

# 氨基酸对类弹性蛋白多肽产量的影响

葛慧华, 张光亚, 王士斌

(华侨大学 化工学院, 福建, 厦门 362021)

**摘要:** 采用谷氨酰胺来确定氨基酸初始添加浓度,分析各种氨基酸对类弹性蛋白多肽[KV8F-40]产量的影响.结果表明:苏氨酸、精氨酸和半胱氨酸都能较大提高产量,其中以苏氨酸最为明显,产量可达  $126.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,比对照增加 54.0%.利用响应面设计对上述 3 种氨基酸进行 3 因素 3 水平实验,经优化后所得理论最大产量为  $100.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .经实验验证,所得实验值为  $103.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与理论值吻合,但其产量低于单个氨基酸.交互作用分析表明:3 种对产量有促进作用的氨基酸之间没有互作或者存在拮抗作用.

**关键词:** 类弹性蛋白多肽; 条件优化; 氨基酸; 响应面设计

**中图分类号:** TQ936.16

**文献标志码:** A

类弹性蛋白多肽(elastin-like polypeptides, ELPs)是一类有重复五肽序列的生物高分子,其五肽序列为 Val-Pro-Gly-Xaa-Gly(Xaa 是除了 Pro 外的其他 20 种氨基酸中的任何一种).因具有特殊的相变特性,使其在生物技术和生物医药方面具备广阔的应用前景.将 ELPs 作为药物载体具有诸多优势,如有良好的生物相容性,无毒,可在体内自然降解,可增加药物的溶解性,能有效延长药物的半衰期、减少药物的毒理作用,以及可定向在肿瘤部位累积等<sup>[1]</sup>.有研究者发现,不同类型 ELPs 在 37 °C 下可形成粒径均一的颗粒,其直径从 6 nm 到 1 602 nm 不等<sup>[2]</sup>,而经特殊设计的 ELPs 在 37 °C 和 pH=7 时,可自发形成高度均一的纳米颗粒(直径为 500 nm),用于蛋白类药物的定向运送<sup>[3]</sup>.尽管如此,ELPs 目前主要是通过基因工程菌发酵制备.由于其高度重复的序列,导致编码基因也高度重复,翻译过程中密码子使用疲劳,从而降低表达效率,使得 ELPs 的产量不高,在一定程度上限制了其应用.文献[4]的研究发现,通过添加氨基酸可以显著提高 ELPs 的产量,但由于该文献使用的 ELPs 与文献[5]的 ELPs[KV8F-40](以下简称为 ELPs<sub>40</sub>)在一级结构上存在明显差异.因此,有必要进行 ELPs<sub>40</sub>制备条件的优化,提高其产量,为其大规模应用奠定基础.本文通过单因素考察,结合响应面分析优化了工程菌的培养基条件.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

菌种 *E. coli* BL21(DE3)为本实验室保存,该菌株用于高效表达克隆含有噬菌体 T7 启动子的表达载体(如 pET 系列)的基因. T7 噬菌体 RNA 聚合酶位于  $\lambda$  噬菌体 DE3 区,该区整合于 BL21 的染色体上.该菌适合表达非毒性蛋白.其基因型为:F<sup>-</sup>, ompT, hsdS(rBB-mB<sup>-</sup>), gal, dcm(DE3).

TB 培养基的配方.组分 1:蛋白胨 12 g,酵母粉 24 g,甘油(Glycerol)4.5 mL,蒸馏水 900 mL.组分 2:磷酸氢二钾 16.43 g,磷酸二氢钾 2.31 g,蒸馏水 100 mL.将 2 种组分经高温高压灭菌后,降温至 60 °C 后按照 9:1 的体积比混合即可.

### 1.2 菌种培养条件

在培养基中加入 1% 的氨苄,将种子菌按照 1:100 的比例添加入 TB 培养基中,置于摇床振荡培养(培养条件为 30 °C, 200 r · min<sup>-1</sup>)2 h.然后,添加 IPTG 诱导 ELPs<sub>40</sub> 的表达, IPTG 也按照 1:100 的比

收稿日期: 2012-09-28

通信作者: 王士斌(1965-),男,教授,主要从事生物医学材料的研究. E-mail: sbwang@hqu.edu.cn.

基金项目: 华侨大学高层次人才科研启动项目(10BS220)

例加入菌液中,置于摇床中振荡培养 10 h,培养条件为 25 ℃,200 r·min<sup>-1</sup>.

