文章编号: 1673-1689(2011)03-0470-05

乳糖诱导重组大肠杆菌表达胆固醇氧化酶的研究

李 闯, 孙 艳, 张 玲, 杨海麟, 王 武*
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214122)

摘 要: 采用乳糖诱导胆固醇氧化酶(COD)基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达, 研究了培养基成分、乳糖浓度、诱导时间和诱导温度对胆固醇氧化酶表达的影响。结果显示, 在对诱导条件进行优化控制的前提下, 胆固醇氧化酶酶活达到 15.2 U/mL。研究结果为乳糖作为诱导剂最终应用于重组基因工程药物的工业化生产提供了有益的参考和借鉴。

关键词: 胆固醇氧化酶; 乳糖诱导; 重组
中图分类号: Q 815 文献标识码: A

Expression Cholesterol Oxidase Gene in Recombinant *Escherichia coli* Using Lactose as Inducer

LI Chuang, SUN Yan, ZHANG Ling, YANG Hai-lin, WANG Wu*
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lactose was used to induce cholesterol oxidase (COD) expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) in this manuscript. Effect of different nutrient and environmental conditions, including media ingredients, lactose concentration, lactose addition time, and the culture temperature on COD expression were carefully investigated. Under the optimum induced conditions, the maximal activity of COD reached at 15.2 U/mL. The results confirmed that lactose could be used as an inducer in the fermentation process.

Key words: cholesterol oxidase, lactose induction, recombinant

IPTG (异丙基-β-D-巯基半乳糖苷)是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂, 但其价格较为昂贵, 且对人体具有潜在的毒性, 限制了它的应用。乳糖是一种有潜力的 IPTG 替代品, 它价格低廉且没有毒性, 转化为异乳糖后可诱导 T7lac 启动子, 在基因工程产品的产业化应用中具有十分重要的意义[1]。本文报道了以大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株为宿主细胞, 以克隆在 pET28 (a)中的胆固醇氧化酶基因为目的基因, 对乳糖诱导目的蛋白表达的各种基本参数进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-COD

收稿日期: 2010-05-27
基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z305); 江南大学青年科学基金项目(2009LQN03)。
* 通信作者: 王 武(1952-), 女, 福建福州人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程及遗传工程方面的研究。
Email: wangwu@jiangnan.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作者所在的验室构建并保存。构建方法见参考文献[2]。

1.1.2 培养基　发酵培养基中无机盐成分(g/L): KH_2PO_4 2, K_2HPO_4 4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7, $(NH_4)_2SO_4$ 1.2, NH_4Cl 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, 微量元素[3]。氨苄青霉素 100 mg/L。

1.2 培养方法

种子的制备:从平板挑取单菌落, 接种至装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 ℃, 200 r/min 摇床培养 9 h。

摇瓶发酵培养方法:种子以 5% 接种量接到发酵培养基中, 装液量 20%, 摇瓶转速 200 r/min, 温度 37 ℃;培养到 8 h 后添加终浓度 10 g/L 乳糖诱导 12 h。改变相应的诱导及培养条件进行单因素分析。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体破碎　见参考文献[2]。

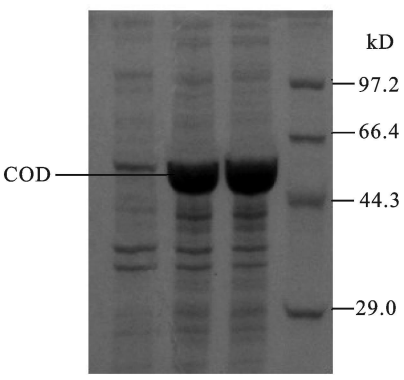
1.3.2 SDS-PAGE 及蛋白量测定　见参考文献[2]。

1.3.3 酶活的测定　见参考文献[4]。

2 结果和分析

2.1 诱导 COD 基因表达

用 IPTG 和乳糖均能诱导 *E. coli* BL21-pET28a-COD 表达胆固醇氧化酶(见图 1)。全细胞蛋白电泳可见50 000 左右的目的条带, 这与预期的胆固醇氧化酶基因编码蛋白的相对分子质量一致。



