

表达重组别藻蓝蛋白质粒在工程菌株中的遗传稳定性研究*

葛保胜^{1,2} 任育红^{1,2} 唐志红^{1,2} 杨雨^{1,2} 秦松^{1**}(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)¹ (中国科学院研究生院 北京 100039)²

摘要: 将含有表达重组别藻蓝蛋白基因的重组质粒 pMal-2X 的工程菌株 P1 分别在含有 Amp 的 LB 固体培养基上采用划线法连续传代至 100 代, 其生长速度 (在 LB 培养基中)、菌落形态和抗生素抗性等方面与原始种子库无明显差异; 取第 10, 20, 50, 100 代提取质粒 DNA 经 *EcoRI* 限制性内切酶酶切检查, 酶切图谱没有改变。DNA 测序未见 *apc* 基因变异。原代菌株与传代第 10, 20, 50 和 100 代菌株经诱导培养, 其 rAPC 表达水平、菌体蛋白的 SDS-PAGE 图谱及重组蛋白的免疫原性均无明显差异。以上结果表明, 重组质粒 pMal-2X 在工程菌株 P1 中具有良好的遗传稳定性。

关键词: 重组别藻蓝蛋白, 遗传稳定性, 传代

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0037-05

**Study on the Heredity Stability of a Recombinant
Plasmid pMal-2X in *Escherichia coli* ***

GE Bao-Sheng^{1,2} REN Yu-Hong^{1,2} TANG Zhi-Hong^{1,2} YANG Yu^{1,2} QIN Song^{1**}(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)¹(Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)²

Abstract: The strain of TB1 from the original stock which harboring a recombinant plasmid pMal-2X including *apc* gene from cyanophyceae had been subcultured serially to 100th generation in Amp⁺ plate. The growth characteristics and the morphology of the cultures did not show differences among the generations. The chromatogram of the plasmids in different generations digested by *EcoRI* restriction enzymes were same, as well as DNA sequences showed no difference among generations. In addition to that, origin strain and 10th, 20th, 50th and 100th generation strain had a similar rAPC expression level. The immunology activity of the rAPC and SDS-PAGE of the proteins expressed in different generations were also same. From the above results, it is indicated that recombinant strain P1 has a high hereditary stability.

Key words: rAPC, Heredity stability, Generations

藻胆蛋白 (Phycobiliprotein) 是某些藻类特有的捕光色素蛋白, 主要包括藻蓝蛋白 (Phycocyanin, PC)、藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 和别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC)。国内外的研究证实: 螺旋藻中的 APC 具有抗肿瘤、提高机体免疫力等生物学功能^[1~5]。

本实验室从蓝藻中克隆了别藻蓝蛋白基因^[4], 构建了重组 APC 质粒 pMal-apc, 转化大肠杆菌 TB1 成功地构建了能高效表达重组别藻蓝蛋白 (recombinant Allophycocyanin, rAPC) 的工程菌株 P1。临床前药效学研究表明, rAPC 对小鼠的 S₁₈₀ 肉瘤和 H₂₂ 肝癌有显著的抑制作用, 并且不具有化疗药 (CY) 对白细胞和胸腺的毒副作用, 具有良好的开发前景^[6~7]。

* 国家十五“863”计划 (No. 2001AA620410)

山东省合同攻关计划资助项目

** 通讯作者 Tel: 0532-82898500, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2004-09-20, 修回日期: 2004-11-29

工程菌株的遗传稳定性和有限传代次数的确定在生产实践中至关重要,也是医药监督管理局对基因工程药物评审的一个重要内容^[8]。为了确定原始种子库和工程菌株的遗传稳定性和有限传代次数,本文通过平板划线培养的方法将此工程菌株进行传代培养,并且对不同代数的生长和形态特性、质粒的限制酶切图谱、菌株的总蛋白电泳图谱、rAPC 的表达水平等方面进行了比较分析。结果表明该重组质粒在工程菌株中具有良好的遗传稳定性。

1 材料与方法

1.1 试剂

限制性内切酶 *EcoR* I 购自 TaKaRa 公司; DNA 序列测定由上海博亚完成。

1.2 菌株与培养基^[9]

工程菌株 P1 由本实验室构建并保存。

LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 氨苄青霉素 100μg/mL, 定容至 1L, (固体培养基中加入琼脂粉 15g/100mL)。

