

## 发酵条件对细菌工程菌产 WSSV-VP37 的影响

张秀丽<sup>1,2</sup> 杨 啸<sup>1</sup> 刘庆慧<sup>1\*</sup> 马璀艳<sup>1</sup> 黄 捷<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>青岛科技大学, 266042)

**摘要** 在 pBAD/gIII A-VP37 重组表达载体构建的基础上, 研究发酵工艺参数对重组 WSSV-VP37 (rVP37) 蛋白表达量的影响, 并对重组质粒的稳定性和重组菌的生长进行研究。结果表明, pBAD/gIII A-VP37 表达的 rVP37 以包涵体形式存在于菌体中, 发酵温度及诱导时间影响 rVP37 蛋白表达和菌体产量, 以 37 °C 诱导 5h 最佳。重组质粒在宿主菌中具有良好的分离稳定性, WSSV-VP37 基因的插入对宿主菌的生长规律影响不大。

**关键词** 发酵条件 重组 VP37 蛋白表达

**中图分类号** S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0060-06

## The effect of fermenting procedure on recombinant WSSV-VP37 expression

ZHANG Xiu-li<sup>1,2</sup> YANG Xiao<sup>1</sup> LIU Qing-hui<sup>1\*</sup>

MA Cui-yan<sup>1</sup> HUANG Jie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboorary for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Aqriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>Scientific Technology of Qingdao, 266042)

**ABSTRACT** The effect of fermenting procedure on WSSV-VP37 expression and the stability in recombinant pBAD/gIII A-VP37 was studied. The result showed that recombinant VP37 (rVP37) protein was expressed in inclusion body. The temperature and incubation time of fermentation affected the production of rVP37. The best results were attained by incubation for 5h at 37 °C. The recombinant plasmid had excellent stability in Top10. And the study also showed that transformation of WSSV-VP37 gene had little effect on the growth of host cells.

**KEY WORDS** Fermenting procedure Recombinant VP37 Protein expression

对虾白斑综合征病毒(WSSV)是危害全球对虾养殖业的主要病源生物之一。至今已造成了巨大的经济损失,同时也给海洋生态平衡带来了一定的威胁。自1992年以来,已经对该病毒及对虾白斑综合征进行了大量的研究。目前,还未弄清楚 WSSV 致病的分子机理,没有找到有效的措施防治白斑综合征。

由于从感染对虾组织中难以获取大量的 WSSV 蛋白,因此采用高效表达系统以制备大量的 WSSV 蛋白,

国家高技术发展计划项目(2006AA100312)、国家重点基础研究项目(2006CB101801)和国家自然科学基金项目(30871942)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期:2007-12-13; 接受日期:2008-05-29

作者简介:张秀丽(1986-),女,硕士研究生,主要从事生物工程研究。E-mail: xiuli68@126.com

对于揭示 WSSV 侵染和复制机制,开发抗病毒药物具有重要意义。基因工程菌发酵过程中,影响外源蛋白生产的因素有很多,如质粒复制数、转录及转移效率、mRNA 及重组质粒的稳定性等。基因工程菌发酵生产目的是希望获得大量的外源基因产物,尽可能减少宿主细胞本身蛋白的污染,实现基因工程菌的工业化生产。除了构建高效的载体-宿主系统外,基因工程菌的发酵过程控制也十分重要。本文在 pBAD/gIII A-VP37 大肠杆菌表达系统构建的基础上,研究发酵工艺参数对 rVP37 蛋白表达量的影响,优化发酵工艺参数,并进一步研究重组质粒的稳定性以及重组菌生长曲线,为规模制备 WSSV-VP37 重组蛋白提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

*Escherichia coli* Top10,载体 pBAD/gIII A,外源基因为 WSSV-VP37, *E. coli* TOP10 /pBAD/gIII A-VP37 由黄海水产研究所水生动物疾病与病原分子生物学实验室保存。

#### 1.1.2 培养基

平板培养基为 LB 培养基 (0.5 % 酵母提取物,1 % 蛋白胨,0.5 % NaCl),并添加 2 % 琼脂及 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Amp;液体培养基为 LB 培养基。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 摇瓶发酵方法

