

霍乱毒素 B 亚单位工程菌 MM2 的表达与 lac 启动子的关系*

方宏清 赵四清 于公义 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 研究了不同碳源(葡萄糖、乳酸和乙酸)以及 IPTG 诱导对工程菌 MM2 表达霍乱毒素 B 亚单位(CTB)的影响, *ctb* 基因位于 *lac* 启动子的下游。在 YC 培养基中分别加入 0.048mol/L 的葡萄糖、0.102mol/L 的乳酸和 0.167mol/L 的乙酸, 它们在完全氧化后可产生相同的能量。结果表明, 加入葡萄糖会大幅度降低 *ctb* 基因的表达水平, 其原因和培养过程中 pH 值下降有关; 加入乳酸可提高 *ctb* 基因表达水平 1.15 倍, 且不抑制菌体生长; 加入乙酸可提高 *ctb* 基因的表达水平 0.9 倍, 但对菌体生长有抑制作用。不同时间及不同浓度的 IPTG 诱导未能提高 *ctb* 基因的表达水平, 说明 *lac* 启动子对 *ctb* 基因的表达没有影响或影响很小。

关键词 霍乱毒素, 疫苗, *lac* 启动子, 大肠杆菌

工程菌 MM2 是一株表达霍乱毒素 B 亚单位(CTB)的大肠杆菌, 产物 CTB 能分泌到培养液中。所含重组质粒 pMM-CTB 来源于 pUC19, *ctb* 基因位于 *lac* 启动子的下游^[1]。*Lac* 启动子是一个化学诱导型启动子。无诱导物(如 IPTG、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)存在时, 其下游基因则不能表达。但是工程菌 MM2 的早期培养研究结果指出, 在不用 IPTG 诱导的情况下 CTB 产量可达 80 mg / L 以上^[2]。为了弄清 *ctb* 基因上游 *lac* 启动子对其表达的影响, 本文详细研究了在培养基中加入不同碳源(葡萄糖、乳酸和乙酸)和 IPTG 诱导时工程菌 MM2 表达 CTB 的变化情况。

1 材料和方法

1.1 菌株

工程菌 MM2 由马清钧等构建^[1], 重组质粒为 pMM-CTB, *ctb* 基因位于 *lac* 启动子的下游。菌种保存在 -20℃, 15% 甘油中。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基为 LB 培养基(g / L): 酵母抽提物 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, pH7.0, 121℃, 20min 灭菌后加氨苄青霉素(50mg / L, 下同)

1.2.2 YC 培养基(g / L): 玉米浆(干重)4, 酸水解酪蛋白 5, KH_2PO_4 0.9, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15.6, pH7.0。

1.3 种子液的制备

取甘油菌种 0.1ml 接入含 5ml LB 培养基的试管中, 于 30℃ 培养 16h。然后按 2% 的

*该课题由中国人民解放军总后勤部“八五”攻关项目经费资助。

本文于 1996 年 5 月 28 日收到。

接种量接入装有 50ml LB 培养基的 250ml 的三角瓶中(用八层纱布封口), 置 THZ-82A 型台式恒温振荡器(上海跃进医疗器械一厂产品)上, 30℃, 130r / min 振荡培养 8h, 作为发酵培养种子液。

1.4 摇瓶发酵培养

采用相同型号的 250 ml 三角瓶, 培养基装量为 30 ml, 接种量为 2%, 于 37℃, 180r / min 振荡培养 24h。

1.5 分析方法

菌密度的测定: 培养菌液用生理盐水适当稀释后于波长 600nm 处测吸光度(722 型光栅分光光度计, 北京光学仪器厂产品), 光程 10 mm, 对照为生理盐水, 线性范围为 0.05~0.50。还原糖的测定: 3, 5-二硝基水杨酸比色法^[3]。乳酸的测定: 酶法^[4]。乙酸的测定: 按乙酸试剂盒(Boehringer Mannheim 公司产品)说明进行测定。CTB 抗原量的测定: 琼脂糖免疫单扩散法^[5]。