2-YT 培养基^[10]: 葡萄糖 5g, 蛋白胨 16g, 酵母提取物 10g, NaCl 5g, MgSO₄ 5g, 定容至 1L。

1.3 菌株传代方法

在 LB-Amp⁺ 固体平板上划线接种受试菌株, 37℃ 培养 24h 后, 挑取单菌落继续划线培养, 每传 1 次记为 1 代^[11]。

同时取不含 Amp 的 LB 固体平板, 接种受试菌, 按上述方法进行传代培养, 分别挑取第 10, 20, 50, 100 代的单菌落 100 个于 LB-Amp⁺ 固体平板和 LB-Amp⁻ 固体平板上, 37℃ 培养过夜后, 记数 LB-Amp⁺ 固体平板和 LB-Amp⁻ 固体平板上的菌落数, 同时做平行对照, 计算工程菌在没有 Amp 选择压力下传代时质粒的丢失率。

$$\text{质粒稳定性} = \frac{\text{LB-Amp}^+ \text{固定平板上的菌落数}}{\text{LB-Amp}^- \text{固定平板上的菌落数}}$$

1.4 菌落形态和生长观察

用接种环挑取菌落, 涂布于 LB-Amp⁺ 固体平板培养基上, 37℃ 培养 24h, 与从原代种子接出的培养物对比, 观察菌落形态变化。

接种单菌落到 LB-Amp⁺ 液体培养基中, 37℃ 培养 12h, 用空白 LB 培养基作为对照, 测定 OD₆₀₀, 确定生长速度的变化。

1.5 质粒酶切鉴定

传代过程中, 挑取第 10, 20, 50, 100 代单菌落于 5mL LB-Amp⁺ 液体培养基中, 37℃ 培养过夜, 用碱裂解法^[10]提取质粒, 重溶于 20μL TE buffer 中, 取 4μL 用 *EcoR* I 酶切后, 用 1% 琼脂糖电泳鉴定酶切片段。

1.6 插入片段 DNA 序列测定

用 malE primer 对提取的第 100 代重组质粒进行序列鉴定^[4]。

1.7 *apc* 基因在工程菌株中的表达

分别挑取第 0, 10, 20, 50, 100 代工程菌株 P1 的单菌落到 5mL LB-Amp⁺ 液体培养基中, 37℃ 培养过夜, 接种到 100mL LB-Amp⁺ 液体培养基中, 37℃ 培养 4h 后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3mmol/L, 诱导 5h 后, 取 3mL 培养液离心收集菌体, 菌体悬浮于 1mL CB (20mmol/L Tris-HCl, 200mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH 7.4) 中, 经

超声破碎后, 10,000g 离心 10min, 取上清, 利用 SDS-PAGE 检查 rAPC 表达情况。

1.8 Western blotting 鉴定

利用天然 *apc* (本实验室自制) 免疫家兔, 提取抗血清得兔抗 APC 抗体, 以此为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔为二抗, DAB 为底物显色剂, 对上述表达产物进行免疫原性鉴定^[2]。

2 结果

2.1 菌落形态与生长

在 LB-Amp⁺ 固体平板上生长的菌落为 1mm~2mm 的圆形隆起, 外表湿润光滑, 白色, 为典型的大肠杆菌菌落, 无杂菌生长。原代和第 10, 20, 50, 100 代菌株在 5mL LB-Amp⁺ 液体培养基中培养 12h 时的生长情况见表 1。由表 1 可见, 工程菌 P1 在 5mL LB-Amp⁺ 液体培养基中培养 12h 的生长情况没有显著差别。

2.2 质粒稳定性检查

工程菌株 P1 在没有氨苄青霉素选择压力情况下, 在 LB 固体平板上传代时, 质粒在工程菌株中较为稳定 (如表 2)。

表 1 工程菌株 P1 在不同传代代次时的生长情况

菌株	代数				
	原代	10	20	50	100
<i>OD</i> ₆₀₀ *	2.37	2.38	2.20	2.49	2.35

* 培养 12h 后的 *OD* 值

表 2 工程菌株 P1 在 Amp⁺ LB 平板上传代时的质粒丢失情况

	代数				
	原代	10	20	50	100
质粒稳定性 (%)	100	100	98	98	98

2.3 质粒酶切鉴定

重组质粒用 *EcoR* I 可以切出大小为 1kb 的插入片段, 从图 1 的 *EcoR* I 酶切电泳图谱可以看出, 经传代 100 代后, 重组质粒的酶切图谱与原代没有差异。

