

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.6.02

产气荚膜梭菌 ϵ 毒素重组突变体 大肠杆菌表达条件的优化

朱 真, 杜吉革, 薛 麒, 李启红, 印春生, 张莹辉, 李倩琳, 姚文生, 陈小云*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-07-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)06-0008-07 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 为优化产气荚膜梭菌 ϵ 毒素重组蛋白的表达条件, 以前期构建的产气荚膜梭菌 ϵ 毒素重组突变体为基础, 通过控制变量法确定诱导温度、诱导时间、IPTG 诱导浓度以及诱导时菌液浓度等原核蛋白表达条件。结果表明, ϵ 毒素的重组突变体在 37 °C、菌液 OD₆₀₀ 值为 0.895 ~ 1.295, 1.6 mM IPTG 诱导 6 h 条件下可溶性表达量最高。这为下一步大规模生产 ϵ 毒素基因工程亚单位疫苗奠定基础。

[关键词] 产气荚膜梭菌; ϵ 毒素; 基因工程亚单位疫苗; 蛋白表达;

Optimization of Expression Conditions for Recombinant Mutants of *Clostridium perfringens* ϵ - toxin in *E. coli*

ZHU Zhen, DU Ji - ge, XUE Qi, LI Qi - hong, YIN Chun - Sheng, ZHANG Ying - hui,

LI Qian - lin, YAO Wen - sheng, CHEN Xiao - yun*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: CHEN Xiao - yun, E - mail: caucxy@163.com

Abstract: To optimize the expression conditions of the ϵ - toxin recombinant protein of *Clostridium perfringens* and lay the foundation for the next large - scale production of ϵ - toxin genetic engineering subunit vaccines. Based on the recombinant mutant of *Clostridium perfringens* epsilon toxin constructed in the previous stage, the prokaryotic protein expression conditions such as induction temperature, induction time, IPTG induction concentration and bacterial solution concentration during induction were determined by the control variable method. The results showed that the recombinant mutant of epsilon toxin had the highest soluble expression under the condition of 6 h induced by 1.6 mM IPTG at 37 °C and the OD₆₀₀ value of the bacterial solution was 0.895 ~ 1.295.

Key words: *Clostridium perfringens*; ϵ toxin; genetic engineering subunit vaccine; protein expression

作者简介: 朱 真, 主要从事兽用生物制品相关研究。

通讯作者: 陈小云。E - mail: caucxy@163.com

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 旧称魏氏梭菌 (*C. welchii*) 或产气荚膜杆菌 (*Bacillus perfringens*)^[1], 1891 年, 由医学博士 William H. Welch 和同事进行尸检时发现。它是一种重要的人畜共患细菌性病原, 广泛存在于土壤、污水、食物等自然环境以及动物及人类的肠道中^[2]。作为条件致病菌, 能引起多种动物, 包括绵羊、山羊、牛、猪、禽类、犬、家兔、驯鹿、羊驼等坏死性肠炎、肠毒血症, 并能导致人的气性坏疽和食物中毒。菌体自身不致病, 依靠其分泌的外毒素造成机体损害^[3], 主要分泌 α 、 β 、 ϵ 、 ι 四种外毒素, 而根据毒素产生种类的不同, 该菌可分为 A、B、C、D、E 五型^[2]。由 B 型和 D 型产气荚膜梭菌产生的 ϵ 毒素^[4], 对小鼠的 LD₅₀ 为 100 ng/kg, 在该菌所有外毒素中毒力最强, 也是继肉毒杆菌毒素和破伤风毒素之后的世界第三大毒力细菌外毒素, 是潜在的生物恐怖主义战剂, 被美国疾控中心 (CDC) 列为 B 类生物制剂^[5]。

疫苗免疫是防制产气荚膜梭菌病的重要手段, 而目前广泛应用的类毒素疫苗存在诸多弊端, 如生产过程需添加动物组织、批间差异大、抗原成分复杂、有效抗原含量低。为此, 本研究在前期产气荚膜梭菌突变体研究^[12]的基础上, 对突变体重组蛋白表达条件进行优化, 使可溶性表达比例进一步提高, 这将为产气荚膜梭菌突变体的进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 pETX_{m3} 质粒为本实验室保存; 12% SDS PAGE 预制蛋白胶、NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X)、NuPAGE™ Transfer Buffer (20X); BL21 (DE3) 感受态细胞、IPTG 购自宝日生物技术 (北京) 有限公司; 硫酸卡那霉素购自北京索莱宝科技有限公司; PBS、LB 培养基购自北京中海生物科技有限公司; 蛋白 Marker 购自康润生物。

