文章编号:1000-5404(2005)02-0115-04

论著

大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位基因工程菌发酵工艺的研究

田文标,邹全明,张卫军 (第三军医大学医学检验系临床微生物与免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究建立大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位(LTB)基因工程菌的发酵工艺。**方法** 先通过摇瓶培养初步确定工程菌的最适生长条件,然后以此为基础在发酵罐中比较、筛选影响菌体生长和目的蛋白表达率的各种条件,并进一步对发酵工艺进行改良优化。**结果** 经试验确定了rLTB基因工程菌发酵罐培养的各项条件的最佳组合,优化后工程菌菌体产量平均可达40.5 g/L,目的蛋白的表达率平均为30.6%。**结论** 建立了稳定、高效的工程菌发酵工艺。

关键词: 产毒素性大肠杆菌;不耐热肠毒素B亚单位;发酵
中图法分类号: R378.21; TQ460.38 **文献标识码:** A

Fermentation technology in heat-labile enterotoxin B subunit of genetic recombinant *E. coli*

TIAN Wen-biao, ZOU Quan-ming, ZHANG Wei-jun (Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the fermentation conditions for the heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) of genetic recombinant *E. coli*. **Methods** The effects of different kinds of media, the range of pH, the induction time, the glucose concentration, and the fed-batch on LTB level in 10-liter fermenter under the condition of cascade controlling dissolved oxygen content were analyzed. **Results** Under the established conditions, the cell output per liter was 40.5g, and the expression level was 30.6%. **Conclusion** The results indicate that the stable fermentation technology with high efficiency has been established.

Key words: enterotoxigenic *E. coli*; heat-labile enterotoxin B subunit; fermentation

大肠杆菌不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)是产毒素性大肠杆菌分泌的一种热不稳定性(65℃,30 min即失活)肠毒素,是目前人们发现的最强有力的粘膜免疫原和粘膜免疫佐剂之一。LT组分中,全毒素和A亚单位均有很强的毒性作用,而B亚单位毒性低、粘膜佐剂效应高,所以常用LT的B亚单位,即LTB来代替全毒素来进行粘膜免疫方面的研究[1,2]。要获得大量LTB,需通过重组菌的繁殖发酵:一方面提高发酵的菌体数量,另一方面提高LTB的表达量,同时还要考虑节省原料,降低成本。本研究拟通过培养基的选择,葡萄糖浓度的限制,营养物的补充,pH及溶氧控制等方法而达到上述目的。

基金项目: 国家"九五"重点科技攻关项目(96-901-01-54)
Supported by the Key Research Project of the National "Tenth Five-year Plan" of China (96-901-01-54)

作者简介: 田文标(1970-),男,河北省石家庄市人,博士研究生,主要从事临床微生物及免疫学方面的研究。电话:(023)68753591,E-mail: tianwb@hotmail.com
通讯作者: 邹全明,电话:(023)68752316

收稿日期: 2004-08-18;**修回日期:** 2004-12-13

1 材料和方法

1.1 材料

工程菌pIM-1-LTB/JM109由本室构建并保存。

德国BIOSTAT C 10L自控发酵罐;蛋白胨、酵母抽提物为英国牛津公司提供,IPTG为Promega公司提供,其它试剂为国产和进口分装分析纯。LB培养基和M9-CAA培养基参考文献[3]配制,改良M9-CAA培养基和补料由本室改良配制。

1.2 方法

1.2.1 种子菌的活化[4] 取-70 ℃,20%甘油保存的菌种100 μl,接种于含4 ml LB培养基的试管中,37 ℃、200 r/min培养10 h,然后按试管培养基量的2%转种1次,相同的条件培养4 h,成为活化种子。

1.2.2 摇瓶培养 在500 ml摇瓶中加入LB培养基100 ml,取活化的种子,以2%接种量进行培养。依次改变培养温度、气体条件、pH等因素对工程菌培养条件进行初步摸索,为上罐培养做好准备。

