

产 3-羟脯氨酸重组菌的构建及发酵优化

姚雪娜^{1,2,3}, 张震宇^{*1,2,3}, 孙付保^{1,2,3}, 陈昶^{1,2,3}, 黄建华^{1,2,3}, 沈松^{1,2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 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: 顺式-3-羟基-L-脯氨酸(顺式-3-羟脯氨酸)可用于合成多种抗癌药物,具有重要的商业价值,目前大多通过添加 IPTG 来诱导表达脯氨酸-3-羟化酶,采用两步法生物合成顺式-3-羟脯氨酸。作者通过目的基因优化设计,引入强启动子色氨酸串联启动子(Ptrp2)来避免异源表达时的诱导剂使用,构建重组质粒 pES-Ptrp2-P3H,成功构建了重组大肠杆菌 BL21 (DE3) / pET21a-Ptrp2-P3H,优化后的脯氨酸-3-羟化酶基因(P3H)改变了 168 个碱基,GC 含量由原来的 64.83%降低到 49.31%。该菌在初步优化培养基(葡萄糖 1 g/dL,甘油 0.125 g/dL,胰蛋白胍 1.6 g/dL, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/dL, K₂HPO₄ 0.1 g/dL, NaCl 0.2 g/dL, FeSO₄ 1 mmol/L, MgSO₄ 0.5 g/dL, CaCl₂ 0.015 g/dL, 脯氨酸 10 g/L, pH 7.5)上能一步法原位合成顺式-3-羟脯氨酸,摇瓶发酵 24 h,产量 0.8 g/L,比优化前提高一倍以上,为进一步开展顺-3-羟脯氨酸产业化提供了依据。

关键词: 脯氨酸-3-羟化酶;顺式-3-羟脯氨酸;密码子优化;重组菌构建;发酵优化

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)03-0243-09

Construction of Recombinant *Escherichia coli* Strains Producing *cis*-3-Hydroxyproline and Preliminary Optimization of the Fermentation Conditions

YAO Xuena^{1,2,3}, ZHANG Zhenyu^{*1,2,3}, SUN Fubao^{1,2,3}, CHEN Chang^{1,2,3}, HUANG Jianhua^{1,2,3}, SHEN Song^{1,2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract: The *cis*-3-hydroxy-L-proline can be used to synthesize many anticancer drugs with important commercial value. At present, *cis*-3-hydroxyproline is produced with IPTG-inducible recombinants in two steps. The subject of this study is to construct a recombinant with high proline-3-hydroxylase activity and generate *cis*-3-hydroxyproline without adding IPTG which is expensive and toxic. We constructed the recombinant plasmid pES-Ptrp2-P3H and transformed *E. coli* BL21 (DE3) successfully. Compared with the original gene sequence of proline 3-hydroxylase, 168 nucleotides were changed and the GC percentage was reduced from 64.83 % to 49.31%. The preliminarily optimized medium was 1 g/dL glucose, 0.125 g/dL glycerinum, 1.6 g/dL

收稿日期: 2015-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800018;30970058);江苏省自然科学基金项目(BK2012554);高等学校博士学科点专项科研基金项目(200802951036);工业生物技术教育部重点实验室主任基金项目(KLIB-ZR200801)。

* 通信作者: 张震宇(1976—),男,江苏张家港人,理学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事微生物产品的制备技术和发酵工艺方面的研究。E-mail: zhangzy@jiangnan.edu.cn

引用本文: 姚雪娜,张震宇,孙付保,等. 产 3-羟脯氨酸重组菌的构建及发酵优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(03): 243-251.

tryptone, 0.5 g/dL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 g/dL K_2HPO_4 , 0.2 g/dL NaCl, 1 mmol/L FeSO_4 , 0.5 g/dL MgSO_4 , 0.015 g/dL CaCl_2 , 10 g/L L-proline, and pH valve at 7.5. At shaking flask level, *cis*-3-hydroxyproline was accumulated to about 0.8 g/L in 24 h, which was one times higher than before. It provides the basis for the industrialization of *cis*-3-hydroxyproline bioproduction.

Keywords: proline-3-hydroxylase, *cis*-3-hydroxyproline, codon optimization, construction of recombinant *Escherichia coli*, fermentation optimize

羟基-L-脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp, 羟脯氨酸) 为亚氨基酸, 是 L-脯氨酸羟基化后的产物。根据羟脯氨酸的羟基所在位置不同, 可形成 4 种立体异构体, 分别是反式-4-羟脯氨酸、顺式-4-羟脯氨酸、反式-3-羟脯氨酸和顺式-3-羟脯氨酸。其中反式-4-羟脯氨酸最为常见, 对哺乳动物骨胶原合成至关重要^[1], 已被广泛应用于动物饲料、营养和美容业等许多行业; 其次为反式-3-羟脯氨酸, 它在 I、II 和 III 型骨胶原中含量较多, 能通过脯氨酰-3-羟化酶的催化形成。相对地, 顺式羟脯氨酸比较少见, 比如稀有的顺式-3-羟脯氨酸^[2], 现有资料证明它存在于产放线菌素、宜他霉素和远霉素等次级代谢物的微生物中^[3]。

