

重组大肠杆菌产融合蛋白 AG 的发酵优化

蓝萌萌¹, 黄玲珑¹, 倪辉², 李志朋^{1,3}, 姜泽东^{1,3}, 朱艳冰^{1,3}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361102;
3. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 对产融合蛋白 AG 的重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a-rPAG 进行发酵优化以提高其表达量。从筛选后的 TB 培养基出发, 通过单因素实验对 TB 培养基的组分和摇瓶发酵的培养条件进行优化, 确定了最适的培养基组分, 即酵母浸粉为 24 g/L、大豆蛋白胨为 12 g/L、蔗糖为 8 g/L、 KH_2PO_4 为 2.31 g/L、 K_2HPO_4 为 12.54 g/L。在此基础上, 利用单因素实验获得了最佳的培养条件, 即培养基初始 pH 值为 7.0、接种量为 5%、装液量为 40%、菌液 $A(600) = 0.8$ 时加入 0.3 mmol/L IPTG、30 °C 诱导发酵 8 h。优化培养基组分和发酵条件后, 重组大肠杆菌的 $A(600)$ 值是优化前的 3.58 倍, 融合蛋白 AG 相对含量是优化前的 2.92 倍。在 30 L 发酵罐进行初步放大验证, 诱导发酵 8 h 后, 融合蛋白 AG 相对含量最高, $A(600)$ 值最高达 8.688, 湿质量达到 18.56 g/L。

[关键词] 融合蛋白 AG; 发酵优化; 重组大肠杆菌; 培养基组分; 生物量

[中图分类号] TQ 925

Fermentation Condition Optimization of Recombinant *Escherichia coli* Producing Recombinant Protein AG

LAN Mengmeng¹, HUANG Linglong¹, NI Hui², LI Zhipeng^{1,3}, JIANG Zedong^{1,3}, ZHU Yanbing^{1,3}

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361102, China;

3. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China)

Abstract: Fermentation of the recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-28a-rPAG was optimized to improve its production of recombinant protein AG. The components of the TB medium and the culture conditions of shake flask fermentation were optimized by single-factor experiments based on the screened TB medium. The optimal medium composition was determined as 24 g/L yeast extract, 12 g/L soy peptone, 8 g/L sucrose, 2.31 g/L KH_2PO_4 , 12.54 g/L K_2HPO_4 . On this basis, the optimal culture conditions were initial medium pH of 7.0, an inoculation volume of 5%, a liquid volume of 40%, and the addition of 0.3 mmol/L IPTG when the $A(600)$ value of the culture reached 0.8, followed by induction at 30 °C for 8 h. After optimizing, the $A(600)$ of recombinant *E. coli* increased by 3.58 times, and the relative content of the fusion protein AG increased by 2.92 times. A preliminary scale-up verification was conducted in a 30 L fermenter. After 8h of induction fermentation, the relative content of the recombinant protein AG was the highest, with the $A(600)$ value

[收稿日期] 2025-01-07

[基金项目] 福建省促进海洋与渔业产业高质量发展专项资金项目 (FJHYF-L-2023-25)。

[通信作者] 朱艳冰 (1976—), 博士, 教授, 从事生物化学与分子生物学方向研究。E-mail: yanbingzhu@jmu.edu.cn

reaching up to 8.688 and the wet weight reaching 18.56 g/L.

Keywords: recombinant protein AG; fermentation optimization; recombinant *E. coli*; medium component; biomass

0 引言

随着生物医药行业的发展,单克隆抗体被广泛应用于酶联免疫吸附实验等医学诊断技术^[1-2]和抗原纯化层析技术^[3],占据了生物制药产品大部分市场份额^[4]。近年来,抗体细胞培养效价的显著提高使上游加工不再是抗体制造的瓶颈,追求高通量的下游加工逐渐成为降低生产成本的迫切需求。在抗体下游纯化工艺中,亲和层析是一种高选择性、高效率和便捷的技术^[5]。细菌蛋白类亲和层析是最常用的抗体捕获层析技术,利用特殊细菌蛋白作为亲和配基以实现抗体的分离纯化^[6],这些细菌蛋白的层析主要包括金黄色葡萄球菌蛋白 A (staphylococcal protein A, SPA) 层析、链球菌蛋白 G (streptococcal protein G, SPG) 层析^[7]等。利用基因工程技术将 Protein A 的 5 个结合域 (E、D、A、B、C) 与 Protein G 的 3 个结合域 (C1、C2、C3) 重组得到的融合蛋白 AG (recombinant protein AG) 具有更广谱的抗体吸附能力^[8]。

与单独的 Protein A 或 Protein G 相比,融合蛋白 AG 既改善了 Protein A 对 IgG3 结合能力弱的缺陷,又弥补了 Protein G 无法结合其他类型免疫球蛋白的不足。重组后的融合蛋白 AG 理论相对分子质量为 54.38 ku,等电点为 4.62,与 IgG 结合的 pH 值依赖性较低,在抗体纯化、免疫共沉淀和疾病治疗等领域都具有重要应用价值。Mali 等^[9]研究发现,与传统的 Protein G 琼脂糖层析介质相比,利用融合蛋白 AG 琼脂糖层析介质纯化肿瘤抑制蛋白 p53 的性能更好。Barwick 等^[10]使用融合蛋白 AG 琼脂糖磁珠将 661 W 细胞裂解复合物进行免疫共沉淀,结果表明,跨膜受体蛋白 Sig1R 中存在大量 NRF2,为 NRF2 调节参与 Sig1R 介导的视网膜神经保护提供了有力支持。Liu 等^[11]利用融合蛋白 AG 与高盐浓度下过量 β -原纤维制成的薄膜,结合 IgG 分子并通过传统的针刺注射器在体内注射,将生物治疗药物集中在病变组织中以实现局部递送,提高了生物利用度。

