

昆虫病原细菌 Cip 蛋白基因工程菌 发酵条件的优化

游娟¹, 黄建林², 曹莉³, 韩日畴^{3*}

(1. 广东药学院 生物化学与分子生物学系, 广东 广州 510006;

2. 广州计量检测技术研究院, 广东 广州 510030; 3. 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260)

摘要: 昆虫病原发光杆菌属(*Photobacterium*)细菌产生的 2 种胞内晶体蛋白 CipA 和 CipB 已在大肠杆菌原核表达系统中进行稳定表达, 为进一步提高该蛋白在大肠杆菌中的表达水平, 确定工程菌摇瓶培养的最适条件, 研究了多种无机离子、装液量、培养基初始 pH 值、诱导前添加葡萄糖等因素对工程菌摇瓶发酵的影响。结果显示, 在发酵培养基中添加 10 mmol/L Mg^{2+} 和 15 mmol/L PO_4^{3-} , 调节初始 pH 值至 7.2, 装液量为 25 mL (250 mL 摇瓶), 诱导前添加 10 g/L 葡萄糖时, Cip 蛋白的表达量可明显提高, 发酵条件优化后 CipA 和 CipB 的表达量达到了 39% 和 41%。

关键词: 昆虫病原细菌; 胞内晶体蛋白; 基因工程菌; 原核表达; 发酵优化; 表达量

中图分类号: S476+.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)06-0092-05

Optimization of Expression Conditions of Recombinant Crystalline Inclusion Protein of Entomopathogenic Bacterium in *Escherichia coli*

YOU Juan¹, HUANG Jian-lin², CAO Li³, HAN Ri-chou^{3*}

(1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou Institute of Metrology & Testing Technology, Guangzhou 510030, China;

3. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Two types of intracellular crystalline inclusion proteins produced by *Photobacterium* bacteria, CipA and CipB, were expressed in prokaryotic expression system previously. To improve the expression level of the two proteins and determine the optimal expression conditions, the effects of inorganic ions, liquid volume, initial pH value, addition of glucose before induction and other factors were studied on shake flask fermentation of engineered bacteria. The result showed that when 25 mL recombinant bacteria were cultured in 250 mL LB medium (pH 7.2) with 10 mmol/L Mg^{2+} and 15 mmol/L PO_4^{3-} , and 10 g/L glucose was added before induction, both of CipA and CipB could be highly expressed, up to 39% and 41% of the total bacterial proteins, respectively.

Key words: entomopathogenic bacterium; crystalline inclusion protein; genetic engineering bacterium; prokaryotic expression; fermentation optimization; expression level

Cip 蛋白(crystalline inclusion proteins)是昆虫病原发光杆菌属(*Photobacterium*)细菌胞内产生的 2 种形态显著的晶体蛋白, 命名为 CipA 和 CipB, 分子量分别为 11.6 kD 和 11.3 kD^[1-2]。发光杆菌属细

菌与昆虫病原异小杆属(*Heterorhabditis*)线虫互惠共生^[3], 后者作为一类高效安全的生物防治因子, 对人畜、环境安全, 可以豁免注册进入大多数国家, 是欧美销售量第二的生物农药^[4-5]。

收稿日期: 2011-11-18

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(036692); 广东药学院基金项目(2006JCX07)

作者简介: 游娟(1978-), 女, 湖北洪湖人, 讲师, 博士, 主要从事蛋白质与多肽的生物化学研究。E-mail: youjuan1010@163.com

* 通讯作者: 韩日畴(1963-), 男, 海南文昌人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事功能基因、生物农药的基因工程研究。

对“线虫—细菌”共生关系的研究发现,Cip 蛋白不能为共生菌自身所利用,其氨基酸序列与已知蛋白并无相似性,氨基酸含量和组成与线虫的营养需求类似,被认为与线虫完成世代及形成高感染力的感染期线虫(infective juvenile)有关^[6-7]。目前,Cip 蛋白的编码基因已分别被克隆到原核及真核系统进行表达^[7],但还没有有关工程菌表达条件优化的报道。

为进一步提高 Cip 蛋白表达量,本试验研究了无机离子(Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , PO_4^{3-})、培养基初始 pH 值、装液量及诱导前添加葡萄糖等因素对菌体生长和蛋白表达的影响,以期为此类蛋白的大规模发酵生产奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)由广东省昆虫研究所保存,重组质粒 pET-15b-cipA 及 pET-15b-cipB 由广东省昆虫研究所构建并保存。

