

高密度发酵制备重组人 OCIF 活性域多肽融合蛋白*

张兴群^{1,3} 王梁华² 焦炳华² 袁勤生^{1**}

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)¹

(第二军医大学基础医学部生物化学和分子生物学教研室 上海 200433)²

(东华大学生物工程系 上海 200051)³

摘要: 以补料-分批发酵方式在 3.7 L 发酵罐上实现了人破骨细胞形成抑制因子活性域多肽 (OCIF_{AD}) 的高密度发酵融合表达。通过参数控制, 发酵液最终 OD_{600} 达 12.5 (相当于 35 g 湿菌体/L), 表达量占菌体总蛋白 40% 左右, 含量超过 0.6 g/L, 并且 90% 呈可溶性而直接具有生物学活性。直链淀粉树脂亲和层析法一步纯化, 纯度达 90% 以上。

关键词: 破骨细胞形成抑制因子, 融合蛋白, 发酵, 补料-分批培养

中图分类号: TQ92 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 06-0053-04

Higher Density Fermentation of Recombinant Human Ocif Active Domain Peptide Fusion Protein*

ZHANG Xing-Qun^{1,3} WANG Liang-Hua² JIAO Bing-Hua² YUAN Qin-Sheng^{1**}

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)¹

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Basic Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433)²

(Department of Biological Engineering, Donghua University, Shanghai 200051)³

Abstract: A fed-batch protocol was used to overexpress recombinant human osteoclastogenesis inhibitory factor active domain (OCIF_{AD}) fusion protein by higher density cultivation of *E. coli* TB1/pMAL-OCIFAD in 3.7 L bioengineering fermentor. After controlling the parameters, the bacteria were reproduced in a large scale at the final cell density of $OD_{600} = 12.5$ (approximately 35 g wet weight bacteria cell/L). Expressed OCIF_{AD} fusion protein accounted for about 40% of total bacterial protein, which represented for 0.6 g/L of final product. OCIF_{AD} presented as 90% soluble form in supernatant. The purity of OCIF_{AD} fusion was more than 90% after affinity chromatography on Amylose Resin.

Key words: OCIF, Fermentation, Fusion protein, Fed-batch culture

破骨细胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF 或称 Osteoprotegerin, OPG) 可通过抑制破骨细胞形成、抑制成熟破骨细胞活性并诱导其凋亡实现对骨密度的调节, 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员^[1,2]。骨质疏松症、Paget's 病、癌症骨转移等导致的骨破坏都与破骨细胞分化增殖异常活跃和骨吸收过量密切相关^[3], 因此, OCIF 研究将为这些骨骼类疾病^[4,5]的预防和治疗提供帮助。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30000078)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30000078)

国家“863”计划资助项目 (No. 2001AA215441)

Project of Chinese National Programs for High Technology and Development (No. 2001AA215441)

** 联系人 Tel: 021-64252255, E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

收稿日期: 2004-02-02, 修回日期: 2004-03-16

本研究在获得 OCIF_{AD} 活性结构域 (OCIF_{AD}) 克隆与表达基础上, 进一步考察了实现发酵罐高密度发酵表达可溶性 OCIF_{AD} 融合蛋白的各种参数, 实现了高表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和重组表达质粒: 大肠杆菌 TB1 由本室保藏。含有 OCIF_{AD} 基因片段的重组质粒 pMAL-OCIF_{AD} 和工程菌株 TB1/ pMAL-OCIF_{AD} 由本实验室构建。

1.1.2 培养液: LB 液体培养基^[6] 和 2×YT 液体培养基用作种子培养, 半合成培养液用于发酵罐中的补料-分批培养。2×YT 培养液含有蛋白胨 16 g, 酵母粉 5 g, KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ 4 g, Na₂HPO₄·12H₂O 7 g, (NH₄)₂SO₄ 1.2 g, NH₄Cl 0.2 g 和微量元素溶液, 定容至 1 L。微量元素溶液中含有 MnSO₄·5H₂O 0.001 g, CaCl₂·6H₂O 0.004 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.002 g, ZnCl₂ 0.002 g, CuSO₄·5H₂O 0.001 g, H₃BO₃ 0.0005 g, FeSO₄·7H₂O 0.02 g, CaCl₂·2H₂O 0.02 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, 定容至 1 L。补料基质中葡萄糖 200 g, 酵母粉 70 g, 蛋白胨 70 g, MgSO₄·7H₂O 5.7 g, 定容至 1 L。各培养液 pH 均调为 7.0, 加入氨苄青霉素至 100 μg/mL。

