

培养过程对基因工程菌稳定性的影响

刘志伟 郭 勇

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

张 晨

(嘉应大学生物系 梅州 514015)

摘要:重组质粒不稳定性是基因工程菌生产中的主要问题,从培养过程的角度综述了选择压力、操作方式、培养基组成、溶氧、培养温度、pH 等因素对质粒稳定性的影响,为基因工程菌的发酵提供参考。

关键词:基因工程菌,培养,质粒稳定性

中图分类号:Q 93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0086-04

包含质粒载体的细胞培养的不稳定性是分子克隆技术商业开发应用中的主要问题。重组质粒稳定性受多种因素影响,如寄主细胞的特性、质粒的类型和环境条件等。质粒的稳定性可以通过构建重组质粒时的基因操作及培养条件优化加以提高。重组缺陷菌株作为克隆基因受体菌、用不包含转座子的质粒、使用温度敏感型质粒、调控环境参数对保持重组质粒稳定性有利。对于一定结构的基因工程菌而言,优化环境条件可以提高稳定性,这对于基因工程产物的生产具有重要的意义。

1 含调控型启动子的基因工程菌稳定性控制

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。因此,形成基因工程菌的阶段培养原则,即调控环境参数(碳氮比、pH、培养温度、溶氧等),于发酵前期,保持受体细胞生长速率,提高受体细胞浓度,控制外源基因不大量表达,这能保证重组质粒稳定地遗传;培养后期,适当调控以提高质粒拷贝数,加强转录翻译效率,使外源基因高度表达。已经采用的诱导方式主要有专一性物质的诱导和培养过程的温度诱导,诱导的时机非常重要。研究重组酵母中克隆基因表达时发现在各种稀释速率下,质粒稳定性随 LacZ 基因表达的诱导而降低。Kim 等研究用基因工程大肠杆菌生产果糖转移酶时证明 D-乳糖可代替有毒而且昂贵的 IPTG,是一个可供选择的合适的诱导物^[1]。

2 选择性培养基提高质粒稳定性

为了提高含质粒细胞的竞争力,通常用选择性培养基进行培养。首先在表达产物的质粒上引入抗生素抗性基因,再引入抗生素到培养基中,这对提高质粒稳定性非常有效,但对于大规模生产系统,抗生素的大量使用,不论从环境或成本都是不值得的。在研究重组大肠杆菌 HMS174(pTZ18U-PHB)质粒稳定性时发现,为了保证细胞正常生长及表达,在种子培养基中必须添加氨苄青霉素(Ap),但由于接种时种子带入的 10mg Ap/L 足以杀死丢失了质粒的细

胞,因而在发酵阶段不必再添加 $Ap^{[2]}$ 。另外,在连续培养中抗生素的添加采用周期性变化(只在无质粒细胞生长占优势时添加)则经济得多, Lee 等对此进行了研究^[3]。而使用由系统内部产生选择压力的培养是一种新的方法,通过偏利共栖和抑制来保护含质粒细胞已在实验室实现。

3 培养操作方式对工程菌稳定性的影响

不同培养操作方式对不同工程菌稳定性有不同的影响。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,多采用流加操作方式;连续操作被认为是得到稳定性高的基因重组菌株的重要手段;而间歇操作在基因工程菌培养中较少应用。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。

3.1 流加操作对工程菌稳定性的影响 流加培养适于生产重组基因产物。流加方式对于质粒的稳定性影响很大。研究生产重组葡聚糖酶枯草杆菌质粒稳定性时发现,周期性分批流加的酶产量和质粒稳定性高于间歇培养和恒化器培养,周期 2~4h,质粒稳定,大于 6h,导致质粒丢失,而间歇培养和恒化器培养时质粒很快丢失^[4]。另外,选择合适的流加方式可提高质粒在非选择性培养基中的稳定性和工程菌的产量。Cheng 等发现含 pSXR125 产 β -半乳糖苷酶的重组酿酒酵母分批培养时,带质粒的细胞在指数生长期减少,但在平衡期增加,这是因为不含质粒的细胞在底物充足时生长较含质粒的细胞快,但在底物耗尽时分解或死亡也较快,因此在适当的时候间歇流加底物形成周期性的饥饿期可提高质粒稳定性和产量,先采用选择性培养基间歇培养细胞,再用新的流加方式,即使用非选择性培养基也能长时间保持基因工程菌的稳定性^[5]。Hyun 等优化了由含启动子 GAL10 的重组酿酒酵母分批流加生产 LC1 的流加工艺,流加混合碳源半乳糖:葡萄糖为 1:1 时得到最高产量^[6]。

