

人源性抗 HBsAg Fab 抗体的发酵生产研究

邓宁¹ 向军俭¹ 陈文吟² 熊盛³ 王珣章^{4*} 粟宽源²

¹(暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

²(解放军第 458 医院传染病研究中心, 广州 510602)

³(暨南大学药学院, 广州 510632)

⁴(中山大学生物防治国家重点实验室、生物医药中心, 广州 510175)

摘要 为了适应工业生产的需要,利用 fed-batch 方法,重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体酵母工程菌在 30L 发酵罐中进行了高密度发酵,发酵最适温度 30℃,pH 值范围 5.0~5.3,溶氧范围 20%~30%。发酵液 OD_{600} 值达到 300 时开始诱导,甲醇最佳诱导浓度为 10 mL/L。重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体经离子交换层析纯化,纯化产品经 SDS-PAGE、Western blot 进行分析和 ELISA 方法进行活性测定。结果显示,重组 Fab 抗体在 Fed-batch 发酵系统中可高效表达,经过 192 h 的发酵生产,重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的表达量可达 412mg/L。发酵上清经过离子交换层析纯化,获得纯度为 95% 的重组 Fab 抗体,该 Fab 抗体经 ELISA 分析具有较高的 HBsAg 抗原亲和力和特异性。结果证实可以通过高密度发酵毕赤酵母工程菌来高效生产重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体,为后续的工业化生产应用奠定了基础。

关键词 HBsAg, 重组 Fab, 发酵, 毕赤酵母

中图分类号 TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0800-05

乙型肝炎病毒不仅引起急慢性肝炎,且与肝硬化和肝癌的发生有密切的关系。现已公认针对乙肝表面抗原的抗体具有保护活性,是唯一能用于紧急预防的生物制品。人源性抗乙肝表面抗原(HBsAg)Fab 抗体在临床上具有防治乙型肝炎病毒的很好的应用前景,如防治新生儿乙型肝炎病毒的垂直传播、肝脏移植病人的病毒控制和用于制备治疗性乙肝疫苗等^[1,2]。Fab 抗体具有全抗体相同的抗原结合活性,且糖基化对抗原抗体的结合活性没有影响^[3]。Fab 抗体具有广泛的应用价值,如用于疾病的检测和治疗^[4]、体外诊断^[5]以及用于亲和纯化^[6]等。抗 HBsAg Fab 抗体被认为具有预防和治疗 HBV 引起的肝病的作用。

人源性抗 HBsAg Fab 抗体基因是通过噬菌体展示技术筛选获得^[7]。我们曾将该 Fab 抗体基因克隆到酵母表达载体^[8],成功在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中获得高水平表达^[9],表达量可达 50mg/mL。并对表达的重组 Fab 的活性和理化性质进行了分析^[9,10],该 Fab 抗体具有较强的抗原结合活性和较高的特异性,具有进一步开发应用的前景,在此基础上,对重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体酵母工程菌进行了高密度发酵研究,成功在 30L 发酵罐中高密度发酵生产了人源性抗 HBsAg Fab 抗体,其表达量可达 412mg/L。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 工程菌:重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体酵母工程菌 GS115/Fab,本实验室保存。

1.1.2 试剂:YNB、Biotin 和 ZeocinTM 购自 Invitrogen 公司;羊抗人 Fab 抗体及其碱性磷酸酶标记物购自 Sigma 公司;ELISA 检测试剂盒购自中山生物工程公司;甲醇、氨水、甘油及其他无机盐等均为国产分析纯。

1.1.3 设备:Biostat B-30 型发酵罐,德国 Brong 公司,AKTA 快速液相蛋白层析仪(FPLC),Amersham Pharmacia 公司;5mL HiTrapTM DEAE-sepharose Fast Flow 和 5mL HiTrapTM CM-sepharose Fast Flow 层析柱,购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.2 培养基