1: 对照未诱导; 2: 5 g/L 乳糖诱导; 3: 1 mmol/L IPTG 诱导; M: 标准蛋白分子量

图 1　重组菌诱导表达的全菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1　SDS-PAGE analysis of *E coli* BL21 (DE3)/pET28a/COD after induction

乳糖作为诱导剂时总蛋白浓度和胆固醇氧化酶酶活均高于 IPTG(见表 1)。单位菌体产酶量为 IPTG 诱导时的 2.4 倍。表明乳糖不仅能作为诱导剂诱导外源基因表达, 诱导效果也比 IPTG 诱导时好; 可能的原因是: T7 启动子是强启动子, 在 IPTG 持续稳定的诱导时, 外源基因过量表达, 外源蛋白以包涵体的形式存在; 同时菌体代谢负担加重, 加速质粒丢失速率, 不含质粒的菌体在种群中占据优势, 最终导致菌体退化, 影响酶的产量。

表 1　诱导剂对菌体生长和产酶的影响

Tab. 1　Effect of inducer on cell growth and cholesterol oxidase production

诱导剂	总蛋白质量浓度 (g/L)	单位体积产酶量 (U/mL)	表达百分比 (%)	比酶活 (U/mg)
IPTG	0.99	0.19	40	0.19
乳糖	1.68	0.76	36	0.45

2.2 培养基的正交优化

选择酵母膏、蛋白胨、葡萄糖、甘油、$MgSO_4$ 5 种底物作为正交试验的因素, 每个因素选择了 4 个浓度水平, 安排 5 因素 4 水平的正交试验(见表 2), 无机盐离子和微量元素同 1.1.2 中发酵培养基。

表 2　影响因素及水平分布

Tab. 2　Selected factors and assigned levels for optimizing medium components and concentration

水平	影响因子				
	酵母膏/(g/L)	胰蛋白胨/(g/L)	葡萄糖/(g/L)	甘油/(mL/L)	$MgSO_4$/(mmol/L)
1	0	5	0	0	0.1
2	2.5	10	0.5	1	0.2
3	5	15	1	2	0.3
4	10	20	2	4	0.4

对于细胞生长, 5 种因素的影响均比较明显, 主要原因是不同的碳氮比造成 pH 值的波动(数据未给出), 影响菌体生长。胆固醇氧化酶的表达属于生长偶联型, 各个因素对产酶的影响的相对显著性与对生长影响的相对显著性完全相同。为获得最大产酶量, 各因素应选择的最优浓度水平(见表 4)。

根据极差直观分析结果, 最终确定的种子培养基组成为: 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 15 g/L, 葡萄糖 0.5 g/L, 甘油 4 mL/L, $MgSO_4$ 0.1 mmol/L。在此条件下, 胆固醇氧化酶的酶活力为 3.17 U/mL。为验证此优化结果的稳定性, 结果平均值为 3.1 U/mL, 为初始酶活的 4 倍。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 $L_{16}(4^5)$正交试验设计

Tab. 3 $L_{16}(4^5)$ Orthogonal array of design experiments

序号	水平					COD 酶活/(U/mL)	A_{600}
	酵母膏/(g/L)	胰蛋白胨/(g/L)	葡萄糖/(g/L)	甘油/(mL/L)	$MgSO_4$/(mmol/L)		
1	1	1	1	1	1	0.05	1.34
2	1	2	2	2	2	0.18	4.56
3	1	3	3	3	3	0.81	10.59
4	1	4	4	4	4	0.13	5.17
5	2	1	2	3	4	1.23	9.39
6	2	2	1	4	3	1.91	9.84
7	2	3	4	1	2	0.09	5.19
8	2	4	3	2	1	0.96	8.81
9	3	1	3	4	2	1.87	9.78
10	3	2	4	3	1	1.50	11.25
11	3	3	1	2	4	0.36	5.43
12	3	4	2	1	3	0.40	4.8
13	4	1	4	2	3	1.11	9.38
14	4	2	3	1	4	0.19	5.19
15	4	3	2	4	1	3.17	11.06
16	4	4	1	3	2	1.26	8.93
COD K_1	0.29	1.06	0.89	0.18	1.42		
K_2	1.05	0.95	1.24	0.65	0.85		
K_3	1.03	1.11	0.96	1.20	1.06		
K_4	1.43	0.69	0.71	1.77	0.48		
R_1	1.143	0.422	0.535	1.587	0.942		
A_{600} K_1	5.415	7.473	6.385	4.130	8.115		
K_2	8.308	7.710	7.453	7.045	7.115		
K_3	7.815	8.068	8.592	10.040	8.652		
K_4	8.640	6.928	7.748	8.963	6.295		
R_2	3.225	1.140	2.207	5.910	2.357		

