

文章编号:1009-038X(2001)05-0489-04

重组大肠杆菌生产人表皮生长因子的发酵条件

阮文权, 李玉忠, 杨邱明, 王懂明, 陈坚

(江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 通过质粒转化实验, 获得了较好的产 hEGF 重组菌, 对重组菌发酵条件进行优化, 获得最佳初始糖质量浓度为 5 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母抽提物 10 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.5 g/L、Amp 100 mg/L; 最佳接种时间为种子液生长到 5~6 h, 即菌体 OD 值在 1.0~2.0; 诱导剂最佳添加时间为 8 h, 即菌体 OD 值在 8.0 左右. 通过流加发酵进行高密度培养, 可使重组菌的 hEGF 的产率达 102 mg/L, 比优化前提高了近 30%.

关键词: 人表皮生长因子; 大肠杆菌; 发酵

中图分类号: Q 546

文献标识码: A

Fermentation Conditions of Re-combination *E. coli* for the Production of hEGF

RUAN Wen-quan, LI Yu-zhong, YANG Qiu-ming, WANG Dong-ming, CHEN Jian

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Plasmid was transferred into *E. coli* JM101. The fermentation condition of recombination strain was studied. The optimized mediums were glucose 5 g/L, peptone 20 g/L, yeast extract 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.5 g/L and Amp 100 mg/L. The best incubating time was between 5~6 hour, and the cell concentration was 1.0~2.0 of the OD. The induced time was 8 hours after the fermentation, the OD was about 8.0. By fed-batch fermentation, the production of hEGF had dramatically increased, reached 102 mg/L, 30% higher than before.

Key words: hEGF; *E. coli*; fermentation

人表皮生长因子(hEGF)是一带有 53 个氨基酸残基的活性片段(相对分子质量为 6201), 对热和蛋白酶分解作用较为稳定^[1]. hEGF 具有较广的应用前景, 在医药上, 能刺激皮肤组织生长繁殖、加速角膜创伤的修复、增强表皮细胞的蛋白质和 RNA 的合成以及促进细胞代谢等; 在化妆品工业中, 能够减少光和细胞氧化给皮肤带来的损害, 防止或减少皮肤皱纹, 起到一定的美容作用. 因此, hEGF 系

列产品的开发, 具有广阔的应用前景^[1,2].

作者通过质粒转化实验获得高产率的重组细菌, 对该细菌进行高密度培养, 优化培养、发酵条件, 使所需产品在细菌中得以高效表达, 并有效地分泌至胞外. 由于 hEGF 为胞外产物, 分离时无需破碎细胞, 可直接从发酵液上清液中纯化 hEGF, 避免细胞破碎时众多细胞蛋白的干扰, 从而减少分离纯化难度, 提高产品提取收率.

收稿日期: 2001-04-03; 修订日期: 2001-09-14.

作者简介: 阮文权(1966-), 男, 上海人, 工学硕士, 讲师.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与质粒 质粒(UV5par8egf),菌种(*E. coli*, JM101),通过质粒转化得重组菌,编号为*E. coli* HJ101.

1.1.2 培养基

种子培养基(2×YT培养基)组成:蛋白胨 16 g/L,酵母粉 10 g/L,NaCl 10 g/L,另外加入 100 mg/L的经微孔滤膜(0.25 μm)过滤的AMP(安苄青霉素),固体培养基加2%琼脂.

发酵培养基(MBL培养基)组成:葡萄糖5 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母粉 10 g/L,K₂HPO₄ 3.5 g/L,K₂HPO₄ 5 g/L,(NH₄)₂HPO₄ 3.5 g/L,NaCl 5 g/L,MgSO₄·7H₂O 1 g/L,微量元素混合液 3 mL/L,AMP 100 μg/mL(经微孔滤膜除菌).微量元素组成:FeCl₃·6H₂O 0.162 g/L,ZnCl₂·4H₂O 0.0144 g/L,CoCl₂·6H₂O 0.12 g/L,Na₂MoO₄·2H₂O 0.012 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.006 g/L,CuSO₄·5H₂O 1.9 g/L,H₃BO₃ 0.5 g/L;HCl(37%)37 mL/L.

1.2 实验方法

1.2.1 种子及扩大培养 出发菌种为已完成质粒转化的斜面菌种,将菌种稀释涂布平板,得到单菌落(时间视生长情况而定,一般为24 h以上),挑取1~2个生长较好的菌落移接斜面,培养24 h,移接种子液(250 mL三角瓶中加入30 mL),摇瓶培养6 h(30℃,200 r/min),移接发酵液.

