DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.018
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)15-1375-03

论著

重组幽门螺杆菌粘附素工程菌高密度发酵条件的研究

刘正祥,邹全明,洪 愉,朱永红 (第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究重组幽门螺杆菌粘附素基因工程菌的发酵工艺。方法 采用德国B. Brau公司C-10型15 L发酵罐发酵,对影响工程菌生长和目的蛋白的表达条件进行了优化。结果 在优化的条件下,15 L发酵罐发酵工程菌,菌体收获量可达48.2 g/L,目的蛋白表达量约占总蛋白的31.5%。结论 此发酵工艺可以提高工程菌收获和目的蛋白的表达。

关键词:幽门螺杆菌粘附素;发酵;大肠杆菌
中图法分类号:R377;R392.11;TQ920.6 文献标识码:A

Study of the fermentation conditions for engineering *E. coli* expressing fusion protein of HpaA

LIU Zheng-xiang, ZOU Quan-ming, HONG Yu, ZHU Yong-hong (Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 40038, China)

Abstract: Objective To investigate the fermentation conditions of gene engineering *E. coli* strain for expression of *Helicobacter pylori* adhesin (N-acetylneuraminyl-lactose-binding haemagglutinin, HpaA). Methods The expression of recombinant fusion protein was analyzed for optimizing the composition of the media, the range of pH, induction time, and other factors in fermentation task. Results Under the optimal fermentation conditions, the cell output and expression rate of HpaA reached 48.2 g/L and 31.5%, respectively. Conclusion Both the recovery rate of gene engineering *E. coli* strain and expression level of HpaA can be improved under the fermentation condition.

Key words: *Helicobacter pylori*; adhesin; fermentation; *Escherichia coli*

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染致病的第一步是粘附定值。组织学研究表明,在胃内Hp只见于胃上皮细胞,一般大量存在于胃窦部,能在胃内定植是Hp致病的前提[1~4]。介导Hp粘附过程的粘附因子称为粘附素,是细菌粘附定居的物质基础。Hp与胃上皮细胞间的粘附力极强,不同Hp菌株在粘附同一胃粘膜组织时表现出明显的差异,提示存在着复杂的粘附素和受体系统[5,6]。研究表明N-乙酰神经氨酰乳糖结合原纤维血凝素(N-acetylneuraminyl-lactose-binding haemagglutinin, NLBH, HpaA)是Hp的主要粘附素之一。近年来Hp基因工程疫苗的研究进展迅速,HpaA以其特异性的粘附特点而成为众多亚单位疫苗的候选成分。本研究对重组工程菌发酵工艺,对影响工程菌生长和目的蛋白的表达条件进行了优化。建立了工程菌的中试发酵工艺,为规模化工业生产打下了基础。

基金项目:"十五"国家"863"生物与现代农业技术领域生物工程技术主题课题(2001AA215161)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2001AA215161)
作者简介:刘正祥(1969-),男,贵州省台江县人,硕士,主治医师,主要从事医学检验及基因工程疫苗方面的研究,发表论文13篇。电话:(023)68752315
通信作者:邹全明,E-mail:qmzou@mail.tmmu.com.cn,电话:(023)68752316
收稿日期:2003-06-25;修回日期:2004-01-05

1 材料与方法

1.1 菌种

重组HpaA(rHpaA)基因工程菌,由本室构建及保存。

1.2 培养基

LB、M9-CAA培养基按文献[7]的方法,改良M9-CAA为本室改良配制。改良M9-CAA培养基是在M9-CAA的基础上添加0.6%酵母浸出液和及其它离子溶液而成。

1.3 补料

20%葡萄糖,8%胰化蛋白胨和8%酵母提取物及微量元素(80 mg/L $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$、80 mg/L $CoCl_2 \cdot 4H_2O$、160 mg/L $FeSO_4 \cdot 16H_2O$、200 mg/L H_3BO_3、64 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、160 mg/L $CuSO_4$)。

