

游思亮,王裔娜,田瑞平,等. 响应面法优化高压均质破碎重组大肠杆菌的条件[J]. 江苏农业科学,2021,49(17):71-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.011

响应面法优化高压均质破碎重组大肠杆菌的条件

游思亮,王裔娜,田瑞平,王 青

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京 210095)

摘要:通过单因素试验,分析了均质压力、均质次数和菌液浓度 3 个因素对大肠杆菌蛋白破碎率的影响。然后利用响应面试验拟合出大肠杆菌蛋白破碎率的回归方程,优化了高压均质法破碎大肠杆菌的试验条件。结果表明,各因素对大肠杆菌蛋白破碎率影响顺序为均质次数(B) > 均质压力(A) > 菌液浓度(C)。在均质压力 140 MPa、均质次数 4 次、菌液浓度 60 g/L 时,大肠杆菌蛋白破碎率达到最高,为 13.98%。

关键词:响应面;高压均质;蛋白破碎率;大肠杆菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)17-0071-04

在生物学领域,经过改造过的细菌系统经常用来表达各种外源重组产物,如蛋白质、酶和抗体,大肠杆菌(*Escherichia coli*,简称 *E. coli*)是最常见的寄主材料。这主要是由其特点决定的,大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、繁殖快、培养成本低、表达量高、表达产物容易纯化、稳定性好、抗污染能力强以及适用范围广等优势^[1]。

但是重组蛋白通常在大肠杆菌细胞内部表达,不能被大肠杆菌分泌到细胞外部,要提取纯化蛋白还需要将大肠杆菌细胞破碎^[2]。目前,用于提取大肠杆菌外源蛋白的常用细胞破碎方法主要有高压均质法、珠磨法、超声波破碎法、渗透压法、反复冻融法、酶解法和化学降解法^[3-8]。高压均质法破碎细胞的原理是在高压条件下使溶液通过均质阀,溶

液内细胞经过阀门的撞击力、通道内高速流体剪切力和瞬时压力差 3 个不同的作用力后被破碎,释放胞内物质达到细胞破碎的目的^[9]。高压均质法作为一种物理破碎方式,具有破碎效率高^[3-4]、无试剂消耗和污染^[5]、可用于工业化生产等诸多优点^[10],正在被越来越多的研究者采用。

有学者利用高压均质法研究破碎大肠杆菌的试验条件^[7],但主要是探讨单个因素对破碎结果的影响,没有考虑到因素之间的交互作用,也没有探讨最优化的试验条件。本研究在单因素试验的基础上,利用响应面法探讨因素之间的交互作用以及最优化的试验条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:*E. coli* DH5 α 为南京农业大学小麦研究所保存,重组质粒 pCold-10477 为小麦研究所构建,按常规方法转化获得相应重组工程菌。

收稿日期:2021-01-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31801350)。

作者简介:游思亮(1984—),男,湖北武汉人,硕士,实验师,主要从事大型仪器设备管理和功能开发。E-mail:youisl@njau.edu.cn。

[11] 吴雪霞,查丁石,朱宗文,等. 茄子分子育种研究进展[J]. 江西农业学报,23(5):70-71.

[12] 周 晶,沈火林,杨文才,等. 辣椒遗传多样性的 SSR 分析[J]. 华北农学报,2009,24(6):62-67.

[13] 贾 豪,魏小春,姚秋菊,等. 辣椒 SSR 标记种质资源遗传多样性的分析[J]. 分子植物育种,2017,15(1):353-363.

[14] Sun M. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems[J]. American Journal of Botany, 1997, 84(2): 224.

[15] 武占省,江 英,赵晓梅. 天然辣椒红色素的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2004(6):22-25.

[16] 邱建生,张彦雄. 世界辣椒红色素的历史、现状及发展趋向

[J]. 中国食品添加剂,2003(6):3-10.

[17] 黄 巍,邹学校,马艳青. 辣椒红色素的研究进展[J]. 辣椒杂志,2008(2):32-36,44.

[18] 孔繁玲. 植物数量遗传学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2006:403-419.

[19] 陈运起,高莉敏,刘洪星. 大葱部分种质资源数量性状聚类分析[J]. 中国蔬菜,2006(8):25-26.

