

生物反应器中表达 ScFv 大肠杆菌细胞自溶的分析

胡卫国^{1,2,3}, 安展飞^{1,2,3}, 刘秀霞^{1,2,3}, 戴晓峰^{1,2,3}, 杨艳坤^{*1,2,3}, 白仲虎^{1,2,3}

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 表达外源蛋白细菌培养过程中的细胞自溶现象是一个普遍性的过程工程问题。在相同发酵培养条件下, 研究生物反应器中大肠杆菌 W3110 表达全人源化单链抗体片段 (Single chain antibody fragments, ScFv) 工程菌和野生菌的外源蛋白表达及细胞活性的差异, 发现外源蛋白高效表达并积累在细胞内, 大部分活细胞较野生菌提前 6 h 进入活着但不可培养 (Viable but nonculturable, VBNC) 状态, 进而发生细胞自溶。分析工程菌与野生菌中胁迫应激和自溶途径基因转录水平表达谱, 发现外源蛋白表达过程中热激途径 *rpoH*, *dnaK*, *dnaJ*, *groEL*, *groES*; 酸胁迫途径 *rpoS*, *gadE*, *gadX*; 氧胁迫途径 *sodA*, *katE* 均出现表达波峰, 而发酵罐中细胞自溶过程中外膜蛋白基因 *ompA*, *ompC*, *ompW*, *ompX* 表达量显著下降, 但 *rpoE* 并未出现持续高表达。这些发现为后续 ScFv 表达宿主细胞抗胁迫和自溶控制策略提供了新思路。

关键词: 工程菌细胞自溶; 活的不可培养状态; σ^E 途径; 胁迫应激; 生物反应器

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)09—0978—09

Cell Lysis Analysis of *E.coli* Expressing ScFv in Bioreactor

HU Weiguo^{1,2,3}, AN Zhanfei^{1,2,3}, LIU Xiuxia^{1,2,3}, DAI Xiaofeng^{1,2,3}, YANG Yankun^{*1,2,3}, BAI Zhonghu^{1,2,3}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cell lysis is a process problem in the protein expression using bacterial host. Under the same fermentation condition, the differences in the expression of foreign protein and cell activity between engineered and wild-type *Escherichia coli* W3110 expressed by the humanized single antibody fragments (ScFv) were studied. The results showed that high expression and accumulation of heterologous protein in the engineered *E. coli* cells were found, most living cells entered viable but nonculturable (VBNC) state 6 h in advance and the occurrence of cell lysis compared with wild-type. Through the analysis of transcription levels of both *E. coli*, we found that the process of ScFv expression causing overshoot phenomenon of multiple stressed responses pathway genes included *rpoH*, *dnaK*, *dnaJ*, *groES*, *groEL* in heat stress response pathway, *rpoS*, *gadE*, *gadX* in acid

收稿日期: 2014-11-29

基金项目: 国家 973 计划项目(2013CB733602); 中央高校基本科研业务费专项项目(JUSRP51401A); 江苏高校优势学科建设工程项目。

* 通信作者: 杨艳坤(1978—), 男, 河北石家庄人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物学、基因工程、分子遗传、蛋白质的分离纯化等方面的研究。E-mail: yangyankun@jiangnan.edu.cn

stress response pathway, *sodA*, *katE* in oxygen stress response pathway. However, during cell lysis process in the fermentation tank, the expression of membrane protein gene *ompA*, *ompC*, *ompW*, *ompX* was significantly decreased, but *rpoE* did not appear to continue to be high expression. These findings provide us new ideas to improve the resistance of engineering bacteria cells and control cells lysis.

Keywords: engineering cell lysis, VBNC, σ^E pathway, stress response, bioreactor

随着现代基因工程的发展进步,大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)高效表达 ScFv 已经实现工业化生产^[1]。为了收获高浓度高质量的产品,此类外源蛋白质的工业化生产通常采用分批补料培养方式实现高密度发酵培养并要求外源蛋白质高效表达^[2-3]。但由于生物反应器中培养环境复杂多变,以及不同外源蛋白质表达过程中基因和蛋白质层次非常复杂,表达外源蛋白细菌大规模发酵生产过程中常出现不可预测的细胞自溶现象。

众所周知,外源蛋白质表达会导致细胞生理缺陷,在一定程度上对宿主细胞产生毒性和代谢负担,降低细胞活性,有效生物合成代谢所需的能量减少^[4-6]。而要进一步了解生物反应器中重组菌细胞遭受的外源蛋白质表达胁迫对细胞自溶的影响,需要了解外源蛋白质表达与大肠杆菌宿主自身的胁迫应激机制和自溶机制之间的关联。

现在已广泛认为大肠杆菌经过长期进化已经形成复杂精确的胁迫应激机制,如热胁迫应激、酸胁迫应激途径、氧胁迫应激途径,它们通过调节蛋白复合物重构和磷酸化的信号传导系统来适应外界/内部的多种多样的刺激,包括温度、pH、渗透压、营养物质浓度和细胞内产生的次级代谢产物,或者周质空间外源蛋白错误折叠积累等^[7-9]。最新的研究发现,大肠杆菌内存在类似于真核组织细胞凋亡的程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD)机制,调控细胞死亡及自溶的发生过程^[10]。Murata 等^[11-12]基于摇瓶培养发现了一条 σ^E 引导的大肠杆菌细胞自溶途径,其被认为是细胞应对不利环境或遭受胁迫时的一种内在生存策略。即 *E. coli* 细胞由对数生长期进入稳定期后,或细胞受发酵过程中因环境刺激如营养缺乏,或受培养液 pH 胁迫和氧化胁迫等胁迫时,大部分细胞由“活细胞”转化为 VBNC 细胞, σ^E 引导的细胞自溶机制的启动用于清除这些 VBNC,使得活细胞最大限度利用细胞释放物来应对营养缺乏环境,以保持较长的细菌稳定期。