1.1.2 试剂 胰蛋白胨(bacto-tryptone)、酵母浸出粉(bacto-yeast extract),英国 OXOID 公司;羧苄青霉素(carbenicillin disodium, Car),美国 Sigma 公司;IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), MD 生物公司;蛋白质宽分子量标准(10~225 kD),美国 Promega 公司;其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 UV-2102 Pc 型紫外分光光度计,UNICO(上海)仪器有限公司;Universal 32 型台式冷冻离心机,德国 Hettich 公司;DYCZ-24D 型垂直电泳槽,北京六一仪器厂;EPS1001 型电泳电源,Amersham Pharmacia 公司;AlphaImager 2200 型凝胶图像分析系统,Alpha Innotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 工程菌的培养及诱导表达 将-80℃甘油储存菌在 LB 抗性平板(10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母膏,10 g/L NaCl,1.5% 琼脂粉,50 μ g/mL Car)上划线培养,挑取直径 1 mm 左右的单菌落接种至 3 mL LB(含 50 μ g/mL Car)培养基中,37℃下、200 r/min 活化培养 2.5 h,按 3%接种量转接至含有 Car 的 LB 培养基中,继续培养至 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$,加入 IPTG 溶液至终浓度为 1 mmol/L,37℃下、200 r/min 诱导培养 8 h。

1.2.2 无机离子对蛋白表达和细菌生长的影响试验 在发酵培养基中分别添加不同浓度的无机离子: Mg^{2+} (0、10、20、30 mmol/L), Ca^{2+} (0、3、6、9

mmol/L), NH_4^+ (0、10、20、30 mmol/L), PO_4^{3-} (0、15、30、45 mmol/L),按照 1.2.1 方法进行重组菌的培养及诱导表达,测定菌体干质量,并分析目的蛋白的表达情况。

1.2.3 装液量对蛋白表达和细菌生长的影响试验

在摇床转速一定(200 r/min)的情况下,设置摇瓶(250 mL)装液量分别为 25、50、75、100、125 mL(即装液量 10%~50%),进行重组菌的培养及诱导表达,测定菌体干质量及蛋白表达情况。

1.2.4 初始 pH 值对蛋白表达和细菌生长的影响试验 调节发酵培养基的初始 pH 值为 6.5~8.0,进行重组菌的培养及诱导表达,测定菌体干质量及蛋白表达情况。

1.2.5 诱导时期对蛋白表达和细菌生长的影响试验

挑取单菌落接种至 3 mL LB 抗性培养基中,37℃下、200 r/min 活化 2.5 h,按 3%接种量再转接至 LB 抗性培养基中继续培养,每小时取样测定 OD_{600} 值。其中,培养至对数生长期时,选取 2 个不同时间点($OD_{600} = 0.8, 1.5$)加入 IPTG 溶液。

1.2.6 补加葡萄糖对蛋白表达和细菌生长的影响试验

诱导前在培养基中加入不同质量浓度的葡萄糖(0、10、20、30、40 g/L),进行重组菌的培养及诱导表达,测定菌体干质量,并分析目的蛋白的表达情况。

1.2.7 菌体干质量的测定 发酵液经过离心(6 000 r/min,10 min)后,双蒸水洗涤 3 次,收集菌体,40℃烘干至恒质量,进行测定。

1.2.8 蛋白表达量分析 取 0.2~0.5 mL 发酵液,离心得菌体,洗涤后,加入 50 μ L 水与 50 μ L 2×SDS-PAGE 上样缓冲液等体积混合,沸水浴 2 min,-20℃下保存备用或直接进行 SDS-PAGE 电泳分析。采用 Gel-Pro(Media Cybernetics)软件分析蛋白表达情况。

2 结果与分析

2.1 无机离子对蛋白表达和细菌生长的影响

2.1.1 Mg^{2+} 在发酵培养基中添加 $MgCl_2$,结果显示: Mg^{2+} 的加入,使工程菌菌体干质量和 Cip 蛋白的表达量均有所增加。当 Mg^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时,CipA 及 CipB 的表达量最高,超过了 34%。随着 Mg^{2+} 浓度继续增大,Cip 蛋白的表达量持续下降,而菌体干质量持续上升(图 1)。说明 Mg^{2+} 的加入有利于菌体生长,而高浓度的 Mg^{2+} 则会抑制目的蛋白表达。培养基中加入 10 mmol/L 的 Mg^{2+} 为宜。

