

重组质粒 pUDK-HGF 的中试纯化工艺

胡春生^{1,2}, 王延亮¹, 卢育新¹, 程晓晨¹, 刘琳¹, 张通², 张庆林¹

1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

2 内蒙古工业大学化工学院, 呼和浩特 010051

摘要: pUDK-HGF 是携带人肝细胞生长因子的裸质粒, 目前已进入 I 期临床试验, 因此需要大量符合药学规格的质粒 DNA。文中建立了 pUDK-HGF 中试规模纯化制备的新工艺。流程包括: 发酵、离心收获菌体、碱裂解、超滤浓缩碱裂解液、Sephacryl S-1000 层析除去 RNA 并更换缓冲液、plasmidselect 捕获超螺旋质粒 DNA、琼脂糖凝胶 6BFF 除盐。新工艺可获得浓度为 2.0 mg/mL、纯度在 1.70 以上的裸质粒原液, 符合相关质量标准, 并避免使用动物源性的酶及有毒试剂。

关键词: 重组质粒, 纯化, 质量检测, 肝细胞生长因子

Pilot-scale production of recombinant plasmid pUDK-HGF

Chunsheng Hu^{1,2}, Yanliang Wang¹, Yuxin Lu¹, Xiaochen Cheng¹, Lin Liu¹, Tong Zhang², and Qinglin Zhang¹

1 Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

2 College of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot 010051, China

Abstract: pUDK-HGF, the recombinant plasmid DNA encoding human hepatocyte growth factor (HGF), can treat ischaemic disease. A great quantity of pharmaceutical pUDK-HGF is needed. A pilot-scale production process of pUDK-HGF was established based on a new chromatographic media (plasmidselect), including fermentation, cell harvesting, alkaline lysis, ultrafiltration, RNA removing and buffer exchanging on Sephacryl S-1000, capturing supercoiled plasmid DNA with plasmidselect, and removing the salt with Sepharose 6BFF. The process does not use RNase enzyme and toxic solvents.

Keywords: recombinant plasmid, purification, hepatocyte growth factor

肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 是一类多功能生长因子, 具有刺激血管增生作用, 通过局部肌肉注射携带 HGF 基因的质粒 DNA

可明显促进肢体急性缺血部位新生血管的形成, 在临床上具有治疗缺血性疾病的应用前景^[1]。

Zhang 等^[2]对质粒 pUDK-HGF 大规模纯化工艺

Received: June 7, 2010; Accepted: August 25, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2001AA217061).

Corresponding author: Qinglin Zhang. Tel/Fax: +86-10-66930270; E-mail: qinglz@yahoo.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2001AA217061) 资助。

进行了大量研究, 工艺成熟, 能生产药用级重组质粒 pUDK-HGF 注射液。其工艺是碱裂解后离心处理获得澄清碱裂解液, 直接用 Q-Sepharose XL 阴离子交换层析捕获质粒 DNA; 再用 Sephacryl S-1000 分离除去 RNA; 用 Source 15Q 对质粒 DNA 进行精制。随着新填料 plasmidselect 的出现, 生产超螺旋质粒 DNA 的工艺随之更新, 因此本文建立新的 pUDK-HGF 纯化工艺, 该工艺为碱裂解细菌后, 用绸布滤去细胞碎片等絮凝物, 获得碱裂解上清液; 上清液经 300 kDa 超滤柱进行浓缩, 获得的浓缩液经 Sephacryl S-1000 层析柱除去 RNA, 然后通过 plasmidselect 层析柱对超螺旋质粒 DNA 进行捕获, 获得高纯度的超螺旋质粒 DNA, 再通过琼脂糖凝胶 6BFF 对超螺旋质粒 DNA 进行脱盐; 最终采用异丙醇沉淀质粒 DNA, 75% 乙醇洗涤, 配方溶液重溶获得产品。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

