

基因重组鲨鱼软骨血管生成抑制因子的发酵条件优化

吴欢¹, 陈先金¹, 李观贵², 姚晟¹, 徐丽慧¹, 谢秋玲¹

(暨南大学 1. 生物工程研究所; 2. 生物工程学系, 广东 广州 510632)

[摘要] 采用三角摇瓶来优化基因工程菌表达重组鲨鱼软骨血管生成抑制因子(SCAIF)的最佳发酵条件,并以此为基础在 Biotop CF-10L 自动控制发酵罐进行发酵培养. 基因工程菌 BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)诱导表达 SCAIF 蛋白的最佳摇瓶培养条件是:接种量为 2%、装液量为 75 mL/500 mL、加入 IPTG 的诱导时间为培养 2 h 后、IPTG 浓度为 0.25 mmol/L、诱导时间为 2 h. BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)菌种在 Biotop CF-10L 自动控制发酵罐中的条件为:以 10% 的接种量接种到 10 L 发酵培养基中,设定 pH 7.0,温度 37 ℃,培养 4 h 后,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,诱导 2 h 后终止发酵. 发酵罐中获得的菌体量为 10.2 g/L,蛋白表达率为 25% 左右.

[关键词] 鲨鱼软骨血管生成抑制因子; 发酵条件; 优化

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)03-0314-05

The optimization of the recombinant Shark Cartilage Angiogenesis Inhibiting Factor's fermentation conditions

WU Huan¹, CHEN Xian-jin¹, LI Guan-gui², YAO Sheng¹, XU Li-hui¹, XIE Qiu-lin¹

(1. Bioengineering Institute; 2. Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] To determine the optimal condition for the expression of recombinant Shark Cartilage Angiogenesis Inhibiting Factor (SCAIF), IPTG concentration, induction time, harvest period, Inoculum concentration, liquid volume were optimized in this study in flask. It was found that higher expression of rSCAIF could be achieved under the following conditions; 2% inoculum was added to 75 mL/500 mL LB medium. After 2 h of culture, 0.25 mmol/L IPTG was added to induce rSCAIF expression. The recombinant BL21(DE3)/SCAIF was harvested after 2 h of induction. Large scale gene expression was performed in Biotop CF-10L fermenter. Started with 10% inoculation, the cell was cultured in pH7.0 fermentation medium for 4 hours, followed by induction with 0.5 mmol/L IPTG for 3 hours. The final biomass was 10.2 g/L, and the expressed rSCAIF was about 25% of total cellular protein.

[Key words] Shark Cartilage Angiogenesis Inhibiting Factor; fermentation condition; optimization

近几年来,抑制血管生成成为肿瘤治疗的新靶点^[1],对新生血管内皮细胞的抑制可消减大量的肿瘤细胞等^[2-3]. 鲨鱼是极少发生恶性肿瘤的动物之

一. 经研究发现,鲨鱼软骨提取物中含有一种血管生成抑制因子(Shark Cartilage Angiogenesis Inhibiting Factor, SCAIF)^[4]. SCAIF 能通过抑制肿瘤周围

[收稿日期] 2008-11-13

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2008BAI63B05)

[作者简介] 吴欢(1984-),男,硕士研究生,研究方向:基因工程
通讯作者: 谢秋玲,副研究员. Tel: 020-85220728

毛细血管生成而达到抑制肿瘤生长和迁移的作用^[5-8]。目前大多 SCAIF 都是从鲨鱼软骨中提取的,而鲨鱼软骨资源有限,通过基因工程来生产 SCAIF 是一种可以大规模获得 SCAIF,并应用于临床的切实可行的方法。

本实验针对已构建好的重组 BL21 (DE3) / pET3c (SCAIF) 菌种,采用三角摇瓶培养摸索不同的发酵条件对其生长及蛋白表达量的影响,为大规模生产 SCAIF 打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

工程菌株 BL21(DE3)/pET3c (SCAIF) 由本所构建。

1.2 方法

基础 AIFL 三角摇瓶培养条件优化:设置不同培养条件实验组,于 37 °C, 180 r/min 培养。每小时抽取培养液检测 $A_{600\text{ nm}}$ 作为菌体密度,绘成生长曲线。SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达量。按体积分数 5% 浓缩胶和 12% 分离胶配制 SDS-PAGE 胶,120 V 电泳 1 h。每组实验都在上一实验所得最佳参数基础上进行。