1.2 方法

1.2.1 诱导温度的优化 将 pETX_{m3} 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 将成功转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞的菌液分别接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μ g/mL), 37 °C 培养过夜, 再以 1%

比例分别接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μ g/mL) 5000 mL, 37 °C 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.6 时, 加入 IPTG (0.5 m mol/L) 进行诱导表达, 分别取 1000 mL 菌液, 在 17 °C、22 °C、27 °C、32 °C 和 37 °C 下各振荡培养 4 h。各取 10 mL 菌液, 4 °C 12000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 分别以 10 mL PBS 重悬沉淀, 后使用高压破碎仪进行菌体细胞裂解。分别取裂解液 1 mL, 4 °C 12000 rpm 离心 5 min, 收集上清, 沉淀分别用 1 mL PBS 复溶。以未诱导菌液裂解液作为阴性对照, 取不同温度下诱导的裂解菌液的上清和沉淀进行 SDS - PAGE 电泳, 比较不同诱导温度对蛋白表达的影响。

1.2.2 表达菌不同生长期对重组蛋白表达的影响

将成功转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞的菌液分别接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μ g/mL), 37 °C 培养过夜, 再以 1% 比例接种于含 5000 mL LB 肉汤培养基 (Kana 30 μ g/mL), 37 °C 振荡培养, 每隔 1 h 取菌液进行 OD₆₀₀ 测定, 以时间为横坐标, 以 OD₆₀₀ 为纵坐标绘制表达菌生长曲线。同时, 分别在培养 2、4、6、8 h 和 10 h 各取菌液 1000 mL, 加入 IPTG (0.5 m mol/L) 进行诱导表达, 37 °C 振荡 4 h 收获。分别取不同时间点的诱导菌液, 4 °C 12000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 分别以 10 mL PBS 重悬沉淀, 后使用高压破碎仪进行菌体细胞裂解。分别取裂解液 1 mL, 4 °C 12000 rpm 离心 5 min, 收集上清, 沉淀分别用 1 mL PBS 复溶。以未诱导菌液裂解液作为阴性对照, 取不同温度下诱导的裂解菌液的上清和沉淀进行 SDS - PAGE 电泳, 比较不同生长期对重组蛋白表达的影响。

1.2.3 诱导时间的优化 将成功转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞的菌液分别接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μ g/mL), 37 °C 培养过夜, 再以 1% 比例接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μ g/mL) 5000 mL, 37 °C 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.895 ~ 1.295 时, 加入 IPTG (0.5 m mol/L) 进行诱导表达, 分别取 1000 mL, 在 37 °C 下振荡培养 2、4、6、8 h。各取 10 mL 菌液, 4 °C 12000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 分别以 10 mL PBS 重悬沉淀, 后使用高压破碎

仪进行菌体细胞裂解。各取裂解液 1 mL,4 ℃ 12000 rpm 离心 5 min,收集上清,沉淀分别用 1 mL PBS 复溶。以未诱导菌液裂解液作为阴性对照,取不同温度下诱导的裂解菌液的上清和沉淀进行 SDS - PAGE 电泳,比较不同诱导时间对蛋白表达的影响。

