DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.025
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1430 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1430-03

重组LTB-UreB融合基因工程菌发酵工艺研究

袁小澎,邹全明,曾 浩,王 宁,张卫军 (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 研究大肠杆菌表达重组人幽门螺杆菌尿素酶B亚单位和大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位(LTB-UreB)融合基因工程菌BL21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52.2 g/L,目的蛋白表达量约占总蛋白的27%。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:幽门螺杆菌尿素酶;大肠杆菌不耐热肠毒素;发酵;大肠杆菌
中图法分类号:R378.21;R394.3;TQ920.6 文献标识码:A

Study on fermentation process of fusion protein of LTB and UreB expressing *E. coli* BL21

YUAN Xiao-peng, ZOU Quan-ming, ZENG Hao, WANG Ning, ZHANG Wei-jun (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To develop the best fermentation process on *E. coli* BL21 expressing fusion protein of LTB and UreB. **Methods** The expression of recombinant fusion 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, 55.2 g of wet bacteria per liter was obtained and the derivative of recombinant fusion protein was about 27% of total protein in host. **Conclusion** The established fermentative technique increases the collection efficiency and expression of recombinant fusion protein.

Key words: *Helicobacter pylori* urease; heat labile enterotoxin; fermentation; *E. coli*

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)与多种上消化道疾病相关[1~4],1996年WHO将Hp列为"一级致癌因子"。疫苗的研究为Hp的预防和治疗提供了更好的选择[5]。尿素酶(Urease)是幽门螺杆菌中最为确定的一种保护性抗原,其免疫原性良好、稳定,由A、B两个亚单位组成(分子量分别为29.5×10^3和62×10^3),研究证实:尿素酶或其亚单位UreA/UreB口服免疫小鼠可预防小鼠HP感染,保护率达到为30%~80%,而其B亚单位以无毒性和更好的免疫原性,成为Hp疫苗有效亚单位的侯选者[6]。疫苗的研究中,粘膜免疫愈来愈受到人们的重视,胃有着人体最大的粘膜相关淋巴组织,存在粘膜免疫体系。Hp疫苗如果辅以有效诱发粘膜免疫的佐剂,活化Th2细胞免疫应答,产生大量的分泌型IgA,就能更好的发挥其免疫保护作用。大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)是目前应用较多的粘膜免疫佐剂,而LTB亚单位以其无毒性和较好的佐剂活性,已得到高度重视[7]。LTB亚单位与蛋白疫苗共免疫动物,虽然可以产生一定的免疫佐剂效果,但其免疫佐剂效果与LT全单位比较有明显减低[8,9]。在研究中我们将人幽门螺杆菌尿素酶B亚单位和大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位两个基因构建融合基因(LTB-UreB),共表达成LTB为分子内佐剂的融合蛋白,在大肠杆菌中获得了高表达。为了进一步对融合蛋白研究和应用,本研究对融合基因工程菌发酵工艺经多批次发酵,对影响工程菌生长和目的蛋白的表达条件进行了优化。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:国家"九五"重点科技攻关项目(96-901-01-54)
作者简介:袁小澎(1972-),男,河南省洛阳市人,博士研究生,助教,主要从事临床微生物诊断和预防方面的研究。电话:(023)68753591
收稿日期:2001-08-25;修回日期:2001-11-15

1 材料与方法

1.1 材料

含LTB-UreB融合基因的重组表达质粒pIM-LU由本室构建,宿主菌为*E. coli* BL21

德国B.Brau公司C-10型15 L发酵罐,蛋白胨、酵母抽提物为英国牛津公司,IPTG为Promega公司,其他试剂为国产和进口分装分析纯。培养基LB、M9-CAA按分子克隆实验指南,改良M9为本室改良配置。

1.2 方法

1.2.1 发酵用菌种的筛选 依前法转化质粒pIM-LU于BL21,涂布于Amp+的LB平板,挑取多个单菌落,分别依前法培养诱导。10%SDS-PAGE电泳,凝胶扫描分析仪上扫描分析,取表达量最高的细菌扩大培养,取新鲜饱和的的培养液(培养至对数生长期),1∶1与甘油溶液混合,-70 ℃保种。每批发酵取1支,以保证菌种的稳定性。

