

# 重组大肠杆菌高密度发酵中乳糖诱导表达 hBLyS

李兆鹏<sup>1</sup>, 张栩<sup>1</sup>, 徐斌<sup>2</sup>, 宋礼华<sup>2</sup>, 谭天伟<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学生命科学学院, 北京 100029; 2. 安徽安科生物工程有限责任公司, 安徽 合肥 230088)

**摘要:** 研究了乳糖代替异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导大肠杆菌表达重组人 B 淋巴细胞刺激因子(hBLyS)。结果表明, 乳糖不仅能够作为诱导剂诱导外源蛋白的合成, 而且能作为碳源促进菌体的生长。通过对诱导条件进行优化, 乳糖诱导外源蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 14.3%, 达到 IPTG 的诱导水平(26%)的 55%。在 5 L 发酵罐中 hBLyS 的表达量达到 16%, 同时生物量  $OD_{600}=62$ 。

**关键词:** 大肠杆菌; 乳糖; IPTG; hBLyS

**中图分类号:** TQ92

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-606X(2005)04-0446-04

## 1 前言

人 B 淋巴细胞刺激因子(hBLyS)属于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员, 在体液免疫调控中起重要作用。它能强烈刺激 B 淋巴细胞的增殖和分化并分泌大量免疫球蛋白; 在体外过量表达能促进多种 B 系肿瘤细胞的生长<sup>[1]</sup>。其在原核<sup>[2]</sup>和真核<sup>[3]</sup>表达系统中的表达均有报道。

在构建基因工程菌株时, 常将外源基因安置在可被诱导控制的启动子序列下游。实验室小规模样品制备中 IPTG 是常见的诱导剂, 但由于其昂贵的价格和潜在的毒性, 使其应用于大规模发酵生产重组蛋白时有一定的局限性<sup>[4]</sup>。乳糖是一种二糖, 无毒性且价格低廉, 可以作为诱导剂启动 PET 载体中的 T7 启动子, 从而开始目的蛋白质基因的转录。Kweon 等<sup>[4]</sup>发现, 在摇瓶中 1 mmol/L 乳糖诱导表达 PIP(Ribosome-Inactivating Protein, pMS 质粒, *E. coli* TG1), 发酵液中目的蛋白的最终含量(21.4 mg/L)达到 IPTG 诱导下表达水平(38.7 mg/L)的 55% 左右。Woyski 等<sup>[5]</sup>使用乳糖诱导表达细胞色素 P450(PET22b 质粒含 T7 启动子), 在乳糖的诱导下 P450 表达量最终达到 12 mg/L 以上, 超过了 1 mmol/L IPTG 诱导的效果。虽然乳糖的诱导效果不及 IPTG, 但因其价格低廉, 能大大降低诱导成本, 使在重组 *E. coli* 表达外源蛋白质的发酵中代替 IPTG 作为诱导剂的研究有着十分重要的现实意义。本工作以大肠杆菌 BL21(ED3)菌株为宿主菌, 研究了乳糖诱导表达克隆在 PET-22b 载体中的人 B 淋巴细胞刺激因子基因。

## 2 材料和方法

### 2.1 菌株和培养基

*Escherichia coli* BL21(ED3)含 pET-22b (Novagen)/

hBLyS 重组质粒, 由徐斌提供。

试管种子培养及二级种子培养基均选用 LB 培养基(g/L): tryptone 10, yeast extract 5, NaCl 10; 发酵罐中基础培养基为半合成培养基(g/L): glucose 2.5, tryptone 10, yeast extract 5,  $KH_2PO_4$  2,  $K_2HPO_4$  4,  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$  7,  $(NH_4)_2SO_4$  1.2,  $NH_4Cl$  0.2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2, NaCl 1, 去泡剂 0.2 mL/L; 补料液(g/L): glucose 150,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  5; 乳糖诱导液(g/L): lactose 200, yeast extract 50; IPTG 诱导液(g/L): 238.3。全部培养基 pH 值均调至 7.0, 116 °C 灭菌后加入氨苄青霉素至终浓度 100  $\mu$ g/mL。

