

大肠杆菌W 3110(pEC901)的 α A干扰素生产

康风先* 叶勤** 俞俊棠 张嗣良

(华东理工大学生化工程研究所, 上海 200237)

通过大肠杆菌W 3110(pEC 901)和宿主菌W 3110 的连续培养, 分别得到它们的最大比生长速率、饱和常数、维持系数和生长得率系数。两者生长动力学参数的差异表明由于质粒pEC 901 的存在, 明显使大肠杆菌的生长速率降低及维持代谢的消耗增大。W 3110 (pEC 901)的质粒稳定性和 α A干扰素的表达均随比生长速率的增大而增大。在补料分批培养中, 通过葡萄糖的流加维持W 3110(pWC 901) 较高的比生长速率, 培养 13 h 的干扰素效价达到 2.5×10^1 u/L, 比摇瓶培养大为增加。

关键词 α A干扰素; 连续培养; 补料分批培养

基因操作技术的发展, 为利用微生物大规模生产各种具有特殊生理活性的蛋白开辟了道路。现在, 许多真核基因, 如人胰岛素、生长因子、多种干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子等都已在微生物中得到表达。然而 要实现外源基因的高表达, 除了要构建高效的载体-宿主系统以外, 基因工程菌的发酵过程控制也是十分重要的^[1]。连续培养可以为微生物提供恒定的生活环境, 控制其比生长速率, 为研究基因工程菌的发酵动力学创造了很好的条件。本文报道带有人 α A干扰素基因的大肠杆菌的连续培养和补料分批培养的结果。

材料和方法

(一)菌种

本研究采用的菌种为*E. coli* W 3110 (pEC 901), 由本院生化工程研究所王二力副研究员提供。pEC 901带有受启动子控制的人 α A干扰素基因, 并带有四环素耐药性标记。

(二)培养基

1. 种子培养基 (g/L): Polype-

pton(日本大五营养)10, 酵母抽提物(英国Oxoid)5, NaCl 5, pH 7.0, 使用前加四环素12 μ g/ml。

2. 固体培养基: 同种子培养基, 并加入琼脂 20 g/L, 根据需要加入或不加四环素。

3. 发酵培养基 (g/L): Na₂HPO₄ 6, KH₂PO₄ 3, NaCl 0.5, NH₄Cl 1, CaCl₂ 0.011, MgSO₄ 0.24, 葡萄糖 2, pH 7.2。其中葡萄糖、磷酸盐和镁盐分开灭菌。

4. 高密度培养基(g/L): Na₂HPO₄ 6, KH₂PO₄ 3, NaCl 0.5, (NH₄)₂SO₄ 5, NH₄Cl 5, MgSO₄ 2, CaCl₂ 0.011, 葡萄糖 6, 微量元素贮备液^[2] 1 ml/L。所有培养基均在0.05 MPa 压力下灭菌。

(三)培养方法

1. 培养条件: 培养温度37 $^{\circ}$ C, 接种量3%。

本文于1992年6月22日收到。

* 现在无锡轻工学院。

** 通信联系人。

国家自然科学基金和上海市科技发展基金资助部分工作。

第二军医大学杨果思承担了干扰素效价测定工作, 特此致谢。

2. 摇瓶培养: 250 ml锥形瓶中装50 ml培养基。接一环斜面培养物于种子培养基, 置摇床培养10 h, 转接入发酵培养基(葡萄糖浓度为4 g/L)中, 置摇床培养5—10 h。

3. 连续培养: 将摇瓶种子接入微型反应器中的250 ml发酵培养基中(葡萄糖为限制性基质), 在通气量 1.5 vvm 下搅拌培养。待反应器内菌体浓度达到一定程度后, 开动进料和出料蠕动泵, 以一定稀释率进行连续培养。每4 h左右测定流出液中的菌体浓度、葡萄糖浓度和质粒稳定性, 达到稳态后测定干扰素效价。

4. 高密度培养: 在5 L发酵罐(日本丸菱公司MD 300)中的3 L高密度培养基接入摇瓶种子培养液。通气量 1 vvm 下搅拌培养。培养过程中改变搅拌转速以调整反应器的氧传递能力, 使溶解氧不低于20%饱和值。根据需要流加浓度为400 g/L的葡萄糖溶液。