表达重组人肝细胞生长因子的基因工程菌 *E. coli* DH5 α -pUDK-HGF 由本室构建, -80 $^{\circ}$ C 甘油保存。

1.2 材料

Tris(Angus)、DNAGreen (北京天恩泽基因科技有限公司)、十二烷基硫酸钠 (Amresco)、限制性内切酶 (TaKaRa)、胰蛋白胨 (OXOID)、酵母提取物 (OXOID)、甘油、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、盐酸、氨水、硫酸铵、乙二胺四乙酸二钠、乙酸钾、氢氧化钠、冰乙酸、异丙醇、乙醇、葡萄糖 (以上化学试剂均来自国药集团化学试剂有限公司, 分析纯)。

1.3 发酵

E. coli DH5 α -pUDK-HGF 菌种经 LB 培养基^[3]摇床培养 12 h, 以接种量 10% 转入含 TB 培养基^[3] 50 L 发酵罐 (KBT250, 韩国) 中, 发酵体积 30 L, 发酵温度 37 $^{\circ}$ C, 搅拌速度 300 r/min, 空气流量 15 L/min, pH 7.2, 发酵时间 13 h, 每小时分别取样,

测定 OD_{600} 及菌体干重^[4]。菌体经离心后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.4 碱裂解细菌

称取 400 g 细菌, 加入重悬液 (50 mmol/L Glucose, 25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 4 000 mL; 充分重悬后在冰浴上加入裂解液 (200 mmol/L NaOH, 1% SDS) 4 000 mL, 缓慢搅拌, 形成粘稠物; 随即加入中和液 (3 mol/L 乙酸钾, 5 mol/L CH₃COOH) 4 000 mL, 形成白色絮凝物, 冰浴, 静置 1 h。用两层绸布过滤, 获得碱裂解液。

1.5 超滤浓缩

选用截留分子量为 300 kDa 的超滤柱 (型号 003N, 北京旭邦膜设备有限责任公司) 采用内压式, 泵速 15 r/min (BTOO-100M, 兰格恒流泵有限公司), 控制浓缩液流速是超滤液流速的 2 倍。超滤后最终体积为 500 mL。

1.6 Sephacryl S-1000 层析柱去除 RNA、更换缓冲液

Sephacryl S-1000 (GE Healthcare) 填料 1.5 L 装于 5.5 cm \times 80 cm 层析柱中 (上海锦华层析设备厂), 溶液 A (2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 平衡, 碱裂解浓缩液以柱体积的 10% 上样, 上样结束后溶液 A 洗脱, EC2000 色谱工作站检测 (大连依利特分析仪器有限公司), 收集 DNA 峰。流速为 4.5 mL/min。

1.7 Plasmidselect 捕获超螺旋 DNA

Plasmidselect (GE Healthcare) 填料 55 mL 装于 2.6 cm \times 20 cm 层析柱中 (上海锦华层析设备厂), 溶液 A 平衡, 将 Sephacryl S-1000 收集的 DNA 溶液上样, 溶液 A 洗脱 3 个柱体积, 溶液 B (0.02 mol/L NaCl, 2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗脱至基线, 溶液 C (0.3 mol/L NaCl, 1.7 mol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗脱超螺旋质粒 DNA。EC2000 色谱工作站检测, 收集超螺旋质粒 DNA。流速为 3 mL/min。

1.8 琼脂糖凝胶 6BFF 除盐

琼脂糖凝胶 6BFF (北京韦氏博慧色谱科技有限公司) 填料 300 mL 装于 3.5 cm×40 cm 层析柱中 (上海锦华层析设备厂), TE 缓冲液^[3]平衡, 将收集的超螺旋质粒 DNA 以不超过柱体积的 20% 上样, EC2000 色谱工作站检测, 收集脱盐 DNA。流速 4.5 mL/min。

1.9 原液制备及超螺旋比例测定

1.9.1 原液制备

量取脱盐溶液体积按 1:0.8 加入异丙醇, 沉淀质粒 DNA, 4 000 r/min 离心 30 min 收集沉淀。沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次, 空气干燥, 按标示量配制所需浓度。

