



基因工程菌株的培养

施源 袁渭康

(华东化工学院, 上海)

基因工程菌株培养是传统发酵工艺的延伸和发展。随着人们的兴趣转向高水平地获取异源基因的表达产物以及开发其工业化生产^[1, 2], 外来物质的活性和产率就成为科学家和工程师们关注的主要内容。作为外来物质生产场所的受体细胞, 它们的生理和遗传特征影响着异源基因的表达。同时, 这些物质如果不能从受体细胞内分泌至胞外环境, 则它们在胞内的合成与积累会严重地阻遏受体细胞的生长并可能导致使细胞中毒或死亡^[3-5]。从培养角度认为受体细胞的高浓度和目的基因的高表达是一对矛盾, 它们互相制约, 构成生物工程下游研究的重要工作之一。

现代基因工程技术已成功地表达了一系列对人类健康密切相关的重要物质以及多种氨基酸和抗生素, 但其中能投入工业生产的还不多见。明显的原因在于从事基因工程菌株培养人员的知识积累, 仪器设备等与基因工程技术相比存在较大的差别。另外, 基因工程菌株培养技术来自于传统的发酵, 其中以经验为主, 缺乏较完整的理论和成熟的操作原则。而且, 特定的实验设计和工艺操作有较大的局限性。随着实验现象的积累和大量实验数据的积累, 基因工程菌株培养过程的规律正不断地为人们所认识和利用, 这些工作缩短了实验室规模和工业化生产之间的距离。

基因工程菌株培养过程分析

使每个受体细胞所表达的异源蛋白积累而达到一定的宏观浓度受到诸多因素的影响: (1) 重组 DNA 在受体细胞内表达异源蛋白的过程需消耗细胞自身的代谢能量^[6]。尤其是当细胞处在维持期, 往往不足以提供额外能量以满足消耗。(2) 异源基因表达产物的次级生理对受体细胞代谢造成影响。如高度疏水性蛋白在胞内积累会毒害细胞的生长^[7, 8], 或者, 当异源蛋白

在细菌质膜内停留会改变受体细胞的生理特征。

(3) 基因表达的产物在胞内积聚导致细胞内空间的物理限制^[9], 干扰染色体复制、代谢和细胞分裂的正常秩序。

根据基因工程理论, 重组质粒启动子如果为诱导型, 则其活力受控于受体细胞的代谢^[10]。因此, 形成基因工程菌株的阶段培养原则, 即培养前期以提高受体细胞浓度, 保持重组 DNA 在细胞传代时稳定性为目标, 培养后期着重于诱导重组 DNA 基因, 加强它的转录转译效率。此方法能在提供较大的目的基因表达场所的同时尽量合理地分配受体细胞的代谢能量。已经采用的诱导方式有以下几种。

(一) 专一性物质的诱导

1. 石油酵母 (*Pichia pastoris*) 的醇氧化酶 (AO) 活力极强, 其含量可占酵母细胞总蛋白的 30% 左右。当石油酵母以甲醇为唯一碳源时, 它的代谢途径如图 1^[11-13]。因此, 目的基因组建在 AO 启动子下游, 甲醇可诱导其转录。但细胞生长在葡萄糖或乙醇的培养基时, 葡萄糖分解代谢物的阻遏作用使 AO 酶活力被抑制在一个很低的水平^[14, 15]。如图 2 所示, 在以甲醇为碳源时, AO 酶活力迅速上升。但由于甲醇浓度高会损害细胞, 因此细胞生长较缓慢。为克服这一限制, 利用补充甘油的条件, 使细胞在较短时间 (~40h) 达到 7.0×10^8 个数/ml, 当甘油耗尽时通过流加甲醇使细胞在约 120h 内其密度可达至 1.0×10^{10} 个数/ml。同时, AO 启动子被诱导可实现目的基因的高表达^[16]。

2. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IC-WP1 基因工程菌株, 其重组质粒带有色氨酸标记基因, 酸性磷酸酯酶启动子、酸性磷酸酯酶结构基因、大肠杆菌 pBR322 区、抗氨基青霉素基因

