

# ① 基因工程菌株 *Escherichia coli* C600(pRLK14) 的流加培养\*

165-169

Q 78

张小里<sup>1)</sup> 党高潮<sup>2)</sup> 李宝璋<sup>1)</sup> 小林猛<sup>3)</sup>

(1)西北大学化工系;2)西北大学化学系,710069,西安太白北路1号;3)名古屋大学工学部,464,日本名古屋;第一作者32岁,男,讲师)

**A 摘要** 在1L搅拌发酵罐中对含有重组质粒pRLK14的大肠杆菌进行了培养。结果表明,采用二段培养法,于34℃增殖细菌,在对数增殖后期升温到42℃进行诱导,可以高效表达基因产物半乳糖激酶。诱导期,醋酸浓度增长较快,模拟实验表明,控制醋酸浓度可进一步提高半乳糖激酶产率。

**关键词** 生物化学工程; 流加培养; 基因工程; 基因表达; 大肠杆菌; 半乳糖激酶

**分类号** TQ920.1

基因工程菌株

基因工程技术生产有用物质的关键之一是大规模培养工程菌株、高效地表达目的产物。由实验室克隆成功的菌株在向工业装置放大的过程中,常遇到以下障碍,使工业化进程受挫:①从试管培养放大到发酵罐中时,由于难于预测的原因,产品产率下降,甚或生产不出产品;②外源蛋白的过量表达使寄主菌生长减慢、死亡,或者使质粒脱落,生产难于进行;③大规模培养时产品成本很高。这些都表明,对工程菌株进行培养工程研究、寻找其放大规律是很有意义的课题。文献1,2曾有研究报道。但是,由于微生物代谢机理的微妙性,这些结果都在一定程度上受实验所用体系局限。

文献3利用 $\lambda$ 噬菌体的强力串联启动子 $p_{RPL}$ 及其温度敏感型阻遏基因 $cI_{857}$ 作为调控基因,构建了可on-off操纵的表现载体系统pRLK14。利用其进行基因产品生产时,由于无需添加诱导剂、提高温度即可进行诱导,因而在生产与人体有关的蛋白质时极为安全,具有很好的应用前景<sup>[3]</sup>。本文就该工程菌株的大规模培养规律进行探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株及质粒

质粒pRLK14由文献3构筑。具有 $\lambda$ 噬菌体的 $p_{RPL}$ 串联启动子, $cI_{857}$ 阻遏基因,启动子下游为目的基因( $galK$ )。该质粒具有氨苄青霉素抗性( $Amp^R$ )标记。寄主菌为*Escherichia coli* C600( $galE^+$ ,  $galT^-$ ,  $galK^+$ ,  $lac$ ,  $thr$ ,  $leu$ ),用pRLK14转换寄主形成工程菌株*Escherichia coli* C600(pRLK14)。

### 1.2 培养基

实验使用天然培养基和合成培养基。天然培养基(胨 10 kg/m<sup>3</sup>, 酵母膏 5 kg/m<sup>3</sup>, NaCl 5 kg/m<sup>3</sup>,

\* 陕西省自然科学基金资助课题

收稿日期:1994-04-04

氮苄青霉素  $0.1 \text{ kg/m}^3$ , pH 7.0) 用于试管前培养; 在流加培养中使用了完全合成培养基<sup>[2]</sup>。

### 1.3 发酵罐

流加培养所用发酵罐体积为 1 L, 其上装有搅拌装置、pH、DO 及温度测控系统。

### 1.4 培养方法

保存于  $-70^\circ\text{C}$  的菌株首先接种到装有 10 mL 天然培养基的试管中, 于  $34^\circ\text{C}$  进行一次前培养。然后, 转接到装有 100 mL 合成培养基的试管中再进行一次前培养。流加培养是用前培养对数增殖中期的 200 mL 培养液接种到装有 800 mL 培养基的发酵罐中而开始的。培养过程中通过调节空气流量和转速将 DO 控制在  $2\sim 5 \text{ g/m}^3$ 。葡萄糖的流加是根据 DO 指示手工进行的。pH 由测控仪通过添加 14% 氨水或 18% 盐酸自动控制在 7.0 左右。温度由控温仪自动控制。培养初期用空气供氧, 后期通入了纯氧。升温进入诱导阶段时, 通过替换水浴槽中的低温水, 在 15 min 内达到预定值  $42^\circ\text{C}$ 。

### 1.5 分析方法

1.5.1 菌体密度 将样品用生理盐水作适当稀释后, 测定 660 nm 波长下的吸光度  $\text{OD}_{660}$ 。

1.5.2 质粒保持率 将天然培养基琼脂板上长出的单一菌落移植到含氮苄青霉素的相同培养基琼脂板上, 于  $30^\circ\text{C}$  培养后进行计数。