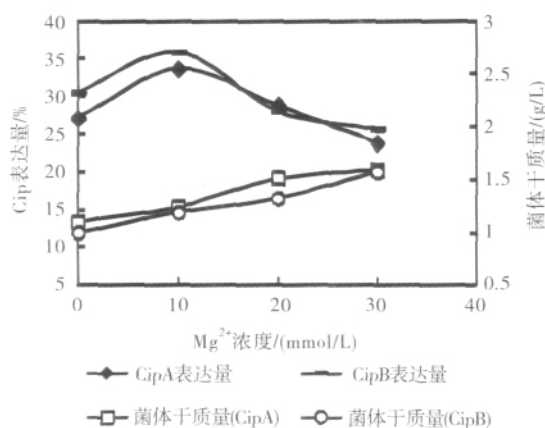


图 1 Mg^{2+} 浓度对 CipA 及 CipB 表达及细菌生长的影响

2.1.2 Ca^{2+} 在培养基中加入 $CaCl_2$, 以提供不同浓度的 Ca^{2+} 。结果显示, 随着 Ca^{2+} 的加入, 菌体干质量并没有明显改变, 保持在 1.1 g/L 左右。 Ca^{2+} 浓度较低时, 对目的蛋白的表达影响不大, 但当 Ca^{2+} 浓度超过 3 mmol/L, Cip 蛋白表达量显著下降(图 2)。因此, 发酵培养基中无需添加 Ca^{2+} 。

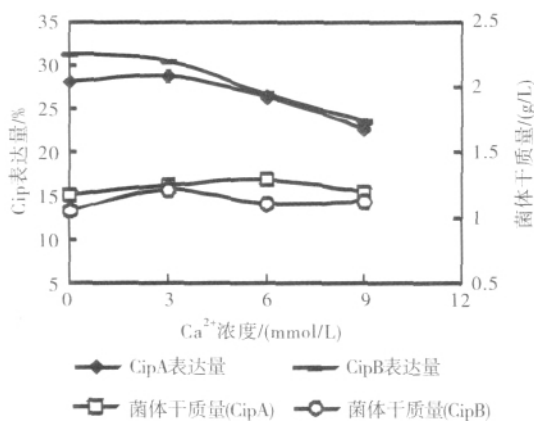


图 2 Ca^{2+} 浓度对 CipA 及 CipB 表达及细菌生长的影响

2.1.3 NH_4^+ 培养基中加入 NH_4Cl , Cip 蛋白的表达量下降, 而菌体干质量无明显变化或是略有下降(图 3)。因此, 发酵培养基中亦不用添加 NH_4^+ 。

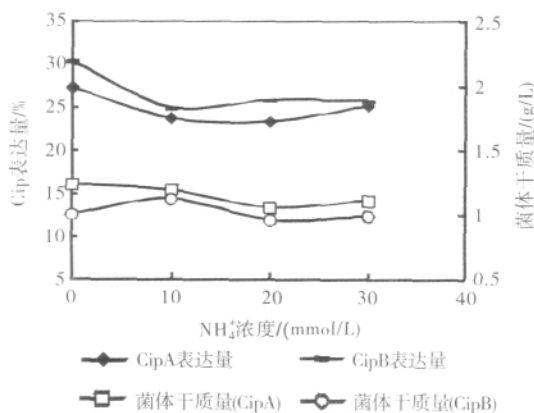


图 3 NH_4^+ 浓度对 CipA 及 CipB 表达及细菌生长的影响

2.1.4 PO_4^{3-} PO_4^{3-} 的加入对 Cip 蛋白的表达有一定促进作用, 随着离子浓度的增加, 2 种 Cip 蛋白的表达量均略有上升。而菌体量则呈现不同变化: 加入较低浓度的 PO_4^{3-} 时, 菌体干质量明显增加, 而离子浓度大于 15 mmol/L 时, 菌体干质量反而下降(图 4)。综合考虑 PO_4^{3-} 对蛋白表达量与菌体量的影响, 发酵时培养基中宜加入 15 mmol/L PO_4^{3-} 。

