

产生霍乱毒素 B 亚单位 (CT-B) 工程菌的发酵条件

于秀琴 马清韵

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

高效表达霍乱毒素 B 亚单位的工程菌 MM2 菌株, 在玉米浆培养基中能高效合成 B 亚单位, 观察了吸光度 (OD)、pH 及 B 亚单位产生的动态变化。玉米浆培养基不仅成本低、制备工艺简易, 而且 B 亚单位产量高, 在 50L 发酵罐中培养, B 亚单位产量可达 40 μ g/mL。

关键词 霍乱毒素; 工程菌; 发酵

霍乱是一种传染病和流行病, 霍乱的发病由霍乱弧菌引起, 霍乱弧菌经肠道感染后产生霍乱毒素, 导致严重的呕吐和腹泻, 迅速脱水以致死亡^[1]。霍乱毒素的分子量为 84000, 由 A 及 B 亚单位组成, A 亚单位以单拷贝存在, 为毒素毒力活性部分。B 亚单位有五个拷贝, 为毒素免疫原性部分, 是组构预防霍乱及毒原性大肠菌腹泻疫苗的保护性抗原^[2,3]。B 亚单位不仅是良好的免疫原, 也是有效的免疫佐剂, 当它与其它抗原一起免疫时, 可促进其它抗原的免疫反应^[4,5]。

我们实验室成功地在大肠杆菌工程菌中获得了毒素基因及毒素缺失的 A⁻B⁺ 基因的克隆和表达, 它们能高效表达 B 亚单位, 且能分泌到胞外^[6-8], 经选育获得一支高产 B 亚单位的菌株 MM2^[9], 本文报道采用玉米浆培养基对 MM2 菌株进行发酵培养, 观察了细菌生长的 OD、pH 及 B 亚单位产生的动态变化, 确定了在玉米浆培养基中细菌生长及产生 B 亚单位的基本条件, 获得了较高水平的 B 亚单位产量, 可达 40 μ g/L。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

大肠杆菌工程菌 MM2(PMM-CTB) 由本实验室构建。

(二) 霍乱毒素 B 亚单位与抗毒素血清

提纯的霍乱毒素为 Sigma 公司产品, 抗霍乱毒素血清系本实验室用霍乱毒素免疫家兔获得的。

(三) 培养基

LB 培养基为每升含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 10g, pH7.4。玉米浆培养基为华北制药厂或北京双桥葡萄糖厂生产的, 配成 3% 浓度, pH7.4。

(四) CT-B 亚单位抗原测定

采用 GM1-ELISA 方法^[10] 或琼脂糖凝胶辐射免疫扩散^[11], 以扩散圈直径大小定量测定。

本文于 1991 年 8 月 16 日收到。

王叙甫等同志协助完成发酵条件实验, 谨致谢忱。

结 果 和 讨 论

(一) MM2 在玉米浆培养基中的振荡培养

将 MM2 在 LB 培养基中生长, 能较好地合成 B 亚单位。为选择价廉、制备工艺简单、生产率高的培养基, 粗筛了四种培养基, 发现玉米浆培养基是可取的。

1. 玉米浆培养基与 LB 培养基的比较: 将 MM2 分别接种于 3% 玉米浆培养基和 LB 培养基, 经振荡培养 20 小时后, 取样离心取上清液, 进行 GM1-ELISA 测定, 以 P/N 值表示其 CT-B 亚单位的产量, 结果见表 1。在玉米浆培养基中合成 B 亚单位较 LB 培养基为高, 按 P/N 值相比, 平均提高 50% 以上。

表 1 玉米浆与 LB 培养基产生 CT-B 亚单位产量的比较
Table 1 Comparison of the amount of CT-B subunit produced
by corn liquid medium and LB medium (GM1-ELISA 1000×P/N)

批 次 Batch	LB 培养基 LB medium	玉米浆培养基 Corn liquid medium
1	8.7	15.0
2	12.6	33.7
3	9.9	25.3
平 均 Average	10.4	24.7

2. 不同浓度玉米浆对 CT-B 亚单位产量的影响: 试验了北京、石家庄、南昌三个不同厂家的玉米浆, 结果对 MM2 生长和 B 亚单位的表达均无明显的差异。进而比较了玉米浆浓度的影响, 结果表明, 其浓度 1.5—9.0% 无明显差异, 3% 浓度较适宜。