1.2 细菌培养方法

1.2.1 种子液制备: 选用新近转化和鉴定的菌种。挑取 LB 平板上单菌落接种于 LB 液体试管中, 37℃, 220 r/min 振荡培养过夜。以 5% 接种量接入含 100 mL 2×YT 培养液的 500 mL 三角瓶中, 同上培养 6 h, 为种子液。

1.2.2 发酵罐中补料-分批培养: 按发酵罐工作体积 10% 接入种子液, 培养 2~4 h, OD₆₀₀ 达 0.6 后, 加入异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 0.6 mmol/L, 诱导表达 9 h。接种培养 2 h 后, 开始连续流加补料基质, 流加速度为 0.5 mL/min, 诱导开始后提高流加速度为 1 mL/min。同时, 调节空气流量和搅拌转速, 控制溶解氧为 30%~50%。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体浓度和质量: 菌体浓度以光密度值 (OD₆₀₀) 表示。3,000 × g 离心发酵液, PBS 重悬洗涤菌体 2 次, 称量得菌体湿重。取不同 OD₆₀₀ 的菌液 10 mL, 同上洗涤, 105℃ 烘至恒重, 称量得菌体干重。OD₆₀₀ 与菌体干重呈线性关系, 一个单位 OD₆₀₀ 约为干菌 0.40 g/L, 而 1 g 湿菌体相当于 0.2 g 干菌体。

1.3.2 OCIF_{AD} 融合蛋白表达量测定和纯化: 蛋白质 SDS-PAGE、Western blot 分析和直链淀粉树脂亲和层析纯化均按文献[7]进行。Syngene 凝胶成像系统扫描估算 OCIF_{AD} 融合蛋白占菌体总蛋白的含量。同时取样按 Bradford 法测定蛋白含量。最终平均值为每克干菌体相当于 0.5 g 蛋白质。

1.3.3 OCIF_{AD} 融合蛋白生物学活性测定^[5]: 分离 6~9 周龄 BALB/C 小鼠股骨和肱骨, 得到骨髓单核细胞后, 离心弃上清, 沉淀以 MEM 培养液 (含 10⁻⁸ mol/L 1, 25 (OH)₂D₃) 重悬后接种于预先接种有成骨细胞的培养板上培养。每 2 d 换液 50%, 一周后将得到的破骨细胞定量接种于 96 孔细胞培养板上, 加入纯化的不同浓度重组 OCIF_{AD} 融合蛋白, 一周后, 405 nm 比色测定破骨细胞特征性酶抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性。

2 结果

2.1 pMAL-OCIF_{AD}重组表达质粒的构建和鉴定

PCR筛选、质粒双酶切鉴定、序列分析确证得到了无移码突变、阅读框正确的阳性重组表达质粒 pMAL-OCIF_{AD}和基因工程菌株 TB1/ pMAL-OCIF_{AD}。

2.2 补料-分批培养

发酵过程中的菌体密度、OCIF_{AD}融合蛋白比率及实际含量变化如表1。结果表明,细菌处于对数生长中期或中后期 OCIF_{AD}融合蛋白产率最高,菌体密度 OD_{600} 为 12.5, OCIF_{AD}融合蛋白含量达 0.629 g/L。2.5 h 后持续诱导表达,第 6 h 就达到 OCIF_{AD}融合蛋白最大表达量的 90%,并且菌体也不再明显增加。此后,菌体开始自溶,密度呈下降趋势,因此,诱导至细菌对数生长中后期为宜,6~7 h 后诱导结束(图1)。

表1 培养时间对 OCIF_{AD}融合蛋白产量的影响

	培养时间 (t/h)				
	3	4	5	6	7
菌体密度 [OD_{600}]	4.8	6.4	8.5	11.2	13.5
OCIF _{AD} (mg/%)	40	40	37	28	20
OCIF _{AD} 含量 / ($\rho_{\text{g}}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^(a)	0.284	0.512	0.629	0.627	0.540

注: (a) OCIF_{AD} 实际含量的计算: $OD_{600} \times 0.4 \text{ g/L 细菌干重} \times 0.5 (\text{蛋白量/干细菌量}) \times \text{表达量}\%$