1.5.3 葡萄糖和醋酸浓度 样品经离心分离后得到菌体和上清液。分别测定上清液中的葡萄糖和醋酸, 葡萄糖浓度用葡萄糖浓度测定仪 (Yellow Spring instrument CO.) 测定; 醋酸浓度是以 Chromosorb 101 (Johns manville Co.) 作担体用气相色谱测定。

1.5.4 半乳糖激酶活力 菌体悬浊于 Tris 盐酸缓冲液中经超声波破碎、离心除去残渣制取酶液。活力按文献 4 的方法用同位素  $^{14}\text{C}$ -半乳糖作底物进行测定。计算比活力的蛋白质浓度根据 Lowry 法<sup>[5]</sup>测定。一个活性单位 U 定义为每 min 磷酸化  $1 \mu\text{mol}$  半乳糖的酶活力。

## 2 结果及讨论

### 2.1 培养及诱导温度

$\lambda$ 噬菌体  $\text{p}_{\text{RPL}}$  启动子是温度诱导型强力启动子。在低温下  $\text{cI}_{857}$  阻遏基因产生的阻遏蛋白抑制基因表达; 升高温度, 阻遏蛋白失活, 基因表达得到诱导。为了确定诱导生产半乳糖激酶的温度条件, 在试管中进行培养探讨其对增殖和诱导生产的影响。选择了  $30, 34, 37, 42^\circ\text{C}$  4 个温度进行对比实验, 结果见图 1。由图可知,  $30^\circ\text{C}$  下起始于  $\lambda\text{p}_{\text{RPL}}$  串联启动子的基因表达完全得到抑制; 而在  $42^\circ\text{C}$  下培养时, 整个过程中基因表达处于诱导状态。 $34^\circ\text{C}$  及  $37^\circ\text{C}$  下培养时, 基因表达基本得到抑制, 仅在增殖停止期可测得少量半乳糖激酶活力, 而且,  $34^\circ\text{C}$  时抑制效果佳, 生长快速。由此可以确定,  $34^\circ\text{C}$  为菌增殖的最佳温度条件, 而  $42^\circ\text{C}$  为充分诱导生产的温度条件。为了兼顾增殖与基因表达, 可以采取  $34^\circ\text{C}$  下增殖, 且待菌生长到一定密度后升高温度进行诱导的二段培养法。

### 2.2 诱导时刻

为了增加基因产品的时空产率, 不仅需要提高菌的表达水平, 同时必须增高菌体增殖密度。这样兼顾二方面采用二段法进行培养时, 诱导时刻亦是至关重要的因素。我们根据 2.1 确定的温度条件进行培养, 在  $34^\circ\text{C}$  下使 *Escherichia coli* C600 ( $\text{pRLK14}$ ) 增殖, 当菌体密度  $\text{OD}_{660}$  分别达到 16, 30, 58, 90 时升温到  $42^\circ\text{C}$  进行诱导, 其结果列于附表。可以看出, 在  $\text{OD}_{660}=58$  时进行诱导, 半乳糖激酶活力及比活力均达最大。

在  $42^\circ\text{C}$  下进行恒温培养, 即无需增殖阶段一开始就诱导基因表达时, 半乳糖激酶的最大比活力仅达到  $0.96 \text{ U/mg-protein}$  (数据未给出), 明显低于各次  $34^\circ\text{C} \rightarrow 42^\circ\text{C}$  二段培养的结果。说明将菌的增殖与诱导生产分开的二段培养法是有效的。

最佳诱导时刻的选择实质上体现了对菌最优状态的把握, 对数增殖前期诱导时, 菌没有充分增殖和成熟就担负起表达基因产物和分裂后代的双重任务, 势必难于获得较高的表达水平; 而当接近停止期 ( $\text{OD}_{660}=90$ ) 时再进行诱导, 此时菌虽充分增殖, 但由于生存环境恶化, 菌的活力衰弱, 故不能给基因表