2 结果

2.1 不同碳源对 MM2 菌生长及表达的影响

我们用正交试验筛选培养基时发现加入葡萄糖会降低 CTB 表达水平。为了对这一现象进行研究, 以 YC 培养基为对照, 加入葡萄糖、乳酸和乙酸, 观察其对 MM2 菌生长及表达的影响。假设这三种碳源都能完全氧化, 那么 1mol 葡萄糖可以产生 38mol ATP, 1mol 乳酸可以产生 18mol ATP, 1mol 乙酸可以产生 11mol ATP。据此, 我们在对照培养基中分别加入终浓度为 0.048mol / L 葡萄糖、0.102 mol / L 乳酸和 0.167mol / L 乙酸, 以保证它们如能完全氧化后可为菌体提供相同的能量。

2.1.1 对 MM2 菌生长的影响: 菌体生长曲线(图 1)表明, 在 YC 培养基中加入 0.048 mol / L 的葡萄糖或 0.102mol / L 的乳酸对 MM2 菌的生长既没有促进作用也没有抑制作用, 而加入 0.167mol / L 的乙酸则明显抑制菌体生长。此外, 在培养后期菌密度变化上, 在加葡萄糖的培养基中菌密度保持平稳, 在其他培养基中菌密度呈下降趋势。

2.1.2 对 CTB 表达的影响: 表 1 的数据说明, 在 YC 培养基中加入 0.102 mol/L 的乳酸可提高 CTB 产量 97%, 提高表达水平 1.15 倍; 加入 0.167mol/L 的乙酸可提高 CTB 产量 21%, 提高比表达水平 0.9 倍; 而加入 0.048mol/L 的葡萄糖则大大降低 CTB 产量, 用免疫单扩散法测不出培养液中 CTB 含量。这一结果似乎表明, CTB 的合成受葡萄糖的分解代谢物阻遏。但是, 培养过程中不同时间(6~12h), 在含葡萄糖的培养基中加入不同浓

表1 葡萄糖、乳酸和乙酸对CTB表达的影响

Table 1 Effects of glucose, lactate and acetate on the expression of CTB

培养基	最高菌密度	CTB	比表达水平	最终pH值
Medium	Maximum cell density (<i>A</i> ₆₀₀)	(mg/L)	Specific expression level (mg.L ⁻¹ . <i>A</i> ₆₀₀ ⁻¹)	pH Value at the end
YC	7.10	26.4	3.72	8.79
YC+Glucose	6.67	<5	<0.75	6.80
YC+Lactate	6.49	52.1	8.02	9.12
YC+Acetate	4.51	31.9	7.07	9.10

度的 cAMP ($1 \sim 15 \text{ mmol/L}$) 并未提高 CTB 产量。

2.1.3 培养过程代谢物的分析: 为了解上述结果, 我们测定了培养过程中还原糖、乳酸和乙酸浓度的变化。图 2 表明, MM2 菌能很好地利用葡萄糖、乳酸, 同时产生大量乙酸; 乙酸的利用度很低, 加乙酸的培养基中乙酸变化较平稳, 只在培养后期略有下降。培养过程中葡萄糖代谢后产生乙酸, 导致培养液的 pH 值降低 (表 1)。推测加入葡萄糖后 CTB 产量降低可能是培养过程中培养液的 pH 值下降所致。

2.1.4 培养过程中调 pH 对 CTB 产量的影响: 为了证明上述推论是否正确, 在摇瓶

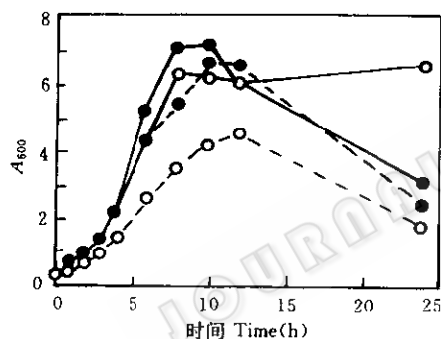


图1 葡萄糖、乳酸和乙酸对 MM2 菌生长的影响

Fig.1 Effects of glucose, lactate and acetate on the growth of MM2 strain

Media: —●— YC; —○— YC+Glucose;
—●— YC+Lactate; —○— YC+Acetate.

