论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0904-03

HSPC016基因重组工程菌发酵研究

邹 锋[1],郝 飞[1],宋志强[1],易 勇[2],郝 进[1],钟 华[1],叶庆佾[1] (第三军医大学:[1]西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,[2]医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究人毛乳头细胞HSPC016基因重组工程菌的发酵工艺。**方法** 采用德国B.Brau公司C-10型5 L发酵罐批次发酵,通过对能影响工程菌生长和目的蛋白表达的条件如不同培养基、不同葡萄糖浓度、营养物补充、pH及溶氧调节等进行优化,确定合适的培养条件和发酵工艺。**结果** 在优化条件下,菌体单产可达45 g/L,目的蛋白表达量约占总蛋白的18%。**结论** 此发酵工艺可以提高人毛乳头细胞HSPC016/pET-28a(+)基因重组工程菌的收获和目的蛋白表达。

关键词: 人毛乳头细胞;HSPC016基因;发酵;大肠杆菌

中图法分类号: Q93-335; R322.99; R394-33 **文献标识码:** A

Research on fermentation process of HSPC016 gene recombinant *Escherichia coli* BL21

ZOU Feng[1], HAO Fei[1], SONG Zhi-qiang[1], YI Yong[2], HAO Jin[1], ZHONG Hua[1], YE Qing-yi[1] ([1]Department of Dermatology, Southwest Hospital, [2]Department of Clinical Biology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop a better fermentation process of the HSPC016 gene of human dermal papilla cell recombinant *Escherichia coli* BL21. **Methods** The expression of target protein was analyzed to optimize the composition of the medium, the range of pH values, induction time and other factors in the process of fermentation. **Results** Under the established condition, 45 g of wet bacteria per liter was obtained and the derivative of target protein was about 18% of total protein in host. **Conclusion** The established fermentative technique enhanced the collection efficiency and expression of target protein.

Key words: human dermal papilla cell; HSPC016 gene; fermentation; *Escherichia coli*

毛乳头为毛囊底部含血管的间充质成分[1]。毛乳头细胞在胚胎毛囊的发育及成年毛囊的周期性生长过程中具有十分重要的作用。因此毛乳头细胞是毛囊研究的中心环节之一[2]。我们已用抑制性消减杂交技术成功地建立了一个凝集性生长状态下的人毛乳头细胞差异表达基因cDNA文库[3]。造血干细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)相关基因HSPC016是我国复旦大学学者在人造血干细胞中发现的新基因[4],我们首次发现了HSPC016作为上调表达基因在凝集性生长状态人毛乳头细胞差异表达cDNA文库中的表达[3],并已成功地将HSPC016基因克隆,构建了表达良好的HSPC016基因重组工程菌。为了获得一定量的HSPC016蛋白,需通过重组菌的繁殖发酵,一方面要提高发酵菌体数量及目的蛋白HSPC016的表达量,同时需兼顾节省原料、降低成本。本研究拟通过对培养基的选择、葡萄糖浓度的控制、营养物的补充、pH及溶氧调节等方法达到上述目的。

1 材料与方法

1.1 菌种

含人毛乳头细胞HSPC016基因的重组表达质粒HSPC016/pET-28a(+)由本科构建,HSPC016基因ORF序列为195 bp,所表达目的蛋白Mr为7 255,宿主菌为*E.coli* BL21。

1.2 培养基

菌种培养采用LB培养基,发酵使用LB、M9-CAA和改良M9-CAA培养基(LB、M9-CAA培养基的配制参照文献[5])。M9-CAA含0.6% Na_2HPO_4、0.3% KH_2PO_4、0.1% NH_4Cl、0.05% NaCl和0.6% CAA,改良M9-CAA则是在M9-CAA的基础上添加酵母浸出液和K^+、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}、PO^{4-}等离子溶液而成。所有培养基均用5 mol/L NaOH调节pH至7.0。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200249)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200249)
作者简介:邹 锋(1972-),男,四川省西充县人,硕士研究生,医师,主要从事皮肤毛囊疾病方面的研究。电话(023)68765416
通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416
收稿日期:2004-12-16;修回日期:2005-03-17