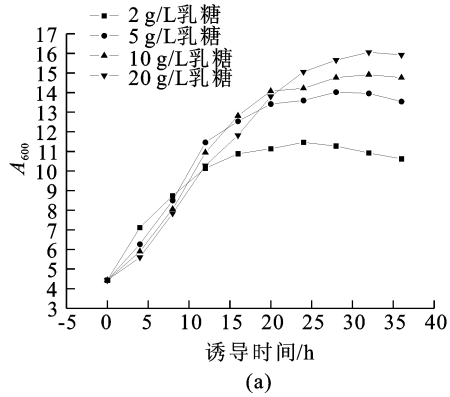
表 4 由直观分析得到各因素影响 COD 酶生产的重要性及优化水平分布

Tab. 4 Relative importance of various factors for COD production determined by margin analysis

重要性	主→次				
因素	甘油	酵母膏	$MgSO_4$	甘油	胰蛋白胨
水平	4 mL/L	10 g/L	0.1 mmol/L	0.5 g/L	15 g/L

2.3 乳糖浓度的影响

乳糖不仅可以诱导胆固醇氧化酶的表达, 也可以做为碳源和能源供菌体生长, 乳糖添加量在影响菌体生长的同时也影响酶的产生。所以考查不同浓度乳糖对菌体生长及产酶的影响, 以确定最佳的诱导浓度。结果如图 2(a, b)所示。



(a)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

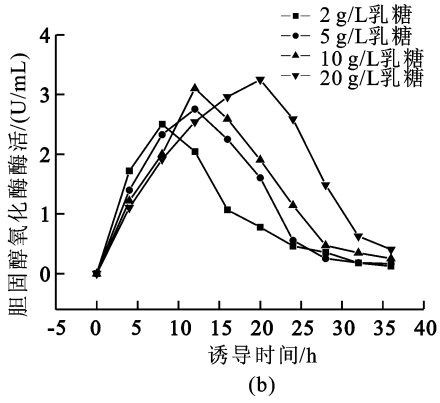


图 2　不同乳糖浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 2　Effect of lactose concentration on cell growth and Cholesterol oxidase production

如图 2(a) 、(b) 所示, 菌体密度和产酶量随着乳糖添加量的增加呈上升趋势, 超过 10 g/L 时, 产酶量不再增加, 主要原因是摇瓶溶氧条件限制, 增加碳源, 菌体不再生长。此外, 随着乳糖添加量的提高, 抑制菌体生长, 初始阶段菌体生长较为缓慢, 使乳糖适应期延长, 产酶高峰期推后, 降低了胆固醇氧化酶生产强度。

