

重组人硫氧还蛋白工程菌生物学特性 稳定性的检测

郭云萍^{1*} 陶凌² 李刚¹ 任阳¹ 王慧峰¹

(1. 太钢总医院 山西 太原 030003)

(2. 第四军医大学 西京医院 心内科 陕西 西安 710032)

摘要: 【目的】观察和检测重组人硫氧还蛋白工程菌 BL21/pET-22b(+)-rhTrx 生物学特性的稳定性。【方法】工程菌连续传代 50 代, 通过对每 10 代进行质粒性状、蛋白表达水平、透射电镜观察、革兰氏染色及各项生化检查, 全面检测工程菌可能影响生产性能的生物学特性稳定性。【结果】各代工程菌提取的质粒经双酶切后均可见 315 bp 的目的基因片段; 各代工程菌中 Trx 蛋白的表达量均为菌体总蛋白的 20% 左右; 透射电镜观察呈现典型的大肠杆菌特性; 革兰染色显示为阴性杆菌; 各项生化检测结果与原始菌种无显著差异。【结论】该菌种生物学特性稳定, 可作为生产用菌种。

关键词: 人硫氧还蛋白, 重组工程菌, 生物学特性, 稳定性

基金项目: 国家科技重大专项项目(No. 2009ZXJ09004-088); 国家自然科学基金项目(No. 81070676); 国家重大新药创制计划项目(No. 2012ZX09J12108-06B)

*通讯作者: ✉: guoyunping2010@163.com

收稿日期: 2012-10-15; 接受日期: 2013-01-04

Stability of biological characteristics of recombinant *Escherichia coli* expressing human thioredoxin

GUO Yun-Ping^{1*} TAO Ling² LI Gang¹ REN Yang¹ WANG Hui-Feng¹

(1. General Hospital of TICS0, Taiyuan, Shanxi 030003, China)

(2. Department of Cardiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: [Objective] This study was to detect the stability of biological characteristics of recombinant *E. coli* BL21/pET-22b(+)-rhTrx expressing human thioredoxin. **[Methods]** Recombinant *E. coli* BL21/pET-22b(+)-rhTrx was subcultured for 50 passages, and subjected to transmission electron microscopy, Gram staining and biochemical examination as well as test for expression level of target protein and property of plasmid every 10 passages. **[Results]** The results of restriction analysis and sequencing of various passages were in agreement. All the expression levels of target protein in recombinant *E. coli* BL21/pET-22b(+)-rhTrx of passages 0, 10, 20, 30, 40 and 50 passages were about 20%, which showed no significant difference. All the passages were negative in Gram staining and showed typical characteristics of *E. coli* under transmission electron microscope and in biochemical examination. **[Conclusion]** The recombinant *E. coli* BL21/pET-22b(+)-rhTrx showed stable biological characteristics and might be used as a bacterial seed for production.

Keywords: Human thioredoxin, Recombinant *E. coli*, Biological characteristics, Stability

硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx) 是一种由 105 个氨基酸组成的含有二硫键的小分子蛋白, 具有多种生物学功能^[1-3]。研究发现 Trx 的表达水平和活性与人类疾病特别是心血管疾病关系密切^[4-5], 有良好的药物应用前景。目前, 外源性给予 Trx 进行疾病治疗的方法日益受到人们的关注^[4]。本室研制和开发了一种重组人硫氧还蛋白(rhTrx)的工程菌表达生产方式(专利申请号: 201210014016.9), 用于心肌缺血再灌注损伤等疾病的治疗, 目前该研究已进入中试生产阶段。

工程菌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。为了确定原始种子库和传代工程菌株的遗传稳定性, 本文对

工程菌 BL21/pET-22b(+)-rhTrx 进行了传代培养, 并对不同代次菌株生物学特性的稳定性进行了全面检测, 保证进一步的大规模生产应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 重组质粒 pET-22b(+)-rhTrx 由本室构建; 宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)由第四军医大学生物技术中心馈赠。

1.1.2 主要试剂: 快速小量质粒提取试剂盒, 购自 Omega 公司; 限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I, 购自 TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 工程菌传代: 将重组质粒 pET-22b(+)-rhTrx

转化 *E. coli* BL21(DE3), 在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基平板上划线传代, 37 °C 培养 8–12 h, 挑取单克隆菌落, 继续划线传代, 共传 50 代。

1.2.2 重组质粒稳定性检测: 工程菌每传 10 代, 挑取单克隆菌落接种于 LB (Amp^+) 培养基中, 37 °C 培养过夜, 提取质粒, 用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。将经酶切鉴定与预期片段长度相符的第 50 代质粒, 送交北京华大基因进行目的基因测序。

1.2.3 工程菌表达产物稳定性检测: 工程菌每传 10 代, 挑取单克隆菌落, 接种于 10 mL 液体 LB (Amp^+) 培养基中, 37 °C 活化振荡培养过夜。次日, 按 1:100 的比例转接于 100 mL 液体 LB (Amp^+) 培养基后, 继续培养至对数生长中期 ($OD_{600} \approx 0.4-0.6$) 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h, 离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 检测目的蛋白的表达水平。