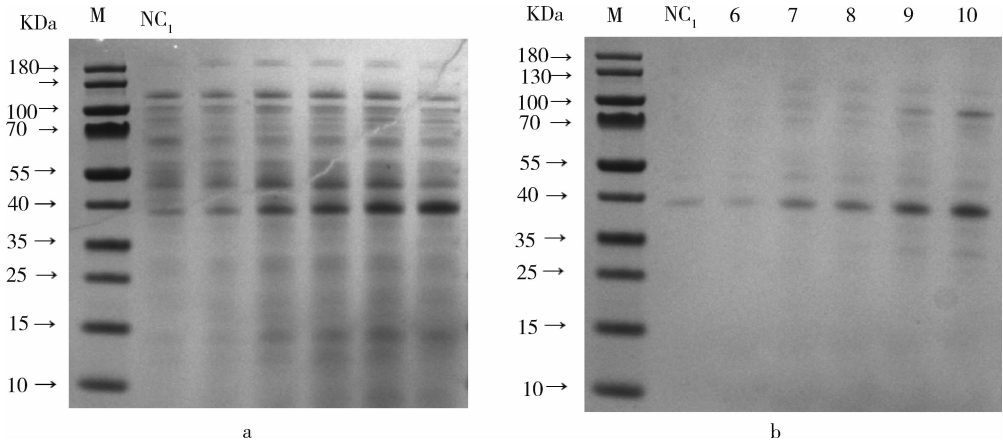
1.2.4 IPTG 浓度的优化 将成功转化至 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞的菌液分别接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μg/mL),37 ℃ 培养过夜,再以 1% 比例接种于 LB 肉汤培养基 (Kana 30 μg/mL)2 瓶,5000 mL/瓶,37 ℃ 振荡培养至菌液 OD₆₀₀为0.895 ~ 1.295 时,将 2 瓶菌液混匀,分别取 1000 mL,分别加入浓度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mM 的 IPTG 进行诱导,在37 ℃ 下分别振荡培养 4 h 后,各

取 10 mL 菌液,4 ℃ 12000 rpm 离心 1 min,弃上清,分别以 10 mL PBS 重悬沉淀,后使用高压破碎仪进行菌体细胞裂解。各取裂解液 1 mL,4 ℃ 12000 rpm 离心 5 min,收集上清,沉淀分别用 1 mL PBS 复溶。以未诱导菌液裂解液作为阴性对照,取不同温度下诱导的裂解菌液的上清和沉淀进行 SDS - PAGE 电泳,比较不同 IPTG 浓度对蛋白表达的影响。

2 结 果

2.1 重组蛋白表达条件优化

2.1.1 诱导温度的优化 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 经 IPTG 在 17 ℃、22 ℃、27 ℃、32 ℃ 和 37 ℃ 条件下诱导表达,从 SDS - PAGE 电泳图中可得知,目的蛋白主要以可溶表达为主,且 37 ℃ 条件下目的蛋白可溶性表达量最高,故选择 37 ℃ 作为最佳诱导温度。



a. 诱导温度对重组蛋白(上清)表达的影响;b. 诱导温度对重组蛋白(沉淀)表达的影响

a. Effect of induction temperature on recombinant protein(supernatant) expression;
b. Effect of induction temperature on recombinant protein(precipitation) expression;

M. 蛋白 marker;NC₁. 未诱导菌细胞裂解上清;NC₂. 未诱导细胞裂解沉淀;1/2/3/4. 17/22/27/32/37 ℃ 诱导细胞裂解上清;
6/7/8/9. 17/22/27/32/37 ℃ 诱导细胞裂解沉淀。

Lane M. protein marker;Lane NC₁. The supernatant of cell lysates without induction;Lane NC₂. The precipitation of cell lysates without induction;Lane 1/2/3/4. The supernatant of cell lysates induced under 17/22/27/32/37 ℃ ;
Lane 6/7/8/9. The precipitation of cell lysates induced under 17/22/27/32/37 ℃ .

图 1 诱导温度对重组蛋白表达的影响

Figure 1 Effect of induction temperature on recombinant protein expression

2.1.2 表达菌不同生长期对重组蛋白表达的影响 以时间为横坐标,以菌液 OD₆₀₀为纵坐标,绘制 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 生长曲线,如表 1 和图 2 所示,细菌生长 0 ~ 1 h 为迟缓期,细菌缓慢生长;2 ~ 13 h

为对数期,细菌快速生长,菌液 OD₆₀₀从 0.090 升至 1.423,且 1 ~ 4 h 生长速率最大,5 ~ 13 h 生长趋于平稳;14 ~ 16 h 细菌生长进入稳定期,OD₆₀₀维持在 1.402 ~ 1.404,生长速率接近为零。