1.2.2 发酵罐培养 德国B.Brau公司C-10型15 L发酵罐,装料10 L,依次分别改变接种量,培养温度,级联控制的溶氧等具体操作按发酵罐操作手册进行。

1.2.3 分析方法[10] 菌密度测定:流动分光光度计测定600 nm波长A值。菌湿重测定:Beckman低温高速离心机6 000×g离心15 min,去上清测重。蛋白表达率分析:留样本,依前法处理10%SDS-PAGE电泳,PAGE电泳图经凝胶扫描仪扫描、Gel-Pro Analyzer v. 3.0软件分析重组蛋白表达率。

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

1.3　统计学分析

结果采用 SPSS 软件方差分析。

2　结果

2.1　发酵用培养基的筛选

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, 见表 1。

表 1　工程菌在 3 种培养基中的发酵结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of 3 different media on the expression of fusion protein ($\bar{x}\pm s$)

Medium	Fusion protein(%)	Cell output (g/L)
LB	27.46±1.08	25.39±0.62
M9-CAA	23.79±0.72	40.40±0.62
Improved M9-CAA	27.71±0.65 *	50.30±1.05△

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

2.2　不同比例种子菌对重组蛋白表达的影响

分别以 5%, 10%和 15%的接种量上罐, 处理方法如前。结果表明 5%的接种量接种时菌体延迟期较长, 重组蛋白表达量低。以 10%及 15%的接种量上罐, 延迟期短, 能够更好的表达重组蛋白, 见表 2。

表 2　不同接种量时的工程菌发酵结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of different cell suspension inocula on the expression of fusion protein($\bar{x}\pm s$)

Cell suspension inoculum (%)	Induction time (h)	Fusion protein (%)
5	4	22.4±071
10	3.5	27.6±1.08 *
15	3	26.02±0.90 *

*: $P<0.05$ *vs* 5

2.3　不同溶氧情况下重组蛋白的表达情况

在保持其他条件不变的情况下, 改变发酵中溶氧指数, 在 20%溶氧指数情况下, 重组蛋白的表达最为理想, 见表 3。

表 3　不同溶氧指数对蛋白的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Influence of dissolved oxygens on the expression of fusion protein($\bar{x}\pm s$)

Dissolved oxygen (%)	Fusion protein (%)	Cell output (g/L)
5	18.9±0.54	50.4±0.60
20	27.4±1.01 *	50.2±0.71
40	25.1±0.70	50.8±0.80

*: $P<0.05$ *vs* 5, 40

2.4　诱导后期不同 pH 值对重组蛋白的影响

在诱导后期改变 pH 值, 分别为 7.0、7.5 和 8.0。在 pH 为 7.5 时重组蛋白的表达最佳, 见表 4。

表 4　pH 对蛋白的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Influence of pH values on the expression of fusion protein ($\bar{x}\pm s$)

pH	Fusion protein (%)	Cell output (g/L)
7.0	21.1±0.39	50.4±1.39
7.5	27.4±0.41 *	50.5±1.90
8.0	20.2±0.70	50.0±2.01

*: $P<0.05$ *vs* pH7.0, 8.0

2.5　补料次数对工程菌的影响

在发酵中, 诱导前不同的补料次数对菌产量有影响。在诱导前增加补料次数可以在一定条件下不影响重组蛋白表达量, 而增加工程菌菌密度, 见表 5。

表 5　在诱导前增加补料次数对工程菌的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Influence of supplements on the expression of fusion protein($\bar{x}\pm s$)

Times of supplements	Fusion protein (%)	Cell output (g/L)
0	27.1±1.07	20.2±2.11
2	27.4±1.91	42.6±1.92
3	27.2±2.01	50.4±1.84 *

*: $P<0.05$ *vs* 0, 2

2.6　诱导后不同时间的菌密度和重组蛋白表达情况

诱导后细菌 A 值即菌密度随着诱导时间增长, 在保证目的蛋白合成前提下, 诱导后补料的速度比诱导前补料速度减慢。在补料 3~5 h 菌密度的增长和重组蛋白的变化不明显, 见表 6。