[20] 臧贺藏,贺德先. 河南省主导小麦品种根系性状的聚类分析[J]. 河南农业科学,2009(5):24-28.

[21] 田新莉,赵宗胜,李国英. 聚类分析在棉花枯萎菌生理小种鉴定中的应用[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2001(4):288-290,319.

试剂:蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂糖、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素、二硫苏糖醇(DTT),购自 Sigma 公司;Bradford 蛋白质浓度检测试剂盒,购自上海碧云天生物公司;PBS 缓冲液(pH 值 7.2),购自英潍捷基公司。

仪器:高压均质机(JN-Mini,广州聚能纳米公司)、酶标仪(Infinite200,TECAN)、离心机(CR21,Hitachi)、摇床(Ks4000,IKA)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌液的培养和收集 重组基因的 *E. coli* DH5α 工程菌采用两步法培养,取 3 μL 重组工程菌液接种到 3 mL 新鲜 LB 培养基(含 50 μg/mL 卡那霉素)中,于 37 ℃、220 r/min 过夜培养 15 h 获得种子液。随后将种子也按照 1% 比例接种到新鲜 LB 培养基(含 50 μg/mL 卡那霉素)中,37 ℃、220 r/min 继续培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.6 左右,加诱导剂后继续 16 ℃、150 r/min 振荡培养 15 h。每 100 mL 诱导后的菌液于 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,加入预冷的 PBS 缓冲液(pH 值 7.2) 50 mL 洗涤 1 次,然后加入预冷的 PBS 缓冲液 15 mL,充分悬浮,悬浮液置于-4 ℃待用。

1.2.2 菌液浓度测定 当菌液在 600 nm 时的吸光度值 $D_{600\text{ nm}}$ 小于 0.7 时, $D_{600\text{ nm}}$ 与菌液浓度呈线性关系^[11],可用来监测菌体生长情况,浓缩之后的菌液浓度用每升菌液中菌体湿质量(g/L)表示。

1.2.3 蛋白质浓度标准曲线的绘制 破碎之后上清液中可溶性蛋白的浓度用 Bradford 染色法测得^[12]。将蛋白标准溶液分别稀释成 1.500、1.000、0.750、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的浓度梯度,然后分别取 5 μL 不同浓度的蛋白标准溶液到 96 孔酶标板,每个孔各加 250 μL 的 G250 染色液,反应 5 min 后,用酶标仪测定 595 nm 处的吸光度,重复 3 次,得到标准曲线的方程为 $y = 0.6329x + 0.5325$,相关系数 $r^2 = 0.9923$,表明标准曲线相关性很好,可用于检测样品的蛋白质浓度。

1.2.4 蛋白破碎率的测定 用上清液中可溶性蛋白的浓度与菌体浓度的比值表示蛋白破碎率。

1.2.5 单因素试验设计 根据已有研究^[7],选取高压均质过程中关键影响因素均质压力、均质次数、菌液浓度,设计单因素试验,研究每个因素对破碎结果的影响,试验方案如下:(1)在菌液浓度为 100 g/L,均质次数为 3 次时,分别用 80、100、120、140、160 MPa 均质压力破碎菌液,分析均质压力对

大肠杆菌破碎结果的影响。(2)在均质压力为 120 MPa,菌液浓度为 100 g/L 时,分别均质 1、2、3、4、5 次,分析均质次数对大肠杆菌破碎结果的影响。(3)在均质压力为 120 MPa,均质次数为 3 次时,分别用 60、80、100、120、140 g/L 浓度的菌液进行破碎,分析菌液浓度对大肠杆菌破碎结果的影响。

1.2.6 响应面试验设计 根据单因素试验结果,利用 Design Expert V8.0.6 软件中 Box-Behnken 试验设计方法,以均质压力(A)、均质次数(B)、菌液浓度(C)为试验因素,以蛋白破碎率为响应值设计三因素三水平响应面试验,并用方程对结果进行拟合及优化,各因素及水平见表 1 所示。

