文章编号:1000-5404(2008)22-2152-03

技术方法

重组呼吸道合胞病毒G蛋白基因工程菌的发酵条件研究

李 光,井申荣,岳婷婷,季秀玲,林连兵,魏云林 (昆明理工大学生物工程技术研究中心,昆明 650224)

摘 要:目的 研究呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)G蛋白基因工程菌的发酵工艺。**方法** 通过摇瓶培养初步确定工程菌的最适生长条件和表达条件,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,对发酵工艺进行改良优化。**结果** 确定了RSV G蛋白基因工程菌发酵罐培养的各项条件的最佳组合:在LB+葡萄糖的培养基中,搅拌速度为200 r/min,培养温度为37 ℃,pH值为7.0,诱导时温度为25 ℃,IPTG浓度为0.01 mmol/L,优化后工程菌菌体的产量可以达到39.20 g/L,目的蛋白表达率平均为18.1%。**结论** 建立了稳定高效的重组RSV G工程菌发酵工艺。

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿呼吸道感染的主要病原体之一[1],全球每年有近400万儿童受其感染。G蛋白是RSV A、B两亚型病毒具有免疫原性的被膜蛋白之一[2,3],主要介导病毒与宿主之间的黏附,也是目前开发抗RSV药物和疫苗的一个重要靶蛋白[3,4]。要获得大量的RSV G蛋白,需要通过重组G蛋白的工程菌发酵,一方面提高发酵菌体的湿质量和干质量,另一方面提高目的蛋白的表达产量,同时还要考虑节约原料和降低成本方面的因素。本研究对重组RSV G蛋白工程菌的发酵培养基、诱导条件、补料等进行了研究,以建立稳定高效的RSV G蛋白工程菌发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

工程菌G-pET22b/BL21(DE3)由本实验室构建并保存,BLOFLO 410自控发酵罐(美国NBS公司),蛋白胨、酵母抽提物由OXIDE公司提供,IPTG购自Sigma公司,蛋白质定量试剂盒Protein assay Kit购自Bio-Rad公司,其他试剂为国产和进口分装分析纯。LB+葡萄糖、M9-CAA、M9培养基由本实验室自己配制。

1.2 方法

1.2.1 种子菌的活化 取冻存于-80 ℃、含10%甘油保存的菌种50 μl,接种于5 ml LB培养基中,37 ℃、200 r/min培养过夜,然后按1%转接入50 ml LB中,相同的条件培养4~5 h,$D(600)$值达到1.5左右即可成为活化种子。

1.2.2 摇瓶培养 在500 ml摇瓶中加入LB培养基200 ml,取活化的种子,以1%的接种量进行培养。依次对培养基、培养温度、诱导时间、气体条件及pH等工程菌培养条件进行初步摸索,为发酵做好准备。

1.2.3 发酵罐培养 在发酵罐中,通过分批补料,检测培养过程中菌的干湿质量、目的产物表达效率、培养基中葡萄糖含量等指标,对工程菌的发酵条件进行摸索。

1.2.4 分析方法 工程菌密度测定:取菌液适当稀释后,在600 nm波长处测吸光度值[$D(600)$]。工程菌干湿质量的测量:Beckman高速离心机5 000 r/min离心10 min,弃去上清,天平测量菌体沉淀质量,沉淀烘干至恒质量后进行测量。菌体总蛋白的测定:紫外分光光度法测定细菌总蛋白。可溶及包涵体的测定:将诱导后的工程菌超声破碎,13 000 r/min离心,上清和沉淀分别进行SDS-PAGE,确定是否为可溶性表达。目的蛋白产率分析:留取样本,进行SDS-PAGE,经电泳、染色、脱色、扫描后用Bio-Rad公司的Quantity one软件分析蛋白表达率。

1.3 统计学分析

对每次发酵后的工程菌的湿质量、目的蛋白表达率、可溶蛋白所占比率进行统计学分析,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,数据用Excel进行处理。