本文于 1988 年 10 月 2 日收到。

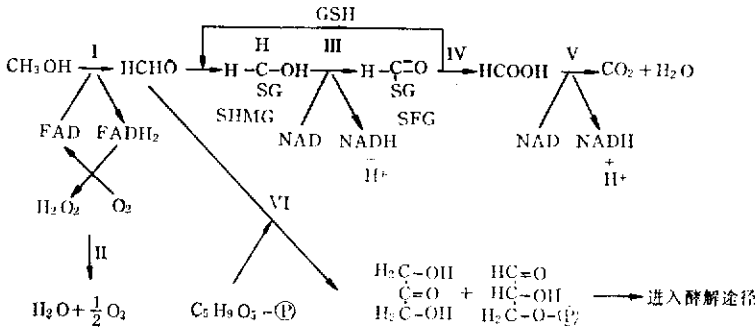


图 1 石油酵母以甲醇为唯一碳源时代谢途径

I:乙醇氧化酶, II:过氧化氢酶, III:甲醛脱氢酶, IV:S-甲基谷胱甘肽水解酶, V:甲酸脱氢酶, VI:二羟丙酮合成酶, SHMG:S-羟甲基谷胱甘肽, SFG:S-甲酰谷胱甘肽, GSH:还原性谷胱甘肽

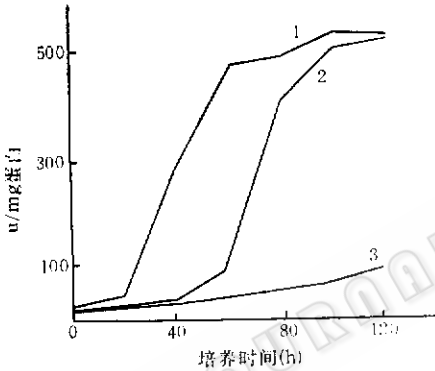


图 2 P.pastoris胞内醇氧化酶活力随不同碳源的变化

1. 甲醇 2. 2%甘油60后改换为甲醇 3. 葡萄糖

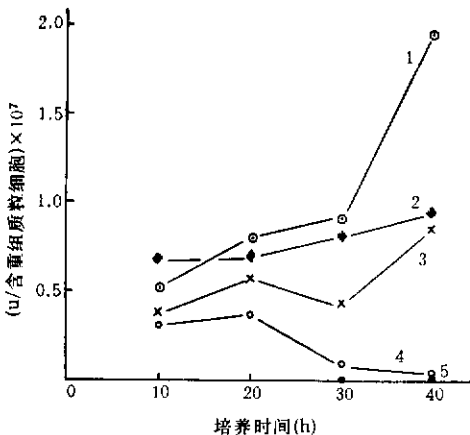


图 3 有机磷含量对酸性磷酸酯酶产率的影响
有机磷含量: 1. 100%, 2. 75%
3. 50% 4. 25% 5. 0%

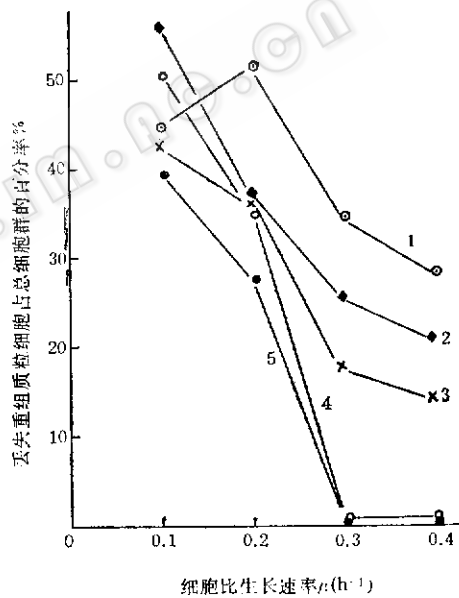


图 4 有机磷含量对受体细胞生长的影响
有机磷含量: 1. 100% 2. 75%, 3. 50%,
4. 25%, 5. 0%

以及酵母 2μ 起始区。培养基中无机磷的存在可控制启动子的转录效率^[1]。图 3 可见,随有机磷含量的增加,可使目的基因的表达量相应提高。但图 4 中的数据指出,保持受体细胞较高生长速率并使重组质粒不被丢失,提高无机磷含量是有利的。

