

# 高密度培养大肠杆菌 YK537/pSBHL-11 生产重组人细胞白介素-3

李 民 杨立宏 任红玉 高 冕 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 在 B. Braun ES-10 型 15L 和 NBS BioFlo 3000 型 5L 发酵罐中,利用补料分批培养技术高密度表达培养含重组质粒 pSBHL-11 的大肠杆菌 YK537,生产重组人白细胞介素-3(IL-3),发现在发酵过程中,限制性流加甘油,控制溶解氧在 30%~40%左右,30℃ 生长 11h,42℃ 诱导培养 4h,能将发酵液中最终菌体密度从  $OD_{16,600}$  提高到  $OD_{53,600}$ (相当于每升发酵液含 106 克湿菌体),并且保持了白细胞介素-3 的表达量,占菌体总蛋白的 30%左右,含量超过 3.3%g/L,使 IL-3 包涵体产量从湿重 2.2g/L 提高到 8.5 g/L,纯化步骤比较简单,超声破菌后经两次洗涤纯度就达到 70%以上。

**关键词** 白细胞介素-3(IL-3),分批补料,高密度培养,包涵体,纯化

**分类号** TQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0470-76

人白细胞介素-3(Human Interleukin 3, hIL-3)是一种对多种造血细胞的发育、分化都具有调节作用,并参与机体调节的细胞因子<sup>[1]</sup>,因而具有较好的临床应用前景和巨大经济效益潜力。我国马大龙等人采用融合表达的方式在大肠杆菌中高效表达了人白细胞介素-3<sup>[2]</sup>,并已进入了临床应用阶段。我们在前文中曾经报道了人白介素-3 在大肠杆菌中直接表达的结果<sup>[3]</sup>,其表达量可达菌体总蛋白的 30%。在此基础上,我们对所构建的表达工程菌 YK537/pSBHL-11 在 B. Braun ES-10 型 15L 和 NBS BioFlo 3000 型 5L 自动控制发酵罐中进行了高密度发酵工艺的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 宿主大肠杆菌 *E. coli* YK537(*supE44 hsdR hsdM recA1 phoA8 leuB6 thi lac Y rpsL20 galK2 ara-14 xyl-5 mth-1*)由中科院典型培养物保藏委员会基因库保藏。重组质粒 pSBHL-11 由本实验室构建<sup>[3]</sup>。它带有氨苄青霉素抗性基因和编码人白细胞介素-3 的基因,受  $\lambda$ PL 启动子的控制,在 42℃ 下能诱导人白细胞介素-3 的表达。用该质粒转化<sup>[4]</sup>宿主菌 YK537 得到表达人白细胞介素-3 的工程菌株 *E. coli* YK537/pSBHL-11,试管培养中人白细胞介素-3 的表达量为菌体总蛋白的 30%。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基用作试管种子培养,2-YT 培养基用作二级种子培养,半合成培养基用于发酵罐中补料分批培养。LB 培养基中含有(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 5;

2-YT 培养基含有(g/L): 蛋白胨 16, 酵母粉 10, NaCl 5; 半合成发酵培养基中含有(g/L): Polypepton 5, Yeast extract 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  7,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.2, 和微量元素溶液<sup>[4]</sup>, 该溶液中含有(g/L):  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.004,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002,  $\text{ZnCl}_2$  0.002,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.0005,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3; 补料基质中有(g/L): 甘油 170, 酵母粉 71, 蛋白胨 71,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.7。培养基的 pH 值全部调为 7.0。各种培养基中都加入经微孔虑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 菌种的制备(一级种子):** 发酵菌种要用新近转化和鉴定的菌株。质粒 DNA 的提取、纯化, 感受态细胞的制备以及质粒转化、单菌落挑选等操作参照文献[5]。菌种在 LB 试管中转接培养过夜作为活化的一级种子。

**1.2.2 三角摇瓶培养(二级种子制备):** 取一级种子, 以 4% 接种量接入到含 100mL 2-YT 培养基的 500mL 摇瓶中,  $30^\circ\text{C}$ , 220r/min 培养 6h, 作为 15L 和 5L 发酵罐的菌种。摇瓶培养过程中自然 pH 值。

**1.2.3 15L 发酵罐中分批补料培养:** 按 B. Braun ES-10 发酵罐工作体积的 4% 接入二级种子, 培养分两个阶段进行,  $30^\circ\text{C}$  培养为菌体生长阶段, 培养时间分别为 3~7h 不等, 随后  $42^\circ\text{C}$  培养为诱导表达阶段, 培养 5h。

