

溶氧反馈-分批补料高密度培养人骨形成蛋白-2 工程菌

李 毅 蒲 勤 赵忠良 柴玉波 陈南春 陈苏民*

(中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室,西安 710032)

摘 要 对表达人骨形成蛋白-2 成熟肽的基因工程大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /pDH-B₂m 在 500mL 摇瓶中进行了培养条件的摸索实验,并在此基础上扩大至 NBS Bioflo IV 20L 发酵罐,利用溶氧反馈-分批补料培养技术,在培养过程中保持适当的溶解氧(40%),以溶氧值在线反馈控制搅拌速度及流加补料培养基,使细菌保持适当的比生长率,成功地进行了工程菌的高密度培养,最终菌体密度达 $OD_{600} = 57$,每升干菌量 22.8 g,目的蛋白的表达量占细菌总蛋白的 30%,人骨形成蛋白-2 成熟肽的理论产率达到 3.59 g/L。

关键词 人骨形成蛋白-2,重组大肠杆菌,分批补料,高密度培养

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0718-06

骨形成蛋白-2(Bone morphogenetic protein 2, BMP-2)是一种多功能的形态发生因子,功能涉及骨骼组织和骨骼外许多组织的器官发生和再生及损伤修复^[1,2]。研究发现 BMP-2 除了在骨骼和牙齿的分化发育和损伤修复中起作用,还参与胚胎发育中腹侧和背侧的特化以及造血系统和神经系统的分化发育和损伤修复,在胚胎发育过程中 BMP 能够诱导特定的细胞凋亡参与某些组织或器官的形态发生,BMP-2 诱导细胞凋亡的作用也可发生于某些来源的肿瘤细胞。因而 BMP-2 有着良好的临床应用前景。

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,而人的重组蛋白已成为生物医药中很重要、而且增长速度较快的一部分。本课题组在国内外率先利用大肠杆菌表达了完整的 rhBMP-2 成熟肽,并通过纯化、复性得到了溶解性良好并具有良好活性的重组人骨形成蛋白-2 成熟肽(rhBMP-2m)^[3]。因此,通过高密度发酵技术可以大量制备 rhBMP-2m,提高比生产率,降低生产成本,以满足基础研究及临床应用的需求。

在密度培养条件下,细菌代谢产物的积累会严重影响细菌状态,甚至抑制细菌生长。因此实现细菌高密度培养的关键在于通过保持适当的溶解氧

和限制甘油等营养补料的流加,将细菌的比生长率控制在适当的范围内,尽量降低底物和有害代谢产物对细菌生长和目的产物表达的抑制作用^[4~6]。利用基因重组技术构建的生物工程菌的发酵工艺远不同于传统的发酵工艺,要获得大量的外源基因表达产物,要充分考虑宿主、载体和外源基因三者之间相互关系以及工程菌的生长状态^[7,8],需要对影响外源基因表达的多种因素进行分析,即对培养基、补料基质、补料方式和诱导时机等因素进行优化,探索出一套适合于外源基因高效表达的发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 温度诱导型工程菌 *E. coli* DH5 α /pDH-B₂m 为本室构建并保存^[3],重组表达质粒 pDH-B₂m 带有氨苄青霉素抗性基因,编码人骨形成蛋白-2 成熟肽基因受控于 P_L 启动子,在 42℃ 下能诱导表达 13kD 的人骨形成蛋白-2 成熟肽工程菌,在试管培养中 rhBMP-2 成熟肽的表达量为细菌总蛋白的 30%~40%。