培养过程的操作原则为流加式 (Fed-batch), 选择有机磷和无机磷的配用作基质流加如图 5 所示。尽管有机磷含量很低时,受体细胞

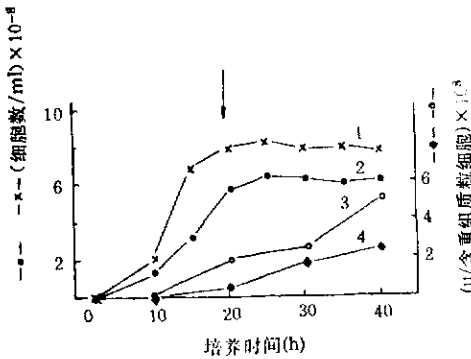


图 5 酵母IC-WPI细胞培养曲线

有机磷含量: 1, 3, 从33%上升至80%, 2, 4, 从0%上升至80%, 培养温度30℃, pH5.0, 箭头所指为有机磷含量变换时间

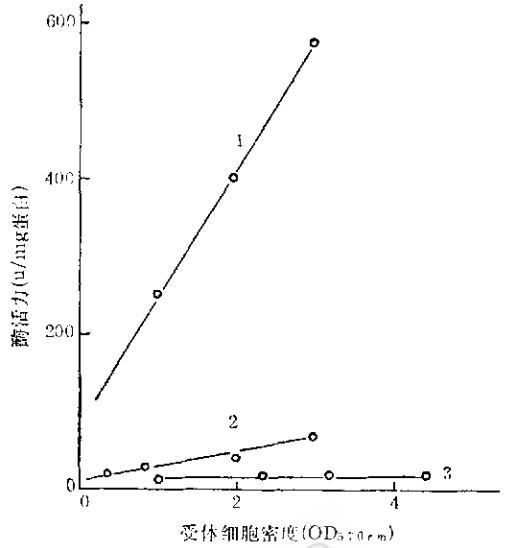


图 6 重组质粒拷贝数的温度诱导效应

1. 33℃ 2. 30℃ 3. 25℃

丢失重组质粒比例较低, 但总的细胞密度增长较慢。因此, 实验以25%至40%的有机磷含量配比操作, 使受体细胞在15至20h内达到 10^8 细胞/ml, 重组质粒稳定在80%以上。随后, 改变流加基质中磷的配比浓度, 增加有机磷含量使目的基因的转录效率提高。有机磷含量采用较大的突变变化如图5中所示, 并非是有利的选择, 而33%的起始基础能使总的细胞数很快地达到相应的水平, 而且目的基因表达的酸性磷酸酯酶浓度也有较大地增长。

(二) 培养过程的温度诱导

1. 大肠杆菌C600/PC I 857, 含有重组质粒 pCP3。由于它的自主复制系统(ARS)受温度的调控而呈现对温度敏感 [14, 19]。分析此重组质粒上抗氨基青霉素基因编码的表达产物β-内酰胺酶活力可了解基因工程菌受温度诱导的培养操作方式。

摇瓶培养的结果见图6, 25℃培养, 细菌的生长缓慢而影响所合成酶的总量。换句话说, 这时重组质粒的拷贝数被抑制在10—20个/细胞。温度提高至30℃以上, 重组质粒拷贝数被诱导而扩增达2000个/细胞, 基因表达产物浓度为560u/mg蛋白, 但由于高温条件使细胞较快地表现出衰老。

基因工程菌接种入发酵罐, 温度范围从25℃至37℃, 图7和图8表现出不同的结果 [20]。前者

当温度诱导时, β-内酰胺酶大量合成处在细胞的对数生长期, 因此能提供足够的代谢能量于细胞额外的能量负担。随目的基因表达的物质在胞内高度积累而毒害细胞, 造成细胞生长的停止和下降, 而丢失重组质粒的细胞却保持其生长状态使得重组质粒稳定性下降。后者温度的诱导处在细胞生长的维持期, 它的维持能量不足以承担目的基因表达的蛋白合成所需能量, 使酶活力表现出较低水平。当然重组质粒稳定性受其影响也较小。