培养中用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值。结果表明 (表 2), 升高 pH 值可提高 CTB 产量, 但与加乳酸的培养基相比仍较低。我们在调 pH 值同时加 cAMP, 观察其对 CTB 产量的影响。表 3 说明, 加 cAMP 对 CTB 表达没有促进作用, 即在加葡萄糖的培养基中 CTB 产量低与分解代谢物阻遏无关。

2.2 IPTG 诱导 MM2 菌生长及 CTB 表达的影响

采用 YC 培养基进行培养, 于 3h 和 8h 加入 1 mmol/L IPTG 进行诱导。结果表明 (图略), IPTG 诱导对 MM2 菌生长无影响。不同时间及不同浓度的 IPTG 诱导对 CTB 表达也无影响。

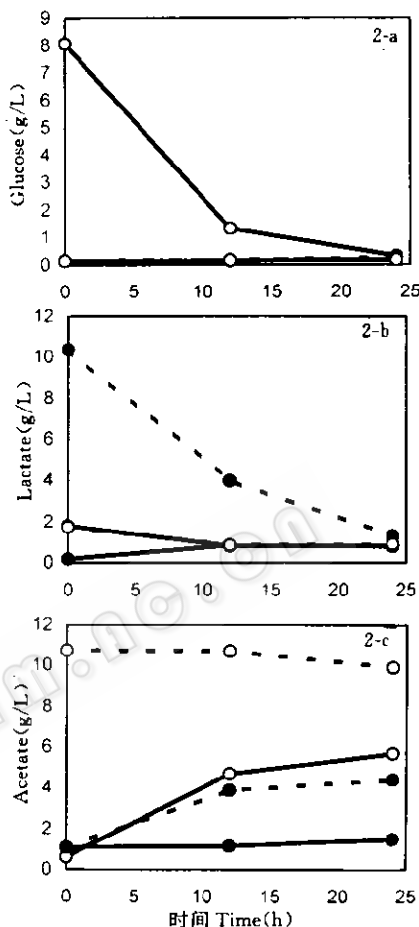


图 2 四种培养基中葡萄糖(a)、乳酸(b)和乙酸(c)的代谢变化

Fig.2 Metabolic curves of glucose (a), lactate(b) and acetate(c) in four media

Media: —●— YC; —○— YC+Glucose;
—●— YC+Lactate; —○— YC+Acetate.

表2 摇瓶培养过程中调pH值对CTB产量的影响

Table 2 Effects of pH on the expression of CTB in shaking flask culture

培养基 Medium	调pH Regulation of pH	最终pH值 pH at the end	CTB (mg/L)
YC	no	8.79	26.4
YC+Lactate	no	9.12	52.1
YC+Glucose	no	6.80	<5.0
YC+Glucose	a*	7.89	15.5
YC+Glucose	b*	8.37	21.4
YC+Glucose	c*	8.87	22.6

*注: a指在培养7h、9h和12h用NaOH调pH至7.5左右; b指在培养7h和9h调pH至7.5左右, 12h调pH至8.0左右; c指在培养7h和9h调pH至7.5左右, 12h调pH至8.5左右。

*a, Regulation pH to 7.5 at 7h, 9h and 12h, b, Regulation pH to 7.5 at 7h and 9h, and to 8.0 at 12h. c, Regulation of pH to 7.5 at 7h and 9h, and to 8.5 at 12h.

表3 调pH值同时加cAMP(1mmol/L)对CTB产量的影响

Table 3 Effects of cAMP on the expression of CTB with regulation of pH

培养基 Medium	调pH Regulation of pH	cAMP	最终pH值 pH at the end	CTB (mg/L)
YC+Glucose	no	-	6.80	<5.0
YC+Glucose	yes	-	8.87	22.6
YC+Glucose	yes	+	8.78	20.2

3 讨论

Lac 启动子是基因工程工业中常用启动子之一, 它具有两大特点: 1. 它是一种化学诱导型启动子, 只有在诱导物如 IPTG

存在时, 其下游基因才会表达。2. 它是一种代谢阻遏型启动子, 受 cAMP-CAP 复合物的正调控。大肠杆菌内 cAMP-CAP 复合物含量主要取决于胞内 cAMP 水平。细胞内碳源的代谢影响 cAMP 水平, 从而影响 lac 启动子的活性^[6, 7]。

在重组质粒 pMM-CTB 中, ctb 基因位于 lac 启动子的下游。一般认为, ctb 基因的表达是受 lac 启动子调控。但我们的实验结果却与 lac 启动子的上述特点相佐。其一, 在不同时间及用不同浓度的 IPTG 诱导对 ctb 基因的表达无影响。其二, 尽管在 YC 培养基中加入葡萄糖后会降低 ctb 基因的表达水平, 但主要原因是加入葡萄糖会降低培养过程中的 pH 值。外加 cAMP 对 CTB 产量没有影响, 这与 Pastan 和 Periman 的实验结果相反。他们的实验结果指出, 外加 cAMP 可解除分解代谢物阻遏^[8]。因此, 可以认为 lac 启动子对 ctb 基因的表达没有影响或影响很小。

