

重组 AiiA 蛋白可溶性表达 及发酵条件优化

杨彩云¹ 杜慈¹ 黄平² 温真¹ 毛惠民¹ 杨梅^{1*}

(1. 福建师范大学 生命科学学院 福建 福州 350108; 2. 福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心 福建 福州 350108)

摘要:通过摇瓶培养确定重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3) \rightarrow ET29a-aiiA 表达 AiiA 蛋白可溶性表达的最优化条件, 考察以牛肉膏蛋白胨为基础培养基添加不同种类的碳源、不同浓度的磷酸钾缓冲液(pH7.0)、微量元素、乙酸以及调整牛肉膏蛋白胨的比值对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响, 并用 15 L 发酵罐进行补料分批发酵, 确定高密度发酵工艺条件。结果表明: 优化发酵培养基为蔗糖 10 g/L, 牛肉膏 7.8 g/L, 蛋白胨 31.2 g/L, NaCl 5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14 g/L, KH_2PO_4 5.3 g/L, 4 mL/L 微量元素。优化后 AiiA 蛋白可溶性达 4.31 mg/mL。在 15 L 发酵罐补料分批发酵培养中, 诱导 24 h 时, 发酵菌 OD_{600} 达到 18.5, 可溶性蛋白表达量 5.9 mg/mL, 占 AiiA 总蛋白 50.7%, 实现了扩大培养。

关键词: AiiA 蛋白; 补料分批发酵; 条件优化

中图分类号: TQ920.6 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2011)06 - 1219 - 09

Soluble Expression and Fermentation Condition Optimization of Recombined AiiA Protein

YANG Cai-yun¹, DU Ci¹, HUANG Ping²,
WEN Zhen¹, MAO Hui-min¹, YANG Mei^{1*}

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 2. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: The optimum conditions for soluble AiiA protein expression of *E. coli* BL21(DE3) \rightarrow ET29a-aiiA were determined by shaking culture. The effects of adding different varieties of carbon sources and trace elements, different concentration of potassium phosphate buffer solution (pH7.0), trace elements, acetic acid into beef anointed medium, adjusting the ratio of beef extract to tryptone on AiiA protein soluble expression were investigated and the conditions for high density fermentation were determined through the experiment of 15L fermentor fed-batch culture. The results showed that the optimal components in the medium(g/L) were sucrose 10, beef extract 7.8 g, tryptone 31.2, NaCl 5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14, KH_2PO_4 5.3, and trace elements 4 mL/L. Under the optimal culture condition, the soluble AiiA protein reached 4.31 mg/mL. After fermented bacteria were induced for twenty-four hours in 15 L fermentor fed-batch culture with high-density, the OD_{600} of the fermented bacteria reached 18.5, the soluble AiiA protein was 5.9 mg/mL and accounted for 50.7% of the total protein making successful extended culture.

收稿日期: 2011 - 08 - 22 修回日期: 2011 - 11 - 08

基金项目: 福建省科技厅(2009N0032) 和福建省教育厅(JA08041)

作者简介: 杨彩云(1982—), 女, 硕士生, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: meixiao_413@126.com; * 通讯作者: 杨梅, 教授, 博士, E-mail: myang@fjnu.edu.cn.

Key words: AiiA protein; fed batch fermentation; condition optimization

许多革兰氏阴性菌通过自身合成和分泌一种或多种称做自诱导物的信号小分子(AHLs)感知周围环境中自身或其它细菌的数量变化,并通过信号分子启动细菌中相关基因表达来影响细菌的某些生物行为^[1],如生物膜的形成^[2-4]、孢子的生成、生物发光^[5]、抗生素的生物合成、毒力因子的产生^[6-7]、胞外多糖的合成、细菌丛集、根癌农杆菌Ti质粒的结合转移^[8]等,从而适应外界环境的变化,这个过程叫做群体感应^[9]。AHLs是一类水溶性、膜透过性的两亲性化合物,可以自由穿越或通过特定的转运机制透过细胞膜,并在环境中累积^[10]。通过干扰AHLs信号对群体感应系统的控制来提高抗病性,一直是生物农药方面的研究热点。

自然界中广泛分布的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称Bt)存在着*aiiA*基因。该基因的产物AiiA蛋白,是一种具有降解AHLs分子的特异性水解酶,能水解致病菌产生的群体感应信号AHLs分子的内酯键,使内酯环开环后不能再激活某些胞外酶的表达,降低AHLs的浓度,极大地减弱了细菌的致病性。但自然界存在的AiiA蛋白表达量低,对N-乙酰高丝氨酸内酯信号分子的降解活力不高。Dong等^[11]首次将枯草芽孢杆菌240B₁克隆*aiiA*基因导入烟草和马铃薯,转基因植物产生AiiA蛋白,抑制植物病原细菌QS系统,导致病原菌致病性衰减和提高对持续增强植物抗性。已有研究表明转*aiiA*基因的茄子、烟草和马铃薯对软腐病菌的侵染,表现出不发病或病状推迟的现象^[12]。该基因也被导入毕赤酵母GS₁₁₅实现了AiiA蛋白的高效表达,纯化蛋白应用于水产养殖上,能减少嗜水气单孢菌的死亡率^[13]。目前,AiiA蛋白作为一种极具应用前景的新型无公害生物制剂,引起了各界的广泛重视。

本实验室利用已构建的pET-29a-*aiiA*融合表达载体,制备重组工程菌*E. coli* BL21(DE3)-pET29a-*aiiA*实现了AiiA蛋白的可溶性表达^[14-15]。为规模化制备大量的AiiA蛋白,本文对摇瓶实验条件进行完善,进一步实现15L发酵罐高密度培养,建立AiiA蛋白基因工程菌高密度发酵工艺,为后续纯化、酶动力学的相关研究以及产业化发展提供保障,为动植物病害的生物防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与质粒 重组质粒pET29a-*aiiA*由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂 卡那霉素、IPTG、SDS、Tris、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、考马斯亮蓝R-250均购自上海生物工程有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 (1) LB、牛肉膏蛋白胨培养基配方参见[6]。(2)微量元素(g/L): FeSO₄·7H₂O 0.1, CaCl₂·2H₂O 0.02, ZnSO₄·7H₂O 0.0225, MnSO₄·4H₂O 0.005, (NH₄)₆MoO₄·4H₂O 0.001, Na₂B₄O₇·H₂O 0.0002, CuSO₄·H₂O 0.01。

