

溶氧对杀菌肽-X 发酵工艺的影响

邱英华^{1*} 沈 益¹ 王玉海² 董雪吟¹ 张洪祖¹ 徐贤秀¹

¹(南京大学医药生物技术国家重点实验室,南京 210093)

²(浙江医药股份有限公司新昌制药厂,新昌 312500)

摘 要 本研究采用 30L 自动控制发酵罐研究了重组杀菌肽-X 工程菌的基本发酵条件。经 12h 发酵培养,发酵培养基中氨苄青霉素浓度为 0 和 100 μ g/mL 时,包涵体得率基本一致,干重分别为 1.24 和 1.20g/L;控制溶氧为 20%~30% 和溶氧自然变化(转速分别为 250 和 150r/min)的条件下,包涵体得率有较大差异,干重分别为 0.05、0.71 和 1.24g/L。在较优化的发酵条件下,目的融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 45%~50%。

关键词 杀菌肽-X, 发酵, 溶氧, 包涵体

中图分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0972-03

杀菌肽 CMIV 是中国科学家从家蚕中分离纯化得到的一种带正电荷的抗菌小肽,由 35 个氨基酸残基组成,不含甲硫氨酸和半胱氨酸,它除具有广谱抗菌功能外,还具有抑制一些肿瘤细胞生长的作用^[1]。为能够制备大量杀菌肽,本实验室在杀菌肽 CMIV 的基础上构建了高效表达的大肠杆菌表达体系,即在 CMIV 的 C 端加上一个天冬酰胺密码子构成杀菌肽-X 基因,并与 TNF β 基因融合表达。融合蛋白分子量为 21kD,其中杀菌肽-X 分子量为 3.8kD,经 BrCN 裂解得到有活性的杀菌肽-X^[2]。药效学预实验证明,杀菌肽-X 对小鼠 S180 肉瘤和 Lewis 肺癌的抑瘤率分别达到 59.77% 和 53.33%,与阴性对照组相比其 *P* 值均小于 0.01 (*P* < 0.01),且未观察到有毒副作用产生。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和工程菌:质粒 pET11d-TNF β -Cecropin-X 为本实验室构建^[2],宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)由本实验室保存。

1.1.2 仪器:30L 自动控制发酵罐由上海高机实业公司生产;均质机由丹麦 APV 公司生产,型号为 APV1000。

1.1.3 试剂:Tryptone 和 Yeast Extract 均购于英国 OXOID 公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养基的选择:LB, TB 培养基的配制参见分子克隆(第二版)^[3],半合成培养基^[4]配方为(g/L) Tryptone 5, Yeast extract 5, Glycerol 2 (mL), KH₂PO₄ 2, K₂HPO₄ 4, Na₂HPO₄ 7, (NH₄)₂SO₄ 1.2, NH₄Cl 0.2。挑转化后长出的单菌落接种于含 3mL LB 培养基的试管中(培养基中氨苄青霉素终浓度为 50 μ g/mL,下同), 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 培养 9h。按

0.1%接种量分别转接于含 200mL 上述三种试验培养基的摇瓶中, 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 培养 16h。对照诱导组在转接培养 9h 后加 IPTG(终浓度 0.05mmol/L)进行诱导。经 SDS-PAGE, 比较该工程菌在三种不同培养基及诱导与否的条件下融合蛋白表达量的差异。

1.2.2 发酵种子液的制备:挑转化后长出的单菌落接种于含 3mL LB 培养基的试管中, 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 培养 9h。按 0.1%接种量转接于含 200mL TB 培养基的摇瓶中, 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 培养过夜。

1.2.3 发酵条件:发酵罐工作体积 20L, 通气量 160L/h, 罐压 0.02~0.04MPa。如无特殊说明发酵培养基为 TB, 氨苄青霉素浓度为 0, 接种量为 4%, 温度为 37 $^{\circ}$ C, 搅拌转速为 150r/min, 溶氧、pH 值自然变化, 发酵时间为 12h, 每隔 1h 取样检测 OD₆₀₀。

1.2.4 菌体收集及包涵体纯化:5 000r/min 离心发酵液 10min 收集菌体, 悬浮于 0.02mol/L 磷酸缓冲液中, 均质机破碎细胞(压力为 8×10^7 Pa ~ 9×10^7 Pa)。10 000r/min 离心破碎细胞 15min 收集沉淀, 依次用 2mol/L 尿素, 0.5% NaCl/2% Triton(曲拉通), TE 溶液(pH8.0)洗涤沉淀, 即得包涵体。

1.2.5 包涵体干重:称取一定量包涵体置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥, 并研成细末直到重量不再减轻, 即为干重。

1.2.6 融合蛋白含量确定:将 SDS-PAGE 图谱进行灰度扫描, 确定融合蛋白在菌体总蛋白中的含量。

2 结 果

2.1 发酵培养基的选择

在摇瓶培养的情况下, 工程菌在 LB, TB 和半合成培养基及诱导与否的情况下融合蛋白表达量的差异见图 1。该

收稿日期:2004-04-15, 修回日期:2004-06-31。

* 通讯作者。 Tel:86-25-83594827; E-mail: qiuyinghua@263.net

工程菌表现为组成型表达,使用 IPTG 诱导与否并不影响融合蛋白的表达量。工程菌在 LB, TB 培养基中融合蛋白的表达量均占菌体总蛋白的 45% ~ 50%,而在半合成培养基中仅占菌体总蛋白的 30% ~ 35%。