目前人们对细胞自溶机制的研究主要集中于摇瓶水平,在基因工程菌株表达外源蛋白质的时候,人们往往需要在生物反应器水平对其进行放大培养,以期收获更多的目的蛋白质,所以在生物反应器水平研究生物反应器中特定外源蛋白质的表达对细胞活性和自溶影响的相关机理,其意义重大。

作者以表达人源化 ScFv 分子的 *E. coli* W3110 (ATCC 39936)工程菌和野生菌为培养模型,在 5 L 生物反应器水平相同培养条件下,研究了外源蛋白质表达对细胞内胁迫和自溶相关基因表达、细胞活性、细胞自溶现象的影响,为提高大肠杆菌工程菌细胞抗性及培养过程中细胞自溶的控制问题提供基础理论依据,实现重组蛋白生产效率的最大化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 野生型 *E. coli* W3110: 作者所在实验室保存的菌种;表达 ScFv 的工程菌所用质粒 pBW: 作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 总 RNA 提取试剂、反转录试剂盒、SYBREx *Taq*TM II 定量试剂盒: TaKaLa 公司;5-氰基-2,3-二-(p-苄基-四唑氯化物)(5-cyano-2,3-ditolyt tetrazolium chloride, CTC) 活细胞染料: 美国 Polyscience 公司;5 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、胰蛋白酶: Sigma 公司;酵母提取物: 安琪酵母股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯;实验所用引物由上海生物工程公司合成。发酵罐实时荧光定量 PCR 仪: 美国产伯乐 Bio-RADiCycler CFX96TM;微量紫外分光光度计: 美国产 Quawell Q5000 型;常规分光光度计: 美国产 MAPADA UV-1800 型;台式离心机: 美国产 Thermo Scientific FRESOL-7 型;荧光显微镜: 日本产 OLYMPUS BX53F 型生物荧光显微镜。

1.1.3 培养基

1) LB 种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5,

琼脂糖 20; pH 7.0。

2) TB/SB 种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 24, KH_2PO_4 2.31, K_2HPO_4 9.58, 甘油 10; pH 7.0。

3) TB/SB 发酵培养基(g/L): 蛋白胨 24, 酵母粉 48, KH_2PO_4 2.31, K_2HPO_4 9.58, 甘油 25; pH 7.0。

4) Booster 补料培养基(g/L): 甘油 714, 酵母粉 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25。

1.1.4 培养方法 *E.coli* W3110 在 LB 平板上 37 °C 过夜培养后, 挑单菌落接种至 TB/SB 摇瓶培养基于 37 °C 培养至对数期($\text{OD}_{600}=4$), 取 100 mL 种子液接种至 2 L 的 TB/SB 发酵培养基。使用荷兰 applikon ez-control-5 L 发酵罐进行工作体积为 2 L 的分批补料发酵, 温度恒定控制在 (30 ± 0.1) °C, 通过补加体积分数 17% 磷酸或体积分数 25% 氨水维持 pH 7.0 ± 0.05 。空气流量维持在 2 L/(L·min), 必要时通入 1 L/(L·min) O_2 , 转速与溶氧联控确保溶氧体积水平达到发酵罐中饱和溶氧的 30% 左右。在快速生长阶段末期(DO Spiking), 开始利用预先校准的蠕动泵以 6 mL/(h·L) 流量补料。稳定期初期添加终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 IPTG 诱导外源 ScFv 表达, 工程菌培养需要添加四环素至终质量浓度 15 $\mu\text{g/mL}$ (使用 0.2 μm 醋酸纤维过滤膜过滤除菌)。

1.2 检测 OD_{600} 和细胞干质量(DCW)

使用紫外分光光度计 OD_{600} 检测菌体浓度。使用台式离心机以 12 000 g 转速离心 1 mL 发酵上清液 10 min, 弃上清液后在烘箱内以 90 °C 烘干至恒质量, 分析天平称量干质量。

1.3 VBNC 数目测量

1.3.1 样品处理 在发酵不同阶段收集样品发酵液 1 mL, 使用 0.01 mol/L PBS 10 倍梯度稀释发酵液, 选取合适稀释倍数稀释液 100 μL 涂布在 LB 琼脂糖平板上计算 CFU。同时, 选取合适稀释倍数稀释液 100 μL , 离心机上 9 000 g, 4 °C 离心 3 min 后弃去上清液, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤沉淀两遍。

1.3.2 CTC 染色 CTC 染色活细胞计数参照 Noor 等^[12-14]所述并稍微改动。100 μL CTC 溶液(0.01 mol/L PBS 溶液配制)加入到样品中至终浓度为 3 mmol/L, 然后在 200 r/min、25 °C 摇床内避光孵育染色 30 min。活细胞通过电子传递可将 CTC 还原成 CTF (CTC formazan, CTF), 在细胞膜上形成红色可见荧光沉淀。

