

工程菌 LacU V5par8egf 产 hEGF 发酵方法的比较

柯世省(浙江临海 317000 台州师范专科学校生化系)

摘要 目的: 明确培养条件对工程菌 LacU V5par8egf 表达水平和质粒稳定性的影响。方法: 采用优化 MBL 培养基, 利用摇瓶发酵研究工程菌 LacU V5par8egf 的最优培养条件, 并与 2L 发酵罐上的发酵进行比较。结果: 摇瓶发酵的最优培养条件为: 温度 32℃, 接种量 10%, 种子液 OD₅₅₀ 1.0~3.0, 装液量 10%, 摇床转速 220rpm; 摇瓶发酵的最优诱导条件是在对数生长中后期诱导, IPTG 最适浓度为 0.2 mM。2L 发酵罐发酵与摇瓶发酵相比, 发酵周期缩短了约三分之一, hEGF 表达水平接近摇瓶中发酵水平, 达到 27.7 mg/L。结论: 利用摇瓶最优培养条件, 较好实现了重组 hEGF 从摇瓶到发酵罐的放大。

关键词 间歇发酵; 工程菌; LacU V5par8egf; hEGF

The studies on hEGF productions by recombinant E. Coli harboring expression LacUV5par8egf in batch fermentation

ABSTRACT **OBJECTIVE:** Clarifying the fermentation conditions of hEGF production by recombinant E. coli harboring expression LacUV5par8egf and plasmid stability was our objective. **METHODS:** The detailed optimized fermentation conditions in the shaken culture in MBL medium had been studied. The fermentation in shaken-flask and 2L bench-top fermentor had been compared too. **RESULTS:** In the shaken culture, the detailed optimized fermentation conditions were obtained as following: temperature 32℃, inoculum volume 10% (V/V), inoculum age OD₅₅₀ 1.0~3.0, medium volume 10% (V/V), rotating speed 220 rpm. It was also shown that induction conditions could affect hEGF accumulation obviously. The maximum hEGF production was attained when the induction was done at middle or late logarithmic phase. The addition of 0.2 mM IPTG led to the highest hEGF accumulation. The fermentation time in 2L bench-top fermentors was two thirds of the time in shaken culture, But hEGF in concentration of 27.7 mg/L was almost equal to which in shaken culture. **CONCLUSION:** The enlarged fermentation from shaken-flask to fermentor was successful.

KEY WORDS batch fermentation, recombinant E. coli, LacUV5par9egf, hEGF

人表皮生长因子(human Epidermal Growth Factor, hEGF)在控制正常细胞生长、致癌、伤口愈合的分子机制中起着重要作用。由于对 hEGF 已经在理论上进行了深入研究^[1], hEGF 的结构、生物学活性以及其医疗应用前景都已比较确切,从而推动了重组 hEGF 的生产和分离纯化研究^[2~4]。重组菌含有外源的质粒,在其发酵过程中往往存在着质粒的不稳定和表达产物的不稳定,质粒稳定性研究成了重组菌发酵研究的中心问题^[5]。影响质粒稳定性的因素很多,主要归结为三个方面^[6]: 1, 质粒自身因素; 2, 宿主因素; 3, 环境因素。本文主要着眼于优化培养条件,研究培养条件对表达水平和质粒稳定性的影响。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌种: 宿主菌为野生型 E. coli JM 101 Amp^r 敏感型, 质粒 LacUV5par8egf 带有 Amp^r 基因, 转化了质粒 LacUV5par8egf 的工程菌为工程菌 LacUV5par8egf, 由浙江大学生物工程研究所保存。

1.2 培养基: 优化 MBL 培养基(g·L⁻¹), 葡萄糖 5.0, 酵母抽提物 20.0, 胰蛋白胨 20.0, 酪蛋白酸水解物 10.0, (NH)₂HP043.5, KH₂PO₄ 3.5, K₂HPO₄ 5.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, NaCl 3.0, 微量元素液 3.0 ml, 接种前加入无菌氨苄青霉素(Amp) 70 μg·mL⁻¹。微量元素液组成(g·L⁻¹): FeCl₃·6H₂O 0.162, ZnCl₂·4H₂O 0.0144, CoCl₂·6H₂O 0.12, Na₂MoO₄·2H₂O 0.012, CaCl₂·2H₂O 0.05, CuSO₄·5H₂O 1.9, H₃BO₃ 0.5, 盐酸 37 mL。

1.3 细胞生长测定: 用光密度法, 取一定量发酵液, 适当稀释后, 在 550 nm 波长下测定吸光值 A, 则 OD₅₅₀ = A × 稀释倍数。

1.4 P⁺ 和 P⁻ 菌浓度的测定: 用平板稀释法, 样品经系列稀释后, 选取合适的三个稀释度涂布不含 Amp 和含 Amp MBL 平板, 取两个平行样, 乘以稀释倍数, 分别得到活细胞(包括 P⁺ 和 P⁻ 菌)浓度和 P⁺ 菌及 P⁻ 菌的百分浓度。