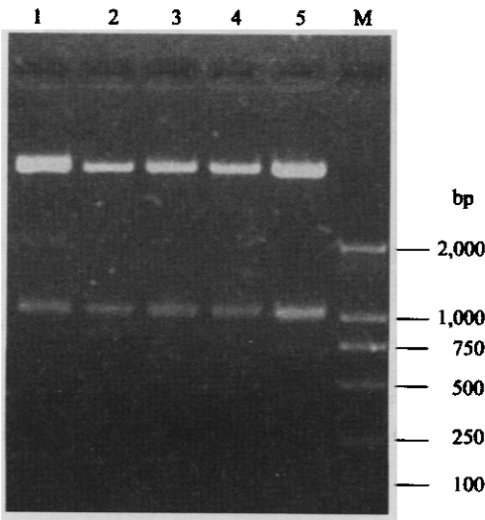


图 1 原代及第 10, 20, 50 和 100 代质粒的酶切图谱

注: 1、2、3、4、5 分别为原代, 第 10, 20, 50 和 100 代的 *EcoR* I 酶切图谱, M DNA Marker 为 DL2000

经 DNA 序列测定, 插入的 DNA 序列与原始序列一致, 没有发生突变。

2.4 SDS-PAGE 鉴定

在工程菌株 P1 中表达的 rAPC 理论分子量为 60kD。经 SDS-PAGE 分离后 (如图 2), 原代菌种和传代 10, 20, 50 和 100 代后的菌种在总蛋白电泳模式中所有蛋白条带位置和表达水平无明显差别, 传代后的菌种依然保持较高的 rAPC 表达活性。

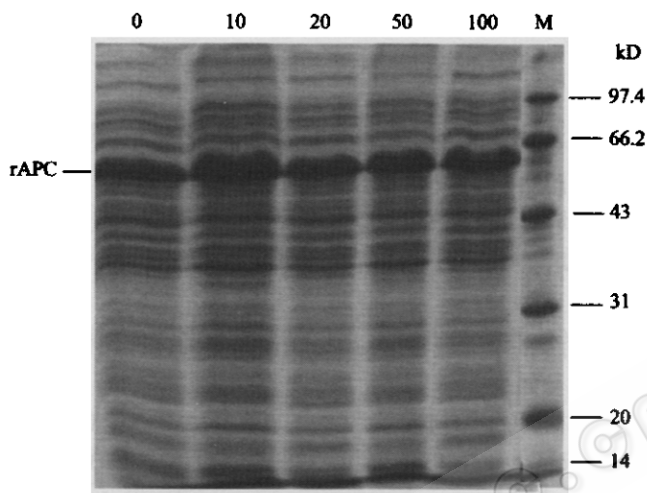


图 2 原代和第 10, 20, 50 和 100 代菌体表达蛋白的 SDS-PAGE

2.5 rAPC 的 western blotting 鉴定

由于大肠杆菌中表达的重组别藻蓝蛋白的为融合蛋白。其一级结构与天然别藻蓝蛋白不完全相同, 分子量等性质也不完全一致, 所以没有天然的对照品, 但是它与天然别藻蓝蛋白有着相同的免疫原性。因此可以利用天然的别藻蓝蛋白免疫家兔, 得到兔抗 APC 抗体, 利用 western blotting 对重组的别藻蓝蛋白进行特异性鉴定 (图 3)。