2 实验结果

2.1 接种量的优化

按 1% 接种量接种于含 5 mL LB 培养基的试管中,37 °C, 培养过夜。第二天分别按 1%、2%、5%、10% 的接种量接种于 50 mL/500 mL 三角瓶摇床培养。在培养 2 h 后加入终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG 诱导,并设一个没有加 IPTG 以 2% 接种量的作为对照组,在诱导 2 h 后,分别取样进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。同时每隔 1 h 取样测 $A_{600\text{ nm}}$ 。

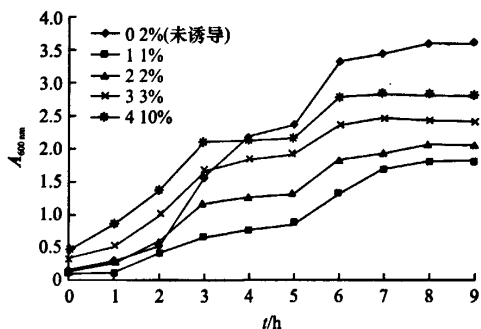
图 1-A 曲线显示,各实验组在培养 6 h 时基本上都达到稳定期,此时 A 值分别为 1.8、2.1、2.4、2.8,即随着接种量的增加,其生物量随着增加。同时从图 1-B 可以得出:以 1%、2% 接种量培养的目的蛋白表达率比 5% 和 10% 高,而 2% 的接种量又比 1% 的表达情况更好。因此选择 2% 的接种浓度。

2.2 IPTG 浓度的优化

按 2% 的接种量接种于三角瓶摇床培养。培养 3 h 后加入终浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,并设一个没有加 IPTG 诱导的对照组,3 h 后分别取样进行 SDS-

PAGE 蛋白质电泳。并比较不同 IPTG 浓度对重组 SCAIF 表达的影响;同时每隔 1 h 取样测 $A_{600\text{ nm}}$ 。

如图 2-A 所示: IPTG 浓度在 0.25 ~ 0.75 mmol/L 的 3 个组的 A 值较高,在 2.3 左右;1 ~ 1.5 mmol/L 3 个组 A 值是在 1.6 左右。而不同 IPTG 浓度对目的蛋白的表达量的影响无明显差异(图 2-B)。综合考虑菌体生长情况以及发酵成本,选择 0.25 mmol/L 为最佳 IPTG 浓度。



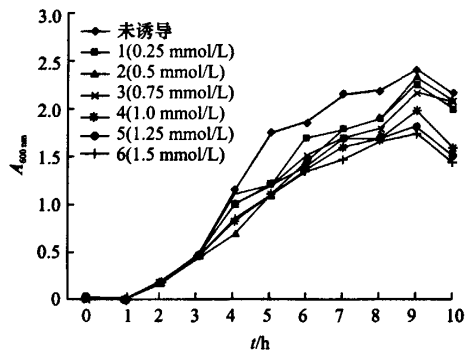
A: 不同接种量 BL21(DE3)/pET3c(SCAIF) 生长情况



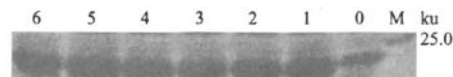
(1~4 分别为 1%、2%、5%、10% 接种量并加入 IPTG 诱导; 0: 2% 接种量不加入 IPTG; M: 低分子质量蛋白 marker)

B: 不同接种量重组 SCAIF-I 的表达

图 1 不同接种量 BL21 (DE3) /pET3c (SCAIF) 生长情况和表达



A: BL21(DE3)/pET3c(SCAIF) 在不同 IPTG 浓度的生长情况



(1~6 分别为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mmol/L 的 IPTG 诱导; 0: 未加入 IPTG; M: 低分子质量蛋白 marker)