1.3　补料

20%葡萄糖、8%胰化蛋白胨和 8%酵母提取物。

1.4　发酵罐

德国 B.Brau 公司 C-10 型 5 L 自控发酵罐,由计算机控制操作,可显示温度、pH、溶氧、转速。

1.5　诱导剂

IPTG 购自 Promega 公司。

1.6　细菌的培养方法

1.6.1　种子菌的活化　　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,相同条件培养 4 h,成为活化种子,4 ℃可保存 2 周。

1.6.2　IPTG 的诱导　　IPTG 采用 20、50、200、500、800 μmol/L 5 种浓度进行诱导,诱导时间 0~24 h,每 1 小时取 1 次标本。

1.6.3　三角烧瓶培养　　取活化的种子,以 2%的比例接种于含 LB 培养基的三角烧瓶中,37 ℃、200 r/min 培养 10 h,可以作为发酵罐的菌种,也可以用 IPTG 诱导后结束培养。考虑到三角烧瓶中调节 pH 比较困难,因此每隔 2 小时加氨水调 pH 至 7.0。

1.6.4　发酵罐级联溶氧控制的分批培养　　所谓级联控制 DO_2 发酵,就是 DO_2 控制器为主控制器,搅拌与通气控制器为伺服控制器,设置二者为级联状态,即 DO_2 控制器的输出直接作用于搅拌与通气控制器的设置点。本实验采用 50%、70%和 90% 3 种溶氧条件进行研究。取三角烧瓶培养的种子,按发酵罐工作体积的 4%接种,自动加入 30%的氨水使 pH 值保持在 7.0 左右,培养过程中不补料。

1.6.5　发酵罐级联溶氧控制的分批补料培养　　根据发酵实验,流加补料分两个阶段进行,发酵过程中在 A_{600} 未达到 2 时不加补料,之后每 3 小时流加补料 1 次,使葡萄糖、胰化蛋白胨和 8%酵母提取物的终浓度分别为 0.5%、0.2%和 0.2%。

1.7　分析方法

1.7.1　菌体浓度和质量　　细菌浓度用分光光度计测 600 nm 的光吸收值(A_{600},光吸收值与细菌湿质呈线性),菌体质量由天平称量。

1.7.2　菌体总蛋白的测定　　紫外分光光度法测定菌体蛋白。取不同 A_{600} 值的菌液 10 ml,5 000 r/min,清洗 2 次,超声破菌 20 次,每次 30 s,取样测定。

1.7.3　HSPC016 的表达量测定　　由 SDS-PAGE 检测。先用 SDS-PAGE 染液染色,脱色后,由灰度扫描仪测出 HSPC016 占菌体总蛋白的百分含量。

2　结果

2.1　培养基的比较

选择 3 种不同的发酵培养基进行发酵。就菌体生长而言,LB 发酵周期长且菌体量少;M9-CAA 可使菌体快速增长,但对数期短;改良 M9-CAA 不仅使菌体生长速度快,对数期也延长,见表 1。就 HSPC016 的表达量而言,3 种培养基 HSPC016 分别占全菌蛋白的 16.0%、16.8%和 18.0%。因此,改良 M9-CAA 是较为理想的培养基,后面的发酵均采用改良 M9-CAA。

表 1　不同培养基发酵结果比较

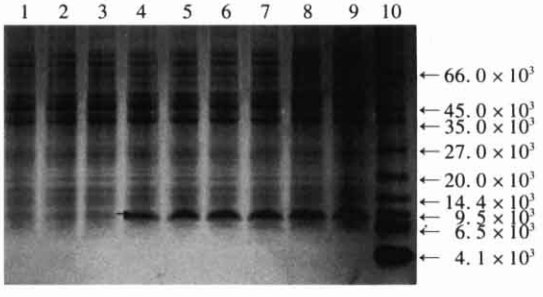
Tab 1　Fermentation of gene engineering *E. coli* strain using various media

