

大肠杆菌发酵中包含体形成减少的实验研究

申 迎 丁长青 唐小龙(牡丹江 157041 黑龙江省牡丹江温春双鹤药业有限责任公司)

摘要 目的:减少大肠杆菌发酵过程中包含体的形成。方法:在发酵过程中,加入 IPTG 后,降低培养温度进行低温诱导。结果:表达产物在细胞内大部分没有形成包含体。结论:低温诱导可减少大肠杆菌发酵中包含体的形成。

关键词 大肠杆菌;发酵;低温诱导;包含体

How to reduce the formation of inclusion body in the course of fermentation of E.coli

Shen Ying (Shen Y) , Ding ChangQing(Ding CQ) , Tang Xiaolong (Tang XL) , et al (Heilongjiang Mudanjiang Wenchun Double Crane Pharmaceutical Co . Ltd 157041)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To reduce the formation of inclusion body in the course of fermentation of E.coli. **METHODS:** In the course of fermentation , the temperature is lowed so as to have low-temperature induction after add IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) . **RESULTS:** Most of the product didn't form inclusion body in cell. **CONCLUSION:** Make use of low-temperature induction, the formation of inclusion body had been reduced in the course of fermentation of E.coli.

KEY WORDS E.coli , fermentation , low-temperature induction , inclusion body

在基因工程的研究中,大肠杆菌是用来做基因表达的最常用的一种载体。分子生物学家已成功地将外源基因导入 E.coli 等宿主细胞,并获得了较为稳定的表达。但是,将 E.coli 表达的产物提取出来,还要克服难以预料的困难,因为大部分产物在细胞内表达,需要将细胞破碎后来释放产物,而且有相当多的蛋白质产物在胞内凝集成没有活性的固体颗粒—包含体^[1]。

包含体基本是由蛋白质构成,其中大部分是克隆表达的产物,这些产物在一级结构上是正确的,但在立体构象上却是错误的,因此没有生物学活性,要分离出具有活性的蛋白质,一般要经过下列步骤:

破碎细胞→分离出包含体→溶解包含体→提取产物→目标产物的复性^[1]

本实验探索在大肠杆菌发酵过程中,利用低温诱导的方法,使目的产物在细胞内不形成包含体,减少了后处理的工作量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:宿主菌为大肠杆菌(PET 体系^[3]),将重组牛催乳素 PRL(Recombined bovine prolactin) 的 DNA 序列表达进去,工程菌由国外惠赠。

1.1.2 设备:发酵罐为德国 B.Braun Biotech International 的 BIostat C20-3 型。

1.1.3 试剂:

Tryptone	DIFCO 公司
Yeast Extract	DIFCO 公司
Casein	Sigma 公司
IPTG	BIOMOL 公司

其它均为国产分析纯试剂。

电泳槽为 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEAN II 型电泳槽

电泳所用试剂:

丙烯酰胺	Biomol 公司
甲叉双丙烯酰胺	Promega 公司
SDS(Sodium dodecyl sulfate)	BIB 公司

1.2 方法

1.2.1 制备菌种:将 - 80℃ 保存的菌种,涂于 LB 固体培养基上,于 37℃ 培养箱中倒置培养,至菌落长到 1.5 ~ 2 mm。从固体培养基上挑一单个菌落,接种于 LB 液体培养基中,于 37℃ 振荡培养 12h 左右。

1.2.2 发酵:将菌种按 1:100 的比例接种于 M-9 发酵培养基中,37℃ 培养,PO₂ 保持 30% 以上,培养至 OD_{600nm} 达 0.8 时,加 IPTG 至终浓度 0.5 mM 进行诱导,同时将培养温度降至 20℃,继续培养 12 ~ 15h。

1.2.3 发酵产物的处理:离心收集菌体,将菌体用缓冲液悬浮,超声破碎,然后于 4℃,16000 转离心 20 min,把上清和沉淀分开,将上清和沉淀分别做 SDS-PAGE 检查 EGF 的情况。

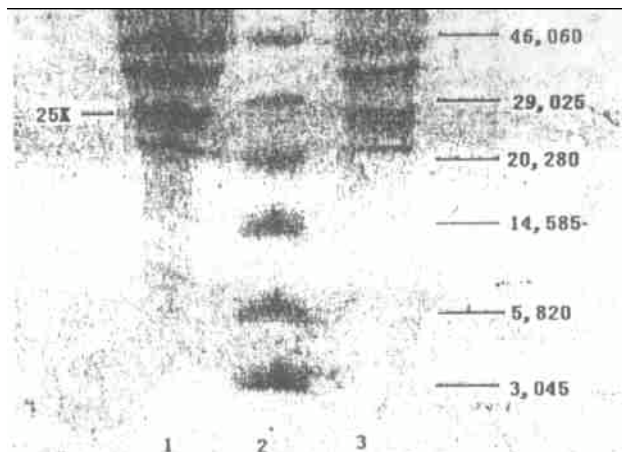
2 结 果

菌体破碎后的上清与沉淀的 SDS-PAGE 结果见下图:

分子量 25 K 的条带为表达产物的条带,由于表达产物在细胞内大部分没有形成包含体,所以菌体破碎后产物大部分溶于上清中,由图可见,PRL 大部分存在于破碎后的上清中,沉淀中只有少量 PRL,说明在低温下诱导可减少包含体的形成。

3 讨 论

包含体形成的原因比较复杂,到目前为止还不清楚。有说法认为包含体的形成是外源蛋白质在生成的过程



1. 菌体破碎后上清 2. 蛋白质标准 3. 菌体碎片
中,缺少某些协助因子或由于周围的物理环境(如温度等)不适,使其难以连续进行次级键的形成,中间产物相互凝集而积累成包含体^[2]。一般的水溶液很难将其溶解,只有在变性溶液中才能溶解,在这些溶液中,溶解的蛋白质是变性状态,而蛋白质的复性是十分复杂的过程,其中目标产物的复性率非常低,一般不超过 20 %^[4]。

我们在大肠杆菌的发酵实验中发现,在低温条件下诱导,可减少包含体的形成,使表达产物大部分存在于破碎后

的上清中。这样就避免了蛋白质变性、复性的棘手问题,给下面的纯化工作带来方便。但国内外的论著、文献中,对有关包含体的论述非常少,有关低温诱导可减少包含体形成的机制也还不十分清楚。通过查阅资料,有专家认为,低温诱导可减少包含体形成的机制,有可能是在低温下,蛋白质的合成速度减慢,使折叠的速度也减慢,这样,就有更多的机会进行正确的折叠,从而会减少包含体的形成,表达产物中有活性的蛋白质的量会增加^[5]。

参考文献

- 1 刘国詮主编,生物工程下游技术,北京:化学工业出版社,1994:74.
- 2 顾觉奋主编,分离纯化工艺原理,北京:中国医药科技出版社,1996:10.
- 3 Novagen, PET System Manual, 1986:21.
- 4 E. L. V. Harris and S. Angal, Protein Purification Methods, 1989:233.
- 5 孙万儒,分离纯化过程中蛋白质的稳定性,中国科学院微生物研究所,2000:25.

收稿日期:2001 - 01 - 10