

利用恒溶氧-补料分批技术高密度培养大肠杆菌 生产重组人骨形成蛋白-2A

李 民 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

朴 勤 陈苏民

(西安第四军医大学生生化教研室 西安 710032)

摘 要 对表达人骨形成蛋白-2A(BMP-2A)的重组大肠杆菌 YK537/pDH-B2m 在 500ml 摇瓶中进行培养条件的摸索实验,继后用 5L 自控发酵罐进行分批培养和分批补料培养,以获取 rhBMP-2A。两种培养方式结果比较表明,在培养过程中保持 30%~40%左右的溶解氧和限制性流加葡萄糖可以使 BMP-2A 的含量达到 2.78g/L,最终菌体密度为 $OD_{600} 53$ (相当于干菌 21.2g/L),重组蛋白的表达量占菌体总蛋白的 25%。该培养技术的关键是:(1)在培养过程中保持适当的溶解氧;(2)限制性流加葡萄糖;(3)42℃ 起始诱导的时间控制在对数生长中期,持续表达时间为 4h;(4)细菌持续生长的比生长速率控制在 $0.3h^{-1}$ 左右。

关键词 重组大肠杆菌,分批补料,高密度培养,人骨形成蛋白-2A(BMP-2A)

学科分类号 Q939.97

基因重组技术的发展已使重组蛋白特别是人的细胞因子成为重要的基因工程药物,发酵技术的日趋成熟已使这类药物走上了大规模工业化生产的道路^[1]。人骨形成蛋白-2A(BMP-2A)是一种诱骨活性蛋白,可以诱导异位宿区间质细胞分化成为软骨细胞和成骨细胞,对于难治性骨折的愈合及各种骨缺损的修复有明显的促进作用^[2,3],目前已准备用于临床。利用重组大肠杆菌(*E. coli*)进行高密度培养获取 BMP-2A,提高比生产率,具有十分重要的意义。

在补料分批培养过程中,细菌的代谢产物,如有机酸、CO₂ 等,这些有害物质的积累会抑制细菌的生长,特别是乙酸还会抑制外源蛋白的表达。溶解氧过高和过低都会影响细菌的代谢,使其后期的生长变得极为缓慢。因此保持一定的溶解氧和限制性流加葡萄糖的补料分批培养可以降低底物和有害废物的抑制作用,实现高密度培养^[4~10]。

另外,对温度控制诱导表达的工程菌来讲,诱导时细菌的生长状态及诱导持续的时间都会对重组蛋白的表达量和生产率有极大的影响。一般而言,细菌的对数生长中期是诱导的最佳时期,但持续时间则因蛋白的不同而异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒宿主细胞 *E. coli* YK537(*supE44 hsdR hsdM recA1 phoA8 leuB6*)

收稿日期:1997-05-05,修回日期:1997-10-11。

thi lacY rpsL20 galK2 ara-14xyl-5mth-1)由中国科学院典型培养物保藏委员会基因库保藏。重组质粒 pDH-B2m 由西安第四军医大学生生化教研室构建。它带有氨苄青霉素抗性基因和编码 BMP-2A 成熟肽的基因,受 λ PL 启动子的控制,在 42℃ 下能诱导表达 BMP-2A。质粒图谱见图 1。用该质粒转化^[11] 宿主菌 YK537 得到表达 BMP-2A 的工程菌株 *E. coli* YK537/pDH-B2m, 试管培养中 BMP-2A 的表达量为菌体总蛋白的 30% 以上。

1.1.2 培养基: LB 培养基用于试管种子培养^[11], 含葡萄糖的 2-YT 培养基用于摇瓶培养^[11], 半合成培养基用于 5L-发酵罐中分批和补料分批培养^[13]。补料基质中有(g/L): 葡萄糖 125, 酵母粉 50, 蛋白胨 50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5。溶液的 pH 值全部调为 7.0。培养基和微量元素溶液 121℃, 高压灭菌 20min, 补料在 115℃ 下, 灭菌 15min。各种培养基中都加入经微孔滤膜除菌的氨苄青霉素溶液至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.2 细菌的培养方法

1.2.1 种子的活化: 取 -70℃, 20% 甘油保藏的菌种 100 μl , 接种于含 4ml LB 培养基的试管中, 30℃, 220r/min 培养 10h 左右, 然后按试管培养基量的 2% 转种 1 次, 相同的条件培养 4h, 成为活化种子, 4℃ 保存可用 2 周。