1.2.3 发酵罐的培养 在德国BIOSTAT C 10 L自控发酵罐中,依次分别改变培养基、补料、溶氧等条件进行摸索,具体操作按发酵罐操作手册进行。

1.3 分析方法

菌密度测定:流动分光光度计于600 nm波长处测光吸收值

A_{600}。菌湿重测定:Beckman低温高速离心机6 000×g离心15 min,用天平进行称量。菌体总蛋白的测定:紫外分光光度法测定菌体总蛋白。目的蛋白表达率分析:留取样本,先行10% Tris-Tricine电泳,经电泳凝胶染色、脱色后,由凝胶扫描分析仪扫描Gel-pro Analyzer v3.0软件分析重组蛋白表达率。

1.4 统计学方法

结果以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件的单因素方差分析。

2 结果

2.1 摇瓶培养

2.1.1 培养中最适温度的确定 在培养过程中采用30、37、40 ℃ 3种温度进行研究(已往实验证明此工程菌的适合生长温度在30~40 ℃),rLTB菌所得湿菌量分别为8.2、11.5和9.0 g/L,说明最适温度为37 ℃。

2.1.2 培养中最适pH的确定 在培养过程中pH选用6.5、7.0、7.5、8.0,培养温度为37 ℃时,rLTB菌所得湿菌量分别为8.6、10.3、12.6和9.5 g/L,说明pH 7.5为最适pH。

2.1.3 培养中最适气体条件的确定 在培养过程中采用100、200、300、400、500 r/min 5种气体条件进行研究。在培养温度为37 ℃,培养基pH为7.5时,rLTB菌所得湿菌量分别为8.8、10.3、12.1、11.6和12.0 g/L,说明此株基因工程菌的最适生长气体条件为300 r/min。

2.1.4 IPTG的诱导研究 在细菌生长的对数中期(A_{600}约为0.9)用不同浓度的IPTG进行诱导,IPTG终浓度为500 μmol/L时表达率明显高于250 μmol/L,与1 000 μmol/L、1 500 μmol/L时的最高表达率和达到最高表达率的时间基本相同,故选择诱导浓度为500 μmol/L(图1)。

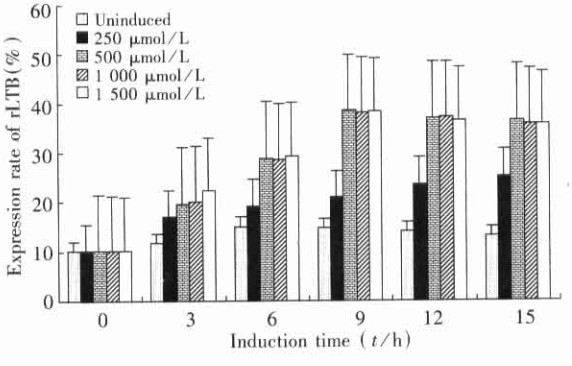


图1 不同浓度IPTC诱导rLTB菌效果的比较

Fig 1 Effects of different concentrations of IPTG on the induced expressions of rLTB

2.1.5 利福平对rLTB表达的影响 在37 ℃、pH 7.5和300 r/min的条件下,rLTB菌液A_{600}约为0.9时,用IPTG诱导30 min后加入终浓度150 μmol/L利福平,在诱导9 h时rLTB的表达率可达30.5%,但菌液A_{600}一直在1.0左右,收获菌量只有4.2 g/L。

2.2 发酵罐培养

根据摇瓶中的培养结果,在发酵罐中培养基pH稳定在7.5左右,温度保持37 ℃,IPTG的诱导浓度为500 μmol/L。

2.2.1 培养基的比较 选择3种不同的发酵培养基进行发酵,结果见表1。由实验结果可知:对于此株基因工程菌,改良M9-CAA是较为理想的培养基。

表1 不同培养基发酵结果比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the fermentation results with different culture media ($\bar{x} \pm s$)

Culture medium	A_{600}	Expression rate of rLTB (%, $\bar{x} \pm s$)
LB	15.52±0.55	23.57±0.37
M9-CAA	18.65±0.33	26.45±0.58
Modified M9-CAA	26.79±0.44▲	31.46±0.61▲

▲: $P<0.01$, *vs* M9-CAA and LB

2.2.2 补料和葡萄糖浓度的影响 在发酵进行至A_{600}为2时,除葡萄糖外适量补充氮源、无机盐和微量元素,每3 h流加补料1次,共3次。限制性流加葡萄糖,葡萄糖终浓度在0.15%时比0.05%和0.25%时要好。补料与非补料的发酵相比,菌体产量和rLTB蛋白的表达率都得到提高(表2)。