Medium	A_{600}	Cell output(g/L)	HSPC016(g/L)
LB	8.1	15.5	2.8
M9-CAA	13.8	27.8	5.0
Improved M9-CAA	26.2	45.0	8.2

2.2　IPTG 的诱导

2.2.1　培养中起始诱导浓度对细菌生长和 HSPC016 表达的影响　　在细菌生长的对数周期(培养 10 h)用 IPTG 进行诱导可以获得较高的产率(8.2 g/L),比后期(培养 14 h)诱导(6.1 g/L)提高了 34%。IPTG 终浓度为 20、50 μmol/L 时表达量不及 10%,100、200 μmol/L 时的表达量均为 12%,500 μmol/L 时的表达量达到 18.0%(最高值),800 μmol/L 时为 16.1%,故选择诱导浓度为 500 μmol/L。

2.2.2　培养中诱导培养时间对细菌生长和 HSPC016 表达的影响　　重组菌 HSPC016 表达量开始随时间延长而增加,在三角烧瓶中 10 h 时达高峰,占细菌总蛋白的 18.0%,以后随时间延长而降低,诱导 24 h 的表达量与诱导 2 h 的表达量相近。细菌在发酵罐中的营养条件和代谢方式与三角烧瓶中不同,诱导后 4 h 达峰值(图 1)。



1, 2: Recombinant strain pET-28a(+)/BL21(DE3) before and after induction; 3 - 9: Recombinant strain pET-28a(+)/HSPC016/BL21(DE3) induced for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h; 10: Protein molecular weight marker. The arrow points to the target protein of HSPC016.

图 1　IPTG 诱导不同时间对 HSPC016 表达的影响

Fig 1　Influence of induction time with IPTG on the expression of HSPC016

2.3　葡萄糖浓度对菌体生长和表达量的影响

在改良 M9-CAA 培养基中加入不同浓度的葡萄糖,由于耗糖产酸过多,2 h 后 pH 值随葡萄糖浓度变化降低到 5.2~6.6。考虑到三角烧瓶中调节 pH 比较困难,因此每隔 2 小时加氨水调 pH 至 7.0。实验表明在三角烧瓶中当葡萄糖浓度高达20 g/L 时,最终菌体密度有所下降。HSPC016 的表达量也下降。在发酵罐中采取限制性流加葡萄糖,始终保持基质中较低的碳源浓度(6~10 g/L),并适当延长培养时间方法,取得了较好的效果。

2.4　补料的作用

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,如胰化蛋白胨、酵母抽提物、K^+、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}、PO^{4-} 等离子,与不加补料的发酵相比,菌体产量增加近 1

倍,达到 42 g/L,对数生长期延长至 8 h,表达量不变,见图 2。

对比培养结果表明,分批培养的最终菌体密度 A_{600} 仅为 4.7,表达量只有 9%,每升发酵液中目的蛋白的含量仅为 1.27 g,而通过控制溶氧和限制性补加葡萄糖及其它补料的培养,最终菌体密度 A_{600} 可以达 24.3,表达量达 18.0%,目的蛋白的含量为 8.2 g/L。