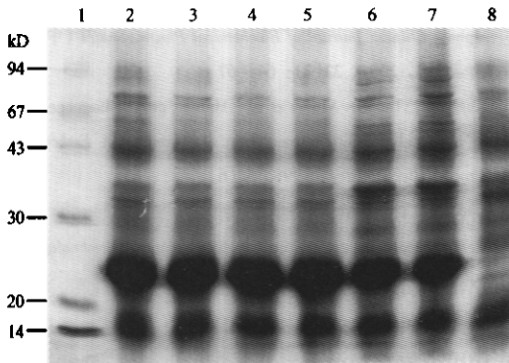


图1 工程菌在不同条件下融合蛋白表达量的差异

Fig.1 Effect of various media on the expression of TNFb-Cecropin-X
1: protein molecular weight marker; 2: LB, non-induced; 3: LB, induced; 4: TB, non-induced; 5: TB, induced; 6: semi-defined media, non-induced; 7: semi-defined media, induced; 8: total protein of *E. coli* BL21(DE3) host

发酵罐中培养基为 2 × LB 和 TB 时发酵结束后 OD_{600} 分别为 6.4 和 14.2,包涵体得率分别为 0.4 和 1.24g/L。对本工程菌的发酵而言, TB 培养基明显优于 LB 培养基。

2.2 选择压力对包涵体得率的影响

以氨基青霉素作为该工程菌的发酵选择压力,在 TB 培养基中其浓度分别为 0 和 100 μg/mL 时工程菌生长速率差别不大,发酵结束时 OD_{600} 分别为 14.2 和 12.6;包涵体的得率亦无显著差别,干重分别为 1.24 和 1.20g/L。可见氨基青霉素存在与否对包涵体得率的影响甚小。

2.3 溶氧对包涵体得率的影响

罐压一定的条件下,针对溶氧设计 3 种试验方案: A: 控制转速和通气量(转速 200 ~ 500r/min, 通气量 160 ~ 800L/h)保持溶氧为 20% ~ 30%, 培养 9h; B: 保持搅拌转速 250r/min、通气量 160L/h 不变,溶氧自然变化,培养 12h; C: 保持搅拌转速 150r/min、通气量 160L/h 不变,溶氧自然变化,培养 12h。

A、C 条件下,不同发酵时间的 SDS-PAGE 图谱分析见图 2、3。

在 A 条件下,目的融合蛋白表达量很低,仅占菌体总蛋白的 2% ~ 5%; C 条件下,工程菌在接种 4h 后开始表达融合蛋白,5 ~ 12h 一直保持较高的表达量,融合蛋白在菌体总蛋白中的含量为 45% ~ 50%。

三种条件下的包涵体得率见表 1。

为了观察高溶氧对融合蛋白的表达是否有明显的抑制作用,针对条件 A、C 设计两种溶氧方案 D: 控制转速和通气量(转速 200 ~ 500r/min, 通气量 160 ~ 800 L/h)保持溶氧为 30% ~ 40%, 培养 5.5h 后将转速调为 150r/min, 通气量调为 160L/h, 继续培养 5h。E: 转速 150r/min, 通气量 160L/h 培养 4h 后, 转速每半小时升高 20 转, 至 350 r/min 后保持该转速至发

酵结束, 共培养 12h。

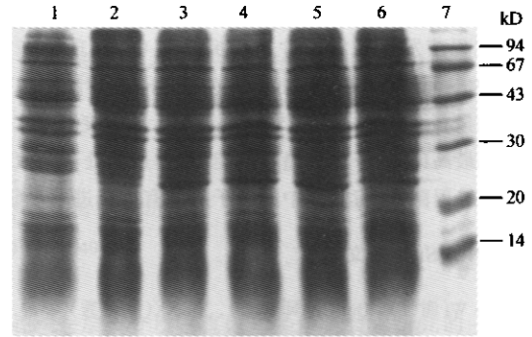


图2 A 条件下工程菌在发酵罐中 5 ~ 9h 的表达情况

Fig.2 The expression of TNFb-Cecropin-X in recombinant bacteria during the fermentation under the condition of A
1: seed; 2 ~ 6: culture time 5 ~ 9h, respectively;
7: protein molecular weight marker

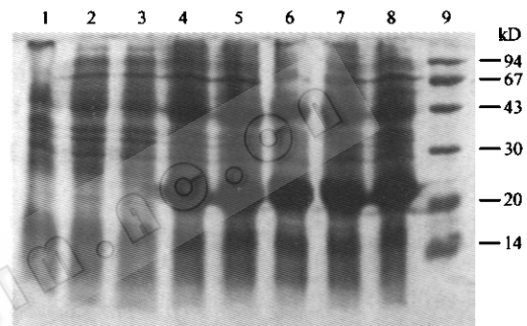


图3 C 条件下工程菌在发酵罐中 2 ~ 12h 的表达情况

Fig.3 The expression of TNFb-Cecropin-X in recombinant bacteria during the fermentation under the condition of C
1: seed; 2 ~ 8: culture time 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12h, respectively;
9: protein molecular weight marker

