DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.026
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
810 2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0810-03

诱导重组人生长激素工程菌高效表达的研究

刘晓宏,粟永萍,艾国平,王 蒙,李淑蓉,王军平,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 筛选诱导重组人生长激素(rhGH)工程菌高效表达的最佳条件,为中试及工业化发酵培养提供依据。方法 质粒PBV-GH转化4种不同宿主菌,比较6种不同培养基在不同pH值、氧含量改变情况下,rhGH工程菌的生长和表达差异,筛选并确定最适宿主菌、最佳培养基及最佳诱导表达条件。结果 ①*E. coli DH5*α为最适宿主菌;②TB培养基为最佳培养基;③培养基pH7.5~7.8有利于目的蛋白的表达。④在半对数生长期(培养4~5 h)迅速升温,且菌密度控制在D_{600nm}3.0之前诱导可获得较高的重组蛋白表达量,rhGH表达量占菌体总蛋白的40%。发酵时间为10 h。结论 *E. coli DH5*α为rhGH高效表达的最适工程菌,*E. coli DH5*α/PBV-GH在pH7.5~7.8的TB培养基中发酵生长10 h,可使菌量最佳扩增,目的产物rhGH表达效率最高。

关键词:重组人生长激素;发酵;工程菌
中图法分类号:R378.21;R394.2;R977 文献标识码:A

Study on inducing high-level expression of recombinant human growth hormone

LIU Xiao-hong, SU Yong-ping, AI Guo-ping, WANG Meng, LI Shu-rong, WANG Jun-ping, CHENG Tian-min (Research Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish a sound fermentation process of preparing recombinant human growth hormone (rhGH) for the basis of pilot and industrial production. **Methods** Different conditions including different host cells transferred plasmid PBV-GH, culture mediums, the values of pH and concentrations of O_2 were compared to obtain the best inducing expression condition of rhGH. **Results** The expression of rhGH kept in a higher level of about 40% of total bacterial proteins when *E. coli* DH5α as host cell, TB cultivating medium, pH 7.5—7.8, bacterial density of D_{600} 3.0, rapidly increased temperature in log time, and a fermentaion time of 10 h were employed. **Conclusion** The high-level expression of rhGH can be achieved in *E. coli* DH5α with TB medium at pH value from 7.5 to 7.8 for 10 h fermentation.

Key words: recombinant human growth hormone; fermentation; host cells

生长激素(Growth hormone, GH)是由脑垂体分泌的一种非糖基化蛋白激素,具有广泛的生理调节作用。临床除治疗侏儒症外,近年来已广泛应用于烧伤、创伤、骨折、营养不良及心衰等诸多疾病[1~3]。我所在以往的研究中已经成功克隆并构建了重组人生长激素高效表达菌株(*E. coil* DH5α/PBV-GH),并进行了纯化研究(另文报道)。为进一步提高rhGH产率并达到工业化规模,本研究对宿主菌筛选、培养基选择及pH值调控等方面进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 PBV-GH由我所构建并保存,氨苄抗性,42 ℃诱导表达。 宿主菌 *E. coil* DH5α[SupE44 △lacU169(Ø80 lacZ △M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1]、*E. coli* BL21[F- ompT hsdS(r_B— m_B—)dcm+Tetr gal]、*E. coli* Tap106(leu dio thi galam lacU169 rpsL $supE44^{\lambda}$[int-ral] BamHIN::$Kan^r$$cI^{857}$[cro-bio](、*E. coli* JM109[recA1 supE44 endA1hsdR17 gyrA94 relA1 thi((lac-proAB)F(traD36-proAB+ lacIq lacZ △M15)]均由我所保存。

1.1.2 培养基 LB培养基:胰蛋白胨10 g、酵母抽提物5 g、NaCl 10 g; LB+5%葡萄糖培养基(简称LB+):配成50%葡萄糖无菌过滤,用前按比例加入LB培养基中;改良的TB培养基:酵母抽提物18 g/L、胰蛋白胨9 g/L、甘油4 ml/L、KH_2PO_4 2.0 g/L、K_2HPO_4 15 g/L;ZP培养基、HD培养及2YT培养基见文献[4~6]。以上培养基用前均加入氨苄青霉素100 μg/ml。

1.1.3 仪器 Beckman低温高速离心机,紫外分光光度仪,Bio-Rad蛋白电泳仪及扫描仪。

1.2 方法

1.2.1 宿主菌的筛选 以LB培养基为菌种培养基。将PBV-GH质粒DNA分别转化宿主菌*E. coli* DH5α, *E. coli* BL21, *E. coli* Tap106, *E. coli* JM109。32 ℃过夜培养,挑单菌落于5 ml LB培养基中摇过夜。再分别按2%加菌种于5 ml LB培养基中32 ℃摇5 h后立即42 ℃热诱导表达5 h。测定A_{600}吸光度值及rhGH表达量。