1.9.2 含量检测及超螺旋比例测定

含量检测: 原液稀释 125 倍, 利用紫外分光光度计 (Beckman DU640, USA) 检测 OD_{260} 、 OD_{280} 。

超螺旋比例测定: Waters 高效液相色谱仪 (Waters, USA); 色谱柱: TskgelDNA-NPR (0.46 id×7.5 cm, TOSOH, 日本), 检测波长: 260 nm, 流速 0.5 mL/min, 流动相 A: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; 流动相 B: 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, pH 9.0, 进样量: 5 μ g, 线性梯度洗脱条件: 起始比例 A:B 为 50%:50%, 梯度洗脱 30 min, 最终 A:B 比例为 20%:80%, 35 min 回到起始平衡色谱柱。

2 结果

重组质粒 pUDK-HGF 纯化制备流程图见图 1。*E. coli* DH5 α -pUDK-HGF 在 TB 培养基中发酵 13 h, 动态观察 OD_{600} (图 2)。当细菌进入稳定期后, 离心收获菌体, 储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。测量菌体干重, 可知在发酵 11 h 后菌体就进入稳定期。发酵结束后, 取出 1 mL 发酵液用北京三博远志质粒提取试剂盒提取质粒, 测含量, 发酵液中 pUDK-HGF 的含量约 42 mg/L。

菌体按重量比 1:10:10:10 加入重悬液、裂

解液、中和液, 碱裂解液经过超滤、离心后, 直接用 Sephacryl S-1000 除去 RNA、更换缓冲液, 获得质粒 DNA (图 3); plasmidselect 捕获超螺旋质粒 DNA (图 4), 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在电泳图上未见 RNA, 超螺旋 DNA 与开环 DNA 完全分离 (图 5); 通过 HPLC 检测, 超螺旋质粒 DNA 比例在 99% (图 6); plasmidselect 柱捕获的含高盐超螺旋质粒 DNA 经琼脂糖凝胶 6BFF, 能达到除盐的效果 (图 7)。利用限制性酶对原液与标准品进行酶切鉴定^[5], 结果显示原液与标准品酶切图谱一致 (图 8)。

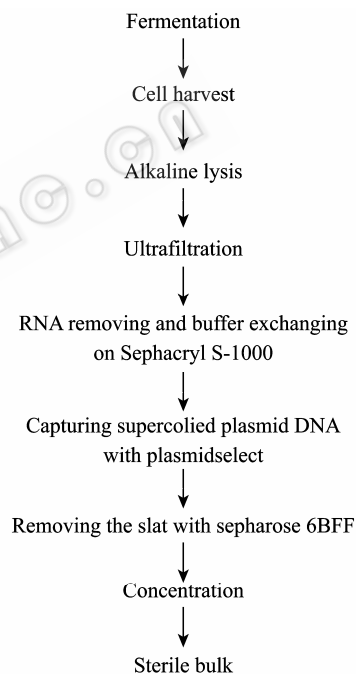


图 1 重组质粒 pUDK-HGF 制备流程图

Fig. 1 Process flow sheet for pUDK-HGF production.

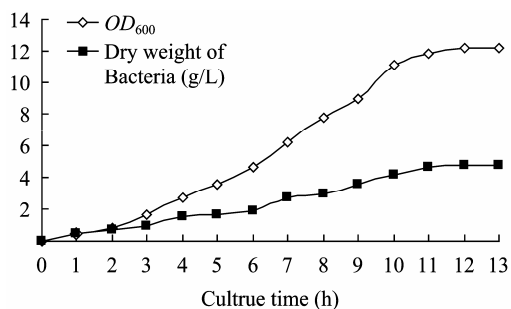


图 2 50 L 发酵罐发酵菌体密度与干重动态曲线

Fig. 2 Curve of OD and dry weight of *E. coli* in 50 L fermentor.