3.2 连续培养对工程菌稳定性的影响 基因工程菌的连续培养方面的研究较多。一种选择性循环反应器在连续培养过程中采用诱导方法使含质粒细胞在分离器中絮凝,而细胞生长和产物合成在主发酵罐中进行,循环过程将目的菌株(含质粒菌株)和非目的菌株(不含质粒或其它杂菌)分开,富集重组菌或生产菌,这样保持反应器中的重组细胞浓度,研究表明,这种方法能使含质粒细胞占优势并能高速连续合成外源蛋白。

连续培养时,稀释速率对质粒稳定性有显著影响。无选择压力时,质粒稳定性随稀释速率增大而降低,但不会完全丢失,再用选择性条件又可提高其稳定性。在恒化器中非选择性条件下,整个培养过程可分为两个阶段,第一阶段质粒快速丢失,而第二阶段含质粒细胞基本保持一定水平^[7]。对含重组质粒 pLG669-2 的酿酒酵母研究发现,稀释速率周期变化时,周期的振幅和频率是使质粒稳定的重要参数^[8]。用方型波变化稀释速率,含质粒的细胞浓度和工程菌产物均超过稳定的稀释速率,并发现稀释速率影响比频率影响大。

3.3 固定化培养对工程菌稳定性的影响 相对于游离悬浮培养,固定化细胞对提高质粒稳定性特别有效,特别当用非选择性培养基时,固定化细胞系统将得到高细胞浓度和高产物。在连续生物反应系统,已证明固定化细胞系统提供了一个潜在的有吸引力的生产方法。Castet 等对卡那胶固定化 *B. Subtilis* 工程菌连续培养生长条件和质粒稳定性进行研究,显示 K-卡那胶微囊内的 *B. Subtilis* 在无选择压力下连续培养,细胞密度和质粒稳定性均有提高,在最初 80h 未测到无质粒细胞,而在游离细胞系统中,质粒丢失在很短时间后发生,发现卡那胶固定化重组菌质粒稳定性的提高是由于细胞分裂数目受到胶内孔洞物理结构的限制^[9]。在搅拌罐和气升

式生物反应器中游离悬浮培养,证明了重组酵母的遗传不稳定性,在气升式生物反应器中一种固定化细胞膜采用棉布条固定酵母细胞,在连续操作条件下,能较长周期保持较高比例的含质粒细胞,这可能由于降低了比生长速率并提高了质粒拷贝数^[10]。

4 培养条件对工程菌稳定性的影响

发酵的环境条件,如温度、溶氧水平、pH值、NH₃的供应、营养浓度控制等非常重要,对于一个已经组建完成的克隆菌株来说,选择最适的培养条件是进行工业化生产的关键步骤。

4.1 培养基组成对工程菌稳定性的影响 质粒 pCPPS-31 含羧甲基纤维素酶和新霉素抗性基因,研究含该质粒的 *E. coli* DH5 α 表明质粒稳定性随培养基复杂性降低而提高,降低培养温度对稳定性不利,在 100r/min 摇瓶装液比例 1:10 时,稳定性最高,pH5~8 对稳定性无影响^[11]。氨基酸补充培养总是比生长在基本培养基的稳定性低。含 pYEa4 质粒的 *Saccharomyces cerevisiae* 在非选择性条件下连续培养,在葡萄糖限制性简单培养基中丢失速率大于在葡萄糖限制性复杂培养基中的丢失速率,在葡萄糖限制性复杂培养基中随稀释速率增大,丢失速率提高,但在葡萄糖限制性简单培养基中却相反^[12]。研究 *E. coli* DH5 α (pMJR1750)发现质粒丢失的可能性随 C/N 增加而增大,这可能由于含质粒与不含质粒细胞生长对营养的竞争,C/N 增大,两者的最大比生长速率下降,而且两者的差也增大,C/N=0.07 时, $\mu_{\max}^-/\mu_{\max}^+=1.16$, C/N=10, $\mu_{\max}^-/\mu_{\max}^+=1.37$,这可能是酶活力降低导致反应速度下降,使含质粒细胞中氨基酸合成所需的前体少于不含质粒细胞;胞外多糖的产生可能是导致高 C/N 时有较高质粒丢失率的第二个原因,因为在高 C/N 时,较多葡萄糖代谢用于胞外多糖生成导致细胞生长和质粒表达的葡萄糖较少^[13]。