1.2.2 培养基筛选 将转化不同宿主菌的rhGH菌种(DH5α/PBV-GH, BL21/pBV-GH, Tap106/PBV-GH, JM109/PBV-GH)分别按2%加入(100 mL锥形瓶)TB、LB、LB+、ZP、HD、2YT培养基中,32 ℃培养,42 ℃迅速加热诱导表达。

1.2.3 培养基pH值的改变及O_2含量的改变对细菌生长及表达的影响 配制培养基pH值为6.5、6.8、7.2、7.5、7.8、8.2共6个梯度,根据以上实验结果筛选出的最适宿主菌转化的rhGH工程菌和最佳培养基(DH5α/PBV-GH、TB培养基)。按2%的浓度分别接种于不同pH值的TB培养基中,32 ℃培养,42 ℃诱导表达。

采用:①无菌镀锡牛皮纸封盖,②无菌牛皮纸加4层纱布封盖;③无菌牛皮纸封盖;④无菌棉塞封盖;按2%的浓度分别接种于各培养瓶内,32 ℃培养,42 ℃诱导表达。

作者简介:刘晓宏(1961—),女,重庆市人,实验师,主要从事蛋白纯化方面的研究。电话:(023)68752355
收稿日期:2002-04-24;修回日期:2002-06-11

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

1.2.4　选择最佳起始诱导时间及最佳诱导表达时间　　选择最佳起始诱导时间: 按 2% 分别接种于 5 个 100 ml 三角摇瓶中, 32 ℃摇 4、5、6、7、8 h 后 42 ℃诱导表达 5 h。

选择最佳诱导表达时间: 选择 5 个诱导表达时间, 按 2% 接种 32 ℃培养 5 h 后, 42 ℃分别诱导表达 1、2、3、4、5、6、8 h。

1.2.5　测定方法　　菌密度及菌体重量测定: 用紫外分光光度计(Beckman UV)测定 A_{600}吸光度值。离心收集菌体, 50 ℃烤干称菌体重量。

蛋白表达量测定: SDS-PAGE 电泳分析, 灰度扫描仪分析重组蛋白占菌体总蛋白的百分含量。

2　结果与讨论

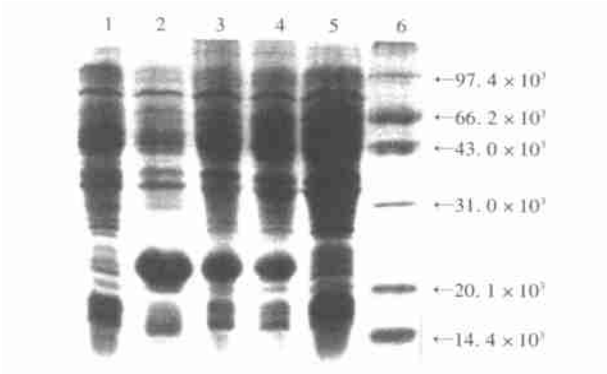
2.1　发酵用最适宿主菌及最佳培养基筛选

将重组质粒 PBV-GH 分别转化 4 种不同宿主菌 DH5α, BL21, Tap106, JM109。并分别在 6 种不同培养基中发酵培养, 各重组菌生长及表达状况, 见表 1, 图 1。

表 1　不同宿主菌在不同培养基中生长及 **rhGH** 表达状况

Tab 1　Expression of rhGH in different host cells and cultivating mediums

Host cell	Cultivating medium(Density of bacterium A_{600} nm/ expression of rhGH)					
	TB	LB	LB+Glucan	ZP	HD	2YT
DH5α	2.90/++++	1.13/+++	1.30/++	1.67/++	1.52/++	1.55/+
BL21	3.51/+++	1.69/++	1.59/++	2.44/++	2.30/++	2.34/++
Tap106	3.22/+++	2.00/++	1.77/++	2.56/++	2.38/++	2.21/+
JM109	2.76/−	1.68/−	1.58/−	2.30/−	3.22/−	1.64/+

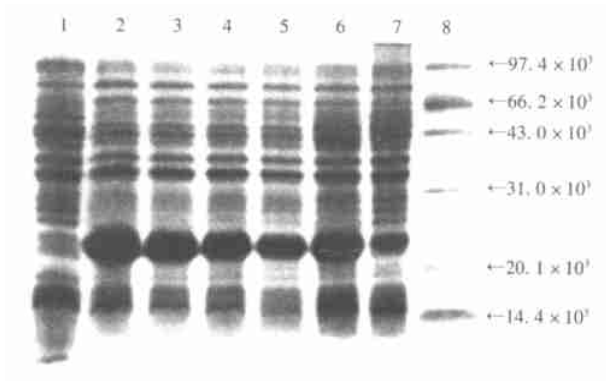


1: Pre-induced expression of rhGH; 2: *DH5α*/PBV-GH; 3: *BL21*/PBV-GH; 4: *Tap106*/PBV-GH; 5: *JM109*/PBV-GH; 6: Molecular weight standard marker