表2 非补料与补料发酵结果比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of the fermentation with and without fed-batch ($\bar{x} \pm s$)

Fed-batch condition	A_{600}	Bacteria weight of rLTB (ρ_B/g·L^{-1})	Expression rate of rLTB (%, $\bar{x} \pm s$)
Unsupplied	4.05±0.42	10.29±0.18	19.02±3.79E-02
0.05% glucose	15.96±0.49	29.09±0.22	22.06±0.16
0.15% glucose	26.07±0.29*#	42.05±0.19*#	31.55±0.11*#
0.25% glucose	22.82±0.11	36.31±0.66	25.04±7.02E-02

*: $P<0.05$, *vs* 0.05% and 0.25% glucose; #: $P<0.01$, *vs* unsupplied

2.2.3 溶氧对产量的影响 对50%、70%、90% 3种溶氧条件进行比较,溶氧为70%时产量最高,50%、90%时产量相对较少(表3)。

表3 不同溶氧条件发酵结果比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of different dissolved oxygen conditions on fermentation results ($\bar{x} \pm s$)

Conditions of dissolved oxygen	A_{600}	Bacteria weight of rLTB (ρ_B/g·L^{-1})	Expression rate of rLTB (%, $\bar{x} \pm s$)
50%	18.80±6.09 E-02*	35.20±4.16 E-02*	28.12±0.14*
70%	23.51±4.51 E-02	40.12±5.51 E-02	30.41±6.03 E-02
90%	20.62±2.51 E-02*	35.82±2.65 E-02*	25.12±6.11 E-02*

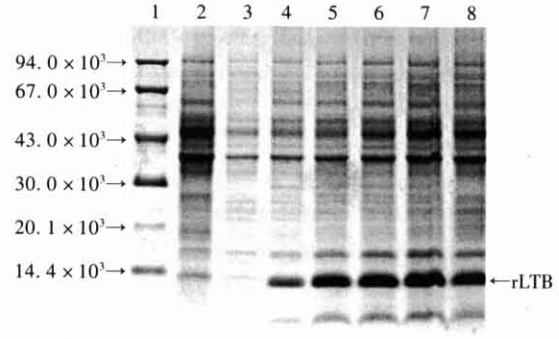
*: $P<0.05$, *vs* 70%

2.2.4 发酵中诱导培养时间对细菌生长和rLTB表达的影响 基因工程菌LTB表达量随诱导时间延长而增加,在诱导4 h后目的蛋白的表达达到峰值(图2)。

2.2.5 pH的控制对产量的影响 发酵过程中的pH通过加入氨水来调节,结果表明生产每克菌体所消耗的氨水量与rLTB估算产率有负的相关性(图3)。

2.2.6 rLTB基因工程菌的产量和目的蛋白表达率 经对多

批发酵产物进行测定发现：rLTB 基因工程菌的产量比较稳定，其中菌体产量平均为 40.5 g/L，目的蛋白（LTB）表达率平均为 30.6%（表 4）。



1: Protein marker; 2: Uninduced bacteria; 3: Before induction; 4: At 1 h after induction; 5: At 2 h after induction; 6: At 3 h after induction; 7: At 4 h after induction; 8: At 5 h after induction

图 2　IPTG 诱导时间对 rLTB 表达的影响

Fig 2　Effects of induction time with IPTG on rLTB expression

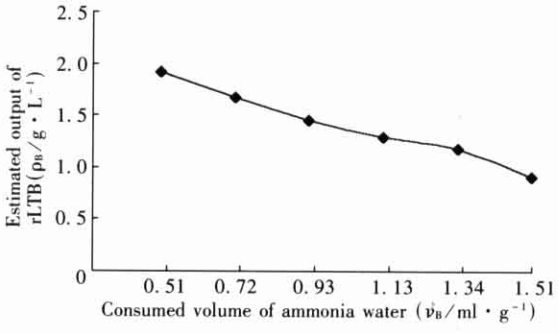


图 3　氨水消耗量与目的蛋白估算产量的关系

Fig 3　Relationship between consumed volume of ammonia water and estimated output of rLTB