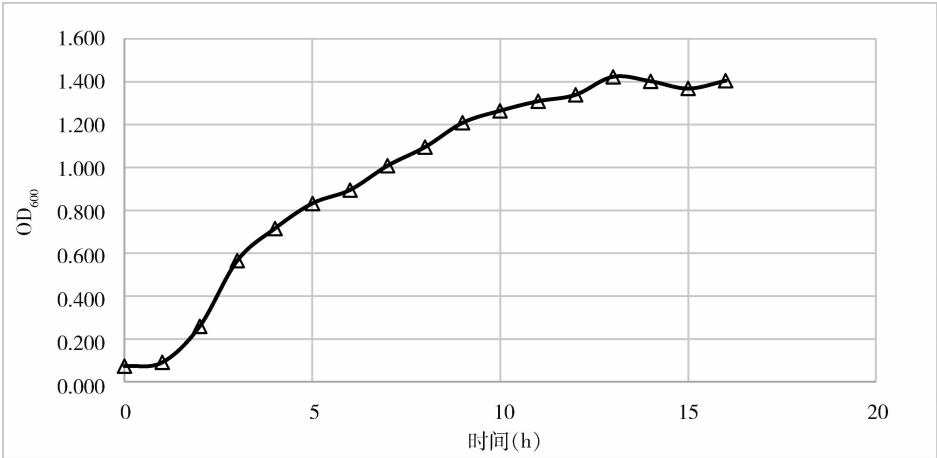


图 2 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 生长曲线

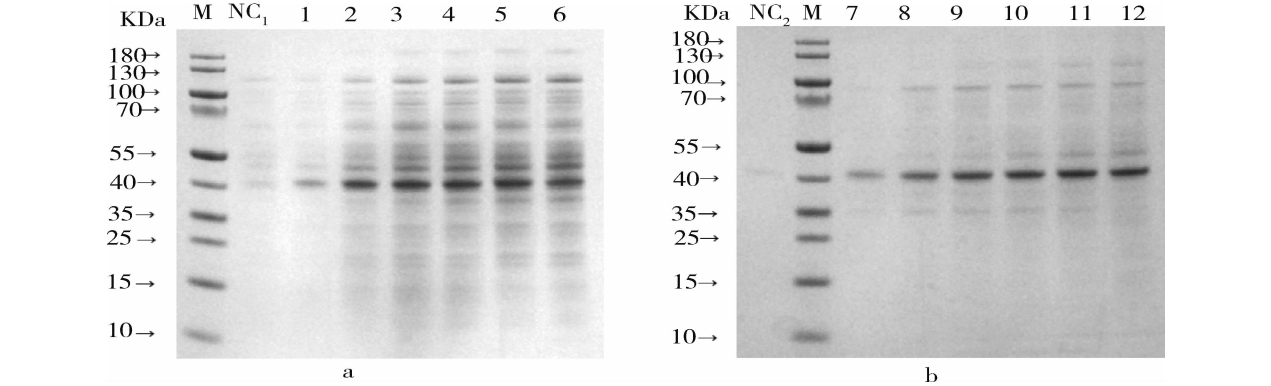
Fig 2 The growth curve of *E. coli* BL21 (pETX_{m3})

表 1 不同培养时间 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 菌液 OD₆₀₀

Table 1 Bacterial broth OD₆₀₀ of *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) at different culture times

时间/h Time/h	OD ₆₀₀	时间/h Time/h	OD ₆₀₀
0	0.073	9	1.208
1	0.090	10	1.265
2	0.259	11	1.309
3	0.565	12	1.339
4	0.715	13	1.423
5	0.832	14	1.402
6	0.895	15	1.368
7	1.008	16	1.404
8	1.095		

不同生长期重组蛋白表达情况如图 3 所示, *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 培养 2 h (OD₆₀₀ 值 0.259) 时, 目的蛋白表达量较少, 从 4 h (OD₆₀₀ 值 0.715) 起表达量开始积累, 且存在可溶表达, 6 ~ 10 h (OD₆₀₀ 值 0.895 ~ 1.295) 表达量差异较小, 为目的蛋白表达量高峰期, 直至培养 12 h (OD₆₀₀ 值 1.339) 时表达量开始下降。从以上分析可知, 表达菌 OD₆₀₀ 为 0.895 ~ 1.295 时开始诱导, 目的蛋白表达量较高。



