

营养条件对 pcDNA3-HBS 质粒 DNA 生产的影响

王志军¹ 乐国伟^{1*} 施用晖¹ 汪 垣²

¹(无锡轻工大学动物科学研究所 无锡 214036)

²(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 为了考查营养条件对质粒 DNA 的生产影响,采用不同的培养基培养含 pcDNA33-HBS 质粒的大肠杆菌 JM109。实验结果表明 碳源、氮源对质粒 DNA 产量有明显的影响。葡萄糖是质粒合成过程中较佳的碳源,蛋白胨是较佳的氮源。在 M9P 培养基中 选择合适的硫酸铵浓度对质粒 DNA 的生产有一定的作用。由于 Gly, Asp, Glu 能提供合成核苷酸的氮源,在 M9G 培养基中添加 1.2g/L 的 Asp, 1.0g/L 的 Glu 和 0.4g/L 的 Gly 后,经 20h 培养,质粒产量可达 25mg/L。外源核苷也影响质粒 DNA 的产量,通过添加 0.4g/L 胞苷与胸苷的混合物(摩尔比为 1:1)到 M9P 培养基中,质粒 DNA 的产量可达 35mg/L。

关键词 质粒 DNA, DNA 疫苗, 营养, 氨基酸, 核苷, 培养基

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0310-04

用质粒 DNA 来免疫动物是 90 年代才发展起来的一种新技术,它比用传统的蛋白免疫有更多的优势,如能激发 T 细胞免疫。这种技术通过将抗原基因片段重组于强启动子(如巨噬细胞病毒 CMV)下构建而成,在大肠杆菌中扩增后提取,然后直接免疫动物。尽管经过多年科学家的努力,目前市场上仍然没有免疫用质粒 DNA 出售,主要问题存在于下游加工过程中^[1-3]。

与蛋白相比,含有人类或非人类基因的质粒 DNA 有很大的分子量(有一些学者认为是纳米微粒),质粒经常含有 5000~20000 个碱基对,分子量约为 $3.3 \times 10^6 \sim 13.2 \times 10^6$ D。目前有较多重组蛋白发酵条件优化的报道,然而对于质粒 DNA 的发酵条件研究报道较少,质粒 DNA 发酵条件与重组蛋白发酵条件不一样。为了选择性地增加质粒 DNA 的产量,充分的能量来源,丰富的核苷酸池较为有利,而其他细胞活性成分应当保持最低,如 RNA 的转录与蛋白质的翻译通常要保持最低。

质粒 DNA 的发酵条件研究是下游加工工艺的一个中心环节,O'Kennedy 首次研究了培养基对质粒 DNA 产量的影响,然而只是对比了 3 种培养基(LB,SDSOY,SDCAS)^[4],目前仍然没有有关营养条

件对质粒 DNA 生产的较详细报道。本文选用乙肝 DNA 疫苗 pcDNA3S-HBS 作为质粒 DNA 发酵条件研究对象,考察了培养基中的不同营养组分对 pcDNA3S-HBS 质粒 DNA 的产量影响,重点研究了无机盐 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 种氨基酸(Gly, Gln, Asp)与核苷(胞苷,胸苷)对 pcDNA3S-HBS 质粒 DNA 的产量影响。质粒 DNA 高产量生产对于质粒纯化过程有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种与质粒

Escherichia coli JM109,含有 pcDNA3S 质粒(由中国科学院上海生物化学研究所汪垣研究员提供),pcDNA3S-HBS 是在 pcDNA3 的 *EcoR* I 与 *Bam*H I 克隆点之间重组有 HBsAg 基因而构建而成。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,NaCl 10,酵母抽提物 5。M9G 矿物盐培养基(g/L):D-葡萄糖 25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.0, KH_2PO_4 13.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2,柠檬酸 1.7, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0084, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0025, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.015, $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015, H_3BO_3 0.003, $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0025,

