

L-天冬酰胺酶工程菌株培养条件及稳定性

王颖达 钱世钧¹ 叶 军 孟广震 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 L-天冬酰胺酶工程菌株的酶活和表达水平受菌体生物量和诱导时间的影响。在生物量 $A_{600} 0.3 \times 10$ 左右,热诱导 4h 酶活力和表达水平可达到较高水平。葡萄糖对酶的生成有阻遏作用,当葡萄糖浓度大于 0.25% 时,对工程菌酶的合成造成阻遏。确定了工程菌培养的培养基、pH 值、接种量等因素。重组质粒 pASN 在 *E. coli* JM105, TG1 和 AS1.357 等宿主菌中具有很好的稳定性,工程菌培养 50 代以上重组质粒保留 90% 以上,在 LB 和 M-3 培养基中也较稳定。

关键词 L-天冬酰胺酶,工程菌,培养条件,质粒稳定性

分类号 Q556⁺.4 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0546-50

L-天冬酰胺酶(E. C. 3. 5. 1. 1)^[1]专一地催化 L-天冬酰胺水解成 L-天冬氨酸和氨。该酶在临床上已用来治疗白血病,特别是对儿童急性淋巴细胞白血病有很好的疗效。为使 L-天冬酰胺酶达到工业化生产,我们通过 PCR 方法将本实验室筛选的产 L-天冬酰胺酶的菌株 *E. coli* AS1.357^[2] 的 L-天冬酰胺酶基因连接到带有 pRpL 启动子的高效表达载体中,成功地构建了含 L-天冬酰胺酶基因的重组质粒 pASN 和工程菌株。为提高该工程菌的表达水平,我们对影响该工程菌表达 L-天冬酰胺酶的培养条件进行了研究,并对重组质粒在不同宿主菌和不同培养基中的稳定性进行了比较。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌种

含 L-天冬酰胺酶基因的重组质粒 pASN,工程菌株 JM105(pASN), TG1(pASN), DH5 α (pASN), AS1.357(pASN)由本实验室构建。

1.2 培养基

LB 培养基(1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1% NaCl), M-1、M-2、M-3 由本实验室配制。

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, Cole-Palmer),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 联系作者

北京大学张玉军同学参加部分工作

收稿日期:1998-07-04,修回日期:1998-11-10

1.4 菌体制备

从平皿上挑一单菌落接入 2mL LB 培养基(Amp100 μ g/mL),30 $^{\circ}$ C 摇荡过夜 ,将菌液转到 50mL LB 培养基中 ,30 $^{\circ}$ C 摇荡培养 ,当菌体生长到一定生物量时 ,立即转到 42 $^{\circ}$ C 诱导 3h ,离心收集菌体(4 $^{\circ}$ C ,5min ,8 000r/min) ,并将菌体悬浮于硼酸缓冲液中(0.1mol/L pH8.4)。

1.5 酶活力测定

根据文献 [3] 所介绍的方法进行。

1.6 酶蛋白表达水平

将菌体蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(15%) ,用考马斯亮蓝染色 ,常规脱色 ,用薄层层析扫描仪扫描 ,即可得到酶蛋白占全部可溶性菌体蛋白的百分率。

2 结果

2.1 工程菌的生长曲线

JM105(pASN)在 LB 和 M-3 培养基中在 30 $^{\circ}$ C 培养中的生长曲线见图 1。LB 和 M-3 培养基都较适合该工程菌的生长 ,LB 培养基中其最大 A_{600} 值约为 0.5×10 ,M-3 培养基中最大值 A_{600} 约为 0.7×10 。每升 LB 发酵液可得湿菌体 7~8g 左右。根据菌体的生长曲线 ,选择最大 A_{600} 值进行诱导 ,以获得更多的 L-天冬酰胺酶。

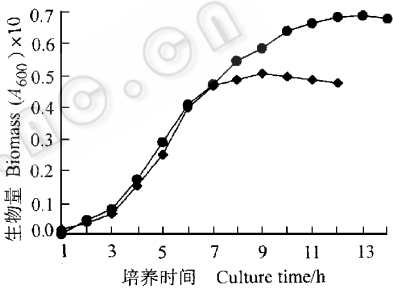


图1 JM105(pASN)在 LB 和 M-3 培养基的生长曲线

2.2 诱导前菌体生物量对酶表达水平和活力的影响

将菌体于 LB 培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养不同时期(不同 A_{600} 值) ,转到 42 $^{\circ}$ C 诱导 3h ,收集菌体 ,测其酶的表达水平 1 和活力。结果见表 1。刚进入对数期时 , A_{600} 值为 0.3×10 时 ,其生长速度比较快 ,这时菌体进入诱导状态 ,酶蛋白的积累加快 ,酶活和

