

大肠杆菌发酵生产重组人源抗-HBs Fab

安 峰^{1*} 陈玉川¹ 范列英² 韩焕兴²

¹(中山大学中山医学院法医病理学教研室, 广州 510080)

²(第二军医大学长征医院临床免疫中心, 上海 200003)

摘 要 在 KLF2000 发酵罐中利用补料分批培养技术培养表达含重组质粒 pBAD/HBs Fab 的 TOP10 大肠杆菌, 生产人源抗-HBs Fab, 为批量生产作准备。在发酵过程中, 控制溶氧 30% 以上, 温度 37℃, 在基础培养基内生长 4 h 后, 补加以甘油为碳源的补料, 继续生长到 9 h, 加入阿拉伯糖, 至终浓度为 0.02%, 30℃ 诱导表达 5 h, 收集菌体, 纯化制备目的蛋白。利用 Western blot 方法检测 Fab 抗原性, Dot blot 方法检测生物学活性。14h 发酵结束后, 菌体密度最终达 96g/L, 纯化所得蛋白大约占菌体总蛋白的 6%, 含量为 80mg/L。以重组质粒 pBAD/HBs Fab 大肠杆菌 TOP10 表达生产的人源抗-HBs Fab 为可溶性具生物学活性的蛋白, 与包涵体表达相比避免了变性、复性这一复杂过程, 发酵罐表达比率与摇瓶相比没有降低, 表达量达 80mg/L 左右, 为大批量生产作了准备。

关键词 人源抗-HBs Fab, 分批补料发酵培养

中图分类号 Q554 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0087-05

特异性抗体治疗是最具特异性, 最有应用潜力的治疗手段, 近年来已有近百余种人源化抗体在前期临床或临床试用, 它在多种疾病治疗中发挥着重要作用^[1], 本实验用 pBAD/HBsFab, TOP10 表达系统, 阿拉伯糖诱导表达生产从噬菌体抗体库中筛选出的人源抗-HBs Fab 片段, 与以往 pComb3 载体表达系统, IPTG 诱导表达相比, 非诱导态控制更加严格, 消除了基础表达对宿主菌的生长密度和诱导状态下高表达的影响, 诱导剂价格低廉, 更加适合发酵培养生产蛋白, 同时载体本身带有六组氨酸尾, 所得蛋白易于纯化。此表达系统为周质腔表达, 避免了胞浆表达形成包涵体后复杂的变性复性过程, 直接得到有生物活性的可溶性蛋白, 而且蛋白产量也较大, 我们经过发酵培养金属螯合层析纯化, 得到了 80mg/L 左右的具生物学活性的目的蛋白, 为批量生产打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及质粒 宿主大肠杆菌 TOP10 及 pBAD/gIII A 质粒由第二军医大学长征医院临床免疫中心

提供, 重组质粒 pBAD/HBs Fab 图谱见图 1。它带有氨苄青霉素抗性基因, 以及编码人源抗 HBsAg 抗体重链 Fd 段及 λ 轻链的基因, 分别受两个阿拉伯糖启动子的控制, 在 λ 轻链基因后连有 6 组氨酸尾, 在阿拉伯糖启动子后, 有 g III 信号肽序列, 加入阿拉伯糖后能诱导人抗 HBsAg 抗体重链 Fd 片段及 λ 轻链的表达, 在周质腔内重链 Fd 片段和 λ 轻链由二硫键连接组装成 Fab 片段。

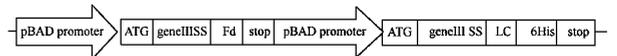


图 1 重组质粒图谱

Fig.1 The scheme for recombinant plasmid

1.1.2 培养基 试管种子培养及二级种子培养均选用 LB 培养基, 含有(g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、NaCl 10。发酵罐中基础培养基为半合成培养基含(g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 10、KH₂PO₄ 2、K₂HPO₄ 4、Na₂HPO₄ 12H₂O 7、(NH₄)₂SO₄ 1.2、NH₄Cl 0.2、MnSO₄ · 5H₂O 0.001、CoCl₂ · 6H₂O 0.004、Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.002、ZnCl₂ 0.002、CuSO₄ · 5H₂O 0.001、H₃BO₃ 0.005、FeSO₄ · 7H₂O 0.02、CaCl₂ · 2H₂O 0.02、MgSO₄ · 7H₂O 0.3、去泡剂 0.2mL/L。补料培养基中含(g/L): 甘油