1.1.2 培养基 LB 培养基^[9]用于试管种子菌的培养,半合成培养基^[10]用于发酵罐补料分批培养,每

收稿日期 2002-06-10,修回日期 2002-08-27。

基金项目 全军医药卫生科研基金重点课题(No.912004 913010 96x045)国家重点科技攻关项目(No.85-722-01-08)。

* 通讯作者, Tel 86-29-3376799; Fax 86-29-3374513; E-mail: chensm@fmmu.edu.cn

升含 :蛋白胨 5g ,甘油 5mL ,十二水磷酸氢二钠 6g ,磷酸二氢钾 1.5g ,硫酸铵 1.5g ,氯化铵 1g ,七水合硫酸镁 0.25g ,氯化钙 0.02g ,硫酸亚铁 0.04g ,甘氨酸 0.5g。每升补料培养基含 :甘油 120mL ,蛋白胨 50g ,酵母抽提物 50g ,七水合硫酸镁 2g。除特殊说明 ,培养基的 pH 值全部调为 7.0。培养基、补料和微量元素溶液高压灭菌后使用 ,除发酵培养基和补料培养基外 ,各种培养基使用前加入氨苄青霉素至终浓度 100μg/mL。

1.2 条件优化

1.2.1 培养基的筛选 :A. LB 培养基 ,B. M9 培养基^[9] ,C. M9CA 培养基^[9] ,D. 1.1.2 中的发酵培养基 2% 接种 30℃ 培养 3h 后 42℃ 诱导表达 4h ,测定工程菌在不同培养基中的人 BMP-2 成熟肽表达量和细菌密度。

1.2.2 pH 值优化 :A. 对工程菌生长的影响 :将 LB 培养基的 pH 分别调成 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。2% 接种 30℃ ,200r/min 培养 ,2h 调整一次 pH ,测定工程菌在不同 pH 值下的生长曲线。B. 对人 BMP-2 成熟肽表达的影响 :2% 接种 ,30℃ 培养 3h 后将 pH 分别调整为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 ,42℃ 诱导表达 4h ,其间每 1 个 h 调整一次 pH ;测定工程菌于诱导期间在不同培养 pH 下的人 BMP-2 成熟肽表达量和细菌密度。

1.2.3 碳源浓度优化 :在摇瓶 LB 培养基中分别加入 0.5、10、15、20mL/L 甘油。其他培养及检测方法同 1.2.2(不涉及 pH 的调整)。

1.2.4 诱导时间优化 :42℃ 诱导过后 ,每隔 1h 取样一次 ,直至诱导 7h。分析目的蛋白表达占菌体总蛋白的比率。

1.3 细菌的培养方法

1.3.1 种子菌活化 :取 -70℃ 保存菌种 100μL 接种于 5mL LB 培养基中 ,30℃ ,200r/min 培养 12h。

1.3.2 种子菌的摇瓶扩大培养 :取活化种子菌 ,按 2% 接种量接种于 400mL LB 培养基中。30℃ ,200r/min 培养 8h 左右。

1.3.3 溶氧反馈 - 分批补料高密度发酵 :将 400mL 发酵种子菌接种入 8L 发酵培养基中 ,利用 NBS Bioflo IV20L 发酵罐进行高密度发酵 ,以 AFS-BioCommand Bioprocessing Software(Version 2.61)软件对其进行数据采集(每 30s 采集数据 1 次)和实现计算机在线控制 ,全过程共 20h。

主要参数 :

温度 :生长阶段温度控制在 30℃ ,16h 后采用一

步法迅速升温至 42℃ 诱导表达 4h。

pH 值 :自动流加分析纯氨水 ,将 pH 始终控制在 7.0 或以上一点。

溶解氧 :空气流量设定为 12L/min。溶解氧在整个发酵过程中控制在 40%。

搅拌速度 :设定搅拌速度下限为 200r/min ,上限为 1000r/min。生长过程中溶氧反馈控制当溶氧低于设定值时通过计算机由 AFS-BioCommand Bioprocessing Software(Version 2.61)软件控制每分钟增长 4 转。诱导过后 ,搅拌速度改为由 NBS Bioflo IV 发酵罐直接溶氧反馈控制。