M. 蛋白 marker; NC₁. 未诱导菌细胞裂解物上清; NC₂. 未诱导菌细胞裂解物沉淀; 1/2/3/4/5/6. 培养 2 h/4h/6 h/8 h/10 h/12 h 后诱导菌液细胞裂解上清; 7/8/9/10/11/12. 培养 2 h/4 h/6 h/8 h/10 h/12 h 后诱导菌液细胞裂解沉淀。

Lane M. protein marker; Lane NC₁. The supernatant of cell lysates without induction; Lane NC₂. The precipitation of cell lysates without induction;

Lane 1/2/3/4/5/6. The induced supernatant of cell lysates induced after 2 h/4 h/6 h/8 h/10 h/12 h incubation;

Lane 7/8/9/10/11/12. The induced precipitation of cell lysates induced after 2 h/4 h/6 h/8 h/10 h/12 h incubation.

图 3 不同生长期 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 重组蛋白的表达

Fig 3 Expression of recombinant protein of *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) in different growth periods

2.1.3 诱导时间的优化 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 经 IPTG 在 37 ℃ 条件下分别进行 2、4、6 和 8 h 诱导表达,从 SDS - PAGE 电泳图中可得知,目的蛋白在最佳温度 37 ℃ 诱导 4 h 后表达量开始增多并趋稳,诱

导 4、6 和 8 h 的表达量彼此差异不大,但从图中可看出,诱导 6 h 无论是可溶蛋白还是包涵体的表达量,相对较多,故选择诱导 6 h 为最佳诱导时间。

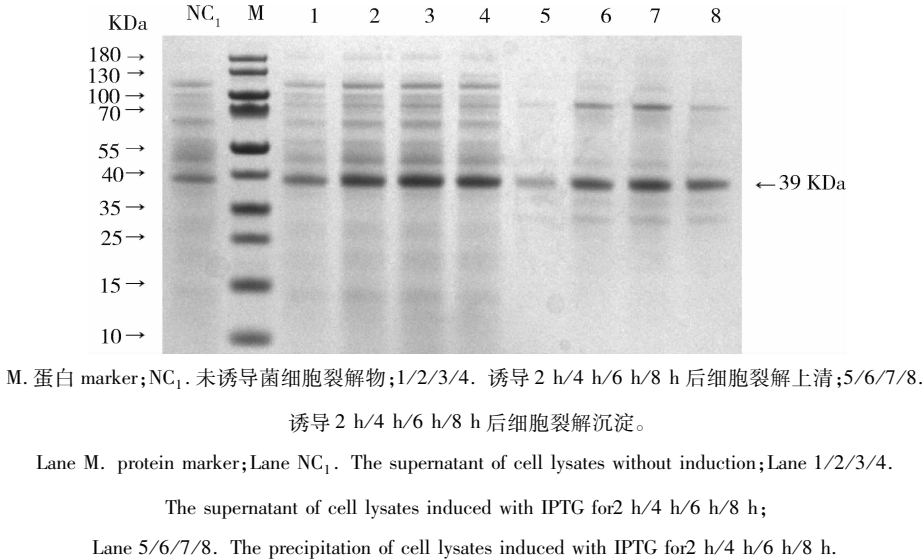
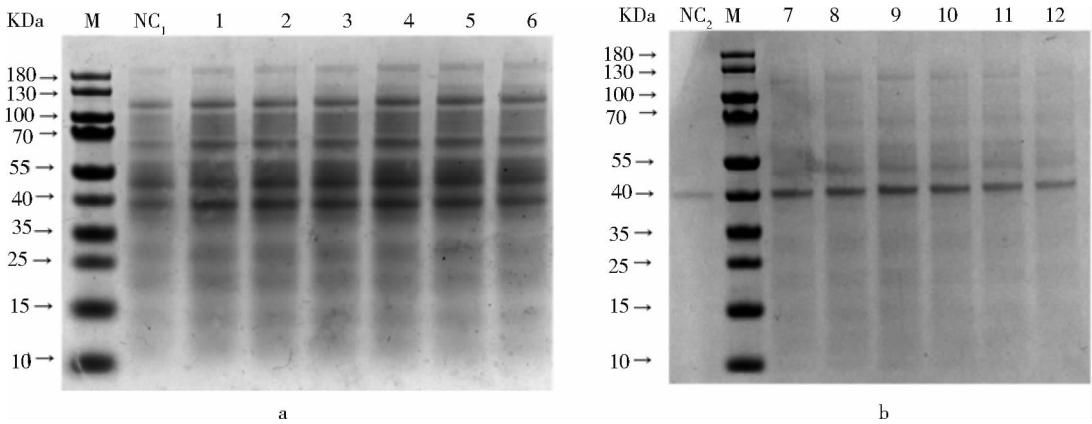