160、酵母粉 65、蛋白胨 65、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.7。培养基 pH 值全部调至 7.0,并加入氨苄青霉素至终浓度 $100\mu g/mL$ 。

1.1.3 其它试剂、蛋白胨、酵母粉均为 OXIOD 公司产品,阿拉伯糖为 Sigma 公司产品,Ni-NTA-agarose 层析纯化柱为 QIAGEN 公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要发酵设备:瑞士产 KLF2000 发酵系统,含 pH 控制器、溶氧控制器、温度控制器、搅拌控制器、空气混合器及补料进样系统等。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养方法:

培养基的准备:基础培养基组分蛋白胨、酵母粉溶解后,加入发酵罐,121℃ 灭菌 30min,冷却后加入灭菌的 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 、微量元素液和去泡剂 SP1 以及抗生素。补料培养基组分酵母粉和蛋白胨溶解后,121℃ 灭菌 30min,与同样条件灭菌的甘油和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 冷却后混合并加入抗生素。培养基各溶液在灭菌前都用 NaOH 调节到适当的 pH 值。

一级种子培养制备:取 -70℃ 保存菌株,二次划线活化,再转接于 LB 液体培养基中,37℃,225r/min 摇床过夜,作为活化的一级种子。

二级种子培养制备:取一级种子液,以 5% 的接种量转接于 100mL LB 培养基中,37℃,225r/min 震荡 5h,作为接入发酵罐的种液。

发酵罐分批补料培养:按发酵罐工作体积的 5% 接入二级种子液,接种后发酵液体积为 1.5L。分三阶段培养,开始 4h 为菌体在基础发酵培养基中生长,4h 后开始加入补料,继续生长不同时间(3h、4h、5h、6h)后开始进入第三个阶段。第三个阶段为加入阿拉伯糖,温度降至 30℃,在继续补料的情况下诱导表达,在诱导后 1~6h 内间隔 1h 取样测表达率,补料根据溶氧变化反馈补料,在细菌发酵整个过程中,要根据 pH 变化补加 30% 氨水,维持培养体系 pH 值在 6.5~7.0,并调控搅拌速度及空气流量使溶氧不低于 30%,必要时通纯氧。

1.2.2 分析方法:菌体生长情况监测:在发酵过程中每 1/2 h 测定 1 次菌体浓度,用分光光度计在 600nm 波长处测光密度值(OD_{600}),发酵结束后,发酵菌液以 5000r/min,在 4℃ 下离心 30min 称量菌体湿重。

Fab 蛋白初步纯化:将菌体按 1:10(W/V)悬浮

于 PBS 中,于冰水浴中 300~400W 反复超声 15 次,每次 10s,间隔 10s,完全裂解菌体,以 5000r/min,在 4℃ 下离心 30min,取上清用 Ni-NTA-Agarose 金属螯合层析柱进行纯化,经过上柱结合,洗涤,洗脱几个步骤,洗涤液组份:50mmol/L NaH_2PO_4 、300mmol/L NaCl、20 mmol/L imidazole, pH = 8.0。洗脱液组份:50mmol/L NaH_2PO_4 、300mmol/L NaCl、250mmol/L imidazole, pH = 8.0。

Fab 蛋白表达率测定和计算:取纯化所得蛋白以及变性裂解所得的细菌总蛋白,按一定稀释度用 Beckman 公司生产的 Du 640 核酸及蛋白分析仪测定其在 280nm 波长的光密度值,初步估化其纯度及浓度,计算表达率。并作发酵罐和摇瓶以及诱导 1~6h 内蛋白表达量的比较。

Fab 蛋白抗原活性测定:以 HRP-羊抗人 IgG 作为显色抗体作 Western blot,检测 Fab 蛋白抗原性。并作发酵罐和摇瓶所得蛋白表达量以及诱导表达 4h、5h、6h 后蛋白表达量的比较。

Fab 蛋白生物学活性测定:在硝酸纤维素膜上点 HBsAg 抗原,用所纯化的抗体作为一抗,HRP-羊抗人 Fab 抗体作为二抗,作 Dot blot 分析鉴定 Fab 蛋白的抗原结合活性。

2 结 果

2.1 补料培养细菌生长情况

我们分别在细菌生长到 7h、8h、9h、10h 开始诱导表达,发现 7h、8h 开始诱导细菌最终密度较小,9h 开始诱导细菌最终密度已达最大,继续延长开始诱导的时间到 10h,菌体最终密度变化不大,说明 9h 已经到达细菌生长的对数中后期,见表 1。对发酵总时间,补料开始时间,诱导时机及诱导时间进行优化后,发现本方法培养 14h 菌体密度最大可达到 $OD_{600} = 48.3$ 左右,相当于湿菌 96g/L。

