.8	24.1
Biomass (g/L)	124.10	122.27	124.47
r-sHSA concentration (g/L)	2.657	2.522	2.608

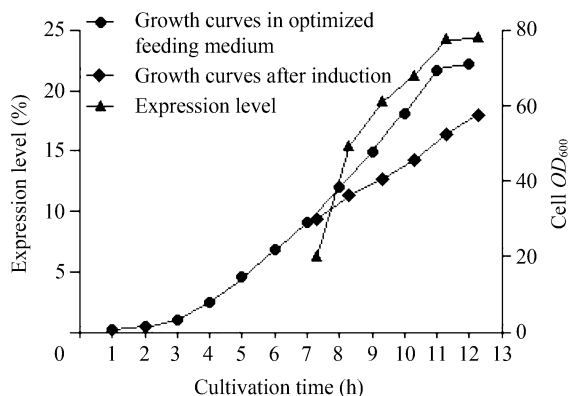


图 2 工程菌在改良 LB 培养基中发酵时添加优化的补液情况下的生长曲线及诱导不同时间的 r-sHSA 表达量
Fig. 2 Growth curve of the engineering bacteria cultured in improved LB medium with the optimized feeding medium and the expression level of r-sHSA on different time.

2.6 优化前后工程菌的生物量和表达量的变化

按照上述优化后的发酵条件, 在 5 L 发酵罐中对工程菌进行了培养和诱导, 5 次重复实验的结果具有良好的稳定性(表 13)。与优化前(表 7 分批发酵)相比, 工程菌的生物量和 r-sHSA 的产量有了明显的提高, 其中 r-sHSA 的产量提高了 13.7 倍左右。

表 13 工程菌在优化发酵条件下的稳定性试验

Table 13 Stabilized experiment of the engineering bacteria under the modified fermentation condition

Trial No.	Biomass (g/L)	Expression level (%)	r-sHSA concentration (g/L)
1	121.95	24.1	2.729
2	122.89	24.3	2.628
3	122.47	23.9	2.642
4	124.56	23.8	2.675
5	124.46	24.1	2.638
X±SD	123.27±1.184	24.04±0.195	2.662±0.041

3 讨论

尽管已建立多种基于真核表达模式的基因工程类产品生产的策略, 但原核表达体系在一些表达产

物无需经翻译后修饰的产品的生长过程中, 仍因其简便、生长周期相对较短以及成本较低的优点而受到各方面的重视^[8], 在工业生产中得到广泛的应用。

基因工程类产品的发酵生产受到碳源、氮源、pH、溶氧量、诱导剂以及补料控制等多种因素的影响, 优化培养基的组成和培养条件, 将在很大程度上提高产品的表达量, 降低培养成本。在本研究中, 基于常规的 LB 培养基虽然营养丰富但缺乏能被细菌快速利用碳源的特点, 比较了添加不同碳源下的工程菌生长及重组产物的表达情况, 结果证明: 在 LB 中添加甘油能显著提高工程菌的生物量及 r-sHSA 的产量, 其原因可能与使用甘油作为碳源时可以在很大程度上减少有害代谢产物乙酸的积累^[9]有关, 而当添加葡萄糖为碳源进行发酵培养时, 将由于产生大量的乙酸而抑制菌体的生长, 降低重组蛋白的产量^[10-11]。

在工程菌的高密度发酵过程中, 无机盐的种类和含量对细胞的生长和重组产物的表达也有很大的影响, 如: 过低的磷酸盐将导致培养菌体的密度低, 而浓度过高时, 早期菌体生长旺盛, 容易使得菌体因过早衰老死亡而降低工程菌的生物量^[12]; 镁离子则是许多酶系的辅助因子或激动剂, 参与了生命活动的各个过程, 因此适当添加镁离子将在一定程度上改善工程菌的生长^[13]。在本研究中, 当在常规的 LB 培养基中添加一定浓度的磷酸盐和硫酸镁后, 工程菌的生物量和 r-sHSA 的产量均有了明显的提高。

在工程菌的发酵生产过程中, 补料分批发酵方式因可以增加菌体密度、延长产物合成周期和降低有害副产物^[14]而被广泛应用于一些重组产物的发酵工艺中^[15]。在分批补料发酵时, 流加培养基的方式在避免代谢溢流、溶氧限制、有害物质的积累以及获得高密度的细胞和较高的生产力过程中起着至关重要的作用^[9]。本研究比较了恒速补料和指数补料这 2 种常见的补料方式对工程菌生长的影响, 结果证明指数补料方式优于恒速补料方式, 其原因可能与前者能使菌体在所需比生长速率下生长时有害副产物乙酸的大量产生有关^[16], 因而指数补料更适合工程菌的高密度发酵。补料培养基的组成和浓度对发酵结果也有较大影响^[17], 当碳源和氮源等满足菌