补料流加 :补料泵的运转直接由当前溶氧值实施反馈控制。在前 16h 生长阶段 ,当溶氧率在 3 min 内持续高于 60% 时补料泵以 5% 的速率进行补加营养。诱导阶段当溶氧值在 3 min 内持续高于 50% 时补料泵以 100% 的速率进行补加营养 1min。

1.4 检测和分析方法

1.4.1 菌体密度及重量 :分光光度计测定 OD_{600} 值 ,菌液对 600nm 光吸收与细菌密度成正比 ,1 $OD_{600} \approx 0.4g/L$ 干菌 ,1g 湿菌约合 0.2g 干菌。

1.4.2 目的蛋白表达量测定 :全菌样品进行还原型 SDS-PAGE 分析 ,考马斯亮蓝 R-250 染色 ,薄层扫描分析判定目的蛋白占菌体总蛋白的百分率。

1.4.3 蛋白理论产量计算 :rhBMP-2 的理论产量 = $OD_{600} \times 0.4g(干菌体)/L \times 0.525g(蛋白)/g(干菌) \times 表达量(%)$ 。

1.4.4 发酵过程中工程菌的稳定性分析 :在发酵的最后阶段取菌液进行 10^9 稀释 ,取 120μL 铺没有氨苄青霉素的 LB 平板 ,30℃ 培养 20h 后 ,从生长的克隆中随机挑取 100 个克隆转接到含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上 ,30℃ 培养 20h ,计算克隆长出的比例 ,随机挑取 8 个克隆接种到不含氨苄青霉素的 LB 培养基中 ,提取质粒进行酶切鉴定 ,转接诱导测定人 BMP-2 成熟肽的表达量。

2 结 果

2.1 发酵培养基的筛选

将工程菌接种于 A、B、C、D 培养基中诱导表达 ,结果(见图 1)表明 ,四种培养基均适合于 *E. coli* DH5α/pDH-B₂m 的高效表达 ,最后的细菌密度则是半合成培养 D 基最高 ,所以我们选取半合成培养基 D 为发酵用培养基。

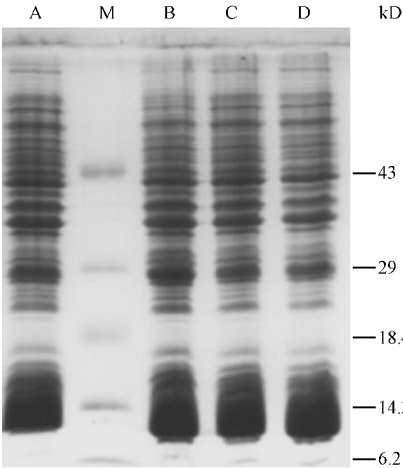


图 1 不同发酵培养基对工程菌表达的影响

Fig.1 Effect of various medias on the expression of rhBMP-2m

A. LB ; M. Marker ; B. M9 ; C. M9CV ; D. Semi-defined media

2.2 培养基 pH 值对工程菌生长和表达的影响

培养基 pH 值对工程菌生长和表达的影响(见表 1、表 2 和图 2) ,结果显示 pH6.5 ~ 7.0 不但是工程菌的最佳生长 pH ,也是工程菌高效表达目的蛋白的最佳 pH。

表 1 培养基 pH 值对工程菌生长的影响

Table 1 Effect of media pH on the growth of *E. coli* DH5 α /pDH-B₂m

pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
OD ₆₀₀					
0h	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
2h	1.21	1.25	1.29	1.14	0.87
4h	2.23	2.38	2.46	2.16	1.54
6h	3.42	3.76	3.65	3.16	2.60
8h	4.51	4.78	4.52	4.02	3.34
10h	4.63	5.01	4.82	3.92	3.34

表 2 培养基 pH 值对工程菌表达 rhBMP-2m 的影响

Table 2 Effect of media pH on the expression of rhBMP-2m

PH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
OD ₆₀₀	1.72	3.87	3.34	2.18	2.06
The expression of rhBMP-2m(%)	5	30	35	15	15