### 2.2 试剂

Tryptone, yeast extract 购自 Oxoid 公司; IPTG, acrylamide, N'-methylene-bis-acrylamide, SDS, glycine, Tris 购自 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

### 2.3 培养方法

#### 2.3.1 种子液

挑取单菌落接种于 50 mL (250 mL 锥形瓶)含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C, 160 r/min 摇床(HYG-A 型全温摇床, 太仓市实验设备厂制造)培养 6~8 h, 使菌体生长达到对数生长期( $OD_{600} \approx 1.0$ )。

#### 2.3.2 摇瓶培养

将种子液以 4% 的接种量加入 25 mL (250 mL 锥形瓶)LB 培养基中, 37 °C, 180 r/min 摇床培养 2~4 h, 当菌体生长达到对数生长期( $OD_{600} \approx 1.0$ )时, 加入诱导剂开始诱导, 诱导后摇床转速与培养温度不变。

#### 2.3.3 发酵罐培养

批式培养: 在 5 L 生物反应器(上海保兴生物设备工程有限公司制造)中加入 LB 培养基 3 L, 116 °C 灭菌, 接种量 4%, 通气量 3 L/min。通过流加 1.5 mol/L NaOH 和

收稿日期: 2004-09-13, 修回日期: 2004-11-18

基金项目: 国家863基金资助项目(编号: 2002AA217022), 国家973基金资助项目(编号: 2003CB716002); 北京市生物加工过程实验室科学基金资助项目

作者简介: 李兆鹏(1980-), 男, 回族, 北京市人, 硕士研究生, 生物工程专业; 谭天伟, 通讯联系人, E-mail: tantw@mail.buct.edu.cn.

1.0 mol/L HCl 控制发酵液中的 pH 为 7.0. 通过调节搅拌转速为 400~500 r/min, 使溶解氧浓度保持在 30%以上. 4.5 h 后加入乳糖至最终浓度为 8 g/L 开始诱导.

分批补料培养: 2 L 半合成培养基中以 9.8%的接种量接入种子液后进行批式培养, 溶氧上升到 80%以上时开始流加补料液, 加入补料液进行补料培养. 当 OD<sub>600</sub>=35 时开始流加诱导液, 诱导外源蛋白的表达.

### 2.4 分析方法

#### 2.4.1 生物量分析

将发酵液稀释一定倍数, 测定 600 nm 波长下的吸光度 OD<sub>600</sub>, 使其为 0.2~0.4. OD<sub>600</sub>=稀释倍数×吸光度<sup>[6]</sup>.

#### 2.4.2 hBLyS 表达量分析

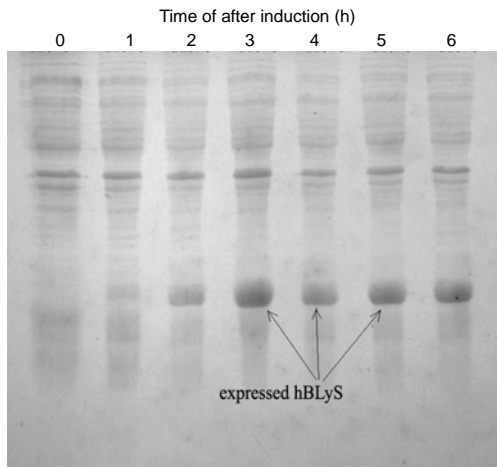
取一定量的发酵液以 12000 r/min 离心(TGL-16C

型离心机, 上海安亭科学仪器制造厂制造)10 min 后去上清, 洗涤再离心后, 按文献<sup>[7,8]</sup>的方法进行 SDS-PAGE, 丙烯酰胺浓度为 15%; 而后用 Fluor Chem 5500 凝聚成像系统(Alpha Innotech, USA)扫描凝胶, 通过成像系统自带软件分析目的蛋白占菌体总蛋白的含量, 记为 hBLyS 的表达量(%).

