

霍乱毒素 B 亚单位工程菌 MM2 在含乳酸培养基中的高表达

方宏清 邓兵兵 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 确定了工程菌 MM2 中霍乱毒素 B 亚单位(CTB)在含乳酸培养基中的高表达方案。采用两阶段控制培养温度(30℃→37℃)可提高 CTB 产量 4 倍,提高后期 pH 值(7.2→8.4)可提高 CTB 比表达水平 2.14 倍,中间补加乙酸钠可提高 CTB 产量 65%。在 5 L 发酵罐培养菌密度 OD_{600} 达 30,CTB 产量达 186.7 mg/L,产物在培养液中以多聚体形式存在,具有抗原性。

关键词 大肠杆菌,霍乱毒素 B 亚单位,温度,乳酸,pH 值

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0161-04

在世界上许多地方,尤其在亚洲和非洲等地霍乱仍然是一种重要的致病和死亡因素。霍乱毒素 B 亚单位(CTB)是口服霍乱疫苗的重要抗原之一。我们构建了分泌表达 CTB 的工程大肠菌 MM2^[1]。前文^[2,3]研究结果指出,它的表达受工程菌培养温度、pH 值以及碳源组成的影响。在培养基中加入乳酸可提高 CTB 产量。我们用正交法获得了含乳酸的高产培养基。本文在此基础上通过采用两阶段控制培养温度、提高后期 pH 值和补加乙酸钠等措施,使 CTB 产量达 186.7 mg/L,为霍乱疫苗的大量生产打下了基础。

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 试剂和器材

蛋白胨、酵母抽提物系英国 Oxoid 公司产品,CTB 标准品、酸水解酪蛋白为 Sigma 公司产品,乙酸测定试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品,兔抗霍乱毒素血清为本所自制,其余试剂均为市售国内产品。THZ-82A 型恒温振荡器是上海跃进医疗器械厂产品,Biostat B 型 5L 发酵罐是德国 B. Braun Biotech International 公司产品,722 型光栅分光光度计是北京光学仪器厂产品。

1.3 培养基

种子培养基为 LB 培养基(g/L):酵母提取物 5,蛋白胨 10,NaCl 5,pH7.0,灭菌后加氨苄青霉素(50 ml/L,下同)。发酵培养基(g/L):乳酸 10,酵母抽提物 15,酸水解酪蛋白 20, KH_2PO_4 0.9, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 15.6,pH7.2。

1.4 发酵

1.4.1 种子培养液:取甘油菌种 0.1 mL 接入含 5 mL LB 培养基的试管中,于 30℃ 培养 16 h。然后按 2% (V/V) 接种量接入装有 60 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中(8 层纱布封口)置恒温振荡器上,30℃、130 r/min 培养 8 h,作为发酵培养种子液。

1.4.2 发酵罐培养:培养基装量 3 L,接种量 2% (V/V),搅拌转速 500~1000 r/min,温度 30~37℃,通气量 3~5 L/min,溶氧不低于 30%。

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 600 nm 处测光密度,光程 10 nm,对照为生理盐水,线性范围为 0.05~0.5。乳酸的测定:酶比色法^[4],波长 340 nm,线性范围 0.1~0.5 g/L。乙酸的测定:用乙酸试剂盒测定,测量范围 0.01~0.3 g/L。CTB 抗原量的测定:琼脂糖免疫单扩散法^[5]。菌体沉淀按文献[6]方法裂解后方可用来测定胞内 CTB 含量。培养上清液的 SDS-PAGE 和 Western 印迹:按文献[7]方法进行,浓缩胶 5%,分离 15% 胶,非还原型样品的上样缓冲液中不含 DTT,也不煮沸处理。