当前,融合蛋白 AG 存在生产成本低和效率低等问题,不利于其规模化生产。对重组大肠杆菌产融合蛋白 AG 进行发酵优化可以提高目标蛋白的产量和效率,减少生产成本。目前,利用蛋白表达量为指标对融合蛋白 AG 的发酵进行优化的相关研究较少,对于发酵培养基的筛选和发酵条件优化实验不多。因此,本研究以实验室前期构建表达的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-28a-rPAG 为发酵菌株,筛选发酵培养基,并研究培养基组分、培养条件对重组菌株生长和融合蛋白 AG 表达的影响,进一步提高融合蛋白 AG 的产量,并在 30 L 发酵罐中进行放大验证,为融合蛋白 AG 的大规模发酵生产提供重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 菌株

重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-28a-rPAG 工程菌株为本实验室前期构建和保存。

1.2 培养基

1) LB 培养基。胰蛋白胨为 10 g/L,酵母浸粉为 5 g/L,NaCl 为 10 g/L,pH = 7.0。

2) TB 培养基。胰蛋白胨为 12 g/L,酵母浸粉为 24 g/L,KH₂PO₄ 为 2.31 g/L,K₂HPO₄ 为 12.54 g/L,甘油为 4 g/L,pH = 6.5。

3) SB 培养基。胰蛋白胨为 32 g/L,酵母浸粉为 20 g/L,NaCl 为 5 g/L,pH = 7.0。

4) 2YT 培养基。胰蛋白胨为 16 g/L,酵母浸粉为 10 g/L,NaCl 为 5 g/L,pH = 7.0。

5) M9 培养基。Na₂PO₄·7H₂O 为 12.8 g/L,KH₂PO₄ 为 12.8 g/L,NaCl 为 0.5 g/L,NH₄Cl 为 1 g/L,葡萄糖为 4 g/L,MgSO₄ 为 0.24 g/L,CaCl₂ 为 0.011 g/L。

1.3 主要仪器与试剂

UV-5200 型紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); Epoch2T 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); JY92-II N 型超声波细胞粉碎机 (宁波新艺生物科技股份有限公司); Centrifuge 5810R 型台式离心机 (Eppendorf, China); 30 L 发酵罐 (镇江东方生物工程设备技术有限责任公司); 高速冷冻离心机 (厦门百萌生物科技有限公司); 多色荧光凝胶成像仪 (GE 医疗器械公司); DHP-90122932 型恒温培养振荡箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 微孔板恒温振荡器 (杭州瑞诚仪器有限公司)。

耐碱蛋白 A 酶联免疫分析试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 硫酸卡那霉素和异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 购自北京索莱宝科技有限公司; 蔗糖、D(-)-果糖、乳糖、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、咪唑等均为国产分析纯产品。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株活化

将保存在 -80 ℃ 的重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a-rPAG 工程菌株在 LB 固体培养基进行划线, 在 37 ℃ 恒温培养箱培养 16 h, 挑取单菌落于 5 mL LB 液体培养基 (含 0.05 g/L 卡那霉素, 下同) 中, 37 ℃ 培养 12 h 作为一级种子液。将一级种子液按体积分数为 1% (下同) 接种量接种于 50 mL LB 液体培养基中, 在 37 ℃、180 r/min 恒温培养箱中培养 12 h, 作为二级种子液。

1.4.2 发酵培养基筛选

将二级种子液按 1% 接种量接种于 300 mL 不同液体发酵培养基 (LB、TB、M9、SB 和 2YT, 含 0.05 g/L 卡那霉素) 中, 37 ℃、180 r/min 培养 3 h, 而后加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 在 16 ℃、180 r/min 恒温条件下培养 6 h。测定大肠杆菌工程菌株的生物量和融合蛋白 AG 相对含量, 筛选初始发酵培养基。

1.4.3 重组大肠杆菌的生物量测定

参照郭茹等^[12]的方法, 发酵过程中取菌液样品, 稀释一定倍数后, 使用分光光度计在 600 nm 波长处测量吸光度值, 测定工程菌株的菌体生物量。

1.4.4 融合蛋白 AG 相对含量的测定

发酵结束后, 将 150 mL 发酵液 7000g 离心 10 min, 收集菌体, 用 5 mL 缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄、300 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑, pH = 8.0) 将菌体重悬, 超声破碎后在 4 ℃ 下 12 000g 离心 20 min, 收集上清液。耐碱蛋白 A 酶联免疫分析试剂盒 (上海恒远生物科技有限公司) 应用双抗夹心法, 将抗体包被在微孔板制成固相抗体, 融合蛋白 AG 样品加入后与固相抗体相结合, 再加入 HRP 标记的二抗结合形成抗体-抗原-酶标抗体复合物显色, 测定上清液中蛋白 A 的含量水平, 以分析融合蛋白 AG 的相对含量。融合蛋白 AG 相对含量 = (上清液中蛋白 A 浓度/单因素优化条件下蛋白 A 最高浓度) × 100%。培养基及发酵优化前后分别取 30 μL 上清液进行 SDS-PAGE, 凝胶染色后, 分析融合蛋白的表达量。

1.4.5 培养基组分的优化

以工程菌的生物量和融合蛋白 AG 的相对含量为指标, 在初始发酵培养基的基础上优化培养基组分, 包括不同碳源种类 (甘油、葡萄糖、果糖、蔗糖和乳糖), 并对最适碳源的添加量 (2、4、6、8、10 g/L) 进行优化。在碳源优化的基础上, 优化氮源种类 (胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、硝酸钾和氯化铵), 并对最适氮源的添加量 (10、12、14、16、18 g/L) 进行优化, 确定最佳培养基组分。

1.4.6 摇瓶水平发酵条件的优化

以工程菌的生物量和融合蛋白 AG 的相对含量为指标, 在碳源、氮源及其添加量优化后的发酵培养基的基础上, 采用单因素实验优化培养基的初始 pH 值 (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、诱导温度 (16、20、25、30、37 ℃)、接种量 (1%、3%、5%、7%、10%)、装液量 (20%、30%、40%、