而为数不多的资料表明, 顺式-3-羟脯氨酸在许多领域均具有重要的应用价值。在医药领域, 顺式-3-羟脯氨酸可以直接作为治疗肿瘤和胶原蛋白障碍的药物^[4], 并且该种氨基酸作为重要的手性合成子能够用于合成许多药物, 如选择性雄性受体调节剂 BMS-564929^[5]、碳氢萘烯类抗生素、血管紧张肽转化酶抑制剂和解痉拮抗剂等^[6]。此外也可用于合成 DNA 促旋酶抑制剂, 如 plusbacin、cyclothialidine 和 tripropeptins 等。在化学合成领域, 顺式-3-羟脯氨酸已用作重要的手性分子来合成倒千里光裂碱和流涎胺等。在不对称合成领域, 它还被直接用作有机催化剂。另外, 顺式-3-羟脯氨酸衍生物, 如卡泊芬净和 Pneumocandin B0, 还能作为抗真菌药物使用^[7]。但是由于顺式-3-羟脯氨酸在自然界中含量极为稀少, 导致其价格相当昂贵 (约 3 800 元/g), 严重限制了在各领域的应用, 尤其在医药领域, 很多以顺式-3-羟脯氨酸为前体合成的抗癌药物才处于临床试验阶段, 并不能满足人类的需求。因此各国科研工作者都在研究顺式-3-羟脯氨酸的生产方法。

目前, 羟脯氨酸的生产方法主要有 3 种: 水解法、化学合成法以及微生物转化法。由于顺式-3-羟

脯氨酸在骨胶原中含量极少, 因而无法通过常见的水解法获得。已有报道显示, 可通过化学全合成或者差向异构化反应生成^[8]。Surajit Sinha 等人通过夏普勒斯不对称环氧化反应从丙氨酸出发, 经过十步反应合成顺式-3-羟脯氨酸^[2]; Navnath B. 等人从 D-谷氨酸出发, 通过一系列化学反应最终合成顺式-3-羟脯氨酸, 转化率不足 30%^[4]。目前, 这些化学法存在明显不足: 1) 合成工序较为繁琐和产率低; 2) 反应过程中会用到一些有毒试剂; 3) 分离纯化工艺复杂。因此, 经济效益欠佳, 难以工业化生产。

随着微生物资源的开发和利用, 研究者们逐步发现一些能够合成顺式-3-羟脯氨酸的微生物。1996 年 HIDEO MORI 等人发现链霉菌 (*Streptomyces sp.*) TH1 能够产一种脯氨酸-3-羟化酶, 该酶能够将游离的 L-脯氨酸羟基化为顺式-3-羟脯氨酸, 接着他们发现脯氨酸-3-羟化酶还存在于包括产远霉素的链霉菌和芽孢杆菌等多种微生物体内^[8], 这也是在微生物中发现脯氨酸-3-羟化酶的首次报道。进一步研究发现, 该酶的羟基化活性需要 2-酮戊二酸和 O_2 的存在, 把它归为 2-酮戊二酸依赖性加双氧酶类。并且以发酵 3 d 的链霉菌 TH1 为酶源, 在含 L-脯氨酸、2-酮戊二酸、硫酸亚铁、L-抗坏血酸和 100 mmol/L TES buffer (pH 7.5) 的反应体系里能够催化产生约 174 $\mu\text{mol/L}$ 的顺式-3-羟脯氨酸^[9]。2009 年, Robert M. 等通过重组菌的构建, 实现了脯氨酸-3-羟化酶在大肠杆菌中的异源表达, 20 L 发酵罐发酵 8 h 后, 加入 IPTG 诱导, 以收集的菌体为酶源, 在 10 L 的反应体系中 60 h 能够催化产生约 9.1 g/L 的顺式-3-羟脯氨酸^[5]。2011 年, 德国研究者 Christian Klein 等人直接向发酵液中添加底物 L-脯氨酸, 800 mL 培养基发酵 3 d 后能够产生约 305 mg 的顺式-3-羟脯氨酸^[6]。在对脯氨酸-3-羟化酶基因 (P3H) 克隆后, 异源表达时还需加入昂贵且有诱导性的诱导剂 IPTG, 这并不适用于药物蛋白质和食用氨基酸的大规模生产^[10]。而且, 这些

微生物发酵生产顺式-3-羟脯氨酸主要采用分步法,即通过大规模的发酵培养获得能够产脯氨酸-3-羟化酶的菌体,以这样的菌体为酶源,加入到合适的反应体系中,催化L-脯氨酸为顺式-3-羟脯氨酸。这种分步法可能是为了高产顺式-3-羟脯氨酸,但生产工序偏长,投资和运行成本偏高,且染菌风险增加。

作者尝试开展微生物一步法合成顺式-3-羟脯氨酸的研究工作,首先对脯氨酸-3-羟化酶基因进行设计优化,然后通过引入强启动子色氨酸串联启动子(Ptrp2)来避免异源表达时诱导剂使用,接着构建重组大肠杆菌,最后探讨利用该菌株在发酵液中原位催化游离脯氨酸来一步法合成顺式-3-羟脯氨酸的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109:作者所在实验室保存;克隆载体 PES:购于上海旭冠公司;表达载体 pUC19、pET28a 和 pET21a:作者所在实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶 *Eco*RI、*Hind* III 和 *Bam*HI:宝生生物工程有限公司;T4 DNA 连接酶、1 kb DNA Marker、Premixed Protein Marker、DNA 胶回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒:上海生物工程有限公司。