1.2.1 发酵基础盐培养基:85% 磷酸 26.7 mL,硫酸钙 0.93 g,磷酸钾 18.2 g,硫酸镁·7H₂O 14.9 g,氢氧化钾 4.13 g,甘油 40.0 g,加水至 1L,直接加入发酵罐内灭菌。

1.2.2 PTM1 微量元素溶液:硫酸铜·5H₂O 6.0 g,碘化钠 0.08 g,硫酸锰·H₂O 3.0 g,钼酸钠·2H₂O 0.2 g,硼酸 0.02 g,氯化钴 0.5 g,氯化锌 20.0 g,硫酸铁·7H₂O 65.0 g,生物素 0.2 g,硫酸 5.0 mL,加无菌水至 1L,抽滤除菌,室温保存。

收稿日期:2004-02-16, 修回日期:2004-05-08。

基金项目:广州市科技局重点项目(No. 2003J1-C0171)及国家自然科学基金项目(No. 40376030)。

* 通讯作者。 Tel: 86-20-84112504; Fax: 86-20-84112504; E-mail: wxz@zsu.edu.cn

1.3 方法

1.3.1 Fed-batch 发酵:菌种准备:从新鲜 YPD 平板挑重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体酵母工程菌 GS115/Fab 单菌落接种于 10 mL 种子培养基中 (BMGY 改良), 30°C 振荡培养 20~24h, 转接于 1L BMGY 培养基中, 30°C 振荡培养至 OD_{600} 达 10 左右。

发酵过程:发酵罐内温度恒定为 30°C, 用氨水调 pH 值, 维持 pH 值在 5.0~5.3, 溶氧控制在 20%~30%。发酵基础盐培养基 10 L, 菌种接种量为 10%。发酵进行中, 当溶氧 (Dissolved oxygen, DO) 陡然上升时 (预示基础盐培养基中的甘油已耗尽, 此阶段耗时 20h), 开始流加补料生长培养基 (含 12 mL/L PTM1 的 50% 甘油, 维持 DO 20% 左右) 发酵。发酵液的 OD_{600} 达 300 时, 停止补料 (此阶段用时 20 h 左右), 甘油耗尽后流加发酵诱导培养基 (含 12 mL/L PTM1 的甲醇), 以低的速率流加甲醇维持 3~6 h 的过渡阶段。过渡阶段结束后, 提高甲醇流加速率并维持发酵液甲醇浓度在 10g/L 左右进行发酵。通过调节转速、罐压和通气量使溶氧大于 20%。诱导发酵 96 h 左右。

1.3.2 发酵结果分析:发酵液稀释至 $OD_{600} = 0.1 \sim 0.5$ ($d = 1 \text{ cm}$), 于波长 600nm 处以去离子水为对照进行比色测定, $OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$ 。发酵液中湿重细胞含量: 经 8000 r/min 离心后称重测定。发酵上清中重组 Fab 抗体浓度: 利用 Bradford 法^[11] 测定发酵上清的总蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 电泳, 经薄层扫描及图像分析系统分析目标蛋白占总蛋白的比值确定重组 Fab 抗体的表达量。Western-blot 分析参照文献^[12] 进行。

1.3.3 甲醇浓度测定:甲醇浓度的测定采用亚硫酸品红比色法进行, 取 10mL 比色管, 加入甲醇标准溶液, 另取几只比色管加入系列稀释的样品。各管加入高锰酸钾磷酸溶液, 混匀, 各管加入 2mL 草酸硫酸溶液, 混匀。加入 5mL 亚硫酸品红溶液, 混匀, 比色测定。

1.3.4 发酵上清中重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的纯化:离子交换法纯化重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体参照文献^[13] 的方法并进行改进。发酵上清液经透析后上阴离子交换柱, 收获的穿流液上阳离子交换柱, 经平衡洗涤, 目的 Fab 抗体用 0.3mol/L NaCl 洗脱下来。利用 Bradford 法^[13] 测定重组 Fab 抗体的含量。