50%、60%)、IPTG 添加量 (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mmol/L)、添加诱导剂时间 ($A(600) = 0.2$ 、0.4、0.6、0.8、1.0)、诱导发酵时间 (6、8、10、12、14 h)，确定最佳摇瓶发酵条件。

1.4.7 30 L 发酵罐放大验证

在摇瓶水平培养基成分和培养条件优化的基础上，利用 30 L 发酵罐进行放大发酵，装液量为 40% (12 L)，pH 值控制在 7.0，溶氧量控制在 30%，加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L 后诱导，每 2 h 取样 1 次，测定重组大肠杆菌的生物量和融合蛋白 AG 的相对含量。参照王建荣等^[13]的方法，将发酵液离心去掉上清液后进行称重，根据前后质量差计算菌体湿质量。

1.5 数据处理

利用 Microsoft Excel 2019 进行数据整理，采用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (ANOVA)，多重比较采用 Duncan 法 ($P < 0.05$)，利用 Origin 2021 软件进行绘图。

2 实验结果与分析

2.1 发酵培养基筛选及组分优化

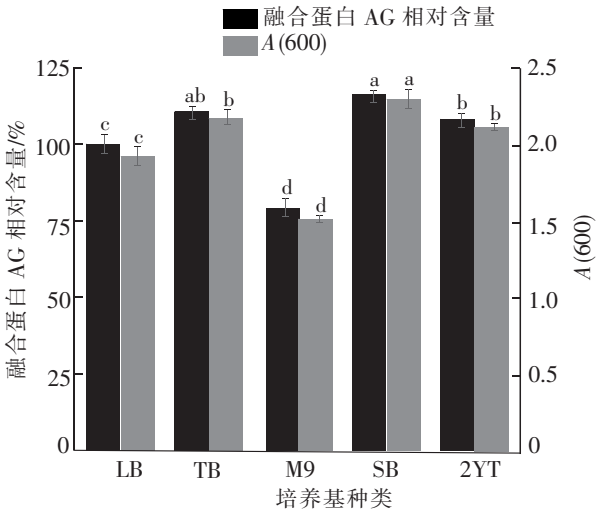
2.1.1 发酵培养基种类对融合蛋白 AG 表达的影响

发酵培养基的组分和碳氮源的比例对于微生物的生长、代谢具有重要影响^[14]。利用 5 种不同基础发酵培养基培养重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-28a-rPAG 工程菌，测定微生物的生长和目标蛋白的表达情况，结果如图 1 所示。可见，当培养基为 SB 时，融合蛋白 AG 的相对含量和菌体量均最高，其次为 TB 和 2YT 培养基。虽然 TB 培养基中菌体生物量略低于 SB 培养基 5.84%，但 SB 培养基的融合蛋白 AG 相对含量与 TB 培养基没有显著性差异。考虑到 TB 培养基的经济成本相对较低，且韦利军等^[15]认为，TB 培养基中含有磷酸盐缓冲液，可以在一定阶段内控制发酵液维持一定的酸碱度，利于工程菌的生长。因此，本文选择 TB 培养基作为初始发酵培养基。

2.1.2 碳源种类及添加量对融合蛋白 AG 表达的影响

碳源是微生物合成有机化合物的重要原料，它能够影响微生物的生长和代谢^[16]。以 TB 培养基为基础，利用不同碳源替换 TB 培养基中的甘油，确定最佳碳源，结果如图 2a 所示。可见，当甘油作为碳源时，菌体的 $A(600) = 2.133$ ，而当蔗糖作为碳源时，菌体的 $A(600)$ 值增加了 33.31%，融合蛋白 AG 相对含量提高了 12.92%，说明蔗糖有助于重组大肠杆菌生长导致的融合蛋白产量增加。此外，考虑到蔗糖的经济成本较低，因此，本文选择蔗糖为最佳碳源。

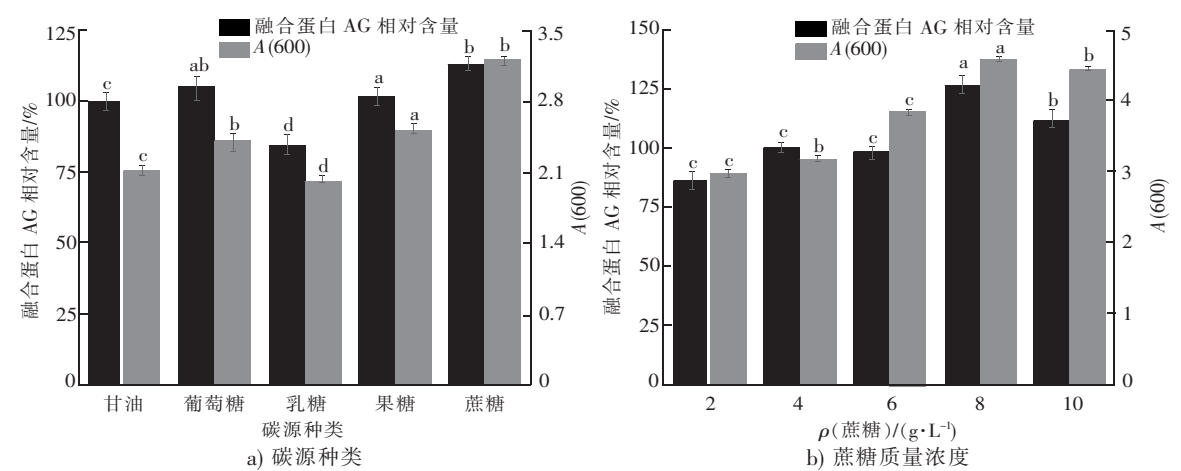
蔗糖质量浓度对融合蛋白 AG 表达的影响如图 2b 所示。可见，随着蔗糖质量浓度的增加，菌体 $A(600)$ 值和融合蛋白 AG 的相对含量均呈现先增加后减少的趋势。当蔗糖质量浓度达到 8 g/L 时， $A(600)$ 达到最高值 4.578，融合蛋白 AG 相对含量较蔗糖添加为 4 g/L 时提高了 30.45%。但当进一步提高蔗糖质量浓度时，目的蛋白的表达量却下降，可能是因为蔗糖质量浓度过高导致渗透压增大，影响菌株生长和蛋白质的表达^[17]。因此，本文选择蔗糖的质量浓度为 8 g/L 作为发酵培养基的碳源浓度。