分批补料方式: 参照常规的补料方法并结合基因工程菌发酵的实际经验经优化改进后进行。细菌接种培养 2h 后, 每隔 1h 补加约 170mL 的补料基质, 诱导后增大为 220mL。

自动流加 30% 的氨水保持 pH 值在 7.0 左右; 手动调节增大空气流量和转速, 使溶解氧不低于 50%。

**1.2.4 5L 自控发酵罐中分批补料培养:** 取二级种子, 按 BioFlo 3000 发酵罐工作体积的 4% 接种(罐中的起始工作体积为 2.5L)。该系统由微机自动控制, 条件优化后的几个关键参数控制如下: (1) 溶氧及转速: 空气流速 7L/min。最低搅拌转速为 200r/min, 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, 自动通入纯氧, 溶氧值保持在 30% 左右。(2) pH 值: 自动流加 30% 的氨水, 使 pH 保持在 7.0 左右。(3) 温度:  $30^\circ\text{C}$  培养 11h, 然后  $42^\circ\text{C}$  诱导培养 4~5h。(4) 补料的流加: 流加补料分 3 个阶段进行, 发酵过程中 0~4h 不加补料, 4~10h 补加进去含 50g 甘油的补料, 10~15h 加入含 70g 甘油的补料。以上数据由微机每 30s 自动收集、记录一次。

## 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在 600nm 波长处测光密度值( $OD_{600}$ )。发酵菌液经 5 000r/min 离心 30min, 称菌体湿重。菌体干重测定如下, 取不同  $OD_{600}$  的菌液 10mL, 5000r/min 离心 15min, 清洗两次,  $105^\circ\text{C}$  烘干至恒定值, 称细胞干重, 光密度值与细胞干重呈线性。一个单位的  $OD_{600}$  约为干菌 0.40g/L, 而 1g 湿菌相当于 0.2g 干菌体。

**1.3.2 IL-3 包涵体的初步纯化:** 将离心得到的菌体按 1:10 (W/V) 悬浮于 STE 中 (20mmol/L Tris-HCl pH8.5, 1mmol/L EDTA, 0.3mol/L 蔗糖), 于  $0^\circ\text{C}$  冰浴中反复超声 15 次, 每次 90s, 每次间隔 3.5 min, 10 000r/min 离心 12min, 收集包涵体; 将包涵体按 1:20

(W/V)悬浮于洗涤液中(20mmol/L Tris-HCl pH8.5, 1mmol/L EDTA, 0.2% Triton X-100)于冰浴中超声 10 次,充分破碎洗涤,每次 60s,每次间隔 3.5min,离心,得包涵体;将包涵体悬浮在 TE 中(20mmol/L Tris-HCl pH8.5, 1mmol/L EDTA)超声洗涤 10 次,离心收集包涵体。

**1.3.3 IL-3 表达量的测定:**取相当于 0.6 $OD_{600}$ 的菌液 1mL 5000r/min 离心 5min,弃上清,沉淀悬液在 20 $\mu$ L 去离子水中,再加入 20 $\mu$ L 2 $\times$ SDS 上样缓冲液,混匀后煮沸 10min,10 000r/min 离心 10min,取 10 $\mu$ L 的上清走 SDS-PAGE 凝胶电泳(Mini-PROTEAN, Bio-Rad, U.S.A.)。凝胶经染色液(考马斯亮蓝 0.25%, 乙酸 10%, 乙醇 12%)染色 30min,脱色(脱色液:10%乙酸, 12%乙醇)4h 后,就可见清晰的蛋白条带,再由激光灰度扫描仪(LKBUV-XL)测出 IL-3 占菌体总蛋白的百分含量。

**1.3.4 菌体总蛋白和包涵体蛋白总量的测定:**Bradford 法测蛋白浓度<sup>[6]</sup>。取菌液 10mL,5 000r/min 离心 15min 得菌体,清洗两次,超声 10 次,每次 60s,破菌后,取样按 Bradford 标准方法测蛋白含量。最终平均值为每克干菌体相当于 0.525 克蛋白质。将包涵体溶解在 8mol/L 尿素中后,按同样方法测蛋白含量,算出包涵体的总蛋白量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 补料分批培养