理论认为, 受温度调控的重组质粒在最佳的

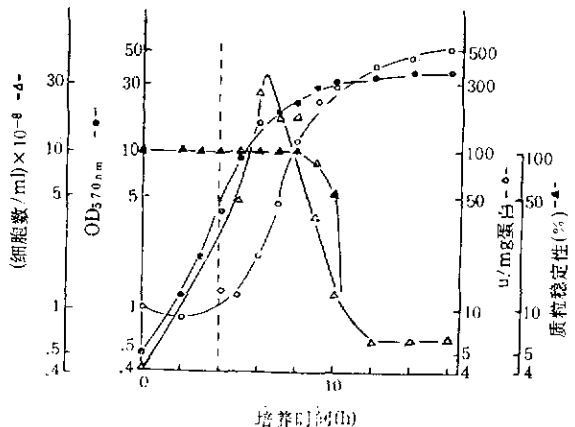


图 7 对数生长期改变培养温度对细胞代谢的影响

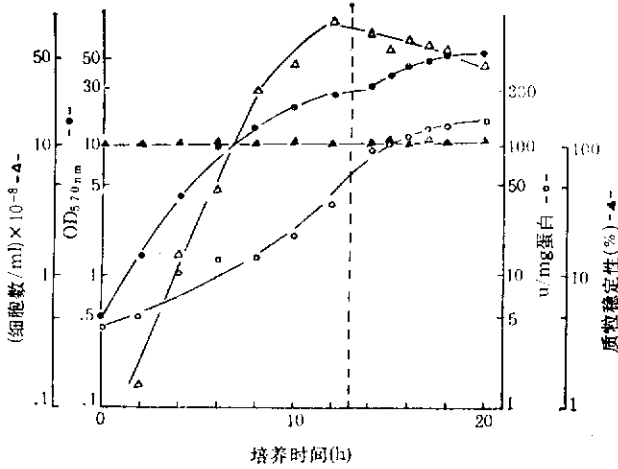


图 8 维持生长期改变培养温度对细胞代谢的影响

培养条件下,可使目的基因表达产物的浓度达到极限。实验得出最佳的培养环境应是温度逐步顺序改变,可避免热冲击对受体细胞的损害。另外,温度的转换时间选择应有理论指导,由模型化的程序所控制。

2. λ 噬菌体的早期左向转录的启动子 P_1 ,其操纵子能与噬菌体 C_1 基因产生的 λ 阻遏蛋白结合。此蛋白是分子量为52000d的二聚体,它的存在阻止mRNA的转录。但 C_1 基因的突变株使编码的 λ 阻遏蛋白成为对温度敏感 [21]。

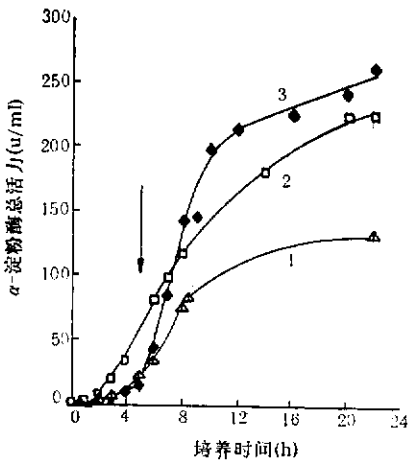


图 9 不同温度条件对 α -淀粉酶活力的影响
 1. 恒定 30°C 2. 恒定 40°C 3. 培养 5h 处温度从 30°C 转换至 40°C

重组质粒 pCSS941 它的 P_1 启动子下游组建有嗜热脂肪芽胞杆菌的高温 α -淀粉酶基因 [22] 在大肠杆菌 MC1061 中表达。两阶段培养在 5h 处改换温度从 30°C 至 40°C, 图 9 指出, 这种操作使 α -淀粉酶量比恒定温度条件的操作可提高约 12% [23]。随着温度的改变, α -淀粉酶的分泌能力亦有所提高, 如图 10 所示。在大肠杆菌受体

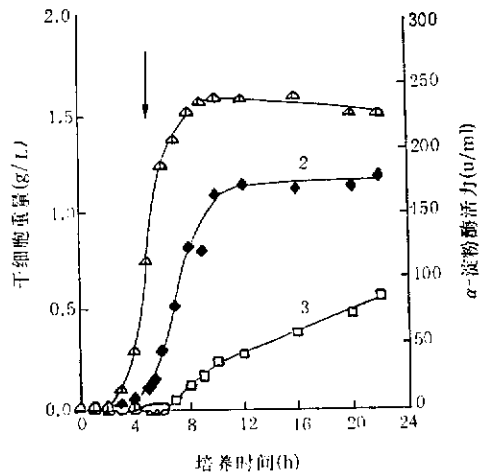


图 10 具有温度改换的操作条件中基因工程菌的培养
 1. 大肠杆菌生长 2. 细胞内 α -淀粉酶活力
 3. 培养液中 α -淀粉酶活力 箭头为温度由 30°C 向 40°C 的转换时间处

细胞外可测得酶活力 85u/ml, 胞内 175u/ml。温度的“开关”效应使 C_1 阻遏蛋白纯化, 不能再与 P_1 操纵子结合, 使重组质粒的拷贝数增加并且提高了目的基因转录译效率。但温度的“开关”时间选择有待于实验证明。