说明:不同小写字母表示具有统计学意义 ($P < 0.05$) (以 LB 培养基中融合蛋白相对含量为 100%)。

图 1 不同培养基对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.1 Effects of different culture media on the relative content of recombinant protein AG and cell growth



说明:不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$)(以 TB 培养基中的甘油和添加质量浓度为 4 g/L 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

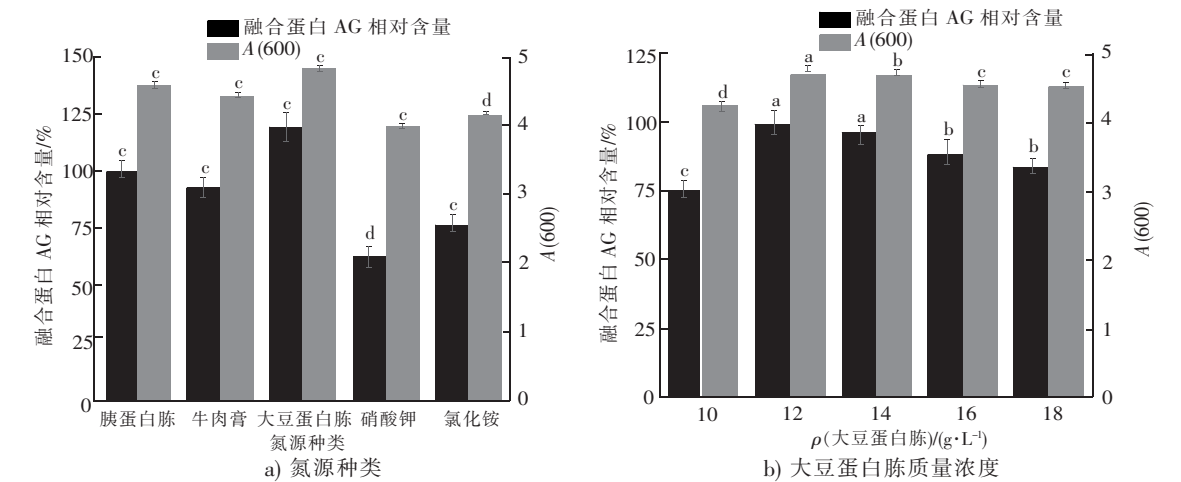
图 2 碳源种类、蔗糖质量浓度对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.2 Effects of carbon sources and sucrose concentrations on the relative content of recombinant protein AG and cell growth

2. 1. 3 氮源种类及添加量对融合蛋白 AG 表达的影响

氮源的种类和浓度会影响微生物对含氮化合物的代谢能力，在微生物的生长和蛋白质合成中发挥重要作用^[18]。在蔗糖及其添加量优化的基础上，利用不同氮源替换 TB 培养基中的胰蛋白胨，确定最佳氮源，结果如图 3a 所示。可见，与胰蛋白胨作为氮源相比，当以大豆蛋白胨作为氮源时，融合蛋白 AG 相对含量提高了 18.99%，菌体 A(600) 值也达到了 4.829。此外，培养基中添加有机氮源比添加无机氮源的融合蛋白 AG 相对含量和菌体量都高，这可能是因为有机氮源中含有丰富的生长因子，能够促进大肠杆菌的生长^[19]。因此，本文选择大豆蛋白胨作为最佳氮源。

氮源质量浓度对融合蛋白 AG 表达的影响如图 3b 所示。可见，融合蛋白 AG 相对含量随着大豆蛋白胨添加量的增加呈现先增加后减少的趋势，在大豆蛋白胨添加量达到 12 g/L 时，菌体量和蛋白质表达量均最高。因此，本文选择大豆蛋白胨的最佳质量浓度为 12 g/L。



说明:不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$)(以 TB 培养基中的胰蛋白胨和质量浓度为 12 g/L 下融合蛋白 AG 的相对含量为 100%)。

图 3 氮源种类、大豆蛋白胨质量浓度对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.3 Effects of nitrogen sources and soy peptone concentrations on the relative content of recombinant protein AG and cell growth

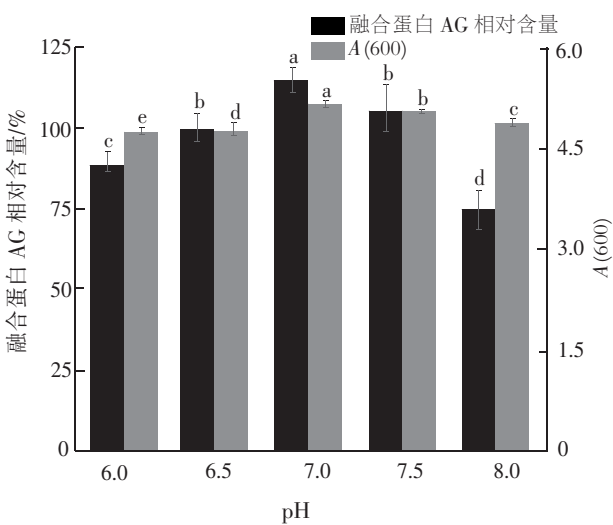
2.2 摇瓶发酵条件优化

2.2.1 培养基初始 pH 值对融合蛋白 AG 表达的影响

培养基的 pH 值是发酵过程中微生物生长和合成产物的重要参数^[20]。在培养基组分优化的基础上，对发酵培养基的初始 pH 值进行优化，结果如图 4 所示。可见，当 pH 值低于 7.0 时，菌体生物量和融合蛋白 AG 相对含量均逐渐上升；当 pH 值为 7.0 时，A(600) 值达到最高值 5.183，融合蛋白 AG 相对含量比组分优化后的 TB 培养基高 15.27%；当 pH 值高于 7.0 时，菌体浓度及融合蛋白 AG 表达量均呈下降趋势，可能是由于微碱性的环境对重组大肠杆菌生长和融合蛋白 AG 的表达有抑制作用^[8]。因此，本文选择培养基初始 pH = 7.0 为最佳培养条件。