1.1.4 主要仪器与设备 V-4100 spectrophotometer 分光光度计; Mini-PROTEAN4 型电泳仪; JSU380A 型扫描仪; GUJS 15-AUTOBIO 型全自动机械搅拌发酵罐购自镇江东方生物工程设备技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶培养 (1) 摇瓶培养条件: 重组工程菌*E. coli* BL21(DE3)-pET29a-*aiiA*活化后,挑单菌落接种到牛肉膏蛋白胨培养基(含80 μg/mL卡那霉素)中,37℃,230 r/min培养过夜。以10 g/L接种量转接到装液量30 mL的250 mL的三角锥形瓶,培养到OD₆₀₀约为0.5,加IPTG终浓度为0.6 mmol/L,20℃诱导20 h。

(2) 碳源的优化: 通过在牛肉膏蛋白胨培养基中添加5 g/L不同的碳源(蔗糖、麦芽糖、甘油、D-果糖、葡萄糖)研究不同碳源对AiiA蛋白可溶性表达的影响。

(3) 蔗糖浓度的优化: 在牛肉膏蛋白胨培养基中加入蔗糖使其终浓度分别为1.5、10、15、20、25 g/L。

(4) 牛肉膏蛋白胨之比的优化: 调整牛肉膏蛋白胨之比分别为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,以原始牛肉膏蛋白胨培养基为对照。

(5) 磷酸钾溶液(pH7.0)浓度的优化: 在牛肉膏蛋白胨培养基中添加2 mol/L的磷酸钾缓冲液,使磷酸钾缓冲液终浓度为50、100、150、200、250 mmol/L。

(6) 微量元素对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响: 在牛肉膏蛋白胨培养基中分别添加 2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

(7) 混合微量元素对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响: 在牛肉膏蛋白胨培养基中添加 1、2、4、6、8、10 ml/L 微量元素溶液。

(8) 乙酸钠对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响: 在牛肉膏蛋白胨培养基中添加 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 g/L 乙酸钠。

1.2.2 15 L 罐发酵培养 (1) 种子液制备。将 *E. coli* BL21(DE3) -pET29a-aiiA 菌株活化后单菌落接入到 LB 培养基(含 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 37 $^\circ\text{C}$ 230 r/min 培养 7~8 h。以 10 g/L 接种量将以上一级种子接入到含 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基 37 $^\circ\text{C}$ 230 r/min 培养过夜, 作为二级种子。

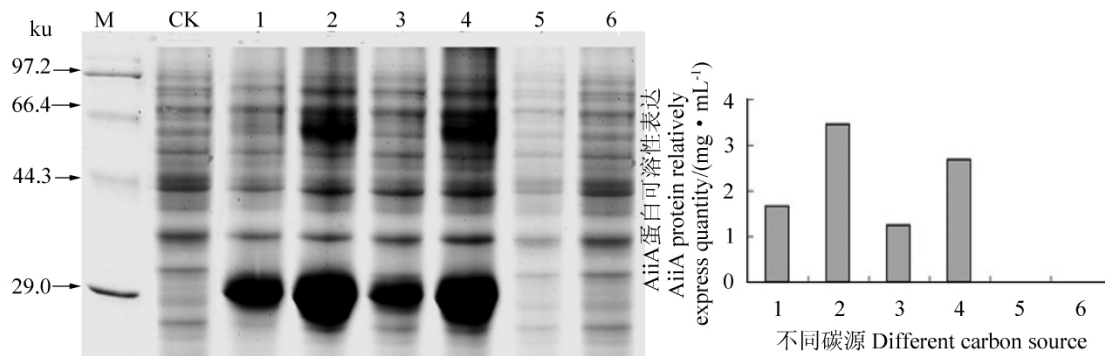
(2) 15 L 发酵罐分批补料培养。使用优化发酵培养基, 以 100 g/L 接种量接入到装料量 10 L 的 GUJS AUTOBIO 型 15 L 全自动机械搅拌发酵罐, 发酵参数分别为温度 37 $^\circ\text{C}$, 搅拌转速 300 r/min, 通气量 1.0 $\text{m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{min})$, 罐压 0.04 MPa。4 h 后开始以每小时补入培养基体积 2% 的速率流加体积分数为 50% 甘油, 到第 6 小时, 温度调节到 20 $^\circ\text{C}$, 转速降低至 150 r/min, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 开始诱导, 每隔 6 h 取样。发酵过程中以浓氨水自动流加调节 pH7.0。

1.2.3 破壁方法和 SDS-PAGE 样品处理 取 1.5 mL 诱导完毕的菌液, 8 000 r/min、离心 5 min, 弃上清, 用 30 μL 双蒸水重悬菌体, 工作 10 s, 停 15 s, 工作 30 个循环进行超声波破碎。将破壁之后的菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 取 30 μL 上清, 加 7.5 μL 5 \times 上样缓冲液, 沸水浴 10 min, SDS-PAGE 电泳备用^[16]。上清液即为可溶性表达的 AiiA 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳可看到分子量约 28 ku。

1.3 检测方法

1.3.1 细胞密度(OD_{600})的测定 发酵液经合适倍数的稀释后, 用紫外可见分光光度计于 600 nm 处测其光吸收值, 光吸收值与稀释倍数的乘积即发酵液的细胞密度(OD_{600})。本方法用于摇瓶和发酵试验。

1.3.2 蛋白质相对含量测定 采用 SDS-PAGE 电泳法及以软件 Gel-pro analyzer 分析 AiiA 蛋白条带相对含量。



a: SDS-PAGE 图

b: 灰度扫描图

M: marker; CK: 未诱导; 1: 牛肉膏培养基; 2: 蔗糖; 3: 麦芽糖; 4: 甘油; 5: D-果糖; 6: 葡萄糖。

M: Protein marker; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2: sucrose; 3: maltose; 4: glycerin; 5: D-fructose; 6: glucose.