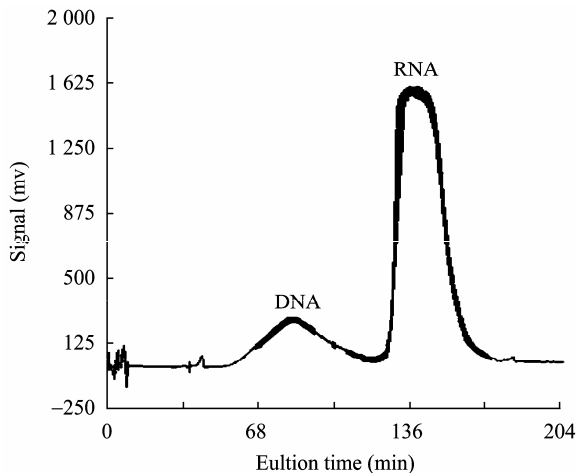


图3 Sephacryl S-1000 层析分离色谱图
Fig. 3 Removing RNA and exchanging buffer on Sephacryl S-1000.

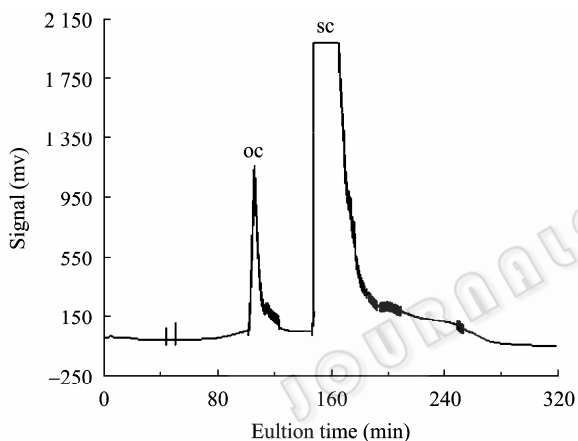


图4 PlasmidSelect 柱层析分离色谱图
Fig. 4 Capturing the supercoiled plasmid DNA on plasmidselect. oc: open circular; sc: supercoiled.

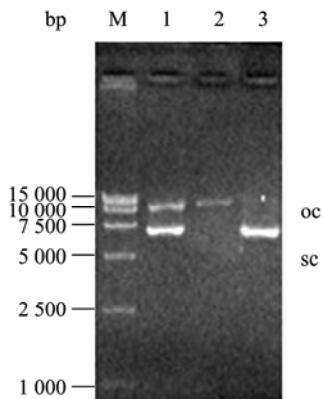


图5 经 Plasmidselect 分离后质粒 DNA 电泳图
Fig. 5 Analysis by 0.8% agarose-gel electrophoresis of purified pUDK-HGF from plasmidselect. 1: loading sample; 2: opened pUDK-HGF; 3: supercoiled pUDK-HGF; M: DNA marker.

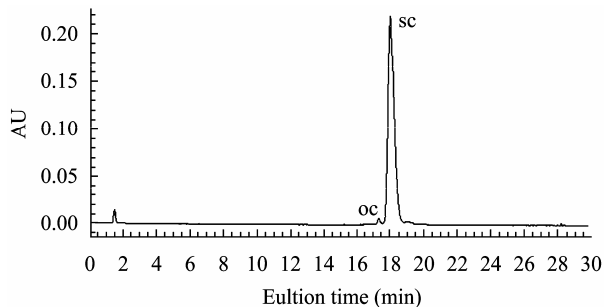


图6 超螺旋比例 HPLC 分析色谱图
Fig. 6 The supercoiled form of pUDK-HGF analysed by a TskgelDNA-NPR column.

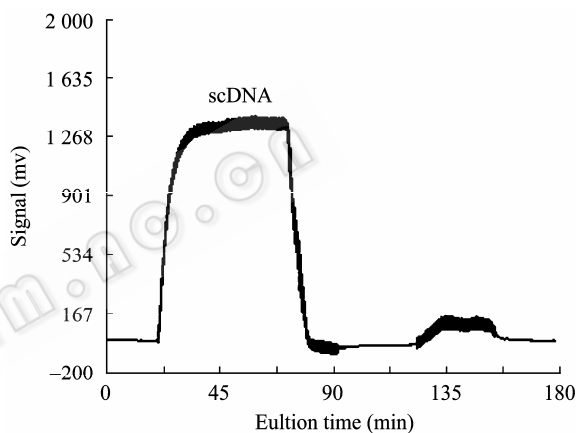


图7 琼脂糖凝胶 6BFF 脱盐色谱图
Fig. 7 Removing the salt by a sepharose 6BFF column.