对于来自自组成型酶系的启动子, 如糖酵解酶系的 PGK [24], GAP [25], ADH-1 [26] 等, 这些酶系的合成速率既不受诱导物控制, 也不受辅阻遏物控制, 基因表达在任何时刻都进行。因此, 经常可见在培养过程中存在着丢失了重组质粒细胞的生长 [27], 它们和受体细胞共同享用培养基并形成竞争的生长, 减少基因表达物的产率。为提高重组质粒的稳定性, 调用合适的操作方式使受体细胞生长速率具有优势并使两种表型细胞生长竞争趋于极端化 [28-31]。可调控的环境参数为温度、pH、培养基组份的改变和溶解氧浓度, 操作参数则为流加的控制。这类启动子系统的调控由于重组质粒不稳定而显得较为复杂。培养工艺的建立必须先从理论上了解其受体细胞生长动力学规

律以指导环境参数、操作参数的顺序变化, 多次重复和改进, 由此设计工艺操作的各项指标。

基因工程菌株培养设备

常规的微生物发酵设备可直接用于基因工程菌的培养工艺。不同点在于利用微生物发酵主要收获的是它们的初级或次级代谢产物, 细胞生长并非主要目标。基因工程菌培养是为了获得大量的基因表达产物。由于这类物质是相对独立于细胞染色体基因之外的重组质粒基因所合成而细胞并不需要的蛋白类。因此, 培养设备以及设备控制应满足于受体细胞高浓度和基因表达产物的高表达。图 11 显示基因工程菌培养的实验装置和必要的操作控制要点。

基因工程菌的培养过程主要包括: (1) 通过摇瓶操作了解工程细胞生长的基础条件, 如温度、pH、溶解氧浓度、培养基各种成份以及碳氮比。(2) 分析表达产物合成、积累对受体细胞的影响以及重组质粒不稳定的操作区域, (3)

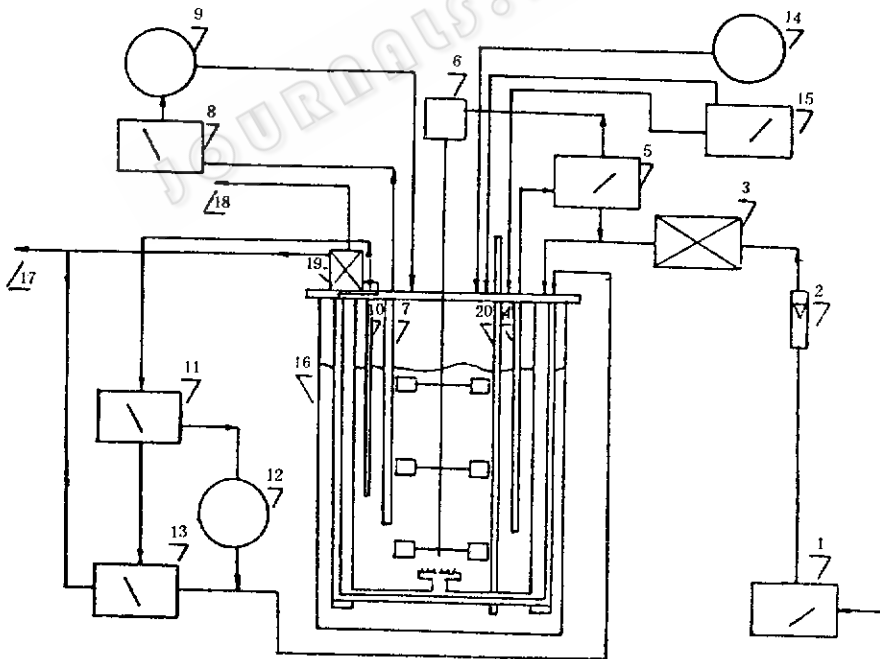


图 11 培养实验设备简示

1. 去水去油空压机系统
2. 转子流量计
3. 空气过滤系统
4. 溶解氧电极
5. 溶解氧控制系统
6. 搅拌转数器
7. pH 电极
8. pH 控制系统
9. 酸、碱补加装置
10. 热敏电阻
11. 温度控制系统
12. 加热器
13. 冷冻水浴系统
14. 消毒装置
15. 培养基流加装置
16. 培养罐体
17. 冷却水排出
18. 排气
19. 排气冷凝器
20. 取样管

