

人溶菌酶工程菌株培养条件的研究*

郭良栋 钱世钧 叶 军 矫庆华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

人溶菌酶在食品工业和医药上具有广泛的用途,最近发现它在癌症的继承性免疫治疗上也有作用。为使入溶菌酶达到工业化生产,我们已成功地人工合成了入溶菌酶基因,并构建了入溶菌酶基因的重组质粒和工程菌株^[1,2]。为提高该工程菌入溶菌酶的表达水平,我们对影响该工程菌表达入溶菌酶的培养条件进行探讨。

1 材料和方法

1.1 菌种

本课题组构建的工程菌株 JPB-HLY。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基(%) : 胰蛋白胨 1.0g, 酵母提取物 0.5g, 氯化钠 1.0g, pH 7.0。

1.2.2 RM 培养基(%) : 胰蛋白胨 2.0g, 酵母提取物 1.5g, 葡萄糖 0.2g, 磷酸氢二钠 1.28g, 磷酸二氢钠 0.3g, 氯化钠 0.5g, 氯化铵 1.0g, 硫酸镁 0.2g, 氯化钙 0.01g, pH 7.0。

1.3 仪器和试剂

薄层层析扫描仪(CS-930)为日本岛津公司产品,721 分光光度计(上海),pH 计(Model 5986-62, Cole-Palmer),卵清溶菌酶、茶啉酮酸、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)均为 Sigma 公司产品,胰蛋白胨、酵母提取物为 Oxoid 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.4 菌体制备

将平皿菌种接到 2ml LB 培养基(含氨苄青霉素 50 μ g/ml)中,28℃ 摇荡过夜,把菌液转到 50ml LB 或 RM 培养基(含氨苄青霉素 50 μ g/ml)中,28℃ 摇荡培养,菌体生长到一定生物量时,其中在 LB 培养基中, A_{660} 为 0.3 ~ 0.5 \times 2,在 RM 培养基中, A_{660} 为 0.5 \times 2 ~ 0.45 \times 10,立即转到 42℃ 下诱导 3h,然后离心收集菌体(4℃, 10min, 6000 \times g),并将菌体悬浮于磷酸钠缓冲液(50mmol/L, pH6.2)中。

1.5 粗酶液提取

将悬浮于磷酸钠缓冲液的菌体进行超声处理(30s \times 10次),离心(10000 \times g, 15min, 4℃),去掉上清液,将沉淀悬浮于 9 倍体积的缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100)中,室温保持 5min,离心去掉上清液,并将沉淀重新悬浮于裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 8mol/L 尿素, 10ml/g 湿菌体)中,室温搅拌过夜,然后将变性液缓慢倒入 9 倍体积的复性液(50mmol/L KH_2PO_4 , pH10.7, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl),并用 1mol/L KOH 维持 pH10.7 ~ 10.8,室温保持 1h,然后用 1mol/L HCl 调到 pH8.0,并在室温下放置 2h,离心(10000 \times g, 20min, 4℃)收集上清液,并

*国家“八五”攻关项目资助。

本文于 1995 年 12 月 22 日收到。

对水透析过夜,即为粗酶液。

1.6 酶活性测定

取 1.2ml 溶于磷酸钠缓冲液(50mmol/L, pH6.4) 的溶壁微球菌(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 加 300 μl 粗酶液, 立即摇匀, 并在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下测出 A_{450} 在 10min 内的变化值。

酶单位定义: 在上述标准条件下, 每分钟光密度降低 0.001 所需要的酶量为一个酶活单位。

1.7 酶蛋白表达水平测定

将菌体蛋白进行聚丙烯酰胺(15%) 凝胶电泳, 用考马斯亮蓝染色, 然后进行脱色处理, 用薄层层析扫描仪扫描, 即可得到酶蛋白占全部菌体蛋白的百分率。

1.8 蛋白质含量测定

根据 Lowry 等方法^[1]。

2 结果和讨论

2.1 生长曲线

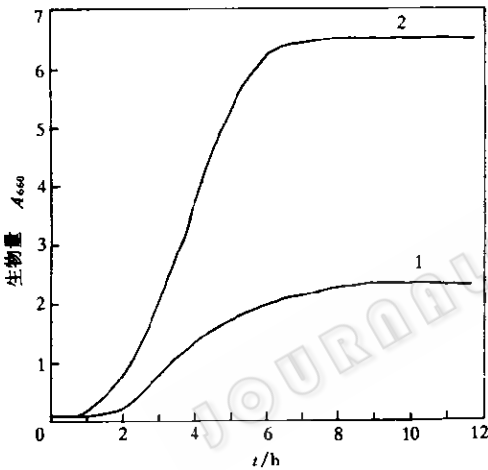


图1 工程菌 JPB-HLY 在 LB、RM 两种培养基

基中的生长曲线

1: LB 培养基; 2: RM 培养基。

该工程菌在两种不同培养基上的生长曲线见图 1。该菌在两种不同培养基中的生长速度不同, 它在 RM 培养基中远远大于在 LB 培养基中的生长速度。菌体在 RM 培养基中的最大 A_{660} 值为 0.65×10 , 而在 LB 培养基中的最大 A_{660} 值仅为 0.225×10 , 因此, 在这两种培养基中的菌体收获量也不相同, 每升 RM 发酵液可得湿菌体 20 ~ 22g, 而每升 LB 发酵液仅得湿菌体 4 ~ 5g。这主要是因为 RM 培养基的营养成分比 LB 培养基丰富, 比较适合该工程菌的生长。另外, 还可根据菌体的生长曲线, 选择最佳的 A_{660} 值进行诱导, 以便得到更多的人溶菌酶蛋白。

