

# 重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白工程菌的高密度培养

刘如石<sup>1</sup> 何志强<sup>1</sup> 李少伟<sup>1</sup> 杨坤宇<sup>1</sup> 鲜阳凌<sup>2</sup>  
逢淑强<sup>2</sup> 张 军<sup>1</sup> 李益民<sup>2</sup> 夏宁邵<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

<sup>2</sup>(北京万泰生物药物有限公司, 北京 102200)

**摘 要** 在 10L 发酵罐中对戊型肝炎病毒衣壳蛋白在重组大肠杆菌中表达发酵工艺进行了研究, 用分批培养方法探讨了不同培养基、培养基中磷酸盐浓度和  $Mg^{2+}$  浓度等因素对菌体生长与重组蛋白表达的影响; 用分批补料培养研究了不同的补料工艺对菌体生长与重组蛋白表达的影响, 同时对重组菌诱导时期、诱导持续时间以及不同诱导温度表达包含体在尿素溶液中的溶解性进行了研究。结果表明, 在优化后的培养基中, 磷酸盐浓度、 $Mg^{2+}$  浓度分别为 80mmol/L 与 20mmol/L 时菌体生长与表达效果较好; 分批补料培养中, 37℃ 培养 9h 菌体达到对数中期(约 45  $OD_{600}$ )为适宜诱导时期, 加入终浓度为 1.0mmol/L IPTG 后诱导 5h,  $OD_{600}$  达到 80 以上, 重组蛋白表达量达到 29.74%, 为最适收获菌体时间; 37℃ 表达的包含体 80% 以上溶解在 4mol/L 的尿素溶液中, 最终浓度达到 14mg/mL; 10L 发酵罐中确定的发酵工艺参数在 30L 发酵罐中进行了放大培养, 10L 发酵罐中确定的发酵工艺参数在 30L 发酵罐上具有可放大性与重复性, 可以应用于工业生产。

**关键词** 戊型肝炎病毒, 衣壳蛋白, 重组大肠杆菌, 高密度培养

中图分类号 TQ920.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0450-06

戊型肝炎病毒(HEV)是近年新发现的一种经胃肠道传播的急性病毒性肝炎, 其基因组共编码 3 个开放阅读框(open reading frame) ORF1、ORF2、ORF3, 其中 ORF2 是编码 660 个氨基酸的病毒主要结构蛋白, 组装成病毒衣壳<sup>[1]</sup>。戊肝疫苗迄今尚未研制成功, 但是研究已经发现多个 ORF2 重组蛋白具有免疫保护作用, 表明 ORF2 蛋白上存在主要的中和表位<sup>[2-4]</sup>, 我们以前的研究发现 aa394-606 段蛋白(NE2)可以形成同源二聚体与多聚体形式, 对戊型肝炎急性期与恢复期血清都有很强的反应, 同时将该片段免疫恒河猴后, 可以产生良好的保护性。但是其免疫原性强烈地依赖于其聚体形式, 而且纯化后的免疫原性有所下降<sup>[5-9]</sup>。为了找到具有更好免疫原性的颗粒抗原, 我们进一步表达了一系列 NE2 的突变体, 发现 ORF2 aa368-606 重组蛋白(HEV239 蛋白)可以形成 15~30nm 的颗粒, HEV239 颗粒可与戊型肝炎患者血清发生很强的反应, 两个与抗 HEV 中和性单克隆抗体 8C11 和 8H3 均有很强的反应<sup>[9]</sup>。HEV239 与 NE2 蛋白分别免疫 Balb/c 小鼠, 结果 HEV239 的抗体阳转率与抗体滴度明显优于 NE2 蛋白<sup>[9]</sup>; HEV239 免疫恒河猴, 可以对同型与异型病毒攻击均产生很好的保护性, 因此具有成为疫苗的良好前景<sup>[5, 8]</sup>; 本研究中, 我们对重组菌的生长与表达规律进行了探索, 建立了稳定的高密度、高表达生产工艺。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 宿主大肠杆菌 ER2566 购于 New England Biolabs 公司。重组质粒 pTQ-T7-239 和重组菌株 *E. coli* ER2566/pTQ-T7-239<sup>[9]</sup> 由本实验室构建。