表 1 菌体生物量对酶表达水平和活力的影响

Table 1 Effect of biomass on the enzyme activity and expression level of L-asparaginase

生物量 Biomass $A_{600} \times 10$	酶活力 Enzyme activity (IU/mL)	酶表达水平 Expression level / %
0.015	6.0	15.0
0.049	19.1	31.1
0.160	72.5	41.5
0.225	102.6	49.8
0.295	165.0	57.7
0.360	105.5	53.4
0.410	62.4	44.5
0.450	30.2	22.5

表 2 诱导时间对酶表达水平和活力的影响

Table 2 Effect of induction time on the enzyme activity and expression level of L-asparaginase

诱导时间 Induction time /h	酶活力 Enzyme activity (IU/mL)	酶表达水平 Expression level / %
0	0.02	
1	52.3	37
2	118.8	57
3	120.6	67
4	165.0	68
5	139.9	64

表达水平都达到较高水平。而菌体进入对数后期,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。在此状态下诱导,酶蛋白的合成显然受到影响。

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℃ 诱导不同时间,结果见表 2。诱导 2~4h 均可使酶的表达和活力处于较高水平。诱导 5h,酶的表达水平和活力开始下降。

2.4 不同培养基对酶活力的影响

菌体在不同培养基中 30℃ 培养 5h,转到 42℃ 诱导 3h,测定活力。在 M-1、M-2 培养基上培养可达到 LB 培养基中的酶活力,M-3 培养基中的酶活力高于 LB 的培养结果,活力为 186IU/mL。LB 培养基是一般工程菌常用的培养基,但在实际工业生产中,成本较昂贵,而 M-1、M-2 和 M-3 比较便宜易得,适合大规模工业生产。

2.5 葡萄糖对工程菌产酶的影响

菌体在含不同浓度葡萄糖的 LB 培养基中,30℃ 培养 5h,42℃ 诱导 3h,结果显示,当葡萄糖浓度大于 0.25% 时,对工程菌酶的合成造成阻遏,当葡萄糖浓度达 1% 时,活力只剩 4%,而且培养基最终 pH 由一般的 pH8.5 下降到 pH6.0。

2.6 工程菌的其他培养条件

对工程菌培养的培养基 pH 值和接种量等条件进行了研究。确定了培养基起始 pH 值为 6.5~9.0,接种量在 0.5%~4% 时,工程菌的酶活力都可达到较高水平。

2.7 重组质粒 pASN 的稳定性^[4,5]

表 3 pASN 在不同宿主菌中的稳定性

Table 3 Stability of pASN in the different host strains

宿主菌 Host strain	抗性菌落百分数 Percentage of cells resistant to ampicillin					
	诱导时间 Induction time/h					
	0	1	2	3	4	5
JM105(pASN)	100	100	99	99	98	98
TG1(pASN)	96	94	85	96	93	85
DH5α(pASN)	87	80	66	76	28	11

2.7.1 pASN 在不同宿主菌中的稳定性:从平皿中挑一单菌落接入 2mL (Amp 100μg/mL) LB 培养基中,30℃ 过夜培养,将种子液 20μL 接入不含 Amp 的新鲜 LB 培养基中,30℃ 培养 12h,如此再转接 3 次,即使菌株在热诱导前均已在无 Amp 的 LB 培养基中连续生长 48h。由此所有工程菌均在热诱导前在无 Amp 的 LB 培养基中连续生长 50 代以上。最后细菌生长到 A₆₀₀ 适合值时转入 42℃ 热诱导,诱导前后分别取样,涂于不含 Amp 的 LB 平板上,再分别从每个平板中取 100 个菌落点种于含 Amp 的 LB 抗性平板上,计算每份样品的菌落对 Amp 的抗性百分数。结果见表 3。

pASN 在 JM105、AS1.357 和 TG1 中的稳定性较好,但在 DH5α 中诱导 5h 后,抗性菌落只占 11%。经过抗性菌落进行酶活测定,结果全部为阳性,即带抗性的菌落均表达 L-天冬酰胺酶活性。表明 pASN 在 DH5α 中的不稳定性可能属于质粒的分离不稳定性。

2.7.2 pASN 在不同培养基中的稳定性:方法基本参照 2.7.1 节进行,将含 pASN 的 AS1.357 在 LB 和 M-3 培养基中连续培养 72h,42℃ 热诱导 5h 后,测定抗性菌落百分数(表 4)。pASN 在 M-3 和 LB 培养基中都是比较稳定的。