表 6　诱导后不同时间细菌的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 6　Influence of time period on the expression of fusion protein after induction ($\bar{x}\pm s$)

Time after induction (h)	A_{600}	Fusion protein (%)
1	24.6±0.45	14.2±1.02
2	27.5±0.51	22.6±0.90
3	29.4±0.47	27.4±0.74 *
4	29.6±0.43	27.1±0.91 *
5	30.0±0.39	27.4±0.78 *

*: $P<0.05$ *vs* 1, 2 h

3　讨论

外源基因在不同的宿主菌、表达载体中的表达条件都不一样。在相同的载体和宿主菌情况下, 影响外源基因表达的因素仍有很多。我们在摇瓶实验的基础上, 级联放大到 15 L 发酵罐中, 高密度发酵进行研究。其中影响较大的因素如下: ①培养基的选择。工程菌开始阶段的生长维持决定于发酵罐中的最初的营养成分。我们在发酵常用的培养基 M9-CAA 进行了改良。增加了微量元素和酵母浸出液, 比较实验证实了改良后更适合菌体的生长及重组蛋白的表达。②种子菌的比例。种子菌量影响发酵的菌产量和发酵周期, 较少接种量时, 菌体延迟期较长, 培养过程中使菌龄老化, 不宜表达外源蛋白, 重组蛋白的表达量较低。以 10%及 15%的接种量上罐, 延迟期短, 菌群迅速繁衍, 能较快的进入对数生长期, 能够更好地表达我们的重组蛋白。③pH 值。菌体在生长过程中最适 pH 值对细菌在生产期包涵体的形成产生很大的影响, 如果 pH 处于菌体生长的最佳状态, 菌体自体蛋白的合成增强, 干扰重组蛋白合成, 产生错误折叠, 大量与重组蛋白结构相似的菌体杂蛋白卷入包涵体, 使包涵体中重组蛋白相对比率降低, 给进一步的纯化工作带来难度。我们在实验中选择不同的 pH 值, 发现发酵后期在 pH 7.5 时, 外源基因的表达最佳。④发酵过程中, 由于为高密度生长, 需要及时补加各种营养物质。常用的补料方式有恒速、分批和指数加料等方法。我们在采取分批流加补料的方式。在发酵过程中诱导前两次补料, 细菌 A_{600} 达到 25.5, 湿菌量达到 41.5 g/L。为了进一步提高

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

菌量，我们采取在诱导前流加 3 次补料，细菌 A_{600} 达到了 30.6，湿菌量达到了 52.2 g/L，而表达量保持不变。在诱导前 4 次补料时，细菌总量有了更大的增加，但是目的蛋白的表达率有降低，还需要进行更深的研究。⑤溶解氧浓度对菌体的生长和重组蛋白生成的影响，菌体在大量扩增过程中，耗氧进行分解代谢，饱和氧的及时供应很重要，当培养基中氧不足时大肠杆菌的呼吸链和三羧酸循环就会被抑制，蛋白的表达受到影响。我们在早期发酵中采用空气来补氧，对数生长期细菌的生长过快，溶氧较低，氧气的供给不足，蛋白的表达量也较低。后期改用纯氧级联控制，溶氧控制在 20%，保证了细菌在后期生长的过程中的需氧量，使外源基因转录和翻译都有了提高。⑥发酵后诱导时间，研究中细菌在诱导后缓慢流加补料，减慢菌体自身的分裂繁殖以利重组蛋白的合成。诱导后 3～5 h 间菌量的增长趋于停滞，重组蛋白表达量基本没有增加，而随着时间增长，易导致细菌自溶，降低表达率。

LTB-UreB 融合基因工程菌通过发酵的优化，目的蛋白表达达到 27%，菌体获得量在湿重 52.2 g/L，在发酵中，稳定性和重复性均达到要求，为融合蛋白的进一步大量生产和应用奠定了基础。