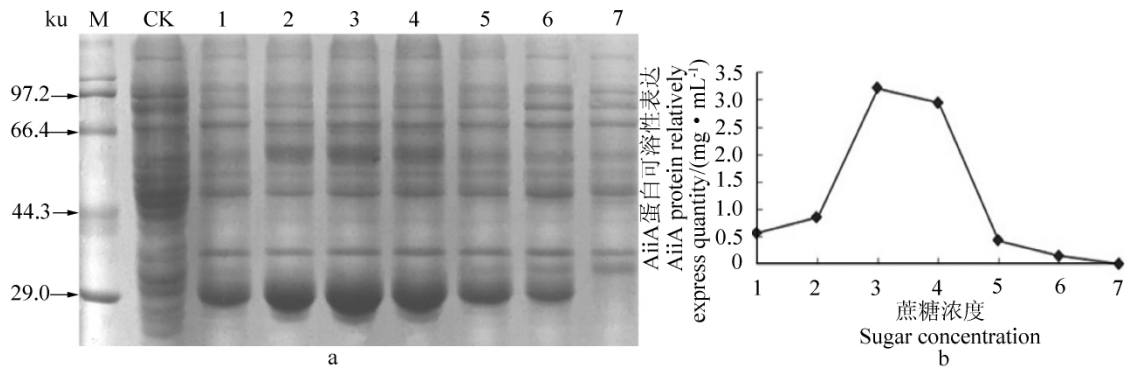
图1 不同碳源对 AiiA 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on AiiA protein soluble expression

2 结果与分析

2.1 摇瓶结果

2.1.1 不同碳源对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响 对 SDS-PAGE 进行灰度扫描并用软件 Gel-pro analyzer 分析蛋白条带含量(图 1)。在培养基中添加 5 g/L 不同的碳源(蔗糖、麦芽糖、甘油、D-果糖、葡萄糖) 结果表明: 蔗糖和甘油对 AiiA 蛋白的可溶性表达明显优于其他 3 种碳源, 可溶性 AiiA 蛋白分别达到 3.45 mg/mL 和 2.68 mg/mL。麦芽糖对目的蛋白的表达有明显抑制作用。添加 D-果糖、葡萄糖破壁上清液中没有 AiiA 蛋白可溶性表达。



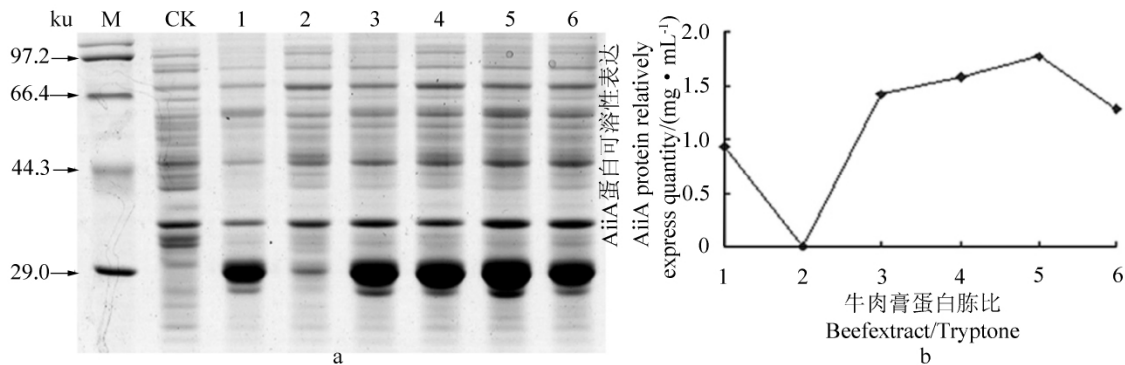
M: marker; CK: 未诱导; 1: 牛肉膏培养基; 2: 1 g/L; 3: 5 g/L; 4: 10 g/L; 5: 15 g/L; 6: 20; 7: 25 g/L.

M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2 - 7: sucrose concentration of 1、5、10、15、20、25 g/L.

图2 不同蔗糖浓度对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响

Fig. 2 Effect of different sucrose concentration on AiiA protein soluble expression

2.1.2 不同蔗糖浓度对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响 利用 SDS-PAGE 电泳蛋白条带进行灰度扫描及软件分析(图2)表明:随着蔗糖浓度的提高,AiiA 蛋白的可溶性表达增加。当蔗糖浓度为 10 g/L 时,可溶性 AiiA 蛋白的表达量最高,达 3.21 mg/mL。随着蔗糖浓度继续提高,AiiA 蛋白可溶性表达不但没有

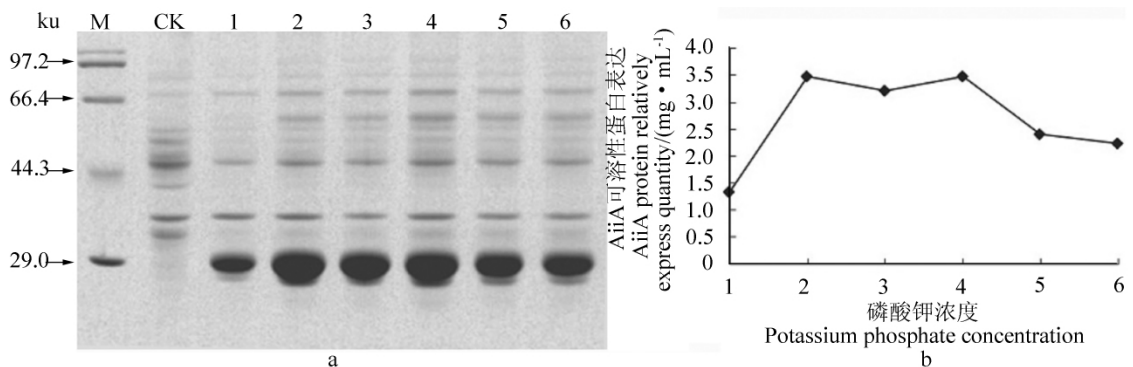


M: marker; CK: 未诱导; 1: 牛肉膏培养基; 2: (1:1); 3: (1:2); 4: (1:3); 5: (1:4); 6: (1:5).