**1.1.2 仪器:** BIOSTAT-B 10L、BIOSTAT-C 30L 自动发酵罐, 都与微机连接, 由 MFCSwin 2.0 软件控制发酵过程, 为德国 B. Braun Biotech 公司产品; 6K15 型高速冷冻离心机为 Sigma 公司产品; LAB-2000 型实验室用均质机, 为美国 APV 公司产品; 微量蛋白电泳仪为 Bio-Rad 公司产品; Eppendorf Biophotometer 分光光度计, 德国 Eppendorf 公司产品; UV 凝胶成像系统为美国 UVI 公司产品。

**1.1.3 主要化学试剂:** 酵母膏、蛋白胨为英国 Oxoid 公司产品, 蛋白浓度测定 BCA 试剂为美国 Pierce 公司产品, 无机盐与葡萄糖为国产分析纯试剂, 消泡剂“泡敌”为江苏淮阴赛欧消泡剂有限公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 种子菌的活化:** 取在 -70℃ 甘油中保存的菌株平板划线, 37℃ 培养约 10h, 挑典型单菌落接种于含 1% 葡萄糖的 3 mL LB 培养基(含卡那霉素 50 mg/L)的试管中, 37℃、200

收稿日期: 2003-09-04, 修回日期: 2004-01-13。

基金项目: 福建省重大科技项目(No. 2002F013), 教育部跨世纪优秀人才培养计划。

\* 通讯作者。Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2184110; E-mail: nsxia@jiangxian.xmu.edu.cn

$\nu$  min 培养 9h 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 诱导 5h, 然后处理菌体进行 SDS-PAGE 电泳, 取表达量最大的菌作为活化种子。

**1.2.2 基因重组菌三角摇瓶培养:** 取活化种子以 2% 接种量转接种于含 1% 葡萄糖的 400 mL LB 培养基的摇瓶中, 37℃、200  $\nu$  min 摇瓶培养, 当  $OD_{600}$  值达 1~1.2 时可以作为发酵罐发酵的菌种。

**1.2.3 菌体浓度  $OD_{600}$  测定:** 将菌液稀释至  $OD_{600}$  为 0.2~0.3 之间, 用 Eppendorf Biophotometer 分光光度计测定 600nm 下的吸光值。

**1.2.4 HEV239 蛋白表达水平检测:** 按常规 SDS-PAGE 方法进行电泳<sup>[5]</sup>, 然后在 UV 凝胶成像仪上分析 HEV239 蛋白占细菌总蛋白的百分比即为 HEV239 蛋白表达水平。

**1.2.5 发酵培养基的筛选:**

(1) 三种发酵起始基本培养基的筛选: 分别用三种不同的培养基来研究其对重组菌生长与表达的影响, 即 iv: LB+1% 葡萄糖; ㊸: 酵母粉(1%), 蛋白胨(2%), NaCl(2%), 葡萄糖(1%),  $KH_2PO_4$ (0.1%),  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (0.2%)  $K_2HPO_4$ (0.1%); ㊹: 酵母粉(1%), 蛋白胨(1%), NaCl(0.6%), 葡萄糖(1.64%),  $KH_2PO_4$ (0.37%),  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (0.6%)  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0.9%),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5%), 微量元素母液( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  3.2g/L,  $ZnSO_4 \cdot 0.4g/L$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.4g/L,  $H_3BO_4$  0.06g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.8g/L,  $Al_2(SO_4)_3$  2.8g/L,  $CaCl_2$  0.07g/L,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  3.2g/L,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.4g/L) 10ml/L。接种前加入卡那霉素至终浓度 50mg/L, 然后分别用上述三种培养基接种培养 7h, 诱导表达 5h, 测定菌体的  $OD_{600}$  与目标蛋白表达水平。

(2) 发酵起始培养基中磷元素对菌体生长与 HEV239 蛋白表达的影响: 在发酵培养基中将  $KH_2PO_4$ 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $K_2HPO_4$  按一定的比例(摩尔比为 1:1:1)配成 0、20、40、60、80、100、120mmol/L 等不同浓度, 然后接种培养, 诱导表达, 测定菌体的  $OD_{600}$  与目标蛋白的表达水平。