1.4 发酵罐

德国B. Brau公司C-10型15 L发酵罐,级联控制的溶氧等具体操作按发酵罐操作手册进行。

1.5 方法

1.5.1 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,相同的条件培养4 h,成为活化种子,4 ℃可保存2周。

1.5.2 摇瓶培养 在500 ml摇瓶中加入含50 μg/ml氨苄青霉素LB培养基100 ml,取活化的种子,以2%接种量进行培养。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分别对:①培养中最适温度采用30、37、40 ℃ 3种温度进行研究;②培养中最适 pH 值选用6.5、7.0、7.5 3个梯度进行研究;③培养中最适气体条件采用100、200、300 r/min 3种条件进行研究;④ 异丙基硫代β-D-半乳糖(isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG)的诱导研究,采用250、500、1 000、1 500 μmol/L 4种浓度进行诱导;诱导时间0~15 h,每3 h取1次标本;⑤利福平对rHpaA表达的影响,根据文献[8]在IPTG诱导30 min后加入利福平至终浓度150 μmol/L。

1.5.3 发酵罐级联溶氧(dissolved oxygen, DO)控制的分批培养 取活化的种子,以2%种量接种于含LB培养基的500 ml摇瓶中,按摇瓶摸索条件培养作为发酵罐的菌种。对LB、M9-CAA、改良M9-CAA 3种培养基和溶氧50%、70%、90% 3种气体条件进行比较。以DO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控制器的输出直接作用于搅拌与通气控制器的设置点。取摇瓶培养的种子,按发酵罐工作体积的10%接种,培养过程中不补料。

1.5.4 发酵罐级联溶氧控制的分批补料培养 在级联溶氧控制的分批培养的基础上,根据发酵的实际经验流加补料。分2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 h流加补料1次使胰化蛋白胨和酵母抽提物的终浓度分别为0.2%和0.2%,使微量元素终浓度分别为2 mg/L $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$、2 mg/L $CoCl_2 \cdot 4H_2O$、4 mg/L $FeSO_4 \cdot 16H_2O$、5 mg/L H_3BO_3、1.6 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、4 mg/L $CuSO_4$。限制性流加葡萄糖,用GLUCOTREND2血糖仪进行监测,使葡萄糖的终浓度保持在0.5%、1.5%、2.5% 3种梯度进行比较。

1.5.5 菌体浓度和重量 细菌浓度用分光光度计于600 nm波长处测光吸收值 A_{600},菌体重量用天平进行称量。

1.5.6 目的蛋白的表达率测定 依前法处理12.5% SDS-PAGE电泳,PAGE电泳图经凝胶扫描仪扫描、Gel-Pro Analyzerv.3.0软件分析重组蛋白表达率。

1.6 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0软件进行统计学分析,采用单因素方差分析及均数多重比较,方差不齐时采用Tamhane法比较。

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 ℃等3种温度进行研究,rHpaA菌所得湿菌量分别为8.2、11.5、9.0 g/L,说明最适温度为37 ℃。

2.1.2 培养中最适pH值的确定 在培养过程中pH值选用6.5、7.0、7.5等3个梯度,培养温度为37 ℃时,rHpaA菌所得湿菌量分别为8.6、10.3、12.6 g/l,说明pH 7.5为最适pH值。

2.1.3 培养中最适气体条件的确定 在培养过程中采用100 r/min、200 r/min、300 r/min等3种气体条件进行研究,在培养温度为37 ℃,培养基pH值为7.5时,rHpaA菌所得湿菌量分别为8.8、10.3、12.1 g/l,说明此株基因工程菌为需氧生长,气体条件越好,基因工程菌生长越好。

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、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。

2.1.5 利福平对rHpaA表达的影响 在37 ℃、pH 7.5和300 r/min的条件下,rHpaA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rHpaA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。说明加入利福平可以提高目的蛋白表达率,但对菌量的增加有抑制作用。

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值稳定在7.5左右,温度保持37 ℃,DO维持在50%以上,IPTG的诱导浓度为500 μmol/L。