1.3.3 荧光显微镜计数 如 Hobbie 等^[15]描述, 细胞

随后通过黑色聚碳酸酯膜 (孔径 0.2 μm , 直径 13 mm, Sartorius AG) 过滤收集。利用生物荧光显微镜 100 倍油镜 (U Plan Semi Apochromat objective 100X/1.3, oil) 和 10 倍目镜 (Widefield eyepiece 10X, focusable), 随机挑选 10 个视野计数并求平均值和标准差, 视野中 30~50 细胞为宜,。OLYMPUS 系列滤片为 BP425-445 exc./FF593/BA628-640 em.。菌数计算

$$E = \frac{X \times S_1}{S_2} \times \frac{1}{V} \quad (1)$$

式(1)中: E 为样品中细菌总数(个); X 为各计数视野细菌总数的平均值(个); S_1 为滤膜面积(mm^2); S_2 为显微镜油镜的视野面积 (mm^2); V 为待测 VBNC 细菌液的体积(mL)。VBNC 数目等于同一样品中活菌数减去 CFU 数目。

1.4 RNA 提取、cDNA 合成和 Real Time PCR 检测 mRNA 表达水平

取 1 mL 发酵液细胞($5 \times 10^6 \sim 10^7$ 个), 立即以 8 000 g(4 °C, 2 min)离心, 弃去上清液, RT-PCR 分析前沉淀于液氮中保存。按照 TaKaRa RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂操作说明书提取 *E.coli* 细胞样品中总 RNA。总 RNA 的质量和纯度通过测定 OD_{260} 和 OD_{280} 吸光度和 2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检验。根据 TaKaRa 反转录试剂 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser) 说明书去除基因组 DNA 后反转成 cDNA, 反应体系和步骤为: 总 RNA 500 ng, 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL , gDNA Eraser 1.0 μL , RNase Free dH_2O 补足至 10 μL , 42 °C 反应 2 min。反转录反应体系及步骤为: 去完基因组后反应液 5 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL , RT Primer Mix 2.0 μL , 5×PrimeScript Buffer2 (实时) 2.0 μL , RNase Free dH_2O 1.0 μL , 补足至 10 μL , 37 °C 反转录 15 min, 85 °C 5 s。进行 Real Time PCR 反应, 用到的引物序列见表 1。使用 TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 定量试剂反应体系如下: SYBR® Premix Ex Taq™ II (2x) 5 μL , PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.3 μL , PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.3 μL , cDNA 模板 1 μL , Sterile ddH_2O 3.4 μL 。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次。退火温度根据不同引物有所不同。实时荧光定量 PCR 仪中进行 RT-PCR, 使用 Sigma Plot Software 对实验结果分

析。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因表达丰度。

表 1 RT-PCR 实验引物序列

Table 1 Sequences of the primers used in RT-PCR

底物	序列(5' to 3')	基因描述
16s-rRNA-F	ACGACCAGGGCTACACAC	Reference
16s-rRNA-R	ACTACGACGCACTTTATGAGG	
RpoH-F	CCCGTGAAC TGGGCGTAACC	Heat stresses response genes
RpoH-R	TGGCTGTCGGAATCGTCGTC	
DnaK-F	ATGAACATCAAAGTGA CTCTGCTG	
DnaK-R	TTCTGAACCAT TGGCATAACG	
GroEL-F	GTACCATCTCCGCTAACTCC	
GroEL-R	CGAACTGCATACCTTCAACC	
GroES-F	GCGTCACCCATAACAGATAC	
GroES-R	AAATAACGATGTCGCCAAC	
DnaJ-R	CCATAGCGAAGTTGATCGGGAC	
RpoS-F	AGCCGTATGCTTCGTCTTAAC	Acid stresses response genes
RpoS-R	TATCGTCATCTTGCCTGCTATC	
H-NS-F	GTATTGACCCGAACGAAC TG	
H-NS-R	GATTTACCTTGCTCATCCATTG	
GadE-F	GAACAACGATTCGGACAAGG	
GadE-R	TTTCGTGATTATCTTTCAACTGC	
GadX-F	ACGCCCACAGACTATCAGGAG	
GadX-R	TTCCGCAGAACGGTCAGTG	
KatE-F	TGTGGAAGCCATTGAAGCAG	Oxygen stresses response genes
KatE-R	AGCACCATTTTGCCGACACG	
SodA-F	GTCTGAAAAAGGCACACCC	
SodA-R	TCACCCATCAGCGGAGAATC	
RpoE-F	GGTCCAGAAGGGAGATCAGAAAGC	Cell lysis genes detected by σ^E
RpoE-R	AACATCACCCGACGGCACATAG	
OmpA-F	TGAGCCTGGGTGTTTCCTAC	
OmpA-R	CAGAGCAGCCTGACCTTCC	
OmpC-F	CGGCAACCCATCTGCTGAAG	
OmpC-R	GCAGCGGTGTTCTGAGCATC	
OmpW-F	AGGTGGGGCTTGATTATCTG	
OmpW-R	TACGCTATCGTGTGCTGTG	
OmpX-F	CACTGAATACCCGACCTACAAAC	
OmpX-R	CTCGTAAGAGAAGTCCAGAGCAAC	