1.5 hEGF 的测定: 取一定量发酵液, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清液测 hEGF 含量。hEGF 含量测定按照 Amershan 公司的 hEGF RIA 试剂盒(Code IM.1961)规定的

方法进行。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶发酵

利用摇瓶发酵研究工程菌 LacUV5par8egf 的最优培养条件。

2.1.1 装液量对菌体生长和 hEGF 积累的影响

在 250 ml 三角瓶中装入不同体积的发酵液, 在 30℃ 220 rpm 下进行摇床试验。当 OD₅₅₀ 为 3.0 时加入 0.1 mM IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 进行诱导, 诱导后 18 hr 测 hEGF 含量, 实验结果见表 1。装液量对工程菌的生长和 hEGF 的表达都有显著的影响。最适装液量为 30 ml/250 ml, 随着装液量的增加, 发酵终点时 hEGF 表达水平, 细胞浓度和 pH 都随之降低, 说明 hEGF 表达需要较高的溶氧。

表 1 装液量对摇瓶发酵的影响

装液量(ml)	20	30	50	70	90
OD ₅₅₀	20.81	21.30	15.13	13.45	12.24
pH	7.3	7.5	7.2	6.9	6.7
hEGF(mg·L ⁻¹)	24.1	24.8	19.1	17.5	13.2

2.1.2 发酵温度对 hEGF 积累的影响

摇瓶装液量为 30 ml/250 ml, 在不同温度下 220 rpm 培养, 诱导条件同 2.1.1, 结果见表 2。随着发酵温度升高, hEGF 积累亦增加, 32℃ 达到最大值, 温度继续升高, hEGF 积累量下降。质粒的稳定性随发酵温度的升高不断下降。

表 2 发酵温度对 hEGF 积累的影响

温度(℃)	25	28	30	32	34
质粒稳定性	0.92	0.87	0.74	0.66	0.41
P ⁺ 细胞浓度(10 ⁹ ·mL ⁻¹)	15	6.9	0.64	0.35	0.17
hEGF(mg·L ⁻¹)	4.5	7.8	18.2	24.1	16.2

2.1.3 种子菌龄和接种量对发酵的影响

种子质量和数量会直接影响发酵产物的产率和整个发

酵系统的效率,一般认为,合适的种龄为对数生长期的中后期。过于年轻的种子会导致较长的延迟期,菌龄过高又可能引起菌种生产能力的下降。在重组菌种子制备中,还应尽可能使种子液中含质粒细菌占绝对优势,以降低发酵过程中质粒的不稳定性。不同菌龄种子液在 30 ml/250 ml 装液量、32℃ 220 rpm 条件下的发酵结果见表 3,接种量为 10%。工程菌 LacUV5par8egf 的种子 OD₅₅₀ 在 0.5~3.0 之间变化,含质粒菌数在总细胞数中比例在 99.7~97.5% 之间,含质粒细菌占绝对优势。种子 OD₅₅₀ 在 1.1~3.0 之间,对菌体生长和 hEGF 积累无明显影响,说明该菌具有优良的生产性能。

表 3 种子菌龄对细胞生长和 hBGF 积累的影响

菌龄(OD ₅₅₀)	0.52	1.11	2.05	3.08	4.13
P ⁺ 的百分浓度	99.7	98.9	99.5	97.5	96.3
hEGF 相对含量	92.5	100.0	104.5	103.4	90.5
细胞密度(OD ₅₅₀)	12.38	15.6	16.25	16.18	14.81

不同接种量的实验结果如表 4 所示,当接种量在 5~15% 范围内,hEGF 浓度相对较高,合适的接种量可取 10%。

表 4 接种量对 hEGF 积累的影响

接种量(%)	1.0	5.0	10.0	15.0	20.0
hEGF 相对含量	92.7	98.4	100.0	103.7	95.3

2.1.4 诱导条件对工程菌发酵的影响

在工程菌的培养过程中,质粒基因的转录和翻译增加了工程菌的能量要求,阻碍了菌体的生长,严重时会导致细菌的大量死亡。通过合适的诱导条件将工程菌的发酵过程分为菌体生长和产物表达二阶段,能在保持较高菌体浓度的基础上高水平地合成目的产物。诱导时间和诱导方法对产物表达率有重要影响。在不同生长期分别添加 0.1 mM IPTG 进行诱导,结果如表 5 所示。在对数生长期中后期加入 IPTG 进行诱导可得到最大的 hEGF 积累量:在对数生长期初期诱导时,由于细胞浓度较低,总的 hEGF 表达水平不高,仅为前一种诱导方式的一半左右;在稳定期诱导,有着最多的含质粒细胞数,但个体 hEGF 产率低,导致 hEGF 表达量仍然较低。