2 结 果

2.1 温度对 MM2 菌生长及 CTB 表达的影响

首先通过摇瓶实验(LB 培养基)比较了 30℃ 和 37℃ 对工程菌 MM2 及其受体菌 TK1046 生长的影响。图 1 说明,37℃ 培养时,MM2 菌的最高菌密度较 TK1046 菌低,且 10 h 就呈明显的下降趋势。而 30℃ 培养时,MM2 菌和 TK1046 菌的生长曲线没有明显差别,即 30℃ 培养时质粒 pMM-CTB 的存在不影响 MM2 菌的生长。因此,选择 30℃ 作为 MM2 菌种子液培养温度。

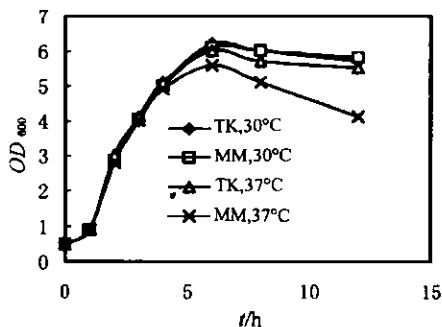


图 1 温度对 TK1046 菌和 MM2 菌生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the growth of TK1046 and MM2 strains

经免疫单扩散法检测,MM2 菌 37℃ 培养液中 CTB 含量达 6.2 mg/L,而 30℃ 培养液中测不到 CTB。所以,温度影响质粒 pMM-CTB 上 *ctb* 基因的表达,选择 37℃ 为 CTB 表达温度。

2.2 升温时间对 CTB 产量的影响

MM2 工程菌生产 CTB 能力与培养温度密切相关,先于 30℃ 培养然后升温至 37℃ 有利于 CTB 的产生。因此,在通过正交实验获得含乳酸的高产培养基后,我们采用先在 30℃ 培养不同时间,然后升温到 37℃ 继续培养到 24 h 分别测定 CTB 表达量。结果表明,30℃ 培养 11 h 后开始升温可获得最高产量,是培养 6 h 后开始升温的 5 倍(表 1)。

表 1 升温时间对 CTB 产量的影响

Table 1 Effect of the temperature-upshifting time on the production of CTB

Culture time at 30 °C /h	Cell density at temperature-upshifting/ <i>OD</i> ₆₀₀	Maximum cell density/ <i>OD</i> ₆₀₀	CTB/ <i>mg</i> · <i>L</i> ⁻¹
6	5.7	20.9	20.8
9	25.4	29.1	95.7
11	26.1	30.2	107.3
13	28.3	31.5	82.3

2.3 pH 值对 CTB 表达的影响

实验中,我们发现 CTB 合成与 pH 值密切相关。先 30℃ 培养 11 h,然后升温至 37℃ 继续培养。升温后 pH 值分别控制在 7.2、7.6、8.0、8.4。结果(图 2)显示,不论培养液上清中还是总 CTB 含量均随 pH 值上升而增加。当 pH 值由 7.2 升至 8.4 时,胞外 CTB 产量增加了 3.28 倍(由 19.7 mg/L 增至 84.3 mg/L),总 CTB 产量增加了 1.65 倍(由 39.9 mg/L 增至 105.6 mg/L),比表达水平增加了 2.14 倍(由 1.09 mg/L/*OD*₆₀₀ 增至 3.42 mg/L/*OD*₆₀₀)。但是继续升高 pH 值对菌体生长不利(结果略),从而影响 CTB 最终产量。因此选择 8.4 pH 作为升温后的 pH 值。

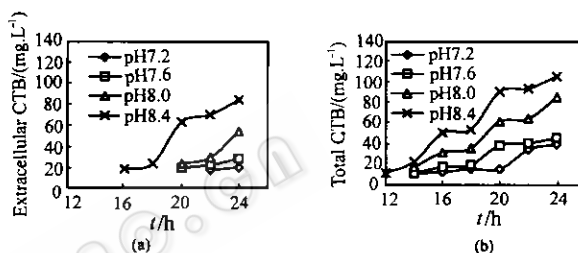


图 2 pH 值对 CTB 产量的影响

Fig. 2 Effect of pH values on the production of CTB.