在 B. Braun ES-10 型发酵罐中,按常规分批补料方式, YK537/pSBHL-11 在 30 $^{\circ}$ C 生长不同时间的结果(表 1)显示,细菌处于对数生长中期或中后期 IL-3 的产率最高,菌体密度为  $OD_{600}$ 16.42, IL-3 含量为 0.896g/L。42 $^{\circ}$ C 持续诱导培养结果表明,第 4h 就达到 IL-3 的最大表达量 28%,并且菌体也不再增加,此后细菌开始自溶,密度有下降的趋势,因此在 B. Braun ES-10 型发酵罐中的发酵工艺应是在细菌对数生长中后期开始诱导,4h 后诱导结束。

表 1 B. Braun ES-10 型发酵罐中 30 $^{\circ}$ C 培养时间对 IL-3 产量的影响

Table 1 Effects of culture time in 30 $^{\circ}$ C on the yield of IL-3 in B. Braun ES-10 type fermentor

$t/h^{(a)}$	3	4	5	6	7
Cell density/ $OD_{600}^{(b)}$	11.2	13.20	16.42	20.30	24.40
Expression of IL-3/% <sup>(c)</sup>	28	28	26	20	16
Contents of IL-3/(g $\cdot$ L $^{-1}$ ) <sup>(d)</sup>	0.659	0.813	0.896	0.852	0.820

(a) 各数字表示在 30 $^{\circ}$ C 培养的时间;(b) 30 $^{\circ}$ C 培养一定时间后,42 $^{\circ}$ C 诱导培养 4h 后的最终密度;(c)42 $^{\circ}$ C 诱导 4h 后 IL-3 的表达量;(d)含量计算: $OD_{600} \times 0.4g/L$  干菌体  $\times$  0.525g 蛋白/g 干菌  $\times$  表达量/%

利用该培养方法,我们能得到稳定的发酵结果,菌体密度达到  $OD_{600}$  16~18, IL-3 的表达量为 28% 左右,表达产物为包涵体,破菌后经初步纯化可得纯度在 70% 以上的包涵体湿重 2.2~2.4g/L,基本可满足 IL-3 工业化生产的需要。图 1、图 2 分别是成熟工艺的发酵在线控制图和细菌生长曲线及 IL-3 诱导表达曲线。

为了进一步提高 IL-3 发酵的比生产率,我们曾通过增加培养时间、提高培养基中氮源物质浓度等方法,使菌体密度增大到  $OD_{600}$  25 左右,但表达量明显降低,只有 16% 左

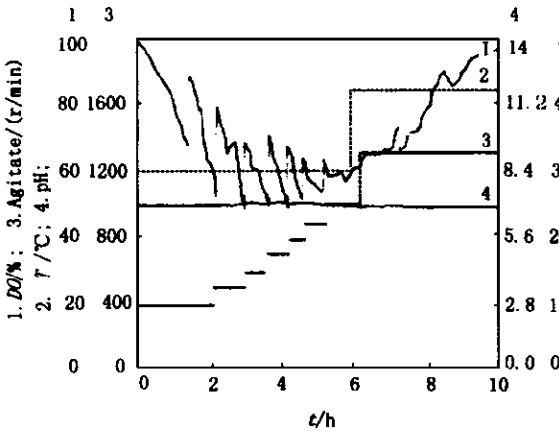


图 1 B. Braun ES-10 型发酵罐中补料分批培养的在线控制图

Fig.1 The on-line controlling during fed-batch culture in B. Braun ES-10 type fermentor