3. 不同接种量对 CT-B 亚单位的影响: 应用 3% 玉米浆培养基, 比较了 1%、3% 和 5% 三种接种量对 B 亚单位产量的影响, 结果显示 1%—5% 接种时, 细菌生长没有差异, 培养 12 小时前 B 亚单位均合成很少, 12 小时后迅速增长, 均能达到同一水平, 但 5% 较 1% 接种量提前 2 小时 (图 1)。

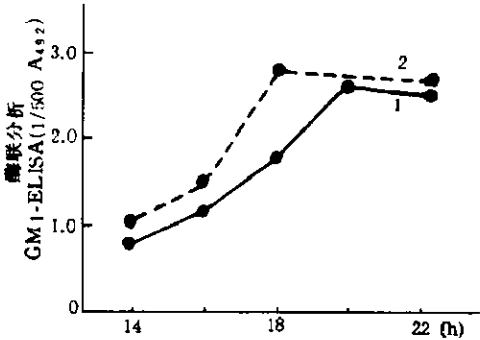


图 1 不同接种量对 CT-B 亚单位产量的影响
Fig. 1 Effect of different inoculative amount on the yield of CT-B subunit.
1. 5%; 2. 1%

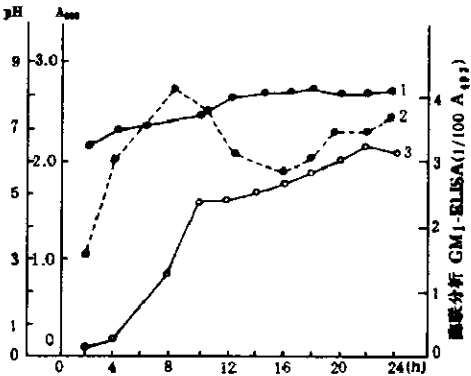


图 2 培养过程中 OD、pH 及 B 亚单位的动态变化
Fig. 2 Kinetics of OD, pH and CT-B subunit during cultivation
1. pH; 2. OD; 3. GM1-ELISA

4. 振荡培养过程中 OD、pH 及合成 B 亚单位的动态变化：以 5% 菌量接种在 3% 玉米浆培养基中，观察了其振荡培养过程中 OD、pH 及 B 亚单位的动态变化 (图 2)。细菌生长较快，培养 6—8 小时后即达到对数生长期，培养液的 pH 逐步上升，12 小时后维持在 pH8.0—8.5 左右。合成 B 亚单位则在 4 小时后开始，6 小时后大量分泌，12 小时后上升速度减慢，于 20—22 小时达高峰。

5. MM2 在玉米浆培养基中 CT-B 亚单位产量：MM2 以 5% 接种于 3% 玉米浆培养基，在 500ml 三角烧瓶中装量 50ml，振荡培养 18 小时，采用 GM1-ELISA 及辐射免疫扩散法测量 B 亚单位抗原量，每批 2—3 瓶，四批结果于表 2。B 亚单位产量在 20—29 $\mu\text{g/ml}$ 左右，平均 $24\mu\text{g/ml}$ 。

表 2 MM2 在玉米浆培养基中 CT-B 亚单位的产量

Table 2 The amount of CT-B subunit in the corn liquid medium produced by engineered bacteria MM2

批 次 Batch	酶联分析 OD 值 GM1-ELISA 1:1000	B 亚单位产量 CT-B Content
1	3.38	29.0
2	2.23	22.5
3	2.13	20.0
4	2.21	23.8
平均 Average	2.51	23.6

(二) MM2 在玉米浆培养基于发酵罐中的培养

应用 MSJ-u3 50 L 发酵罐，发酵的培养温度、pH、溶解氧、搅拌速度等重要指标可

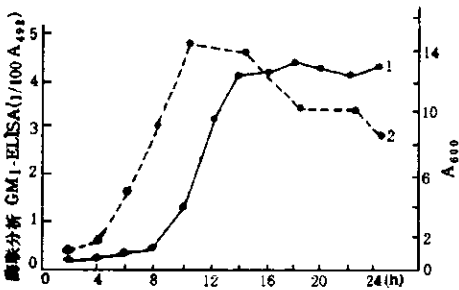


图 3 MM2 在发酵罐中产生 CT-B 亚单位的动态变化

Fig. 3 Kinetics of CT-B subunit productivity in 50L fermentative tank produced by engineered bacteria MM2