2.2.2 发酵温度对融合蛋白 AG 表达的影响

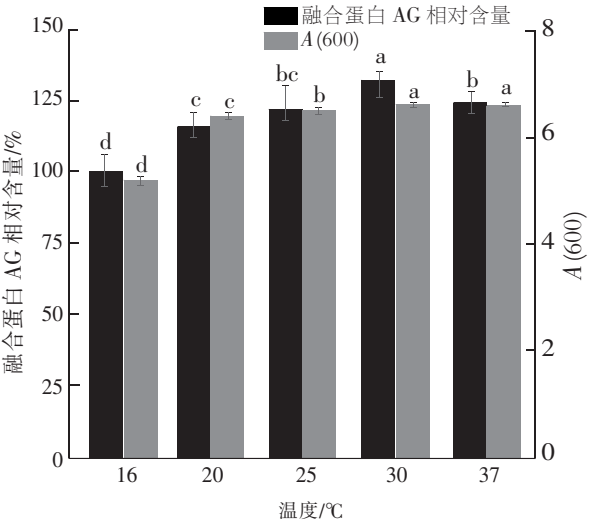
大肠杆菌需要合适的诱导温度，低温可以减少蛋白质错误折叠，但是菌体的生长速度会受到限制；高温虽然可以加快菌体的代谢速度，缩短发酵周期，但是蛋白质容易出现错误折叠，产生大量的不溶性蛋白质^[21]。温度对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响如图 5 所示。可见，当温度达到 37 ℃ 时，菌体 A(600) 值达到最高值 6.605，但融合蛋白 AG 相对含量低于 30 ℃ 的。因此，本文的后续实验选择最佳诱导温度为 30 ℃。



说明：不同小写字母表示具有统计学意义($P<0.05$) (以培养基初始 pH=6.5 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 4 培养基初始 pH 值对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.4 Effect of pH value on the relative content of recombinant protein AG and cell growth



说明：不同小写字母表示具有统计学意义($P<0.05$) (以初始发酵温度 16 ℃ 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 5 发酵温度对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.5 Effect of fermentation temperature on the relative content of recombinant protein AG and cell growth

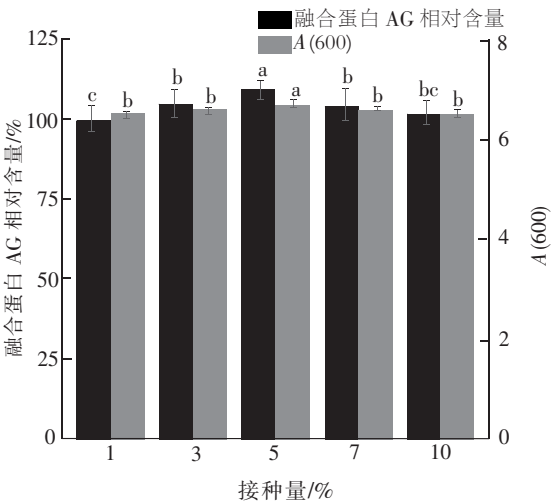
2.2.3 接种量对融合蛋白 AG 表达的影响

接种量对发酵周期和蛋白质合成有直接的影响。高接种量虽然能够缩短发酵周期，降低发酵中染菌的概率，但是接种量过高，菌体繁殖过快，容易造成溶氧不足，持续生长时间短、自溶加快，不利于目的蛋白的合成与积累^[22]。接种量对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响如图 6 所示。可见，随着接种量的增加，菌体浓度与蛋白质表达量均呈现先增加后减少的趋势。当接种量为 5% 时，菌体 A(600) 值达到最高值 6.731，此时融合蛋白 AG 相对含量也达到最高。因此，本文确定后续实验的接种量为 5%。

2.2.4 装液量对融合蛋白 AG 表达的影响

大肠杆菌是兼性厌氧菌，其生长受到培养基中溶氧量的影响。在摇瓶发酵中，培养基的装液量会直接影响培养基的溶氧量^[23]。过高的溶氧会产生活性氧和代谢副产物，不利于目的产物的累积；氧气供给不足会影响菌体前期的生长及蛋白质的表达。装液量对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影

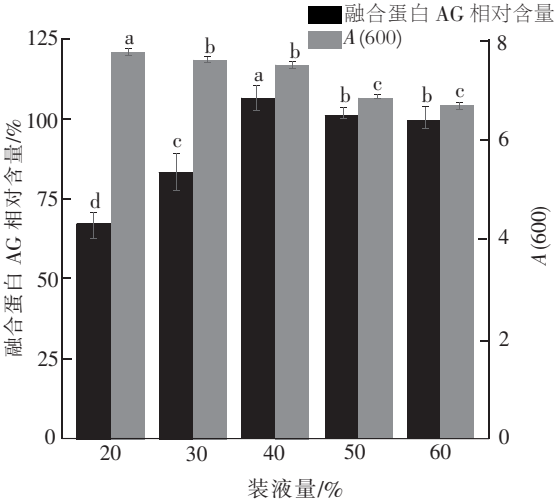
响如图 7 所示。可见, 融合蛋白 AG 的表达量随着装液量的增加呈现先升高后降低的趋势。当锥形瓶装液量为 40% 时, 融合蛋白 AG 的表达量达到最高。因此, 本文选择 40% 为最佳装液量。



说明:不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$) (以 1%接种量下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 6 接种量对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.6 Effect of inoculum amount on the relative content of recombinant protein AG and cell growth