(a) Extracellular; (b) Total

2.4 发酵培养后期加乙酸钠对 CTB 产量的影响

工程菌培养过程中有机酸的积累对菌体生长及产物合成有一定的影响。MM2 工程菌培养过程的乳酸和乙酸代谢变化分析结果(图 3)说明,培养前期 0~12 h 是乳酸消耗阶段,同时产生乙酸。培养 10~12 h 后乙酸开始消耗。培养后期也是 CTB 合成期,因此在培养后期加乙酸可能会提高 CTB 产量。在培养到 11~12 h 时加入乙酸钠,结果说明加入乙酸钠可提高 65% CTB 产量(表 2),但对菌密度没有影响。

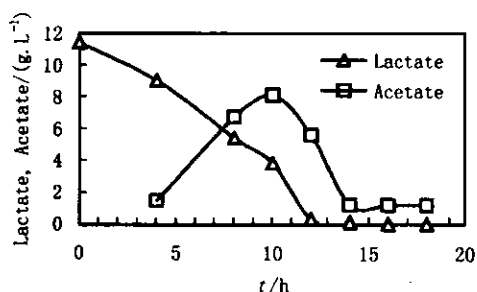


图 3 MM2 菌培养过程乳酸和乙酸代谢曲线

Fig. 3 Metabolic curves of lactate and acetate during the growth of the MM2 strain

表 2 加乙酸钠对 CTB 产量的影响

Table 2 Effects of adding sodium acetate on the production of CTB

Batch No.	Adding acetate	Maximum cell density/ OD_{600}	Average/ OD_{600}	CTB/(mg. L ⁻¹)	Average/(mg. L ⁻¹)
I	-	31.25		111.9	
II	-	31.75		111.6	
III	-	27.16	30.05 ± 2.51	115.2	112.9 ± 2.0
IV	+	28.95		181.0	
V	+	32.00		172.5	
VI	+	29.85	30.27 ± 1.57	206.7	186.7 ± 17.8

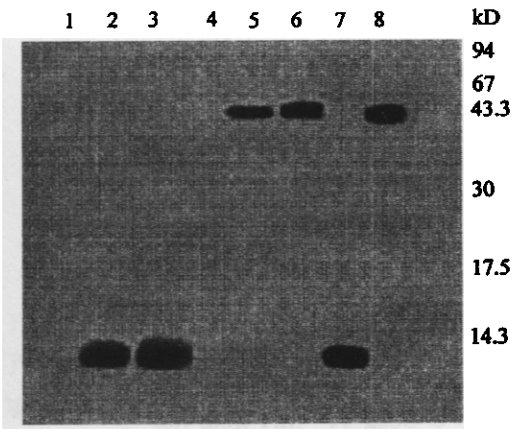


图 4 培养上清液的 Western 印迹结果

Fig. 4 Western blotting of the culture supernatants

1,2,3:Reduced samples respectively at 12h,16h and 24h.
4,5,6:Non-reduced samples respectively at 12h,16h and 24h.
7,8:Respectively reduced and non-reduced samples of CTB purchased from Sigma.

工程菌 MM2 发酵培养上清液的 Western 免疫印迹分析(图 4)表明重组 CTB 和天然霍乱毒素 B 亚单位的分子量相同,在培养液中以多聚体形式存在,保持天然构型。

3 讨论

工程菌 MM2 能很好地分泌表达 CTB,前文中我们研究了 *ctb* 基因的表达与培养温度、pH 和碳源的关系^[2,3]。

温度对基因表达的影响机制相当复杂,可发生在转录水平、翻译水平、mRNA 及蛋白质的稳定性水平上。大肠杆菌的 OmpR 和霍乱弧菌的 ToxR 分别是外膜蛋白 OmpF 和霍乱毒素的反式转录激活因子。OmpR 由于和 ToxR 的 DNA 结合区氨基酸序列高度同源^[8,9],推测温度对 CTB 表达的影响可以与此有关。另外全菌蛋白电泳图谱表明,在 37℃