(3) 发酵起始培养基中  $MgSO_4$  对菌体生长与 HEV239 蛋白表达的影响: 在发酵培养基中将  $MgSO_4$  配成 0、5、10、15、20、25、30mmol/L 等不同浓度, 然后接种培养, 诱导表达, 然后测定菌体的  $OD_{600}$  与 HEV239 蛋白的表达水平。

**1.2.6 10L 自控发酵罐中分批培养:** 发酵罐工作体积为 8.0L, 装料前校正 pH 电极, 灭菌后校正溶氧电极, 按 4% 的接种量接种三角摇瓶培养的种子。发酵温度维持 37℃。发酵过程的几个关键参数为: (1) 转速与溶氧控制: 0~8h 按 MCS win 2.0 预设的 profile 程序从 400~800r/min 直线上升保证溶氧不低于 40%, 低于 40% 时自动通入纯氧; 空气/纯氧流速设定为 1V/(V·M)(溶氧控制与纯氧通入参数(Gasmix)相关联, Gasmix 自动); (2) pH 值: 自动流加 4mol/L 的 NaOH 或 4mol/L 的 HCl 使 pH 值保持在  $7.0 \pm 0.1$ ; (3) 消泡: 起泡沫时通过消泡泵自动加入泡敌消泡; 培养 6h, 加入 IPTG 至终浓度

为 1.0mmol/L 进行诱导, 5h 后收获菌体。

**1.2.7 自控发酵罐补料工艺:** 采用如下三种方法进行补料。iv: 发酵 3h 前不补, 3h 后按 80ml/h 补料; ㊸: 在发酵 3h 前不补料, 在发酵 3h 到 8h 按 80ml/h 补料, 8h 后 120ml/h 补料; ㊹: 依据细菌的生长, 随时间的不断进行补料量不断增加, 具体补料量如下: 0~4.5h 不补料; 5.5~6.5h 79 ml/h; 6.5~7.5h 132 ml/h; 7.5~9.0h 192 ml/h; 9.0~10h 245ml/h; 10~12h 254 ml/h; 12~14h 282 ml/h [补料培养基组分为蛋白胨 38g/L, 酵母粉 34g/L,  $KH_2PO_4$  2g/L,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  2.5g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  5g/L, 4% Vit B<sub>1</sub> 14ml/L, 葡萄糖 125g/L, 微量元素母液( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  3.2g/L,  $ZnSO_4$  0.4g/L,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.4g/L,  $H_3BO_4$  0.06g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.8g/L,  $Al_2(SO_4)_3$  2.8g/L,  $CaCl_2$  0.07g/L,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  3.2g/L,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.4g/L) 30ml/L]。

**1.2.8 蛋白浓度测定:** HEV239 蛋白经尿素溶液溶解后, 适当稀释后用 BCA(bicinchoninic acid) 法进行测定<sup>[12]</sup>, 具体步骤如下: 取 50 份试剂 A 与 1 份试剂 B 混合配成工作试剂; 配制不同浓度(20~2000 $\mu$ l/ml) 的牛血清白蛋白(BSA)溶液; 分别取 0.1ml BSA 和适当稀释的蛋白样品与 2ml 工作试剂混合, 密封试管, 37℃ 保温 20min; 冷却到室温, 测定各试管在 562nm 处吸光值; 绘制 BSA 蛋白浓度标准曲线, 利用标准曲线计算出样品的蛋白含量(试剂 A 为: 1.0% BCA 双钠盐, 2.0% 碳酸钠, 0.16% 酒石酸钠, 0.4% 氢氧化钠, 0.95% 硫酸钠, 用氢氧化钠调节 pH 为 11.25; 试剂 B 为: 4% 硫酸铜)。