表 1 响应面试验各因素和水平

水平编码	因素		
	A:均质压力(MPa)	B:均质次数(次)	C:菌液浓度(g/L)
-1	100	2	60
0	120	3	80
1	140	4	100

1.3 数据处理

单因素试验每个试验点做 3 次重复,使用 Excel 2016 处理数据及制作图表。响应面结果用 Design Expert V8.0.6 进行拟合,方差分析并优化参数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 不同均质压力对破碎结果的影响 由图 1 可知,在均质压力达到 120 MPa 之前,随着压力的增大,大肠杆菌蛋白破碎率明显升高,100 MPa 和 120 MPa 处理之间差异达到显著水平($P < 0.05$)。当均质压力达到 120 MPa 之后,随着均质压力上升,大肠杆菌蛋白破碎率缓慢升高,但是处理之间差异不显著,说明压力达到 120 MPa 时,样品的破碎已经接近完成,升高压力对结果的影响已经不明显,因此,选用的均质压力为 120 MPa。

2.1.2 不同均质次数对破碎结果的影响 由图 2 可知,样品破碎前期(次数≤3)增加均质次数可以显著提高大肠杆菌蛋白破碎率,处理之间差异达到显著水平($P < 0.05$)。但是均质 3 次之后,继续增加均质次数,结果的增加幅度明显放缓,均质 3、4 和 5 次处理之间差异均不显著。过长时间的破碎有可能导致释放出的蛋白质降解,并且考虑时间成本,选择的均质次数为 3 次。

2.1.3 不同菌液浓度对破碎结果的影响 由图 3

可知,随着菌液浓度的提高,大肠杆菌的蛋白破碎率呈缓慢下降的趋势,但各处理的结果基本维持在较高的水平(>9.5%),除了浓度最低的 60 g/L 处

理,其他处理之间差异都不显著,说明菌液浓度对大肠杆菌蛋白破碎率的影响较小。因此,选取差异不显著的第 1 个处理,也就是 80 g/L 作为后续试验条件。

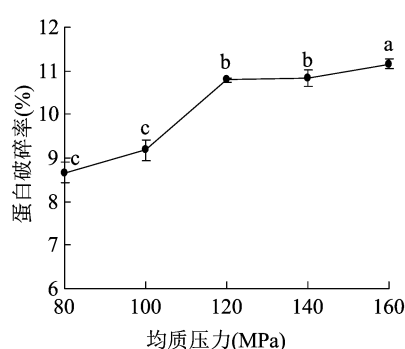


图1 均质压力对细胞破碎过程的影响

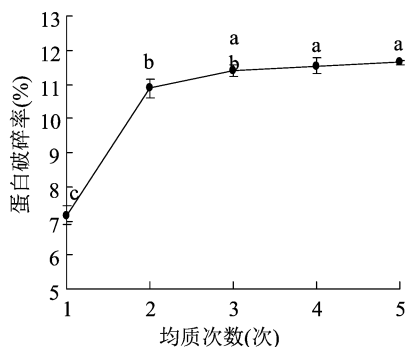


图2 均质次数对细胞破碎过程的影响

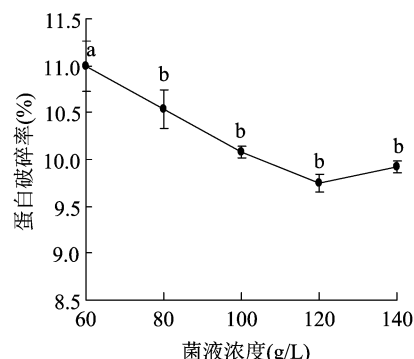


图3 菌液浓度对细胞破碎过程的影响

2.2 响应面试验结果分析

根据试验设计,一共安排响应面试验 15 组,试验顺序及结果如表 2 所示。通过软件对结果进行二元多次回归拟合,得到蛋白破碎率的回归方程为 $Y = 11.55 + 0.82A + 1.5B + 0.18C - 0.38AB - 0.59AC + 0.055BC + 0.25A^2 - 0.12B^2 + 0.062C^2$ 。该回归方程模型的 $P_{\text{模型}} = 0.0008 < 0.01$,表明模型极显著;失拟项 $p_{\text{失拟}} = 0.1554 > 0.05$,表明模型失拟项不显著;模型的确定系数 $R^2 = 0.9820$,调整确定系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.9495$,说明该模型能解释 94.95% 的响应值变化,因此,该模型拟合良好,可以用此模型对最优破碎参数进行分析和预测。