1.3.5 重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体活性测定:重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的抗原结合活性采用 ELISA 的方法进行^[14]。用 100ng/孔的 HBsAg 包被酶标板, 调整纯化重组 Fab 抗体、发酵上清和 HBIG 的浓度, 分别系列稀释后加入酶标板, 加入二抗 HRP-羊抗人 IgG, 显色, 测定 450/630 值。

2 结果

2.1 发酵的策略

重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体酵母工程菌的发酵采用 Fed-batch 发酵的策略。发酵生长曲线如图 1。发酵进行到 20 h 时, DO 值迅速从 30% 上升至 70% 左右, 预示发酵液中

甘油已消耗完, 开始流加补料培养基, 补料速度为 30%~35%。36 h 时发酵液 OD_{600} 达到 300 左右, 停止补料, 待甘油消耗完后开始流加甲醇诱导培养基诱导。在整个诱导过程中, 发酵液的 OD_{600} 值趋于平稳、缓慢的上升。发酵过程中工程菌生长良好。显微镜下 80% 的菌体呈现出芽状态。发酵结束时收获 26.5 L 发酵液, OD_{600} 值为 332。诱导 6 h, 发酵上清中就有重组 Fab 抗体的表达, 如图 2, 诱导发酵第 1 天, 可见 28kD 附近出现两条清晰的表达条带。Bradford 法检测显示, 重组 Fab 抗体在诱导 24h 的表达量达 200 mg/L。经 192h 诱导, 收获时发酵液中重组 Fab 抗体的含量为 412 mg/L。成功实现了 30 L 发酵罐高密度发酵生产重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体。发酵罐中的表达量比摇瓶诱导表达量提高近 10 倍。表达产物的 Western-Blot 分析结果见图 3, 结果显示, 还原条件下, 重组 Fab 抗体的二硫键打开, 在 28kD 处显示两条条带, 非还原条件下, 重组 Fab 抗体在 50kD 处显示一条条带。

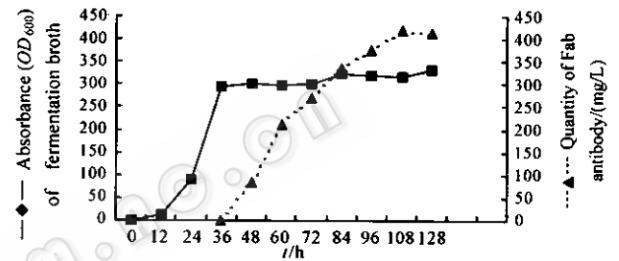


图1 重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体酵母工程菌发酵生长曲线及重组 Fab 抗体的生产

Fig.1 Curves for cell optical density in recombinant GS115/Fab cultivation and yield of recombinant Fab antibody

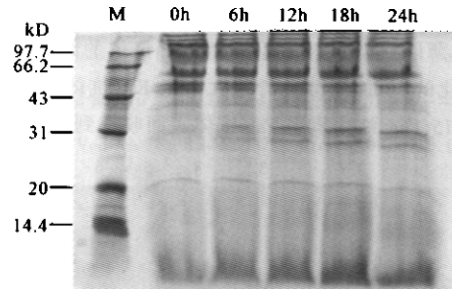


图2 诱导发酵第一天发酵上清的还原型 SDS-PAGE 分析
Fig.2 Reduced SDS-PAGE analysis for fermentation supernatant of GS115/Fab in the first day of induction

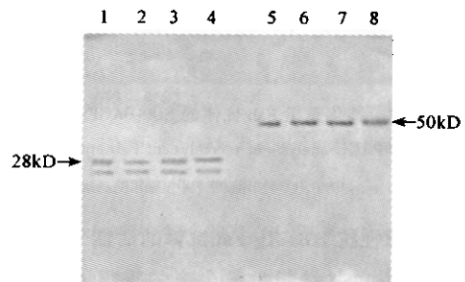


图3 发酵上清重组 Fab 抗体的 Western blot 分析
Fig.3 The Western blot analysis of recombinant Fab antibody in fermentation supernatant