达提供大量生力旺盛的细胞。所以, 正如上述实验结果, 在接近过渡期(图 2,  $OD_{660} = 58$ )进行诱导时, 可获得最佳效果。

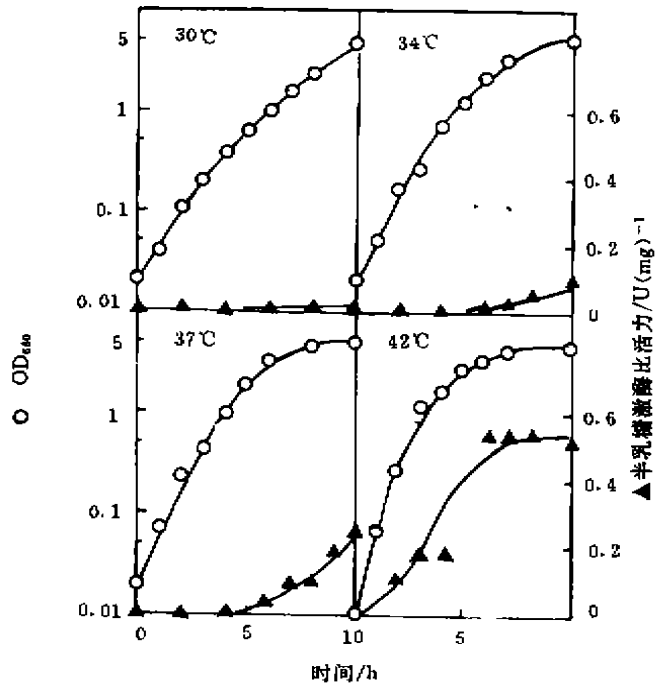


图 1 各种温度条件下的对比实验

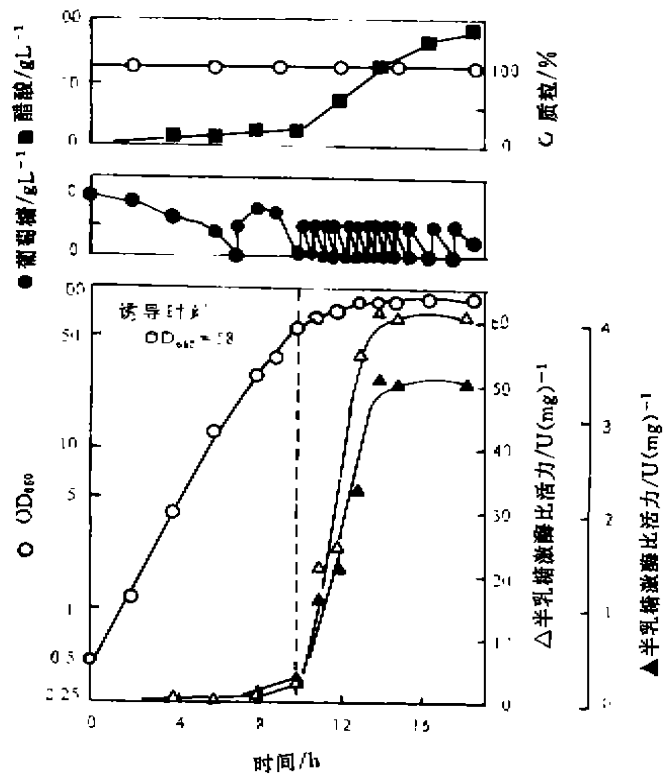


图 2 34°C → 42°C 二段培养诱导生产半乳糖激酶

### 2.3 发酵产物的阻害作用

附表给出了各种条件下培养结束时的醋酸浓度。可以看出,利用 *Escherichia coli* C600(pRLK14) 进行基因产品半乳糖激酶生产时,发酵产物醋酸在培养基中积累浓度较高。由图 2 可知,诱导阶段,醋酸浓度增加迅速。培养结束时其浓度一般为 20 g/L 左右。关于醋酸对细胞增殖和基因表达的不利影响,文献 6,8 曾有论述。因此,我们对该体系进行实验探讨。

用 T 试管(100 mL)在 34℃ 下培养 *Escherichia coli* C600(pRLK14),在将要升温诱导时,向试管中加入用氨水调至中性的醋酸溶液,使培养基中相应的醋酸浓度分别为 0, 2, 4, 10 g/L 左右,然后升温到 42℃ 令其表达产品。结果如图 3,图中的醋酸浓度为测定值,当醋酸浓度达到 4 g/L 时,对菌的生长和基因表达产生明显影响;而达到 10 g/L 时,菌的生长和基因表达几乎被完全抑制。从罐培养结果可见,在醋酸浓度高于 10 g/L 以后,菌的生长和基因表达已进入停止或衰退期。因此,不难得出,利用该工程菌株诱导生产半乳糖激酶时,醋酸的积累是影响产率进一步提高的重要因素。为此,除去或减少醋酸生成就成为增加生产效率的有效措施。