1.2.2 三角摇瓶培养: 取活化的种子, 以 2% 种量接种于含 100ml 2-YT 培养基的 500ml 摇瓶中, 30℃, 220r/min 培养 6h, 可以作为 5L 发酵罐的菌种, 也可以继续培养 2h, 再升高温度至 42℃ 诱导培养 4-5h 结束。此培养过程中不调节溶解氧, 若不特别指出也不调节 pH 值。

1.2.3 发酵罐分批培养: 取摇瓶培养的种子, 按发酵罐工作体积的 4% 接种(罐中的起始工作体积为 3.5L), 一次性加入 50g 葡萄糖, 30℃ 生长 10h, 42℃ 诱导培养 4h。自动加入 30% 的氨水使 pH 值保持在 7.0 左右, 搅拌转速固定为 600r/min, 空气流速 7L/min。

1.2.4 溶氧控制的分批补料培养: New Brunswick Scientific 公司, BioFlo 3000 型 5L 自动控制发酵罐装置见图 2。

该系统由微机自动控制, 控制的几个关键参数如下: ①温度。前 16h 的培养温度为 30℃, 然后 42℃ 诱导培养 4h; ②溶氧及转速。当培养基中溶氧降至 40% 以下时, 每 30s 提高 10r/min, 若超过 60%, 降低 10r/min, 当达到最大转速 800r/min 时, 通入纯氧, 溶氧值保持在 30% 左右; ③pH 值。自动流加 30% 的氨水, 使 pH 保持在 7.0 左右; ④葡萄糖的流加;

根据发酵的实际经验, 流加补料分三个阶段进行, 发酵过程中 0~4h 不加补料, 4~10h 补加含 50g 葡萄糖的补料, 10~20h 加入含 190g 葡萄糖的补料, 诱导前 0.5h 追加 100ml 补料。以上数据由微机每 30s 自动收集 1 次。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体浓度和重量: 菌体浓度用分光光度计测 600nm 的光吸收值 OD_{600} 值。光吸

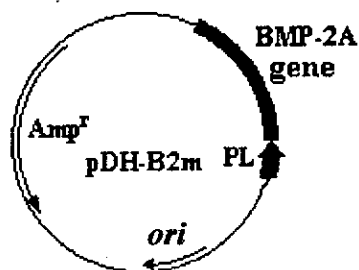


图 1 重组质粒 pDH-B2m 的结构图

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pDH-B2m

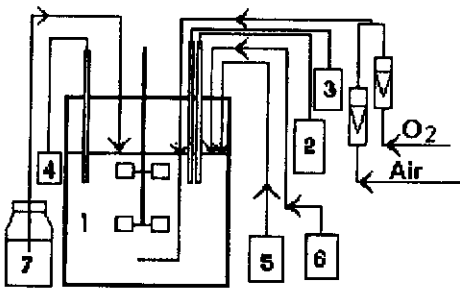


图 2 发酵系统简图

Fig. 2 Schematic diagram of fermentation system
1. Fermenter, 2. Dissolved oxygen meter and controller,
3. pH meter and controller, 4. Thermometer and controller, 5. Alkali, 6. Acid, 7. Medium bottle

收值与细胞干重呈线性。一个单位的 OD_{600} 约为干菌 0.40g/L ，则 1g 湿菌相当于 0.2g 干菌体。

1.3.2 葡萄糖的浓度测定：由斐林试剂法测定。

1.3.3 BMP-2A 表达量测定：由 SDS-PAGE 凝胶电泳检测^[11]。再用 SDS-PAGE 液染色，脱色后由灰度扫描仪测出 BMP-2A 占菌体总蛋白的百分含量。

1.3.4 菌体总蛋白的测定：Bradford 法测菌体总蛋白^[12]。取不同 OD_{600} 值的菌液 10ml ， 5000r/min 离心 15min ，清洗 2 次，超声破菌 10 次，每次 60s ，取样按 Bradford 标准方法测蛋白含量。总平均值为 0.525g/g (蛋白/干菌体)。