高浓度甲醇对酵母细胞有毒,表1显示摇瓶发酵中不同甲醇浓度对重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体表达的影响。当甲醇浓度超过 20g/L 时,将严重影响重组酵母工程菌的生长和重组 Fab 抗体的表达,摇瓶发酵液的 OD_{600} 和重组 Fab 抗体的表达量随甲醇浓度的升高而明显降低。毕赤酵母发酵的最佳甲醇浓度为 10g/L 左右。30 L 发酵罐中,开始甲醇诱导时甲醇的流加速度缓慢,应让酵母细胞有一个适应阶段,否则容易发生甲醇中毒。3~4h 后开始增加甲醇流加的速度,使得发酵液的甲醇浓度逐步达到并维持在 10g/L 的水平。

表1 甲醇浓度对重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体表达的影响

Table 1 Expression of recombinant human HBsAg Fab in different methanol concentration

Methanol concentration / (g/L)	Initial		End		Fab concentration / (mg/L)
	OD_{600}	OD_{600}	pH	pH	
5	9.6	29	6.0	6.3	37.4
10	9.6	29.1	6.0	6.2	42.48
15	9.6	30.4	6.0	6.5	35.8
20	9.6	28.6	6.0	6.7	31.8
25	9.6	23.7	6.0	6.9	20.6
30	9.6	18.2	6.0	7.1	14.6

2.2 发酵上清中重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的纯化

利用阴、阳离子交换柱从发酵上清中纯化重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体。纯化重组 Fab 抗体的 SDS-PAGE 分析如图 4。通过薄层扫描分析,纯化重组 Fab 抗体的纯度为 96.5%。用于纯化的 50mL 发酵上清约含重组 Fab 抗体 20mg,经纯化回收得到 15.1mg 纯化重组 Fab 抗体。回收率达到了 75%。

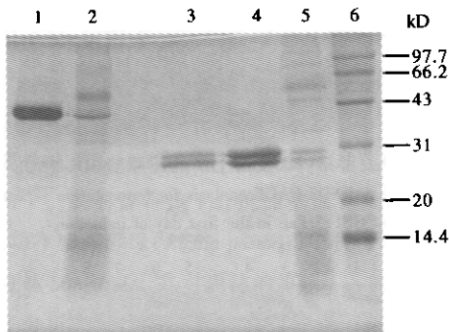


图4 纯化重组 Fab 抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant Fab antibody purified from fermentation supernatant

2.3 重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的活性分析

利用间接 ELISA 分析发酵生产的重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的抗原结合活性如图 5。纯化的重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体、发酵上清和 HBIG (作为阳性对照) 均显示了较好的 HBsAg 的抗原结合特性。结果表明通过发酵生产的