取 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存的由本实验室构建并保存的 rVP37 菌株无菌条件下接种于 Amp 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LB 固体培养基上,30  $^{\circ}\text{C}$  下培养过夜。次日从平板上挑单菌落接入到 1 ml LB 培养基中,120 r/min 摇菌过夜。按 1 % 的量,接入 LB 液体培养基(Amp 浓度为 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 4 h 至 OD 达 0.5~0.6,然后加入终浓度为 0.02 % 的 L-阿拉伯糖分别在 25、30 和 37  $^{\circ}\text{C}$  进行诱导。每过 1、2、3、4、5 和 6 h 取样 1 次,样品 10 000 r/min 离心 2 min,分别收集上清和沉淀(菌体),菌体裂解离心得到的沉淀中含有包涵体,进行 SDS-PAGE 分析 rVP37 表达,沉淀称重。同时以空载体 pBAD/gIII A 为对照。

#### 1.2.2 SDS-PAGE 分析

不连续 SDS-PAGE 采用 Laemmli 系统,分离胶 12 %,浓缩胶 5 %。采用的蛋白质分子量标准为兔磷酸化酶 B(97.4kD)、牛血清白蛋白(66.2kD)、兔肌动蛋白(43kD)、牛碳酸酐酶(31kD)、胰蛋白酶抑制剂(20.1kD)和鸡蛋清溶菌酶(14.4kD)。

#### 1.2.3 Western-blot 分析

采用 Laemmli 系统,分离胶 12 %,浓缩胶 5 %,将纯化后的样品、重组菌及空载体电泳,丽春红染色,标记 Marker,脱色。将 SDS-PAGE 凝胶转印 PVDF 膜,5 % 脱脂奶粉封闭洗涤后,加入 HRP-Anti-His 抗体,孵育洗涤后,加入 DAB 进行显色反应。

#### 1.2.4 表达量的检测

采用 Bradford 法(奥斯伯等 1998)及电泳扫描法,测定波长为 595 nm 时,不同浓度的标准蛋白的光密度值,绘制标准曲线,测定样品的光密度值,计算总蛋白含量。同时进行 SDS-PAGE,凝胶扫描,计算机分析测定表达蛋白百分含量,根据蛋白浓度推算其表达量。

#### 1.2.5 重组质粒稳定性检测

质粒分离稳定性的检测采用平板稀释计数法和平板点种法,将重组菌在非选择性液体培养基中连续培养,在不同时间取等体积分别涂固体培养基和非选择性培养基平板,30  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 18 h,将选择性培养基中的菌落数与非选择性培养基中的菌落数进行比较,计算出质粒的缺失率;同时随机挑取在非选择培养基上生长的菌落,分别点种在对应的选择性培养基和非选择性培养基平板上,比较两种平板中菌落数,验证质粒的缺失率。在不同时间的选择培养基上挑出菌体提取质粒进行凝胶分析,检测重组质粒的结构稳定性。