**1.2.9 菌体破碎与包涵体洗涤:** 称取一定量的菌体, 按 1:20 加入细胞裂解缓冲液(300mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris·HCl, 10mmol/L EDTA, pH 8.0) 重悬细胞,  $5.5 \times 10^7$  Pa 下均质机均质细胞 4 次,  $8000 \times g$  4℃ 离心 10min, 弃上清; 加入与裂解液等体积的洗涤缓冲液(100mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris·HCl, 5mmol/L EDTA, pH 8.5),  $5.5 \times 10^7$  Pa 下均质机均质 1 次,  $8000 \times g$  4℃ 离心 10min, 弃上清; 重复 2 次; 往沉淀中加入与裂解液等体积的 2mol/L 的尿素溶液, 室温搅拌 40min,  $8000 \times g$  4℃ 离心 15min, 留上清与沉淀; 按尿素溶液菌体 4(1/V/W) 的比例往沉淀中加入 4mol/L 尿素溶液, 室温搅拌 2h,  $15000 \times g$ 、4℃ 离心 15min, 留上清与沉淀; 按尿素溶液菌体 2:1 的比例往沉淀中加入 8mol/L 尿素溶液, 室温搅拌 1h,  $15000 \times g$ 、4℃ 离心 15min, 留上清。取上述各步保留上清稀释适当倍数, 用 BCA 测定蛋白浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基组分与配比的筛选

**2.1.1 三种发酵起始培养基的筛选:** 用 iv、㊸、㊹ 三种基本培养基, 采用 10L 发酵罐发酵(工作体积为 8L) 进行分批发酵, 结果如表 1: 显示培养基 ㊹ 用于重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白工程菌的发酵, 无论是菌体的  $OD_{600}$ , 还是目标蛋白的表达都明显优于 iv、㊸, 因而选用 ㊹ 培养基作为发酵用培养基。

表1 比较不同起始培养基对菌体生长与表达的影响

Table 1 Comparison of fermentation performance for recombinant *E. coli* in different media

| Original medium | Cell $OD_{600}$ | Expression level of HEV239 % | Yield of HEV239 (g/L)* |
|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------------|
| iv              | 6.8             | 14.8                         | 0.13                   |
| ㊸               | 10.4            | 16.2                         | 0.21                   |
| ㊹               | 14.6            | 18.0                         | 0.33                   |

\*: The total expressed HEV239 protein, including all HEV239 resolved in 2mo/L, 4mo/L, 8mo/L urea solution.

**2.1.2 起始培养基中磷酸盐对菌体生长与表达的影响:** 磷酸盐不仅是微生物生长和维持溶液渗透压的必需物质,而且对重组菌株质粒的稳定性、菌体的生物量以及外源蛋白的表达都有影响。因而采用在培养基中添加不同浓度的磷酸盐来研究其对菌体的生长以及外源蛋白表达的影响,结果如图1,磷酸盐浓度对重组菌的生长以及 HEV239 蛋白表达的影响呈钟形曲线,在 60~100mmol/L 时对菌体生长与 HEV239 蛋白的表达有利,而在 80mmol/L 菌体生长与表达最好。菌体  $OD_{600}$ 、目标蛋白表达水平以及 HEV239 蛋白产量分别比没有添加磷酸盐时增加 25.4%、32% 与 61.9%。当磷酸盐浓度再增大时,蛋白表达水平、HEV239 蛋白产量都有下降趋势。因而确定发酵培养基中磷酸盐浓度为 80mmol/L。

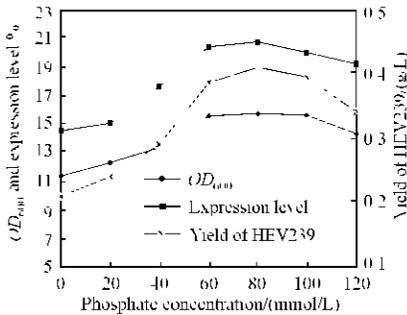


图1 不同浓度的磷酸盐对菌体的生长与表达的影响

Fig. 1 Effect of phosphate concentrations on cell yield and expression of recombinant protein