M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2 - 6: Ratio between Beef extract and Tryptone for 1: 1、1:2、1:3、1:4、1:5.

图3 牛肉膏蛋白胨培养基之比对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响

Fig. 3 Effect of the ratio between beef extract and tryptone on AiiA protein soluble expression



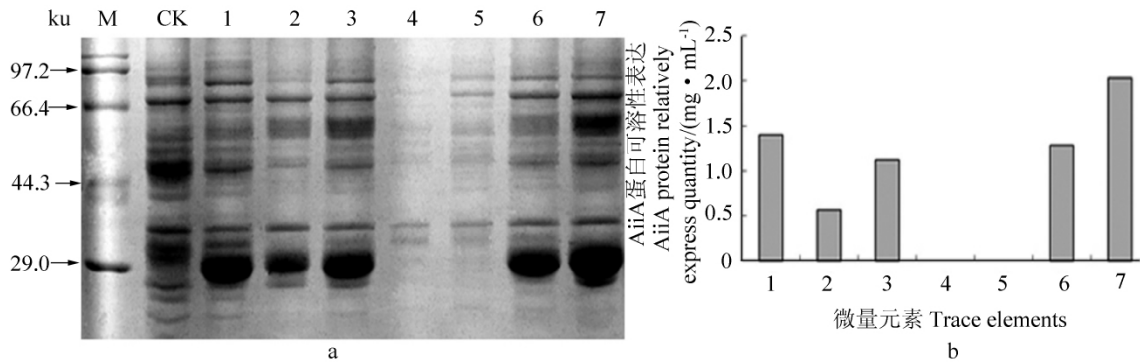
M: marker; CK: 未诱导; 1:牛肉膏培养基; 2: 50 mmol/L; 3: 100 mmol/L; 4: 150 mmol/L; 5: 200 mmol/L; 6: 250 mmol/L. M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2 - 6: different potassium phosphate buffer(PH7.0) for 50、100、150、200、250 mmol/L.

图4 不同磷酸钾缓冲液(pH7.0)对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响

Fig. 4 Effect of different potassium phosphate buffer (pH7.0) on AiiA protein soluble expression

再提高, 反而明显下降。蔗糖浓度大于 15 g/L 抑制效果明显。蔗糖浓度在 25 g/L 基本上没有可溶性表达。这可能是因为碳源浓度过高时, 糖代谢产生过量的酸性物质, 使菌体生长的微环境恶化, 影响某些酶的活性, 抑制了菌体的生长, 从而抑制目的蛋白的表达。综合考虑产量和成本, 确定添加蔗糖的最佳浓度为 10 g/L。

2.1.3 牛肉膏蛋白胨培养基之比对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响 SDS-PAGE 电泳蛋白条带进行灰度扫描及软件分析(图 3) 表明, AiiA 蛋白可溶性表达量随着牛肉膏蛋白胨之比的减小而增加。牛肉膏蛋白胨之比为 1:4 时 AiiA 蛋白的可溶性表达最高, 达到 1.77 mg/mL。但是当牛肉膏蛋白胨之比小于 1:4 时, AiiA 蛋白的可溶性表达量呈明显下降趋势。这可能是因为氮源比失调抑制工程菌的代谢, 导致菌体初期生长旺盛, 繁殖量大, 代谢废物增多, 改变代谢微环境, 使菌体后期生长滞后、代谢异常, 从而影响目的蛋白的可溶性表达。所以本实验选择最佳的牛肉膏蛋白胨培养基之比为 1:4。



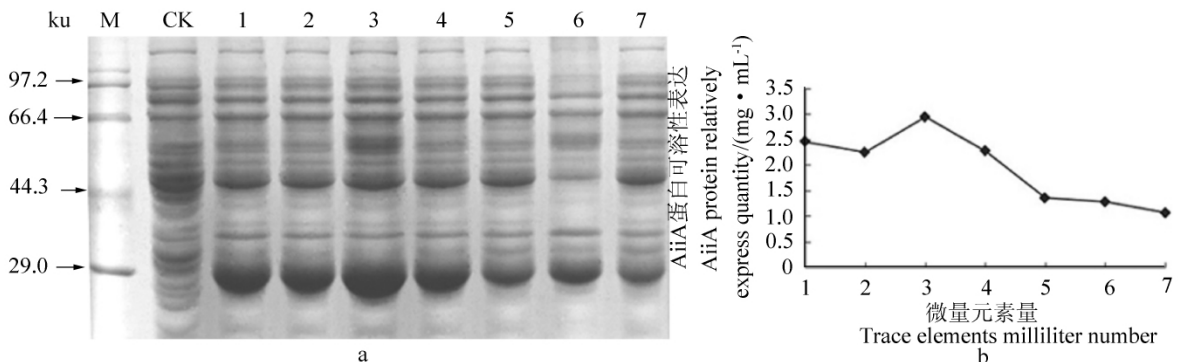
M: marker; CK: 未诱导; 1: 牛肉膏培养基; 2: MgSO₄ · 7H₂O; 3: Na₂B₄O₇ · H₂O; 4: ZnSO₄ · 7H₂O; 5: CuSO₄ · 5H₂O; 6: MnSO₄ · 4H₂O; 7: CaCl₂ · 2H₂O.

M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2: MgSO₄ · 7H₂O; 3: Na₂B₄O₇ · H₂O; 4: ZnSO₄ · 7H₂O; 5: CuSO₄ · 5H₂O; 6: MnSO₄ · 4H₂O; 7: CaCl₂ · 2H₂O.