葡萄糖和乳酸对 MM2 工程菌中 ctb 基因表达水平的影响不同。在 YC 培养基中加入 0.048 mol/L 葡萄糖会大幅度降低 ctb 基因的表达水平, 加入 0.102 mol/L 的乳酸则会提高 ctb 基因的表达水平 1.15 倍(表 1)。在完全氧化的条件下, 0.048 mol/L 葡萄糖和 0.102 mol/L 乳酸可产生相同的能量。培养过程代谢产物分析结果表明, 工程菌 MM2 能很好利用葡萄糖和乳酸, 并产生大量乙酸(图 2)。葡萄糖代谢产生乙酸后会降低培养基的 pH 值, 乳酸代谢产生乙酸后则对培养基的 pH 值影响不大。可以推测, pH 值的降低是加入葡萄糖后 ctb 基因表达水平大幅度下降的原因。在培养过程中用碱调节 pH 值确实提高了 ctb 基因的表达水平(表 2)。

在摇瓶培养过程中, 工程菌 MM2 不能充分利用乙酸作为碳源, 图 2 显示仅在培养后期

乙酸才开始略被利用。但在 YC 培养基中加入乙酸后可提高 *ctb* 基因表达水平 0.9 倍。其原因可能是加入乙酸后抑制了菌体生长(图 1), 从而使更多的营养成分转向产物合成。我们这一结果与大量文献报道结果相反。如 Jensen 和 Carlsen 的研究结果指出, 乙酸不但抑制菌体生长, 而且抑制基因表达^[9]。这指出乙酸对基因表达的作用在不同的表达系统中是不同的。

致谢 本研究工作得到李逸民教授、朱厚础教授、熊凌霜副研究员以及本室其他同志的关心和帮助。

参 考 文 献

- [1] 马清钧, 刘传喧, 熊凌霜, 等. 中国科学(B 辑), 1990, 7: 726~730.
- [2] 方宏清, 冯尔玲, 赵四清, 等. 军事医学科学院院刊, 1996, 20(1): 49~51.
- [3] Millar G L. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426~428.
- [4] 华南工学院, 无锡轻工业学院, 大连轻工业学院, 等. 制糖工业分析. 北京: 轻工业出版社, 1981. 170~173.
- [5] 刘传喧, 马清钧. 军事医学科学院院刊, 1989, 13(4): 322.
- [6] Botsford J L, Harman J G. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1): 100~122.
- [7] Buettner M J, Spitz E, Rickenberg H V. *J Bacteriol*, 1973, 114(4): 1068~1073.
- [8] Pastan I, Periman R. *Science*, 1970, 169(3): 339~344.
- [9] Jensen E B, Carlsen S. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36(1): 1~11.

RELATION OF Lac PROMOTOR AND THE EXPRESSION OF CHOLERA TOXIN SUBUNIT B GENE IN RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* MM2

Fang Hongqing Zhao Siqing Yu Gongyi Ma Qingjun

(Institute of biotechnology, Academy of military medical sciences, Beijing 100071)

Abstract Effects of different carbon sources including glucose, lactate and acetate and IPTG induction on the expression of *ctb* gene, which is on the downstream of lac promotor, in recombinant *Escherichia coli* MM2 were studied. In medium YC were added 0.048mol/L glucose, 0.102mol/L lactate or 0.167mol/L acetate which separately produce the same energy in the condition of complete oxidization. Addition of glucose largely decreased the expression level of *ctb* gene because of decrease of pH during culture process. Addition of lactate increased the expression level of *ctb* gene by 1.15 fold and did not inhibit the growth of MM2 strain. Addition of acetate increased the expression level of *ctb* gene by 0.97 fold and inhibited the growth of MM2 strain. Induction by IPTG at different time and different concentration did not increase the expression level of *ctb* gene, so the lac promotor had no or a little influence upon the expression of *ctb* gene in recombinant MM2 strain.

Key words Cholera toxin, Vaccine, lac promotor, *Escherichia coli*