2 结果与讨论

2.1 三角瓶培养

2.1.1 三角瓶培养中起始诱导时间对细菌生长和 BMP-2A 表达的影响：影响重组 BMP-2A 表达的因素很多，其中诱导的时机和诱导时菌体的密度对表达水平和比生产率有较大的影响。如图 3 和表 1 所示，在细菌生长的对数中期 (培养 6h) 升高温度进行诱导可以获得较高的产率 (0.28g/L)，比后期诱导 (0.19g/L) 提高了 32% ，并且 BMP-2A 包涵体的纯度也较高 (未发表)。这是因为在对数生长后期，营养的消耗和生长环境的恶化引起细菌生长状态下降，因而表达外源基因的能力也随之降低。

表 1 三角瓶培养中不同时期^(a)诱导对菌体终密度和 BMP-2A 表达量的影响
Table 1 Effecty of induction in various phase on final cell density and expression
of BMP-2A in shake flask cultivation

Method of induction ^(b)	Cultivation time /h	Final cell density/ OD_{600}	Final pH value in broth	Expression of BMP-2A/ %	Contents of BMP-2A ^(c) / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
In early log phase	4	4.06	6.8	26	0.22
In middle log phase	6	5.40	5.8	25	0.28
In late log phase	8	4.60	5.40	22	0.19

(a) 生长时期是细菌在 30°C 生长不经过诱导而确定的，诱导后生长状态有所改变，与诱导生长曲线稍有不符。
(b) YK537/pDH-B2m 培养方式均为： 30°C 培养一定时间后，迅速升高温度至 42°C ，再诱导培养 4h 。
(c) $\text{BMP-2A 含量}(\text{g/L}) = OD_{600} \times 0.4\text{g}(\text{干菌体})/\text{L} \times 0.525\text{g}(\text{蛋白})/\text{g}(\text{干菌}) \times \text{表达量}(\%)$

2.1.2 三角瓶培养中诱导培养时间对细菌生长和 BMP-2A 表达的影响：诱导培养 3h 后，表达量就达到最大值 25% ，然而菌体还有所增加， 4h 后细菌基本停止生长，而且有下降趋势，所以诱导表达的时间应控制在 4h 左右。

2.1.3 三角瓶培养中起始葡萄糖浓度对细菌生长和 BMP-2A 表达的影响：培养基中葡萄糖的浓度严重影响着细菌的代谢方式，在 2-YT 培养基中加入不同浓度的葡萄糖，由于

耗糖产酸过多,2h后 pH 值随葡萄糖浓度变化下降到 6.8~5.4 不等,考虑到三角瓶中调节 pH 比较困难,因此每隔 2h 加入不等量的氨水调 pH 至 7.0。试验表明当葡萄糖的浓度高到 20g/L 时,最终菌体密度有所下降,BMP-2A 的表达量也下降,见表 2。因此限制性流加葡萄糖,始终保持基质中较低的碳源浓度,并适当延长培养时间是达到高密度和高表达培养的关键因素。

表 2 摇瓶培养中不同起始葡萄糖浓度对细菌生长的影响
Table 2 Effect of various initial glucose conc. on grown
of bacteria in shake flask cultivation

Initial glucose conc. /g·L ⁻¹	Final pH value	Initial cell density/OD ₆₀₀	Final cell density/OD ₆₀₀	Specific growth rate/h ⁻¹	Expression of BMP-2A / %	Content of BMP-2A/g·L ⁻¹
0	7.4	0.23	2.8	0.31	26	0.15
5	7.0	0.33	4.2	0.32	24	0.21
10	5.8	0.29	5.3	0.36	25	0.28
20	5.4	0.30	5.0	0.35	22	0.23
35	5.3	0.32	4.6	0.32	20	0.19

(a)30℃ 培养 6h,42℃ 诱导培养 4h,(b) $\mu = [\ln(OD_2/OD_1)]/(t_2 - t_1)$, (c)OD₁ 的值取自培养后 2h 的 OD₆₀₀, (d)最终 pH 指收获时的 pH,此时并未调 pH 值, (e)BMP-2A 含量的计算:OD₆₀₀×0.4g(干菌)/L×0.525g(蛋白)/g(干菌)×表达量(%)

2.2 分批培养和补料分批培养

对比培养结果表明,分批培养的最终菌体密度仅有 OD₆₀₀ 8,表达量只有 20%,每升发酵液中 BMP-2A 的含量为 0.29g,而通过控制溶氧和限制性补加葡萄糖的培养最终菌体密度可以达到 OD₆₀₀ 53,表达量达到 25%,BMP-2A 的含量为 2.78g/L。诱导后 1h BMP-2A 的表达量仅有 4%,第 3h 就几乎达到了最大表达量(图 3、4 和表 3)。图 3 也表明诱导后细菌体的生长状态受到了极大的影响,能量转向表达外源蛋白,使本处在分裂旺盛期的细胞不再快速生长,而呈现为对数生长末期状态。