表 5 不同诱导时间对 hEGF 积累的影响

培养时间	2	6	8	12
生长阶段	对数生长初期 Early log phase	对数生长中期 Middle logphase	对数生长后期 Late logphase	稳定期
OD ₅₅₀	3.02	6.83	9.31	15.76
hEGF 浓度(mg·L ⁻¹)	12.5	25.3	26.8	18.5
P ⁺ 细胞浓度(10 ⁸ ·ml ⁻¹)	2.2	10.3	12.2	13.3

在对数生长期后期添加不同浓度 IPTG 进行诱导,试验结果如图 1 所示。hEGF 的表达在加入 IPTG 进行诱导后 14 到 16 hr 出现峰值。在小于 0.2 mM 范围内时,hEGF 表达水平随着 IPTG 浓度增大而增加,当 IPTG 浓度大于 0.2 mM

时,随浓度增大而 hEGF 表达水平下降。0.2 mM 是最适的诱导剂量,hEGF 达到 34.68 mg·L⁻¹。

2.2 重组 hEGF 在小型发酵罐上的间歇发酵

B. Braum B 2-Liteir 标准发酵罐与计算机相连,可以调整温度、pH、DO、通气量、搅拌转速等参数。装料系数为 60%,培养温度为 32℃,并通过酸碱泵自动补加 1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 和 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液控制发酵罐中的 pH 为 6.8,通过调节搅拌速度、通风量和补充纯氧等方法控制发酵过程中 DO 在 20% 以上。表 6 比较了摇瓶(500 ml)和 2 L 发酵罐中所取得的发酵结果。从表 6 可看出,在发酵罐中生长明显比在摇瓶中加快,发酵周期缩短了约三分之一,菌体干重有明显提高,含质粒细胞浓度增加了 45%,质粒稳定性没有大的变化,hEGF 表达水平接近摇瓶中表达水平,较好地实现了重组 hEGF 从摇瓶到发酵罐的放大。

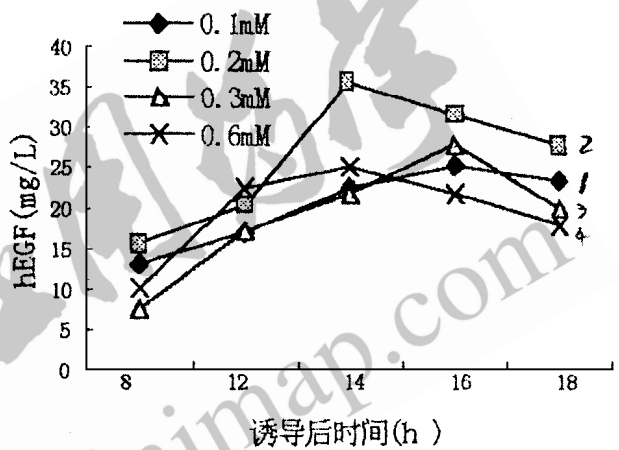


图 1 IPTG 浓度对 hEGF 表达的影响

表 6 摇瓶与发酵罐发酵的结果比较

	摇瓶 Shake-flask	2L 发酵罐 2L fermentor
总时间(hr)	24	15
诱导后时间(hr)	16	10
细胞干重(g·L ⁻¹)	11.5	13.8
hEGF 浓度(mg·L ⁻¹)	28.35	27.70
P ⁺ 细胞浓度(10 ⁸ ·L ⁻¹)	1.76	2.56
P ⁺ 细胞百分含量(%)	78.7	78.5

3 结论

3.1 摇瓶发酵的最优培养条件为:温度 32℃,接种量 10%,种子液 OD₅₅₀ 1.0~3.0,装液量 10%,摇床转速 220 rpm;温度升高,诱导后细胞浓度下降,质粒稳定性亦下降。

3.2 摇瓶发酵的最优诱导条件是:在对数生长中后期诱导,IPTG 最适浓度为 0.2 mM。

3.3 2L 发酵罐发酵与摇瓶发酵相比,发酵周期缩短了约三分之一,菌体干重有明显提高,含质粒细胞浓度增加了 45%,质粒稳定性和 hEGF 表达水平接近摇瓶中发酵水平,hEGF

达到 $27.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献

- 1 Heldin H., Westermark B.. Growth factors: Mechanism of action, and relation to oncogenes, Cell, 1984, 37: 9,
- 2 Harper R. A., Pierce J, Savage C. R. Methods Enzymol, 1987, 146: 3.
- 3 Wong W. K. R, Sutherland M. L. Excretion of heterologous proteins from E. coli, U. S. P. 1993, 5: 223.
- 4 Hamsa P. V., Kackroo P., Chattoo B. B. Production and Secretion of Biologically-Active Human Epidermal Growth Factors in *Yarrowia lipolytica*, Current Genetics, 1998, 33: 231.
- 5 Zhang z. Chizti YM, Moo-Young, Plasmid of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Advance. 1996, 14: 401.
- 6 Imanaka T., Aiba S., A perspective on the application of genetic engineering: Stability of recombinant plasmid, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1981, 369: 1

收稿日期: 2000- 05- 30