培养时除目的蛋白外至少还有一个蛋白基因的表达得到加强,这对工程菌的稳定性是不利的(结果略)。因此采取先于 30℃ 培养,达到一定菌密度后再升温至 37℃ 继续培养,以提高 CTB 的产量。由表 1 可看到选择适当的升温时间对提高 CTB 产量是很重要的。

大肠杆菌内许多基因的表达受外界 pH 值的影响。例如,在酸性 pH 值时,OmpF 和 LamB 的表达下降,OmpC 的表达上升;在碱性 pH 值时,OmpF 和 LamB 的表达上升,OmpC 的表达下降^[10]。Heyde 等^[11]用核酸杂交技术和链延伸技术证明,pH 是在转录及转录后水平上影响 OmpF 和 LamB 的表达。在工程菌 MM2 中 CTB 的表达也与 pH 值有关。前文^[3]证明在含葡萄糖的培养基中 CTB 产量下降与培养过程中 pH 下降有关,培养后期加碱提高 pH 值可增加 CTB 产量。本文实验结果进一步证实可知,CTB 产量及比表达水平均随 pH 值升高而增加(图 2)。但高 pH 值促进 CTB 表达的确切机理还不清楚。过高的 pH 不利于菌体生长,可能会导致菌体破裂,释放胞内蛋白酶,降解产物,因此 pH 值的控制也采用两段式,前一段控制 pH 值在 7.2,有利于菌体生长,后一段控制 pH 值在 8.4,有利于 CTB 表达。

通常发酵过程中常见副产物乙酸的累积不利于菌体生长,也不利于目的蛋白的表达^[12]。但是前文^[3]研究结果指出,在培养基中加乙酸可促进 CTB 合成。本文结果也表明(表 2),加入乙酸没有影响菌体生长,反而使 CTB 的表达水平提高了 65%,这说明乙酸对基因表达的作用在不同的表达系统中是不同的,这可能与受体菌有关。

本文研究结果采用两阶段控制培养温度(30℃ → 37℃)、提高后期 pH 值(7.2 → 8.4 pH)和补加乙酸钠等措施,使 CTB 产量达 186.7 mg/L,为大规模生产 CTB 打下了基础。

参 考 文 献

- [1] 马清钧,刘传喧,熊凌霄等. 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] 方宏清,赵四清,于公义等. 微生物学报,1997,37(4):265~269
- [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] Finley B B, Pasloske B L, Paranchych W. *J Bacteriol*, 1986, 165(2):625~630
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社,1992
- [8] Wurtzel E T, Chou M Y, Inouye M. *J Biol Chem*, 1982, 257(22):13685~13691
- [9] Miller V L, Taylor R K, Mekalanos J J. *Cell*, 1987, 48(2):271~279
- [10] Heyde M, Portelier R. *Mol Gen Genet*, 1987, 208:511~517
- [11] Heyde M, Coll J L, Portelier R. *Mol Gen Genet*, 1991, 229:197~205
- [12] Jensen E B, Curlsen S. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36(1):1~11

Overproduction of Cholera Toxin B Subunit by Recombinant *Escherichia coli* MM2 in Lactate-containing Medium

FANG Hong-Qing DENG Bing-Bing ZHAO Si-Qing YU Gong-Yi MA Qing-Jun
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract The expression of *ctb* gene in recombinant *E. coli* MM2 strain is affected by temperature, pH and carbon source. High level production of cholera toxin B subunit (CTB) was investigated in lactate-containing medium which designed by experiments of orthogonal test. Upshifting temperature from 30°C to 37°C could increase the production of CTB by 4 fold, upshifting pH value from 7.2 to 8.4 at the later culture stage could increase the specific expression level of CTB by 2.14 fold, and adding sodium acetate increased the production of CTB by 65%. In 5L fermentor the cell density was reached at OD_{600} 30, and the 186.7 mg/L of CTB was obtained. The CTB in the culture supernatants was in the form of polymer like the native CTB from Sigma, and also possessed the same antigenity.

Key words *E. coli*, cholera toxin B subunit, temperature, lactate, pH value