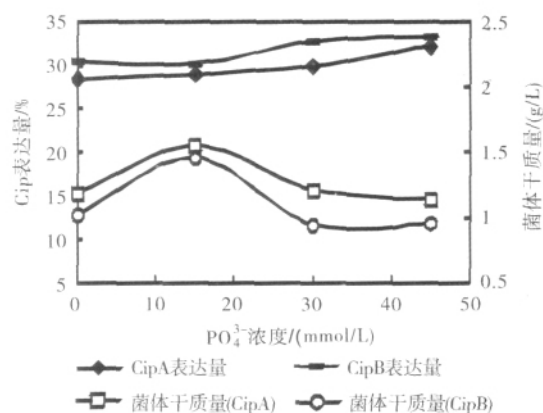


图 4 PO_4^{3-} 浓度对 CipA 及 CipB 表达及细菌生长的影响

2.2 装液量对蛋白表达和细菌生长的影响

由图 5 可知, 随装液量的增加, Cip 蛋白表达量逐渐下降, 其中装液量为 25 mL 时表达量最高, CipA、CipB 分别为 36.28% 和 37.44%。而装液量在 25 mL 和 50 mL 时, 菌体干质量无显著差异, 介于 0.9~1.1 g/L。但装液量增加为 75 mL 时, 干质量略有下降, 随着装液量继续增加, 则菌体干质量显著

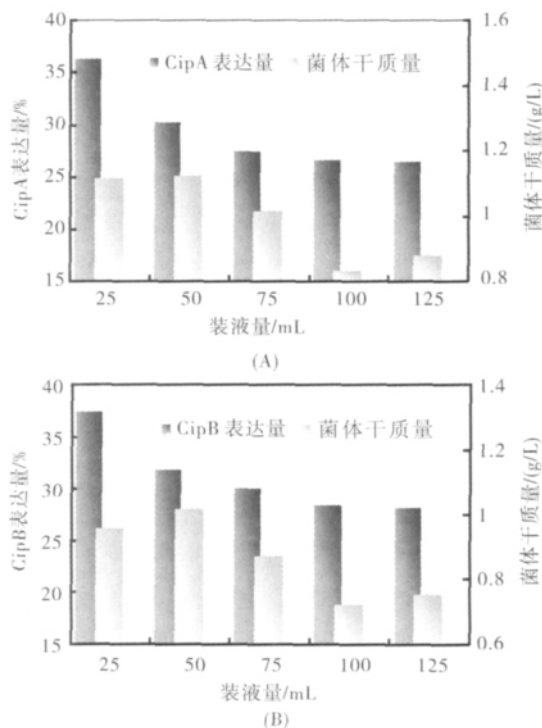


图 5 装液量对 CipA(A)及 CipB(B)表达和细菌生长的影响

下降。综合考虑该因素对目的蛋白产量的影响,宜选用25 mL(250 mL摇瓶)的装液量。

2.3 初始pH值对蛋白表达和细菌生长的影响

在培养基初始pH值大于6时,随着pH值增大,Cip蛋白的表达量有所增加,但在pH值大于7.2后,目的蛋白的表达量开始下降,菌体干质量则没有明显变化(图6)。其中,pH值为7.2时,CipA及CipB的表达量最高,分别为30.1%和31.1%。因此,发酵时宜选用培养基初始pH值7.2。

