

# 乙酸对重组大肠杆菌生长及外源基因表达的影响

沈林南 魏东芝\* 周宇荀 王二力 俞俊棠

(华东理工大学生物化学研究所 上海 200237)

**摘要:** 在重组基因工程菌 DH5 $\alpha$  (PG-FGF) 的高密度培养过程中, 发现培养液中有大量代谢副产物—乙酸的产生和积累, 乙酸的存在抑制了工程菌的生长及外源基因的表达。研究了乙酸在 M9 培养基中对工程菌 DH5 $\alpha$  (PG-FGF) 生长及外源基因表达的影响。结果表明, 乙酸的存在不仅导致重组菌生长速率的降低及延迟期的增长, 而且对外源基因产物的表达具有强烈的抑制作用, 这为该工程菌的高密度培养及外源基因产物的高表达打下了基础。

**关键词:** 重组大肠杆菌, 乙酸, 生长, 基因表达

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0254-03

## EFFECTS OF ACETIC ACID ON GROWTH AND EXPRESSION OF FOREIGN GENE OF RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI*

SHEN Lin-Nan WEI Dong-Zhi ZHOU Yu-Xun WANG Er-Li YU Jung-Tang

(*Institute of Biochemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

**Abstract:** During high cell-density cultivation (HCDC) of a recombinant *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  harboring plasmid pG-FGF for basic fibroblast growth factor production, a large amount of acetic acid was excreted by the cells and accumulated in the culture medium. High concentration of acetic acid in medium inhibited cell growth and expression. In this study, the inhibition of acetic acid on cell growth and expression of foreign gene was examined by using shake flask in M9 medium. The results showed that acetic acid not only caused the cell growth rate decrease and a progressively increased Lag time, but also seriously inhibited the expression of foreign gene.

**Key words:** Recombinant *Escherichia coli*, Acetic acid, Growth, Foreign gene expression

在重组基因产物表达系统中, 由于人们对大肠杆菌遗传特性及生理行为了解最为清楚, 加之其生长快速, 因而被广泛地用于表达各种外源基因<sup>[1-4]</sup>。但是, 大肠杆菌生长时会产生代谢副产物—乙酸, 乙酸的产生和积累不仅抑制重组菌的生长, 而且还影响外源基因的有效表达, 尤其是在重组菌的高密度培养过程中, 随着菌体密度的增加及培养时间的延长, 乙酸的这种抑制作用更为严重, 成为制约高密度培养的重

要因素<sup>[5-6]</sup>。目前, 乙酸复杂的抑制机制尚不完全清楚, 一般认为, 质子化形式的乙酸具有低亲脂性, 作为解偶联剂通过细胞膜进入细胞内, 导致细胞内 pH 值下降, 从而降低总质子驱动力, 影响细胞能学过程<sup>[7,8]</sup>。有关乙酸影响重组菌的生长及外源基因表达水平的专题研究, 至今报

\* 联系人

收稿日期: 1999-01-08, 修回日期: 1999-03-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

道很少。本文研究了在常用的培养基 M9 中, 乙酸对重组菌生长及外源基因表达的影响。结果表明, 乙酸的存在不仅导致重组菌生长延迟期的延长, 而且抑制重组菌的生长及外源基因的有效表达; 乙酸的这种抑制作用随着其浓度的提高而增强。这些结果将有助于我们在进行重组菌的高密度培养时有效地控制培养条件, 减少乙酸的抑制作用, 实现重组菌的高密度培养和外源基因的有效表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

重组菌 DH5 $\alpha$  (PG-FGF) 为本研究室构建的工程菌, 表达质粒 PG-FGF 中 tac 启动子控制重组人碱性成纤维细胞生长因子融合蛋白的表达。

### 1.2 培养方法

**1.2.1 培养基:** LB、M9 培养基(含 20g/L 的葡萄糖按“分子克隆实验指南”所述方法配制<sup>[9]</sup>, 用前加入氨苄青霉素 100mg/L。

**1.2.2 种子培养:** 取 5 $\mu$ L 甘油保存菌株, 接入含 5mL LB 培养基的试管中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。按 1% 接种量接入装有 25mL LB 培养基的 250mL 三角瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C、200r/min 培养 6h, 作为摇瓶试验种子液。

**1.2.3 摇瓶试验:** 250mL 三角摇瓶, M9 培养基 25mL, 接种量 4%, 于 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 旋转摇床中培养。

**1.2.4 诱导表达:** 重组菌在摇瓶中生长至  $OD_{600} = 0.15 \sim 0.20$ , 加入 IPTG(异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷) 至终浓度为 0.4mmol/L, 诱导表达 8~12h 取样分析。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 菌体浓度测定:** 将发酵液适当稀释, 使  $OD_{600}$  值在 0.30 以下, 用 721 分光光度计测定 600nm 下的吸光值, 由菌体浓度和  $OD_{600}$  值标准曲线即可求得菌体浓度:

$$\text{菌体浓度 (g/L)} = OD_{600} \times 0.852 \times \text{稀释倍数}$$

**1.3.2 葡萄糖浓度测定:** 采用葡萄糖试剂盒(上海生物制品研究所产品)测定培养液中葡萄糖

浓度。

**1.3.3 乙酸浓度测定:** 采用气相色谱法, 上海分析仪器厂的 102 型气相色谱仪进行乙酸分析, 上海计算技术研究所生产的 CDMC-1EX 色谱数据处理机进行数据处理。

**样品预处理:** 1.5mL 培养液 5000g 离心 10min, 取 1mL 上清液于 1.5mL 微量离心管中, 加入 20 $\mu$ L 50%  $H_2SO_4$  酸化, 酸化后 5000g 离心 10min, 取 0.5 $\mu$ L 上清液进行分析。从不同浓度乙酸制作的标准曲线获得乙酸浓度。