表2 响应面试验设计及结果

试验编号	A	B	C	蛋白破碎率 (%)
1	-1	-1	0	9.10 ± 0.38
2	1	-1	0	11.62 ± 0.35
3	-1	1	0	12.50 ± 0.29
4	1	1	0	13.51 ± 0.40
5	-1	0	-1	10.21 ± 0.30
6	1	0	-1	12.90 ± 0.37
7	-1	0	1	12.00 ± 0.29
8	1	0	1	12.34 ± 0.40
9	0	-1	-1	9.81 ± 0.48
10	0	1	-1	13.07 ± 0.47
11	0	-1	1	9.80 ± 0.42
12	0	1	1	13.28 ± 0.38
13	0	0	0	11.47 ± 0.06
14	0	0	0	11.44 ± 0.43
15	0	0	0	11.73 ± 0.29

从表 3 可知,一次项 A、B 达到极显著水平 ($P < 0.01$),而 C 不显著,表明均质压力和均质次数对蛋白破碎率影响极大,菌液浓度对蛋白破碎率的影响

相对不显著。二次项中除了 AC 因素之间交互作用显著外,其他因素之间交互作用都不显著,表明因素之间的交互作用对蛋白破碎率的影响较小。而且各因素对大肠杆菌蛋白破碎率影响大小顺序为均质次数 (B) > 均质压力 (A) > 菌液浓度 (C)。

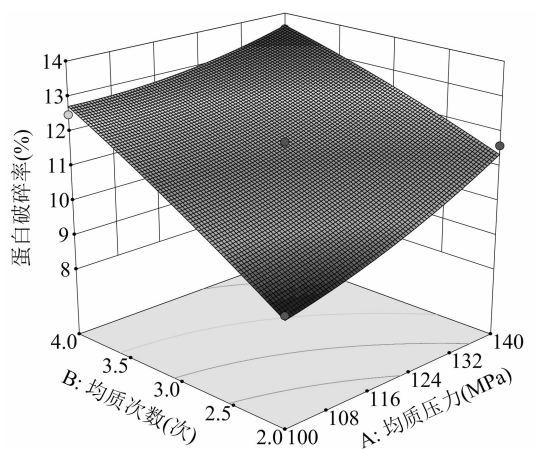
表3 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	26.01	9.00	2.89	30.26	0.0008
A	5.38	1.00	5.38	56.32	0.0007
B	18.09	1.00	18.09	189.41	<0.0001
C	0.26	1.00	0.26	2.68	0.1628
AB	0.57	1.00	0.57	5.97	0.0584
AC	1.38	1.00	1.38	14.46	0.0126
BC	0.01	1.00	0.01	0.13	0.7364
A ²	0.24	1.00	0.24	2.50	0.1749
B ²	0.05	1.00	0.05	0.54	0.4949
C ²	0.01	1.00	0.01	0.15	0.7172
残差	0.48	5.00	0.10		
失拟项	0.43	3.00	0.14	5.59	0.1554
纯误差	0.05	2.00	0.03		
总变异	26.48	14.00			

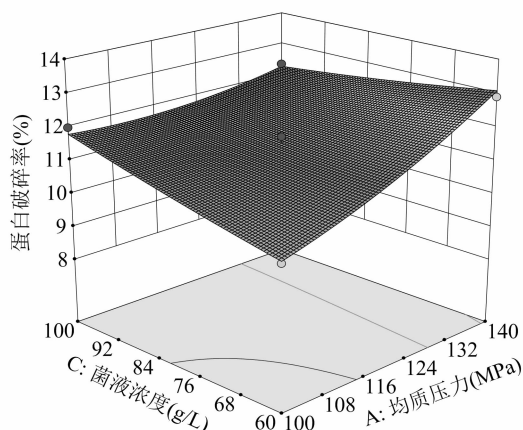
通过观察两因素之间的响应曲面图可以预测变量的响应值以及确定变量之间的相互关系,响应面越陡,反映两因素之间的交互作用越显著^[13]。三因素两两之间的响应面曲面见图 4,可见图 4-a 的响应曲面较陡,表明均质压力和均质次数之间交互作用较显著,对蛋白破碎率的影响较大。图 4-b、图 4-c 的响应曲面较平缓,表明均质压力与菌液浓度、均质次数与菌液浓度之间的交互作用较不显著,对响应值的影响较小。