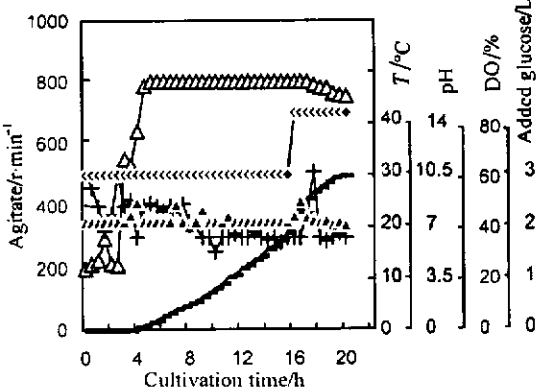
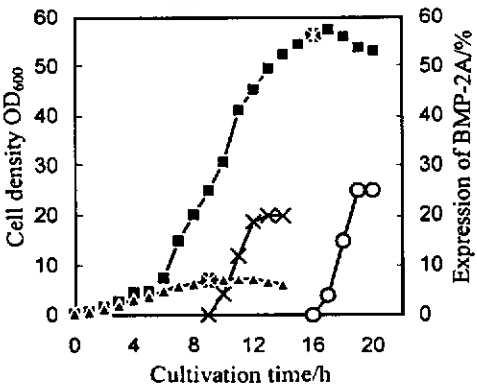


图 3 分批和补料分批培养的细菌生长曲线和 BMP-2A 表达曲线
Fig.3 Bacteria growth and BMP-2A expression in batch and fed-batch culture
(▲)Cell density in batch culture, (■)In fed-batch culture, (×) Expression level of BMP-2A in batch cultivation, (○)In fed-batch culture (*)Thermal induction

图 4 补料分批培养的计算机在线控制
Fig.4 The on-line controlling during fed-batch culture
(△) Agitate, (◆) Temperature, (+) Dissolved oxygen (▲)pH (-) added glucose

表 3 诱导后 BMP-2A 的含量变化
Table 3 BMP-2A change with time after induction

Time after induction/h	Batch culture		Fed-batch culture	
	Total host protein/g·L ⁻¹	BMP-2A/g·L ⁻¹	Total host protein/g·L ⁻¹	BMP-2A/g·L ⁻¹
1	1.537	0.063	12.08	0.47
2	1.537	0.183	11.80	1.78
3	1.508	0.284	11.32	2.78
4	1.445	0.289	11.17	2.78

菌体经超声破菌后得到的包涵体纯度达到 65%，再经简单纯化就可以达到 80% 以上（图 5）。

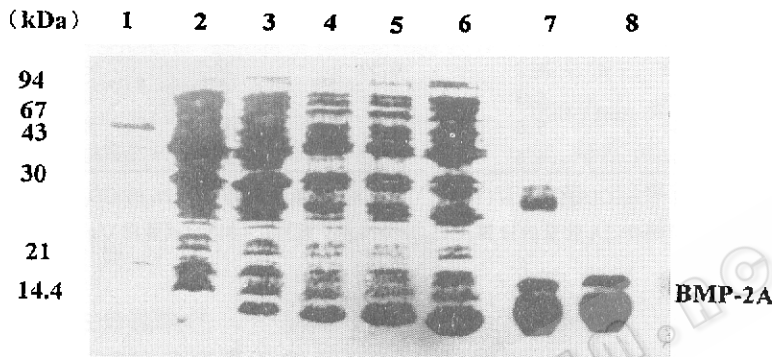


图 5 BMP-2A 表达和包涵体纯化的 SDS-PAGE 电泳图
Fig.5 Electrophoretogram of SDS-PAGE of BMP-2A expression and purification of its inclusion body

1. Stand protein, 2. Host protein before induction, 3~6. BMP-2A expression after induction 1-4 h, 7. BMP-2A inclusion body, 8. Purified BMP-2A inclusion body