4.2 氧传递与搅拌对工程菌稳定性的影响 氧传递对固定化细胞或游离细胞培养影响很大,氧和营养供应受固定化胶粒屏障和胶粒表面高浓度细胞的限制,搅拌速率能影响细胞生长和产物合成,搅拌强度明显影响质粒丢失速率,游离和固定化细胞的质粒稳定性都随搅拌强度提高而下降,温和的搅拌速率适于保持质粒的稳定性。另外发现,强烈搅拌使固定化胶粒内细胞浓度明显减少,但细胞酶活力较高。在搅拌罐发酵时,质粒拷贝数通常较摇瓶培养低,原因是搅拌罐中有较好通气,生长速率较高,因此染色体复制增加。当溶解氧强度(DOT)在非选择性培养基中周期变化时,重组酵母连续培养质粒稳定性强烈依赖于培养的生长速率,在较低生长速率下完全稳定。提高氧压力或增加氧浓度能引起细胞内氧化性胁迫,而过渡或稳定阶段缺氧条件引起氨基酸生产和质粒稳定性受限制^[14]。

4.3 温度和 pH 值对工程菌稳定性的影响 温度对基因工程菌培养影响很大,对含温敏启动子的质粒,必须用合适的温度诱导才能得到产物表达,而且必须选择适当的诱导时机,因此,温度的控制更为重要。与一般微生物发酵相似,重组工程菌的生长和产物合成时的 pH 值往往不同,如重组 *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (pIL252)对生长和质粒稳定性的最适 pH 值分别为 6.39 和 6.41^[15]。

5 小结

培养条件及过程控制对基因工程菌的稳定性有很大的影响,上述影响质粒稳定性的各种因素在不同菌种中可能有不同作用,为了提高基因工程菌的稳定性,对培养过程进行条件优化是必要的。另外,还应考虑从菌种构建的角度来解决这个问题。

参 考 文 献

- [1] Kim ChH, Lee J Y, Kim M G, *et al.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, **86**(4): 391~394.
- [2] 刘 芳, 李红旗, 沈忠耀. 清华大学学报, 1997, **37**(6): 46~49.
- [3] Jeewon L, Satish J P. Chemical Engineering Science, 1996, **51**(2): 217~231.
- [4] Argyropoulos D, Lynch H C. Biotechnology Techniques, 1997, **11**(3): 187~190.
- [5] Chinyuan C, Yuliang H, Shangtian Y. Biotechnology and Bioengineering, 1997, **56**(1): 23~31.
- [6] Chung Bong H, Seo D J, Nam S W, *et al.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, **84**(5): 466~470.
- [7] Hempel C, Erb R W, Deckwer W D, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1998, **57**(1): 62~70.
- [8] Khaswar S, Paul F G, David A M. Journal of Biotechnology, 1996, **45**(3): 205~210.
- [9] Castet J C, Craynest M, Barbotin J N, *et al.* FEMS Microbiology Reviews, 1994, **14**(1): 63~68.
- [10] Zhigen Z, Jeno S, Murray M Y. Biotechnology and Bioengineering, 1997, **55**(2): 241~251.
- [11] Gupta R, Sharma P, Vyas V V. Journal of Biotechnology, 1995, **41**(1): 29~31.
- [12] O'Kennedy R, Houghton C J, Patching J W. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, **44**(1~2): 126~132.
- [13] Ching-Tsan H, Steven W P, James D B. Biotechnology and Bioengineering, 1994, **44**(3): 329~336.
- [14] Konz J O, King J, Cooney C L. Biotechnology Progress, 1998, **14**(3): 393~409.
- [15] Beal C, D'Angio C, Corrieu G. Biotechnology Letters, 1998, **20**(7): 679~682.