1. Dissolved oxygen/%; 2. Temperature/°C; 3. Agitate/(r. min<sup>-1</sup>); 4. pH

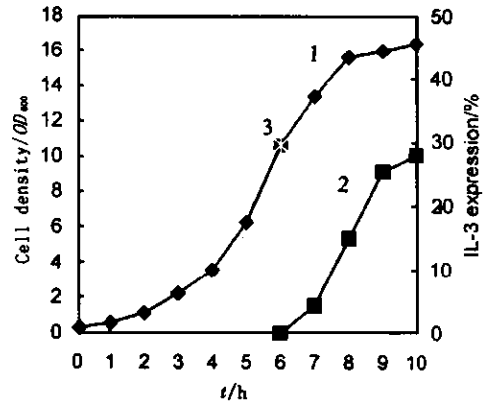


图 2 B. Braun ES-10 型发酵罐中细菌生长曲线和 IL-3 诱导表达曲线

Fig.2 Bacteria growth and IL-3 expression during B. Braun ES-10 fermentation

1. Cell density/OD<sub>600</sub>; 2. Expression of IL-3/%; 3. Thermal induction

右, IL-3 的产量反而下降(见表 1)。分析其中的原因可能是由于每次补料时营养物质特别是甘油的量补加过多,在这种通气培养方式下,微生物会将过盛的碳源转化为不完全氧化的有害代谢副产物,特别是乙酸会过量积累,造成细菌代谢的“酸苹果树效应”(Crabtree effect),抑制细菌的生长<sup>[7,8]</sup>,同时也会降低外源蛋白的表达<sup>[9,10]</sup>,因此我们推测改进补料的流加方式减少培养基中碳源浓度,降低乙酸的比生成率,可大大缓解抑制效应,实现更高密度和外源蛋白高效表达的培养。于是我们改用自动化程度更高、更易控制的 NBS BioFlo 3000 型 5L 自控罐来实现这一目的。

### 2.2 5L 发酵罐中补料分批培养的条件优化实验

为了确定在 NBS BioFlo 3000 型发酵罐中的发酵总时间、补料的开始时间、料液的补加速度以及诱导的起始时间,我们进行了在 NBS 发酵罐中培养条件的摸索实验,整个培养过程都在 30°C 条件下进行,共 17h (图 3)。为保持培养基中的甘油始终处于较低浓度,必须限制性流加补料,实验中发现当补料流速过低,会使细菌生长极为缓慢,但流速超过 72mL/h 时,

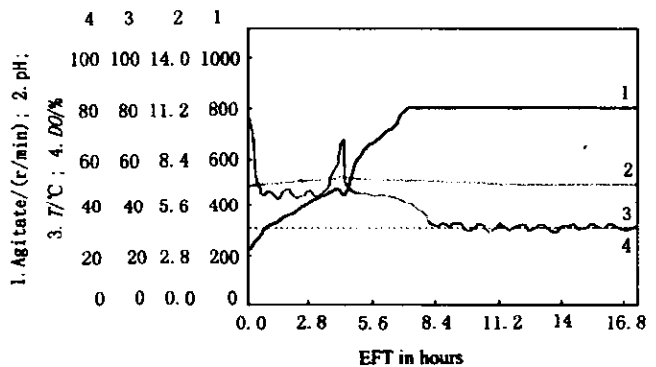


图 3 NBS BioFlo 3000 型自控发酵罐中 YK537/pSBHL-11 条件优化培养的计算机在线控制图

Fig.3 The on-line controlling of optimizing culture of YK537/pSBHL-11 in NBS BioFlo 3000 type fermentor

培养的后期细菌生长受到抑制,发酵 15h 菌体密度也仅有  $OD_{600}30$ ,因此我们选用补料的流加速度在 48mL/h 左右。(考虑到诱导后,细菌对营养物质的需求增加,所以诱导阶段流加速度增加到 72mL/h 左右。),见图 3。发酵开始的培养基中含有一定浓度的营养物质,故开始时不加补料,细菌能良好地生长,但 4h 后溶解氧上升,超过 60%,这一现象反映出培养基中营养物质已大量消耗,细菌生长代谢的活力开始下降,故消耗氧气的的能力降低。这告诉我们开始补料的时间应定在 4h 左右。随后开始流加补料,细菌重新旺盛地生长,耗氧量变大,故搅拌转速持续升高以保持溶解氧不低于 40%。7h 左右转速达到最高值 800r/min,于是通入纯氧,溶解氧维持在 30% 左右。

培养 16h 后,细菌基本停止生长,最终菌体密度为  $OD_{600}62$ ,这提示我们按目前培养方式能使 YK537/pSBHL-11 的密度达到  $OD_{600}60$  左右。从整个细菌的生长曲线可以看出,细菌对数生长中后期是在培养 10h 左右,因此要保证 IL-3 的高效表达,最佳的诱导时间不宜超过 10h 左右,并且诱导时的菌体密度应在  $OD_{600}35$  左右。

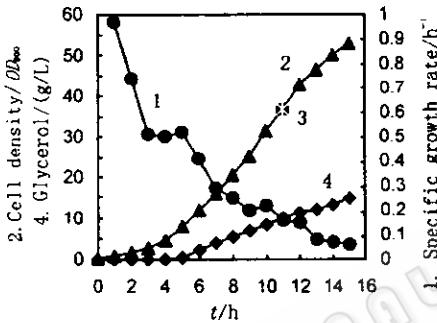


图 4 NBS BioFlo 3000 型自控发酵罐中分批-补料培养的细菌生长曲线和比生长速率曲线

Fig. 4 Bacteria growth and specific growth rate during fed-batch in NBS BioFlo 3000 type fermentor