2.3 最优参数的确定及验证

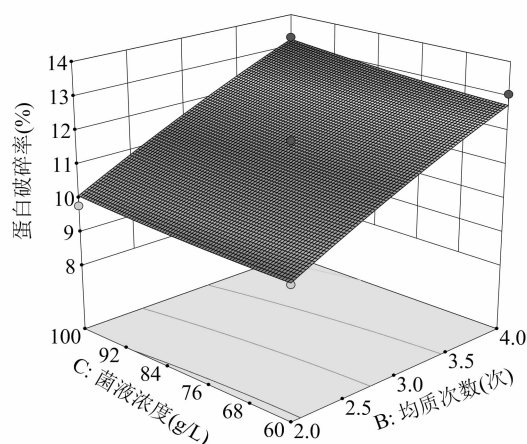
在选取的因素范围内,通过 Design Expert



a. 均质压力与均质次数的响应面



b. 均质压力与菌液浓度的响应面



c. 均质次数与菌液浓度的响应面

图4 三因素之间的响应曲面图

3 结论

本研究通过单因素试验,分析了均质压力、均质次数和菌液浓度 3 个因素对大肠杆菌蛋白破碎率的影响。然后根据单因素试验结果,利用响应面试验拟合出大肠杆菌蛋白破碎率的二元多次回归方程,各因素对大肠杆菌蛋白破碎率影响顺序为均质次数(B) > 均质压力(A) > 菌液浓度(C),并确定最优化的试验参数:均质压力 140 MPa、均质次数 4 次、菌液浓度 60 g/L,在此条件下的大肠杆菌实际蛋白破碎率为 13.98%。该结果可为高压均质法破碎大肠杆菌,提取胞内外源蛋白提供一定的方法借鉴,并适用于大规模工业生产。

参考文献:

- [1] Tripathi N K. Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* [J]. *ChemBioeng Reviews*, 2016, 3(3): 116–133.
- [2] Eggenreich B, Rajamanickam V, Wurm D J, et al. A combination of HPLC and automated data analysis for monitoring the efficiency of high-pressure homogenization [J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 134.
- [3] 赵烨清, 石莉, 欧阳臻, 等. 化学-渗透压法温和破碎处理下大肠杆菌细胞内蛋白质的释放率 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(19): 146–149.
- [4] 谢琦, 刘永明. 渗透休克法从大肠杆菌中提取 GST-Tα1-TP5 融合蛋白 [J]. *华夏医学*, 2016, 29(4): 9–12.
- [5] 沈徐凯, 周斌, 王云艳, 等. 丙酮破碎法提取重组大肠杆菌表达的转谷氨酰胺酶酶原 [J]. *生物技术通报*, 2011(5): 223–226.
- [6] 刘红, 潘红春, 蔡绍哲, 等. 酶解-超声法破碎大肠杆菌提纯包含体 [J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2004, 27(10): 75–78.
- [7] 吴蕾, 洪建辉, 甘一如, 等. 高压匀浆破碎释放重组大肠杆菌提取包含体过程的研究 [J]. *高校化学工程学报*, 2001, 15(2): 191–194.
- [8] 徐龙, 曹小安, 刘永生, 等. 布鲁氏菌 BP26 蛋白对鼠源树突状细胞分化及抗原提呈作用 [J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(4): 984–991.
- [9] 梁蕊芳, 徐龙, 岳明强. 细胞破碎技术应用研究进展 [J]. *内蒙古农业科技*, 2013(1): 113–114.
- [10] Pekarsky A, Spadiut O, Rajamanickam V, et al. A fast and simple approach to optimize the unit operation high pressure homogenization – a case study for a soluble therapeutic protein in *E. coli* [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(1): 74–81.
- [11] Glazyrina J, Materne E M, Dreher T, et al. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 42.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [13] 鲁龙, 毕生雷, 金洪波, 等. 高压均质法破碎小球藻细胞工艺优化 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(6): 304–307, 349.

V8.0.6 软件提取的最优条件:均质压力 140 MPa、均质次数 4 次、菌液浓度 60 g/L,在此条件下,回归模型预测的理论蛋白破碎率为 14.04%。为了验证预测结果的可靠性,根据预测试验条件,经过 3 次重复,得到大肠杆菌实际蛋白破碎率为 13.98%,这与预测值非常接近。说明该模型能较好地拟合实际情况,有一定的实践指导意义。