1.3 类弹性蛋白多肽的定量测定

设计 ELPs<sub>40</sub> 基因时,在其末端添加了一个色氨酸的密码子,故表达出的 ELPs<sub>40</sub> 分子上都相应含有一个色氨酸.色氨酸在紫外波长 280 nm 处有最大吸收峰,其光密度值与色氨酸浓度成正比,利用不同浓度的色氨酸溶液制作标准曲线,可以计算 ELPs<sub>40</sub> 的产量<sup>[6]</sup>.

2 结果与分析

2.1 不同谷氨酰胺浓度对 ELPs<sub>40</sub> 产量的影响

微生物在氮同化代谢过程中,转氨的供体来自谷氨酸(Glu)与谷氨酰胺(Gln),而大肠杆菌可合成全部所需氨基酸,所以在 TB 培养基中采用谷氨酰胺来确定氨基酸添加的浓度<sup>[7]</sup>.不同谷氨酰胺浓度(C<sub>Gln</sub>)下,培养 24 h 之后的菌体生长量(用光密度 D(600)表示)和 ELPs<sub>40</sub> 摩尔产量(C<sub>ELPs<sub>40</sub></sub>)如表 1 所示.其中,菌体 D(600)是培养 24 h 后离心收集菌体用 PBS 溶液混匀,定容至 4.5 mL 时所测得光密度值.由表 1 可知,当 Gln 浓度为 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>时,ELPs<sub>40</sub> 产量最高.

表 1 不同浓度 Gln 对单位菌体的光密度值及 ELPs<sub>40</sub> 摩尔产量  
Tab.1 Influence of Gln concentration on the biomass and the production of ELPs<sub>40</sub>

项目	C <sub>Gln</sub> /mmol·L <sup>-1</sup>						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	5.0
D(600)	2.92	2.78	2.84	2.83	2.76	2.80	2.76
C <sub>ELPs<sub>40</sub></sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	6.47	5.35	5.94	6.74	4.80	5.74	4.96

不同浓度 Gln 对单位菌体产 ELPs<sub>40</sub> 量(单位 D(600)值产生的 ELPs<sub>40</sub> 的量)的影响,如图 1 所示.由图 1 可知:当 Gln 浓度为 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>时,单位菌体表达的 ELPs<sub>40</sub> 量达到极大值,因此选用 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>作为氨基酸初始添加浓度进行.

2.2 不同氨基酸对 ELPs<sub>40</sub> 产量的影响

TB 培养基中,每种氨基酸添加浓度为 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>,其他培养条件不变,培养 24 h 后分离菌体,纯化蛋白,测蛋白含量,结果如表 2 所示.表 2 中:D<sub>av</sub>(600)为 D(600)平均值;ρ(ELPs<sub>40</sub>)为 ELPs<sub>40</sub> 产量;η 为增长比例.

由表 2 可知:在 19 种氨基酸中,对 ELPs<sub>40</sub> 产量增长影响从大到小依次为:丝氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)、组氨酸(His)、谷氨酰胺(Gln)、异

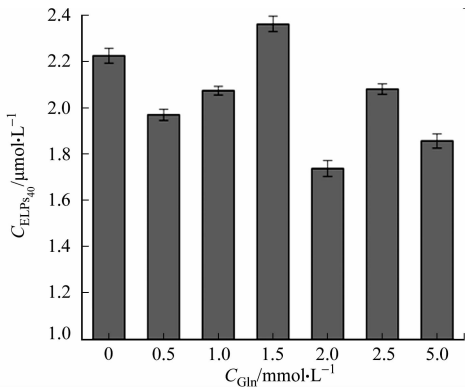


图 1 不同浓度 Gln 下单位菌体的 ELPs<sub>40</sub> 产量  
Fig.1 Influence of Gln concentration on the production of ELPs<sub>40</sub> per cell