1.1.3 培养基 种子培养基 LB:胰蛋白胨 1 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL,NaCl 1 g/dL,pH 7.0。初始发酵培养基:葡萄糖 1 g/dL,甘油 0.5 g/dL,胰蛋白胨 1 g/dL,(NH₄)₂SO₄ 0.5 g/dL,K₂HPO₄ 0.1 g/dL,NaCl 0.2 g/dL,FeSO₄ 3 mmol/L,MgSO₄ 0.02 g/dL,CaCl₂ 0.015 g/dL,脯氨酸 46 g/L,pH 7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 脯氨酸-3-羟化酶基因的优化 脯氨酸-3-羟化酶基因密码子使用频率分析由数据库(<http://www.kazusa.or.jp/codon>)完成。通过同义替换的方法消除一些在大肠杆菌中使用频率低的密码子,调整脯氨酸-3-羟化酶基因的 GC 含量,使其接近大肠杆菌的 GC 含量。利用密码子优化软件 Java Codon Adaptation Tool(JCAT)来对基因进行评估。为便于基因操作,分别在脯氨酸-3-羟化酶基因的 5' 端设计了 *Eco*RI、*Hind* III,3' 端设计了 *Bam*HI 酶切位点。

同时利用 RNAstructure 软件对其 mRNA 的二级结构进行优化,保证起始密码子 ATG 及其后的数个碱基组成的密码子呈开环状态,降低核糖体结合到 mRNA 上的能势,使得核糖体能够顺利地沿着起始密码子向后翻译。优化后的基因序列提交给上海旭冠公司合成。

1.2.2 重组质粒的构建 合成的基因连接到质粒 pES 上 (pES-P3H), 含色氨酸串联启动子的质粒 pUC19-Ptrp2-Hyp(作者所在实验室构建)经 *Eco*RI 和 *Hind* III 酶切后,回收 Ptrp2 片段,与经过同样双酶切的质粒 pES-P3H 连接,构建重组质粒 pES-Ptrp2-P3H。构建过程见图 1。

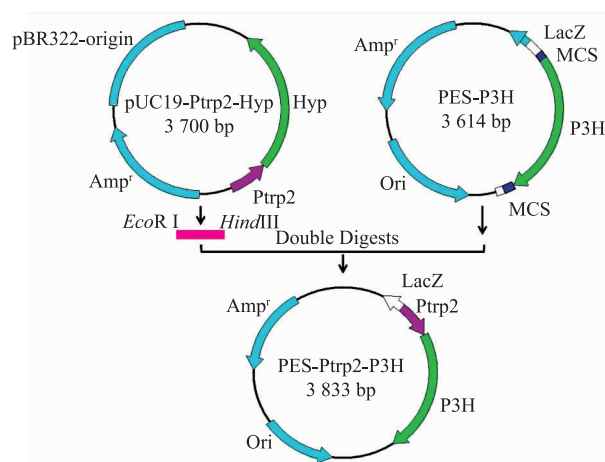


图 1 pES-Ptrp2-P3H 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of the expression vector pES-Ptrp2-P3H

重组质粒 pES-Ptrp2-P3H 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后,回收 Ptrp2-P3H 片段,将该片段分别连接到 pUC19、pET21a 和 pET28a 质粒上,构建不同的重组质粒 pUC19-Ptrp2-P3H、pET21a-Ptrp2-P3H 和 pET28a-Ptrp2-P3H。对重组质粒酶切验证正确后转化至 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* JM109。

1.2.3 重组大肠杆菌的培养 重组大肠杆菌培养在含有相应抗生素的平板上,37 °C 培养约 10 h 后长出单菌落,挑取单菌落,接种到含有相应抗生素的 30 mL(250 mL 摇瓶)种子培养基 LB 中,220 r/min、37 °C 培养 8 h,再按 4% 的接种体积分数接种到 30 mL(250 mL 摇瓶)的初始发酵培养基中,于 220 r/min、30 °C 培养 12 h,测定发酵液中顺式-3-羟脯氨酸的质量浓度。

1.2.4 蛋白质表达分析 取 1 mL 发酵液,8 000 g

离心 2 min, 去上清液, 用 100 μL 的去离子水重悬细胞。取上述细胞悬浮液 10 μL , 加入 5 \times 上样缓冲液, 混匀后, 于沸水中煮约 10 min, 使细胞充分破碎, 破碎的细胞在 12 000 r/min 离心 2 min, 取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 全细胞酶活测定 取发酵液离心 2 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 8 000 g), 取 10 g/dL 细胞悬浮于 5 mL、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.9) 中, 细胞悬浮液加入到 50 mL 的酶反应液 (5 mmol/L L-抗坏血酸, 1 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 90 mmol/L 2-酮戊二酸, 90 mmol/L L-脯氨酸) 中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 后, 转移到 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 2 min 终止酶反应, 测定顺式-3-羟脯氨酸的质量浓度。

一个酶活单位 (U) 定义为每分钟催化得到 1 nmol 顺式-3-羟脯氨酸的酶量。全细胞酶活是每毫克干菌体的酶活, 单位为 U/g, 其中细胞干重 $\text{DCW (g/L)} = 0.54 \times \text{OD}_{600}$ 。

1.2.6 发酵优化单因素实验 按照 1.2.3 培养方法, 对培养基的成分进行优化。优化的培养基的成分包括: 底物 L-脯氨酸添加质量浓度 (1、5、10、20、40 g/L), 不同有机氮源 (酵母提取物、胰蛋白胍和玉米浆, 质量浓度分别为 4、8、12、16、20 g/L), 碳源 (葡萄糖质量浓度为 10、15、20、25、30 g/L; 甘油浓度为 1、1.25、2.5、5 g/L), 亚铁离子质量浓度 (0、1、5、10 mmol/L) 以及镁离子质量浓度 (0.1、0.5、1、2 g/dL)。不同因素间进行单独研究, 不考虑不同成分之间的交互影响。