体的生长后,微量元素则会成限制性因子^[18],通过在培养过程中加入微量元素,则能明显提高发酵产量。为此,本研究通过在补料培养基中添加适量的微量元素,使工程菌的生物量和 r-sHSA 的产量有了明显的提高。

总之,本研究通过对工程菌发酵培养基的组成以及相关培养条件的优化,初步建立了适合 r-sHSA 生产的工艺。与优化前相比,优化后的 r-sHSA 的产量高达(2.662 ± 0.041) g/L,比优化前提高了 13.7 倍左右,已经能够满足后续的中试产品生长的需要。但是鉴于工程菌在不同的生长阶段(如指数生长期和平台期等)对营养成分的需求有所不同,因此,进一步优化工程菌不同生长阶段时补料培养基的组成,将可能在一定程度上提高工程菌的生物量以及重组产物的表达量,相关的工作值得进一步探讨。

致谢: 感谢 Clemson 大学生物科学系董宇清博士对本文提出的修改意见。

REFERENCES

- [1] Ye BP, Xi T, Lü ZB, *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNA fragment of shark hepatic stimulating substance's similarity. *Chin J Nat Med*, 2003, **1**(2): 111-115.
叶波平, 奚涛, 吕正兵, 等. 鲨肝刺激物质类似物 cDNA 片段的克隆及序列分析. *中国天然药物*, 2003, **1**(2): 111-115.
- [2] Wang Y, Bian S, Zhang TT, *et al.* Expressing and bioactivity analysis of shark hepatic stimulate substance analogue in *Escherichia coli*. *Mar Sci*, 2004, **28**(6): 37-41.
王颖, 边杉, 张婷婷, 等. 鲨肝刺激物质类似物基因在大肠杆菌中的表达与产物活性分析. *海洋科学*, 2004, **28**(6): 37-41.
- [3] Wang Y, Zhao YJ, Ye BP, *et al.* Effect of recombinant hepatic stimulator substance analogue on CCl₄-induced acute liver injury in mice. *J China Pharm Univ*, 2005, **36**(4): 368-372.
王颖, 赵艳景, 叶波平, 等. r-sHSA 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的保护作用. *中国药科大学学报*, 2005, **36**(4): 368-372.
- [4] Fang KT. The uniform design: application of number-theoretic methods in experimental design. *Acta Math Appl Sin*, 1980, **3**: 363-372.
- [5] Yoon SK, Kang WK, Park TH. Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**(10): 995-999.
- [6] Korz DJ, Rinas U, Hellmich K, *et al.* Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1995, **39**(1): 59-65.
- [7] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 1128-1131.
萨姆布鲁克, 拉塞尔. *分子克隆实验指南*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1128-1131.
- [8] Yin J, Li G, Ren X, *et al.* Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*, 2007, **127** (3): 335-347.
- [9] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(3): 98-105.
- [10] Turner C, Gregory ME, Turner MK. A study of the effect of specific growth rate and acetate on recombinant protein production of *Escherichia coli* JM107. *Biotechnol Lett*, 1994, **16**(9): 891-896.
- [11] Bauer KA, Ben-Bassat A, Dawson, M, *et al.* Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(5): 1296-1302.
- [12] Xu H, Li M, Ruan CG, *et al.* Production of mutant recombinant human tumor necroses factor by high density cell culture. *Ind Microbiol*, 1998, **28**(2): 20-25.
徐皓, 李民, 阮长庚, 等. 高密度发酵生产突变型重组人肿瘤坏死因子 rhTNF α -DK2 的研究. *工业微生物*, 1998, **28**(2): 20-25.
- [13] Xiong ZG. *Fermentation Technology Principles*. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1995: 313-322.
熊宗贵. *发酵工艺原理*. 北京: 中国医药科技出版社, 1995: 313-322.
- [14] Miguel ASM, Vitolo M, Jr AP. Fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for glucose 6-phosphate dehydrogenase production. *Biochem Eng J*, 2007, **33**(3): 248-252.
- [15] Clementschitsch F, Jürgen K, Florentina P, *et al.* Sensor combination and chemometric modelling for improved process monitoring in recombinant *E. coli* fed-batch cultivations. *J Biotechnol*, 2005, **120**(2): 183-196.
- [16] De Anda R, Lara AR, Hernández V, *et al.* Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng*, 2006, **8**(3): 281-290.
- [17] Babaeipoura V, Shojaosadati SA, Robatjazia SM, *et al.* Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 2007, **42**(1): 112-117.
- [18] Zhu QC, Ye Q. Effects of trace elements on growth and acetate production of *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin*, 2004, **44**(2): 230-234.
朱才庆, 叶勤. 微量元素对大肠杆菌生长和乙酸生成的影响研究. *微生物学报*, 2004, **44**(2): 230-234.