表 2 各种氨基酸对 ELPs<sub>40</sub> 产量的影响

Tab.2 Influence of amino acids on the production of ELPs<sub>40</sub>

氨基酸	D <sub>av</sub> (600)	ρ(ELPs <sub>40</sub> )/mg·L <sup>-1</sup>	η/% <sup>①</sup>	氨基酸	D <sub>av</sub> (600)	ρ(ELPs <sub>40</sub> )/mg·L <sup>-1</sup>	η/% <sup>①</sup>
对照组	2.87	82.4	/	Tyr	3.07	69.3	-16.0
Lys	3.15	65.5	-20.5	Gly	3.18	68.7	-16.7
Ala	2.97	67.4	-18.3	Trp	2.82	58.8	-28.7
Thr	3.01	126.9	54.0	Met	3.01	114.3	38.7
Leu	3.10	67.1	-18.5	Ile	3.04	98.6	19.6
Glu	3.12	81.5	-1.1	Gln	3.08	103.1	25.1
Asp	3.02	86.6	5.1	Pro	3.09	93.2	13.1
Ser	3.12	75.7	-8.2	His	2.97	110.8	34.4
Val	3.11	49.4	-40.1	Cys	2.98	116.2	41.0
Arg	2.93	117.2	42.2	Phe	3.01	92.4	12.1

① “-”表示负增长,即该氨基酸抑制了 ELPs<sub>40</sub> 的产生

亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)和天冬氨酸(Asp). 其中,苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、半胱氨酸(Cys)对于 ELPS<sub>40</sub>产量的促进作用最大,分别比对照提高了 54.0%,42.2%和 41.0%.

在 ELPS<sub>40</sub>中,每连续的 10 个 Val-Pro-Gly-Xaa-Gly 单元中,其第 4 位的 Xaa 有 1 个为赖氨酸(K),有 8 个为缬氨酸(V),1 个为苯丙氨酸(F),40 表示有 40 个以 Val-Pro-Gly-Xaa-Gly 为单元的重复序列. 因此,缬氨酸(Val),脯氨酸和甘氨酸(Gly)含量丰富,而 Phe 和赖氨酸(Lys)含量较少,其他氨基酸为 ELPS<sub>40</sub>所不含的氨基酸(色氨酸除外). 因此把氨基酸分成 2 组,第一组为在 ELPS<sub>40</sub>中含量丰富的氨基酸,包括 Val,Pro,Gly,Phe 和 Lys;第二组为在 ELPS<sub>40</sub>中含量不丰富的氨基酸.

研究发现:在 ELPS<sub>40</sub>中含量丰富的氨基酸并没有很大促进 ELPS<sub>40</sub>产量的提高,反而是在 ELPS<sub>40</sub>中含量不丰富的氨基酸可以较大幅度的提高其产量. 这与文献[4]的报道吻合. 究其原因可能是,由于添加后缓解了大肠杆菌代谢压力,促使蛋白表达量增多,但也有可能与细胞内氨酰 tRNA 合成酶的量有关.

2.3 3 种氨基酸的配比优化

设计 3 因数 3 水平响应面试验考察中对 ELPS<sub>40</sub>产量有明显促进作用的苏氨酸、精氨酸和半胱氨酸,以期能进一步提高 ELPS<sub>40</sub>产量. 20 组响应面试验设计及其结果,如表 3 所示. 表 3 中:A 为 Thr 浓度;B 为 Arg 浓度;C 为 Cys 浓度; $\rho$ 为 ELPS<sub>40</sub>产量.

表 3 响应面试验设计  
Tab.3 Design of response surface analysis

组别	因素			$\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
	A/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	B/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	实验值	理论值
1	1.5	1.5	0.5	93.8	93.2
2	1.5	0.5	1.5	90.9	92.6
3	0.2	1.0	1.0	103.9	103.6
4	0.5	0.5	0.5	84.8	89.7
5	1.0	1.8	1.0	67.1	73.5
6	1.0	1.0	1.0	76.3	84.2
7	0.5	1.5	0.5	97.2	92.0
8	1.0	1.0	1.0	84.6	84.2
9	0.5	0.5	1.5	103.1	100.2
10	1.0	1.0	1.8	89.5	93.1
11	1.5	1.5	1.5	89.5	80.9
12	1.0	1.0	1.0	84.6	84.2
13	1.0	1.0	1.0	83.7	84.2
14	1.5	0.5	0.5	95.8	91.4
15	1.8	1.0	1.0	92.7	98.2
16	0.5	1.5	1.5	88.2	89.0
17	1.0	1.0	1.0	90.9	84.2
18	1.0	1.0	0.2	93.1	94.6
19	1.0	1.0	1.0	85.9	84.2
20	1.0	0.2	1.0	82.6	81.4

通过对各因素值和响应值分析计算,得到回归方程为

$$\begin{aligned} Y &= 97.5 - 40.6A + 28.2B - 5.4C - 0.5AB \\ &= 9.3AC - 13.4BC + 23.6A^2 - 9.5B^2 + 13.6C^2. \end{aligned}$$

