

Cecropin-X 发酵过程中工程菌质粒稳定性的研究

邱英华¹ 沈 益¹ 王玉海² 徐贤秀^{1*}

(¹ 南京大学医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

(² 浙江医药股份有限公司新昌制药厂 新昌 312500)

摘 要 通过连续斜面转接实验(50次)检测重组 Cecropin-X 工程菌质粒的结构稳定性,采用 30L 自动控制发酵罐观察不同培养基,有无选择压力和溶氧高低等培养条件对质粒分裂稳定性的影响。结果表明,该工程菌质粒具有结构稳定性和分裂不稳定性。当外源蛋白表达时,便会出现分裂不稳定性,表达量越高,质粒丢失情况越严重。经 12h 的培养,当采用 TB 和 2×LB 作为发酵培养基时,带质粒的菌为 68.5% 和 98.0%,包涵体得率有很大差异,干重分别为 1.24 和 0.40g/L。发酵培养基中(TB)氨苄青霉素浓度为 0 和 100μg/mL 时,带质粒的菌为 68.5% 和 92.0%,包涵体得率基本一致,干重分别为 1.24 和 1.20g/L。通过改变搅拌速度来调节溶氧量,当转速为 150 和 250r/min 时,带质粒的菌为 68.5% 和 100%,包涵体得率有较大差异,干重分别为 1.24 和 0.71g/L。

关键词 Cecropin-X, 发酵, 质粒稳定性

中图分类号:Q939.97;Q782 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)03-0390-03

对于用于生产的工程菌进行质粒稳定性的考察是非常必要的,因为携带重组质粒的工程菌在繁殖过程中往往会出现质粒丢失现象,从而影响外源基因产物的表达。一般认为质粒的不稳定性可分为两种,结构不稳定性和分裂不稳定性^[1],本文在这两个方面对产生 Cecropin-X 的工程菌质粒稳定性进行考察。

杀菌肽 CMIV 是中国科学家从家蚕中分离纯化得到的一种带正电荷的抗菌小肽,由 35 个氨基酸残基组成,不含甲硫氨酸和半胱氨酸,它除具有广谱抗菌功能外,还具有抑制一些肿瘤细胞生长的作用^[2]。为能够制备大量杀菌肽,本实验室在杀菌肽 CMIV 的基础上构建了高效表达的大肠杆菌表达体系,即在 CMIV 的 C 端加上一个天冬酰胺密码子构成 Cecropin-X 基因,并与 TNF β 基因融合表达。融合蛋白分子量为 21kD,经 BrCN 裂解得到有活性的 Cecropin-X,分子量为 3.8kD^[3]。药效学预实验证明,Cecropin-X 对小鼠 S180 肉瘤和 Lewis 肺癌的抑瘤率分别达到 59.77% 和 53.33%,与阴性对照组相比其 P 值均小于 0.01($P < 0.01$),且未观察到有毒副作用产生。Cecropin-X 作为一种安全有效的抗肿瘤药物,具有潜在广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 质粒和工程菌

质粒 pET11d-TNF β -Cecropin-X 为本实验室构建,工程菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 由本实验室保存。

1.2 仪器和试剂

30L 自动控制发酵罐由上海高机实业公司生产,均质机

由丹麦 APV 公司生产,型号为 APV1000,Tryptone 和 Yeast Extract 均购于英国 OXOID 公司,其他试剂均为分析纯。

1.3 菌种质粒结构稳定性

LB 和 TB 的配制参见文献[4],连续斜面转接实验的方法为:挑转化后长出的单菌落接种于 3mL LB(氨苄青霉素 50μg/mL)试管中,于 37℃ 200r/min 培养 10h,用接种环取少量接种于斜面上(斜面含氨苄青霉素 50μg/mL),37℃ 培养 12h,为第一次。从第一次斜面挑少量菌接种到另一斜面,37℃ 培养 12h,重复该步骤至 50 次。对 10、20、30、40、50 次的菌提质粒并作酶切图谱分析。

1.4 发酵种子液的制备

挑转化后长出的单菌落接种于 3mL LB(氨苄青霉素 50μg/mL)试管中,于 37℃ 200r/min 培养 10h,取 20μL 转接于摇瓶中(含 200mL TB 培养基,氨苄青霉素 50μg/mL),于 37℃ 200r/min 培养 10~12h。