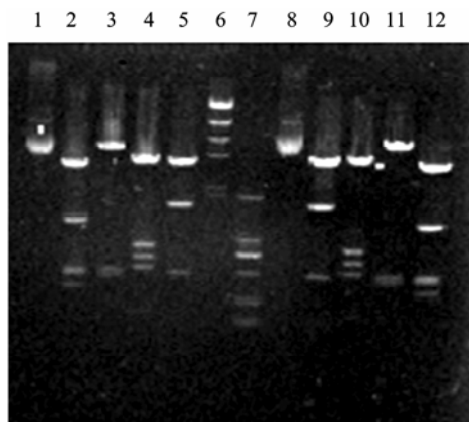


图8 pUDK-HGF 限制性内切酶鉴定图谱
Fig. 8 Analysis by 0.8% agarose-gel electrophoresis of restriction enzyme dealing with pUDK-HGF. 1-5: sample; 8-12: reference substance; 2 and 12: *Bam*H I, *Bag*L II; 3 and 11: *Bag*L II, *Sal* I; 4 and 10: *Eco*R I, *Sal* I; 5 and 9: *Hind* III, *Xba* I; 1 and 8: plasmid pUDK-HGF; 6: λ -*Hind* III Marker; 7: DNA Marker DL2 000 (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp).

利用紫外分光光度计 (Beckman DU640, USA) 检测重组质粒 pUDK-HGF 原液含量及纯度, 读取 260 nm 与 280 nm 处光吸收值, 根据公式: 样品 DNA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$) = $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times$ 稀释倍数计算含量; OD_{260}/OD_{280} 比值表示质粒 DNA 纯度, OD_{260}/OD_{280} 比值一般在 1.75 以上^[2]。本工艺能获得含量为 2.0 mg/mL、 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.9 的原液质粒 DNA。

3 讨论

基因治疗可能成为一些重大疾病如肿瘤、动脉粥样硬化、骨质疏松症、关节炎等的治疗手段, 而基因治疗的关键是携带治疗基因的载体能有效进入靶细胞^[1]。目前, 应用基因治疗的载体大致可以分为两大类, 一类是病毒载体, 另一类是非病毒载体。临床上腺病毒载体占 23.8%, 反转录病毒载体占 20.7%, 质粒载体占 18.3%^[6]。虽然病毒载体的转染率高, 但存在一些安全隐患; 而质粒 DNA 在靶细胞中的基因表达效率低、持续时间短, 但它在靶细胞中安全性高。国内重组质粒 HGF 用于治疗局部肢体动脉缺血疾病已进入 I 期临床试验。

由于色谱分离技术的高分辨率和种类的多样性, 现仍在生物分离技术中占主导地位。迄今为止, 已有大量的色谱分离技术应用于质粒 DNA 的分离纯化, 例如: 阴离子交换色谱 (Anion exchange, AE)^[7]、亲和层析色谱 (Affinity chromatography, AC)^[8]、疏水交换色谱 (Hydrophobic interaction chromatography, HIC)^[9]、反相色谱 (Reverse phase, RP)^[10]、排阻色谱 (Size exclusion, SE)^[11]。虽然色谱填料价格昂贵, 但具有容易放大的优点, 适用于工业化生产质粒 DNA。

碱裂解细胞是纯化过程的关键步骤, 碱裂解不当会使超螺旋质粒 DNA 断裂, 开环质粒 DNA 含量增加; 在加入碱裂解液时, 要缓慢搅拌均匀, 否则会导致局部过碱, 造成超螺旋 DNA 的断裂; 随后中和液用量也比较关键, 用量过多, 使溶液偏酸性,

超螺旋质粒 DNA 会发生断裂; 用量过少, 碱裂解液中和不充分, 宿主蛋白、DNA 不能完全沉淀, 后续纯化难度加大。

利用超滤柱对碱裂解液进行浓缩, 泵速和液体在管道内的运动形式是控制超螺旋质粒 DNA 比例的关键。若泵速过高, 流体在管道内易形成湍流, 剪切力较大, 易造成超螺旋质粒 DNA 大量断裂; 适当控制泵速是超滤浓缩的关键, 本工艺控制转速在 15 r/min 以下可以获得超螺旋比例高的质粒 DNA 浓缩液。