1.5 工程菌与野生菌相关胁迫基因与自溶基因表达水平比较方法

工程菌与野生菌平行发酵培养,分别在相同培养时间点 3,6,7.5,9,12,15,24 h 取样;检测上述自溶基因和胁迫基因表达量。

$$R = \frac{E_g}{E_y} \quad (2)$$

式(2)中: R 为相对表达率, E_g 为工程菌基因相对表达量, E_y 为野生菌基因相对表达量。

1.6 细胞自溶程度定义

工程菌和野生菌在第 15 h 进入稳定期达到最大生物量,定义其后减少的生物量占最大生物量的比值为自溶程度

$$A = \frac{OD_{600}(15\text{ h}) - OD_{600}(t)}{OD_{600}(15\text{ h})}$$

1.7 酶联免疫分析法(Elisa)检测上清液和菌体中 ScFv 表达水平

将 0.25 mg/mL HSA 包被缓冲液加入 96 孔微孔板,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜。去除包被液,每孔用 PBST 洗涤 5 次,加入 150 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。同上洗涤 5 次,分别加入抗体样品和对照液,50 μ L/孔,2 复孔/样品,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。同上每孔洗涤 5 次,每孔加入 50 μ L 酶标抗体 HRP-proteinA (武汉博士德生物工程有限公司),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。同上每孔洗涤 5 次,加底物与显色剂(郑州博赛生物技术股份有限公司)混合液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,再加入 100 μ L 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,在 450 nm 波长下用酶标仪检测。

2 结果与分析

2.1 工程菌与野生菌自溶时间、程度及外源蛋白质表达对比

发酵预实验中 DO spiking (说明初始甘油已经耗尽)总是出现在(11.5 $\pm$ 1) h,所以第 9 小时开始补料。1 h 后添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导外源蛋白质表达,此时 OD_{600} 大于 40。如图 1 所示,工程菌生长状态略差于野生菌,但工程菌和野生菌都大致在发酵 15 h 后进入稳定期,不同的是野生菌维持稳定期至 24 h 后开始自溶,而工程菌比不表达外源蛋白质的野生菌细胞自溶提前 6 h 发生,第 24 小时自溶程度为 18.3 %,明显高于野生菌。

本实验中所用工程菌 *E.coli* W3110 所包含的

质粒为 pBW (其中包含 scFv 基因), ScFv 的表达受 T7A3 强启动子调控, 这套表达系统在宿主菌中只有极微弱的基底活动。如图 1 所示, 添加 IPTG 之前, 细胞上清液和发酵液中几乎没有检测到 ScFv, 说明构建工程菌细胞 ScFv 分子基因的本底表达水平极低。而当补料 1 h 后添加 IPTG, ScFv 基因以 $0.906 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 的速度被快速诱导表达形成, 其在诱导后 3.5 h 内产量达到最大并积累在胞内后, 只有约占总产量 1/5 的 ScFv 分泌胞外上清液中。而不带 ScFv 分子基因的野生菌几乎没有 ScFv 表达。可以看出, 带有外源基因质粒的导入对细胞生长产生轻微抑制作用, 外源蛋白质的大量诱导表达与细胞提前自溶存在关联性, 这也是 *E.coli* 作为宿主细胞提高表达外源分泌蛋白质产量的瓶颈所在^[16]。

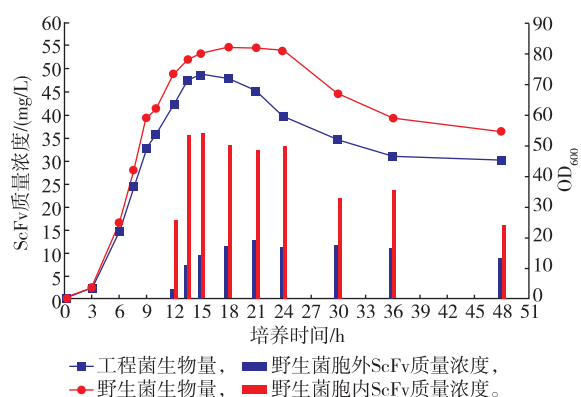


图 1 工程菌与野生菌自溶情况及外源蛋白质表达对比
Fig. 1 Comparison of cell lysis and ScFv expression between Engineered *E.coli* and wild-type *E.coli*

2.2 工程菌与野生菌细胞活性对比

由图 2 可知, 工程菌在第 10 小时 (对数期后期) IPTG 诱导外源蛋白质大量表达后, CFU 数目立即呈指数级下降, 但 10~18 h 内活细胞数目只是略微下降, 说明外源蛋白质大量表达积累对细胞产生毒害作用, 导致大部分细胞活性降低成为 VBNC 状态, 这也是外源蛋白质表达后活细胞数目略微下降, 细胞没有立即自溶的原因。第 18 小时后工程菌细胞发生大幅自溶, 其活细胞数目呈指数级下降, 而此时 CFU 数目下降幅度变缓, 第 24 小时后 CFU 基本不变, 这种现象说明发生自溶的细胞主要是 VBNC 状态的细胞。野生菌同样在第 15 小时后出现 CFU 指数下降, 至 24 h 大部分细胞成为 VBNC 细胞后开始大幅自溶。