1.2.2 发酵过程控制 采用流加发酵,过程中溶氧控制在20%以上,发酵温度为32℃,MBL培养基中AMP添加量为100 μg/mL;在微生物对数生长期中后期加入浓度为0.2 mmol IPTG进行诱导,诱导后约16 h结束发酵;在诱导前控制pH值为6.8左右,诱导后pH值自然.

1.3 分析方法

1.3.1 hEGF的检测 采用HPLC测定产物含量.蛋白分析柱(StableBond WidePore Reversed-Phase C₈ Column)柱长250 mm,柱径4.6 mm,粒子尺寸5 mm.流动相采用A液10%乙腈+90%磷酸缓冲液(pH 7.4),B液70%乙腈+30%磷酸缓冲液(pH 7.4);检测波长280 nm;柱温25℃.

1.3.2 菌浓 光密度法测定.

1.3.3 还原糖 DNS法测定.

1.3.4 质粒稳定性检测 质粒稳定性通过一式两份的转化子培养物的稀释分离而获得,分别于选择

性(100 μg/mL Amp)和非选择性的2×YT琼脂平板上进行.琼脂平板接种后在30℃条件下培养20 h.将接种培养后个板样的菌落计数(将原培养物适当稀释).质粒稳定性通过计算含Amp的2×YT琼脂平板培养基上的菌落平均数与无Amp的2×YT琼脂平板培养基上的菌落平均数之比而获得^[2].

1.4 质粒转化实验

从培养16~20 h的新鲜平板挑取1~4个菌落于盛有50 mL LB液体培养基的250 mL三角瓶中,37℃振荡培养3~4 h(OD值为0.2~0.3);于冰浴10 min,离心5 min(5 000 r/min),收集菌体;把菌体悬浮于25 mL,100 mmol pH为6.0的CaCl₂溶液中,冰浴5 min,5 000 r/min离心5 min,搜集菌体;再把菌体悬浮于0.5 mL,100 mmol CaCl₂溶液中,分装于Eppendorf管中,每管0.1 mL,置于冰浴,即为感受态细胞.(冰浴12~24 h最佳);在每个Eppendorf管中加入1 μL已提取的质粒;冰浴30~60 min,轻摇2次;在42℃下,静置2 min,冰浴2 min;加1 mL LB培养基,37℃培养60 min;在LB+AMP+平板上涂布100 μL,在32℃培养12~16 h.

2 结果与讨论

2.1 Amp对生产hEGF的影响

工程菌*E. coli*HJ101所携带的质粒UV5par8egf能够表达β-内酰胺酶,并降解培养基中的筛选因子Amp,在初始培养基中加入Amp,能抑制不带质粒的P⁻菌,从而保持只有P⁺菌的生长繁殖,提高质粒稳定性.在不同初始Amp浓度下测定hEGF积累的情况,结果如图1所示.

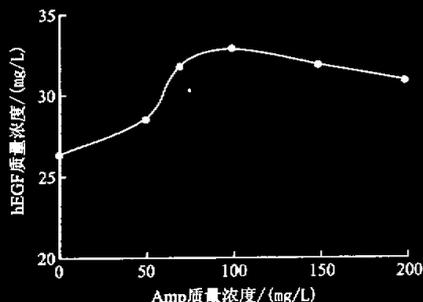


图1 Amp质量浓度对hEGF发酵的影响

Fig.1 The effect of Amp concentration on the production of hEGF

由图1可得,Amp的加入会有助于hEGF在培养基的积累,当Amp增加到100 mg/L时,hEGF浓度提高了24.95%,进一步增加Amp添加量,hEGF

表达没有进一步提高。当 Amp 加入培养基中,质粒所表达的内酰胺酶在 1 h 甚至 0.5 h 内就可将其降解,因此增加 Amp 添加量不能完全抑制 P 菌生长。从表中可见,加入 100 mg/L 的 Amp,已经起到了最佳效果。值得指出的是,尽管 Amp 可能被快速降解,但在被完全降解前抑制了不含有效质粒菌(P⁻)生长,使得含有效质粒菌(P⁺)具有生长优势,从而有利于产物的高效表达。因此,在初始培养基中加入一定量的抗生素(Amp 100 mg/L),有利于工程菌的发酵。