参考文献：

[1] Blaser M J. Hypotheses on the pathogenesis natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation[J]. Gastroenterology, 1992, 102(12): 720—727.
[2] Peterson W L. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease[J]. N Engl J Med, 1991, 324(15): 1 043—1 048.
[3] Roggero E, Zucca E, Pinotti G, *et al*. Eradication of *Helicobacter pylori* infection in primary low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue[J]. Ann Intern Med, 1995, 122(10): 767.
[4] Labigne A, Reuse H D. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity [J]. Infect Agents Dis, 1996, 5(4): 191—202
[5] Michetti P. Oral immunization against *Helicobacter pylori*-a future concept [J]. J Gastroenterol, 1998, 33(suppl X): 66—68.
[6] Corthesy T I, Porta N, Glauser M, *et al*. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against Helicobacter infection in mice[J]. Gastroenterology, 1995, 109(1): 115—121.
[7] Rollwagen F M, Pacheco N D, Clements J D, *et al*. Killed Campylobacter elicits immune response and protection when aadministered with an oral adjuvant[J]. Vaccine, 1993, 11(3): 1 316—1 320.
[8] McCluskie M J, Weeratna R D, Davis H L. Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution[J]. Mol Med, 2000, 6(10): 867—877.
[9] McCluskie M J, Weeratna R D, Clements J D. Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* as adjuvants[J]. Vaccine, 2001 Jun 14, 19(27): 3 759—3 768.
[10] Heather L M, Justin O N. Effect of medium quality on the expression of human IL-2 at high cell density in fermentor culture of *E. coli* [J]. Appl Envi Microbiol, 1990, 56(3): 640—645.

（编辑 谢义霞）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)12-1432-02

超脉冲激光经穹隆结膜入路行眼袋整复术

Lower blepharoplasty with ultrapulse CO_2 laser through transconjunctival-fornix approach

周建明 （第三军医大学附属西南医院激光中心，重庆 400038）

传统的眼袋整复术，无论下睑皮肤是否松弛，都将手术切口设计在眼睑下方的皮肤上，病人最大的顾虑是术后遗留疤痕。经穹隆结膜入路眼袋整复术将从根本上消除大多数眼袋病人的顾虑，使眼袋的整形迈进一大步。自从激光在医学美容领域的再次广泛应用，本手术由激光刀代替手术刀，可以达到省时、术野清晰、病人痛苦小、术后恢复快的效果。自 1998 年 3 月以来，我们应用美国引进的超脉冲激光机施行本手术 60 例共 120 眼，效果良好。

1 材料与方法

1.1 临床资料

60 例患者中女 50 例，男 10 例。年龄最大 58 岁，最小 22 岁，25～35 岁占 80%，手术适应症：下睑皮肤无松弛或轻微松弛，以脂肪疝出为主。术前无结膜的急、慢性炎症。

1.2 手术方法

设备为 Coherent 公司（美）超脉冲（Ultrapulse）5000C 型 CO_2 激光器。患者仰卧于手术台，常规消毒铺巾，0.5%丁卡因表面麻醉，1%利多卡因局部浸润麻醉，安放眼罩。将激光功率调至连续波 7 W，牵开下睑，用 0.2 mm 激光刀于穹隆结膜处切开结膜及结膜下组织，切口长约 1.5 cm，暴露眶隔，切开隔膜，见脂肪球自动膨出，轻轻牵拉内、中、外脂肪球，小湿纱布条保护周围组织，激光刀切割膨出的脂肪球，尤其对于内、中侧脂肪球要仔细切除，比较两侧是否对称，对可疑出血的部位再给予点状凝固，不缝合切口，0.25%氯霉素眼液冲洗术腔，下睑加压冰敷 30 min。术后 0.25%氯霉素眼液滴眼、夜间 0.5%金霉素眼膏涂眼 4～6 d，口服抗生素 10 d。两周内避免剧烈活动。

（下转 1436 页）

作者简介：周建明（1964— ），男，江苏省建湖县人，硕士，主治医师，主要从事激光手术、睡眠呼吸暂停综合征方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(023)68754406

收稿日期：2001-11-23；修回日期：2002-06-25

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