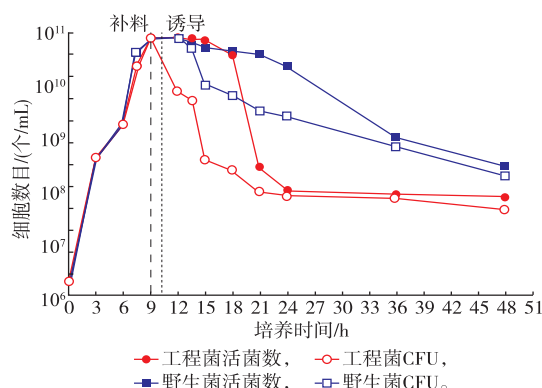


图 2 工程菌与野生菌活菌数、CFU 数目对比

Fig. 2 Comparison of viable cell number and CFU between engineered *E.coli* and wild-type *E.coli*

2.3 工程菌与野生菌抗胁迫基因和自溶基因表达对比

2.3.1 工程菌与野生菌热胁迫应激相关基因表达对比

图 3 是工程菌与野生菌热胁迫应激相关基因的动态行为对比, 表明工程菌培养时间 6~15 h 内, 工程菌抗胁迫基因表达量高于野生菌, 特别是添加 IPTG 诱导外源蛋白质表达后, 胁迫基因表达出现波峰现象。第 6、7.5、9 h 的 *rpoH* 基因表达量分别是野生菌相同时刻的 3.17、3.60、2.77 倍, 说明外源基因的导入和基因工程改造对宿主菌产生了一些不利影响, 一定程度上触发了细胞内热胁迫应激系统。而诱导表达外源蛋白质过程中, 第 12 小时工程菌 *rpoH* 基因表达上调至野生菌的 5.46 倍, 可见外源蛋白质表达使这种作用表现得更加明显。但是第 13.5、15 小时 *rpoH* 表达量又出现回落, 甚至第 24 小时表达量低于野生菌数分之一, 继续监测发酵结束时 *rpoH* 表达量, 发现两菌表达量几乎检测不到, 所以数据上趋近于 1。

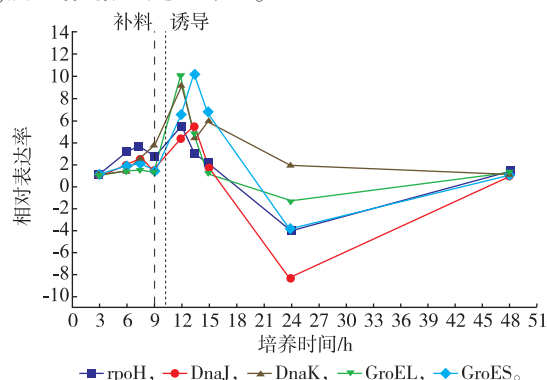


图 3 大肠杆菌热胁迫应激相关基因相对表达率

Fig. 3 Relative expression rate of heat stresses response genes in *E.coli*

大肠杆菌热应激机理,*rpoH* 基因编码 Sigma32 调节子,通过调控 *dnaK/J-grpE* 和 *groEL/groES* 等分子伴侣蛋白基因,负责细胞热胁迫应激,降解错配蛋白质,阻止蛋白质错误折叠,或使错误折叠蛋白质复性^[17-18]。原核生物的热休克蛋白质 DnaK/DnaJ 连接在未折叠好的多肽疏水片段来维持可溶性和防止聚集,而 GrpE 触发核苷酸交换使 DnaK 和 DnaJ 从多肽上分离(催化 DnaK/DnaJ/多肽分解)^[19-20]。大肠杆菌热胁迫应激反应能迅速诱导热休克蛋白质(Heat Shock Proteins, HSPs)产生,随后经过一段适应期 HSPs 合成速率下降至一个新的平衡水平。在发酵罐培养中发现,*rpoH* 基因控制的热胁迫相关基因 *dnaK*,*dnaJ*,*groES*,*groEL* 的表达趋势与 *rpoH* 一致,说明这些基因的表达是受 *rpoH* 调节子的严控。

2.3.2 工程菌与野生菌酸胁迫应激相关基因表达对比 图 4 是与酸胁迫相关的基因 *H-NS*,*rpoS*,*gadE*,*gadX* 的表达动态,其中 *H-NS* 在外源蛋白表达过程中的第 12 小时是野生菌的-28.8 倍,而 *rpoS* 是 6.12 倍,值得注意的是,工程菌中 *gadE* 的表达在未诱导前第 9 小时高出工程菌 200 多倍,但是随后在第 12 小时出现大幅下降但仍维持在高水平表达,*gadE* 高水平表达的同时激活 *gad* 酸抗性系统中 *gad* 脱羧酶和逆向转运基因如 *gadX*,这也说明外源蛋白质产生的胁迫能引起不同基因在不同水平上的差异。第 15 小时后发现工程菌这些基因和热胁迫基因明显低于野生菌表达水平,同时大量工程菌细胞在 12~18 h 内成为 VBNC 细胞,并在 18 h 后开始出现强烈的细胞自溶,而野生菌出现自溶要比工程菌晚数小时,这也说明 mRNA 表达水平从某种意义上来说可以反映细胞的活性。继续检测至发酵结束后第 48 小时,发现工程菌与野生菌表达量基本持平。可能在发酵罐中,在第 15 至 24 小时表达外源蛋白质工程菌细胞活性下降,细胞抗胁迫能力变弱。