式中:Y 为 ELPS<sub>40</sub>的产量,A,B,C 分别为 Thr,Arg 和 Cys 的浓度. 模型的  $p$  值为 0.042 8,小于 0.05,说明该模型是显著的,具有统计学意义. 回归模型的决定系数为 0.741 3,说明该模型能够解释 74.13%的变化. 模型预测结果表明:当苏氨酸、精氨酸和半胱氨酸浓度分别为 0.5,0.5 和 1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,模型达最大值,每升发酵液的 ELPS<sub>40</sub>的理论最大产量为 100.3 mg. 经试验验证,所得实验值为 103.1 mg,与预测值误差为 2.96%.

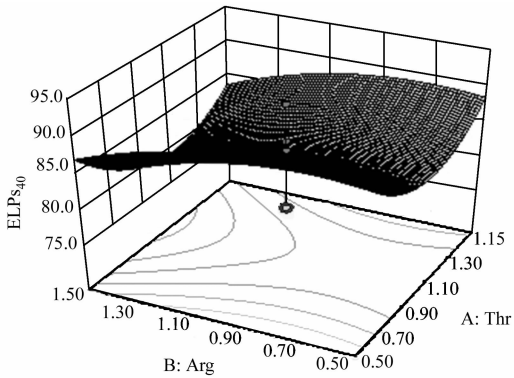
2.4 氨基酸之间的交互作用分析

由以上结果可知,经响应面优化得到的 ELPS<sub>40</sub>产量不如添加 1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苏氨酸的产量,而选

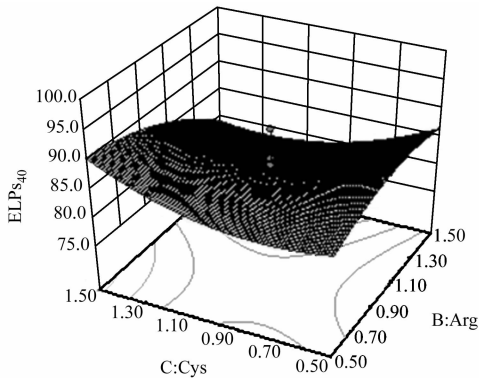
取的 3 种氨基酸都是能够提高 ELPs 产量的,这与预期结果存在差异.为此,分析了 3 种氨基酸之间的交互作用.

响应面图形是响应值 Y 对应于试验因素 A,B,C 所构成的三维空间曲面图,以及其在二维平面上的等高图.响应面图形可以直观地反映各因素及它们之间的交互作用对响应值的影响.将一个因素固定在某一水平,可作出另外两因素交互作用的响应曲面图,其结果如图 2 所示.

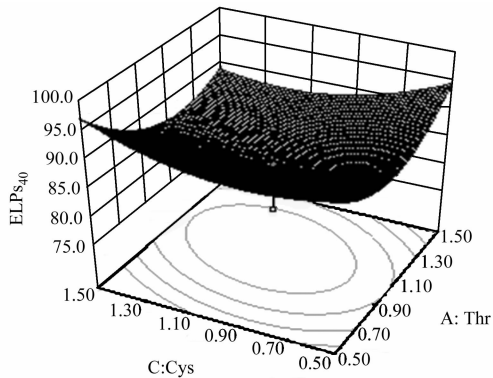
由图 2(a)可知:在这浓度区间,ELPs<sub>40</sub> 产量没有取到极值,说明 Thr 和 Arg 对 ELPs<sub>40</sub> 产生过程没有交互作用.由图 2(b)可知:在这浓度区间,ELPs<sub>40</sub> 产量没有取到极值,说明 Arg 和 Cys 对 ELPs<sub>40</sub> 产生过程没有交互作用.由图 2(c)可知:在这浓度区间,ELPs<sub>40</sub> 产量得到一个极小值,说明 Thr 和 Cys 对 ELPs<sub>40</sub> 产生过程存在交互作用,且为抑制作用.这表明当把能提高 ELPs<sub>40</sub> 产量的 Thr 和 Cys 同时添加到培养基中时,二者会产生阻遏效应,从而抑制了 ELPs<sub>40</sub> 的产生,这可能与这两种氨基酸分别属于不同的合成途



(a) Thr 和 Arg 的交互作用



(b) Arg 和 Cys 的交互作用



(c) Thr 和 Cys 的交互作用

图 2 氨基酸之间的交互作用分析  
Fig. 2 Interaction of amino acids

径<sup>[8]</sup>有关,导致这种结果的机制有待进一步探讨.