1.2.7 顺式-3-羟脯氨酸浓度测定 通过 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 柱前衍生法^[11]测定顺式-3-羟脯氨酸的质量浓度。发酵液离心后取上清液作为样品。标准品或样品用衍生缓冲液溶解, 取待测样品 2 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入 1 mL 衍生试剂, 60 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 1 h, 冷却至室温后用平衡缓冲液定容至 10 mL。用 0.45 μm 的水系滤膜过滤。

HPLC 系统包括: 日立 HPLC 系统 (输液泵、紫外检测器, 柱温箱, 进样器, 数字记录及处理装置), 安捷伦 ZORBA SB-Aq (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 操作时柱温控制在 27 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A: 乙酸钠缓冲液 (pH 6.5~6.8), 流动相 B: 50% 的乙腈水溶液。洗脱过程采用梯度洗脱: 0~6 min, 16% 的 B 相; 6~7 min, 40% 的 B 相; 7~15 min, 100% 的 B 相; 15~16 min, 40% 的 B 相; 16~25 min, 16% 的 B 相。

2 结果与分析

2.1 脯氨酸-3-羟化酶基因的优化设计和合成

在大肠杆菌中进行异源蛋白表达时, 同义密码子的使用频率与基因的异源表达水平相关^[15]。因此, 首先通过基因优化策略, 将稀有密码子替换为大肠杆菌常用密码子, 控制 GC 含量及脯氨酸-3-羟化酶基因 mRNA 二级结构, 设计合成了一个适合在大肠杆菌中表达的脯氨酸-3-羟化酶基因, 进而确保脯氨酸-3-羟化酶的表达效率。脯氨酸-3-羟化酶基因序列的原始序列见 GenBank: AF003371.1, 脯氨酸-3-羟化酶基因全长 873 bp, 编码 290 个氨基酸。在优化脯氨酸-3-羟化酶基因前, 通过 Codon Usage Database 数据库对其进行密码子使用频率分析, 并比较其与大肠杆菌密码子的使用频率。结果显示, 来源于链霉菌 TH1 的脯氨酸-3-羟化酶基因部分密码子使用频率在大肠杆菌中都有不同程度的降低, 如起始密码子后的 CGC, 在链霉菌 TH1 中的使用频率为 34.4%, 在大肠杆菌中的使用频率为 18.8%; TCG 在链霉菌 TH1 中的使用频率为 13.7%, 在大肠杆菌中的为 11.4%; CAC 在链霉菌 TH1 中为 41.2%, 在大肠杆菌中为 7.2%。并且从 5' 端开始就出现了密码子使用频率差异较大的情况, 不利于脯氨酸-3-羟化酶基因序列的翻译表达。数据库的分析结果还显示, 脯氨酸-3-羟化酶基因的 GC 含量为 64.83%, 高于大肠杆菌的 GC 含量 (50.80%)。

基因优化结果见表 1。首先, 通过同义替换的方法改变了稀有密码子, 脯氨酸-3-羟化酶基因的 GC 含量从 64.83% 降低到 51.78%, 更接近大肠杆菌的 GC 含量。在蛋白质的表达过程中, 基因序列 5' 末端的二级结构会对蛋白质的翻译产生影响^[12], 同时 RNA 5' 末端形成二级结构所需要的能量也影响基因产物的产量。因此利用 RNA 二级结构预测软件 RNAstructure 5.3 对其二级结构进行预测, 发现脯氨酸-3-羟化酶基因的 mRNA 5' 末端会形成茎环结构, 不利于翻译的进行。通过同义替换改变 27 个密码子, 使得脯氨酸-3-羟化酶基因的 mRNA 5' 末端呈打开状态, 见图 2。自由能 ΔG 由开始的 -243.5 kcal/mol 降低到 -230.5 kcal/mol, 促进核糖体结合到 mRNA 上, 并且顺利地进行翻译。经过优化, 共改变了 187 个脯氨酸-3-羟化酶的碱基, 172 个密码子发生了变化, GC 含量从 64.83% 降低到 49.31%, 更接

近于大肠杆菌的 GC 含量。图 3 为链霉菌 TH1 的脯氨酸-3-羟化酶基因序列与优化后的脯氨酸-3-羟化酶基因序列的对比结果。

表 1 脯氨酸-3-羟化酶基因优化结果
Table 1 Codon optimization process

优化过程	密码子改变数/个	碱基改变数/个	GC 含量/%
优化密码子	154	168	51.72
调整 mRNA 的二级结构	27	30	49.31
消除酶切位点	2	2	49.31
最终结果	172	187	49.31

2.2 重组大肠杆菌的构建

2.2.1 组成型色氨酸串联启动子的引入

目前,顺式-3-羟脯氨酸微生物合成过程用到的启动子为 IPTG 诱导型启动子,这不利于顺式-3-羟脯氨酸作为前体用于合成药物蛋白产品。因此,作者尝试采用引入了一个强的启动子(色氨酸串联启动子)来提高 mRNA 产量,该策略避免使用有毒诱导剂 IPTG 同时,也有助于降低生产成本。作者所在实验室设计合成的色氨酸串联启动子 Ptrp2 全长 237 bp,5'端为 *EcoRI* 酶切位点,3'端为 *Hind* III 酶切位点。将色氨酸串联启动子 Ptrp2 插入到目的基因的上游后,转化至 *E. coli* JM109 中,提取重组质粒

pES-Ptrp2-P3H。Ptrp2 重组质粒 pES-Ptrp2-P3H 经 *EcoRI* 和 *Bam*HI 双酶切后,得到 1 117 bp 和 2 716 bp 两个片段,电泳结果见图 4。