(四) 测定方法

1. 菌体浓度: 用721型分光光度计测定培养液的光密度 OD_{550} 。实验表明, 当 $\text{OD}_{550} < 0.3$ 时光密度与菌体浓度有线性关系, 1个 OD_{550} 单位相当于0.287 g菌体(dwt)/L。

2. 葡萄糖浓度: 用3,5-二硝基水杨酸试剂与培养液的离心上清液(需要时加以稀释)作用进行显色。测定 OD_{520} , 与标准曲线对照, 求出葡萄糖浓度。需要时用葡萄糖试剂盒测定加以校核。

3. 质粒稳定性: 将培养液样品适当稀释, 均匀涂布于不含四环素的平板培养基上。培养12 h左右, 用无菌牙签随机挑选100个菌落, 点接到含四环素的平板培养基上。培养12 h, 统计长出菌落的比例。

4. 干扰素效价: 取2 ml培养液, 离

心沉淀菌体, 弃去上清液, 加裂解液(含NaCl 30 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.8) 120 μl , 将菌体悬浮, 加少量溶菌酶粉末, 冻(-25 $^{\circ}\text{C}$)融(37 $^{\circ}\text{C}$)三次, 离心, 上清液用细胞病变保护法^[8]测定干扰素效价。

结果与讨论

(一) 摇瓶培养

E. coli W 3110(pEC 901)在摇瓶培养时菌体浓度可达1 g (dwt)/L。干扰素效价约 $2 \times 10^7 \text{ u/L}$, 比效价(单位质量干菌体所含的干扰素)约为 $2 \times 10^7 \text{ u/g}$ 菌体(dwt)。在各种条件下进行摇瓶培养, 均未发现质粒丢失现象。

(二) 连续培养

1. 生长: 对W 3110(pEC 901)进行连续培养。在不同稀释率下的稳态菌体浓度和葡萄糖浓度见图1。将稀释率的倒数对葡萄糖浓度的倒数进行标绘, 得到一条直线, 表明W 3110(pEC 901)的生长可用Monod方程描述。根据该直线的截距和斜率求出最大比生长速率 μ_m 和饱和常数 K_s (表1)。为了与宿主菌W 3110的生

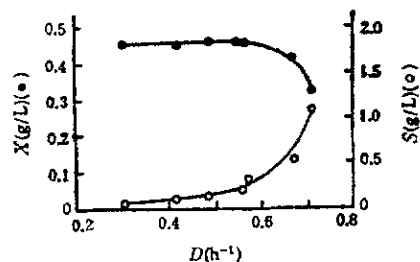


图1 *E. coli* W 3110(pEC 901)连续培养中稳态菌体浓度(X)和葡萄糖浓度(S)与稀释率(D)的关系

Fig. 1 Steady state cell concentration (X) and glucose concentration (S) vs. dilution rate (D) in continuous culture of *E. coli* W 3110(pEC 901)

长特性对比,对W 3110 也进行了连续培养,结果见图 2。W 3110 的生长也可用 Monod方程描述 其 μ_m 和 K_s 也列于表 1 中。

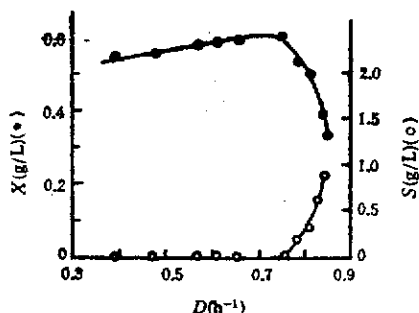


图 2 *E. coli* W 3110 在连续培养中稳态菌体浓度(X)和葡萄糖浓度(S)与稀释率(D)的关系
Fig. 2 Steady state cell concentration (X) and glucose concentration (S) vs. dilution rate (D) in continuous culture of *E. coli* W 3110.