1. Specific growth rate/h<sup>-1</sup>;
2. Cell density/ $OD_{600}$ ;
3. Initial thermal induction;
4. Glycerol(g·L<sup>-1</sup>)

至  $0.1h^{-1}$ 。

纵观整个培养过程,细菌的比生长速率随菌体密度的升高和代谢废物的增加呈下降的趋势。15h 后发酵结束,最终菌体密度为  $OD_{600}53$ ,相当于湿菌 106g/L。

**2.3.2 IL-3 的诱导表达:** 第 10h 后,虽然补料有所增加,但并没有很强烈地刺激菌体的生长(图 5),说明在诱导后细菌的能量主要消耗于外源基因的诱导和表达上,特别是第 2 小时内,IL-3 蛋白占菌体总蛋白的含量从 5% 陡升至 23%。4h 后 IL-3 的表达量达到 31%(图 6、7)。

**2.3.3 IL-3 包涵体的纯化:** STE 超声破菌后,离心上清中不含有 IL-3,说明 STE 去除

## 2.3 YK537/pSBHL-11 的高密度、高效表达培养和 IL-3 包涵体的纯化

**2.3.1 YK537/pSBHL-11 生长曲线和比生长速率:** 由图 4 可见,0~4h:由于接入处于对数生长中期的新鲜菌种,接种后并没有出现明显的生长延滞期,比生长速率在前几个小时较高。但由于培养基中没有甘油的存在,细菌的生长只有依靠分解蛋白胨和酵母粉,代谢产生出  $NH_4^+$ ,因此 pH 逐渐升高,第 4h 达到 7.3,考虑到补加甘油后 pH 值会下降,并且 pH 值稍微变动对下降生长影响不大,故没有用酸调节。

4~11 h:此阶段是细菌旺盛生长期,它决定了高密度培养能否成功。此阶段细菌的比生长速率在  $0.2\sim 0.6h^{-1}$  之间。

11~15h:11h 升高温度至  $42^\circ C$ ,开始诱导表达 IL-3,此时细菌的生长状态活性较高,诱导后细菌仍能持续生长,但比生长速率降

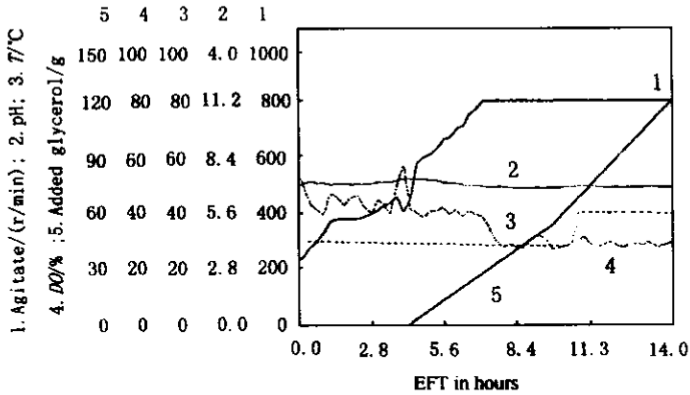


图 5 NBS BioFlo 3000 型自控发酵罐中成熟工艺的计算机在线控制图

Fig.5 The on-line controlling of ripe technological process in NBS BioFlo 3000 type fermentor

1. Agitate/(r. min<sup>-1</sup>); 2. pH; 3. Dissolved oxygen/%; 4. Temperature/°C; 5. Added glycerol/g

了绝大多数可溶性的菌体蛋白,并没有溶解包涵体,得粗包涵体 15.5g/L。离心沉淀的包涵体颗粒比较致密,采用超声的方法能彻底破碎块状颗粒,0.2%的 Triton X-100 能溶解一些包涵体,造成少量 IL-3 包涵体的损失,但能够溶解掺杂在包涵体中杂蛋白。TE 洗涤去除杂蛋白并去除残存的 Triton X-100,否则会造成在尿素中的溶解度降低。洗涤后可得纯度为 74%湿包涵体 8.5g/L。