重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体具有较强的抗原结合活性。

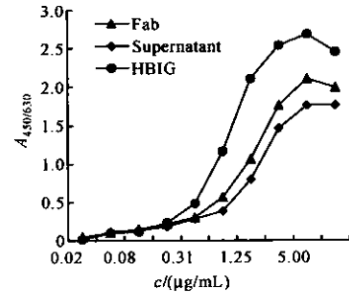


图5 重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体的 ELISA 测定

Fig. 5 Quantification of recombinant humanized anti-HBsAg Fab antibody by ELISA

3 讨论

巴斯德毕赤酵母具有高效表达外源蛋白的能力^[15, 16]。外源基因插入在其醇氧化酶强启动子下游,高效分泌表达^[17, 18]。毕赤酵母表达外源蛋白不仅具有真核细胞的优点,可正确折叠、形成二硫键、具有糖基化和进行分泌表达,而且毕赤酵母发酵时可达非常高的细胞密度,可以利用廉价的无机盐培养基进行高密度发酵生产。这使得毕赤酵母非常适合于表达和发酵生产外源蛋白^[19-22]。Horwitz AH 等 1988 年在啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株中成功分泌表达了具有功能的抗人鼠嵌合抗体 Fab 片段,其表达量仅为 100~200 $\mu\text{g/L}$ ^[23],虽然表达量较低,但是开创了抗体基因在酵母中表达的先河。Takahashi K 等 2000 年在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统中分泌表达了抗 IgE 受体的人源化 Fab 抗体片段,其表达量提高到 10~40mg/L^[24]。Lange S 等利用 Fed-batch 发酵系统在 5L 发酵罐中发酵生产了 at-razine 特异的 Fab 抗体,其发酵行情的表达量为 40 mg/L^[25]。我们前期研究显示,人源性抗 HBsAg Fab 抗体可在毕赤酵母中高水平表达,摇瓶中的表达量可达到 50mg/L^[9],对其特性分析显示,毕赤酵母表达的重组 Fab 抗体为低糖基化蛋白,分子量为 50kD,具有较强的抗原结合活性,而且糖基化对其活性没有影响^[10]。

本研究首次用 fed-batch 发酵系统高效生产了重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体。根据前三次的发酵经验,甲醇起始诱导的最佳菌体密度 OD_{600} 为 300~400,起始诱导时菌体密度太高 (OD_{600} 大于 500) 往往会造成后期发酵困难,需要补充消泡剂避免大量泡沫的产生,密度太高还会造成溶氧困难,需补充纯氧才能维持发酵(会使发酵成本上升);甚至因密度太高和含消泡剂太多而造成后续纯化困难。甲醇浓度最后控制在 10g/L 左右,因高浓度甲醇对毕赤酵母有毒,故应实时检测发酵系统的甲醇浓度,避免造成甲醇毒性。

采用 fed-batch 发酵系统生产重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体,表达量达 412mg/L,该表达量大大高于目前报道的其他重组 Fab 抗体在毕赤酵母中的表达^[19, 20]。发酵生产的重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体通过离子交换得到了有效的纯化,纯化的重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体经 ELISA 分析显示具

有较强的抗原结合活性。因此,毕赤酵母是很好的表达重组 Fab 抗体的系统,利用该系统表达的重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体非常适合于工业化生产,为重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体在诊断和临床治疗应用奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Dulbecco R, Ginsberg HS. In *Virology*. Harper and Row, Philadelphia, 1980
- [2] White DO, Fenner JF, In *Medical Virology*. Academic Press, Orlando, FL, 1986
- [3] He ML(何明亮), Li ZP(李载平). Character and application prospect of gene engineering antibody. *Chinese Journal of Cell Biology*(细胞生物学杂志), 1995, 17(3):112-117
- [4] Levy R, Miller RA. Tumor therapy with monoclonal antibodies. *Fed Proc*, 1983, 42(9): 2650-2656
- [5] Tam MR, Goldstein LC. In *Manual of Clinical Microbiology*. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ *et al* eds, 4th ED. Am Soc Microbiol, Washington DC, 1985, pp.905-909
- [6] Johnstone A, Thorpe R. *Immuno chemistry in Practice* (Blachwell, Oxford), 1982. pp. 905-909
- [7] Gao H(高辉), Gao L(高磊), Ren ZL(任宗玲) *et al*. Screening and sequence analysis of a humanized anti-HBsAg Fab fragment. *J Cell Mol Immunol*(细胞与分子免疫学杂志), 1998, 14(2): 155-157
- [8] Deng N(邓宁), Su KY(栗宽源), Wang XZ(王珣章) *et al*. The construction of expression vector of anti-HBsAg single chain Fab gene in *Pichia pastoris*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*(中山大学学报-自然科学版), 2002, 41(4):67-69
- [9] Deng Ning, Xiang Junjian, Wang Xunzhang *et al*. Expression, purification and characterization of humanized anti-HBs Fab fragment. *Journal of Biochemistry*, 2003, 234(5): 813-817
- [10] Deng N(邓宁), Su KY(栗宽源), Wang XZ(王珣章) *et al*. The expression of humanized Fab fragment of the anti-HBsAg antibody in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2002, 18(5):546-550
- [11] Ausubel F, Brent R, Kingston RE *et al*. Using the Bradford method to determine protein concentration. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol 2, New York: John Wiley and Sons, Inc., 1987
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989
- [13] Zhao YF(赵永芳). *The Principle and Application of Biochemistry technology*. Wuhan University Publishing Company(武汉大学出版社), 1988
- [14] Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S *et al*. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody Fab fragment against hepatitis B surface antigen. *Journal of Medical Virology*, 1999, 58: 338-345
- [15] Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R *et al*. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technol*, 1987, 5: 1305-1308
- [16] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP *et al*. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnol*, 1991, 9: 455-460
- [17] Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM *et al*. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(9): 3859-3876
- [18] Brierley RA, Bussineau C, Kossan R *et al*. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: Bovine lysozyme. *Ann New York Acad Sci*, 1990, 589:350-362
- [19] Digan ME, Lair SV, Brierley RA *et al*. Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1989, 7: 160-164
- [20] Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C *et al*. High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1987, 5: 479-482
- [21] Cregg JM, Vedvich TS, Raschke WC. Recent advance in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1993, 11: 905-910
- [22] Chauhan AK, Arora D, Khanna N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 1999, 34: 139-145
- [23] Horwitz AH, Chang CP, Better M *et al*. Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8678-8682
- [24] Takahashi K, Yuuki T, Takai T *et al*. Production of humanized Fab fragment against human high affinity IgE receptor in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 2138-2144
- [25] Lange S, Schmitt J, Schmid RD. High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 255: 103-114