### 1.2.6 重组菌生长曲线的测定

将受体菌 Top10 和重组菌接种到液体 LB 培养基中培养,定时取样测 OD<sub>600</sub>。

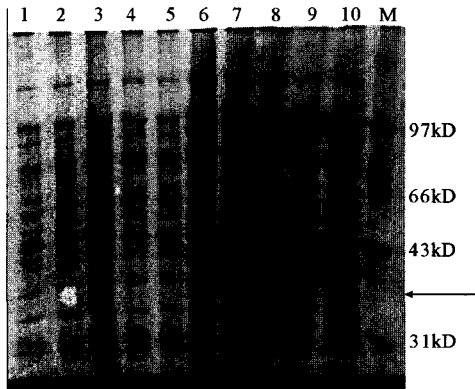
### 1.2.7 细胞光密度(OD<sub>600</sub>)分析

菌液稀释后于波长 600 nm 处,以 LB 培养基为空白对照,进行比色测定。OD<sub>600</sub> = OD 读数 × 稀释倍数

## 2 结果

### 2.1 pBAD/gIII A-VP37 蛋白的表达

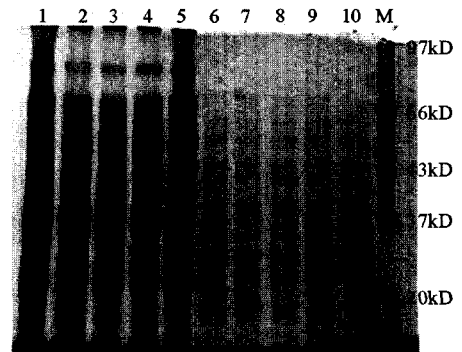
重组体 pBAD/gIII A-VP37 经 L-阿拉伯糖诱导后,分别检测菌体上清和包涵体中目的蛋白的表达情况,结果见图 1 和图 2。图 1 结果表明,诱导前空载体及重组载体均无目的蛋白表达,L-阿拉伯糖诱导后,重组体(泳道 7-10) rVP37 明显表达(图 1 箭头所示目的蛋白),而诱导后的空载体无 rVP37 表达,初步表明 rVP37 蛋白获得表达。图 2 显示 L-阿拉伯糖诱导前后包涵体上清 SDS-PAGE 分析结果,对比诱导前后空载体及重组体蛋白的表达,未有目的蛋白的表达,表明 pBAD/gIII A-VP37 表达的 rVP37 以包涵体形式存在,其表观分子量约为 37kD。



诱导前:1.空载体,2,3,4,5,重组体,诱导后:  
6.空载体,7,8,9,10,重组体,M:Marker  
Before induction: Lane 1. Empty vector, Lane 2, 3,  
4, 5. recombinant; After induction: Lane 6, Empty  
vector, Lane 7, 8, 9, 10, Recombinant

图 1 菌体裂解后沉淀的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of cell  
after cracking precipitation



诱导后: 1.空载体,2,3,4,5,重组体;诱导前:  
6.空载体,7,8,9,10,重组体

After induction: Lane 1. Empty vector, Lane  
2, 3, 4, 5, recombinant; Before induction: Lane  
6. Empty vector, Lane 7, 8, 9, 10, recombinant

图 2 菌体裂解后上清 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of cell after  
cracking precipitation

### 2.2 Western blotting 鉴定

为进一步验证表达的目的蛋白,将 L-阿拉伯糖诱导后的含有重组体 pBAD/gIII A-VP37 的菌体裂解与含有空载体 pBAD/gIII A 进行 SDS-PAGE 分析,然后电转移至 PVDF 膜上,以 Anti-His-HRP 为抗体,进行 Western 印迹反应,结果显示,表达的 rVP37 能与 Anti-His-HRP 抗体发生特异性反应,而空载体表达的蛋白无此反应,进一步表明该融合蛋白含有 His 标签,表达出目的蛋白(图 3)。

### 2.3 发酵温度和时间对重组菌体产量的影响

由于 rVP37 蛋白在包涵体中表达,因此富含包涵体的湿菌体重量直接影响包涵体中蛋白的表达量。为此将重组体分别在 25、30 和 37 °C 诱导,分析不同诱导时间下菌体重量,结果见图 4。由图 4 可见,随着诱导后发酵时间的增加,菌体重量逐渐增加,37 °C 诱导后发酵 4 h 时,菌体重量达最大,30 °C 发酵 4 h 后,菌体量不再增

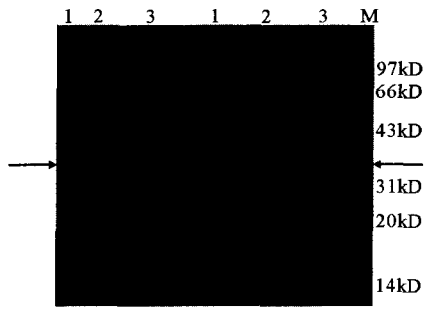


图 A: Western blotting analysis. 1、空载体, 2、重组体, 3、纯化的 rVP37

图 B: SDS-PAGE analysis. 1、空载体, 2、重组体, 3、纯化的 rVP37 Gel A: Western blot analysis.