2.3 甘油浓度对工程菌生长和表达的影响

在 LB 培养基中加入不同浓度的甘油 ,由于消耗甘油产酸 ,2h 后 pH 值下降到 6.8 ~ 6.0 不等 ,每隔 2h 加入不等量的氨水调节 pH 至 7.0。实验表明当甘油的浓度高到 20mL/L 时 ,最终菌体密度有所下降 ,hBMP-2m 的表达量也随之下降(见表 3 和图 3) ,

因此限制性流加甘油 ,始终保持培养液中较低的碳源 ,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。

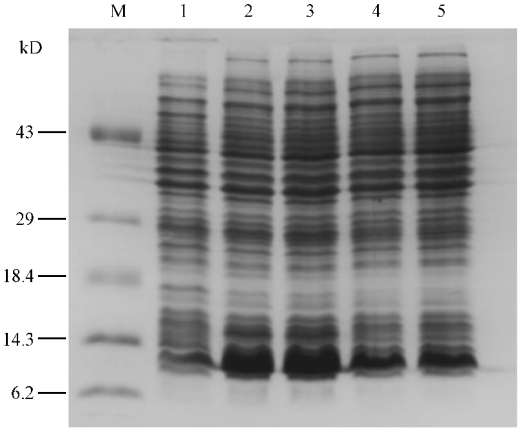


图 2 培养基 pH 值对工程菌表达 rhBMP-2m 的影响

Fig.2 Effect of media pH on the expression of rhBMP-2m

M. Marker ; 1. pH6.0 ; 2. pH6.5 ; 3. pH7.0 ; 4. pH7.5 ; 5. pH8

表 3 甘油浓度对工程菌生长和表达的影响

Table 3 Effect of various initial glycerol concentrations on the expression of rhBMP-2m and the growth of the recombinant *Escherichia coli*

Initial glycerol concentration (g/L)	Final pH	Initial cell density (OD ₆₀₀)	Final cell density (OD ₆₀₀)	The expression of rhBMP-2m/ %	The yield of rhBMP-2m (g/L)
0	6.8	0.16	2.68	38	0.24
5	6.5	0.16	3.87	35	0.30
10	6.3	0.16	3.51	30	0.32
15	6.2	0.16	3.46	30	0.32
20	6.0	0.16	3.29	30	0.32

2.4 诱导时间长度的选择

不同的外源基因具有不同的诱导表达规律 ,了解合理的诱导表达培养时间也很关键。取种子菌 4% 接种 LB 培养基 30℃ 培养 3h 后 42℃ 诱导 ,分别于诱导后 1、2、3、4、5、6 和 7h 取样 ,作 SDS-PAGE 凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色 ,比较不同诱导时间蛋白表达情况发现 ,13kD 蛋白在 42℃ 诱导 1 h 后即有相当的表达 ,诱导后 3 h 表达量趋于稳定 ,诱导时间再延长仅引起细菌密度的缓慢增加 ,4 h 后细菌基本上便停止生长 ,所以诱导表达的时间应控制在 4 h 左右。

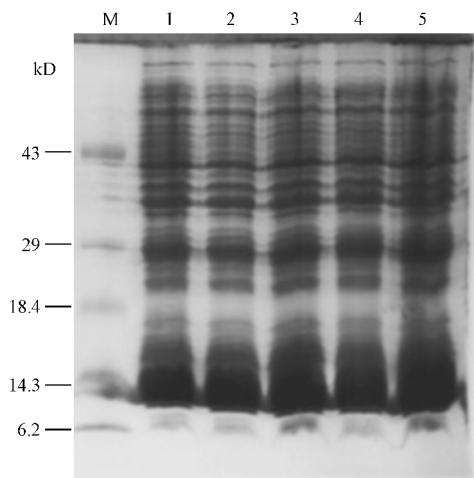


图 3 甘油浓度对工程菌表达 rhBMP-2m 的影响

Fig.3 Effect of various initial glycerol concentration on the expression of rhBMP-2m