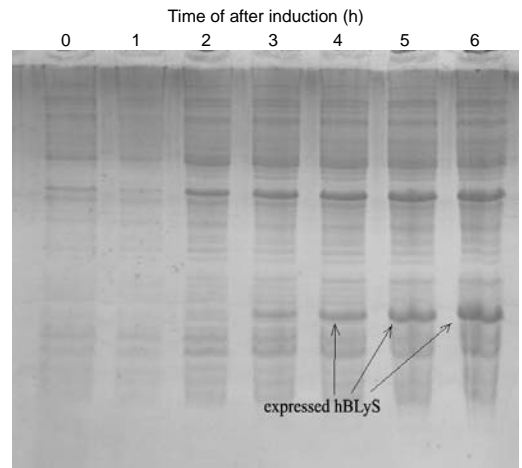
## 3 结果与讨论

### 3.1 IPTG 与乳糖诱导效果的比较

为了确定乳糖是否能够代替 IPTG 诱导表达 hBLyS, 首先比较了 IPTG 与乳糖诱导对外源蛋白表达和菌体生长的不同影响, 结果见图 1.



(a) 1 mmol/L IPTG as the inducer



(b) 8 g/L lactose as the inducer

图 1 以 IPTG 和乳糖为诱导剂诱导重组 *E.coli* 表达 hBLyS 的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of IPTG and lactose as inducer

对比 1 mmol/L IPTG 和 8 g/L 乳糖诱导的 SDS-PAGE (图 1)发现, 乳糖诱导能够得到与 IPTG 相同的条带, 并且随着诱导时间的增长, 目的条带逐渐加深. 通过软件分析, hBLyS 的表达量和生物量如图 2 所示. 在 IPTG 诱导下, 表达量迅速增加, 诱导 3 h 后达到最大值(26%); 同时生物量也达到最大值 OD<sub>600</sub>=4.0, 在随后的时间内二者均保持在最大值的水平. 而在 8 g/L 乳糖诱导下, 表达量和生物量均逐渐增长. 从图中可以看出, 乳糖诱导的 hBLyS 表达速度比 IPTG 慢, 且最终表达量(13.1%)仅达到 IPTG 诱导水平的 50%. 在发酵 8 h 左右, 乳糖诱导下的生物量超过了 IPTG 诱导下的生物量, 说明乳糖诱导对于菌体的生长有一定的促进作用.

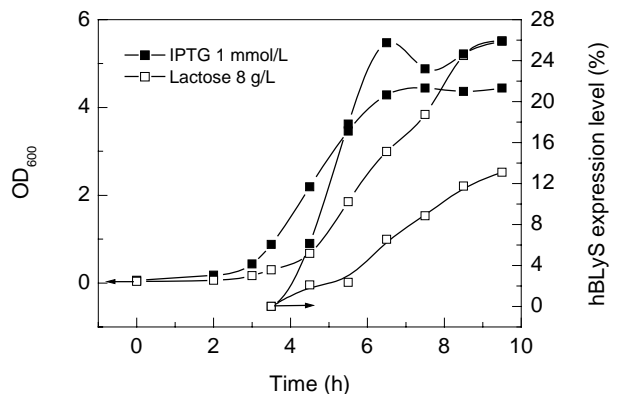


图 2 IPTG 或乳糖诱导的重组 *E. coli* 生长和 hBLyS 表达动力学  
Fig.2 The growth and expression kinetics using IPTG or lactose as inducer