图 5 各微量元素对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响

Fig. 5 Effect of various trace elements on the AiiA protein soluble expression

2.1.4 不同磷酸钾缓冲液(pH7.0)对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响 从图 4 可以看出, 磷酸钾缓冲液(pH7.0)对 AiiA 蛋白可溶性表达影响效果明显。添加终浓度为 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液时 AiiA 蛋白可溶性表达量最多, 表达量达到 3.48 mg/mL。添加终浓度为 50 ~ 150 mmol/L 时, 目的蛋白可溶性表达量差别不是很大。当添加量继续增加为 200 mmol/L 时, AiiA 蛋白可溶性表达量反而比最高表达量减少 33.3%。综合上述因素, 添加磷酸钾缓冲液的最佳终浓度为 50 mmol/L 即 K₂HPO₄ · 3H₂O 14 g/L, KH₂PO₄ 5.3 g/L。

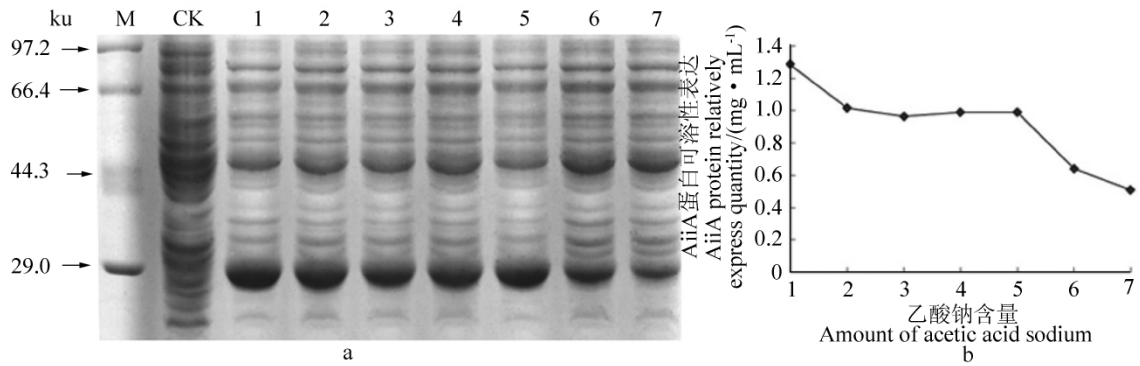


M: marker; CK: 未诱导; 1: 牛肉膏培养基; 2: 2 ml/L; 3: 4 ml/L; 4: 6 ml/L; 5: 8 ml/L; 6: 10 ml/L; 7: 12 ml/L.

M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2-7: mixed trace elements for 2、4、6、8、10、12 ml/L.

图 6 混合微量元素对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响

Fig. 6 Effect of mixed trace elements on the AiiA protein soluble expression



M: marker; CK: 未诱导; 1: 牛肉膏培养基; 2: 0.5 g/L; 3: 1 g/L; 4: 2 g/L; 5: 4 g/L; 6: 6 g/L; 7: 8 g/L.

M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1: Beef anointed medium; 2 - 7: concentration of Sodium acetate for 0.5、1、2、4、6、8 ml/L.

图7 乙酸钠对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响

Fig.7 Effect of Sodium acetate concentration on the AiiA protein soluble expression

2.1.5 各微量元素对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响 SDS - PAGE 电泳蛋白条带进行灰度扫描及软件分析(图6)表明,分别添加6种不同微量元素对 AiiA 蛋白的可溶性表达影响也不同。其中 CaCl₂ · 2H₂O 对 AiiA 蛋白可溶性表达具有明显的促进作用,比原始的牛肉膏培养基提高了 45.5%。MgSO₄ · 7H₂O, Na₂B₄O₇ · H₂O, Mn-SO₄ · 4H₂O 抑制目的 AiiA 蛋白可溶性表达。添加 CuSO₄ · 5H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O 诱导后破壁上清液基本没有 AiiA 的蛋白表达。

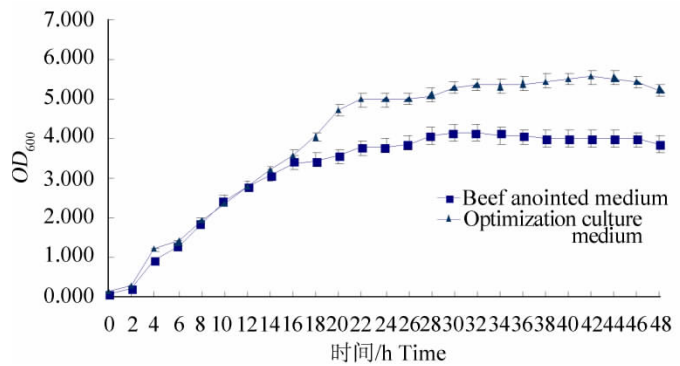
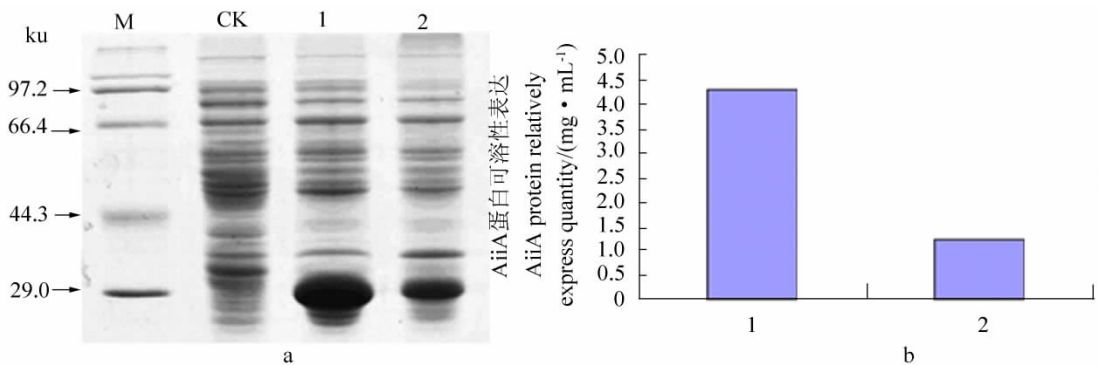


图8 E. coli - BL21 (DE3) - pET29a - aiiA 的摇瓶生长曲线

Fig.8 Cell growth curve of E. coli - BL21 (DE3) - pET29a - aiiA in the shake flask



M: marker; CK: 未诱导; 1: 优化后上清; 2: 优化前上清。

M: Protein marker CK: Without IPTG induction; 1: the supernatant of after optimization; 2: the supernatant of before optimization.