1.5 发酵条件

30L 发酵罐中含培养基 20L,泡敌 200μL,通气量 160L/h,罐压 0.02~0.04MPa。如无特殊说明发酵培养基为 TB,氨苄青霉素浓度为 0,接种量为 4%,搅拌转速为 150r/min,发酵培养时间为 12h,每隔 2h 取样检测质粒稳定性。检测方法为:发酵液稀释 2.25×10⁴ 倍后涂 LB 板,37℃ 培养 14h,挑 LB 平板上长出的单菌落 200 个点于 LA 平板(氨苄青霉素浓度为 50μg/mL)上,37℃ 培养 14h,能在 LA 平板上生长的菌即为含质粒的菌^[5]。

1.6 菌体收集和包涵体纯化

6000r/min 离心发酵液 10min,收集菌体,悬浮于 PBS 溶液

* 通讯作者。Tel 86-25-83594827;E-mail xxxu@nju.edu.cn, xuxianxiu@hotmail.com

作者简介 邱英华(1977-),女,广西人,硕士,主攻基因工程方向。E-mail qjuyinghua@263.net

其他作者 董雪吟¹,张洪祖¹

收稿日期 2003-07-22,修回日期 2003-12-01

中,均质机破碎(压力为 $8 \times 10^7 \sim 9 \times 10^7$ Pa),镜检($1000 \times$)无完整菌体。 $10000\text{r}/\text{min}$ 离心20min收集沉淀,依次用PBS、TE、 $2\text{mol}/\text{L}$ 尿素、 0.5% NaCl/ 2% Triton(曲拉通)洗涤沉淀,即为包涵体。

1.7 包涵体干重

称取一定量包涵体置于 37°C 烘箱中干燥,并研成细末直到重量不再减轻,即为干重。

1.8 融合蛋白含量确定

将 SDS-PAGE 图谱进行灰度扫描,确定融合蛋白在全菌总蛋白中的含量。

2 结果

2.1 菌种质粒结构稳定性

转接 10、20、30、40、50 次的工程菌质粒用 *Eco*R I 及 *Bam*H I 进行酶切,并与原质粒作酶切图谱比较。每种质粒均能切下约 120bp 片段(Cecropin-X 的基因序列),并与原质粒酶切条带位置一致。

2.2 工程菌在发酵罐中的表达情况

不同发酵时间的 SDS-PAGE 图谱分析表明,融合蛋白以包涵体形式存在(图 1)。

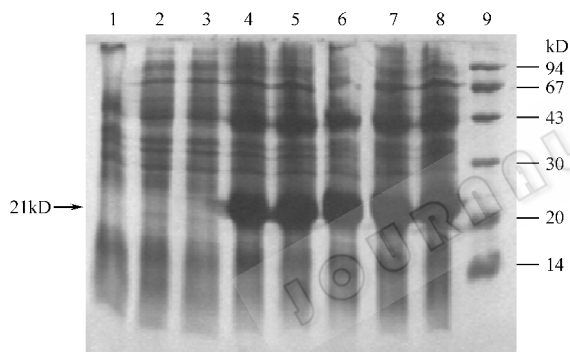


图 1 工程菌在发酵罐中 2~12h 的表达情况

Fig.1 The expression of TNFb-Cecropin-X in recombinant bacteria during the fermentation

1. Seed; 2~8. Culture time: 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12h, respectively; 9. Protein molecular weight marker.

由图 1 可知,接种 4h 后工程菌开始表达融合蛋白,5~12h 一直保持较高的表达量。经灰度扫描确定融合蛋白占全菌总蛋白的 45%~50%。

2.2 培养基对质粒稳定性的影响

采用 TB 培养基进行发酵时,4h 后工程菌开始表达融合蛋白,同时质粒稳定性开始下降,发酵结束时 OD_{600} 为 11.0,带质粒的菌占 68%,包涵体干重得率为 $1.24\text{g}/\text{L}$ 。采用 $2 \times \text{LB}$ 培养基进行发酵时,在发酵过程中带质粒的菌基本维持在 98%~100%,工程菌生长缓慢,发酵结束时 OD_{600} 为 6.4,包涵体干重得率很低,为 $0.40\text{g}/\text{L}$ 。

2.3 选择压力添加与否对质粒稳定性的影响

以氨苄青霉素作为选择压力,在其浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 的情况下,当工程菌开始表达融合蛋白时,仍会出现质粒丢失

现象,发酵结束时 OD_{600} 为 12.6,带质粒的菌占 92.0%,比无选择压力情况下质粒稳定性高,但包涵体干重得率基本一致,为 $1.20\text{g}/\text{L}$ 。

2.4 溶氧对质粒稳定性的影响

通过改变搅拌转速来调节溶氧量,当转速为 $250\text{r}/\text{min}$ 时,在发酵过程中带质粒的菌基本维持在 100%,工程菌生长速度较快。发酵结束时 OD_{600} 为 18.8,包涵体得率较低,干重为 $0.71\text{g}/\text{L}$ 。