1.2.4 透射电镜观察: 按照常规方法制备工程菌的透射电镜样品, 电子显微镜下观察。

1.2.5 革兰氏染色及生化反应: 按照常规方法进行革兰氏染色, 光学显微镜下观察。各项生化检查参照文献[6–7]方法进行。

2 结果与分析

2.1 菌落形态与生长

如图 1 所示, 在含氨苄青霉素平板上生长的菌落平均直径为 1.5 mm, 白色、圆形、隆起、光滑, 为典型的大肠杆菌菌落, 无杂菌生长, 各代次间无明显区别。

2.2 重组质粒结构稳定性

提取第 0、10、20、30、40 和 50 代工程菌质粒, 经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 均可见一条明显的约 315 bp 大小的片

段, 与原代质粒相符(图 2); 目的基因测序结果与原代质粒一致, 表明质粒的稳定性良好。

2.3 工程菌表达量的稳定性

工程菌连续传代培养后, 用细菌全蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测, 发现原代与各代次的工程菌均表达相对分子质量为 12 kD 的目标蛋白, 表达产物的水平也无明显差别(图 3)。

2.4 透射电镜观察

对各代次工程菌进行透射电镜观察, 发现细菌外观呈短棒状, 大小形态一致, 无芽胞, 不形成荚膜, 无支原体、衣原体、噬菌体、病毒样颗粒和其他微生物污染(图 4)。

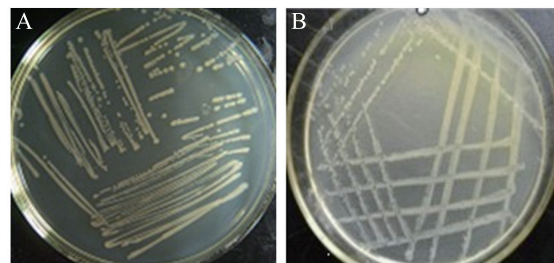


图 1 原代(A)和第 50 代(B)工程菌菌落形态
Fig. 1 Colonial morphology of recombinant *E. coli* of passage 0 (A) and 50 (B)

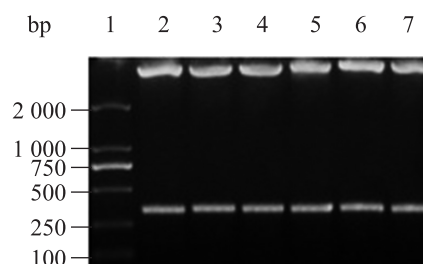


图 2 各代次质粒的双酶切图谱
Fig. 2 Restriction map of BL21/ pET-22b(+)-rhTrx of various passages

注: 1: DNA marker DL2000; 2–7: 第 0、10、20、30、40 和 50 代工程菌质粒, 经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后各自的琼脂糖凝胶电泳分析条带。

Note: 1: DNA marker DL2000; 2–7: Recombinant *E. coli* strain of passage 0, 10, 20, 30, 40 and 50 double digested with *Nde* I+BamH I, respectively.

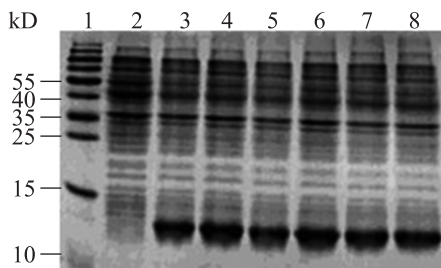


图3 各代次工程菌目的蛋白的表达水平

Fig. 3 SDS-PAGE profile of protein expressed in recombinant *E. coli* of various passages

注: 1: 蛋白 Marker; 2: 诱导前工程菌目的蛋白的表达水平; 3: IPTG 诱导后 0 代工程菌目的蛋白的表达水平; 4-8: IPTG 诱导后 10、20、30、40 和 50 代工程菌各自目的蛋白的表达水平。

Note: 1: Protein marker; 2: Primary strain before induction; 3: Primary strain induced by IPTG; 4-8: Strains of passages 10, 20, 30, 40 and 50 induced by IPTG; respectively.