2.2.1 培养基的比较 应用LB、M9-CAA和改良M9-CAA 3种不同的培养基,15 L发酵罐发酵,处理方法同前。结果显示在应用改良M9-CAA培养基时工程菌量和重组蛋白的表达优于LB和M9-CAA(表1)。

表1 工程菌在3种培养基中的发酵结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of fermentation in 3 media ($\bar{x} \pm s$)

Medium	n	Fusion protein (%)	Cell output (g/L)
LB	3	23.5±0.5	25.4±0.5
M9-CAA	3	26.6±1.5 *	28.7±1.1
Improved M9-CAA	3	31.5±1.3 **△△	48.2±2.9 **△△
F		34.617	136.34
P		0.001	0.000

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$, *vs* LB; △△: $P<0.01$, *vs* M9-CAA

2.2.2 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、酵母提取物、K^+、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Co^{2+}、PO_4^{3-} 等离子,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,对数生长期延长,菌体产量增加,rHpaA蛋白的表达率也得到提高(表2)。

表2 非补料与补料发酵结果比较($\bar{x} \pm s$)

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

Fed-batch condition	n	A_{600}	Bacteria weight of rHpaA (g/L)	Expression rate of rHpaA (%)
Unsupplied	3	4.2±0.4	10.3±0.6	19.0±0.4
0.05% Glucose	3	15.8±1.1 **	29.2±2.2 **	22.1±1.9
0.15% Glucose	3	26.3±1.7 **△	42.0±0.9 **△△	31.5±1.0 **△△
0.25% Glucose	3	22.8±1.1 **△△	36.6±1.4 **△△▲▲	25.0±1.3 **▲▲
F		216.812	296.210	54.804
P		0.000	0.000	0.000

**: $P<0.01$, *vs* unsupplied; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* 0.05% glucose; ▲▲: $P<0.01$, *vs* 0.15% glucose

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,发现溶氧为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($\bar{x} \pm s$)

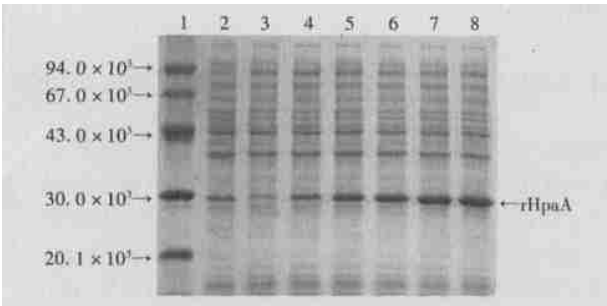
Tab 3 Effects of dissolved oxygen on fermentation results ($\bar{x} \pm s$)

Condition of dissolved oxygen	n	A_{600}	Bacteria weight of rHpaA (g/L)	Expression rate of rHpaA (%)
50%	3	18.8±2.3	35.2±0.8	28.2±1.8
70%	3	23.5±1.1 *	40.1±1.9 **	30.4±1.6
90%	3	20.6±1.4	35.8±0.4△	25.1±0.9△
F		5.905	14.578	9.654
P		0.038	0.005	0.013

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 50% group; △: $P<0.05$, *vs* 70% group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.4　发酵中诱导培养时间对细菌生长和 rHpaA 表达的影响　细菌在发酵罐中的营养条件和代谢方式与摇瓶中不同, rHpaA 基因工程菌在诱导 4 h 后目的蛋白的表达达到峰值(图 1)。



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 1　IPTG 诱导时间对 rHpaA 表达的影响

Fig 1　Effects of induction time with IPTG on the expression of rHpaA

2.2.5　pH 值的控制对产量的影响　发酵过程中的 pH 值是通过加入氨水来调节的, 结果表明生产每克菌体所消耗的氨水量与 rHpaA 估算产率(每 L 产率= 每 L 湿菌质量×0.2×0.6×表达率)有负的相关性(图 2)。