利用补料-分批连续流加培养得到了稳定的发酵结果,菌体 OD_{600} 达 10~12, OCIF_{AD} 表达量约 40%, 90% 呈可溶性且直接具生物学活性,少量呈包涵体形式(图1A)。直链淀粉树脂亲和层析一步纯化, OCIF_{AD} 融合蛋白纯度达到 90% 以上(图1B)。以鼠抗人 OCIF 单克隆抗体为一抗,进行的 Western blot 分析,可见 Mr 约为 60 kD 处有一特异性条带。

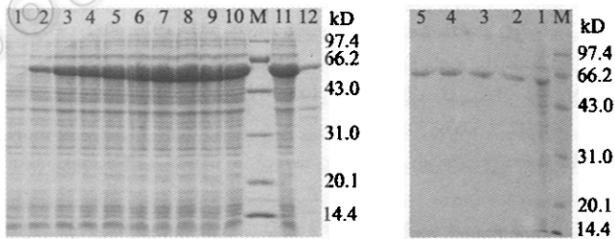
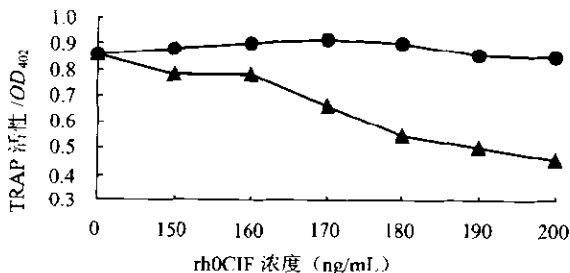


图1 OCIF_{AD}融合蛋白表达和纯化结果

A IPTG 诱导不同时间对 OCIF_{AD}融合蛋白表达的影响, B 表达产物的亲和层析纯化, M 相对分子质量标准蛋白, A1 未诱导时的菌体总蛋白, A2~10 IPTG 诱导 1~9h 时的菌体总蛋白, A11 菌体破碎后上清液中的总蛋白, A12 菌体破碎后沉淀中的总蛋白, B1 IPTG 诱导后的菌体总蛋白, B2~9 亲和层析纯化后的 OCIF_{AD}融合蛋白

2.3 表达产物生物学活性检测

重组 OCIF_{AD}融合蛋白生物学活性测定结果表明,表达产物在浓度大于 120 ng/mL 时对破骨细胞呈现剂量依赖性的诱导凋亡效应(图2)。

图2 OCIF_{AD}生物学活性测定

3 讨论

初步探索研究了 TB1/pMAL-OCIF_{AD} 的高密度发酵和表达, 认为技术关键在于补料控制。采用补料-分批连续流加和控制溶解氧能够实现基因工程菌的较高密度培养和产品的高表达。为了提高 OCIF_{AD} 发酵生产率, 曾通过延长培养时间、提高培养液中氮源物质浓度等方法, 使菌体密度 OD_{600} 增大到 14 左右, 但目标蛋白表达量并未明显增加, 只有 20% 左右, OCIF_{AD} 产量下降。原因可能是在这种通气培养方式下, 营养物质特别是葡萄糖补加过多后, 微生物将过剩的碳源转化为氧化不完全的有害代谢副产物, 如: 乙酸^[8], 从而造成细菌代谢的“酸苹果树效应”(crab tree effect), 细菌生长受抑, 外源蛋白表达量降低。因此, 基因工程菌发酵过程中, 可以通过改进补料加入方式、减少培养液中碳源浓度、降低乙酸生成率等措施, 缓解抑制效应, 实现高密度培养和外源蛋白高效表达。

参考文献

- [1] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, *et al.* Cell, 1997, **89** (2): 309 - 319.
- [2] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Endocrinology, 1998, **139** (3): 1229 - 1337.
- [3] Yamamoto M, Murakami T, Nishikawa M, *et al.* Endocrinology, 1998, **139** (9): 4012 - 4015.
- [4] Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, *et al.* Eur J Biochem, 1998, **254** (3): 685 - 691.
- [5] Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, *et al.* J Biol Chem, 1998, **273** (9): 5117 - 5123.
- [6] Lipton A. Cancer, 2000, **88** (12): 3033 - 3037.
- [7] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a laboratory manual (3rd edition), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] 张惟才, 朱厚础. 微生物学通报, 1999, **26** (4): 289 - 293.