内达到较高的生物量。

比生长速率(μ)也影响着细菌生长和 BMP-2A 的表达,在分批培养中,前一阶段比生长速率很高,在 $0.6 \sim 0.4\text{h}^{-1}$ 左右,但随后细菌生长变得非常缓慢,比生长速率仅有 0.1h^{-1} ,表明细菌基本停止生长,并开始自溶。在补料分批培养中,细菌持续生长时间较长,比生长速率为 $0.34 \sim 0.2\text{h}^{-1}$ 之间,而诱导后细菌也不再生长,能量主要消耗在外源蛋白的表达上,BMP-2A 的表达量在 2h 内从 4% 提高到 25% (见图 3)。

在整个分批补料的培养过程中葡萄糖的消耗比较完全,残糖浓度一直保持在 0.1g/L 以下,菌体对葡萄糖的转化效率($Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S$)为 0.4g/g 。

该项发酵技术有一定的普遍性,利用它也成功地进行了表达 TNF- α (肿瘤坏死因子- α) 和 IL-3 (白介素-3) 基因工程菌的高密度和高表达培养(未发表)。因此控制发酵过程中的溶解氧和碳源物质的浓度可以改变细菌的生长代谢方式,降低有害废物的积累,始终保持细菌较高的活性状态,能提高菌体密度并使外源蛋白充分表达,实现高比生产率的目的。但在实验中也发现,在高密度培养时 BMP-2A 的表达量(25%)总是比试管中(30%)低一些。因此影响外源蛋白表达的因素还有待进一步研究和克服。

在分批培养过程中,由于葡萄糖的浓度过高,细菌分解代谢的有害废物,特别是乙酸积累过多,抑制了细菌的生长,同时也降低了外源蛋白的表达。分批补料就是通过限制流加碳源来控制细菌的代谢途径,使比生长速率不致过高,降低葡萄糖效应,避免底物抑制作用,减少有害代谢物的大量产生,故细菌可以稳定地生长,在较短的时间

致谢 特别感谢任红玉同志在实验中的大力协助,感谢李荣秀、徐 皓、方 佳、陈建军、张曼芳同志提供的有益建议和帮助。

参 考 文 献

- 1 Hodgson J. *Bio/Technology*, 1993, **11**:887~893
- 2 Urist M R. *Science*, 1965, **150**:893
- 3 Wozney J M *et al.* *Science*, 1988, **242**:1528
- 4 Yee L, Blanch H W. *Bio/Technology*, 1992, **10**:1550~1556
- 5 Kleman G L, Strohl W R. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, **5**:180~186
- 6 Cutayar J M, Poillon D. *Biotechnol Lett.*, 1989, **11**:155~160
- 7 Landwall P, Holme T. *J Gen Microbiol*, 1997, **103**:345~352
- 8 Allen B R, Luli G W. *Biopharmacology*, 1987, **1**:38~41
- 9 Seo D J, Bong H C J. *Fermen and Bioeng*, 1992, **74**, (3):196~198
- 10 Chantal C, Kenich K J. *Fermen and Bioeng*, 1993, **75**, (5):383~386
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*(2nd ed), Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.
- 12 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1987, **72**:248~254
- 13 Mizutani S, Mori H, Shimizu S *et al.* *Biotech and Bioeng*, 1986, **28**:204~209

Production of Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2A by High Density Culture of *Escherichia coli* with DO-stat Fed-batch Condition

Li Min Chen Changqing

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Pu Qin Chen Sumin

(Department of Biochemistry Xi'an Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract The optimization of cultivation condition in 500ml shake flasks was carried out to produce recombinant human bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A) in recombinant *Escherichia coli* YK537/pDH-B2m, followed by 5L fermentor batch and condition-controlled fed-batch culture to obtain BMP-2A. The comparison of these two methods indicated that keeping dissolved oxygen at 30%~40% and limiting glucose concentration could obtain BMP-2A 2.78g/L broth, the final cell density OD₆₀₀ 53 (21.2g dry cell weight/L), and expressed BMP-2A was 25% of the total amount of protein in *E. coli*. The critical fermentation conditions included: (1) keeping appropriate dissolved oxygen concentration in the process; (2) limiting glucose concentration; (3) keeping heat induction at the middle-log phase and maintaining 42℃ for 4 hours; (4) maintaining specific growth rate around 0.3h⁻¹ in the duration of growth.

Key words Recombinant *Escherichia coli*, fed-batch, high density cultivation, human bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A)