ZnCl₂ 0.013 , FeCl₃ 0.1 组成。M9P 的组成为在 M9C 培养基的基础上加蛋白胨 10g 而组成 , 高压灭菌后 , 加盐酸硫酸素至 4.5mg·L⁻¹ , 最后加入氨苄青霉素至 100mg·L⁻¹ (pH 值 6.5)。

1.3 培养方法

从 LB 固体培养基中挑取单菌落 , 接种于盛有 25mL 液体培养基 (含 5mL LB) 的试管中 , 37℃ 震荡培养 24h。在 250mL 的三角瓶中加入 50mL 的发酵培养基 , 接入 500μL 的菌种 , 37℃ 200r/min 培养 24h。

1.4 分析方法

1.4.1 菌量的测定 菌量通过测量菌液在 550nm 下的吸光度来确定。

1.4.2 质粒制备与纯化 质粒制备与纯化参照文献 [5] 采用碱溶与玻璃珠结合法。玻璃珠的制备参照文献 [6]。

1.4.3 质粒的浓度分析 选用 Noites 报道的荧光光度法测量^[7]。以不同浓度的 λDNA 溶液作标准 , 用 0.5μg/mL 的溴乙锭为荧光染料 , 在激发波长与发射波长分别为 520nm , 601nm 下测定荧光吸收强度 , 绘制标准曲线 , 所得标准曲线方程为 $Y = 5.837 + 62.75X$, $R = 0.997$ 。取经适当稀释后的质粒待测溶液 0.5mL 与 0.5mL 溴乙锭溶液混匀后 , 在室温下放置 5min , 测定荧光强度 , 质粒浓度可从标准曲线中得出。

1.4.4 氨基酸分析 氨基酸的浓度通过氨基酸全自动分析仪 (Agilent Co. Type 1100) 测定 , 样品先经过 12000 × g 离心 5min 后 , 将上清液经 0.22μm 硝酸纤维素滤膜过滤后用于分析。

2 结果与讨论

2.1 碳源对质粒 DNA 的影响

在 M9P 培养基中用不同种类的碳源作对比实验 , 添加量为 25g/L , 结果如表 1 所示。实验表明 D-葡萄糖对质粒 DNA 的生产是一种较佳的碳源 , 当用乳糖及甘露糖为碳源时效果最差 , 而用甘油为碳源时 , 发现虽然菌量与质粒浓度不如葡萄糖 , 但质粒浓度与菌量之比是所有碳源中最高的 , 这表明甘油对于增加质粒 DNA 的浓度有一定的作用。

2.2 氮源对质粒 DNA 浓度与菌体浓度的影响

在 M9C 矿物盐培养基中用不同的氮源作对比实验 , 氮源添加量为 10g/L。结果如表 2 所示 , 选用蛋白胨做氮源能得到最大质粒 DNA 产量 , 而用胰蛋白胨作为氮源时 , 质粒 DNA 浓度与菌体浓度比是所有氮源中最高的 , 这表明胰蛋白胨能增加菌体内质

粒 DNA 的含量。当用酵母膏为氮源时发现菌量比蛋白胨为氮源时增加了近 2 倍 , 而质粒的含量却增加不多 , 主要原因是菌体生长率增加后而导致质粒的拷贝数下降。

表 1 碳源对质粒 DNA 浓度 (相对误差 ± 5%) 与菌量的影响

Table 1 Effects of various carbon sources on plasmid DNA concentration (relative error ± 5%) and biomass

Carbon Sources	Plasmid concentration (mg/L)	Biomass (g/L)	Ratio of plasmid concentration to biomass
D-glucose	6.5	2.0	3.25
D-lactose	1.5	0.4	3.75
D-fructose	5.0	2.4	2.08
Sucrose	5.4	2.3	2.35
Glycerol	3.7	0.5	7.40
D-mannitol	1.6	0.6	2.67

表 2 氮源对质粒 DNA 浓度 (相对误差 ± 5%) 与菌量的影响

Table 2 Effects of various nitrogen sources on plasmid concentration (relative error ± 5%) and biomass