1. Empty vector, 2. Recombinant, 3. Purified rVP37. Gel B: SDS-PAGE analysis.

1. Empty vector, 2. Recombinant, 3. Purified rVP37

图 3 Western blot 分析表达 rVP37

Fig. 3 Analysis of rVP37 by Western blot

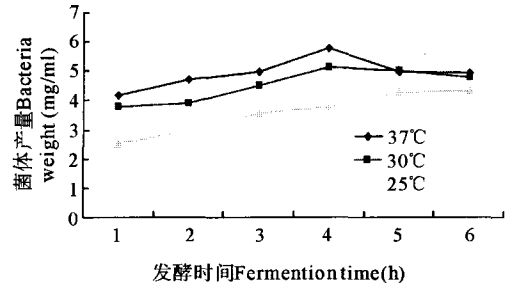


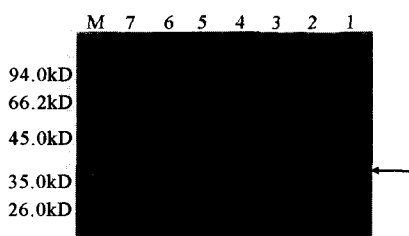
图 4 发酵时间对菌体产量影响

Fig. 4 Induction time on weight of bacteria

加,而 25 °C 诱导后发酵 5h,菌体量变化不大。仅从菌体产量考虑,以 37 °C 诱导后发酵 4 h 时或 30 °C 诱导后发酵 4 h 为佳。

### 2.4 温度及诱导时间对 rVP37 蛋白表达量的影响

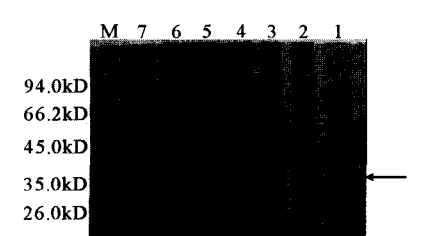
rVP37 蛋白的产生与诱导时间显著相关,随着诱导时间的延长,rVP37 的表达量显著增加(图 5、图 6 和图 7)。在 25 °C,当诱导 4h 以后,目的蛋白的表达量明显增加,至诱导 6h,rVP37 蛋白的表达量最大(图 5)。电泳凝胶灰度扫描分析诱导表达 4、5 和 6 h 后的 SDS-PAGE 图像,结果表明,重组蛋白的表达量分别约占菌体总蛋白的 7.3 %、10.6 % 和 11.7 %。在 30 °C,当诱导 4 h 以后,rVP37 表达量快速增加,而诱导 5 和 6 h,rVP37 表达量变化不大(图 6),电泳凝胶灰度扫描分析诱导表达 4、5 和 6 h 后的 SDS-PAGE 图像,结果表明,重组蛋白的表达量分别约占菌体总蛋白的 17.9 %、19.3 % 和 19.6 %。在 37 °C,诱导表达 4、5 和 6 h 目的蛋白表达量分别约占菌体总蛋白的 18.6 %、20.8 % 和 20.6 %。因此从目的蛋白表达量考虑,在 30 °C 诱导 5h 或 37 °C 诱导 5h 较好。综合发酵温度和时间对重组菌体产量及蛋白表达量两因素评价,以 37 °C 诱导 5 h 最佳。



1. 诱导 1 h, 2. 诱导 2 h, 3. 诱导 3 h, 4. 诱导 4 h, 5. 诱导 5 h, 6. 诱导 6 h, 7. 空载体, M. Marker  
1. Induction 1 h, 2. Induction 2 h, 3. Induction 3 h, 4. Induction 4 h, 5. Induction 5 h, 6. Induction 6 h, 7. Empty vector, 8. Marker

图 5 SDS-PAGE 分析不同诱导时间 rVP37 表达(25 °C)

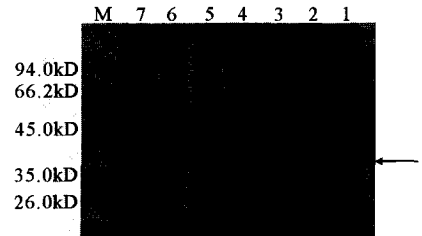
Fig. 5 SDS- PAGE analysis of expressed rVP37 at different induction time (25 °C)



1. 诱导 1 h, 2. 诱导 2 h, 3. 诱导 3 h, 4. 诱导 4 h, 5. 诱导 5 h, 6. 诱导 6 h, 7. 空载体, M. Marker  
1. Induction 1 h, 2. Induction 2 h, 3. Induction 3 h, 4. Induction 4 h, 5. Induction 5 h, 6. Induction 6 h, 7. Empty vector, 8. Marker

图 6 SDS-PAGE 分析不同诱导时间 rVP37 表达(30 °C)