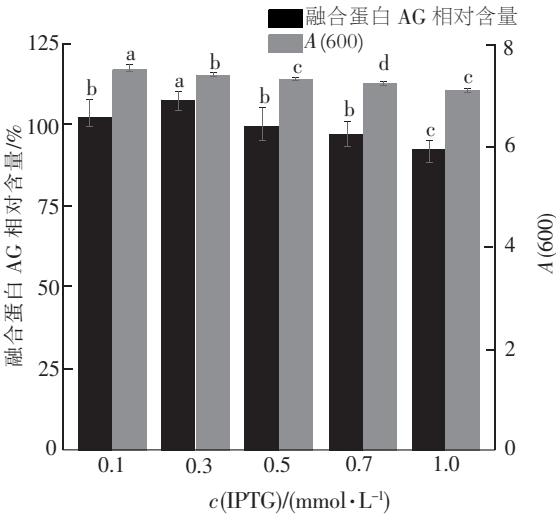
说明:不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$) (以装液量 60% 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 7 装液量对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.7 Effect of loading volume on the relative content of recombinant protein AG and cell growth

2.2.5 诱导剂添加量对融合蛋白 AG 表达的影响

重组大肠杆菌所携带的 pET-28a 表达载体上带有 T7 启动子和乳糖操纵子^[24], 而 IPTG 是有效的乳糖操纵子的诱导剂。IPTG 浓度过低会导致诱导剂的量不足以与阻遏蛋白结合, 从而降低表达水平^[25], 但是过高浓度的 IPTG 对菌体有一定毒性, 会使得菌体生长和蛋白质表达受阻^[26]。IPTG 添加量对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响如图 8 所示。可见, 融合蛋白 AG 的表达量在 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时达到最高, 比 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时高 7.83%。而当 IPTG 浓度超过 0.3 mmol/L 时, IPTG 对菌体产生毒性, 导致蛋白质表达量减少^[27]。因此, 本文选择最佳的 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L。



说明:不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$) (以添加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 8 IPTG 添加量对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

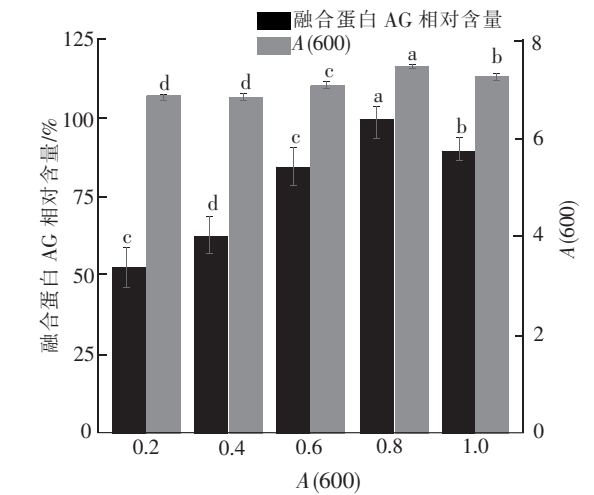
Fig.8 Effect of IPTG addition on the relative content of recombinant protein AG and cell growth

2.2.6 添加诱导剂时间对融合蛋白 AG 表达的影响

诱导时间对重组蛋白表达有重要影响, 过早诱导, 菌体浓度太低, 没有足够的菌体来表达蛋白质, 重组蛋白产量下降; 诱导时间过长, 菌体浓度过高, 则会出现菌体老化现象, 培养基中营养物质被大量消耗, 代谢副产物累积, 导致蛋白质表达量减少^[28]。分别在不同菌体 A(600) 值时添加诱导剂, 发酵结束后菌体 A(600) 值和融合蛋白相对含量的结果如图 9 所示。可见, 当 A(600) = 0.8 时添加诱导剂, 融合蛋白 AG 相对含量最高, 比 A(600) = 0.6 时添加诱导剂高 14.95%, A(600) 值达到最高 7.528。因此, 本文选择菌体浓度 A(600) = 0.8 时为诱导剂添加的最佳时间点。

2.2.7 诱导发酵时间对融合蛋白 AG 表达的影响

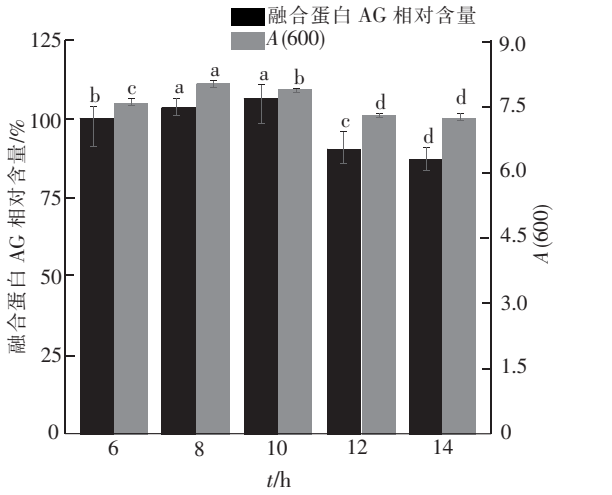
发酵时间与蛋白质产量密切相关，较长时间的发酵有利于目的蛋白的积累，但是可能会出现蛋白质降解的现象^[29]。而且随着发酵时间的增加，培养基中固定的碳源和氮源会限制菌体的生长和蛋白质的表达。加入 IPTG 诱导后分别发酵不同时间，菌体浓度与融合蛋白 AG 的表达量结果如图 10 所示。可见，随着发酵时间的增加，菌体浓度与蛋白质表达量均呈现先升高后降低的趋势。当发酵至 8 h 和 10 h 时，融合蛋白 AG 相对含量和菌体生物量较高。因此，考虑到时间因素，确定最佳诱导发酵时间为 8 h，此时菌体的 A(600) 值为 8.048。



说明：不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$) (以诱导 A(600)=0.6 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 9 添加诱导剂时间对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.9 Effect of time adding the inducer on the relative content of recombinant protein AG and cell growth