经 DNA 测序后,序列结果正确。

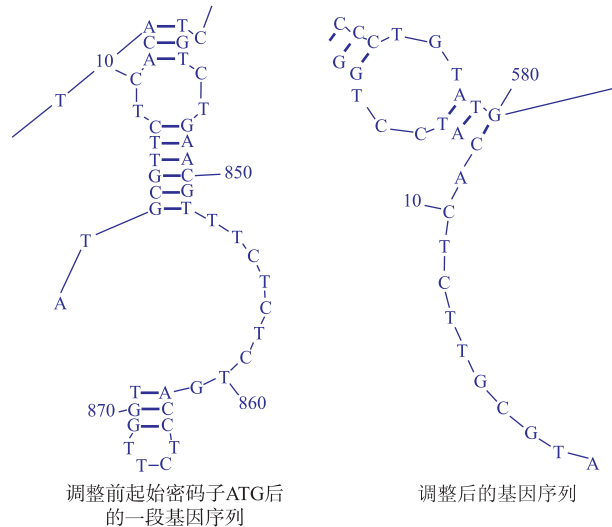
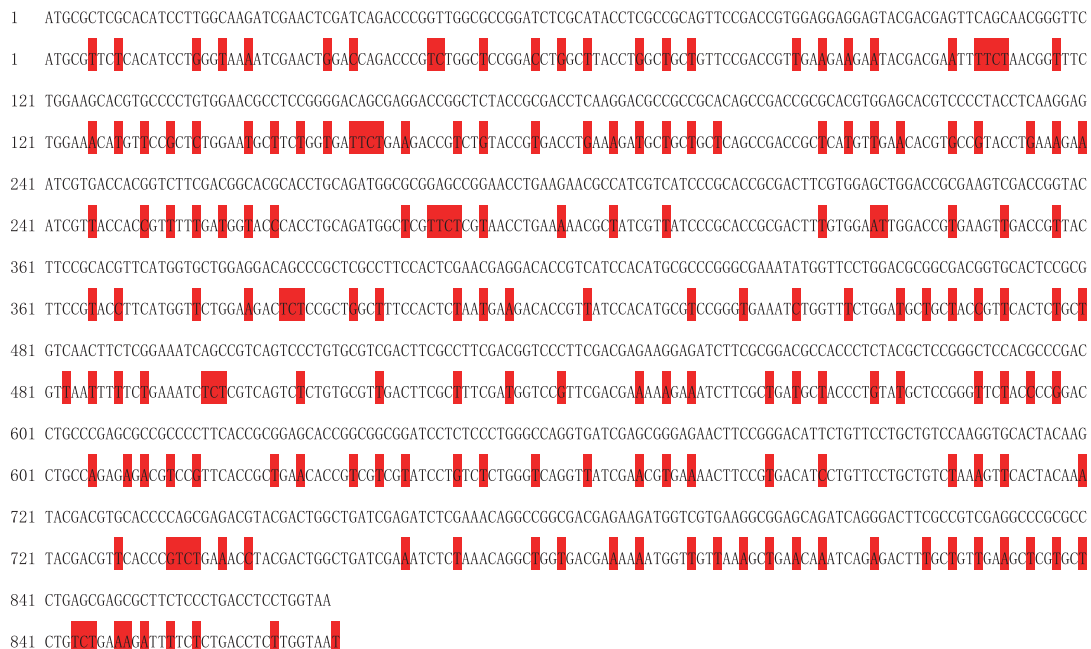


图 2 脯氨酸-3-羟化酶基因 mRNA 5' 末端二级结构预测结果

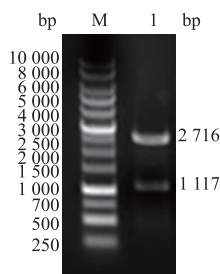
Fig. 2 Potential mRNA secondary structures around the ATG start codon of the unadjusted gene and the adjusted gene



改变的碱基用红色阴影标出

图 3 脯氨酸-3-羟化酶基因优化前(上)与优化后(下)的序列比对

Fig. 3 Alignment of nucleotide sequences between wild-type gene (upper) and the synthetic optimized (lower)

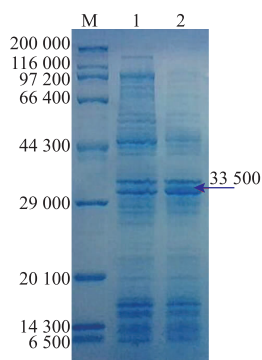


泳道 1:pES-Ptrp2-P3H *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切, 泳道 M:1 kb DNA Ladder