图9 条件优化前后可溶性目的蛋白相对含量的比较

Fig.9 The condition optimizes the soluble goal protein comparative content comparison

2.1.6 混合微量元素对 AiiA 蛋白可溶性表达的影响 通过 SDS-PAGE 电泳和凝胶分析软件分析,微量元素混合液的添加浓度在 2 ~ 4 mL/L, AiiA 蛋白的可溶性表达随着混合微量元素浓度的升高而升高,混合微量元素浓度大于 4 mL/L 时, AiiA 蛋白的可溶性表达量随着混合微量元素浓度的升高而大幅地降低。所以选择混合微量元素的浓度为 4 mL/L 比较适合。

2.1.7 乙酸钠对 AiiA 蛋白可溶性表达的抑制作用 如图 7 所示, 添加一定量的乙酸钠后, 发现乙酸钠对 AiiA 蛋白可溶性表达有抑制作用。乙酸钠浓度在 0.5 ~ 4.0 g/L 时, 各浓度抑制效果差别不大。但是当乙酸钠浓度大于 6 g/L 时, 有明显的抑制作用。

2.1.8 摇瓶培养基优化前后生长曲线比较 从图 8 可以看出, 牛肉膏培养基和优化后的培养基培养重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3) - pET29a-aiiA 所测的生长曲线趋势大致是一致的: 0 ~ 2 h 细菌生长缓慢, 处于延滞期; 4 ~ 22 h 细菌生长旺盛, 菌体密度快速增加, 处于对数生长期, 22 ~ 40 h 处于稳定期; 40 h 之后菌体生长就进入了衰亡期。因此, 优化后的培养基菌体量明显优于牛肉膏培养基, 最终确定优化培养基用于上罐高密度培养。

2.1.9 摇瓶培养基优化前后可溶性 AiiA 蛋白比较 SDS-PAGE 电泳蛋白条带进行灰度扫描及软件分析(图 9) 表明, 优化前可溶性目的蛋白的相对含量为 1.22 mg/mL, 优化后达到 4.31 mg/mL。实验结果表明优化后培养基大大提高了目的蛋白的可溶性表达, 为进一步 15 L 发酵罐扩大培养奠定基础。

2.2 15 L 发酵罐放大培养

2.2.1 发酵生长曲线 为进一步了解 *E. coli* BL21(DE3) - pET29a-aiiA 的生长特性并确定最佳诱导时机, 首先测定上罐生长曲线。接种量 100 g/L 时, 重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3) - pET29a-aiiA 生长曲线

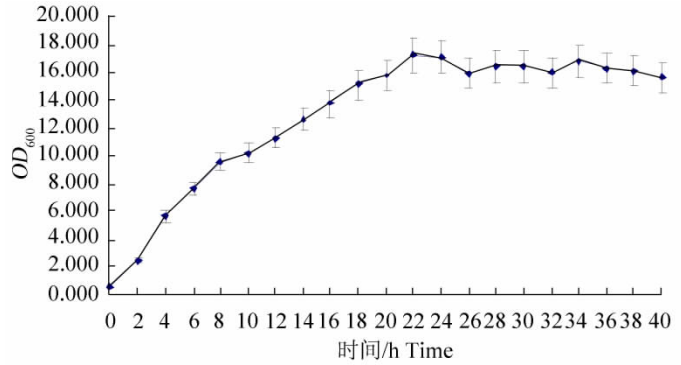


图 10 *E. coli* BL21(DE3) - pET29a - aiiA 的罐上生长曲线
Fig. 10 Cell growth curve of *E. coli* BL21(DE3) - pET29a - aiiA in the fermenter

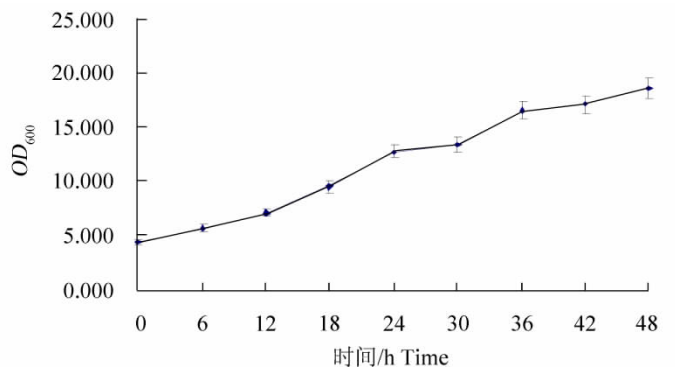
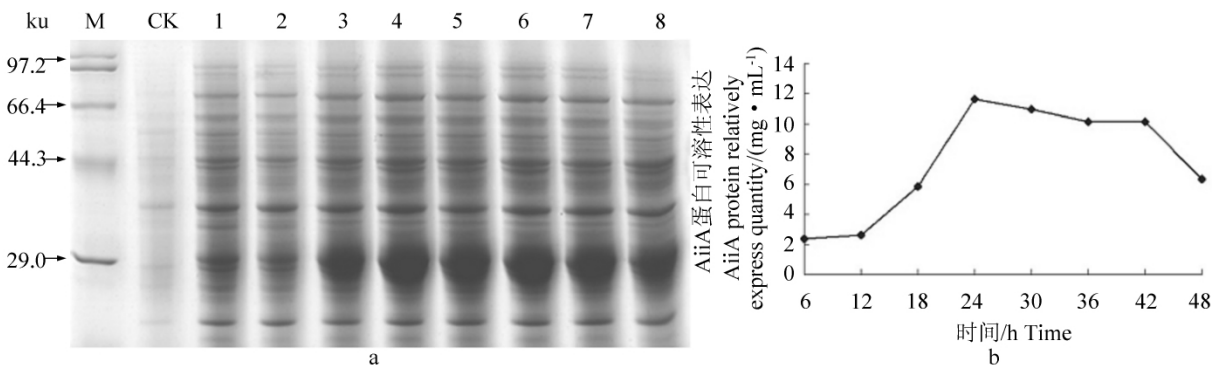