表 1 不同的诱导时间和最终菌体密度关系表

Table 1 Relations between induction time and Cell density after cultivation

t/h	7	8	9	10
Cell density/ OD_{600}	16.9	26.8	48.3	48.1

当菌落生长到 4h 后,此时溶氧下降速度明显减慢,这一现象表明,培养基中营养物质已被消耗,细菌生长速度开始下降,故耗氧能力下降,应该开始补

料,为维持 pH = 6.5 ~ 7.0 及溶氧 30% 以上,我们在第 7 小时开始补加 30% 氨水,转速由第 3 小时开始由 300 r/min 上调,到第 6h 达最大转速 700r/min,于第 7 小时空气流量也达到最大,开始通纯氧。在发酵过程中菌体密度变化以及溶氧、转速、pH 值和温度变化见图 2 ~ 6。

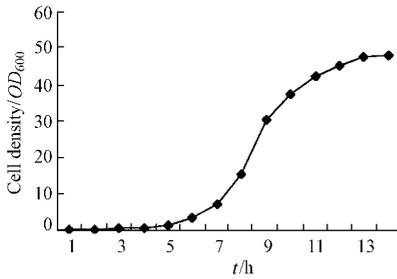


图 2 发酵时间和菌体密度变化关系

Fig.2 The change of cell density with the time of fermentation

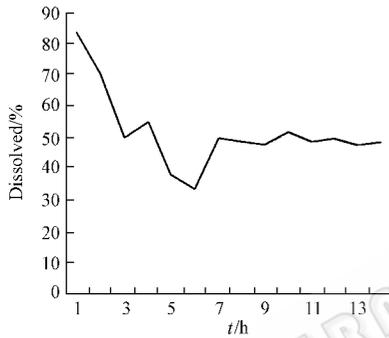


图 3 发酵过程中溶解氧的变化

Fig.3 The change of dissolved oxygen during fed-batch fermentation

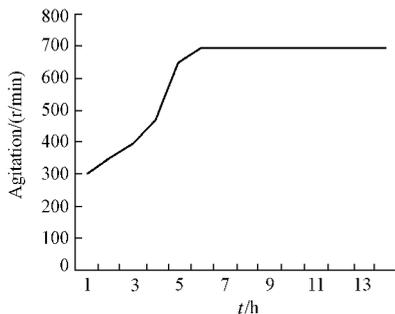


图 4 发酵过程中转速的变化

Fig.4 The change of agitation during fed-batch fermentation

2.2 Fab 蛋白的初步纯化

发酵结束后收获的细菌反复超声 15 次以后,离心取上清,沉淀重复以上操作再得到的上清,Dot blot 分析几乎测不到 Fab 蛋白,所以超声 15 次已经最大限度的获取了目的蛋白。纯化蛋白电泳结果见

图 7。可见 47.5kD 左右的 Fab 蛋白和 25kD 左右部分未组装的轻链蛋白。

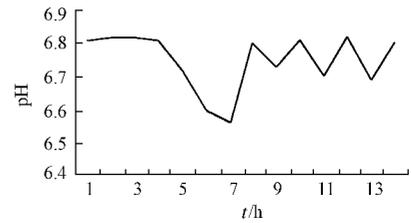


图 5 发酵过程中 pH 值的变化

Fig.5 The change of pH during fed-batch fermentation

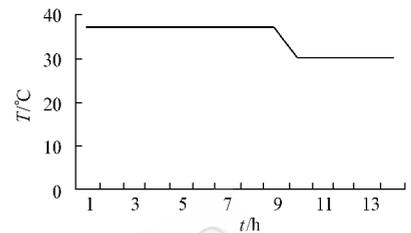


图 6 发酵过程中温度的变化

Fig.6 The change of temperature during fed-batch fermentation

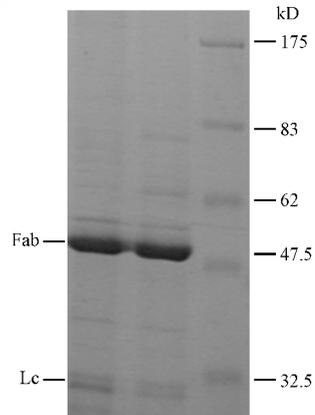


图 7 纯化后人源抗 HBs Fab 蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig.7 The SDS-PAGE analysis of purified human anti-HBs Fab protein