图 4 pES-Ptrp2-P3H 双酶切电泳结果

Fig. 4 *Eco*RI-*Bam*HI Double digestion of pES-Ptrp2-P3H

2.2.2 重组大肠杆菌的构建 外源基因在原核生物中高效表达除了要有合适的启动子外,合适的质粒也是影响蛋白质表达的一个重要因素。为了得到高产顺式-3-羟脯氨酸重组大肠杆菌,将连有色氨酸串联启动子的脯氨酸-3-羟化酶基因片段分别连接到质粒 pUC19、pET21a、pET28a 上,构建不同的重组质粒 pUC19-Ptrp2-P3H、pET21a-Ptrp2-P3H、pET28a-Ptrp2-P3H,然后将重组质粒转化至 *E. coli* BL21 中,构建不同的重组大肠杆菌。重组大肠杆菌经过一段时间的发酵后,取上清液进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 5。在约 33 500 的位置出现了目的条带,表明在重组大肠杆菌中该酶得到了表达。



泳道 M:Premixed Protein Marker;1:大肠杆菌 BL21 (DE3);2: BL21 (DE3)/pES-Ptrp2-P3H, 红色箭头所示条带为脯氨酸-3-羟化酶,大小约为 33 500

图 5 SDS-PAGE 结果

Fig. 5 SDS-PAGE

2.2.3 质粒载体的优化 宿主菌细胞类型对质粒稳定性有一定影响,质粒的稳定性又直接影响目的蛋白质的表达。因此合适的质粒是实现目的蛋白质高效表达的一个重要因素。构建 4 种不同的重组大肠杆菌,通过比较它们酶活高低,寻找到合适的宿

主菌与质粒的搭配。取发酵后的菌体,离心后收集菌体,在酶反应缓冲液中 30 °C 反应 30 min,测定 4 种不同重组大肠杆菌的酶活,结果见表 2。从表 2 可以看出,重组大肠杆菌 BL21/ pET21a -Ptrp2-P3H 的酶活最高,达到了 722.807 U/g,与 H Mori^[8]等人的研究结果相比,酶活提高了约 7 倍。

表 2 不同重组菌脯氨酸-3-羟化酶全细胞活性

Table 2 Whole cell enzyme activity of different recombinant strains

重组大肠杆菌	OD ₆₀₀	顺式-3-羟脯氨酸产量/(mol/L)	脯氨酸-3-羟化酶全细胞活性/(U/g)
BL21/PES-Ptrp2-P3H	4.845	0.022	56.870
BL21/pUC19-Ptrp2-P3H	4.815	0.078	199.388
BL21/pET21a-Ptrp2-P3H	4.815	0.281	722.807
BL21/pET28a-Ptrp2-P3H	4.380	0.100	283.124

2.3 重组菌一步法生产顺式-3-羟脯氨酸的摇瓶发酵

2.3.1 重组大肠杆菌生长曲线的测定 种子培养是为了获得足够多生长代谢旺盛的活菌体。在本研究中,以酶活最高的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET21a-Ptrp2-P3H 为出发菌株,挑取一环单菌落接种于 LB 中,按 1.2.3 所述方法进行种子培养。横坐标为种子的培养时间,纵坐标为种子液 OD₆₀₀,生长曲线见图 6。

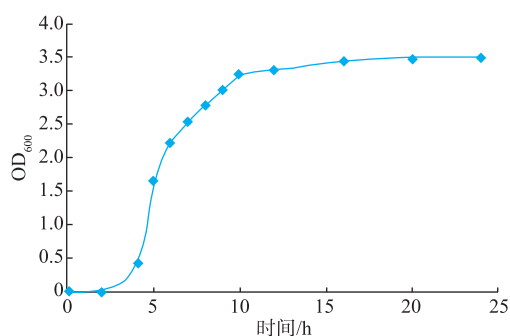


图 6 重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/ pET21a-Ptrp2-P3H 生长曲线

Fig. 6 Growth curve of recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/ pET21a-Ptrp2-P3H

从图 6 可以看出,菌种接入种子培养基 LB 中 4 h 前后,开始进入对数期,6~10 h 为种子的对数期。一般在对数生长期菌体细胞的代谢活性、酶活性高而稳定,因而对数生长期中后期的菌种为最佳。此后的发酵摇瓶试验,均选择种龄为 8 h 的菌种接入

发酵培养基。

2.3.2 摇瓶发酵单因素优化 细菌的生长需要碳源、氮源、无机盐等营养物质。葡萄糖为菌体细胞的快速碳源,它的过量会形成 TCA 流溢现象,导致乙酸的过量累积^[13],抑制大肠杆菌的生长。同时碳源和氮源的比例^[14]也会影响细胞生长和蛋白质表达,最终影响顺式-3-羟脯氨酸的产量。此外,各种离子的浓度对菌体生长、酶的表达都有不同的影响,顺式-3-羟脯氨酸的产量还会随着培养条件的变化而变化。因此,必须重视培养基各组分的含量。图7为各单因素优化结果。

其中图7(a)为对底物 L-脯氨酸优化结果,结果显示,当底物在 1~10 g/L 的范围内时,顺式-3-羟脯氨酸的产量随着底物质量浓度的升高而升高,但当继续增加底物时,顺式-3-羟脯氨酸增幅明显减小,因此底物适宜的添加量为 10 g/L。

图7(b)为氮源的种类和质量浓度的优化结果。

结果显示,以胰蛋白胨为有机氮源时,顺式-3-羟脯氨酸产量高于其他两组有机氮源,其中 16 g/L 胰蛋白胨为最优,继续增加胰蛋白胨质量浓度,顺式-3-羟脯氨酸质量浓度反而下降。