表 4　rLTB 基因工程菌的产量和表达率

Tab 4　Output and expression rate of rLTB

	Fermentation time (h)								Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Output of rLTB (g/L)	39.6	38.2	43.1	42.5	40.6	37.8	41.6	40.2	40.5
Expression rate of rLTB (%)	31.8	32.4	30.5	31.0	28.8	31.6	27.9	31.2	30.6

3　讨论

在建立发酵工艺前必须在摇瓶中对基因工程菌生长条件进行摸索，这是上罐发酵前的重要步骤，是从实验室研究到中试研究的必经阶段，可以减小直接上罐发酵的盲目性[5]。在摇瓶培养中分别对影响工程菌生长的各种因素如最适温度、pH、气体条件、IPTG 诱导浓度等进行了摸索并加以确定，其中加入利福平虽然可以提高目的蛋白表达率，但对菌量的增加有抑制作用，其最终作用不好确定，故在上罐发酵中未予采用。

在进行工程菌的高密度发酵时，许多因素直接影响着工程菌的产量和目的蛋白的表达率，因此建立一个成熟稳定的发酵工艺就必须对这些因素进行优化。在实践中对其中影响较大的因素进行了摸索：①培养基的选择：基因工程菌开始阶段的生长是通过发酵罐中最初加入的营养物得以维持的，因此发酵罐中营养成分的配方非常重要[4]。对 LB、M9-CAA、改良 M9-CAA 3 种培养基进行比较后发现：LB 因缺乏无机离子和 pH 缓冲系统不能满足菌体生长的需要，而且有机氮源的利用速度也较慢，所以发酵周期长而菌体量少；M9-CAA 弥补了 LB 的不足，可使菌体快速生长，但对数生长期短，后劲不足；在 M9-CAA 中添加酵母浸出液和微量元素后，不仅生长速度快，对数生长期延长，而且目的蛋白的表达率也得到明显提高。②补料的作用：对比培养结果表明，在发酵进行至 A_{600} 为 2 时，除葡萄糖外适量补充氮源、无机盐和微量元素，对于葡萄糖采取限制性补加。与不加补料的发酵相比，对数生长期延长，菌体产量和表达率也得到提高。其原因是：补料分批培养既合理控制了发酵过程中葡萄糖的浓度，又兼顾了细菌生长所必须的营养条件。③溶氧的影响：通过摇瓶培养得出此株基因工程菌为需氧发酵，发酵过程中溶氧高虽然有利于菌体生长和产物合成，但太高反而抑制产物的形成[6]。通过观察溶氧浓度的变化，可以了解细菌对氧的利用规律，及时了解发酵过程中的异常情况及设备的供氧能力，以便对发酵工艺进行合理的调整[7]。④IPTG 的诱导：IPTG 的诱导时机和诱导时的菌体密度对表达水平和生产率有较大的影响[5]。实验中发现，在细菌生长的对数中期用 IPTG 进行诱导比在后期诱导可以获得较高的产率。原因是在对数生长后期，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。⑤利用氨水消耗量判断发酵结果：发酵罐中 pH 是通过生理性酸性物质 $(NH_4)_2SO_4$ 和碱性物质氨水来控制的[5,8]。它们不仅可以调节 pH，还可以补充氮源。发酵过程中氨水主要用于中和发酵过程中所产生的乙酸。由于细胞生长速率过高、发酵液中糖浓度过高和氧气不足都会导致乙酸大量积累，所以氨水的用量可反映出菌体的生长速率大小、葡萄糖浓度是否合适、氧气是否充足以及目的蛋白的表达水平[5]，进而初步判断发酵的情况。

经对以上多种影响因素进行摸索优化，建立了稳定、高效的发酵工艺。对多次发酵结果进行测定发现：rLTB 基因工程菌的菌体单产平均可达 40.5 g/L，rLTB 的表达率平均可达 30.6%。这说明：研究有关基因重

组菌的生长特性及其发酵动力学，并据此制订发酵工艺，对发酵过程进行有效的控制，为重组菌提供合适的生长环境，可望充分发挥有关菌株的生产性能，大幅度提高生产水平并降低原材料消耗[5]。

参考文献：

[1] Clements J D, El-Morshidy S. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera- Escherichia coli-related diarrheas[J]. Infect Immun, 1984, 46(6): 564 - 569.