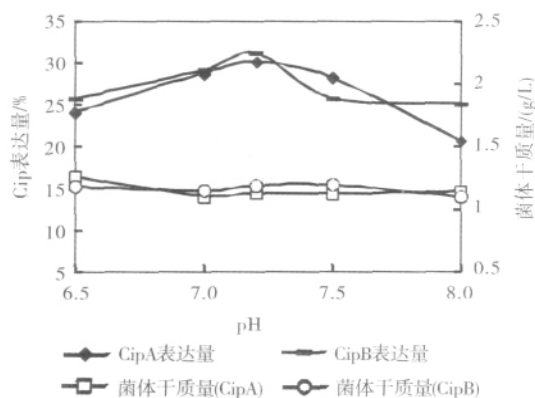


图6 初始pH值对CipA及CipB表达和细菌生长的影响

2.4 诱导时期对重组菌生长的影响

前期研究表明,在重组菌的对数生长期诱导,菌体量达到一定规模,代谢旺盛,目的蛋白产量较高。图7、图8的表达曲线显示:在此段时期的不同时间

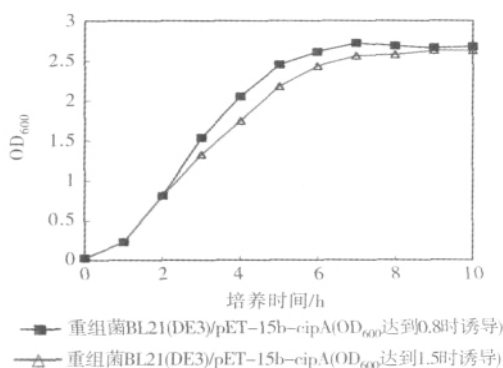


图7 重组菌BL21(DE3)/pET-15b-cipA的表达曲线

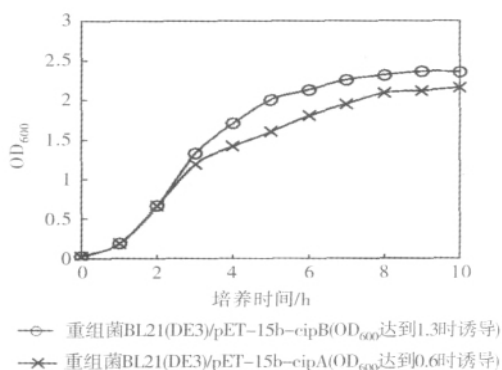


图8 BL21(DE3)/pET-15b-cipB的表达曲线

点加入IPTG进行诱导,即使诱导时OD₆₀₀值差异较大,诱导一段时间后,菌体量趋于接近。说明IPTG的加入明显增加了重组菌的代谢负担,改变诱导开始时间并不能显著增加菌体量。

2.5 葡萄糖对蛋白表达和细菌生长的影响

加入IPTG诱导前,在培养基中加入不同质量浓度的葡萄糖,目的蛋白的表达量没有明显差异,但葡萄糖的加入使菌体干质量有一定提高,其中,加入10 g/L的葡萄糖时,菌体干质量最大,分别达到1.82 g/L和1.78 g/L(图9)。因此,可在诱导前添加10 g/L的葡萄糖。

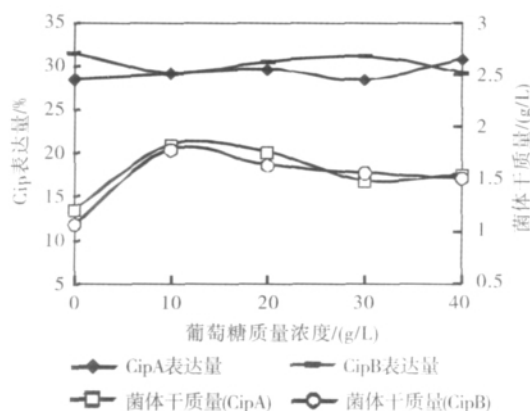
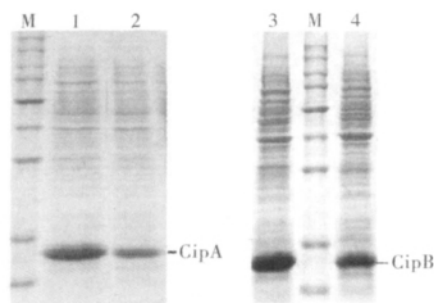


图9 诱导前添加葡萄糖对CipA及CipB表达和细菌生长的影响

2.6 优化后目的蛋白的表达量

经过以上发酵条件的优化,即在LB培养基(初始pH值7.2)中添加10 mmol/L Mg²⁺和15 mmol/L PO₄³⁻,装液量25 mL(250 mL摇瓶),诱导前添加10 g/L葡萄糖,在菌液OD₆₀₀达到0.8~1.0时,以1 mmol/L IPTG溶液诱导培养8 h,重组蛋白CipA及CipB的表达量可分别提高至胞内总蛋白的39%和41%(图10),菌体干质量则分别达到1.69 g/L和1.52 g/L。



1. 优化后的BL21(DE3)/pET-15b-cipA重组菌; 2. 优化前的BL21(DE3)/pET-15b-cipA重组菌; 3. 优化后的BL21(DE3)/pET-15b-cipB重组菌; 4. 优化前的BL21(DE3)/pET-15b-cipB重组菌; M. 蛋白分子量标准(225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15, 10 kD)

图10 优化前后Cip蛋白表达情况

3 结论与讨论

昆虫病原发光杆菌属(*Photobacterium*)细菌为昆虫病原异小杆属(*Heterorhabditis*)线虫的共生细菌,在该类线虫的产业化培养中发挥着重要作用^[8-9]。初生型细菌产生 2 种胞内晶体蛋白 CipA 及 CipB,这类晶体蛋白被认为与形成具有生物防治效果的感染期线虫直接相关。为大量获得此类蛋白,使该蛋白的研究更为接近线虫产业化的实践,本试验利用经典的大肠杆菌原核表达系统,在已构建稳定携带 *cipA* 及 *cipB* 基因的重组菌的基础上,进一步优化发酵条件,为 Cip 蛋白发酵规模的扩大提供参考,同时为细菌—线虫共生关系的深入研究提供材料,以进一步促进该类生物农药的产业化。