图 1　**TB** 培养基中不同宿主菌对 **rhGH** 表达的影响

Fig 1　Effects of different host cells in TB cultivating medium on rhGH expression

结果显示, 各重组菌在不同培养基中的生长速度及表达 rhGH 量均有所不同。DH5α 表达 rhGH 量最高, 约占菌体总蛋白的 40%。BL21、Tap106 菌生长速度较快, 但杂蛋白多, 表达量均为 28%, JM109 仅在 2YT 培养基中表达, 表达量仅为 13%。不同培养基对 rhGH 工程菌生长及目的蛋白的表达也有所不同, 见图 2。从文献得知许多高密度发酵都是通过加补葡萄糖来供能的, 但大肠杆菌在利用葡萄糖供能的同时又会产生大量乙酸, 随着细菌密度的升高, 乙酸累积达到一定程度后势必影响细菌生长和表达。本实验通过比较 6 种培养基, 其中 3 种均加有 5%葡萄糖, 而 TB 培养基采用产酸量较少的甘油代替葡萄糖发酵, 取得较好结果。综合以上结果分析认为: DH5α/PBV-GH 与 TB 培养基配伍作为发酵种子较为理想。



1: Pre-induced expression of rhGH; 2: TB cultivating medium; 3: LB cultivating medium; 4: LB and Glucan cultivating medium; 5: ZP cultivating medium; 6: HD cultivating medium; 7: 2YT cultivating medium

图 2　不同培养基对 **rhGH**(**DH5α**/**PBV-GH**)表达的影响

Fig 2　Effects of different mediums on rhGH expression in DH5α/PBV-GH

2.2　培养基 pH 值对菌体生长和表达 rhGH 的影响

配制 6 种不同 pH 的 TB 培养基发酵结果, 见图 3。结果显示 pH＜6.8 时对细菌生长及 rhGH 蛋白表均有一定影响。pH＞8 时对 rhGH 蛋白表达量虽影响不大, 但菌产率偏低。因此选择 pH 7.5～7.8 之间既可提高细菌得率又能提高 rhGH 蛋白表达量。

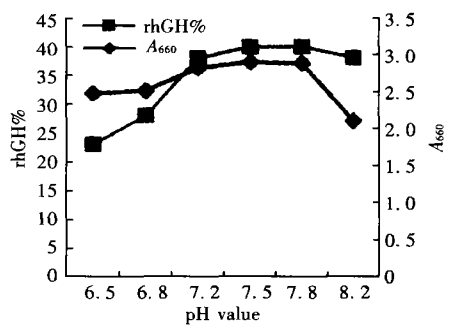


图 3　培养基 **pH** 值对细菌生长及表达 **rhGH** 的影响

Fig 3　Effects of pH of mediums on rhGH expression

2.3　培养基中 O_2 含量对细菌生长及表达的影响

采用 4 种不同 O_2 含量的培养基发酵, 其中: ①用无菌镀锡牛皮纸封盖与空气绝对隔绝, 随着培养时间的延长, 培养瓶内氧浓度逐渐降低, 细菌生长及表达重组人生长激素受到显著抑。而实验用: ②无菌牛皮纸加 4 层纱布封盖; ③无菌牛皮纸封盖; ④无菌棉塞封盖等 3 瓶培养基中氧浓度足以维持细菌生长及 rhGH 表