2 4　诱导时机的影响

添加诱乳糖诱导菌体产酶时, 选择适当的诱导时机对发酵的意义巨大, 选取不同的诱导时间来考察最佳的诱导时机, 实验结果如图 3(a) 、(b) 所示。

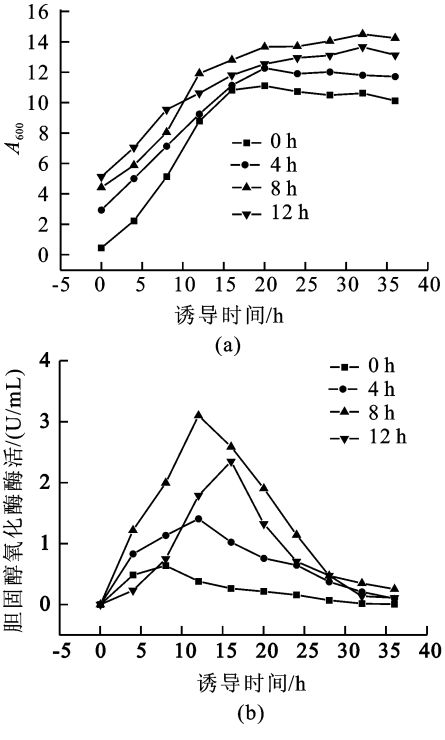


图 3　不同乳糖添加时间对菌体生长和产酶的影响

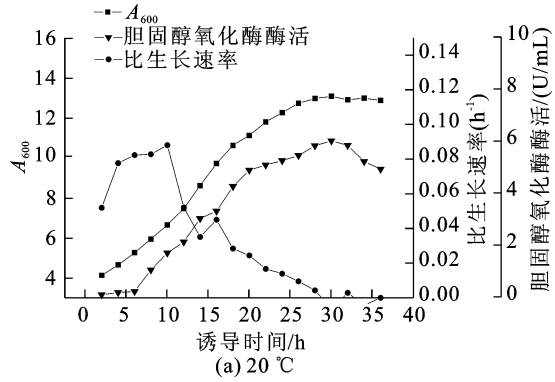
Fig. 3　Effect of lactose addition time on cell growth and Cholesterol oxidase production

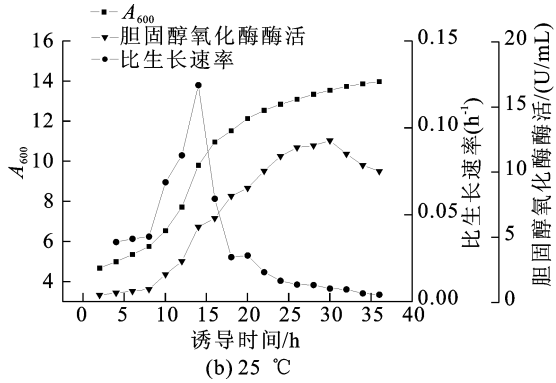
由图 3(a, b) 显示, 菌体生长和产酶情况都是在培养 8 h 后(即对数生长中后期) 诱导的情况下, 效果最好; 过早的添加乳糖, 菌体生长速度过快, 代谢副产物积累, 影响菌体生长; 而在对数末期添加乳糖诱导, 发酵液中代谢副产物增加, 不利于菌体生长, 进而影响产酶水平; 综合考虑菌体产酶量和菌体量, 认为在对数生长中后期诱导效果最佳。

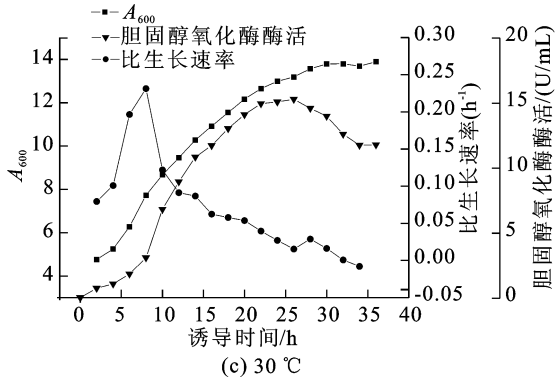
2 5　诱导温度的影响

温度是保证微生物生长和产物合成所需各种酶活性的重要条件, 同时是影响重组蛋白表达的一个重要因素, 因此在发酵过程中必须控制合适的温度。考察在 20、25、30 和 37 ℃下诱导胆固醇氧化酶基因的表达的情况, 结果见图 4(a) 、(b) 、(c) 、(d) 。

图 4(d) 所示, 当温度较高时, 虽然更适合菌体生长, 但由于在较高的培养温度下, 重组酶的合成速率太快, 目标蛋白来不及折叠修饰, 就可能在胞内形成包涵体, 此外胆固醇氧化酶在 37 ℃不稳定[5] , 诱







© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

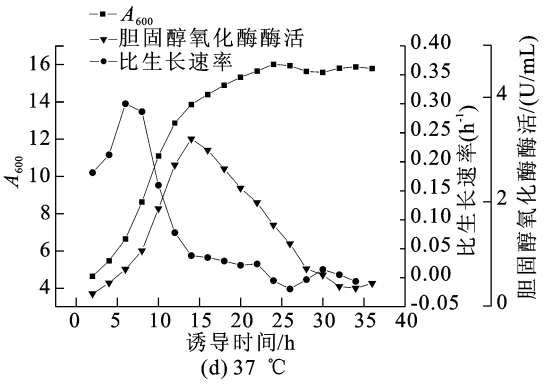


图 4 温度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 4 Effect of temperature on cell growth and Cholesterol oxidase production