Fig. 6 SDS- PAGE analysis of expressed rVP37 at different induction time (30 °C)



1. 诱导 1 h, 2. 诱导 2 h, 3. 诱导 3 h, 4. 诱导 4 h, 5. 诱导 5 h, 6. 诱导 6 h, 7. 空载体, M. Marker  
1. Induction 1 h, 2. Induction 2 h, 3. Induction 3 h, 4. Induction 4 h, 5. Induction 5 h, 6. Induction 6 h, 7. Empty vector, 8. Marker

图 7 SDS-PAGE 分析不同诱导时间 rVP37 表达(37 °C)

Fig. 7 SDS- PAGE analysis of expressed rVP37 at different induction time (37 °C)

### 2.5 重组 pBAD/gIII A-VP37 外源基因的稳定性研究

研究表明,大肠杆菌工程菌在摇瓶培养时,每 12 h 菌数增加 100~150 倍,约繁殖 7 代(邱晓颖等 1998),

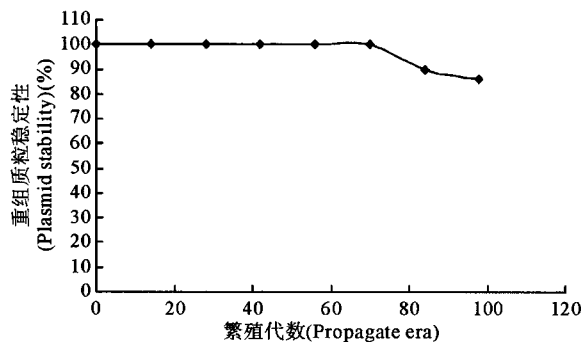


图8 重组质粒 pBAD/gIII-VP37 稳定性分析

Fig.8 Stability of recombinant pBAD/gIII-VP37

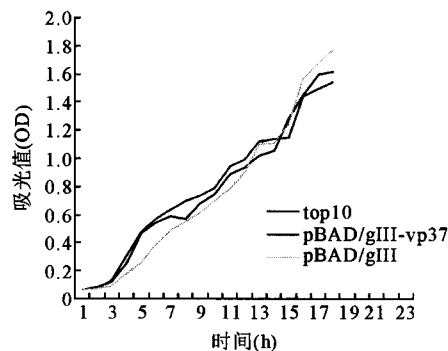


图9 基因工程菌 Top 10/pBAD/gIII A-VP37 生长曲线

Fig.9 Growth curve of Top 10/pBAD/gIII A-VP37

据此对质粒稳定性进行研究。由图8中可以看出重组质粒在宿主菌中分离稳定性较好,在没有选择压力下(Amp),质粒缺失率较低,经过约80代繁殖只有10%的缺失率。

## 2.6 重组 Top10/pBAD/gIII A-VP37 生长曲线

外源基因的引入对宿主菌 Top10 的生长是否有影响,这是基因工程菌表达外源基因的一个不可忽略的问题。将受体菌 Top10 和重组菌 Top10/pBAD/gIII A-VP37 以及无目的基因的 Top10/pBAD/gIII A 接种到新鲜 LB 培养基中培养,定时取样测定其 OD<sub>600</sub>,结果见图9。由图9中可以看出,重组菌与其受体菌的生长曲线相近,二者都在约17 h以后进入生长的稳定期。在对数生长前期,重组菌的 OD<sub>600</sub> 略大于受体菌 Top10,但在对数生长后期,后者的生长又略优于前者,但总的来说,WSSV-VP37 基因的插入对宿主菌的生长规律影响不大。