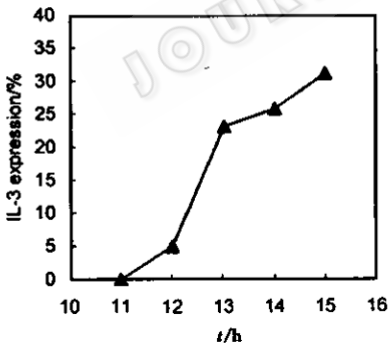


图 6 YK537/pSBHL-11 诱导后 IL-3 表达量与诱导时间的关系

Fig.6 Relationship between IL-3 expression and induction time of YK537/pSBHL-11

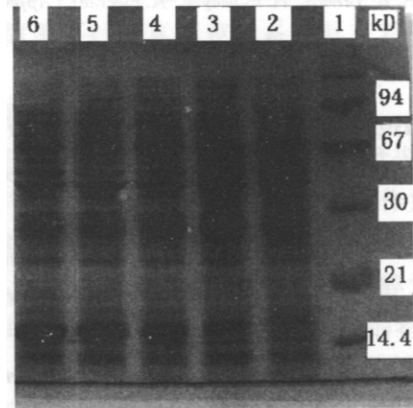


图 7 IL-3 表达的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.7 Electrophoretogram of SDS-PAGE of IL-3 expression

1. MW marker of stand protein;  
2. Host protein before induction;

3~6. IL-3 expression after induction 1~4 hours

### 3 讨 论

我们对 YK537/pSBHL-11 的高密度发酵和包涵体的纯化进行了以上两种方式的探

索研究,可见技术关键在于补料的控制,采用限制性流加甘油和控制溶解氧的培养方法容易实现基因工程菌的高密度和高表达培养,此外,由于研究体系中使用 5L 和 15L 两种体积的发酵罐,这可能还存在着进一步放大问题。实际上,影响细菌生长和外源蛋白表达的具体因素和调控机制仍需进一步研究。

**致 谢** 感谢李荣秀、徐 皓同志在此工作中的有益指导,并对方 佳、陈建军及张曼芳同志提供的帮助一并表示感谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Y. C. Yang, A. B. Ciarletta, P. A. Temple *et al.* *Cell*, 1986, 47(1):3~10.
- [ 2 ] 马大龙. 高技术通讯, 1991, 1, 11:26~29.
- [ 3 ] 杨立宏, 陈常庆, 高冕等. 生物工程学报, 1995, 11(4):297~303.
- [ 4 ] Y. S. Park, K. Kal, S. Lijima *et al.* *Biotech. Bioeng.*, 1992, 40:686~696.
- [ 5 ] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed), Cold Spring Laboratory Press, New York. 1989.
- [ 6 ] M. M. Bradford. *Anal. Biochem.*, 1987, 72:248~254.
- [ 7 ] L. Yee, H. W. Blanch. *Bio/Technology*, 1992, 10:1550~1556.
- [ 8 ] G. L. Kleman, W. R. Strohl. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, 5:180~186.
- [ 9 ] J. M. Cutayar, D. Poillon. *Biotechnol. Lett.*, 1989, 11:155~160.
- [ 10 ] S. W. Brown, H. P. Meyer, A. Fiechter. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 1985, 23:5~9.

## High-density *Escherichia coli* YK537/pSBHL-11 Cultivation Process for Hyperexpression of Recombinant Human Interleukin-3

Li Min Yang Lihong Ren Hongyu Gao Mian Chen Changqing

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

**Abstract** High-density cultivation of *Escherichia coli* YK537/pSBHL-11 in a B. Braun ES-10 type and a NBS BioFlo 3000 type fermentor was carried out to overexpress recombinant human Interleukin-3(IL-3) using fed-batch method. The results indicated that limiting glycerol at low concentration and keeping dissolved oxygen at 30% ~ 40%, temperature at 30℃ for 11 hours in the growth phase then at 42℃ for 4 hours could increase the final cell density from 16  $OD_{600}$  to 53  $OD_{600}$  (106g wet cell weight/L). Expressed IL-3 was about 30% of the total amount of protein in *E. coli*, 3.3g IL-3/L, and the wet weight of IL-3 inclusion body increased from 2.2g/L to 8.5g/L. After ultrasonication and two steps of washing, the purity of IL-3 inclusion body exceeded 70%.

**Key words** Recombinant human interleukin-3, fed-batch, high-density cultivation, inclusion body, purification