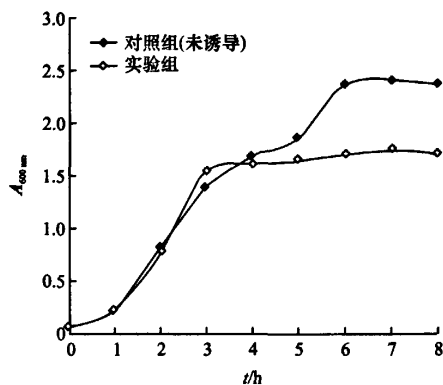
B: IPTG 浓度对重组 SCAIF 表达的影响

图 2 不同 IPTG 浓度诱导的 BL21 (DE3) /pET3c (SCAIF) 生长情况和表达

2.3 重组蛋白表达时间的优化

按2%的接种量接种于50 mL/500 mL三角瓶摇床培养. 培养3 h后在前面实验的基础上加入终浓度为0.25 mmol/L的IPTG诱导,分别在诱导0、1、2、3、4、5、6 h时取样1 mL,并设一个没有加IPTG的作为对照组,在培养9 h后取样进行SDS-PAGE蛋白电泳. 同时每隔1 h取样测 $A_{600\text{ nm}}$.

从图3-A可看出,诱导组在培养后很快就进入了稳定期;最终的菌体浓度 A 值为1.6左右,在培养6 h后达到最高浓度, A 值为1.72. 对照组在培养6 h才进入稳定期,最终 A 值2.4左右. 如图3-B所示:在诱导2 h后菌体表达量较高,综合考虑表达量和菌体浓度,因此IPTG诱导的时间应为2 h.



A: IPTG不同诱导时间的BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)生长情况

0 1 2 3 4 5 6 7 M ku 25.0

(0: 不加入IPTG的对照组; 1~6分别为菌体诱导1、2、3、4、5、6 h; M: 低分子质量蛋白 marker)

B: 不同时间加入IPTG后重组SCAIF的表达

图3 不同IPTG诱导时间的BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)生长情况和表达

2.4 IPTG加入时间的优化

按2%的接种量接种于50/500 mL三角瓶摇床培养. 分别在培养0、1、2、3、4、5、6 h加入终浓度为0.25 mmol/L的IPTG诱导,并设一个没有加IPTG的作为对照组,在培养2 h后,分别取样1 mL进行SDS-PAGE蛋白电泳. 同时每隔1 h取样测 $A_{600\text{ nm}}$.

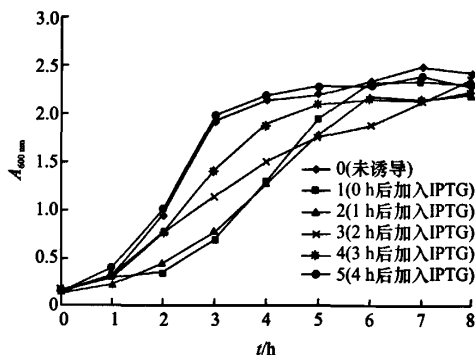
如图4-A所示,在不同时间加入IPTG的菌体的最高浓度接近,即不同诱导时间对菌体的生长的影响没有明显差异. 由图4-B可看出在培养2 h后加入IPTG目的蛋白表达情况是最好的. 因此选择在培养2 h后加入IPTG进行诱导.

2.5 装液量的优化

采用500 mL三角瓶,加入25、50、75、100、125

mL的培养基,并按2%的接种量接入其中. 并设一个50 mL/500 mL装液量,不加IPTG进行诱导的作为对照,在培养2 h后加入终浓度为0.25 mmol/L的IPTG诱导,在诱导2 h后,分别取样进行SDS-PAGE蛋白电泳. 同时每隔1 h取样测 $A_{600\text{ nm}}$.

如图5-A所示,随着装液量的增加,菌体的最高密度随之降低;25、50、75 mL装液量在培养8 h时进入稳定期,最大 A 值可达3.8左右,生长较好;而



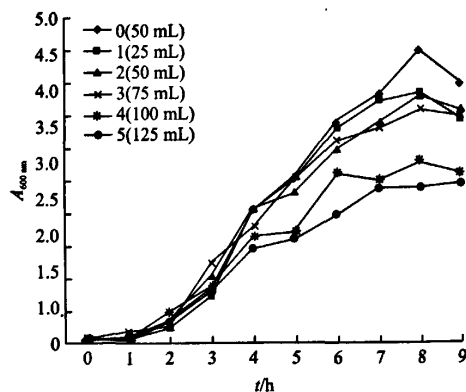
A: 不同时间加入IPTG后BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)生长情况

ku 0 M 1 2 3 4 5
25.0

(0: 不加入IPTG培养4 h的对照组; 1~4分别为培养0、1、2、3、4 h加入IPTG; M: 低分子质量蛋白 marker)