图7(c)为葡萄糖质量浓度的优化结果。当葡萄糖质量浓度低于 15 g/L 时,顺式-3-羟脯氨酸的产量随着葡萄糖质量浓度的增加而增加;当葡萄糖质量浓度大于 15 g/L 时,顺式-3-羟脯氨酸的积累量开始下降。与葡萄糖相比,甘油的运输速度更低,使葡萄糖降解过程中碳通量降低,乙酸生成量大幅度降低。因此通过加入迟效氮碳源能够达到既保证重组菌的生长速度,又高效控制目的蛋白质的表达。以 10 g/L 的葡萄糖质量浓度为速效碳源,对甘油质量浓度进行优化,结果见图7(d)。可以看出,当甘油添加量为 1.25 g/L 时,顺式-3-羟脯氨酸的积累量最大。

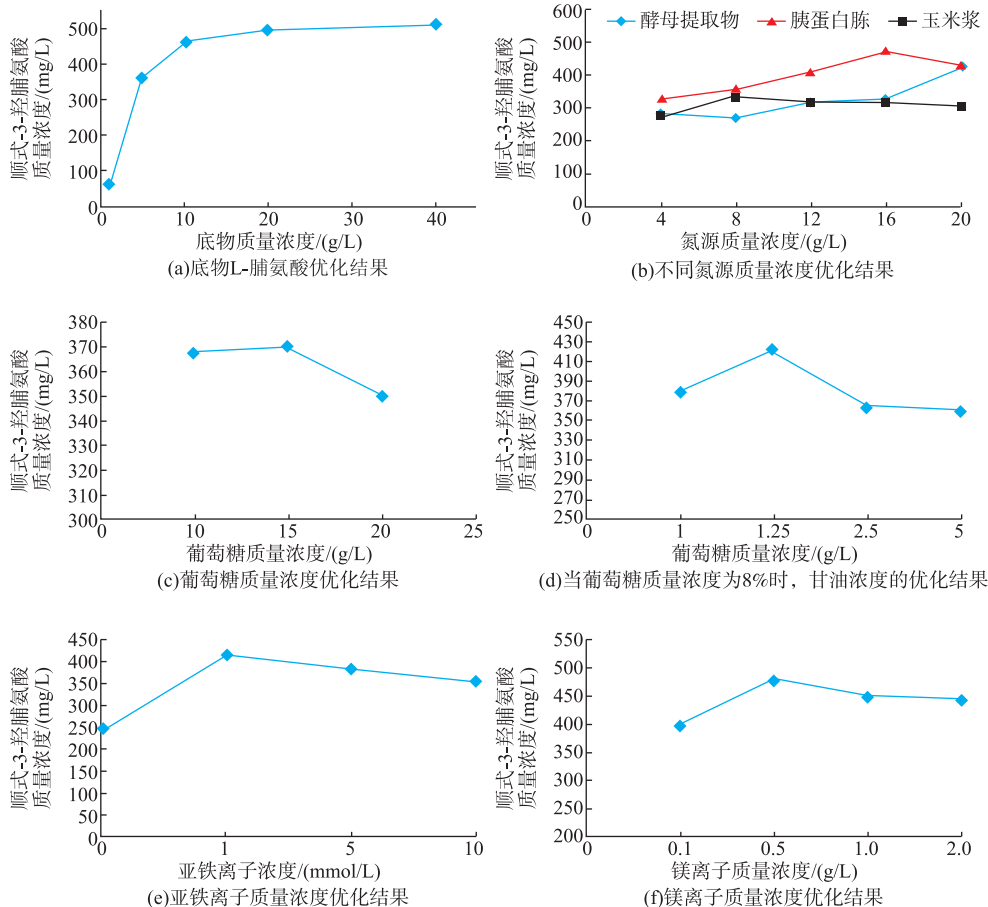


图7 单因素优化结果

Fig. 7 Optimization of the concentration of L-proline, nitrogen sources, carbon source, glycerinum, ferrous ion and magnesium ion

由于脯氨酸-3-羟化酶要发挥羟基化活性需要一种重要的离子作为酶的辅助因子,即亚铁离子,因此对亚铁离子的浓度进行优化,结果见图7(e)。当发酵液中不添加亚铁离子时,顺式-3-羟脯氨酸的累积量能达到约250 mg/L左右,可能是由于胰蛋白胍中含有一定浓度的 Fe^{2+} 。随着 Fe^{2+} 浓度的升高,顺式-3-羟脯氨酸的累积量不断升高,当 Fe^{2+} 浓度为1 mmol/L时,顺式-3-羟脯氨酸的质量浓度最高,继续增加 Fe^{2+} 浓度,顺式-3-羟脯氨酸累积量逐渐减小。

重组大肠杆菌的发酵曲线表明,顺式-3-羟脯氨酸的产量与菌体的浓度偶联,适当浓度的镁离子能明显促进菌体的生长。因此,在重组大肠杆菌发酵过程中,补充适当浓度的镁离子对顺式-3-羟脯氨酸的累积非常重要。镁离子的浓度优化结果见图7(f)。镁离子质量浓度在0.01~0.05 g/dL间,顺式-3-羟脯氨酸的质量浓度随镁离子质量浓度的增加而增加,当镁离子质量浓度大于0.5 g/dL时,产酸随着镁离子质量浓度的增加而减小。

优化的培养基为:葡萄糖 1 g/dL,甘油 0.125 g/dL,胰蛋白胍 1.6 g/dL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/dL, K_2HPO_4 0.1 g/dL, NaCl 0.2 g/dL, FeSO_4 1 mmol/L, MgSO_4 0.5 g/dL, CaCl_2 0.015 g/dL, 脯氨酸 10 g/L。