大肠杆菌表达系统具有遗传背景清晰,生长速度快,稳定高效,易于高密度培养等特点,而外源基因在被诱导高水平表达的同时,表达产物常常聚集成胞内不溶性的、不具备正确三维结构的包涵体形式。而本研究中的 Cip 蛋白,天然状态为胞内晶体,生物学作用主要与其氨基酸组成及含量有关,因此,大肠杆菌是大量生产 Cip 蛋白较合适的宿主。

要维持工程菌正常的生长代谢及满足高水平表达目的蛋白的要求,除基础培养基提供必需的碳源、氮源外,还需要 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、磷酸盐等微量元素及盐类^[10],它们可能是一些酶的激活剂或是酶的活性组分,参与到细胞的基础代谢。这些离子在体外翻译体系中,可以降低有害代谢产物的积累,增加菌体得率,提高外源蛋白的表达水平,还可显著降低蛋白质合成中的错读概率。本试验表明,适宜在发酵培养基中添加 10 mmol/L 的 Mg^{2+} 、15 mmol/L PO_4^{3-} ,无需添加 Ca^{2+} 及 NH_4^+ 。 Ca^{2+} 的加入会抑制目的蛋白的表达,而随 NH_4^+ 浓度的提高,Cip 表达量亦下降,可能培养基中能提供更多氮源, NH_4^+ 的加入成为抑制菌体生长的因素。试验中还发现,诱导剂 IPTG 的加入对菌体生长有极大影响。在对数生长期中后期的不同时间点进行诱导,即使诱导时 OD_{600} 值有明显差异,IPTG 加入后菌体密度亦非常接近。说明在诱导阶段,外源蛋白大量表达,造成重组菌代谢负担,同时培养基营养不足,菌体生长受到限制。菌体量的不足会影响目的蛋白的得率,因此,尝试添加葡萄糖以提供可能的限制性基质——碳源,其比较合适的添加浓度为 10 g/L。

综上所述,将发光杆菌的 CipA 及 CipB 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行优化表达时,在发酵培养基(初始 pH 值 7.2)中添加 10 mmol/L Mg^{2+} 和

15 mmol/L PO_4^{3-} ,装液量 25 mL(250 mL 摇瓶),诱导前添加 10 g/L 葡萄糖,CipA 和 CipB 的表达量可提高至 39%和 41%。这种胞内晶体蛋白表达优化的研究,不仅有利于线虫—细菌共生机制的探索,而且将促进线虫的产业化。

参考文献:

- [1] Bowen D J, Ensign J C. Isolation and characterization of intracellular protein inclusion produced by the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens* [J]. Appl Envir Microbiol, 2001, 67(10): 4834-4841.
- [2] Bintrim S B, Ensign J C. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photobacterium luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes [J]. J Bacteriol, 1998, 180(5): 1261-1269.
- [3] Forst S, Clarke D. Nematode-bacterium symbiosis [M]//Gaugler R. Entomopathogenic nematology. London: CAB International, 2001: 57-77.
- [4] Bowen D, Rocheleau T A, Blackburn M, et al. Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens* [J]. Science, 1998, 280: 2129-2132.
- [5] Poinar G O J. Nematodes for biological control of insects [M]. Boca Raton: CRC Press, 1979: 270.
- [6] Hussein M, Ehlers R U. Significance of the *Photobacterium luminescens* inclusion protein for the development of *Heterorhabditis bacteriophora* [C]//Boemare N, Ehlers R U, Burnell A M, et al. COST 819 Entomopathogenic nematodes—Virulence factors and secondary metabolites from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. Luxembourg: Office for Official Publications of the EC (EUR 19203 EN), 2001: 47-51.
- [7] You J, Liang S, Cao L, et al. Nutritive significance of crystalline inclusion proteins of *Photobacterium luminescens* in *Steinernema* nematodes [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 55(2): 178-185.
- [8] French-Constant R, Waterfield N, Daborn P, et al. *Photobacterium*: Towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen [J]. FEMS Microbiol Rev, 2003, 26(5): 433-456.
- [9] Han R C, Ehlers R U. Effect of *Photobacterium luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(3): 239-247.
- [10] 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 [J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 230-234.