W 3110 (pEC 901) 的最大比生长速率 μ_m 明显低于宿主菌 W 3110, 而饱和常数 K_s 则高于W 3110, 表明质粒pEC 901的存在使大肠杆菌的生长受到明显的影响。

2. 葡萄糖的利用: 根据连续培养的结果, 按下式求出微生物对限制性基质葡萄糖的比消耗速率:

$$q_s = D(S_0 - S)/X \quad (1)$$

其中 q_s 为葡萄糖的比消耗速率 (g/g 菌体/h), D 为稀释率 (h^{-1}), S_0 和 S 分别为进料和反应器中的葡萄糖浓度 (g/L), X 为反应器中的菌体浓度 (g/L)。对葡萄糖进行物料衡算, 并忽略干扰素及副产物的形成所耗用的葡萄糖, 可得

$$q_s = m + \mu/Y_G \quad (2)$$

其中 m 为维持系数 (g葡萄糖/g菌体/h), Y_G 为生长得率系数 (g菌体/g葡萄糖)^[4]。将W 3110(pEC 901)和W 3110的 q_s 分别对 μ 进行标绘, 由所得到的直线的截距和斜率求出各自的 m 和 Y_G , 见表 1。

3. 质粒稳定性: 连续培养为微生物

表 1 *E. coli* W 3110(pEC 901)和W3110的生长动力学参数

Table 1 Growth kinetic parameters for *E. coli* W 3110 (pEC 901) and W 3110

Organism	μ_m (h^{-1})	K_s (g/L)	m (g/g cell/h)	Y_G (g cell/g)
W 3110 (pEC 901)	0.763	0.083	0.51	0.34
W 3110	0.847	0.015	0.21	0.32

提供了无限期生长的可能, 因而也是研究微生物的遗传稳定性的好方法^[5-7]。为了研究W 3110 (pEC 901) 在不同比生长速率下的质粒稳定性, 在每个稀释率下均连续培养一星期左右, 考察其四环素耐药性的变化。由于丢失质粒的个体在同样的环境中较带有质粒的个体表现出生长的优势(表 1)。尽管发生质粒丢失的频率只有 10^{-12} , 但一旦培养液中产生丢失质粒的个体, 便使带有质粒的个体很快从反应器中淘汰(图 3)。图 4 反映了稀释率(比生长速率)与质粒稳定性(以不发生质粒丢失的传代数表示)的关系。随着稀释率的增加, 质粒稳定性有明显的增加, 表明较高的限制性基质浓度有利于改善质粒稳定性。

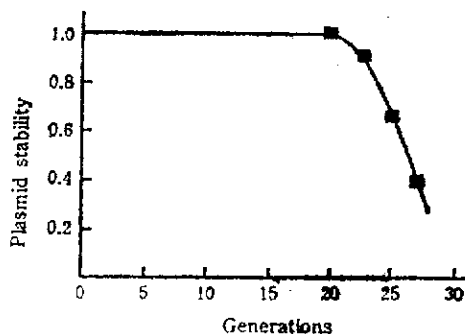


图 3 稀释率 $0.302 h^{-1}$ 时 W 3110(pEC 901) 质粒稳定性变化动态

Fig. 3 Plasmid stability dynamics of W 3110(pEC 901) at the dilution rate of $0.302 h^{-1}$