Nitrogen Sources	Plasmid concentration (mg/L)	Biomass (g/L)	Ratio of plasmid concentration to biomass
Peptone	6.5	2.0	3.25
Tryptone	4.1	1.1	3.73
Yeast extract	6.4	4.0	1.60
Meat extract	5.2	2.2	2.36
Casein enzymatic hydrolysate	5.9	1.7	3.47

2.3 碳氮比对质粒 DNA 产量的影响

在 M9P 培养基中 , 通过改变 (NH₄)₂SO₄ 浓度 , 使碳氮比在一定范围内变化 , 本文中碳氮比 (C:N) 指的是葡萄糖与硫酸铵的摩尔比 , 结果发现最终菌量以及生长速率都不受 C:N 比影响 , 然而质粒的产量受培养基 C:N 比影响较大 (如图 1) , 质粒 DNA 产量在 C:N 比为 2.7:1 时可达 10mg/L。C:N 比对质粒 DNA 的影响较大的原因仍不是十分清楚 , Briers^[8]认为大肠杆菌中的质粒 DNA 丢失率与 C:N 比有很大的关系 , 当大肠杆菌在较高的 C:N 比中生长时 , 葡萄糖大部分被代谢为乙酸及其它一些次生代谢产物 , 而减少了葡萄糖的利用率 , 这就有可能使细胞中

质粒的拷贝数受到了影响,而使质粒的产量减少,相似的结果也被 O'Kennedy 发现^[4]。

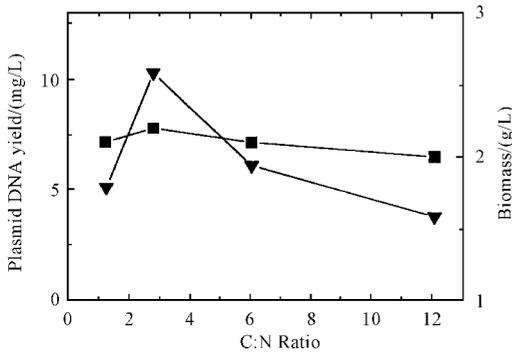
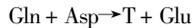
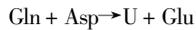
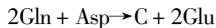
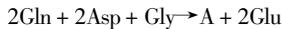


图1 C:N 比对质粒 DNA 的产量(▼)相对误差 $\pm 5\%$ 及生物量(■)的影响

Fig.1 Effects of C:N ratio on plasmid DNA yield (▼) (relative error $\pm 5\%$) and biomass (■)

2.4 氨基酸对质粒 DNA 产量的影响

在 M9G 培养基中添加 3 种氨基酸后研究 3 种氨基酸对质粒 DNA 产量的影响。从代谢过程分析发现 3 种氨基酸:谷氨酰胺,天冬酰胺,以及甘氨酸参与合成 5 种碱基^[9,10]。



以上方程是根据氮平衡得到的。为了增加质粒 DNA 的产量,有必要考虑外源加入 3 种氨基酸以提高质粒 DNA 的拷贝数。在 M9G 培养基中分别添加 3 种氨基酸,经 24h 培养后质粒 DNA 产量的实验结果表明,添加 3 种氨基酸后质粒 DNA 的产量分别有所增加,当 Gly 的添加量为 0.4g/L, Gln 的添加量为 1.0g/L, Asp 的添加量为 1.2g/L 时,质粒 DNA 产量可分别达 5.8g/L, 9.5g/L, 8.0g/L 的较大值。这表明质粒 DNA 因为氨基酸限制作用已经有所放大。