[2] Cardenas L, Clements J D. Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors[J]. Vaccine, 1993, 11(3): 126 - 135.

[3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 分子克隆实验指南[M]. 北京：科学出版社, 1999. 908 - 910.

[4] Grdic D, Smith R, Donachie A, *et al*. The mucosal adjuvant effects of cholera toxin and immune-stimulating complexes differ in their requirement for IL-12, indicating different pathways of action[J]. Eur J Immunol, 1999, 29(6): 1774 - 1784.

[5] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京：科学出版社, 2001. 215 - 233.

[6] Katz J M, Lu X, Young S A, *et al*. Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic Escherichia coli for oral administration of inactivated influenza virus vaccine[J]. J Infect Dis, 1997, 175(2): 352 - 363.

[7] Soriano E, Borth N, Katinger H, *et al*. Flow cytometric analysis of metabolic stress effects due to recombinant plasmids and proteins in Escherichia coli production strains[J]. Metab Eng, 1999, 1(3): 270 - 274.

[8] 李茹冰，单中元，付泳航，等. 重组人肝增强因子工程菌 JM109 的发酵工艺研究[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(2): 63 - 65.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)02-0118-01

静脉注射氯诺昔康控制人工流产术后疼痛的研究

Effects of intravenous injection of Lornoxicam on post-operative pain control in induced abortion patients

聂发传，苏 东，吴 英，陈全梅 （第三军医大学西南医院麻醉科，重庆 400038）

随着经济发展，社会进步，人们对既往一些未实施控制的疼痛进行镇痛处理的要求越来越多。全身麻醉下无痛人工流产的技术已经在国内广泛开展，但麻醉快速清醒后的术后疼痛控制尚未受到临床重视。本研究为适用于门诊人流手术的简便、安全而有效的控制术后下腹痛的方法，有重要的临床价值。

1 资料和方法

1.1 临床资料

299例拟实施异丙酚麻醉下人工流产的患者按硬币法分为3组：①A组：术前15 min口服安宫合剂，每剂含甲羟孕酮（安宫黄体酮）4 mg，氨糖美锌100 mg（氨基葡萄糖80 mg + 吲哚美辛20 mg），沙丁胺醇（舒喘灵）2.4 mg；②B组：异丙酚麻醉前静脉注射氯诺昔康4 mg；③C组：为对照组，无特殊处理。3组患者麻醉用药（芬太尼0.05 mg + 异丙酚4 mg/kg）和手术方法相同，麻醉医师和手术医师固定。术后观察项目由不了解手术麻醉过程和研究分组的其它医师完成。

1.2 观察项目

询问记录患者生育情况、妊娠天数、既往人流手术次数和手术陪伴性别，采用视觉模拟评分法（VAS）测定记录术后30 min、8、16 h时患者下腹疼痛程度，测量围手术期右上肢血压和心率记数，分析不同控制方案对人流术后痛的控制效果及副作用。

1.3 统计学方法

数据以 $x \pm s$ 显示。对应点组间数据比较：等级数据间用秩和检验，连续数据间实行未配对 t 检验。

2 结果

患者生育记录、此次妊娠天数、既往人流手术次数和陪护亲属的性别构成均无显著差异（$P > 0.05$）。

人流术后30 min，口服安宫合剂（A组）不能缓解此时的疼痛，对术后8、16 h的疼痛控制有明显作用；而静脉注射氯诺昔康（B组）可显著减轻3个时间点的疼痛强度，见表1。

表1 患者术后下腹痛评分比较（$x \pm s$）

组别	n	术后30 min VAS	术后8 h VAS	术后16 h VAS
A组	102	2.22 ± 0.063	0.21 ± 0.087*#	0.00 ± 0.000*#
B组	97	1.42 ± 0.038*#	0.19 ± 0.036*#	0.00 ± 0.000*#
C组	100	2.12 ± 0.079	0.46 ± 0.103	0.14 ± 0.028

*：与A组同时相点比较，$P < 0.01$；#：与C组同时相点比较，$P < 0.01$。

作者简介：聂发传（1965 - ），男，湖北省云梦县人，博士，副主任医师，副教授，主要从事疼痛机制和疼痛临床方面的研究，发表论文29篇。电话：(023)65461221

收稿日期：2004-03-23；修回日期：2004-06-15

（下转122页）