图 4 诱导时间对重组蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of induction time on recombinant protein expression

2.1.4 IPTG 浓度的优化 *E. coli* BL21 (pETX_{m3}) 分别经 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 和 2.4 mM IPTG 诱导,在 37 ℃ 条件下振荡培养 4 h 后,蛋白表达情况如图 5 所示,0.4 ~ 2.4 mM IPTG 诱导下,目的蛋白

在上清中均有一定量表达,1.6 mM 时可溶性蛋白表达量最高,比例可达 40%,故选择 1.6 mM 作为最佳 IPTG 诱导浓度。



M. 蛋白 marker; NC. 未诱导菌细胞裂解物; 1/2/3/4/5/6. IPTG 浓度 0.4 mM/0.8 mM/1.2 mM/1.6 mM/2.0 mM/2.4 mM 诱导后细胞裂解上清; 7/8/9/10/11/12. IPTG 浓度 0.4 mM/0.8 mM/1.2 mM/1.6 mM/2.0 mM/2.4 mM 诱导后细胞裂解沉淀。

Lane M. protein marker; Lane NC. The cell lysates without induction; Lane 1/2/3/4/5/6.

The supernatant of cell lysates induced with 0.4 mM/0.8 mM/1.2 mM/1.6 mM/2.0 mM/2.4 mM IPTG; Lane 7/8/9/10/11/12.

The precipitation of cell lysates induced with 0.4 mM/0.8 mM/1.2 mM/1.6 mM/2.0 mM/2.4 mM IPTG.

图 5 IPTG 浓度对蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of IPTG concentration on protein expression

3 讨论与结论

随着现代生物技术发展,许多外源蛋白通过基因技术工程在不同表达系统中得到了高效、正确的表达,并在生物制品、食品、医药等领域广泛应用。外源基因表达系统又有原核和真核之分,其中原核表达应用较多的表达系统有大肠杆菌和枯草芽孢杆菌;真核表达系统则主要为酵母、昆虫杆状病毒以及哺乳动物细胞^[6]。大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、易于操作、培养周期短、成本低廉、使用安全等诸多优点,故本研究使用全球广泛使用的大肠杆菌 PET 系列表达载体,T7 启动子支配下,一经加入 IPTG 诱导剂,外源蛋白即可开始高效表达。影响蛋白表达的因素有很多,同类研究大多选择诱导剂 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间这些项目进行优化^[7-9],除此之外,还有培养基 pH 值^[10]、溶氧量、补料碳源等^[11],但后 3 种因素更适用于实际生产中大规模发酵,本研究不再进行详细比较。故本研究选取了常见的诱导剂 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间这三项优化条件,除此之外,还对诱导菌液浓度对可溶蛋白表达量的影响进行了分析,因为细菌不同生长时期,菌密度、酶活性、代谢速度均有不同,这将对外源蛋白表达具有直接影响。

前期研究中构建的 ϵ 毒素的重组突变体为可溶性表达^[12],所以本研究重点关注如何提高上清中目的蛋白表达量。在比较诱导菌液浓度对可溶蛋白表达量的影响时,经过测得菌液 OD₆₀₀ 值为 0.090 ~ 1.423 时处于生长对数期,1.423 以后进入稳定期,而本研究获得最佳诱导状态 OD₆₀₀ 值 0.895 ~ 1.295 正是处于生长对数期的中后阶段,培养基营养相对较多,酶活性较强,菌密度适中,所以最适于外源蛋白表达。此外将 37 °C 作为最佳诱导温度,在实践生产中具有十分重要的意义,因为诱导温度越高,导致蛋白合成速度越快,有些时候过多的蛋白来不及正确折叠而导致包涵体产生,而包涵体在后期复性时需要费时费力且不一定和原蛋白天然构象一致,为了达到可溶表达效果,诱导温度甚至是低温。本研究将 37 °C 作为最佳诱导温