2 结果

2.1 摇瓶培养

2.1.1 培养基的确定 采用LB+葡萄糖、M9、M9-CAA 3种培养基进行培养,培养温度为37 ℃,用相同的接种量进行培养,所得工程菌$D(600)$随时间变化(图1)。摇瓶培养12 h结束后,菌体湿质量分别为8.5、7.4、3.7 g/L,各组之间差异显著($P<0.05$),表明LB+葡萄糖为工程菌最适生长培养基。

2.1.2 培养最适温度的确定 在培养过程中采用25、30、37、40 ℃ 4种温度进行研究,培养基为LB+葡萄糖,摇瓶培养12 h结束后,工程菌湿菌量分别为7.6、7.8、8.9、8.1 g/L,各组之间差异显著($P<0.05$),说明该菌的最佳生长温度为37 ℃。

2.1.3 培养中pH值的确定 在培养过程中pH分别选用6、6.5、7、7.5,培养温度为37 ℃,培养基为LB+葡萄糖,摇瓶培养12 h结束后,工程菌湿菌量分别为7.5、7.4、8.0、7.8 g/L,各组之间差异显著($P<0.05$),说明该菌的最佳生长pH为7.0。

基金项目:昆明理工大学科研启动项目;云南省应用基础面上项目(2007C032M)
Supported by the Initial Funds of Kunming University of Science and Technology and the General Program of Basic Research and Application of Yunnan Province(2007C032M)

作者简介:李 光,男,辽宁省锦州市人,硕士研究生,主要从事生物制药方面的研究。电话:(0871)3801018, E-mail: liguang820701@126.com
通信作者:井申荣,E-mail: jingshenrong@163.com

收稿日期:2007-12-16;修回日期:2008-03-11

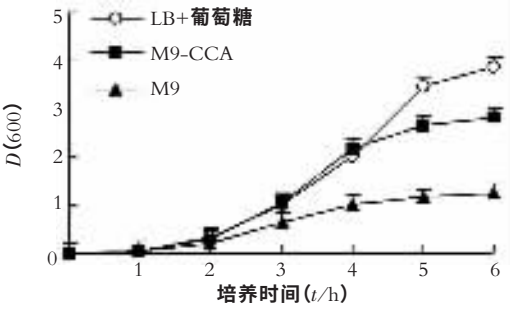


图 1　基因工程菌在 3 种不同培养基中的生长曲线

2.1.4　IPTG 浓度对诱导的影响　　工程菌在 37 ℃进行摇瓶培养,培养基为 LB + 葡萄糖,pH 7.0,在对数中期[D(600)值约为 1.0]时,加入诱导物进行诱导,IPTG 的终浓度为 0.1、0.25、0.5、1.0 mmol/L,诱导时间为 2.5 h[5],SDS-PAGE 和软件分析蛋白的表达水平,结果 4 个浓度的 IPTG 对目的蛋白表达效率分别为 17%、18.1%、17.5%、18.2%,无显著性差异(P > 0.05,图 2),故选择 0.1 mmol/L 进行诱导。

2.1.5　目的蛋白表达形式的测定　　重组菌生长阶段都采用 37 ℃培养,在诱导阶段,分别采用 16、25、37 ℃ 3 种温度加入终浓度 0.1 mmol/L IPTG 进行诱导表达,通过菌体离心、超声破菌、离心,分离包涵体和上清,SDS-PAGE 和软件分析目的蛋白的表达形式及表达率。在 16 ℃下,菌的湿质量较少,蛋白表达量很低(11.7%),但为可溶性蛋白,可溶蛋白所占比率为 98.8%;25 ℃下,菌的湿质量为 7.6 g,蛋白表达率为 17.1%,大部分为可溶性蛋白,可溶蛋白所占比率为 71.8%;37 ℃诱导时,菌体湿质量为 8.85 g,表达量为 21.4%,但表达蛋白大多都是包涵体,可溶蛋白所占比率为 18.5%。上述数据表明在 25 ℃诱导有利于下游纯化(目的蛋白带有 His-Tag)。