H-NS 基因是酸抗性(Acid resistance, AR)调节系统的高级调节子,促进 *rpoS* mRNA 降解和抑制某些氨基酸依赖的 AR 系统如 *gadX*,*adiY*,*cadC* 等调节子的表达^[21-22]。所以当外源蛋白质表达产生胁迫后,*H-NS* 表达量反而降低,其对 *rpoS* 的抑制作用解除,直接或者间接地促进了 *gad* 酸抗性系统基因的表达。*gadE* 是编码谷氨酸盐依赖型酸抗性系统的

中心激活元件,*H-NS* 直接或间接通过 EvgA, YdeO, GadX 和 GadW 等抑制 *gadE* 表达^[23],从结果可见,*gadE* 在工程菌中表达量超出野生菌数百倍,差异巨大。

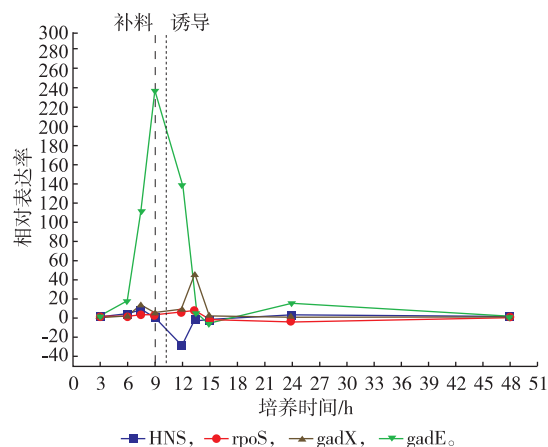


图 4 大肠杆菌酸胁迫应激相关基因相对表达率

Fig. 4 Relative expression rate of acid stresses response genes in *E. coli*

2.3.3 工程菌与野生菌氧胁迫应激相关基因表达对比 图 5 显示大肠杆菌中编码超氧化物歧化酶的 *sodA*^[24],编码过氧化氢酶 HPII 的 *katE*^[25]被认为能够应对突然氧胁迫对细胞造成的蛋白质巯基化损伤^[26],IPTG 诱导后第 12 小时高出数倍,但随细胞生长速率下降到很低水平。

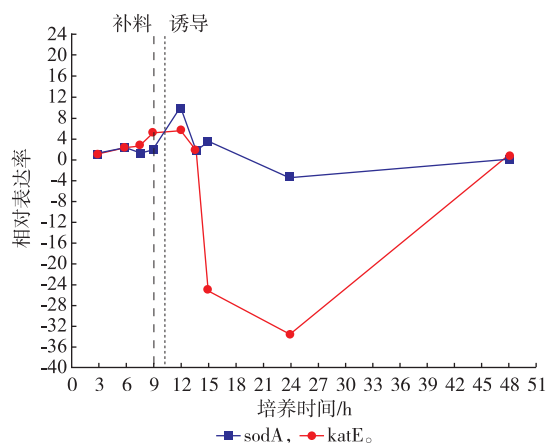


图 5 大肠杆菌氧胁迫应激相关基因相对表达率

Fig. 5 Relative expression rate of oxygen stresses response genes in *E. coli*

2.3.4 工程菌与野生菌自溶途径相关基因表达对比 图 6 是 Murata 等发现的 σ^F 引导的自溶途径基因的表达变化图谱。外源蛋白质表达前,工程菌

rpoE 基因表达低于野生菌,但外源蛋白质表达后的第 12 小时,*rpoE* 高水平表达,而 *ompA*、*ompC* 稳定地稍高表达随后骤降,而 *ompW*、*ompX* 虽然分别在第 9 小时和第 6 小时表达量突降,但外源蛋白质表达过程中的第 12 小时后,其表达量同样急升后再降低。*rpoE* 编码的 σ^E 最早是在研究编码热刺激 σ^H 因子的 *rpoH* 基因时被定义成 σ^E 转录因子, σ^E 调控相关基因来修复热刺激或其他外界胁迫造成的折叠异常的周质蛋白质或膜蛋白质^[27]。而 Murata 等^[11,28]于 2012 年系统地阐述了一条完整的 σ^E 引导的细胞自溶途径,即当细胞受到 pH 胁迫(pH stress)、氧化胁迫(Oxidative stress)、温度胁迫(Heat shock)和营养物匮乏(Nutrient starvation)等环境胁迫时,未折叠好的周质蛋白质在周质空间或细胞膜上积累到一定程度, σ^E 蛋白质在细胞质内被激活,调节 sRNA-*micA* 和 *rybB* 的基因转录,然后通过这两个 sRNA 与同源 mRNA 的相互影响以及核糖核酸酶的降解作用,降低 *ompA*、*ompC* 和 *ompW* 外膜蛋白质 mRNA 水平,进而减少这 3 个膜蛋白质的表达,导致外膜缺陷,引起细胞的自溶。但是 Murata 等是基于大肠杆菌摇瓶培养在对数期和稳定期过表达 *rpoE* 基因,发现 σ^E 引导的自溶途径使受损的 VBNC 细胞发生自溶。而在发酵罐细胞自溶过程中并没有发现 *rpoE* 基因的持续性高表达。已知 *ompA* 作为细胞外膜极其重要的结构蛋白质维持细胞菌体形态和亲水化合物的跨膜传递,*ompC* 是大肠杆菌细胞内主要的阳离子选择性孔蛋白质^[29],它们在外源蛋白质表达后表达量较野生菌降低。*ompW* 编码革兰氏阴性菌中 β -折叠小外膜蛋白质应对环境变化,但 *ompW*、*ompX* 的表达机制目前并不清楚,在结果中可以看出,细胞自溶过程中外膜蛋白基因表达量显著下降^[30-32]。出现这种现象可能是因为外源蛋白质大量表达产生强烈胁迫导致细胞受损 VBNC 积累,细胞内 σ^E 启动激活以清除这些 VBNC 细胞,受 σ^E 自溶途径负调控的 *ompA* 和 *ompC* 表达量减少,细胞外膜结构破坏,随后自溶发生^[33]。这和基于摇瓶发现 σ^E 引导细胞自溶的现象一致。然而也发现,这些自溶相关基因在 15 h 后较野生菌表达量明显下降,不同于 Murata 等利用 *rpoE* 基因的瞬时表达系统,其受诱导后 *rpoE* 基因持续高表达。分析自溶现象发现, σ^E 引导的自溶现象特异性在稳定期发生,当 *rpoE* 基因被诱导表达后, σ^E 相关调控基因上