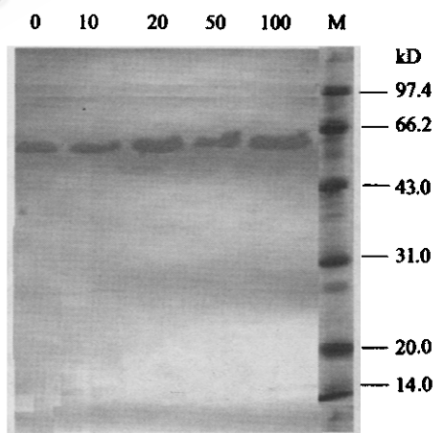


图 3 原代和第 10, 20, 50 和 100 代菌体表达产物的 Western blotting 鉴定

3 讨论

基因工程菌株的遗传稳定性是确定工业化生产中种子库建立规模的重要参数。工程菌株中质粒的稳定性也是基因工程药物进行放大生产的主要限制性因素。质粒不稳

定主要表现为两种:首先是分裂延迟,表现为细胞快速分裂时质粒 DNA 不能平均分配到两个子细胞中;其次是质粒结构不稳定,表现为质粒 DNA 的缺失、插入以及基因重排等。在大肠杆菌的高密度培养中,由于菌体的快速生长,容易产生质粒的分裂延迟现象,菌体丢失质粒。在平板传代试验中,由于传代速度比较温和,所以质粒稳定性较好,即使在没有氨苄青霉素作为选择压力的情况下,质粒的稳定性也接近 100%。然而赵方庆^[6]等人的研究表明,工程菌株 P1 在 5L 发酵罐的高密度发酵中,在 IPTG 诱导培养的条件下,当 OD₆₀₀ 达到 106 时,质粒的稳定性为 87%。因此,如何提高质粒在基因工程菌大规模培养中的稳定性也是工程菌株高密度发酵成功与否的关键。目前,提高质粒稳定性的方法主要有:施加选择压力,对质粒进行分子改造和优化发酵培养条件等^[12-15]。通过添加抗生素保持质粒的稳定性,但从工业化大规模培养中,从成本核算和污染物处理两个方面考虑,显然不是一种理想的办法。提高质粒的稳定性还要从对质粒进行分子改造和优化发酵培养条件入手。

本实验室构建的工程菌株 P1 经固体平板连续划线传代 100 次以后,仍然保持与原代菌株具有相同的菌落大小和形态,在 LB-Amp⁺ 液体培养基中的生长情况基本一致。*EcoR* I 酶切结果显示工程菌株 P1 携带的重组质粒在传代前后的限制性内切酶图谱没有发生变化。进一步的 DNA 序列测定表明,插入的 *apc* 基因没有发生突变。经诱导培养后, rAPC 在原代和第 10、20、50 和 100 代中都可以表达,表达量没有明显差别。它们在 SDS-PAGE 中的带型基本一致,并且蛋白免疫印记显示它们具有相同的免疫原性。这都说明该重组质粒在工程菌株 P1 中具有良好的遗传稳定性。

参考文献

- [1] 李 敏,黄惟立,叶 颖,等. 中国海洋药物, 2001, 20 (3): 36 ~ 39.
- [2] 曾繁杰,林启山,蒋丽金,等. 生物化学和生物物理学报, 2002, 24 (6): 545 ~ 552.
- [3] Zarile A L. *Algae and Human Affairs*. Cambuiede Uni Press, 1989. 149 ~ 202.
- [4] Qin S, Hiroyuki K, Yoshikazu S Y, *et al.* Chin J Oceanol Limnol, 1998, 16 (Suppl.): 6 ~ 11.
- [5] 赵方庆,唐志红,林 凡,等. 高技术通讯, 2003, 2: 29 ~ 32.
- [6] 唐志红,赵方庆,秦 松,等. 高技术通讯, 2004, 3: 83 ~ 86.
- [7] 贺石汉,李宝宗,邵金荣,等. 武汉大学学报(理学版), 2003, 49: 497 ~ 500.
- [8] 李 颂,徐维明,杨 喆,等. 云南大学学报, 2003, 25 (4): 364 ~ 367.
- [9] 刘丽丽,杨文博,刘 忠. 微生物学通报, 2004, 31 (4): 57 ~ 60.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Li-feng X. *Progress in Microbiology and Immunology*, 1997, 25 (3): 9 ~ 11 (CH).
- [12] Kumar P K R, Haschke H E, Friehs K, *et al.* *Trends in biotechnology*, 1991, 9 (1): 279 ~ 284.
- [13] Peter H, Johanna W P, Farhad A. *Journal of Biotechnology*, 2004, 50: 1 ~ 14.
- [14] Gupta R, Sharma P, Vyas V V. *Journal of Biotechnology*, 1995, 41: 29 ~ 37.
- [15] Chul H K, Jang Y L, Min G K, *et al.* *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86 (4): 391 ~ 394.