2.2　发酵罐培养

根据摇瓶中所确定的条件,在发酵罐中采用 LB + 葡萄糖为培养基,pH 稳定在 7.0 左右,培养温度为 37 ℃,诱导温度为 25 ℃,IPTG 浓度为 0.1 mmol/L。

2.2.1　补料的影响　　发酵过程中,要分批补入碳源和氮源,碳源主要以葡萄糖为主,氮源则以 LB 为主,通过溶氧(DO)来反映碳、氮源的利用情况。在通气量和搅拌速度不变的情况下,DO 升高意味着菌体的代谢停止,提示发酵体系中的碳、氮源有 1 种已耗竭,考虑加入补料。

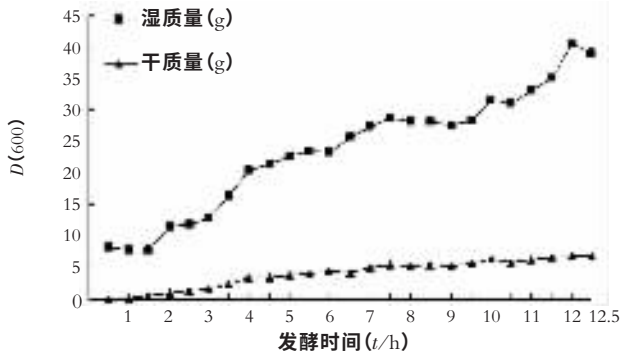
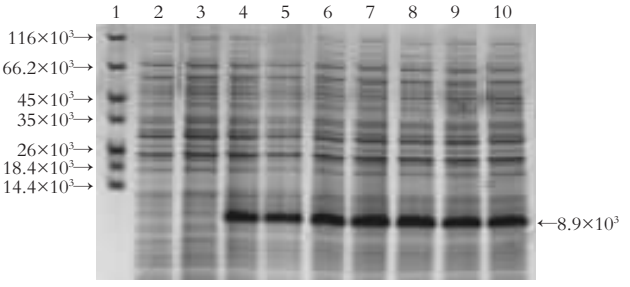


图 2　发酵过程中菌的干、湿质量变化

2.2.2　培养和诱导时间对菌体生长的影响　　制备种子菌,发酵体积为 5 L,按 1% 接种。基因工程菌的生长量随发酵时间的延长而增加,在接种 9 h 后进行诱导,IPTG 浓度为 0.1 mmol/L,诱导之后工程菌菌量仍持续增加,在诱导后期达到峰值并停止增长,菌的湿质量为 39.20 g/L,干质量为 6.95 g/L(图 2)。

2.2.3　诱导时间对 RSV G 蛋白表达的影响　　接种 9 h 后进行诱导,诱导时菌的 D(600)值为 28.4,经 Quantity one 软件分析,在诱导后每 0.5 h 的蛋白表达率分别为 16.7%、17.8%、17.6%、17.0%、18.1%、16.3%、16.4%。因此,RSV G 蛋白的表达量并非一直增加,而是随时间延长呈现先升后降的趋势,但是变化没有显著性差异(P > 0.05,图 3)。



1:蛋白标准;2:接种 1.5 h;3:接种 9 h;4 ~ 10:分别为诱导 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 h

图 3　发酵阶段的目的蛋白可溶性蛋白表达量分析

2.2.4　RSV G 蛋白基因工程菌的产量及可溶性蛋白表达率　　经多批发酵产物进行测定,RSV G 蛋白的基因工程菌的产量比较稳定,其中菌体湿质量平均为 39.20 g/L,目的蛋白表达率平均为 18.1%。

3　讨论

在建立发酵工艺之前,必须在摇瓶中对基因工程菌的生长条件进行摸索,可以减小直接上罐发酵的盲目性。本实验在摇瓶培养中分别对影响工程菌生长的各种因素如生长温度、pH、气体条件、IPTG 诱导浓度、目的蛋白的表达形式等进行了摸索并加以确定,虽然在 37 ℃时菌的表达量大,但由于产生的目的蛋白都为包涵体形式,所以在发酵时并没有采用 37 ℃下诱导,采取的温度为 25 ℃,蛋白表达量虽低了一点,但大多为可溶形式,有利于下游纯化。