**1.3.4 重组 bFGF 表达检测:** 取诱导后重组菌培养液 1mL, 5000g 离心 10min, 倒去上清液, 沉淀中加入 100 $\mu$ L SDS-PAGE 加样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min, 5000g 离心 10min, 取 30 $\mu$ L 上样, 进行 SDS-PAGE(15%) 考马氏亮兰染色分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高密度培养中菌体生长及乙酸的积累

图 1 为重组菌 DH5 $\alpha$  (PG-FGF) 高密度培养过程中菌体浓度、残糖浓度、乙酸浓度变化曲线。图 1 表明: 重组菌培养前期(0~6h), 菌体生长缓慢, 乙酸生成较少; 培养中期(6~12h), 菌体生长速率加快, 培养液中乙酸浓度有所增加; 培养后期(12~20h), 乙酸浓度迅速增加, 菌体生长速率随之迅速下降; 培养结束时, 乙酸浓度高达 12g/L, 菌体生长完全被抑制。

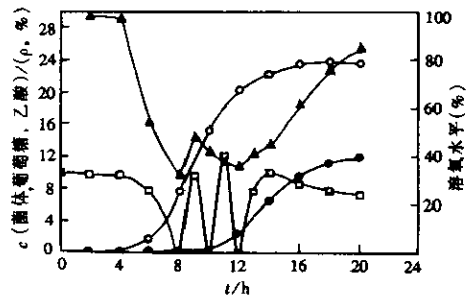


图1 高密度培养过程中菌体浓度、残糖浓度、乙酸浓度及溶氧水平变化曲线

—○— 菌体浓度, —□— 葡萄糖浓度,  
—●— 乙酸浓度, —▲— 溶氧水平

### 2.2 乙酸对重组菌生长的影响

在高密度培养过程中, 除了乙酸的抑制作

用外,其它培养条件如营养成分、供氧等均会影响重组菌的生长和代谢。为了消除这些影响因素,我们采用摇瓶培养试验来考察乙酸对重组菌生长的影响。

接种前,在摇瓶中加入相应量的无菌乙酸钠溶液(pH调整为7.0),使培养液中乙酸浓度分别为0g/L、2g/L、4g/L、8g/L、12g/L、16g/L。接种后每4h取样测定菌体浓度,结果见图2。

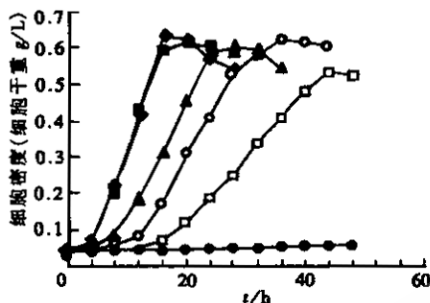


图2 M9培养基中乙酸起始浓度对重组菌DH5 $\alpha$  (PG-FGF)生长的影响

—●— 0g/L, —■— 2g/L, —▲— 4g/L,  
—○— 8g/L, —□— 12g/L, —●— 16g/L

### 2.3 乙酸对重组菌外源基因表达的影响

接种培养重组菌,当菌体浓度达到  $OD_{600} = 0.1 \sim 0.2$  时,加入 IPTG 至终浓度为  $0.4 \text{ mmol/L}$ ,同时加入相应量的无菌乙酸钠溶液,使培养液中乙酸浓度分别 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12g/L, 进行重组菌诱导培养。诱导表达 8~12h, 取样进行 SDS-PAGE, 考察乙酸对重组菌 DH5 $\alpha$  (PG-FGF) 表达外源基因的影响。结果如图 3 所示。

图 3 表明,乙酸对重组菌表达外源基因产物具有很强的抑制作用,随着培养液中乙酸浓度从 1~12g/L 的增长,外源蛋白 GST-FGF 的

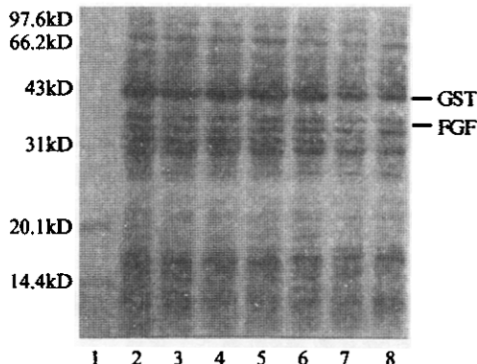


图3 乙酸对重组菌DH5 $\alpha$  (PG-FGF)表达外源蛋白GST-FGF的影响

1 分子量标准蛋白, 2~8 乙酸浓度分别为  
0.1, 2, 4, 8, 10, 12g/L时的蛋白表达量

表达量明显下降,当培养液中乙酸浓度达到12g/L时,外源蛋白的表达完全被抑制。

### 参 考 文 献

- [1] Gold L. Annu. Rev. Biochem, 1988, 57:199~233.
- [2] Hodgson J. Bio/Technology, 1993, 11:887~893.
- [3] Marston F A O. Biochem, 1986, 240:1~12.
- [4] Shatzman A R. Curr. Opin. Biotechnol, 1995, 6: 491~493.
- [5] El-Mansi E M T, Homls W H. J. Gen. Microbiol, 1989, 135:2875~2883.
- [6] Han K, Lim H C. Biotechnol. Bioeng., 1992, 39: 663~671.
- [7] Luli G W, Strohl W R. Appl. Environ. Microbiol, 1990, 56:1004~1011.
- [8] Bech Jensen E, Carlson S. Biotech. Bioeng, 1990, 36:1~11.
- [9] J. 萨姆布鲁克, E F 费里奇, T 曼尼阿蒂斯编著. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993.