### 3.2 乳糖浓度对诱导结果的影响

在确定乳糖能够诱导表达 hBLyS 的基础上, 为进一步确定合适的乳糖诱导浓度, 分别以 0~20 g/L 不同浓度的乳糖进行诱导。

从图3可以看到, 相对于空白实验, 浓度为 1~20 g/L 的乳糖诱导下均有目的条带表达(箭头所指)。经软件分析, hBLyS 的表达量和生物量如表1所示。在诱导前生物量近似相同( $OD_{600} \approx 1$ )的情况下, 随着乳糖浓度的增加, 诱导 5 h 后的  $OD_{600}$  值也随之增加, 在乳糖浓度为 8 g/L 时达到最大值(5.16), 这说明乳糖能够促进菌体的生长; 但乳糖浓度大于 8 g/L 时诱导 5 h 后的  $OD_{600}$  值缓慢下降, 这可能是高浓度乳糖对菌体的生长有一定的抑制作用。同样, hBLyS 表达量随乳糖浓度增长的趋势同生物量变化的趋势类似, 只是最大值(14.3%)出现在乳糖浓度为 4 g/L 时。这说明乳糖能够促进 hBLyS 的表达, 但过高的浓度有抑制效应。

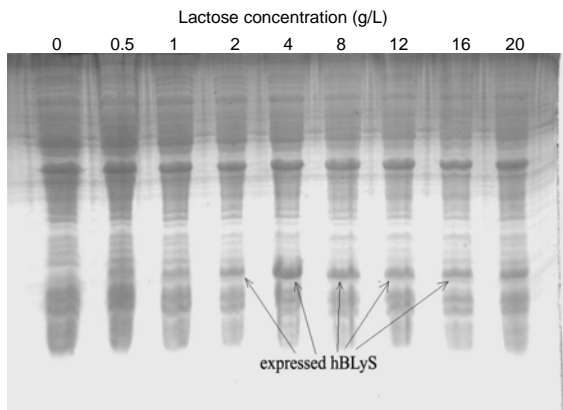


图3 不同浓度乳糖诱导下的 SDS-PAGE  
Fig.3 SDS-PAGE of lactose as inducer with different concentrations

表1 不同浓度乳糖的诱导结果

Lactose (g/L)	$OD_{600}$ before induction	$OD_{600}$ induction after 5 h	hBLyS expression level (%)
0	0.99	2.03	0
0.5	0.99	2.34	4.2
1	1.01	2.57	6.23
2	1.03	3.27	8.63
4	1.03	4.43	14.3
8	1.05	5.16	11.3
12	1.02	4.97	9.53
16	1.04	4.55	9.17
20	1.04	4.48	8.57

### 3.3 批次发酵培养

在摇瓶实验的基础上, 在 5 L 发酵罐内, 采用 LB 培养基, 进一步进行了重组 *E. coli* 表达 hBLyS 批次发酵培养, 结果如图4所示。

加入 8 g/L 乳糖后, 外源蛋白开始表达, 表达量逐

渐增加。生物量的增长有所减慢, 这可能是由诱导后表达外源蛋白所产生的新陈代谢负担所引起的, 诱导后 3 h 生物量增长速度加快, 诱导后 8 h  $OD_{600}$  值达到 7.5, 同时 hBLyS 的表达量约为 9%。从图中可以看出, 在批次培养中, 加入乳糖能够诱导目的蛋白的表达, 同时生物量得到较大的提高(从诱导前  $OD_{600}=2.5$  到最终  $OD_{600}=7.5$ )。