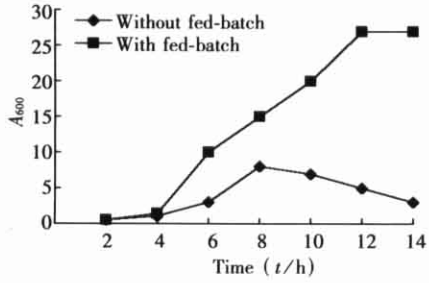


图 2 非补料发酵与补料发酵的比较

Fig 2 Fermentation with and without fed-batch

2.5 pH 的控制对产量的影响

发酵过程中的 pH 是通过氨水来调节的,结果表明每克菌体所消耗的氨水量随目的蛋白产率的增加而减少(图 3)。

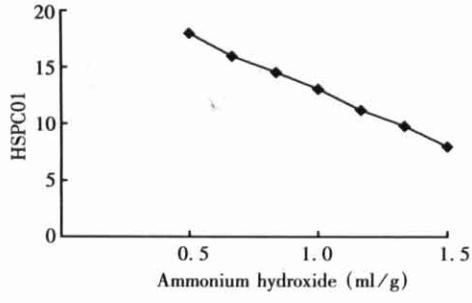


图 3 氨水消耗量与 HSPC016 产量的关系

Fig 3 Relationship between consumed ammonium hydroxide and expressed HSPC016

2.6 溶氧对产量的影响

对 50%、70%、90% 3 种溶氧条件进行比较,发现溶氧为 70%时产量最高,达 8.2 g/L,50%和 90%时产量相对减少,分别为 7.1、6.8 g/L。

3 讨论

外源基因的表达会受各种因素的影响。这些因素主要包括:培养基的选择、葡萄糖浓度的控制、营养物的补充、诱导的时机和诱导剂的浓度、pH 及溶氧的调节等。

在基因工程菌的发酵过程中,必须补加氮源、碳源及一些金属离子等。对 LB、M9-CAA、改良 M9-CAA 3 种培养基进行比较发现,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,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,但对数期短,后劲不足。在改良 M9-CAA 中添加酵母浸出液和微量元素后,不仅生长速度快,对数期也延长了。

实验表明,IPTG 诱导的时机和诱导时菌体密度对表达水平和比生产率有较大影响。在细菌生长的对数中期诱导比早期和后期诱导产率高,这是因为在对数生长早期,宿主菌的数量还非常有限,而诱导后菌体生长状态受到了极大影响,能量转向外源蛋白,导致目的蛋白的产率大为降低;而在对数生长后期,营养消耗和环境恶化引起细菌生长状态下降,表达外源基因的能力也随之降低。所以应在对数中期进行诱导。

研究证实,分批补料可通过限制性流加碳源控制细菌的代谢途径,使比生长速度不致过高,降低葡萄糖效应,避免底物限制作用,减少有害代谢物的产生,故细菌可稳定生长,在较短时间内达到较高生物量[6]。

发酵过程中氨水主要用于中和发酵所产生的乙酸,其用量可反映出菌体的生长速率大小,氧气是否充足,葡萄糖浓度是否合适以及目的蛋白的表达水平[7]。我们的研究证明每克菌体所消耗的氨水量与 HSPC016 产率随目的蛋白产率的增加而减少。

溶氧过高和过低都会影响细菌的代谢,使后期的生长变得极为缓慢[7]。我们的研究证明溶氧为 70%时比 50%和 90%时产量都高。

人毛乳头细胞 HSPC016 基因重组菌通过以上发酵条件的优化,菌体单产可达 45 g/L,目的蛋白表达量约占总蛋白的 18%,在多批次发酵中,稳定性和重复性均达到要求,为目的蛋白 HSPC016 的进一步大量制备和应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Hardy M H. There secret life of the hair follicle[J]. Trends Genet, 1992, 8(1): 55-61.

[2] Bratka-Robia C B, Mitteregger G, Aichinger A, *et al*. Primary cell culture and morphological characterization of canine dermal papilla cells and dermal fibroblasts[J]. Vet Dermatol, 2002, 13(1): 1-6.

[3] 宋志强, 郝 飞, 杨希川, 等. 毛乳头细胞凝集性生长差异表达基因的筛选及分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(9): 513-515.

[4] Zhang Q H, Ye M, Wu X Y, *et al* . Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34$^+$ Hematopoietic stem/progenitor cells[J], Genome Res, 2000, 10(10): 1546-1560.

[5] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 908-910.

[6] 张春丽, 赵世新, 肖锡岭, 等. 表达 α-2a 干扰素工程菌的大型罐级联控制溶氧发酵研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1998, 11(4): 215-218.

[7] 熊宗贵, 白秀峰, 徐亲民, 等. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003. 134-136, 143-147.

(编辑 陈聪连)