2.3.3 重组大肠杆菌发酵生产顺式-3-羟脯氨酸
按上述培养基对重组大肠进行摇瓶发酵,以时间为横坐标,产酸和 OD_{600} 为纵坐标绘制曲线,见图8。可

以看出,发酵24 h 顺式-3-羟脯氨酸能够累积约0.80 g/L,产量提高了约2倍。

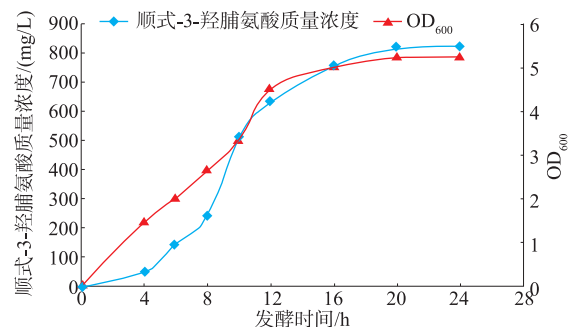


图8 重组大肠杆菌发酵曲线

Fig. 8 Fermentation process curve of recombinant *E. coli*

3 结语

为了生产适用于药物蛋白合成的顺式-3-羟脯氨酸,作者通过引入色氨酸串联启动子成功构建了一株高产顺式-3-羟脯氨酸的重组大肠杆菌。该菌在初步优化培养基(葡萄糖 1 g/dL,甘油 0.125 g/dL,胰蛋白胍 1.6 g/dL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/dL, K_2HPO_4 0.1 g/dL, NaCl 0.2 g/dL, FeSO_4 1 mmol/L, MgSO_4 0.5 g/dL, CaCl_2 0.015 g/dL, 脯氨酸 10 g/L, pH 7.5)上能一步法原位合成顺式-3-羟脯氨酸,摇瓶发酵24 h 顺式-3-羟脯氨酸0.80 g/L,比优化前发酵产量提高一倍以上,实现了“一锅法”直接生产顺式-3-羟脯氨酸,具有较好的工业化生产前景。

参考文献:

- [1] BACH T M H, TAKAGI H. Properties, metabolisms, and applications of L-proline analogues[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 6623-6634.
- [2] WENG Lushui, CHEN Fen, XIAO Guoying. Optimization and functional verification of Cry2Aa gene[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2013, 21(11): 1261-1269. (in Chinese)
- [3] SHIBASAKI T, MORI H, OZAKI A. Cloning of an isozyme of proline 3-hydroxylase and its purification from recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 1967-1973.
- [4] KALAMKAR N B, KASTURE V M, DHAVALA D D. Total synthesis of natural *cis*-3-hydroxy-L-proline from D-glucose[J]. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51: 6745-6747.
- [5] JOHNSTON R M, CHU L N, LIU M, et al. Hydroxylation of L-proline to *cis*-3-hydroxy-L-proline by recombinant *Escherichia coli* expressing a synthetic L-proline-3-hydroxylase gene[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45: 484-490.
- [6] KLEINlein C, HUTTEL W. A simple procedure for selective hydroxylation of L-proline and L-pipecolic acid with recombinantly expressed proline hydroxylases[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353: 1375-1383.
- [7] GORRES K L, RAINES R T. Prolyl 4-hydroxylase[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 45(2): 106-124.

- [8] MORIori H, SHIBASAKI Y, OCHIAI K, et al. Detection of novel proline 3-hydroxylase activities in streptomyces and *Bacillus* spp. by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996, 62: 1903-1907.
- [9] MORI H, SHIBASAKI Y, YANO K. Purification and cloning of a proline 3-hydroxylase, a novel enzyme which hydroxylates free L-proline to cis-3-hydroxy-L-proline[J]. **Journal of Bacteriology**, 1997, 179:5677-5683.
- [10] MIROUX B, WALKER J E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1996, 260(3):289-298.
- [11] LI Dong, SUN Jiayi. Determination of 18 kinds of amino acids by HPLC with precolumn 2,4-dinitrofluorobenzene derivatization [J]. **Chemical Analysis and Meterage**, 2004, 13(1):289-298. (in Chinese)
- [12] ZHENG Zhongcheng. RNA secondary structure prediction algorithms[J]. **Chemical of Life**, 2000, 20(4):176-178. (in Chinese)
- [13] HAN K, LIM H C, HONG J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1992, 39(6):663-671.
- [14] CHEN G, STREVETT K A. Impact of carbon and nitrogen condition on *E.coli* surface thermodynamics[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 28(2-3):135-146.

会 议 消 息

会议名称(中文):第三届生物学国际会议

会议名称(英文):3rd Annual International Conference on Biology

所属学科:动植物微生物学,生物物理学、生物化学及分子生物学,遗传与发育生物学,生物技术与生物工程

开始日期:2017-06-19

结束日期:2017-06-22

所在城市:希腊

具体地点:Athens, Greece

主办单位:The Biology Research Unit of the Athens Institute for Education and Research (ATINER)

E-MAIL:atiner@atiner.gr

会议网站:http://www.atiner.gr/biology

会议背景介绍:The Biology Research Unit of the Athens Institute for Education and Research (ATINER) organizes its 3rd Annual International Conference on Biology, 19-22 June 2017, Athens, Greece sponsored by the Athens Journal of Sciences.

The aim of the conference is to bring together academics and researchers from all areas of Biology and related disciplines. You may participate as panel organizer, presenter of one paper, chair of a session or observer.