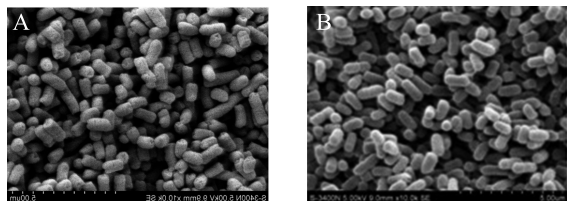


图4 原代(A)和第50代(B)工程菌透射电镜观察

Fig. 4 Transmission electron microscopy of recombinant *E. coli* of passage 0 (A, 10 000 \times) and 50 (B, 10 000 \times)

2.5 革兰氏染色及生化反应

各代次工程菌的革兰氏染色均为阴性杆菌(图5), 各代次工程菌菌株生化反应结果一致, 均与大肠杆菌生化反应相符(表1)。

3 讨论

大肠杆菌遗传背景清楚, 载体受体系统完备, 生长迅速, 培养简单, 是基因工程的主要受体菌之一。然而, 携带外源基因的质粒转化到大肠杆菌受体细胞之后, 会产生一系列的生理效应, 影响到大肠杆菌自身的稳定性。当利用质粒在大肠杆菌中表达重组蛋白时, 质粒的丢失会给生产带来严重的损失。因此, 表达质粒的不稳定性一直是一个亟待解决的重要问题^[7]。

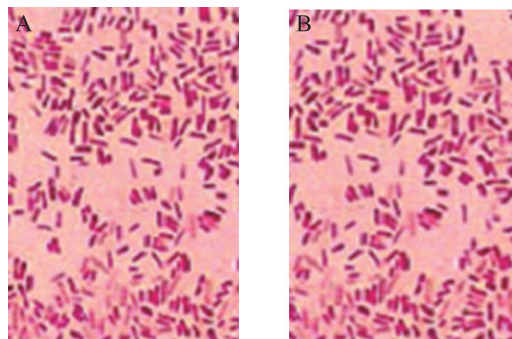


图5 原代(A)和第50代(B)工程菌革兰氏染色

Fig. 5 Gram staining of recombinant *E. coli* of passage 0 (A, 400 \times) and 50 (B, 400 \times)

表1 各代次工程菌菌株生化反应结果
Table 1 Biochemical reactions of recombinant *E. coli* of passages 0, 10, 20, 30, 40 and 50

Items	Results	Items	Results
LIP	-	ODC	-
β NAG	-	IND	+
MAL	+	MAN	+
GLU	+	RP	+
SAC	-	5KG	+
GAT	+	LARL	-
URE	-	LDC	+
ADH	-	β GLU	-
INO	-	MNT	-
α MAL	-	SOR	+
CEL	-	β GUR	+
B-GAL	+	ADO	-
AspA	-	RHA	+
TRE	+	α GAL	+
α GLU	-	DARL	-
LARA	+	PLE	-

近年来, 许多学者对大肠杆菌工程菌的稳定性从不同的角度进行了研究。在大肠杆菌表达外源基因时, 常出现重组质粒的不稳定性, 主要包括分配不稳定性和结构不稳定性。分配不稳定性指工程菌分裂时出现一定比例不含质粒的子代菌的现象, 结构不稳定性指外源基因从质粒上丢失或碱基重排、缺失所致工程菌性能的改变^[8]。

尽管在细胞分裂过程中, 随机产生携带这些突变体的细胞几率相当低, 但是由于这些细胞生长速度快, 在经过持续的增殖之后, 最终便会取代正常宿主细胞, 成为培养物中的优势群体, 导致目的蛋白的表达量受到严重影响^[9]。

因此, 在微生物应用和研究方面, 重组工程菌中质粒的稳定性对于有效发挥工程菌的作用及大规模发酵和产物制备至关重要。本文对构建的大肠杆菌工程菌 BL21/pET-22b(+)-rhTrx 的稳定性进行了综合研究。结果表明, 传代至 50 代, 工程菌的质粒酶切图谱、外源蛋白表达水平、透射电镜、革兰氏染色及生化反应均与原始菌株一致。结果证明重组工程菌株 BL21/pET-22b(+)-rhTrx 具有良好的遗传稳定性, 能够确保外源基因在宿主细胞内持续稳定地表达, 并在各批次间保持产量、活性等一致, 为大规模生产奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels[J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2005, 14(2): 149–153.
- [2] Bai J, Nakamura H, Kwon YW, et al. Does thioredoxin-1 prevent mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine?[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(5): 603–608.
- [3] Malik G, Gorbounov N, Das S, et al. Ischemic preconditioning triggers nuclear translocation of thioredoxin and its interaction with Ref-1 potentiating a survival signal through the PI-3-kinase-Akt pathway[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, 8(11/12): 2101–2109.
- [4] Nakamura H. Thioredoxin and its related molecules: update 2005[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7(5/6): 823–828.
- [5] Burke-Gaffney A, Callister MJ, Nakamura H. Thioredoxin: friend or foe in human disease?[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, 26(8): 398–404.
- [6] 孟洁如, 颜真, 赵宁, 等. 导向性人干扰素 $\alpha 2a$ 工程菌生物学特性的稳定性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2003, 16(4): 222–224.
- [7] 薛晓畅, 李萌, 秦鑫, 等. 重组人 B 淋巴细胞刺激因子工程菌生物学特性的稳定性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(9): 777–779.
- [8] Imanaka T, Tsunekawa H, Aiba S. Phenotypic stability of trp operon recombinant plasmids in *Escherichia coli*[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1980, 118(1): 253–261.
- [9] 吴乃虎. 基因工程原理(上册)[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998, 229–239.