文献 7 用  $\lambda_{pL}$  启动子诱导生产白细胞间介素-2 时,升温诱导后亦发现醋酸积累。他们采用过滤方式除去醋酸后,提高了产品产率。另一种措施是利用大肠杆菌的某些变异株减少醋酸生成,据悉起到了提高表达水平的作用<sup>[9]</sup>。

附表 各种诱导时刻的培养结果

| 诱导时菌体密度/OD <sub>600</sub> | 最终菌体密度/OD <sub>600</sub> | 最大活力(U · mL <sup>-1</sup> ) | 最大比活力(U · mg <sup>-1</sup> ) | 醋酸浓度(g · L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 16                        | 69                       | 43.2                        | 2.58                         | 19.8                       |
| 30                        | 89                       | 53.4                        | 2.81                         | 25.4                       |
| 58                        | 89                       | 62.5                        | 3.38                         | 18.2                       |
| 90                        | 110                      | 26.4                        | 0.98                         | 24.1                       |

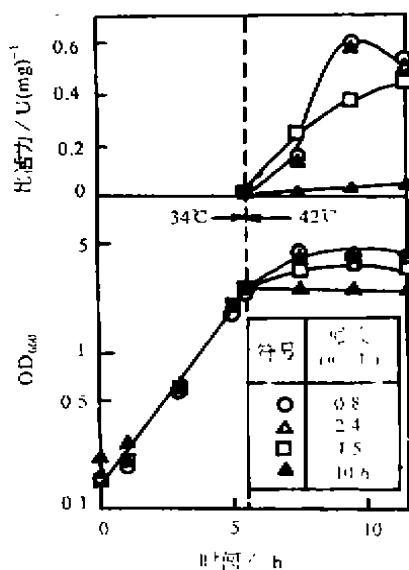


图 3 醋酸对菌增殖和基因表达的影响

### 3 结束语

我们通过在搅拌发酵罐中培养工程菌株 *Escherichia coli* C600(pRLK14),从培养工程角度探讨了

利用该寄主-载体系统进行基因产品高效生产的方法。实验证明, 采用 34℃→42℃的二段培养法, 于对数增殖后期开始诱导表达可以实现目的产物的高效生产。同时发现, 升温诱导后发酵产物醋酸的生成速度较快, 模拟实验证明, 它的积累有害于菌的生长及基因表达。减少或除去培养基中过量的醋酸, 有助于产品产率的提高。这将有待于培养工程及育种方面进一步研究。

### 参 考 文 献

1. 林孔华, 饭岛信可, 黄世佑等. 酵母 PGKプロモ-タ-からの遗传子发现制御による有用物質の効率的生产. 化学工学论文集, 1991, 17(3), 680~688
2. Mizutani S, Mori H, Shimizu S, et al. Effect of amino acid supplement on cell yield and gene product in *Escherichia coli* harboring plasmid. Biotechnol. Bioeng., 1986, 28(2), 204~209
3. Morooka Y, Mitani I. Efficient expression of a promoter-controlled gene. J. Biotechnol., 1985, 2(5), 303~316
4. Mackenny k, shimatate H, Court D, et al. Gene amplification and analysis(2). North-Holland, Elsevier, 1981. 383
5. 太田次郎. 基础生化学の实验法. 东京: オ-ム社, 1986. 15
6. Mori H, Yano T, Kobayashi T, et al. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. J. Chem. Eng. Jpn., 1979, 12(4), 313~319
7. MacDonald H L, Neway J O. Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor culture of *Escherichia coli* K12. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56(3), 640~645
8. Bauer K A, Ben-Basaat A, Dawson M, et al. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor culture of *Escherichia coli* K 12 by a phosphotransacetylase mutant. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56(5), 1296~1302

## Fed-batch Culture of *Escherichia coli* C600 Harboring Recombinant Plasmid pRLK14

Zhang Xiaoli<sup>1)</sup> Dang Gaochao<sup>2)</sup> Li Baozhang<sup>1)</sup> Takeshi Kobayashi<sup>3)</sup>

(1)Department of Chemical Engineering, Northwest University; 2)Department of Chemistry, Northwest University, 710069, Xi'an; 3)Department of Biotechnology, Nagoya University, Japan)

**Abstract** An *Escherichia coli* strain harboring recombinant plasmid pRLK14 was cultured in 1 Litre fermentor. The results showed that genetic product galactokinase could be efficiently produced by two-step culture method, in which the cell was grown at 34℃ then shifted to 42℃ during the late logarithmic growth phase. Acetic acid concentration was increasing rapidly in the inducible stage. So the productivity of galactokinase can be raised by controlling acetic acid concentration at lower level.

**Key words** biochemical engineering; fed-batch culture; gene engineering; gene expression; *Escherichia coli*; galactokinase