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

达,其菌密度及 rhGH 表达量均较高。结果见图 4。

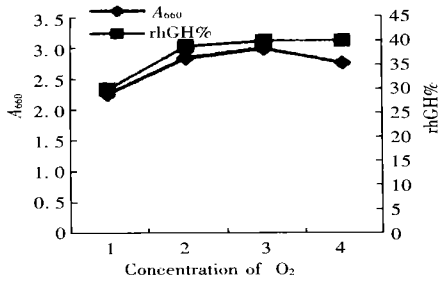


图 4 培养基氧浓度对细菌生长及表达 **rhGH** 的影响

Fig 4 Effects of O_2 concentrations on rhGH expression

2.4 起始诱导时间及诱导表达时间对细菌生长和 rhGH 表达的影响

在半对数期生长期(培养 4~5 h)迅速升温可获得较高的重组蛋白表达量,且菌密度应控制在 A_{600nm} 3.0 之前诱导均有利于重组蛋白表达,见表 2。因为早期诱导达不到一定菌密度,培养基营养成份得不到充分利用。而后期营养的消耗和生长环境恶化可能导致外源基因表达能力的降低。在确定最佳起始诱导时间后,我们设定了 7 个诱导表达时间 1、2、3、4、5、6、8 h。结果显示,见表 3。不同表达时间对 rhGH 表达均有所不同。细菌开始诱导后其生长明显减慢,而表达量由占菌体总蛋白 18%徒升至 32%,4 h 后表达量达 40%,说明诱导后细菌的能量主要消耗在外源基因表达上。随着诱导表达时间的延长,细菌生长虽不断上升,但表达量却不断下降。因此诱导表达时间以 4~5 h 为宜。

表 2 不同起始诱导时间对细菌生长及 **rhGH** 表达量的影响

Tab 2 Effects of different starting time of induction on rhGH expression

Ttime of starting induction (h)	Density of Bacterium(A_{600})		RhGH
	Induced beginning	Induced ending	Expression ratio(%)
4	2.45	2.93	40
5	2.92	3.22	40
6	3.25	3.34	38
7	3.46	3.61	35
8	3.65	3.84	32

表 3 不同诱导表达时间对细菌生长及 **rhGH** 表达量的影响

Tab 3 Effects of different inducing time on rhGH expression and bacterial growth

Time of inducing expression (h)	1	2	3	4	5	6	8
Bacterium Density of induced end A_{600}	1.84	2.06	2.17	2.23	2.28	2.29	2.30
Expression ratio of rhGH(%)	18	32	38	40	40	39	36
Dry weight of bacterium(g/l)	10.8	13.1	13.5	13.8	14.2	14.7	15.9

综上所述,我们认为,不同目的基因的蛋白表达在不同宿主菌中不尽一致,选择最适宿主菌尤为重要;此外,良好的培养基、稳定的 pH 及氧供给对提高菌量及目的蛋白表达也有重要影响,三者缺一不可,在此基础上选择最佳发酵时机及诱导表达时间,优化其培养条件,改善设备条件,可确定周期短、产率高、稳定、可靠的发酵工艺。本所构建的工程菌 DH5α/PBV-GH,在 pH7.5~7.8 的 TB 培养基中发酵生长 10 h,可使菌量最佳扩增,目的产物 rhGH 表达效率最高,上述研究为工业化生产奠定了基础。

参考文献:

[1] Beckers V, Milet J, Legros J J. Prolonged treatment with recombined growth hormone improves bone measures: study of body composition in 21 deficient adults on treatment[J]. Ann Endocrinol, 2001, 62(6): 507—515.

[2] Kolstad O, Jenssen T G, Ingebretsen O C, *et al*. Combination of recombinant human growth hormone and glutamine-enriched total parenteral nutrition to surgical patients: effects on circulating amino acids[J]. Clin Nutr, 2001, 20(6): 503—510.

[3] 李为勤, 黎介寿, 许宝华, 等. 重组人生长激素和全肠外营养支持对腹腔感染患者低白蛋白血症的治疗作用[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(11): 643—645.

[4] Lahijni R, Hully G, Soriano G, *et al*. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation[J]. Hum Gene Ther, 1996, (16): 1 971—1 975.

[5] 刘社际, 杨立明. 重组人生长激素在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达研究[J]. 生物技术通讯, 2000, 11(4): 264—267.

[6] 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 908—909.

(编辑 郭建秀)

(上接 809 页)

污染,酸雨、大气污染及吸烟人员较多有关;而心血管位于第 4 位,这可能由于重庆的经济状况及山城坡高路陡,人们长期爬坡运动,从而减少了血管硬化和粥样斑块的形成。

从表 2 统计上我们发现在 461 例死亡病例中 81.12%(16.05%+24.5%+40.56%)的老年病例除了死亡病因外常常合并三种以上的疾病,如一个慢性支气管炎可同时合并高血压、糖尿病、冠心病等,这可能是与 60 岁以上的老年人本身就因各种器官功能的减退是各种疾病的易感人群,而且合并症多少与年龄的增长有关系。

综上所述,老年人防止疾病转危的重点应放在呼吸系统,必须提高老年人的免疫、防御功能,减少各种器官功能的损伤,在用药和治疗中注意各系统器官的保护工作,减少死亡率,提高老年人的寿命。

关键词:老年疾病;死因

中图法分类号:R195.4 文献标识码:B

参考文献:

[1] 叶任高. 全国高等医药院校教材内科学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 2.

[2] 宋桂香, 杨 青. 上海市 1988~1992 年老年人死因调查[J]. 中华老年医学杂志, 1997, 16(2): 123—124.

(编辑 陈聪连)

Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net