表1 A、B、C 三种条件下包涵体的得率

Table 1 The yield of inclusion body under the condition of A, B and C

Condition	A	B	C
OD_{600}	29.6	18.8	14.2
Yield of inclusion body/(g/L)	0.05	0.72	1.24

在 D 条件下,融合蛋白在 5.5h 时尚未表达,此时 OD_{600} 为 24.0。将转速调为 150r/min, 通气量调为 160L/h 后溶氧值降为 0, 1h 后检测到融合蛋白的表达,并持续表达至发酵结束。发酵结束时 OD_{600} 为 24.8, 包涵体得率为 0.70g/L。

在 E 条件下,融合蛋白在 4h 时开始表达,并持续表达至发酵结束。发酵结束时 OD_{600} 为 27.2, 包涵体得率为 1.44 g/L。

在 D、E 条件下,洗涤包涵体过程中发现杂质明显增多。将 A 与 D、C 与 E 条件下的结果比较来看,高溶氧对工程菌表达融合蛋白具有明显的抑制作用。

3 讨论

溶氧在发酵过程中有举足轻重的作用。常有文献报道

采用增加转速,提高通气量甚至通入纯氧的方法来保证足够的溶氧,以适应工程菌高速生长的需要^[5,6]。但在对重组杀菌肽-X工程菌发酵基本条件的研究过程中,发现在高溶氧(溶氧20%~40%)条件下,工程菌生长迅速,但目的融合蛋白的表达量极低。转速为150r/min,溶氧自然变化时,包涵体的得率最高(相对于菌体量)。即当培养过程处于限氧状态时最适于工程菌的表达,其中的分子机制有待于进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Xie W(谢维), Qiu QF(邱奇峰), Xu XX(徐贤秀) *et al.* Synthesis and clone of gene cecropin CMIV from *Bombyx mori*. *Journal of Nanjing University* (南京大学学报), 1996, 32(3): 444 - 447
- [2] Wang L, Wu HH, Xu XX *et al.* High-level expression of cecropin CMIV in *E. coli* from a fusion construct containing the human tumor necrosis factor. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1997, 41(5): 1051 - 1056
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed(分子克隆实验指南), Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1999, pp.908 - 909
- [4] Yan Z(颜真), Zhang YQ(张英起), Li M(李民) *et al.* Fermentation research of new type recombinant human tumor necrosis factor alpha. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics* (中国生化药物杂志), 2001, 22(2): 64 - 67
- [5] Xue WZ, Tao S, Xin L *et al.* Human growth hormone production by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 1998, 33(6): 683 - 686
- [6] Chu IM, Yen HW. Effect of dissolved O₂ concentration on the *Escherichia coli* in a cell-recycle bioreactor. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(1), 59 - 63

Effect of Dissolved O₂ on the Fermentation of Recombinant Cecropin-X by *Escherichia coli*

QIU Ying-Hua^{1*} SHEN Yi¹ WANG Yu-Hai² DONG Xue-Yin¹ ZHANG Hong-Zu¹ XU Xian-Xiu¹

¹(State Key Lab of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

²(Zhejiang Medicine CO., LTD. Xinchang Pharmaceutical Factory, Xinchang 312500, China)

Abstract Cecropin-X is an amphipathic peptide of 35 acid residues with an absence of methionine and cysteine. Besides its broad-spectrum antibacterial activity, Cecropin-X also have activity to inhibit the growth of some tumor cell lines. Cecropin-X gene was fused at the 3'-terminus of TNF β gene and high fusion expression was achieved in *E. coli* system. The fusion protein was presented as inclusion body and biological activated Cecropin-X was obtained after being cleaved by BrCN. A fed-batch fermentation process was carried out for production of recombinant cecropin-X by *Escherichia coli* in large amount. The essential parameters during the fermentation were studied and optimized in a 30L-fermentor. It nearly made any difference to the yield of inclusion body while the ampicillin was absent or not. Dissolved O₂ played a key role in the fermentation. By keeping the dissolved O₂ level at 20% ~ 30% saturation, the inclusion body was hardly produced. By keeping the stirring speed at 250r/min and 150r/min throughout the fermentation, leaving the dissolved O₂ changing spontaneously, the inclusion body obtained were 0.71g/L and 1.24g/L respectively. The content of recombinant fusion protein was as high as 45% ~ 50% of the total protein content. Since *Escherichia coli* is aerobic bacteria, enough dissolved O₂ (20% ~ 60% on the average) has been employed during fermentation in the previous reports. In the case of the engineered strain in this test, high expression was achieved only in the condition of relatively low dissolved O₂, the yield of inclusion body decrease with the increasing of dissolved O₂.

Key words cecropin-X, fermentation, dissolved O₂, inclusion body

Received: 04-15-2004

* Corresponding author. Tel:86-25-83594827; E-mail: qiuyinghua@263.net