B: 不同时间加入IPTG后重组SCAIF的表达

图4 不同IPTG加入诱导时间的BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)生长情况和表达



A: 不同时间加入IPTG后BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)生长情况

ku M 0 1 2 3 4 5
25.0

(0: 不加入IPTG 50 mL装液量的对照组; 1~5分别为25、50、75、100、125 mL装液量并加入IPTG诱导; M: 低分子质量蛋白 marker)

B: 不同装液量重组SCAIF的表达

图5 不同装液量的BL21(DE3)/pET3c(SCAIF)生长情况和表达

100、125 mL 装液量在 6 h 就停止对数生长,最终浓度也较低。同时从图 5-B 可以看出,75 mL 的装液量目的蛋白的表达量是最高的,因此选择 75 mL 的装液量。

2.6 10L 生物反应器的发酵

在之前实验的基础上,以 10% 的接种量接入 10 L 发酵培养基。生物反应器起始设定参数为: pH 7.0, 温度 37 °C, 转速 200 r/min, 通气量 4 L/min; 并逐渐提高转速至 600 r/min, 通气量至 20 L/min, 以满足菌体生长以及表达的需要。本实验采用甘油作为碳源补料, 从接种开始快速流加 200 g 甘油, 于 30 min 内流加完毕。菌体培养 4 h 后, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。诱导 2 h 后, 放罐并收集菌体。

如图 6-A 所示, 菌体在培养 1 h 后进入对数生长期, 5 h 后进入稳定期。最终获得菌体量 10.2/L, 表达率约为 25%。本次发酵通过延长 IPTG 加入前的培养时间和适当缩短 IPTG 诱导的时间即缩短至 2 h, 获得较高的表达率(图 6-B)和较多菌体。

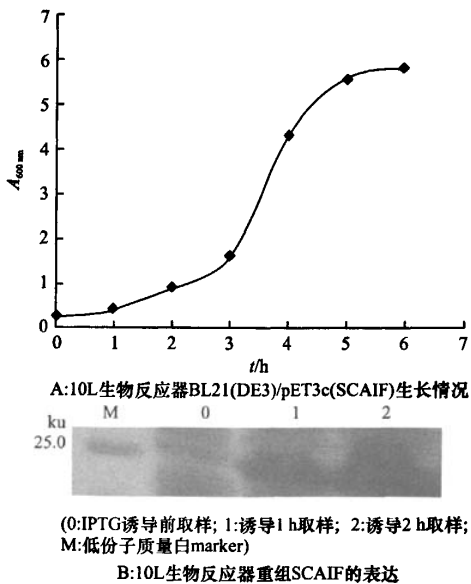


图6 10 L 生物反应器的 BL21(DE3)/pET3c(SCAIF) 生长情况和表达

3 讨论

SCAIF 作为一种血管生成抑制剂被发现后, 人们通过体内外试验进一步证实了 SCAIF 的生物学功能, 并对其应用于临床发挥抗肿瘤效应寄予厚望。

本实验对重组表达 SCAIF 基因工程菌株的发酵条件进行了一系列的优化^[9-13], 并在此基础上进行 10 L 规模的发酵。

在基因工程菌的发酵中, 诱导时间以及诱导剂 IPTG 的浓度是非常关键的因素。因为 IPTG 对菌体具有一定的毒性, 因此会影响菌体的生长。IPTG 浓度过高或者过早加入都会大大减少菌体量, 而 IPTG 浓度过低或者太晚进行诱导又会影响重组蛋白的表达量。因此需要通过优化来确定。摇瓶培养中在设置的最低 IPTG 浓度(0.25 mmol/L)时最终 A_{600nm} 为 2.43, 而高浓度的 IPTG(1.5 mmol/L)最终 A_{600nm} 仅为 1.65。不同浓度 IPTG 浓度对重组 SCAIF 的表达量的影响却没有明显差异。因此我们最终选择了 0.25 mmol/L 为最优 IPTG 浓度。许多文献报道, 基因工程菌的最佳诱导时期多数在菌体的对数生长期中后期, 这样既可以保证获得一定菌体量, 又可以保证得到较好的蛋白表达量。但不同的目的蛋白, 其诱导特性有所不同。摇瓶培养中, 菌体在培养 2 h (对数生长期前期, A 值约为 1.00) 时诱导可获得较高的表达量。当诱导时间为 3 h 以上时, 目的蛋白的量有所下降。综合考虑以上因素, 选择 IPTG 诱导时间为 2 h 为最佳。发酵罐的培养环境优于摇瓶, 诱导前的培养时间应长于摇瓶诱导前的培养时间, 从而获得较多的菌体量; 发酵罐菌体浓度高于摇瓶, 加入的 IPTG 的浓度应适当提高, 以确保获得较高的表达量; 而 IPTG 的诱导时间则可参照摇瓶的。因此选择菌体在发酵罐中培养 4 h 后加入 0.5 mmol/L 的 IPTG, 诱导时间为 2 h。