度,省去了实际生产中低温冷却的工序,能极大降低生产成本,具有较好应用前景。综上所述,37 °C、菌液 OD₆₀₀ 值为 0.895 ~ 1.295 时,以 1.6 mM IPTG 诱导 6 h 条件下可溶性表达量最高,这将为产气荚膜梭菌突变体的进一步研究提供依据。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学第五版[M]. 北京:中国农业出版社,2012.
Lu Ch P. Veterinary Microbiology, Fifth Edition [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012.
- [2] Lucey B P, Hutchins G M. William H. Welch, MD, and the Discovery of *Bacillus welchii* [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2004, 128(10): 1193 - 1195.
- [3] Petit L, Gibert M, Popoff M R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. [J]. Trends in Microbiology. 1999, 7(3): 104 - 110.
- [4] Kadri H E, Alaizoki A, Celen T, *et al.* The effect of low - temperature long - time (LTLT) cooking on survival of potentially pathogenic *Clostridium perfringens* in beef [J]. International Journal of Food Microbiology. 2020, 320.
- [5] Grass J E, Gould L H, Mahon B E. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998 - 2010 [J]. Foodborne Pathog Dis. 2013, 10(2): 131 - 136.
- [6] 袁葵洲. 基因工程 第二版[M]. 北京:化学工业出版社, 2019.
Yuan W Zh. Gene Engineering, Second Edition [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2019.
- [7] 李文锋,梅敏敏,黄兴国,等. 新型鸭呼肠孤病毒 σB 蛋白基因密码子的优化及原核表达 [J]. 中国畜牧兽医. 2018, 45(10): 2700 - 2706.
Li W F, Mei M M, Huang X G, *et al.* Optimization and Prokaryotic Expression of the σB Protein Gene Codons of the New - type Duck Reovirus [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine. 2018, 45(10): 2700 - 2706.
- [8] 张磊,唐永凯,李红霞,等. 鲤鱼重组 IL - 17N 的原核表达条件优化及蛋白纯化 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版). 2020, 46(03): 364 - 369.
Zhang L, Tang Y K, Li H X, *et al.* Prokaryotic expression and protein purification of recombinant IL - 17N in *Cyprinus carpio* [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition). 2020, 46(03): 364 - 369.
- [9] 刘佳璐,郑维,范若辰,等. 金黄色葡萄球菌 *SaeP* 蛋白表达条件的优化 [J]. 中国乳品工业. 2020, 48(01): 14 - 17.

Liu J L,Zheng W,Fan R Ch,*et al.* Optimization of Expression Conditions of Staphylococcus aureus SaeP Protein [J]. China Dairy Industry. 2020,48(01): 14-17.

[10] 许崇利. IPTG 诱导剂对 C 型产气荚膜梭菌 $\beta 2$ 毒素基因表达的影响[J]. 湖北农业科学. 2016, 55(03): 749-753.

Xu Ch L. Influences of IPTG Inducer on Expression of the $\beta 2$ -toxin Gene of Clostridium perfringens Type C [J]. Hubei Agricultural Sciences. 2016,55(03):749-753.

[11] 李正杰,顾正华,石贵阳,等. Nanog 蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达及发酵优化[J]. 食品与发酵工业.: 1-10.

Li Zh J,Gu Zh H,Shi G Y,*et al.* Soluble expression of human Nanog Protein in E. coli and optimization of fermentation [J]. Food and Fermentation Industry. : 1-10.

[12] 杜吉革,朱真,薛麒,等. 产气荚膜梭菌重组 ϵ 毒素突变体的免疫保护力评价[J]. 畜牧兽医学报. 2018, 49(04): 777-785.

Du J G,Zhu Zh,Xue Q,*et al.* Evaluation of protective Efficacy of recombinant mutants of Clostridium perfringens ϵ toxin [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. 2018, 49(04): 777-785.

(编辑:陈希)