3 讨论

大肠杆菌发酵是大量获取重组蛋白的良好途径,具有价格低廉,操作简便等优点。但在许多研究中也发现,外源基因的表达水平高,会增加质粒的不稳定性,从而影响发酵产率^[1]。

本实验中采用的工程菌质粒结构稳定性的检测方法参照国家药品监督管理局的新生物制品审批方法,证明具有结构稳定性。该工程菌为组成型表达,无需诱导,简化了发酵工艺。但在发酵过程中发现外源基因的高效表达必然导致质粒分裂稳定性的降低,通过采用替代培养基(如 LB)或升高溶氧的办法虽然可以提高质粒分裂稳定性,但同时却大大降低了包涵体的得率。在本实验的结论部分可以看到,工程菌外源基因的高效表达和质粒稳定复制所需要的培养条件并不一致,例如在溶氧高的条件下质粒能够稳定复制却不能达到高效表达。因为工程菌为组成型表达,使得在发酵过程中质粒复制与表达交织在一起进行,而且外源基因在接种后 4h 开始表达,时间过早。发酵条件的设计须考虑上述因素,结合工程菌质粒分裂稳定性的特点,以获取大量外源基因表达产物为目的,设计出切合实际的发酵条件。

参 考 文 献

- [1] Jos F M L Secgers, Cristian M Franke, Rense K, et al. Use of continuous culture for the selection of plasmids with improved segregational stability. *Plasmid*, 1995, **33**: 71-77.
- [2] 谢维,邱奇峰,徐贤秀,等. 中国家蚕抗菌肽 CMIV 基因的合成与克隆. *南京大学学报*, 1996, **32**(3): 444-447.
- [3] Wang L, Wu H H, Xu X X, et al. High-level expression of cecropin CMIV in *E. coli* from a fusion construct containing the human tumor necrosis factor. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1997, **41**(5): 1051-1056.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1999: 908-909.
- [5] Nayak D P, Jayas V V. Improved stability and expression of a recombinant shuttle plasmid in *Escherichia coli* during fedbatch cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999, **15**: 65-71.
- [6] 赵霞,叶勤,俞俊棠,等. 影响重组工程菌发酵产率的因素. *工业微生物*, 1995, **25**(2): 56-32.

Study on Plasmid Stability of Recombinant *Escherichia coli* Producing Cecropin-X During Fermentation

QIU Ying-Hua¹ SHEN Yi¹ WANG Yu-Hai² XU Xian-Xiu^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

(² Zhejiang Medicine Company, Limited. Xinchang Pharmaceutical factory, Xinchang 312500, China)

Abstract : In the view of engineering application, the plasmid stability of pET11d-TNFb-Cecropin-X, harbored in BL21 (DE3), was investigated. The results showed that the plasmid had structural stability and segregational instability. Plasmid segregational instability was aggravated by high-level expression. Segregational stability of the plasmid was investigated in a 30L-fermentor. In 2 × LB or in a condition of high-level dissolved O₂, the rate of plasmid harboring cell was almost maintain 100% with a low yield of inclusion body, 0.40 and 0.71g/L respectively. In TB while the ampicillin was absence or not, the rate of plasmid harboring cell were 68.5% and 92.0% respectively, and the yield of inclusion body were 1.24 and 1.20g/L respectively.

Key words : Cecropin-X, Fermentation, Plasmid stability

* Corresponding author. Tel 86-25-83594827 ;E-mail :xxxu@nju.edu.cn ,xuxianxiu@hotmail.com

Received date : 07-22-2003

常见基金项目的英文译名

1. 国家自然科学基金
Chinese National Natural Science Foundation
2. 国家“863 计划”, 又名 国家高技术研究发展计划项目
Chinese National Programs for High Technology Research and Development
3. 国家“973 项目”, 又名 国家基础研究发展规划项目(有两种资助方式)
(1) 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目
Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(973 program)
(2) 国家重大基础研究发展规划(973 计划)项目
Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development
4. 国家科技公关项目
Chinese National Programs for Science and Technology Development
5. 国家“十五”重点科技攻关项目
The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China
6. 国家杰出青年科学基金
National Science Foundation for Distinguished Young Scholars
7. 国家杰出人才科学基金
Chinese National Science Foundation for Outstanding Scholarship
8. 农业部农业微生物重点实验室项目
Key Laboratory Project on Agromicrobiology of Chinese Agriculture Ministry
9. 科技部转基因植物研究与产业化专项
National R. & D. Project of Transgenic Crops of Ministry of Science and Technology of China
10. 中澳科技合作项目
Science and Technology Cooperation Project of China and Australia