Production of Recombinant Humanized anti-HBsAg Fab Antibody by Fermentation

DENG Ning¹ XIANG Jun-Jian¹ CHEN Wen-Yin² XIONG Sheng³ WANG Xun-Zhang^{4*} SU Kuan-Yuan²

¹ (Life Science and Technology College in Jinan University, Guangzhou 510632, China)

² (The Central Research Institute, 458th Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China)

³ (Pharmaceutical Science College in Jinan University, Guangzhou 510632, China)

⁴ (The State Key Laboratory of Bio-control in Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract In order to produce recombinant human anti-HBsAg Fab antibody in *Pichia pastoris*, the recombinant yeast was fermented using fed-batch system in a 30 L bioreactor. The fermentation temperature was 30°C, the pH was 5.0 ~ 5.3, and the DO was 20% ~ 30%. The recombinant Fab antibody was purified from crude culture supernatant by ion exchange and analyzed by SDS-PAGE and western blot and ELISA. When the absorbance (OD_{600}) of broth reach 300 at the end of fed-batch phase, the induced phase was initiated. The results showed that recombinant human anti-HBsAg Fab antibody was high-level expressed in recombinant *Pichia pastoris* using a fed-batch fermentation system. Both chains of the Fab were successfully expressed upon methanol induction. After 192 h of induction, the expression level of recombinant Fab (soluble) reached 412 mg/L. The recombinant Fab antibody was purified effectively by ion-exchange chromatography from the fermentation supernatant to a purity of 95%. And the affinity activities of the purified recombinant Fab antibody and fermentation supernatant were detected, and both of them showed high affinity activities. The results demonstrated that recombinant human anti-HBsAg Fab antibody could be high level produced by fed-batch fermentations in *Pichia pastoris*. Which can be efficiently used in industrial production.

Key words HBsAg, recombinant Fab, fermentation, *Pichia pastoris*

Received: 02-16-2004

This work was supported by Grants from Guangzhou Municipal Department of Science and Technology (No. 2003J1-C0171) and National Natural Science Foundation of China (No. 40376030).

* Corresponding author. Tel: 86-20-84112504; Fax: 86-20-84112504; E-mail: cxz@zsu.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>