2.2 发酵条件的优化

本实验所使用的重组菌,含有外源质粒,在其发酵过程中,往往存在质粒的不稳定性和表达产物的不稳定性,质粒稳定性研究成了重组菌发酵研究的中心问题。基因工程菌质粒不稳定的原因包括分配不稳定和结构不稳定两个方面。前者源于质粒在子代细胞中分配的随机性,如果质粒的复制速度低于细胞的分裂速度,细胞中质粒的拷贝数将逐渐减少,细胞在下次分裂中就可能产生一个丢失了质粒的原养型菌(P⁻);后者是由于质粒中的基因结构发生突变所引起。这两种菌都失去表达目标产物的能力。影响质粒稳定性的因素很多,主要归纳为 2 方面^[1,2]: 1) 质粒自身因素。如通过减弱启动子可以增加质粒的稳定性; 2) 宿主因素。不仅大肠杆菌,枯草杆菌和酵母菌之间有所不同,大肠杆菌不同菌株之间亦存在较大差异。因此,使工程菌在优化的发酵条件下生长,可以提高质粒稳定性和产物得率。

以摇瓶发酵的研究结果为基础,实现重组 hEGF 发酵从摇瓶到 2 L 发酵罐的放大,确证摇瓶发酵的实验结果。并通过在发酵罐上进一步控制摇瓶发酵时所无法控制的溶氧和 pH 值,以及流加补料技术,研究菌体浓度、产率和它们的关系。

2.2.1 诱导时间对 hEGF 表达的影响

在菌体的不同生长期(对数生长期,中期,后期和稳定期),分别添加 0.2 mmol 的诱导剂 IPTG 进行诱导,实验结果如下表 1 所示。

表 1 诱导时间对 hEGF 表达的影响

Tab.1 The effect of induced time on the secretion of hEGF

诱导剂添加时间/h (对数生长期)	所处阶段	细菌 OD 值	hEGF 产量/(mg/L)
2	初期	0.875	44.75
6	中期	5.632	56.74
8	后期	7.778	76.44
12	稳定期	9.862	57.36

由上表可得,在对数生长中后期(6~8 h)加入 IPTG 进行诱导,可得到最大的 hEGF 积累量;在对

数生长初期(2 h)诱导时,由于菌体浓度较低,总的 hEGF 表达水平不高;在稳定期(12 h),虽有较高的菌体浓度,但营养的消耗和生长环境的恶化引起细菌生长状态下降,因而表达外源基因的能力也随之降低,导致 hEGF 的表达量不高。因此,对数生长中后期是一个合适的诱导期,即诱导时间为开始发酵后 6~8 h 之间。

2.2.2 重组菌发酵的糖耗过程 重组菌在发酵过程中的葡萄糖消耗情况如图 2。培养基中的还原糖于前 4 h 大量消耗,4 h 后由于还原糖含量较低而没有太大变化。葡萄糖作为碳源能较好的支持菌体生长,如按正常方法在 8 h 进行诱导时,葡萄糖浓度已经很低,碳源的缺乏和 IPTG 诱导的致死作用可能导致细胞死亡和质粒丢失,因此诱导时流加一定量的葡萄糖,会提高质粒细胞浓度,提高 hEGF 的表达水平。由于补加葡萄糖能对菌体进行高密度培养^[4],故在此后的实验中采取 4 h 后补加适量葡萄糖的方法。

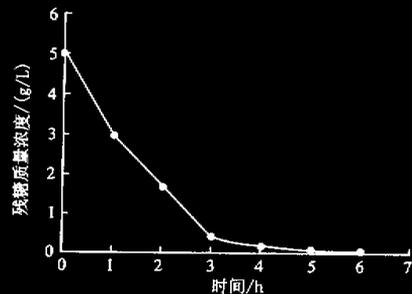


图 2 重组菌糖耗过程

Fig.2 The change of glucose in the fermentation of recombination *E. coli*

2.2.3 葡萄糖流加对菌体生长以及 hEGF 水平的影响

葡萄糖作为碳源能较好地被菌体所利用,如按正常方法在 8 h 进行诱导时,葡萄糖质量浓度已经很低,碳源的缺乏和 IPTG 诱导的致死作用可能导致细胞死亡和质粒丢失。因此,诱导时流加一定量的葡萄糖,提高含质粒细胞浓度,从而提高 hEGF 的表达水平。为了对菌体进行高密度培养,按 2 g/L 总糖质量浓度进行了流加。接种 4 h 后开始流加,流加速度根据培养基中 pH 值变化决定,因为葡萄糖的消耗会使培养基的 pH 下降。