M. Marker ; 1. 0%glycerol 2. 5%glycerol ; 3. 10%glycerol ; 4. 15%glycerol ; 5. 20%glycerol

2.5 *E. coli* DH5α/pDH-B2m 工程菌的高密度发酵

利用培养基中营养物质消耗殆尽时 ,细菌的有氧代谢迅速减缓 ,导致培养液中溶解氧迅速持续升高 ,加入营养物质后溶解氧又会迅速下降的原理 ,通过溶氧反馈控制搅拌转速和营养成分的限制性补加 ,使培养基中的营养物质保持在相对较低的浓度 ,控制合适的比生长率和工程菌良好的生长状态 ,减少有害副产物的生成和积累。基于上述原理进行的 rhBMP-2m 工程菌的溶氧反馈调节-限制性补料高密度发酵 ,发酵过程中发酵液的 pH 控制在 7.0 ,30℃ 生长 16h ,42℃ 诱导表达 4h ,最终菌体密度达到了 $OD_{600} = 57$,rhBMP-2m 的表达量达细菌总蛋白的 30%(见图 4) ,hBMP-2m 的理论产量为 3.59g/L ;整个发酵过程中比生长率稳定在 0.35 ~ 0.21 之间 ,溶氧值稳定于 40% 上下波动 ,诱导后 1h rhBMP-2m 的表达量就达到 20% ,第 3h 就基本上达到最大表达量 30%(见图 5)。诱导后细菌的生长状态受到很大的影响 ,能量转向外源蛋白的表达 ,使本处于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。在溶氧反馈补料控制过程中甘油的浓度保持在每升 1.5mL 以内 ,整个过程中甘油消耗比较完全 ,菌体对甘油的转换效率达到 1.06g 干菌/mL 甘油。

2.6 工程菌稳定性检测

高密度发酵的成功与否 ,发酵过程中工程菌的稳定性起着关键的作用。在本实验中发酵的最后阶

段 ,取发酵液稀释 10^9 倍后铺 LB 平板 ,长出约 300 个克隆 ,从该平板上随机挑 100 个克隆分别转接到含氨苄 LB 平板上培养 ,所有克隆全部长出 ,重组质粒的分离稳定性为 100% ;从中随机挑出 8 个进行诱导 ,SDS-PAGE 显示这 8 个克隆都表达 13kD 重组蛋白 ,而且表达水平与种子菌一致(见图 6A)。随机挑取 8 个克隆提取质粒 ,用 *Afl* II + *Hind* III 进行限制酶酶切鉴定 (见图 6B) ,从这 8 个克隆的质粒上都切下了 350 bp 的片段 ,说明重组质粒的结构稳定性非常好 ,没有发生重排和目的基因的重组丢失。这些结果都说明 ,本研究所使用的高密度发酵从培养基到补料方法都不存在对工程菌的稳定性有负面影响的因素。

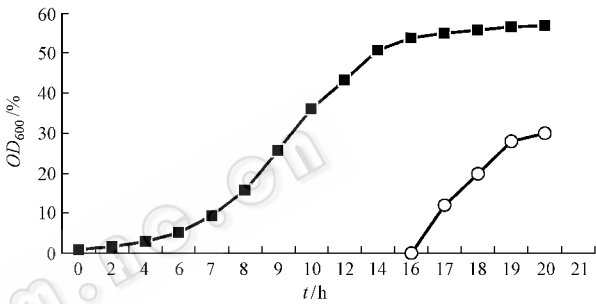


图 4 高密度发酵过程中工程菌的生长和 rhBMP-2m 表达的时间曲线

Fig.4 The time curve of the growth of the recombinant bacteria and the expression of rhBMP-2m after the recombinant bacteria been induced during the high density fermentation