2.2 诱导前菌体生物量对酶表达水平和活力影响

菌体生长到不同时期(不同 A_{660} 值), 转到 42 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导 3h, 收集菌体, 测其酶的表达水平和活力。实验结果见表 1。无论是在 LB 还是在 RM 培养基中, 随发酵液中菌体生物量的增加, 人溶菌酶在菌

体中的表达水平反而逐渐降低。在菌体刚刚进入生长的对数期时, 酶的表达水平最高, 并且在在对数期内变化不明显, 但菌体的生长进入对数期后期, 该酶的表达水平明显下降。这主要是与菌体的生长速度有关; 当菌体的生长刚进入对数期时, 其生长速度比较快, 这时菌体进入诱导状态, 酶蛋白的积累也快; 当菌体的生长进入对数期的后期, 由于发酵液中营养的消耗, 氧气的缺乏及代谢产物的积累, 使菌体的生长速度明显受到抑制, 部分菌体开始老化和自溶, 在此状态下诱导, 酶蛋白的合成显然受到影响。同样, 由表 1 可以得出, 无论是在 LB 还是在 RM 培养基中, 随发酵液中菌体生物量的增加, 单位体积发酵液中人溶菌酶活力由低到高再到低。因为单位体积发酵液中酶活力是由两方面因素所决定, 即菌体的生物量和酶表达水平, 只有在生物量和酶的表达水平都处在较高水平时, 单位体积发酵液中酶活力才达到最高水平; 如在 LB 培养基中 A_{660} 为 0.2×5 , 在 RM 培养基中 A_{660} 为 0.45×10 时进行

诱导，单位体积发酵液中酶活力最高。而在生物量比较低时，虽然酶表达水平最高，但是由于受菌体生物量太低的影响，单位体积发酵液中酶活力也不是很高。同理，在生物量最大时，由于酶的表达水平太低，导致单位体积发酵液中酶活力不高。同时，对两种不同培养基进行比较发现，单位体积 RM 发酵液的酶活力远大于 LB 发酵液的。

表 1 菌体生物量对酶表达水平和活力的影响

| BL 培养基 | | | RM 培养基 | | |
|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|
| 生物量 $A_{600} \times 10$ | 酶表达水平 / % | 酶活力 / $u \cdot ml^{-1}$ | 生物量 $A_{600} \times 10$ | 酶表达水平 / % | 酶活力 / $u \cdot ml^{-1}$ |
| 0.03 | 29.6 | 26.7 | 0.17 | 25.6 | 122.5 |
| 0.06 | 25.5 | 35.4 | 0.22 | 23.4 | 137.1 |
| 0.10 | 23.6 | 44.8 | 0.35 | 20.1 | 141.2 |
| 0.14 | 16.6 | 27.7 | 0.45 | 18.5 | 165.5 |
| 0.17 | 12.5 | 12.4 | 0.55 | 10.2 | 75.3 |
| 0.25 | 8.4 | 8.4 | 0.62 | 8.0 | 71.5 |

2.3 诱导时间对酶表达水平和活力的影响

菌体培养到同一生物量时，转到 42℃ 下诱导不同时间，结果见表 2。在 LB 培养基中，诱导 2 ~ 4h，均可使酶的表达和活力处于较高水平，而诱导 1h，则酶的表达和活力还没有达到最高水平；诱导 5h，则酶的表达水平和活力开始下降。在 RM 培养基中，诱导 1 ~ 3h 均可使酶的表达和活力处于较高水平，而超过 4h，则酶的表达水平和活力开始下降。综上所述，在 LB 培养基中，诱导 3h，在 RM 培养基中，诱导 1 ~ 2h 比较合适。

表 2 诱导时间对酶表达水平和活力的影响

| LB 培养基 | | | RM 培养基 | |
|----------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| 诱导时间 / h | 酶表达水平 / % | 酶活力 / $u \cdot ml^{-1}$ | 酶表达水平 / % | 酶活力 / $u \cdot ml^{-1}$ |
| 0 | 1.2 | 4.4 | 1.0 | 7.6 |
| 1 | 18.1 | 26.0 | 20.9 | 193.1 |
| 2 | 23.6 | 29.1 | 19.8 | 189.2 |
| 3 | 24.2 | 30.6 | 19.3 | 179.7 |
| 4 | 22.9 | 28.6 | 16.3 | 148.0 |
| 5 | 19.3 | 27.9 | 15.6 | 135.4 |