图 3 为流加培养的菌体生长过程。经过流加培养后,菌体生长有了充足的碳源,菌体浓度有了显增加,最终 OD 值达到了 11 左右。图 4 为菌体浓度与 hEGF 产率关系图,图中表明,经过 10h 的诱导

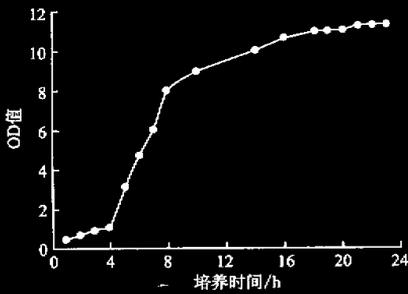


图3 菌体生长曲线

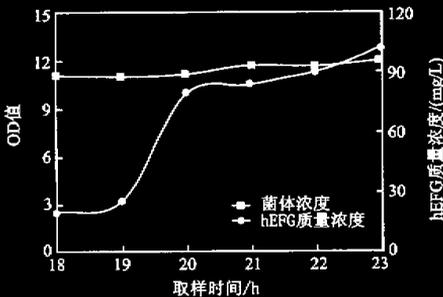
Fig.3 The growth curve of *E. coli*

图4 菌体浓度与hEGF产率关系

Fig.4 The relationship between the concentration of strain and the production of hEGF

后,从18 h开始逐渐积累hEGF,在19~20 h之间大量积累,于23 h处达到最大;而此时的菌体浓度基本维持不变.说明该发酵状态下,菌体处于稳定期,新陈代谢维持平衡而大量分泌hEGF.因此,此时补加葡萄糖,继续对大肠杆菌进行高密度的培养有利于提高hEGF的水平.另外,对流加糖的浓度进行了研究,发现菌体浓度和hEGF水平并不随着总糖浓度的增加而提高.其主要原因是,添加葡萄糖

糖固然大大改善了大肠杆菌的碳源供应,但由于葡萄糖浓度过高,且在发酵液中积累,易导致副产物(如乙酸)的积累,影响大肠杆菌对hEGF表达水平的进一步提高.因此对葡萄糖的流加速度应控制在较低的水平上,通常0.5 g/L以下.

2.2.4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 流加的影响 对发酵结束后的菌体进行了质粒稳定性的测定,发现质粒大量丢失.由于质粒对于提高hEGF的产量至关重要,因此以下的实验中针对质粒的稳定性进行进一步的研究.有关文献表明^[2],流加一定量的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液能够提高质粒的稳定性.本实验将0.3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 加入补加糖溶液中同时流加,测定发酵終了发酵液中大肠杆菌的质粒稳定性,发现流加 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 后质粒稳定性为50%左右,而没有流加时质粒的稳定性仅为30%左右,说明流加 Mg^{2+} 对稳定细胞质粒有积极作用.

2.3 hEGF分泌过程以及菌体生长情况分析

菌体在发酵16 h后基本停止生长,与此同时,菌体在低磷培养基中,诱导合成hEGF.随着诱导时间的延长,hEGF的表达量也随之增加.低磷培养基中诱导2 h后,开始少量的hEGF合成,4 h后菌内已合成成熟的hEGF,并将其分泌至细胞周围和培养基中.在培养基、细胞周围和胞内3个分组中的hEGF量基本相同.随着诱导时间的增加,表达的hEGF总量也随之增加,但大部分hEGF由胞内分泌至培养基,滞留在细胞周围中的含量较低,随着诱导时间的增加反而有所降低.由于周质空间较小,仅作为“通道”,递送hEGF至培养基中,这不同于低表达条件下的分泌行为.分析发现当诱导16 h后,近90%的hEGF被分泌至培养基中.

参考文献:

- [1] SIVAKESAESAVA S. Production of excreted human epidermal factor (hEGF) by an efficient recombinant *Escherichia coli* system[J]. *Process Biochem*, 1999, 34: 893~900.
- [2] IMANAKA T, AIBA A. A perspective on the appearing of genetic engineering: stability of recombinant plasmid[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1981, 369~371.
- [3] 张宏权,王允玲,周延冲等. *E. coli* 分泌表达载体的构建和人表皮生长因子在 *E. coli* 中的分泌性表达[J]. *生物化学杂志*, 1995, 11(4), 371~375.
- [4] LI, TAYOR X, K B. Effect of glucose on expression parameters of recombinant *E. coli* and expression of fusion[J]. *Biotechnol Lett*, 1989, 15: 809~814.

(责任编辑:朱明)