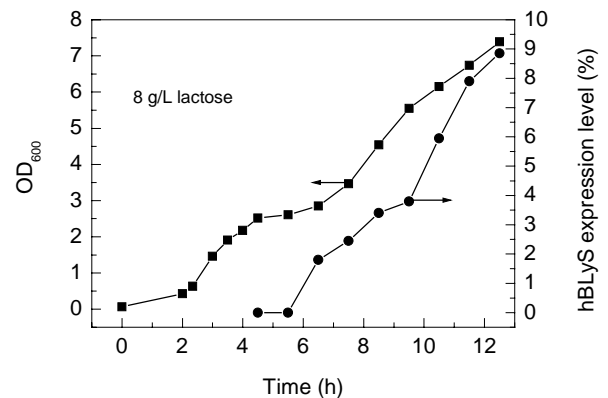


图4 批次培养中的生物量与表达量  
Fig.4 Batch culture with LB medium

### 3.4 分批补料发酵培养

进一步进行了重组 *E. coli* 表达 hBLyS 的高密度培养实验。首先流加限制性底物甘油, 随着生物量的增长和残糖的积累, 逐步提高补料速率, 提高生物量, 当生物量达到  $OD_{600}=35$  时, 加入乳糖开始诱导。由摇瓶实验结果可知, 高浓度乳糖存在抑制效应, 故乳糖的加入采用流加的方式, 且速率恒定为 15 mL/h, 共加入 500 mL, 使乳糖总浓度为 25 g/L, 结果如图5所示。

由图可知, 随着限制性碳源—甘油的加入,  $OD_{600}$  值线性增加, 比生长速率保持在  $0.2 \text{ h}^{-1}$  左右。在诱导前的 1 h 停止补料, 消耗掉残留的碳源。加入乳糖诱导后, 生物量继续增长, 这说明一部分乳糖被分解为葡萄糖与半乳糖, 作为碳源供给细菌生长; 另一部分乳糖进一步异构化为异构乳糖, 诱导外源蛋白的合成。诱导后生物量继续增长, 比生长速率继续保持在  $0.05 \text{ h}^{-1}$  左右, hBLyS 表达量逐渐增加, 在 62 h, 生物量与 hBLyS 表达量同时达到最大值:  $OD_{600}=62$ , hBLyS 表达量为 16%, 这说明乳糖的加入在诱导目的蛋白表达的同时能够促进菌体的生长。hBLyS 最终表达量为 16%, 虽然不及摇瓶中 IPTG 诱导的表达量(26%), 但已超过摇瓶中乳糖诱导的表达量(14.3%), 并且在 5 L 发酵罐中生物量 ( $OD_{600}=62$ ) 大大超过了摇瓶中 IPTG 诱导的生物量 ( $OD_{600}=4.0$ )。

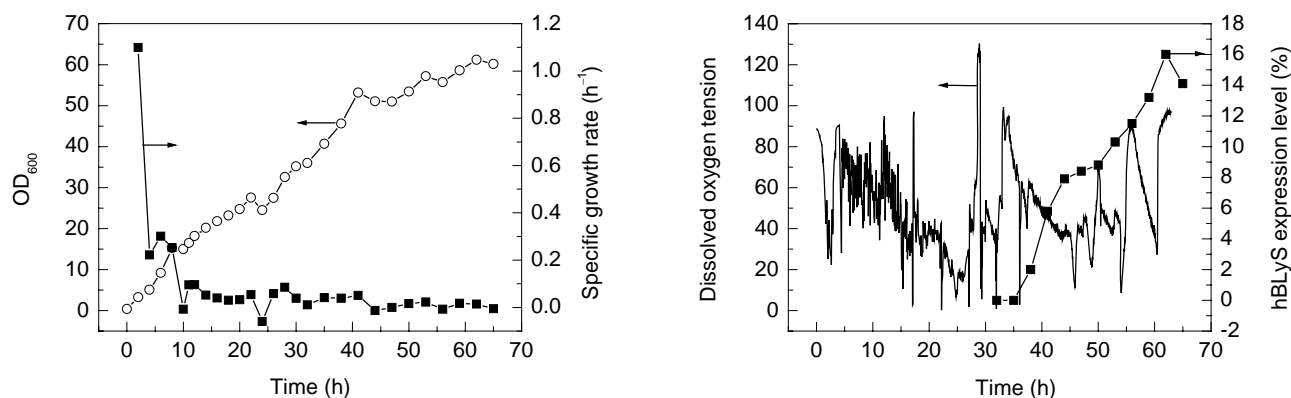


图5 分批补料培养结果  
Fig.5 Results of fed-batch culture

## 4 结论

(1) 本工作采用乳糖为诱导剂, 初步实现了重组大肠杆菌的高密度发酵及 hBLyS 的表达, 发现乳糖不仅能够诱导外源蛋白的表达, 还能够作为碳源促进菌体的生长; 但过高的浓度会有抑制效应, 这种抑制效应可以通过采用流加乳糖的方法克服。