下调,某些基因在时间上特异性表达增强或受阻^[11]。这也许能说明在外源蛋白质表达前,工程菌中 *rpoE* 并没有高水平表达而导致自溶。

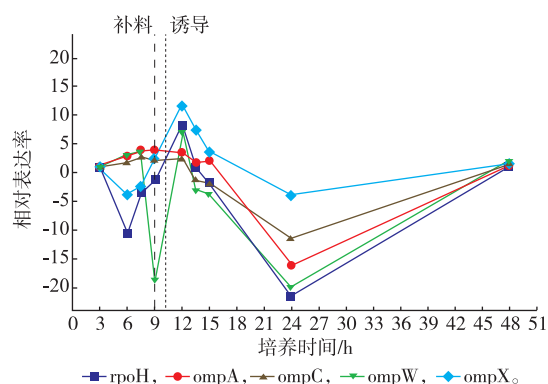


图 6 大肠杆菌 σ^E 引导的自溶途径基因相对表达率

Fig. 6 Relative expression rate of cell lysis genes detected by σ^E in *E.coli*

3 结 语

工程菌诱导表达的第 10 至 18 小时内,ScFv 高效表达达 36.08 mg/L,且大部分积累在细胞内。由胁迫基因转录水平可知,第 10 至 15 小时胁迫相关基因表达活跃,热胁迫应激基因 *rpoH*、*dnaK*、*dnaJ*、*groES*、*groEL* 表达量较野生菌高 1~10 倍不等;酸胁迫途径基因 *H-NS* 表达量降低,其对酸胁迫应激基因 *rpoS*、*gadE*、*gadX* 等的抑制作用解除,表达量较野生菌高至数十倍不等,甚至 *gadE* 出现超高表达(~237 倍);氧胁迫应激基因 *sodA*、*katE* 表达量较野生菌高 1~8 倍不等。说明外源蛋白质高效表达并积累在细胞内引起多重细胞胁迫应激反应。由细胞生长状态可知,外源蛋白质表达后活细胞数维持在 10^{10} 个/L,而 CFU 数目却从第 9 小时的 7.19×10^{10} 个/L骤降至第 18 小时的 2.43×10^8 个/L,说明大部分细胞成为 VBNC 细胞,而野生菌在此期间因无外源蛋白质表达,细胞内胁迫基因表达水平较工程菌低,所以大部分活细胞进入 VBNC 状态出现在第 24 小时,比工程菌晚 6 h。

工程菌和野生菌明显细胞自溶现象分别发生在第 18 小时和第 24 小时,其生物量大幅降低,活细胞数目大幅降低,而 CFU 数目稍微降低,说明工程菌和野生菌发生细胞自溶的主要是 VBNC 状态细胞。自溶相关基因 *rpoE* 在第 12 小时表达量达到最高,其调控的外膜蛋白 *ompA*、*ompC*、*ompW*、*ompX*

随后表达量下降,但发酵罐中细胞在第 12 小时并没有立即发生自溶现象,这和摇瓶水平自溶途径启动发生细胞自溶现象的结果有所不同。第 10 至 18 小时内,工程菌相关胁迫基因和自溶基因表达量较野生菌低数倍至数十倍不等,原因是野生菌在这段时间内处于稳定期,细胞内胁迫基因表达相对活跃,而工程菌中细胞活性骤降或死亡,抗胁迫能力极低。这个观点可以在第 24 小时野生菌细胞活性下降发生自溶后,相关基因表达率持平得到印证。而 σ^E 引导的细胞自溶途径中的关键调控元件 *rpoE* 并没有在这段时间持续性高表达,说明细胞内可能存在其他途径导致细胞自溶。

通过研究知,发酵罐中发生细胞自溶的主要是 VBNC 细胞。因此,结合细胞胁迫应激和自溶机理研究大肠杆菌生产过程中 ScFv 表达,对发酵罐中

VBNC 形成原因和数量变化以及控制细胞自溶过程至关重要。可以通过进一步调查 VBNC 数目变化,了解评估外部或内部胁迫对细胞的影响,以界定细胞生长状态——维持存活还是发生自溶。

现在,以改造 sigma 因子转录调控子为基础的基因工程和合成代谢设计,已经成为调节细菌调控网络,提高细菌抗逆性和代谢物产量等菌种改造的重要工具^[34]。Martin 等^[35]运用系统生物学的原理和方法,构建胁迫诱导反馈调节机制来控制重组蛋白质生产,已经实现通过胁迫诱导型启动子感应胁迫后来下调重组蛋白基因表达。进一步探索工程菌细胞中 sigma 因子引导的胁迫和自溶机制,将有助于寻找分子改造的靶点来提高细胞抗性和构建自溶控制开关,从而平衡外源蛋白表达和细胞生长,实现产量的最大化。