### 3 结论

通过单因素考察可知:当培养基中添加 1.5 mmol · L<sup>-1</sup> 苏氨酸时,ELPs<sub>40</sub> 的产量可达 126.9 mg · L<sup>-1</sup>,较之对照提高了 54.0%.选取了 3 种能明显提高 ELPs<sub>40</sub> 产量的氨基酸进行响应面分析.经优化后,当苏氨酸、精氨酸和半胱氨酸浓度分别为 0.50,0.55 和 1.55 mmol · L<sup>-1</sup> 时,模型达最大值,每升发酵液的 ELPs<sub>40</sub> 的理论最大产量为 100.3 mg.实验验证可知:所得实验值为 103.1 mg,与理论值基本吻合.但这 3 种氨基酸并没有预期的相互促进的效果,反而是苏氨酸和半胱氨酸之间产生相互抑制的现象,其机理有待进一步探讨.

目前,有关氨基酸对重组蛋白产量影响的研究主要集中于单个氨基酸对发酵产量的影响<sup>[4,7,9-10]</sup>,多个氨基酸之间的协同效应的研究较少,对其相互作用机制的研究也鲜见报道.今后可采用均匀设计的方法更大范围的搜索氨基酸的配比,以进一步提高其产量,并在此基础上结合代谢分析,探讨氨基酸之间相互作用的分子机制.

### 参考文献:

[1] RYU B Y, SOHN J S, HESS M, et al. Synthesis and anti-cancer efficacy of rapid hydrolysed water-soluble paclitaxel pro-drugs[J]. Biomaterials Science, 2008, 19(3): 311-324.

[2] FUJITA Y,MIE M,KOBATAKE E. Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain[J]. Biomaterials,2009,30(20):3450-3457.

[3] KORIA P,YAGI H,KITAGAWA Y,et al. Self-assembling elastin-like peptides growth factor chimeric nanoparticles for the treatment of chronic wounds[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA),2011,108(3):1034-1039.

[4] DOMINIC C. CHOW,MATTHEW R D,KIMBERLY T C,et al. Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in *E. coli*[J]. Biotechnology Progress,2006,22(3):638-646.

[5] 黄凯宗,李晶晶,李巍,等. 类弹性蛋白多肽的从头设计、非色谱纯化及盐效应[J]. 生物工程学报,2011,27(4):653-658.

[6] MEYER D E,CHILKOTI A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: Examples from the elastin-like polypeptide system[J]. Biomacromolecules,2002,3(2):357-367.

[7] 张卫兰,陶国庆,刘刚,等. 氨基酸对大肠杆菌 BL21 产嘌呤核苷磷酸化酶的影响[J]. 化学与生物工程,2010,27(2):53-56.

[8] HARCUM S W,RAMIREZ D M,BENTLEY W E. Optimal nutrient feed policies for heterologous protein production [J]. Applied Biochemical and Biotechnology,1992,34/35(1):161-173.

[9] CHU H S,PARK J E,KIM D M,et al. The effects of supplementing specific amino acids on the expression of elastin-like polypeptides (ELPs)[J]. Protein Expression and Purification,2010,74(2):298-303.

[10] 张文超,陈长华,李素霞,等.  $Mg^{2+}$  和氨基酸对重组大肠杆菌 BL21(DE3)生长及羧肽酶原 B 表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2006,19(1):81-83.

## Influence of Amino Acids on the Production of Elastin-Like Polypeptides [KV8F-40]

GE Hui-hua, ZHANG Guang-ya, WANG Shi-bin

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Using Gln to tentatively identify the initial concentration of each amino acid, we analyzed the influence of amino acids on the production of elastin-like polypeptides [KV8F-40]. The results showed Thr, Arg and Cys could improve the production at the concentration of  $1.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Among them, Thr was the best; it could improve the production from  $82.4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $126.9\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , with an improvement of 54%. And then, we designed the response surface analysis with three factors and three levels to optimize the cultivation medium of ELPs<sub>40</sub>. The experimental results fitted the theoretical result very well, which was  $103.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $100.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. However, the production was less than that of single factor. By means of interaction analysis, we found Thr and Cys inhibit each other, while others didn't have interaction.

**Keywords:** elastin-like polypeptides; medium optimization; amino acids; response surface method

(责任编辑: 黄晓楠      英文审校: 刘源岗)