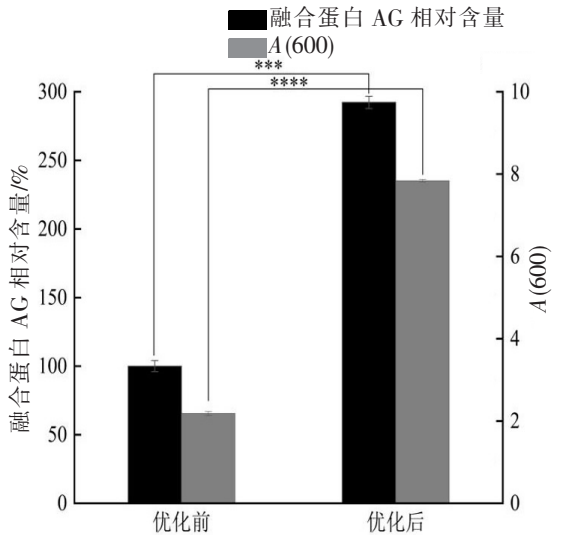
说明：不同小写字母表示具有统计学意义 ($P<0.05$) (以发酵时间 6 h 下融合蛋白 AG 相对含量为 100%)。

图 10 发酵时间对融合蛋白 AG 相对含量和菌体生长的影响

Fig.10 Effect of fermentation time on the relative content of recombinant protein AG and cell growth

2.3 培养基及发酵条件优化前后融合蛋白 AG 相对含量的对比

采用单因素实验对培养基的组分及培养条件进行优化，菌体 A(600) 值及融合蛋白 AG 相对含量如图 11 所示。可见，以优化前的融合蛋白 AG 相对含量为 100%，优化后的融合蛋白 AG 相对含量为 292.27%，达到优化前的 2.92 倍。优化前菌体 A(600) 值最高为 2.184，优化后菌体 A(600) 值最高为 7.839，是优化前的 3.58 倍。培养基组分和培养条件的优化，不仅提高了重组大肠杆菌的菌体密度，而且还大幅提高了融合蛋白 AG 相对含量。发酵结束后，对细胞进行破碎，离心后收集上清液进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 12 所示。可见，融合蛋白 AG 相对分子质量理论值约为 58.34 ku，在保证蛋白质上样量一致的情况下，可以明显看到，泳道 3 比泳道 2 目的蛋白的条带要粗和宽（箭头所示），说明菌体浓度的增加使优化后的融合蛋白 AG 产量得到很大提升。



说明：以优化前融合蛋白 AG 相对含量为 100% (***) 表示 $P<0.001$, **** 表示 $P<0.0001$ 。

图 11 融合蛋白 AG 相对含量和菌体生物量优化前后的对比

Fig.11 Comparison of the relative content of fusion protein AG and microbial biomass before and after optimization

2.4 30 L 发酵罐放大实验

与摇瓶发酵相比, 发酵罐培养可以更准确地控制发酵条件, 为后续工业化生产融合蛋白 AG 提供现实参考。本研究利用 30 L 发酵罐研究重组大肠杆菌的生长和融合蛋白 AG 的表达情况, 结果如图 13 所示。可见, 随着发酵时间的增加, 重组大肠杆菌菌体浓度逐渐增加并趋于平衡。当发酵时间为 8 h 时, A(600) 值最高达 8.688, 较优化后的摇瓶水平提高 10.83%。菌体密度增大, 菌体湿质量最高达 18.56 g/L, 此时融合蛋白 AG 相对含量也最高, 而且与优化后摇瓶水平上目的蛋白相对含量一致。

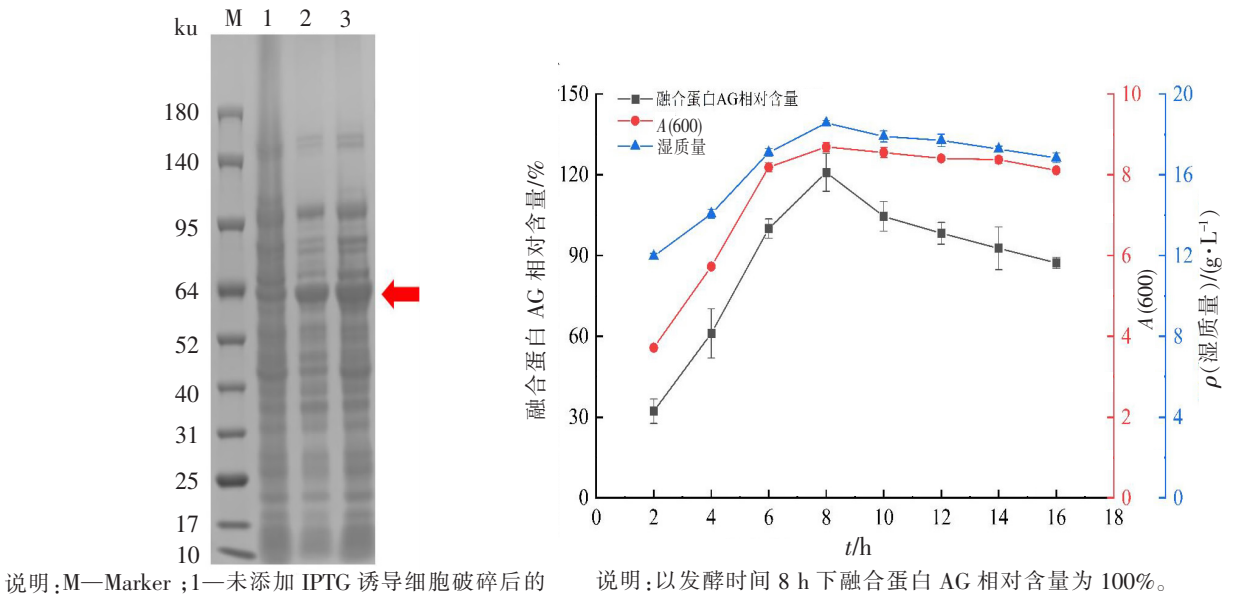


图 12 优化前后诱导细胞内蛋白质的 SDS-PAGE 分析
Fig.12 SDS-PAGE analysis of intracellular proteins before and after optimization induction