进一步,在 M9G 培养基中每升添加 1.2g Asp, 1.0g Gln, 0.4g Gly 3 种氨基酸的实验如图 2 所示,在培养 24h 后, Gln 与 Gly 已基本消耗完,而 Asp 仍有过量,说明菌体利用 Gln 与 Gly 较快,添加 3 种氨基酸后质粒 DNA 的产量最高可达 25mg/L。这表明添加纯的 3 种氨基酸比添加 10g 蛋白胨能获得更高的质粒 DNA 产量。主要是因为菌体在纯氨基酸中生长的生长率比在蛋白胨中要低,这就为质粒的复制提供了时间,有利于质粒的复制,提高质粒的拷贝数与产量。因此在质粒 DNA 生产中用矿物盐培养基值得考虑,这也与在氨基酸不充足的情况下质粒

DNA 有效放大理论一致^[10]。

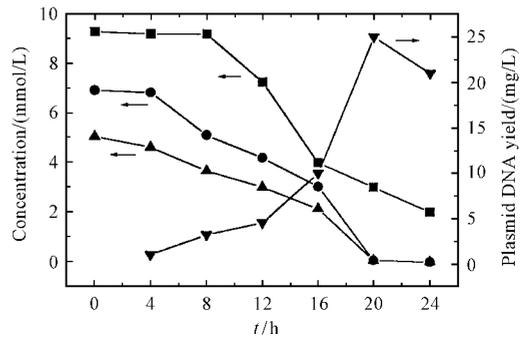


图2 添加 Asp(■),Gln(●),Gly(▲) 3 种氨基酸到 M9G 中后对质粒 DNA 产量(▼)相对误差 $\pm 5\%$ 的影响

Fig.2 Effects of addition Asp(■),Gln(●),Gly(▲) into M9G medium on plasmid DNA yield (▼) (relative error $\pm 5\%$)

2.5 核苷对质粒 DNA 产量的影响

脱氧核糖核酸是染色体 DNA 与质粒 DNA 的组成单元,脱氧核糖核酸 dATP, dGTP, dCTP 是由相应的 AMP, GMP, CMP 通过了取代 2'-OH 基上的氢而形成的, dTTP 是由甲基化 dUTP 形成的,然后 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 直接用于 DNA 与质粒 DNA 的合成。为增加质粒 DNA 的产量,丰富的核苷池通常是有利的。

核苷作为 DNA 合成的底物有重要的作用,为了更高效地增加质粒 DNA 的产量有必要考虑添加 DNA 合成的底物核苷。添加高浓度的胸苷会在细胞内形成巨大的 dTTP 池^[11],同时大大增加 dGTP 和 dATP 池,且减少了 dCTP 池,而供给胞苷后,则会增加 dCTP 池,使质粒 DNA 的产量再次扩增。因此在 M9P 培养基中加入摩尔比为 1:1 的胞苷与胸苷进行实验,实验结果如图 3 所示。

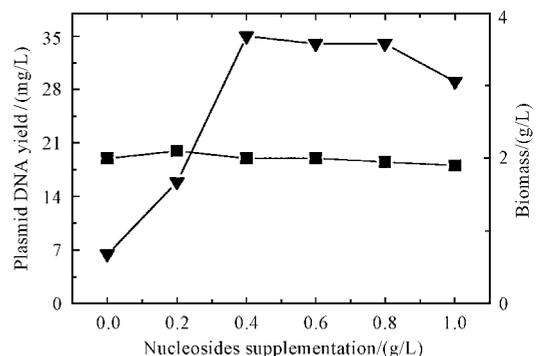


图3 添加核苷后对质粒 DNA 的产量(▼) (相对误差 $\pm 5\%$)及生物量(■)的影响

Fig.3 Effects of supplementation nucleosides on plasmid DNA yield (▼) (relative error $\pm 5\%$) and biomass (■)