导终点过后酶活迅速下降,胆固醇氧化酶酶活仅为 3.2 U/mL;温度太低(20℃)时,重组酶的合成速率会降低,也限制了其表达[6],胆固醇氧化酶酶活为 6.0 U/mL(见图4a)。30℃最适合胆固醇氧化酶的表达,酶活达到最高为 15.2 U/mL(见图 4c);因此选择 30℃ 作为培养温度。

3 结 语

乳糖胆固醇氧化酶表达时,菌体中目标蛋白含量略低,但酶活比 IPTG 高,表明乳糖诱导更利于胆固醇氧化酶的可溶表达。通过正交优化培养基成分,确定了最佳培养基:酵母抽提物 10 g/L、胰蛋白胨 15 g/L、甘油 4 ml/L、葡萄糖 0.5 g/L、$MgSO_4$ 1 mmol/L。以此培养基作为发酵培养基研究乳糖浓度对胆固醇氧化酶表达的影响,随乳糖浓度的升高,胆固醇氧化酶酶活持续升高,乳糖浓度大于 10 g/L 时,酶活不再且造成产酶高峰延后,降低了生产强度。诱导时机对产物表达和菌体生长具有重要影响,过早的添加乳糖,菌体生长速度过快,代谢副产物积累,影响菌体生长;而在对数末期添加乳糖诱导,发酵液中代谢副产物增加,不利于菌体生长,进而影响产酶水平;综合考虑菌体产酶量和菌体量,确定在对数生长中后期(培养 8 h 后)开始诱导。温度对胆固醇氧化酶表达有显著影响,低温能减少不必要的代谢反应,可以温和地使蛋白质表达,增加细菌蛋白的正确折叠,从而增强目标蛋白的可溶性;温度太低时,则抑制细菌的代谢合成;因此,在 30℃诱导是比较合适的。在优化诱导表达条件之后,重组大肠杆菌产酶水平达 15.2 U/mL,为优化前酶活 20 倍。显示了乳糖做为诱导剂的优越性。所以在大规模的发酵生产中,采用乳糖诱导的方法代替 IPTG 诱导,可以极大地降低生产成本和风险性。

参考文献(References):

[1] 张毅,屈贤铭,杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J]. 生物工程学报,2000,16(4):464-468.
ZHANG Yi, QU Xian-Ming, YANG Sheng-Li. The influences of lactose as an inducer on the expression of the recombinant proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. **Chinese Journal of Biotechnology,** 2000, 16(4):464-468. (in Chinese)

[2] 王龙刚,邬敏辰,王武. 胆固醇氧化酶基因的克隆及在 *E. coli* 中的表达[J]. 微生物学通报,2006,33 6:39-42.
WANG Long-Gang, WU Min-Chen, Wang Wu. Cloning and expression of Brevibacterium sp. DGCDG-82 cholesterol oxidase gene in escherichia coli[J]. **Microbiology,** 2006, 33 6: 39-42. (in Chinese)

[3] 杨海麟,王长城. 产胆固醇氧化酶重组大肠杆菌的发酵培养基和诱导条件的优化[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(5):670-674.
YANG Hai-lin, WANG Chang-cheng, et al. Optimization of culture conditions for production of cholesterol oxidase using recombinant *E. coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(5):670-674. (in Chinese)

[4] 季文明,陈毅力. 比色法测定胆固醇氧化酶酶活[J]. 无锡轻工大学学报,2000,19 3:251-254.
JI Wen-ming, CHEN Yi-li. Colorimetric determination of the activity of cholesterol oxidase[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry,** 2000, 19 3:251-254. (in Chinese)

[5] 钟学敏,张玲,孙艳. 重组 E.coli 胆固醇氧化酶的分离纯化及其酶学性质研究[J]. 生物技术通报,2009,5:64-68.
Zhong Xuemin, Zhang Ling, Sun Yan. Purification and partial characterization of cholesterol oxidase from recombinant *E. coli*[J]. **Biotechnology Bulletin,** 2009, 5:64-68. (in Chinese)

[6] Harrison JS, Keshavarz-Moore E, Dunnill P, etal. Factors affecting the fermentative production of a lysozyme-binding antibody fragment in Escherichia coli[J]. **Biotechnol Bioeng,** 1997, 53(6):611-622.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net