1. Fab expressed in spinner flask ; 2. Fab expressed in fermenter. 3. Marker

2.3 Fab 蛋白的表达率计算

利用 Ni-NTA-Agarose 柱亲和层析纯化上清中的 Fab 蛋白,用 Beckman 公司生产的 Du 640 核酸及蛋白分析仪测定其在 280nm 波长的光密度值计算所纯化蛋白的纯度及浓度,最终获得蛋白得率为 0.83mg/g 湿菌,故发酵后所获蛋白量为 80mg/L 菌液,同样方法测定未纯化之前细菌的总蛋白,计算出 Fab 蛋白占菌体总蛋白比例为 6% 左右,比较发酵罐培养诱导表达 1 ~ 6h 后的蛋白表达率,发现诱导后 2h 为高表达期,诱导后 4 ~ 6h 蛋白变化不大已

度,中等诱导剂浓度和较丰富培养基, pH = 6.5 ~ 7.0,这样可以减少包涵体的形成。基于以上原因,选用 pBAD/gIII A, TOP10 表达系统, pBAD/gIII A 载体含阿拉伯糖启动子,它的调控快速而灵敏,未诱导前表达水平极低,诱导后 1min 就开始表达蛋白,不同浓度的诱导剂诱导作用的差别有明显的梯度,诱导范围较宽^[4]。发酵培养过程中选用半合成培养基。诱导后温度由 37℃ 降为 30℃,诱导剂浓度为 0.02%。

利用 pBAD/gIII A, TOP10 表达系统,翻译出的 Fd 片段与 λ 轻链经周质腔正确折叠组装,借助链内及链间二硫键形成有功能的 Fab 蛋白,经 Ni-NTA-Agarose 柱直接纯化得到可溶性具生物学活性的蛋白,避免了胞浆包涵体形式表达后复杂的变性、复性过程,以及包涵体复性后所得有活性蛋白比例较小的缺点,更加上我们选用发酵培养,提高了菌体重量,进而提高了蛋白产量,为大规模生产作了准备^[5-8]。

Fed-batch Fermentation of *Escherichia coli* That Express Fab Fragment of Anti-HBsAg

AN Feng^{1*} CHEN Yu-Chuan¹ FAN Lie-Ying² HAN Huan-Xing²

¹(Department of Forensic Pathology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

²(Clinical Immunological Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract To develop a fed-batch fermentation process of *E. coli* TOP10 containing a recombinant plasmid pBAD/HBs Fab. Cells were grown in semi-defined medium at 37℃, and the feed operation using glycerol as carbon source was performed when dissolved oxygen increased. When the target cell concentration reached to 64g/L, arabinose was added to a final concentration of 0.02%. Cells were grown for another 5h with the culture temperature decreased from 37℃ to 30℃. In the whole process, cell growth was monitored by measuring OD_{600} of samples taken at 1/2h intervals and the dissolved oxygen was kept above 30%. After the fermentation, *E. coli* pellets were collected for purification of Fab protein. The specificity of Fab protein was confirmed by Western blot, and binding activity to HBsAg was verified by Dot blot. Cell concentration we got is 96g wet bacteria per liter, the Fab protein is about 6% of total protein of the host, that is 80mg per liter. Stable fermentation parameters were obtained for fermentation to improve productivity of the Fab protein. The Fab protein was produced in the form of soluble biologically active protein, it's better than inclusion bodies from which biologically active protein can only be recovered by complicated and costly denaturation and refolding process.

Key words Fed-batch fermentation, human antibody Fab of HBsAg

REFERENCES (参考文献)

- [1] Aair J R. Engineering antibody for therapy. *Immunol Rev*, 1992, **230** : 5 - 40
- [2] James R, Sware Z. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, **12** :195 - 201
- [3] Verma R, Boleti E, George A J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Meth*, 1998, **216** :165 - 181
- [4] Guzman L M, Belin D, Carson M J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriology*, 1995, **177**(14) :4121 - 4130
- [5] Korz D J, Rinas U, Hellmuth K. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1995, **39** :59 - 65
- [6] Sang Yup Lee. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech*, 1996, **14** :98 - 105
- [7] Xie D, Liu D, Zhu H. Multipulse feed strategy for glycerol fed-batch fermentation. *Appl Biochem and Biotechnol*, 2001, **95** :103 - 112
- [8] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbial Biotechnol*, 1999, **51** :422 - 430