## 3 讨论

利用基因重组技术构建的基因工程菌的发酵工艺不同于传统的发酵工艺,生物工程菌发酵的目的是希望获得大量的外源基因产物,尽可能减少宿主细胞本身蛋白的污染。外源基因的高水平表达不仅涉及宿主、载体和目的基因三者的相互关系,而且与其所处环境的条件也密切相关(柴家前等 2000; Sambrook *et al.* 2001)。因此,需要对影响外源基因表达的因素进行分析,探索适合外源基因表达的发酵工艺。重组大肠杆菌的高密度发酵,可降低生产成本、提高生产效率(苏英剑等 1998)。理论上菌体光密度值(OD<sub>600</sub>)值越高,生物量越大,则表达量也越大,但考虑到过高的菌体密度会限制培养基中氧和营养物质的供给,也可能对外源蛋白的溶解性和稳定性等产生影响,故而应针对不同的目的蛋白确定发酵密度(苏英剑等 1998)。作者通过对 pBAD/gIII A-VP37 发酵条件的优化研究,发现温度与诱导时间是影响本实验 rVP37 蛋白表达量最为明显的因素。诱导温度为 25 °C 时,菌体产量以及 rVP37 蛋白表达量显著低于 30 °C 和 37 °C。在同一温度下的诱导初期(1~3 h),菌体产量及 rVP37 表达量较低,诱导 4~5 h,菌体产量达平台期,rVP37 蛋白表达量明显增加,诱导 6 h,rVP37 表达量不再增加。

基因工程菌由于被插入的外源蛋白基因不同(如外源蛋白分子大小、氨基酸组成和比例等)、外源蛋白基因插入宿主菌的位置不同(如宿主菌的染色体和质粒等)和载体的构建方式不同(如外源基因拷贝数多少、引导序列的种类和启动子的不同),因而在相同条件下,其生长规律并不相同。外源基因的引入对宿主菌的生长是否有影响,这是基因工程菌表达外源基因的一个不可忽略的问题。对重组菌生长规律研究表明,外源基因的引入对受体菌影响不大。

基因工程菌的质粒稳定性是决定其有无应用价值的重要因素。重组质粒引入宿主后,引起宿主细胞和重组质粒之间的相互作用,在一定的环境中,其结果是在重组质粒表达或不表达,因此一个组建成的工程菌稳定与否,取决于重组质粒本身的分子组成,宿主细胞生理和遗传性及环境条件 3 个方面。对重组质粒分离稳定性

研究表明,在 80 代前培养中,重组质粒缺失的速度较缓慢,而随后的培养中质粒缺失的速度接近 20%。

研究表明,WSSV-VP37 为 WSSV 的一个粘附蛋白,在 WSSV 与宿主相互作用中起重要作用(Liang *et al.* 2005;Liu *et al.* 2006)。但由于较难从 WSSV 中纯化得到 VP37,因此采用基因表达的方法获得 WSSV-VP37。pBAD/gIII A 为一种分泌型表达载体,其表达异源蛋白可分泌到培养基中,通过对重组质粒 pBAD/gI-IIA-VP37 表达产物进行 SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析,结果表明,VP37 以包涵体形式表达。蛋白在包涵体内表达与蛋白本身的理化指标即:电荷平均数、转变形成的残基组分、半胱氨酸组分、脯氨酸组分、亲水性和残基总数密切相关。重组蛋白在表达宿主 *Escherichia coli* 中往往以无生物活性的不溶性聚合体的包涵体形式存在。一般认为,包涵体形成的原因是由于表达水平过高所致,即使大肠杆菌自身的蛋白质在高效表达时也会形成包涵体。包涵体致密的结构形成空间障碍,防止被蛋白酶降解。

## 参 考 文 献

- 李会成,李文辉,郭 军,刘利民. 1997. 基因工程菌的发酵研究. 生物工程进展, 17(2):40~44
- 邱晓颖,朱红惠,卢秋雁,丘元盛. 1998. 质粒 PMC73A 在宿主细菌中的稳定性研究. 高技术通讯,16(6):52~55
- 苏英剑,张新波,周 筠. 1998. 工程菌高密度发酵工艺简述. 山东医药工业,17(3):27~31
- 柴家前,陆庆泉,沈志强,刘吉山. 2000. 大肠杆菌高密度发酵研究进展. 中国预防兽医学报, 22(6):471~474
- 奥斯伯, R. 布伦特. 1998. 精编分子生物学试验指南. 北京:科学出版社
- Liang, Y., Huang, J., Song, X. L., Zhang, P. J., and Xu, H. S. 2005. Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. *Dis Aquat Organ.* 66(1): 81~85
- Liu, Q. H., Huang J., Hang, W. J., Liang Y., Lu, C. L., and Wang Q. Y. 2006. Expression, purification and characterization of WSSV-VP37 in *Pichia pastoris*. *Aquaculture*, 258(1-4):55~62
- Sambrook, J., and Russel, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Press, 636~644