当核苷的添加量为 0.4g/L 时质粒 DNA 的产量

可达 35mg/L,而菌体干重无明显增加。过多的添加核苷酸作用不明显。

3 结 论

质粒 DNA 的生产近年来受到重视,研究培养基的组成对质粒 DNA 的产量影响有一定的意义。微生物的生长与代谢是一个十分复杂的过程,如果考虑大肠杆菌详细代谢过程将变得非常复杂,由于未知量过多,以及在不同的生长条件下,动力学参数不同会导致分析失败。本文从营养物质代谢途径分析生产质粒 DNA 的需求,重点对氨基酸与核苷酸进行了研究,发现在 M9G 培养基中添加 3 种氨基酸 Gly、Asp、Gln 能使质粒 DNA 产量达到 25mg/L,而在 M9P 介质中,添加核苷酸后质粒 DNA 的产量可达 35mg/L。

致谢 本文得到波兰 Gdańsk 大学分子生物学系 Grzegorz Węgrzyn 教授的指导,在此表示衷心的感谢!

REFERENCES (参考文献)

[1] Prazeres D M F, Ferreira G N M, Monteiro G A *et al.* Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends Biotech*, 1999, **17**: 169 ~ 174

[2] Levy M S, O'Kennedy R D, Ayazi-Shamlou P *et al.* Biochemical en-

gineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol*, 2000, **18**: 296 ~ 305

- [3] Ferreira G N M, Monteiro G A, Prazeres D M F *et al.* Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol*, 2000, **18**: 380 ~ 388.
- [4] O'Kennedy R D, Baldwin C, Keshavarz-Moore E. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J Biotechnol*, 2000, **76**: 175 ~ 183
- [5] Lakshmi R, Baskar V, Ranga U. Extraction of superior quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. *Anal Biochem*, 1999, **271**: 109 ~ 112
- [6] Woodard B L, Raleigh N C, Walters A H *et al.* Purification of DNA on hydroxylated silicas. US Patent, 1997, 5693785.
- [7] Noites I S, O'Kennedy R D, Levy M S *et al.* Rapid quantitation and monitoring of plasmid DNA using an ultrasensitive DNA-Binding dye. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **66**: 196 ~ 201
- [8] Bryers J D, Huang C T. Recombinant plasmid retention and expression in bacterial biofilm cultures. *Water Sci, Technol*, 1995, **31**: 105 ~ 115
- [9] Xie L Z and Wang D T C. Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**: 1164 ~ 1174
- [10] Węgrzyn G. Replication of plasmid during bacterial response to amino acid starvation. *Plasmid*, 1999, **41**: 1 ~ 16
- [11] Adams R L P, Berryman S, Thomson A. Deoxyribonucleoside triphosphate pools in synchronized and drug-inhibited L929 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **240**: 455 ~ 462

Effects of Nutrition Condition on pcDNA3-HBS Plasmid DNA Production

WANG Zhi-Jun¹ LE Guo-Wei^{1*} SHI Yong-Hui¹ WANG Yuan²

¹(Animal Science Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

²(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract To investigate the effects of nutrition condition on plasmid DNA production, *Escherichia coli* JM109 containing plasmid pcDNA3S-HBA was grown in different culture media. Results show that carbon source, nitrogen source affected plasmid DNA yield significantly. Glucose and peptone was selected, since they were preferable to other investigated carbon source and nitrogen source. In M9P medium, the appropriate concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was important for plasmid DNA production. Gly, Asp, Gln were formulated into the M9G medium because they served as the nitrogen donors for nucleotides synthesis. With addition of 1.2g/L Asp, 1.0g/L Gln and 0.4g/L Gly into M9G medium, plasmid DNA yield was 25mg/L after 20h culture. Foreign nucleotides distinctively affected plasmid DNA production. With addition of 0.4g/L nucleosides mixture of thymidine and cytidine (mole fraction of thymidine:cytidine = 1:1) into M9P medium, plasmid DNA yield was 35mg/L.

Key words plasmid DNA, DNA vaccine, nutrition, amino acids, nucleosides, culture media

Received: November 15, 2000

This work was supported by National University Key Teacher Foundation.

* Corresponding author. Tel: 86-510-5803990 ~ 749; Fax: 86-510-5865545; E-mail: animsci@wxuli.edu.cn