溶氧一直是发酵过程中的限制性因素, 本实验采用装液量来检测菌体生长和重组蛋白表达对溶氧的要求。装液量过大, 进入摇瓶中的空气量就少, 在大肠杆菌进入对数生长期后, 易造成溶氧不足; 装液量过少, 营养物质的量不足, 同样也可能减少目的蛋白的表达量。本实验中, 75 mL/500 mL 的装液量重组蛋白的表达量与菌体生长都可以达到一个很好的水平, 随着装液量的增加, 菌体生长和重组蛋白的表达量都有所减少。发酵罐内的溶氧可即时调节。在 IPTG 诱导之前, 菌体在发酵罐生长较快, 对氧气消耗不断增大, 这时需要及时提高发酵罐的转速和通气量以满足菌体生长需要, 通常溶氧值应保持在 30% 以上; 而加入 IPTG 诱导后, 菌体以表达蛋白为主, 生长缓慢, 溶氧值趋于稳定, 发酵罐的转速和通

气量可维持不变。

为了提高最终的生产量,发酵中需要补加碳源;而为维持发酵液 pH 的稳定,培养基中需要添加缓冲系统,磷酸盐缓冲系统是最为常用的缓冲系统。本实另外还对甘油、葡萄糖、磷酸盐是否对发酵中菌体生长和表达量有影响做出了检测,结果表明甘油、葡萄糖可以促进菌体的生长,而对重组蛋白的表达没有影响,而磷酸盐对菌体量和表达量均无明显影响。

[参考文献]

- [1] 孙军辉. 抗肿瘤血管生成机制及治疗研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2005, 19(6): 459.
- [2] SIEMANN D W, CHAPLIN D J, HORSMAN M R. Vascular-targeting therapies fortreatment of malignant disease [J]. *Cancer*, 2004, 100(12): 2491 - 2499.
- [3] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86(3): 353 - 364.
- [4] MOSES M A, WIEDRSCHAIN D, WU I, et al. SCAIF-I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis [J]. *Prod Notl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2645 - 2650.
- [5] O'REILLY M S, HOLMGREN L, SHING Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewislung carcinoma[J]. *Cell*, 1994, 79: 315.
- [6] FOLKMAN J. Anti2angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors[J]. *Ann Surg*, 1972, 175(3): 409 - 416.
- [7] RIBATTI D, CONCONI M T, NUSSDORFER G G. Non-classic endogenous regulators of angiogenesis [J]. *Pharmacol Rev*, 2007, 59(2): 185 - 205.
- [8] 沈先荣, 贾福星. 软骨抗肿瘤因子的研究现状[J]. 海军军事医学杂志, 1994, 15(1): 30.
- [9] 张 锐, 孙美榕, 欧阳红生, 等. 真核基因在 pET 系统中表达出现的问题与拟解决的方案[J]. *生物技术*, 2004, 14(2): 62 - 63.
- [10] 吴一凡, 张双全, 高秀玉, 等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究[J]. *南京师大学报*, 2002, 25(1): 89 - 93.
- [11] 邹 锋, 郝 飞, 宋志强, 等. HSPC016 基因重组工程菌发酵研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(7): 904 - 906.
- [12] 刘文波, 柴同杰. 大肠杆菌高密度发酵研究[J]. *动物科学与动物医学*, 2001, 18(1): 27 - 29.
- [13] MAORI M, MASAHIKO I. Improvement in the expression of CYP2B6 by co-expression with molecular chaperones GroES/EL in *Escherichia coli* [J]. *Protein Express Purif*, 2006, 46: 401 - 405.

[责任编辑:黄建军]