表 4 pASN 在不同培养基中的稳定性
Table 4 Stability of pASN in the different media

培养基 Media	抗性菌落百分数 Percentage of cells resistant to ampicillin/%											
	30℃ 培养时间 Incubation time/h						诱导时间 Induction time/h					
	12	24	36	48	60	72	0	1	2	3	4	5
LB	100	100	99	98	98	100	99	99	98	98	98	98
M-3	93	99	96	98	97	98	91	96	95	94	92	92

3 讨论

JM105 (pASN) 在合适的生物量和热诱导时间下 ,其 L-天门冬酰胺酶酶活力可达 165IU/mL ,比原始菌株 *E. coli* AS1.357 (4.6IU/mL) 提高近 40 倍。但生物量差别不大 ,说明是由于重组质粒 pASN 的高效表达和在合适发酵条件下质粒的高拷贝数 ,使单位体积发酵液中 L-天门冬酰胺酶活力显著增加。

在对原始菌株 *E. coli* AS1.357 的研究中已经观察到葡萄糖对酶合成的抑制现象。其原因可能与一般微生物中葡萄糖的阻遏效应有关 ,在细菌发酵过程中葡萄糖浓度过高 ,使发酵后期乙酸积累 ,抑制菌体生长 ,可通过剔除大肠杆菌染色体上的 *ackA*、*pta1* 基因 ,同时引入 *Zymomonas mobilis* 的 *pdcl*、*adh1* 基因来解决乙酸的大量累积。

由于在分子克隆中 ,使用的大多数载体都带有抗生素选择标记 ,而在工业生产中一般不希望使用抗生素 ,因此重组的工程菌株在无选择压力下的质粒稳定性至关重要 ,微生物培养过程中的质粒不稳定性 ,降低了发酵过程中目的产物的整体水平 ,也增加了生产成本 ,所以认为质粒的不稳定性是其工业应用的主要难题之一。对于质粒的不稳定性 ,有大量的解释 ,大都着眼于所应用的特定质粒-宿主重组体 ,认为宿主细胞的遗传背景对重组质粒外源基因的表达有重要作用。在基因产物聚合体对宿主细胞有害时 ,间接影响质粒的稳定性^[6]。以上质粒 pASN 稳定性也显示 ,pASN 在 AS1.357 宿主细胞中 ,在不同的培养基中稳定较好 ,我们认为可能与 AS 1.357 本身就是产 L-天门冬酰胺酶的菌株有关 ,L-天门冬酰胺酶在宿主细胞中的高效表达 ,对宿主细胞正常代谢所造成的负担可能要小于对其他的宿主如 DH5 α 等。我们构建的带 L-天门冬酰胺酶基因的重组质粒 pASN 在无选择压力下 30℃ 连续培养 50 代以上 ,质粒保持稳定 ,培养代数大大超出了实际生产所需的培养时间 ,为进一步大规模工业化生产打下了良好基础。

参 考 文 献

[1] 孟广震.L-天门冬酰胺酶.见:张树政主编.酶制剂工业(下册).北京:科学出版社,1984.709~720.
[2] 邱秀宝,郝凤兮,钱世钧等.微生物学报,1973,13(1):59~62.
[3] Peterson R E, Ciegler A. *Appl Microbiol*,1967,17(6):929~930.
[4] 陈 炜,何秉旺,张建华等.微生物学报,1997,37(4):270~275.
[5] Vyas V, Gupta S, Sharma P. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 240~245
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

[6] Burt D E. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* ,1986 **A** 263~277.

CULTURE CONDITIONS OF ENGINEERED STRAIN OF L-ASPARAGINASE
AND THE RECOMBINANT PLASMID STABILITY

Wang Yingda Qian Shijun Ye Jun

Meng Guangzhen Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080*)

Abstract The growth curves of engineered strain JM105(pASN) were different in LB and M-3 media. The expression level and activity of L-asparaginase were affected apparently by both biomass and induction time. Glucose repression of production of L-asparaginase was found. The stability of the recombinant plasmid pASN in different host strains and in LB and M-3 media was determined. After cultivation inLB broth and M-3 media at 30℃ for more than 50 generations without antibiotic selection , then induced at 42℃ for up to 5h , the engineered strains were proved to be stable ,except for DH5α(pASN).

Key words L-asparaginase , Engineered strain , Culture conditions , Plasmid stability

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

- 顾 问 张树政
- 主 编 李季伦
- 副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全 谭华荣
- 编 委 王修垣 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴
- 孙志浩 李焕娄 陈世平 陈永青 杨苏声
- 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民 钱世钧
- 诸葛健 徐怀恕 翟中和 谭华荣
- 编 辑 戈苏国 刘玉方