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,因此建立一套稳定成熟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:M9 培养基由于营养缺乏,所以菌的生长速度和生长量都很低;M9-CCA 培养基,营养丰富,在菌的生长阶段速度较快,但在菌生长的后期生长速度下降,显得后劲不足,这与以前的实验结果吻合[6];LB + 葡萄糖培养基补料简单,能够满足菌体生长所需的碳源和氮源,再有

通过对葡萄糖的检测可以简便地判断菌体的生长状况,以便进行补料和诱导。②诱导温度:基因工程菌的最佳生长温度为37 ℃,表达量最大,但目的蛋白主要以包涵体的形式存在;25 ℃时表达量虽不高,但目的蛋白主要以可溶性形式表达,故25 ℃诱导最为合适。③诱导物IPTG的浓度:本实验采取4个浓度诱导目的蛋白的表达量没有差异,从经济的角度考虑,采取最小浓度0.1 mmol/L。④诱导时间:目的蛋白表达量随时间的增长无明显变化,可能由于该蛋白相对分子质量太小,很利于合成,不同以往的报道[6]。

本研究经对以上多种影响因素进行摸索优化,建立了稳定、高救的发酵工艺。多次发酵结果表明:RSV G蛋白基因工程菌的菌体湿质量可达39.2 g/L,表达率平均可达18.1%。为充分发挥该菌株的生产性能,大幅度提高生产水平并降低原材料消耗提供了实验依据。

关键词:呼吸道合胞病毒;G蛋白;发酵

中图法分类号:Q815 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus—viral biology and the host response[J]. J Infect, 2002, 45(1): 18-24.

[2] Brandenburg A H, Neijens H J, Osterhaus A D. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development [J]. Vaccine, 2001, 19(20-22): 2769-2782.

[3] Godefroy S, Goestch L, Plotnicky-Gilquin H, *et al*. Immunization onto shaved skin with a bacterial enterotoxin adjuvant protects mice against respiratory syncytial virus (RSV)[J]. Vaccine, 2003, 21(15): 1665-1671.

[4] Sullender W M, Britt W J. Antigenic and immunogenic analysis of group A and group B respiratory syncytial virus G proteins expressed from recombinant baculoviruses[J]. J Gen Virol, 1996, 77(Pt 4): 641-648.

[5] 张 彩, 王郡甫, 刘金生,等. 重组人白细胞介素15工程菌高密度发酵条件探讨[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 1-3.

[6] 田文标, 邹全明, 张卫军. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 115-118.

(编辑 张 维)

《第三军医大学学报》对一稿两投和重复发表问题处理的声明

为维护本刊的声誉和广大读者的利益,尊重审稿专家和编辑工作者的劳动,坚决杜绝学术不端行为,我刊编辑部在加强稿件初审和刊用前查重工作的基础上,受编委会的委托,就一稿两投和重复发表问题的处理声明如下:

1. 凡属原始研究的报告,同语种一式两份(或多份)投寄不同的杂志,或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿,分别投寄不同的杂志,属一稿两投;一经两个(或多个)杂志刊用,则为重复发表。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志,以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一种杂志,不属一稿两投。但作者若要重复投稿,应向本刊及相关期刊编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满3个月未接到退稿通知,表明稿件仍在处理中,若欲投他刊,应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或重复发表嫌疑时,我们将认真收集有关资料并仔细核对后通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出书面解释。若作者对编辑部的认定和处理有异议,可书面申诉,由编辑部上报校学术规范委员会进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实,立即退稿,由供稿编辑书面通知作者退稿原因给予警示;对该作者作为第一作者及通信作者所撰写的论文,2年内拒绝在本刊发表;供稿编辑汇总该文稿所有材料,就处理情况提交书面报告,编辑部留存备案。

重复发表一经证实,将择期在期刊中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告;对该作者作为第一作者及通信作者所撰写的论文,2年内拒绝在本刊发表;向作者所在单位科研管理部门和相关期刊通报情况。

特此声明。

本刊编辑部