■ :Cell density ; ○ :The expression of rhBMP-2 amounts of the total protein

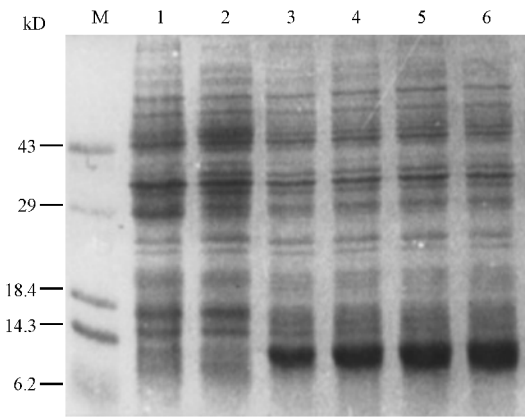


图 5 高密度发酵过程中的 rhBMP-2m 诱导表达

Fig.5 The expression of rhBMP-2m after the recombinant bacteria been induced during the high density fermentation

M. Marker ; 1 2. Non-induced ;

3 ~ 6. rhBMP-2m expression after induction 1 ~ 4

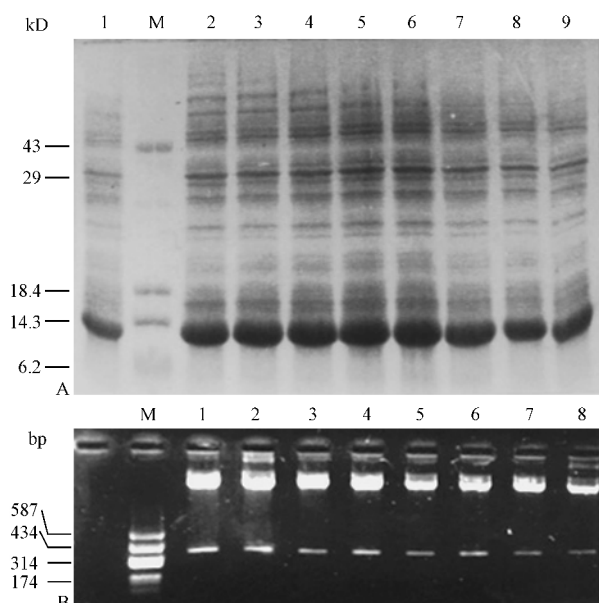


图 6 高密度发酵过程中工程菌的稳定性

Fig.6 The stability of *E. coli* DH5α/pDH-B2m during the high-density fermentation

A: The stability of the expression of rhBMP-2m

1. Seed M. Marker 2~9. 8 random selected clones

B: The stability of the plasmid pDH-B2m

M. Marker; 1~8. Plasmids from the 8 random selected clones digested with *Afl*II + *Hind*III

3 讨 论

重组大肠杆菌的发酵工艺不同于传统的发酵工艺,在发酵过程中不仅要提供工程菌保持良好生长状态所需要的组成成分合理配比的培养基^[11]、最佳的生长 pH 和溶解氧浓度^[12],还要确保这些条件有利于工程菌的稳定性即每个细菌都有较高的正确的表达载体的拷贝数^[7,10,13];在诱导表达阶段不仅需要及时提供相对更为丰富的营养成分用于维持生长分裂和表达外源蛋白^[14],同时还需要提供更有利于外源基因表达的发酵液的 pH 和溶解氧环境,当然工程菌的稳定性同样非常重要。一个发酵工艺只有在给重组大肠杆菌提供了以上生长和表达环境后,才有可能获得尽可能高的细菌密度和外源目的蛋白表达量。