Plasmidselect 捕获超螺旋质粒 DNA, 硫酸铵的离子浓度会影响超螺旋和开环质粒 DNA 与 plasmidselect 的结合能力。硫酸铵浓度低于 2.0 mol/L, 则超螺旋和开环质粒 DNA 均不与 plasmidselect 结合; 硫酸铵浓度高于 2.0 mol/L, 则超螺旋与开环质粒 DNA 均与 plasmidselect 结合, 一方面影响填料对超螺旋质粒 DNA 的负载量, 另一方面影响超螺旋质粒 DNA 的比例。

Zhang 等^[2]之前建立的工艺与文中建立的工艺相比, 在同等规模下处理碱裂解液, 使用的层析填料用量多, 生产周期较长。新工艺的建立应用超滤柱对碱裂解液进行浓缩, 缩短生产周期, 降低生产成本; 同时, plasmidselect 对超螺旋质粒 DNA 是特异性吸附, 吸附量可达到 0.4 mg/mL 及以上, 获得的质粒 DNA 超螺旋比例高。通过本试验可知, 选用截留分子量为 300 kDa 的超滤柱可有效地浓缩质粒 DNA。应用于大规模生产时, 浓缩获得高浓度超螺旋质粒 DNA, 可以避免用异丙醇或乙醇沉淀质粒时造成大量质粒损失。

REFERENCES

- [1] Zhang QL, Li MY, Wu ZZ. Research advance of gene therapy for peripheral arterial disease using hepatocyte growth factor. *Chin J Rep Recon Surg*, 2006, 20(11): 1147-1150.
张庆林, 李敏元, 吴祖泽. 肝细胞生长因子基因治疗周围动脉闭塞症研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2006,

- 20(11): 1147–1150.
- [2] Zhang QL, Bi JJ, Xiao FJ, et al. Production of plasmid DNA encoding human hepatocyte growth factor for gene therapy. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 49(Pt 1): 11–16.
- [3] Lu SD. *Current Protocols for Molecular Biology*. Beijing: Higher Education Press, 1993: 571–594.
卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993: 571–594.
- [4] Bi JJ, Zhang QL, Wei HD, et al. Effect of growth medium on the yield of recombinant plasmid pcDNA3-HGF. *Lett Biotech*, 2000, 11(4): 271–274.
毕建进, 张庆林, 魏汉东, 等. 培养基对重组质粒 pcDNA3-HGF 产率的影响. *生物技术通讯*, 2000, 11(4): 271–274.
- [5] Zhang QL, Xiao FJ, Bi JJ, et al. Quality analysis of recombinant plasmid pUDKH. *Lett Biotech*, 2006, 17(5): 733–736.
张庆林, 肖凤君, 毕建进, 等. 重组质粒 pUDKH 的质量分析. *生物技术通讯*, 2006, 17(5): 733–736.
- [6] *Journal of gene medicine*. Vectors used in gene therapy clinical trials [EB/OL]. [2009-12-20]. www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical.
- [7] Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, et al. Production of clinical-grade plasmid DNA for human phase I clinical trials and large animal clinical studies. *Vaccine*, 2007, 25(27): 5013–5024.
- [8] Cano T, Murphy JC, Fox GE, et al. Separation of genomic DNA from plasmid DNA by selective renaturation with immobilized metal affinity capture. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(5): 1472–1477.
- [9] Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA, et al. Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68(5): 576–583.
- [10] Ferreira GNM. Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination. *Chem Engine Technol*, 2005, 28(11): 1285–1294.
- [11] Urthaler J, Buchinger W, Necina R. Improve downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(3):703–711.

本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	生物谷网站	内 页
宝生物工程 (大连) 有限公司	封 二	第 5 届中国工业生物技术发展高峰论坛	内 页
北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司	内 页	镇江东方生物工程公司	内 页
安琪酵母股份有限公司	内 页		