(2) 在摇瓶中 hBLyS 的最大表达量为 14.3%, 达到 IPTG 的诱导水平(26%)的 55%, 结果表明乳糖可以代替 IPTG 作诱导剂, 但诱导效果不及 IPTG。

(3) 在 5 L 发酵罐中通过补料使 hBLyS 表达量达 16%, 同时生物量  $OD_{600}=62$ 。在发酵罐中乳糖诱导的时机还需进一步优化, 以提高产率。

(4) 虽然乳糖的诱导效果不及 IPTG, 但考虑到乳糖能够作为碳源促进生物量的提高, 并且其价格上具有很大的优势, 所以在重组大肠杆菌高密度发酵表达外源蛋白的产业化上有着良好的应用前景。

### 参考文献:

[1] 吴一凡, 张双全. B 淋巴细胞刺激因子 BLyS 研究进展 [J]. 生物化

学与生物物理进展, 2001, 28(5): 658-661.

[2] 杜秋丽, 张双全, 刘晓宇. 重组人 B 淋巴细胞刺激因子原核表达条件的优化 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2001, 24(2): 69-73.

[3] 戴君勇, 张双全, 刘平. 人 B 淋巴细胞刺激因子的真核表达以及表达条件的筛选 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2001, 24(2): 87-90.

[4] Kweon D H, Han N S, Park K M, et al. Overproduction of Phytolacca Insularis Protein in Batch and Fed-batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* [J]. Process Biochem., 2001, 36(6): 537-542.

[5] Woyski D, Jill R C V. Enhanced Expression of Cytochrome P450s from Lac-based Plasmids Using Lactose as the Inducer [J]. Arch. Biochem. Biophys., 2001, 388(2): 276-280.

[6] Srivastava M, Nayak J, Mehrotra V, et al. High Level Expression in *Escherichia coli* and Purification of Immunoreactive Recombinant Bonnet Monkey Zoon Pellucida Glycoprotein-3 [J]. Process Biochem., 1999, 35(5): 451-457.

[7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南, 第二版 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1996. 333-341.

[8] Steven D D, Lisa M O'Sullivanb, Sejal P, et al. Large Scale Production of Cyclohexanone Monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239 [J]. Enzyme Microb. Technol., 2001, 28(2): 265-274.

## Expression of Hblys in the *E. coli* High Cell Density Culture Using Lactose as an Inducer

LI Zhao-peng<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, XU Bin<sup>2</sup>, SONG Li-hua<sup>2</sup>, TAN Tian-wei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Anhui Anke Biotechnology Co., Ltd., Hefei, Anhui 230088, China)

**Abstract:** B lymphocyte stimulator (BLyS) is a recently identified member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily, which stimulates B lymphocyte's proliferation and differentiation. The process of expression of hBLyS (human B Lymphocyte cell stimulator) gene under the control of T7 promoter in *Escherichia coli* was investigated. Lactose was used as an inducer instead of the expensive nonmetabolizable analog of lactose, IPTG. IPTG is satisfactory for small-scale expressions, but not suitable for large-scale fermentations due to its high cost. It was found that lactose could induce foreign protein expression and enhance cell growth during the induction period. Through proper optimization of culture and induction conditions, an expression level near 14.3% of total cellular protein was achieved in the shake flask. This hBLyS expression level reached about 55% of the level (26%) with IPTG as inducer. And in 5 L fermentor, a high cell density  $OD_{600}=62$  and high expression level of hBLyS about 16% of the total cell protein were obtained.

**Key words:** *E. coli*; lactose; IPTG; hBLyS