图 11 *E. coli* BL21(DE3) - pET29a - aiiA 加 IPTG 诱导后每 6 h 测的 OD₆₀₀ 值
Fig. 11 The OD₆₀₀ values of *E. coli* BL21(DE3) - pET29a - aiiA add IPTG every six hours after induction



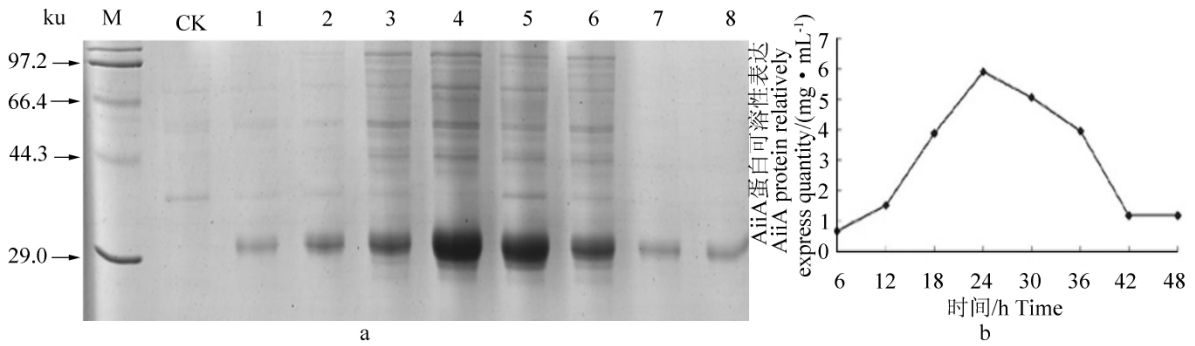
M: marker; CK: 未诱导; 1 - 8: 6、12、18、24、30、36、42、48 h 取样。
M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1 - 8: sample for 6、12、18、24、30、36、42、48 h.

图 12 罐上每 6 h 取样 AiiA 总蛋白量

Fig. 12 Amount of total AiiA protein from cultured cell at every six hours in tank fermentation

如图 9。表明: 接种培养 2 h 后开始进入对数生长期 22 ~ 34 h 为平稳期 34 h 后进入衰退期, 最大发酵密度 OD₆₀₀ 达到 17.25。6 h 是对数期前期是诱导目的蛋白最佳时期, 因此选择 6 h 时加 IPTG 诱导。诱

导时机的选择非常关键,诱导时机过早,外源蛋白的表达会改变宿主细胞生理状态,不利于工程菌生长和重组蛋白的表达;诱导时间太晚,菌体老化,营养物质匮乏,代谢副产物增多,不利于重组蛋白的表达。
 2.2.2 罐上 AiiA 蛋白可溶性表达 见图 10,工程菌 *E. coli* BL21(DE3) -pET29a-aiiA 在添加 IPTG 开始诱导后,菌体总量一直呈线性增加。而 12 h 之前表达量很少 AiiA 总蛋白,12 ~ 24 h 表达量增加,随后蛋白量减少(图 11)。AiiA 总蛋白经破壁处理,SDS - PAGE 电泳显示(图 12)可溶性 AiiA 蛋白变化趋势与图 14 一致。因此,确定最佳放罐时间为 24 h。



M: marker; CK: 未诱导; 1 - 8: 6、12、18、24、30、36、42、48 h 取样。

M: Protein marker ; CK: Without IPTG induction; 1 - 8: sample for 6、12、18、24、30、36、42、48 h.

图 13 罐上每 6 h 取样 AiiA 蛋白可溶性表达量

Fig. 13 Amount of AiiA soluble protein from cultured cell at every six hours in tank fermentation

3 讨论

本实验室已对 AiiA 蛋白可溶性表达的培养基、IPTG 浓度、初始生物量、诱导时间、装液量等条件进行初步探究,本文进一步研究了以牛肉膏蛋白胨为基础培养基添加不同种类的碳源和微量元素,不同浓度的磷酸钾缓冲液(pH7.0)、微量元素、以及牛肉膏蛋白胨之比对重组菌 *E. coli* BL21(DE3) -pET29a-aiiA 表达可溶性 AiiA 蛋白的影响。结果表明,蔗糖和甘油促进作用明显,葡萄糖和 D-果糖没有 AiiA 可溶性表达。Andrea Vei 等^[17]曾报道高浓度的葡萄糖会抑制乳糖启动子,抑制重组蛋白表达。同时,葡萄糖浓度较高时,就会积累大量发酵代谢副产物乙酸,抑制菌体的生长和降低目的蛋白表达量。因此,发酵过程中应尽可能降低葡萄糖浓度,或流加甘油来补充碳源,解除“葡萄糖效应”^[18]。磷酸盐不仅是微生物生长、代谢、增殖以及维持溶液渗透压的必需物质,而且对重组工程菌质粒的稳定性、菌体的生物量以及外源蛋白的表达都有影响。不同微量元素与某些外源蛋白的活性和稳定性密切相关,如参与细胞的基础代谢、调节细胞膜的通透性和酶系的活性^[19]、向培养基中添加微量元素也可能提高蛋白的可溶性。CaCl₂ · H₂O 促进 AiiA 目的蛋白的可溶性表达,混合微量元素的最佳浓度是 4 ml/L。朱才庆等^[20]研究发现,在培养基中添加微量元素后,大肠杆菌 DA19 生长明显改善,生物量比原来提高 2.47 倍。大肠杆菌在缺氧条件下发生“葡萄糖效应”,产生代谢副产物乙酸^[21]。乙酸的积累会抑制重组工程菌的菌体生长和目的基因的表达。最终确定 *E. coli* BL21(DE3) -pET29a-aiiA 最佳发酵培养基为蔗糖 10 g/L、牛肉膏 7.8 g/L、蛋白胨 31.2 g/L、NaCl 5 g/L、K₂HPO₄ · 3H₂O 14 g/L、KH₂PO₄ 5.3 g/L、微量元素 4 mL。此优化培养基用于 AiiA 可溶性表达量高达 4.31 mg/mL,比优化前有显著提高。