通过培养罐操作确定培养参数和过程控制的方案以及顺序。由于细胞生长和异源基因表达之间有着较大的差异,鉴于目前已确认的工艺,上述培养参数在全过程中分段控制是必须的。(4)操作中须防止杂菌的污染,空气过滤系统采用活性炭和玻璃纤维棉材料,为避免基因工程菌株在自然界的扩散,排气和培养液要经化学处理或热处理后才可排放。

为了保持细胞生长良好的微环境,延长受体细胞生长对数期,宜用流加操作方式,流加速率根据其生长规律调节。间歇式操作和连续式操作由于它们存在较大的不足而在实际过程中并不采用。

基因工程菌株严格的操作顺序加速了微机在这领域中的应用。图12表示一个简单的程序控制器/反馈补偿器(PF)系统。前者沿着设计序列

工作,后者补偿由于培养过程的噪声和干扰所造成的实际操作参数与设计参数的偏差^[32]。

由于干扰的影响

$$\varepsilon = X(\bar{F} + \Delta F, t) - X^*(t) = \Delta X(t)$$

反馈补偿通过增加基质流加速率 ΔF , 使实测细胞浓度与设计值之间的差值减至最低。

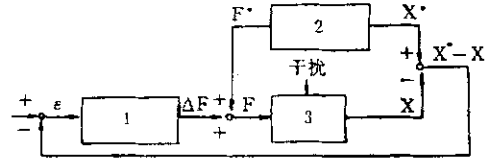


图 12 PF 系统工作程序示意
 F^* , X^* ——设计值或程序中的基质流加速率和细胞浓度
 1. 反馈补偿器 2. 程序控制器 3. 培养罐

参 考 文 献

- [1] Paula, M. A. N.: Third European Congress on Biotechnology, Vol. 2, p. 409, 1984.
- [2] Johnson, J. S.: *Science*, 219, 632, 1983.
- [3] Nordstrom, K. et al.: *Plasmid*, 4, 215, 1980.
- [4] Siegel, R. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 28, 1985.
- [5] Miller, C. A. et al.: *Gene*, 24, 309, 1983.
- [6] Dewey, D. Y. et al.: World Congress III of Chemical Engineering, Tokyo, 10a, p. 254, 1986.
- [7] Padan, E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258, 5666, 1983.
- [8] Remaut, E. et al.: *Nucl. Acid res.*, 1, 4677, 1983.
- [9] Jazwinski, S. M. et al.: *PNAS*, 76(3), 1223, 1979.
- [10] Bram, R. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.*, 82, 43, 1985.
- [11] Allais, J. J. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2547, 1983.
- [12] Ros, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.*, 80, 6872, 1983.
- [13] Roggenkamp, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 149, 489, 1984.
- [14] Holtzer, H.: *Trends biochem. Sci.*, 1, 178, 1976.
- [15] Eggeling, L. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 197, 1978.
- [16] Ellis, S. B. et al.: *Molecular and Cellular biology*, 7, 1111, 1987.
- [17] Parker, C.: World Congress III of Chemical Engineering, Tokyo, 10a, p. 255, 1986.
- [18] Simons, G. E. et al.: *Gene*, 28, 55, 1984.
- [19] Remaut, E. et al.: *ibid*, 22, 103, 1983.
- [20] Kobayashi, T. et al.: World Congress III of Chemical Engineering, Tokyo, 10a, p. 383, 1986.
- [21] Caulcott, C. A. et al.: *Trends in Biotechnol.*, 4, 142, 1986.
- [22] Suominen, I. et al.: *Extracellular Enzymes of Microorganisms* (Chaloupka, J. eds.) New York, Plenum, 129, 1987.
- [23] Renikainen, P. et al.: *Biotechnol. Letters*, 10(3), 149, 1988.
- [24] Deryneh, R. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 11, 1819, 1983.
- [25] Bitter, G. A. et al.: *Gene*, 32(3), 253, 1984.
- [26] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 298, 374, 1982.
- [27] Hjortso, M. A. et al.: *Biotechn. Letters*, 7, 21, 1985.
- [28] Fitcher, A. B. et al.: *J. Bacteriol.*, 157, 283, 1984.
- [29] Nattew, J. K. et al.: *Biotechn. Letters*, 8, 225, 1986.
- [30] Dykhuizen, D. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 47, 150, 1983.
- [31] Imanaka, T. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 369, 1985.
- [32] Takeichiro, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1675, 1985.