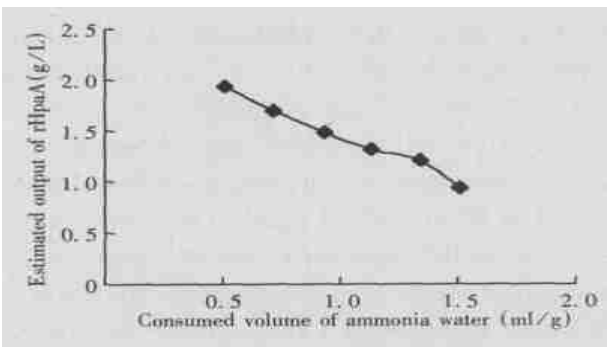


图 2　氨水消耗量与目的蛋白估算产量的关系

Fig 2　Relationship between consumed volume of ammonia water and estimated output of rHpaA

2.2.6　利福平对 rHpaA 菌发酵的影响　根据摇瓶培养结果, 在 IPTG 诱导 30 min 后加入利福平, 使 rHpaA 的表达率从 25% 提高到 30.1%, 湿菌收获量基本不变。说明利福平可以提高 rHpaA 的表达率, 但对菌量的增加有抑制作用。

3　讨论

微生物发酵的过程实际上就是生物细胞按照生命固有的一系列遗传信息, 在所处的营养和培养条件下, 进行复杂而细微的各种动态生化反应的集合, 所以它要受到许多生物、理化和工程环境因素的影响[9]。只有选择最合适的环境条件才能获得 HpaA 工程菌的高密度和高表达产物。使用改良 M9-CAA 培养基即在 M9-CAA 中添加酵母浸出液和微量元素后, 不仅生长速度快, 对数生长期也延长了, 而且目的蛋白的表达率也得到明显提高。

本研究采取分批流加补料的方式。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, 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, 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[10]。

溶氧过高和过低都会影响细菌的代谢, 使后期的生长变得缓慢[9]。对 50%、70%、90% 3 种溶氧条件进行比较, 发现溶氧为 70% 时目的蛋白的产量最高, 50%、90% 时产量相对减少。这一结果与以上发酵理论相符合。

IPTG 诱导的时机和诱导时菌体的密度对表达水平和生产率有较大的影响。诱导后菌体的生长状态受到了极大的影响, 呈现为对数生长末期状态。其原因可能为分裂旺盛细胞的能量转向外源蛋白表达, 因此菌体不再快速生长。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。在实际的发酵工作中应在细菌生长的对数中期进行诱导。

利福平可以提高 rHpaA 的表达率, 但对菌量的增加有抑制作用。所以, 如何把握好产量与表达率之间的平衡将是工程菌高密度发酵工艺中很值得研究的课题。在发酵中 IPTG 的诱导时机最好选在细菌生长到较高的密度时进行。这样, 利福平的加入既不会影响细菌收获量, 又达到了提高基因工程菌表达率的目的。

参考文献:

[1] Doyle J, Evens J, Dolores G E, *et al*. *Helicobacter pylori* adhesions: review and perspective[J]. Helicobacter, 2000, 5(4): 183－194.

[2] Valkonen K H, Wadstrom T, Moran A P. Identification of the N-acetylneuraminyllactose-specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori* [J]. Infect Immun, 1997, 65(3): 916－923.

[3] Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, *et al*. Helicobacter SabA adhesion in persistent infection and chronic inflammation[J]. Science, 2002, 297(5581): 573－578.

[4] Chow J Y, Ma L, Cho C H. The role of adhesion molecules in gastric ulcer healing[J]. World J Gastroenterol, 1998, 4(6): 467－468.

[5] Ilver D, Johansson P, Miller-Podraza H, *et al*. Bacterium-host protein-carbohydrate interactions[J]. Methods Enzymol, 2003, 363: 134－157.

[6] 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染-基础与临床[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 7－37.

[7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 908－910.

[8] Werner M H, Clore G M, Gronenborn A M, *et al*. Refolding proteins by gel filtration chromatography[J]. FEBS Lett, 1994, 345(2－3): 125－130.

[9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2000. 405－408.

[10] 张春丽, 赵世新, 肖锡岭, 等. 表达 α-2α 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.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net