1. GM1-ELISA; 2. OD

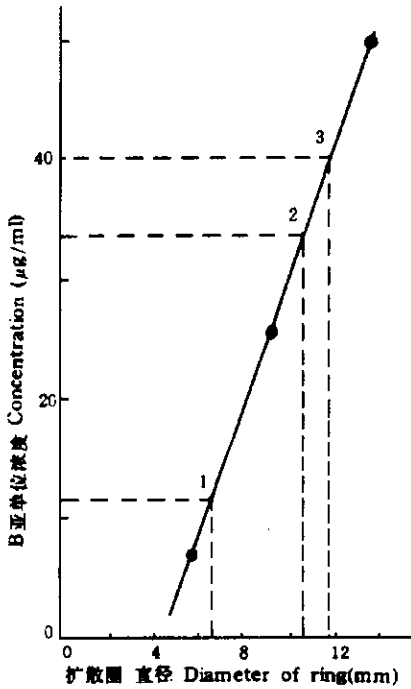


图4 工程菌 MM2 在 50L 发酵罐培养中 CT-B 的抗原产量

1. 12 小时; 2. 18 小时; 3. 24 小时培养物;

● 为已知浓度的标准 B 亚单位抗原

Fig. 4 Yield of CT-B subunit in 50L fermentative tank produced by engineered bacteria MM2 measurement of CT-B antigen concentration by single radial immunodiffusion.

1. 12h culture; 2. 18h culture; 3. 24h culture;

● Standards of known concentration

以自控加以及时调整。以 5% 菌量接种玉米浆培养基, 观察了培养过程中菌量、pH 值及合成 B 亚单位的动态变化 (图 3), MM2 经培养 10 小时后即达对数末期, OD 值达高峰, 随后下降, B 亚单位产量培养 10 小时后急剧上升, 18—22 小时达高峰。B 亚单位产量可达到 40 μg/ml (图 4)。

我们选育的高产霍乱毒素 B 亚单位工程菌高产株 MM2, 在玉米浆培养基中, 经发酵试验表明, 确系高产株, 能高产 B 亚单位且分泌到细胞外。同时表明应用玉米浆培养基进行工程菌的发酵培养, 不仅原料价格低廉, 制备工艺简便, 而且发酵产率高, 具有明显的优越性。为获得高产的 B 亚单位, MM2 于玉米浆培养基中发酵培养应注意下列两个问题, (1) 保证菌种质量, 使其纯度高, 生理活性强, 处于长期繁殖期。(2) 严格控制培养温度、pH 及溶解氧等条件。B 亚单位可达 20—40 μg/ml, 这个水平远较国外文献 [12—14] 水平为高, 达到了国际先进水平。工程菌产生的 B 亚单位经试验证明, 与霍乱弧菌产生的 B 亚单位抗原有相同的抗原性和免疫原性。

参 考 文 献

- [1] Holmgren, J.: *Nature*, **292**:413, 1981.
- [2] Black, R. E. et al.: *Immun.*, **55**:116, 1987.
- [3] Levine, M. M. et al.: *Lancet*, **2**:467, 1984.
- [4] Mckenzie, S. J. & J. F. Halsey: *J. Immun.*, **133**:1818, 1984.
- [5] Tamurs, S. et al.: *Vaccine*, **6**:419, 1988.
- [6] 马清钧等: *生物工程学报*, **3**:24, 1987.
- [7] 马清钧等: *微生物学报*, **28**:307, 1988.
- [8] 马清钧等: *中国科学 (B 辑)*, No.5:517, 1988.
- [9] 马清钧等: *中国科学 (B 辑)*, No.4:394, 1989.
- [10] 刘传喧等: *中华微生物学和免疫学杂志*, **9**:62, 1989.
- [11] 刘传喧等: *军事医学科学院院刊*, **13**:322, 1989.
- [12] Gennaro, M. L. et al.: *Nucl. Acids. Res.*, **10**:4883, 1982.
- [13] Pearson, G. D. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**:2976, 1982.
- [14] Kaper, J. B. et al.: *Bio/Technology*, **2**:345, 1984.

FERMENTATION OF ENGINEERED STRAIN PRODUCING CHOLERA TOXIN B SUBUNIT

Yu Xiuqin Ma Qingjun

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Studies indicate that the cholera B subunit could be synthesized efficiently in corn steep liquor by engineered *E. coli* strain MM2. We have also determined the optical density, pH and the yield of B subunit kinetically during fermentation. Corn steep liquor medium has advantages in low cost, simplicity in technological process and high yield of B subunit which can reach 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50L fermentative tank.

Key words Colera toxin; Engineered bacteria; Fermentation

JOURNALS.IM.AC.CN