参考文献:

- [1] Elvin J G, Couston R G, van der Walle C F. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 440(1): 83-98.
- [2] Zarschler K, Witecy S, Kapplusch F, et al. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 97.
- [3] Riesenbergh D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(4): 422-430.
- [4] Chou C P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 521-532.
- [5] Neubauer P, Lin H Y, Mathisizik B. Metabolic load of recombinant protein production: inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(1): 53-64.
- [6] Glick B R. Metabolic Load and Heterologous Gene-Expression[J]. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(2): 247-261.
- [7] Marles W J, Lewis R J. Stress responses of bacteria[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(6): 755-760.
- [8] Bury M S, Nomane Y, Reymond N, et al. Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli* [J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(9): 51-58.
- [9] Sikdar R, Simmons A R, Doerrler W T. Multiple envelope stress response pathways are activated in an *Escherichia coli* strain with mutations in two members of the DedA membrane protein family[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(1): 12-24.
- [10] Rice K C, Bayles K W. Molecular control of bacterial death and lysis[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(1): 85-109.
- [11] Murata M, Noor R, Nagamitsu H, et al. Novel pathway directed by σ^E to cause cell lysis in *Escherichia coli* [J]. *Genes to Cells*, 2012, 17(3): 234-247.
- [12] Noor R, Murata M, Yamada M. Oxidative stress as a trigger for growth phase-specific sigmaE-dependent cell lysis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 17(4): 177-187.
- [13] Barry H P, Susan C B, Gordon A M. A Rapid, Direct method for enumerating respiring enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 2614-2619.
- [14] Abe A, Ohashi E, Ren H, et al. Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*[J]. *Microbiological Research*, 2007, 162(2): 130-138.

- [15] Hobbie J E, Daley R J, Jasper S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1976, 33(5): 1225-1228.
- [16] Schlegel S, Rujas E, Ytterberg A J, et al. Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E.coli* by regulating gene expression levels[J]. **Microbial Cell Factories**, 2013(12): 24-36.
- [17] Arsene F, Omoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2000, 55(1-3): 3-9.
- [18] Hoffmann F, Rinas U. Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. **Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology**, 2004, 89: 143-161.
- [19] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines[J]. **Cell**, 1998, 92(3): 351-366.
- [20] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Protein folding-Molecular chaperones in the cytosol; from nascent chain to folded protein[J]. **Science**, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [21] Krin E, Danchin A, Soutourina O. Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli* [J]. **BMC Microbiology**, 2010(10): 273-282.
- [22] Giangrossi M, Zattoni S, Tramonti A, et al. Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2005, 280(22): 21498-21505.
- [23] Sayed A K, Odom C, Foster J W. The *Escherichia coli* AraC-family regulators GadX and GadW activate *gadE*, the central activator of glutamate-dependent acid resistance[J]. **Microbiology-Sgm**, 2007, 153(8): 2584-2592.
- [24] Fee J A. Regulation of *sod* genes in *Escherichia coli*; Relevance to superoxide-dismutase function[J]. **Molecular Microbiology**, 1991, 5(11): 2599-2610.
- [25] Vonossowski I, Mulvey M R, Leco P A, et al. Nucleotide-sequence of *Escherichia-Coli* *kate*, which encodes catalase *hpII* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1991, 173(2): 514-520.
- [26] Dukan S, Nystrom T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1999, 274(37): 26027-26032.
- [27] Ades S E. Regulation by destruction; design of the sigmaE envelope stress response[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2008, 11(6): 535-540.
- [28] Udekwi K I, Wagner E G. Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA *MicA* [J]. **Nucleic Acids Research**, 2007, 35(4): 1279-1288.
- [29] Apirakaramwong A, Fukuchi J, Kashiwagi K, et al. Enhancement of cell death due to decrease in Mg^{2+} uptake by OmpC (cation-selective porin) deficiency in ribosome modulation factor-deficient mutant[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1998, 251(2): 482-487.
- [30] Brambilla L, Moran-Barrio J, Viale A M. Expression of the *Escherichia coli* *ompW* colicin S4 receptor gene is regulated by temperature and modulated by the H-NS and StpA nucleoid-associated proteins[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2014, 352(2): 238-244.
- [31] Pilsl H, Smajs D, Braun V. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane[J]. **Journal of Bacteriology**, 1999, 181(11): 3578-3581.
- [32] Fernandez C, Adeishvili K, Wuthrich K. Transverse relaxation-optimized NMR spectroscopy with the outer membrane protein OmpX in dihexanoyl phosphatidylcholine micelles[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2001, 98(5): 2358-2363.
- [33] Nitta T, Nagamitsu H, Murata M, et al. Function of the sigma(E) regulon in dead-cell lysis in stationary-phase *Escherichia coli* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2000, 182(18): 5231-5237.
- [34] Tripathi L, Zhang Y, Lin Z. Bacterial sigma factors as targets for engineered or synthetic transcriptional control[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2014, 2(33): 1-7.
- [35] Dragosits M, Nicklas D, Tagkopoulos I. A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Biological Engineering**, 2012, 6(1): 2-12.