本研究探索了有利于工程菌 *E. coli* DH5α/pDH-B2m 生长和表达的关键参数,选择了有利于高密度培养的发酵培养基,将发酵液控制在有利于工程菌生长和表达的 pH 值附近,而且采用了溶氧反馈调节-限制性补料的方法,合理地控制了生长和诱导表达过程中溶解氧的量以及较为合适的碳、氮源和无

机盐的供给,因此,有效地降低了有害物质的积累,保持了工程菌的稳定性,在整个高密度培养过程中,有着较为理想的比生长率,最终目的蛋白的表达产量大约占细菌总蛋白的 30%~35%,与小量试管诱导的蛋白表达量相近。

该发酵工艺有一定程度的通用性,利用类似的工艺已先后成功地进行了不下 5 种工程菌的高密度培养,不仅适用于温度诱导表达型工程菌,同样也适用于化学诱导型的工程菌。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kingsley D M. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet*, 1994, **10**: 16~20
- [2] Riley E H, Lane J M, Urist M R *et al.* Bone morphogenetic protein-2: Biology and Application. *Clin Orthop and Related Res*, 1996, **324**: 39~44
- [3] Pu Q(蒲勤), Chen N C(陈南春), Chen S M(陈苏民). Expression of mature peptide of human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli*. *J Med Coll PLA*, 1998, **13**(1): 40~43
- [4] Yee L, Blanch H W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1992, **10**(12): 1550~1556
- [5] Kleman G L, Strohl W R. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(11): 3952~3958
- [6] El-Mansi E M, Holmes W H. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2875~2883
- [7] Corchero J L, Villaverde D. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant culture is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(60): 625~632
- [8] Jacques N, Guillerez J, Dreyfus M. Culture conditions differentially affect the translation of individual *Escherichia coli* mRNA. *J Mol Biol*, 1992, **226**: 597~608
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989
- [10] Mizutani S, Mori H, Shimizu *et al.* Effect of amino acid supplement on cell yield and gene product in *Escherichia coli* harboring plasmid. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **28**: 203~211
- [11] Yee L, Banch H W. Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **41**: 221~230
- [12] Khosla C, Curtis J E, DeModena J, Rinas U, Bailey J E. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio/technology*, 1990, **8**(9): 849~853
- [13] Cheng C Y, Huang Y L, Yang S T. A novel feeding strategy for enhanced plasmid stability and protein production in recombinant yeast fed-batch fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56**(1): 23~31
- [14] Wong H H, Kim Y C, Lee S Y *et al.* Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **60**(3): 271~276

High Density Fed-Batch Culture of *Escherichia coli* DH5 α /pDH-B₂m with DO Feed-back Control of Nutrient Feeding

LI Yi PU Qin ZHAO Zhong-Liang CHAI Yu-Bo CHEN Nan-Chun CHEN Su-Min

(Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Forth Military Medical University , Xi 'an 710032 ,China)

Abstract Optimization of cultivation condition of recombinant *E. coli* DH5 α /pDH-B₂m and the condition suitable for expression of recombinant mature peptide of human bone morphogenetic protein-2 was carried out in 500mL shaking flasks and then transferred to NBS Bioflo IV , a 20L DO feed-back fed-batch culture system , to obtain rhBMP-2. The results indicate that keeping dissolved oxygen at 40% and controlling nutrient feeding rate with DO feed back strategy can obtain theoretically 3.59g recombinant mature peptide of hBMP-2 per liter of broth , the final cell density OD_{600} reaches 57(22.8g dry cell weight/L) , and the expression of rhBMP-2 amounts to 30% of the total protein in *E. coli* .

Key words human bone morphogenetic protein-2 , recombinant *E. coli* , fed-batch , high density cultivation

Received : 06-10-2002

This work was supported by Grants from Key Program of Medicine R&D fund of PLA(No. 912004 ,913010 ,96z045) and Key Technologies R&D Programme of China(No.87-722-01-08) .

* Corresponding author. Tel 86-29-3376799 ; Fax 86-29-3374513 ; E-mail : chenmin@fmmu.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>