在 15 L 发酵罐分批发酵中初步验证了摇瓶培养条件,实现了可溶性 AiiA 蛋白的罐上表达。发酵条件即:二级菌种 100 g/L 的接种量(搅拌速率 300 r/min,通气量 10 vvm,罐压 0.04 MPa)。4 h 后开始以 20 g/L 补料速度流加体积分数为 50% 甘油,37 °C 继续培养 2 h 后,温度降到 20 °C,转数调整为 150 r/min,加入终浓度 0.8 mmol/L IPTG 开始诱导,但随着诱导时间的延长,AiiA 总蛋白的可溶性表达反而减少,最佳放罐时间为添加 IPTG 诱导后 24 h。在此条件下,诱导 24 h 时,OD₆₀₀ 达到 18.5,可溶性蛋白占 AiiA 总蛋白的 50.7%。*E. coli* BL21(DE3) 是蛋白酶活性缺陷型菌株^[22],但 Hoffmanl 等^[23]也发现 *E. coli* BL21(DE3) 为宿主细胞时,异源蛋白有被蛋白酶降解的情况发生,到诱导后期,目标蛋白表达水平降低,酶活降低,与本实验结果相一致。此蛋白发酵工艺稳定,适合大规模培养需要,其高效表达为以后对高密度发酵溶氧、PH、诱导时机、诱导前后的碳源及 IPTG 诱导方式等条件的进一步探究以及后

续研究,如进行下游纯化、酶动力学的相关研究,以及大规模生产进而实现产业化发展奠定了基础。

经济的发展和人民生活水平的日益提高,健康和环境问题将成为人们关注的新焦点。以生物农药、无公害农药、特异性农药、低毒、低残留农药为主的生物农药势必会取代传统的化学防治。而 AiiA 蛋白能够破坏革兰氏阴性细菌的群体感应系统,成为生物防治革兰氏阴性病原菌的重要手段。AiiA 蛋白对动、植物病原菌发病的调控作用已引起国际学术界的广泛关注,将成为以生物技术防治细菌病害的新靶点。

参考文献:

- [1] Zhang L H, Dong Y H. Quorum sensing and signal interference: Diverse implications [J]. *Mol Microbiol* 2004, 53(6): 1563–1571.
- [2] Augustine N, Kumar P, Thomas S. Inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* sp. [J]. *Arch Microbiol* 2011, 192(12): 1019–1022.
- [3] Vikram A, Jayaprakasha G, Jesudhasan P, et al. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids [J]. *Journal of applied microbiology* 2010, 109(2): 515–527.
- [4] Kang Y S, Park W. Contribution of quorum-sensing system to hexadecane degradation and biofilm formation in *Acinetobacter* sp. strain DR1 [J]. *Journal of applied microbiology* 2010, 109(5): 1650–1659.
- [5] Steenackers H P, Levin J, Janssens J C, et al. Structure-activity relationship of brominated 3-alkyl-5-methylene-2(5H)-furanones and alkylmaleic anhydrides as inhibitors of *Salmonella* biofilm formation and quorum sensing regulated bioluminescence in *Vibrio harveyi* [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2010, 18(14): 5224–5233.
- [6] Dong Y H, Zhang X F, Xu J L, et al. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference [J]. *Applied and environmental microbiology* 2004, 70(2): 954–960.
- [7] Loh J, Pierson E A, Pierson L S. Quorum sensing in plant-associated bacteria [J]. *Current Opinion in Plant Biology* 2002, 5(4): 285–290.
- [8] Carlier A, Uroz S, Smadja B, et al. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69(8): 4989–4993.
- [9] Czajkowski R, Jafra S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules [J]. *Acta Biochimica Polonica* 2009, 56(1): 1–16.
- [10] Lenz D H, Miller M B, Zhu J, et al. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae* [J]. *Molecular microbiology* 2005, 58(4): 1186–1202.
- [11] Dong Y H, Gusti A R, Zhang Q, et al. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus species* [J]. *Applied and environmental microbiology* 2002, 68(4): 1754–1759.
- [12] Yin X T, Xu L, Fan S S, et al. Isolation and characterization of an AHL lactonase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010, 26(8): 1361–1367.
- [13] Chen R, Zhou Z, Cao Y, et al. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture [J]. *Microbial Cell Factories* 2010, 9(1): 39.
- [14] 杨梅, 张峰, 林彬辉, 等. AiiA 蛋白的可溶性表达及其抗菌活性研究 [J]. *分子细胞生物学报* 2008, 41(6): 465–472.
- [15] J 萨姆布鲁克, D. W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学教育出版社, 2008, 12.
- [16] 杨梅, 林丽玉, 温真, 等. 重组工程菌 *E. coli* BL21 (DE3) -pET29a-aiiA 可溶性 AiiA 蛋白的发酵条件优化 [J]. *福建师范大学学报: 自然科学版* 2010, 26(6): 97–103.
- [17] Veit A, Polen T, Wendisch V F. Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation [J]. *Applied microbiology and biotechnology* 2007, 74(2): 406–421.
- [18] Donovan R S, Robinson C W, Glick B R. Optimizing the expression of a monoclonal antibody fragment under the transcriptional control of the *Escherichia coli* lac promoter [J]. *Canadian journal of microbiology* 2000, 46(6): 532–541.
- [19] 王海波, 欧俊杰, 耿信笃. 基因工程菌生产 rhG-CSF 发酵培养基的研究 [J]. *中国生物工程杂志* 2003, 23(11): 68–71.
- [20] 朱才庆, 叶勤. 微量元素对大肠杆菌生长和乙酸生成的影响研究 [J]. *微生物学报* 2004, 44(2): 230–234.
- [21] 田文标, 邹全明, 张卫军. 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位基因工程菌发酵工艺的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(2): 12–16.
- [22] Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 189(1): 113–130.
- [23] Martinez A, Knappskog P M, Olafsdottir S, et al. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme [J]. *Biochemical Journal*, 1995, 306(2): 589–597.