2.4 培养基 pH 对酶表达水平和活力的影响

菌体在不同起始 pH 的培养基中生长到一定生物量后，立即转到 42℃ 下诱导。实验结果如表 3。在 LB 培养基中，不同 pH 的培养基对酶在菌体中的表达水平和活力影响不显著。这主要是由于 LB 培养基的组份比较简单，且没有缓冲系统。菌体在 LB 培养基的生长过程中，培养基中的 pH 值变化比较大，如在起始 pH8.0 的培养基中，培养 3h 后，培养基中的 pH 值就降为 7.64；而在起始 pH6.0 的培养

表3 培养基的 pH 对酶表达水平和活力的影响

| LB 培养基 | | | RM 培养基 | |
|--------|-----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| pH | 酶表达水平 / % | 酶活力 / $\text{u} \cdot \text{ml}^{-1}$ | 酶表达水平 / % | 酶活力 / $\text{u} \cdot \text{ml}^{-1}$ |
| 6.0 | 22.3 | 48.7 | 20.5 | 123.6 |
| 6.5 | 23.1 | 48.8 | 22.8 | 134.2 |
| 7.0 | 23.0 | 49.0 | 24.4 | 158.6 |
| 7.5 | 24.4 | 49.9 | 28.1 | 214.4 |
| 8.0 | 21.6 | 48.5 | 15.5 | 106.5 |

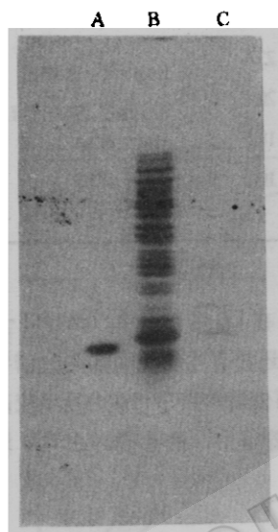


图2 电泳图谱

- A. 蛋清溶菌酶;
B. 全菌体蛋白;
C. 复性后人溶菌酶。

基中, pH 反而上升到 6.63。可见, 经过一定时间的培养, 各个梯度的 pH 逐渐趋向中性化, 因此, 菌体并不完全是在起始的酸碱状态下生长。在 RM 培养基中, 酶在菌体中的表达水平和活力明显受到培养基 pH 的影响。这主要是由于在 RM 培养基中, pH 值是由组成该培养基的成分磷酸氢二钠和磷酸二氢钠作为缓冲系统进行调节, 因此, RM 培养基具有一定的缓冲能力, 在菌体的培养过程中, 培养基的 pH 值相对比较稳定, 这就比较真实地反映了不同 pH 的培养基对菌体生长的影响。实验结果表明, 在两种培养基中, pH 均以 7.5 时为最佳。

2.5 萘啶酮酸对酶表达水平和活力的影响

当菌体转到 42°C 诱导的同时, 加入萘啶酮酸 ($40\mu\text{g}/\text{ml}$), 虽然萘啶酮酸对一些蛋白的表达具有一定的诱导作用^[4], 但是, 从本实验结果(未列出)看到, 萘啶酮酸对人溶菌酶在菌体中的表达水平无显著影响。

2.6 最佳培养条件

通过以上实验, 我们可以得出该工程菌的最佳培养条件为: 菌体在 RM 培养基中生长到 $A_{600}: 0.4 \times 10 \sim 0.45 \times 10$ 时, 立即转到 42°C 下诱导 $1 \sim 2\text{h}$ 即可。并对菌体蛋白和经复性后的粗酶液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(图2)。此时人溶菌酶在菌体中的表达水

平为 $17\% \sim 20.9\%$, 单位发酵液中的总酶活力为 $160 \sim 190\text{u}/\text{ml}$, 酶蛋白量为 $50 \sim 60\text{mg}/\text{L}$ 。

参 考 文 献

- [1] 钱世钧, 于 颖, 田开荣, 等. 生物工程学报, 1994, 10(1): 34 ~ 38.
- [2] 矫庆华, 钱世钧, 叶 军, 等. 生物工程学报, 1997, 13(1): 111 ~ 113.
- [3] Lowry O H, Rousebrough N. J, Farr A. L et al. *J Biol Chem.* 1951, 193: 265 ~ 275.
- [4] Mott J E, Grant R A, Ho Y S et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985, 82: 88 ~ 92.

STUDIES ON THE CULTURE CONDITIONS OF ENGINEERED STRAIN OF HUMAN LYSOZYME

Guo Liangdong Qian Shijun Ye Jun Jiao Qinghua

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract The growth curves of engineered strain JPB-HLY were different in LB and RM media. The expression level and activity of human lysozyme were affected apparently by both biomass and induction time. But nalidix acid could not. The optimum pH of medium for lysozyme production was 7.5. This enzyme activity could reach 190u /ml. The enzyme protein was 60mg /L by employing an enriched growth medium and appropriate conditions.

Key words Engineered strain, Human lysozyme culture condition

JOURNALS.IM.AC.CN