4. 干扰素生产: W 3110(pEC901) 在不同稀释率下的干扰素比效价见图 4。

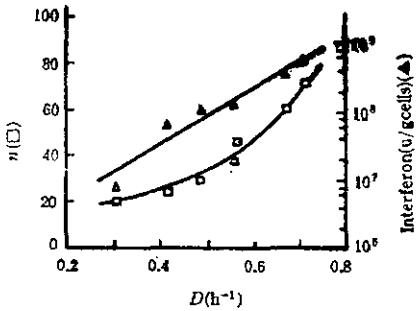


图 4 稀释率对质粒稳定性和干扰素生产的影响
n为不发生质粒丢失的传代数

Fig. 4 Influence of dilution rate on plasmid stability and interferon production

n is the generations without the loss of plasmid

随着稀释率的增大, 干扰素的比效价明显增大。这一现象与质粒稳定性相一致。

(三) 高密度培养

根据连续培养的结果, 在发酵过程中将限制性基质葡萄糖浓度控制在 0.5 g/L 以上, W 3110(pEC 901) 的比生长速率可高于 0.67 h^{-1} , 则质粒稳定性和干扰素的表达都可达到较高的水平。图 5 是高密度培养的结果, 最高菌体浓度达 30.2 g (dwt)/L 培养 13 h 干扰素的效价达到最大值 $2.5 \times 10^{10} \text{ u/L}$, 但以后则迅速下降。产生这一现象的原因很可能是由于醋酸的积累。许多研究人员指出, 大肠杆菌在高比

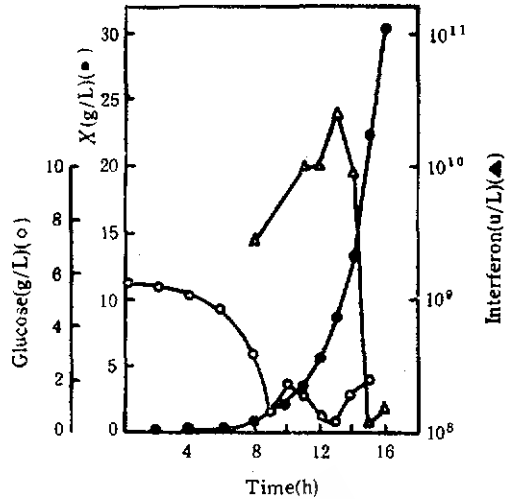


图 5 W 3110(pEC 901) 的补料分批培养
Fig. 5 Fed-batch culture of W3110 (pEC 901).

生长速率下形成副产物醋酸^[2,3,9], 而醋酸的生成可影响干扰素的表达^[10]。在连续培养的实验中, W 3110 (pEC 901) 的高比生长速率与干扰素的高表达相对应, 这可能是由于生成的醋酸因不断稀释, 浓度相对较低, 因而对干扰素表达的影响很小。而在补料分批培养中, 随着菌体浓度的增大, 积累的醋酸浓度也增大, 达到一定程度后使干扰素的表达开始受到影响。在这种情况下, 采用边发酵边分离的方法可望进一步提高干扰素的发酵单位。

参 考 文 献

- [1] Ryu, D. D.Y. and Lee, S. B.: in "Horizons of Biochemical Engineering", University of Tokyo Press, pp. 97, 1987.
- [2] Fieschko, J. and Ritch, T.: *Chem. Eng. Commun.*, 45:229, 1986.
- [3] 杜平, 医学实验病毒学, 人民军医出版社, p. 193, 1985.
- [4] Pirt, S. J.: Principles of microbe and cell cultivation, Blackwel Scientific Publications, pp. 70, 1975.
- [5] Wang, P. C. et al.: *J. Ferm. Technol.*, 66:83, 1988.
- [6] Primrose, S. B. et al., in "Continuous Culture", 8:213, 1984.
- [7] Noack, D. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 184:121, 1981.
- [8] Pan, G. J. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 9:89, 1987.
- [9] Reiling, H. E. et al.: *J. Biotechnol.*, 2:191, 1985.
- [10] Brown, S. W. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 5, 1985.

Production of Interferon α A by *Escherichia coli* W 3110 (pEC 901)

Kang Fengxian Ye Qin Yu Juntang Zhang Siliang
(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University
of Science and Technology, Shanghai 200237)

The maximum specific growth rates, saturation constants, maintenance coefficients and growth yields for *E. coli* W 3110(pEC 901) and the host, W 3110, were estimated through continuous cultivation of the two strains. The growth rate of the transformant was lower than that of the host while its maintenance metabolism increased due to the existence of plasmid pEC 901. Both the plasmid stability and the expression level of interferon increased with the increase in dilution rate. In fed-batch culture, the growth rate of W 3110(pEC 901) maintained at a high level by controlling the feeding rate of glucose, and the interferon titer reached 2.5×10^{10} u/L, which was greatly improved compared with those reached in shake flask cultures.

Key words: Interferon α A; continuous culture; fed-batch culture