图 13 发酵时间对湿质量浓度、A(600) 和融合蛋白 AG 相对含量的影响
Fig.13 Effect of fermentation time on wet weight concentration, A(600) and the relative content of recombinant protein AG

3 结论

本研究在摇瓶水平上探究了不同培养基的碳源、氮源及其添加量的单因素影响, 实现了融合蛋白 AG 在重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-28a-rPAG 中的高效表达。结果表明, 最佳培养基组分为蔗糖 8 g/L、大豆蛋白胨 12 g/L、酵母浸粉 24 g/L、KH₂PO₄ 2.31 g/L、K₂HPO₄ 12.54 g/L。优化后最优的发酵条件为培养基初始 pH = 7.0、5% 接种量、40% 装液量、37 °C 培养至菌液 A(600) = 0.8 时加入 0.3 mmol/L IPTG、30 °C 诱导表达 8 h。利用 30 L 发酵罐进行工艺放大, 菌体浓度和融合蛋白 AG 相对含量均在发酵 8 h 时达到最高。优化后的融合蛋白 AG 产量在生产发酵水平上得到显著提高, 发酵液的 A(600) 值最高达 8.688, 菌体湿质量达到 18.56 g/L, 融合蛋白 AG 相对含量与优化后的摇瓶水平一致。

[参考文献]

[1] AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA[J]. Peptides, 2015, 72: 4-15.

[2] ZINN S, VAZQUEZ-LOMBARDI R, ZIMMERMANN C, et al. Advances in antibody-based therapy in oncology[J]. Nature Cancer, 2023, 4(2): 165-180.

[3] ARORA S, SAXENA V, AYYAR B V. Affinity chromatography: a versatile technique for antibody purification[J]. Methods, 2017, 116: 84-94.

- [4] AMRITKAR V, ADAT S, TEJWANI V, et al. Engineering *Staphylococcal* protein A for high-throughput affinity purification of monoclonal antibodies[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 44: 107632.
- [5] HOBER S, NORD K, LINHULT M. Protein A chromatography for antibody purification[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 848(1): 40-47.
- [6] 何婷, 丁莹莹, 潘卫. 细菌免疫球蛋白结合分子特性及应用的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(1): 135-140.
- [7] AYYAR B V, ARORA S, MURPHY C, et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification[J]. *Methods*, 2012, 56(2): 116-129.
- [8] CHOE W, DURGANNAVAR T A, CHUNG S J. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: an overview of high affinity proteins and peptides[J]. *Materials*, 2016, 9(12): 994.
- [9] MALI S, MOREE W J, MITCHELL M, et al. Observations on different resin strategies for affinity purification mass spectrometry of a tagged protein[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 515: 26-32.
- [10] BARWICK S R, SIDDIQ M S, WANG J, et al. Sigma 1 receptor co-localizes with NRF2 in retinal photoreceptor cells[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(6): 981.
- [11] LIU W, SAUNDERS M J, BAGIA C, et al. Local retention of antibodies *in vivo* with an injectable film embedded with a fluorogen-activating protein[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 230: 1-12.
- [12] 郭茹, 温腾, 曹亚澄, 等. 反硝化细菌法测定土壤 NO_2^- - ^{15}N 丰度的方法优化[J]. *土壤学报*, 2023, 60(2): 535-545.
- [13] 王建荣, 祝木金, 王平, 等. 萎缩芽孢杆菌 Rk1 壳聚糖酶高效制备及特性表征[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(3): 22-30.
- [14] 李鹤宾, 牟明静, 洪璇, 等. 假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶的酶解工艺优化及产物分析[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2022, 27(5): 417-423.
- [15] 韦利军, 曹家明. Rgd-trail 工程菌发酵工艺的摸索研究[J]. *药物生物技术*, 2015, 22(2): 116-120.
- [16] 黄玲珑, 蓝萌萌, 倪辉, 等. 重组耐碱性蛋白 A 大肠杆菌工程菌株的发酵优化[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2025, 30(4): 348-356.
- [17] 冒鑫哲, 彭政, 周冠宇, 等. 枯草芽孢杆菌高产角蛋白酶发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(17): 138-144.
- [18] 管宏伟, 刘婷婷, 陈磊, 等. 红曲菌液态发酵产天然黄色素的条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 150-156.
- [19] 董雪, 刘晓露, 李丽蓓, 等. 地衣芽孢杆菌产芽孢培养基和培养条件的优化[J]. *中国饲料*, 2024(1): 36-43, 50.
- [20] 谢颂洋, 顾正华, 郭自涛, 等. 重组表达 D-泛解酸内酯水解酶乳酸克鲁维酵母的发酵工艺优化[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 38-45.
- [21] DUAN X G, HU S B, QI X H, et al. Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* β -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 53: 17-24.
- [22] 名晓东, 郭自涛, 陈剑雄, 等. 重组大肠杆菌产卤代烷脱卤酶的发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(13): 16-24.
- [23] 王利, 肖扬微, 周庆雯, 等. 小美牛肝菌内生真菌的分离鉴定及产胞外多糖发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2024, 43(7): 140-146.
- [24] LI L L, LI H, TIAN Q W, et al. Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 244.
- [25] 胡耀辉, 王丹, 朴春红, 等. 重组麦芽糖转葡萄糖基酶工程菌发酵条件的优化[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 141-146.
- [26] 刘秋林, 刘娜, 黄浩威, 等. 谷胱甘肽双功能合成酶分子改造及全细胞催化[J]. *中国生物工程杂志*, 2024, 44(7): 1-11.
- [27] 符长春, 杨瑞金, 全艳军. *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 β -半乳糖苷酶的生物信息学分析、异源表达及其酶学性质[J]. *食品科学*, 2025, 46(6): 98-107.
- [28] 齐静静, 范炳森, 张萌, 等. 信号肽及发酵条件优化促进胶原蛋白在谷氨酸棒杆菌中分泌表达[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(15): 9-17.
- [29] 戴易兴, 王洪新, 吕文平, 等. 乳糖诱导基因工程菌产 β -葡聚糖酶及其酶学特性的研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(9): 206-209.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)