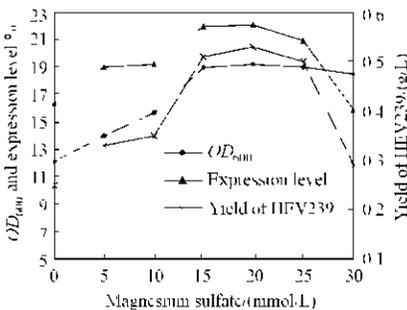


图2 不同浓度的硫酸镁对菌体的生长与表达的影响

Fig. 2 Effect of Magnesium sulfate concentrations on cell yield and expression of recombinant protein

**2.1.3 起始培养基中  $MgSO_4$  对菌体生长与表达的影响:** 由于  $Mg^{2+}$  是微生物代谢过程中许多酶的激活剂,与细胞外产物合成的动力学平衡有关,而且可以稳定目的产物。因而考虑在发酵培养基中添加适量浓度的  $MgSO_4$ 。又据文献报道<sup>[13]</sup>,在高密度发酵采用  $MgSO_4$  浓度应为 0.28mmol/L 以上,

而大于 300mmol/L 时又对菌体的生长与重组蛋白的表达有抑制作用。因而有必要找出有利于我们重组菌株生长与表达的适宜浓度。所以我们在确定发酵培养基中磷酸盐浓度为 80mmol/L 后,再在培养基中添加一定量的  $MgSO_4$ , 研究其对菌体的生长与 HEV239 蛋白的表达的影响,结果如图 2,当  $MgSO_4$  浓度为 15~25mmol/L 时,有利于菌体的生长与表达,且在 20mmol/L 菌体  $OD_{600}$ 、目标蛋白表达水平达到最大值,菌体  $OD_{600}$ 、目标蛋白表达水平以及 HEV239 蛋白产量分别比没有添加硫酸镁时增加 59%、38% 与 100%。再增大其浓度时,对菌体生长尽管没有明显影响,但是对 HEV239 蛋白的表达有抑制作用,因而确定培养基中  $MgSO_4$  浓度为 20mmol/L。

## 2.2 不同补料工艺对菌体生长与产物表达的影响

重组大肠杆菌高密度发酵成功的关键技术是补料策略,也就是根据重组菌的生长特点及产物的表达方式采取合理的营养物质流加方式。碳源与氮源是两者常用的限制性基质,葡萄糖是一种细菌易于利用而且廉价易得的碳源,因而我们采用葡萄糖作为补料的限制性基质,采用不同的补料工艺进行补料,结果如表 2,通过补加复合培养基后,细胞密度比不补料增加了 5.7 倍,HEV239 蛋白表达增加了 40.6%, HEV239 蛋白产量增加了 5.6 倍,说明适当的葡萄糖量的添加以控制重组菌的比生长速率对菌体的生长与 HEV239 蛋白的表达有很大影响。

表2 不同补料工艺对菌体生长与表达的影响

Table 2 Comparison of fermentation performance for recombinant *E. coli* in different Feed methods

| Feed method | Cell $OD_{600}$ | Expression level of HEV239 % | Yield of HEV239 / (g/L) |
|-------------|-----------------|------------------------------|-------------------------|
| No-feeding  | 15.7            | 22.1                         | 0.53                    |
| iv          | 39.6            | 21.0                         | 0.78                    |
| ㊸           | 58.5            | 20.13                        | 2.21                    |
| ㊹           | 89.2            | 31.08                        | 2.96                    |

## 2.3 不同的菌体生长期诱导对菌体生长与表达的影响

为了解分批补料发酵中在不同的细胞浓度诱导对 HEV239 蛋白与生长的影响,以不诱导分批补料培养重组菌作对照,考察在  $OD_{600}$  分别在 30、45、60 时诱导对菌体生长与表达的影响,结果见图 3、图 4,没有诱导的重组菌在培养到 12h 达到最大值,然后进入稳定生长期;在 30  $OD_{600}$  时诱导,5h 后达到稳定生长期,比对照菌晚 1h 达到稳定生长期,蛋白

表达水平与摇瓶小量表达水平没有显著差异, 但菌体  $OD_{600}$  值比对照降低了约 30%, 说明 IPTG 的加入对菌体的生长有抑制作用; 在 45  $OD_{600}$  时诱导, 5h 后达到稳定生长期, 比 30  $OD_{600}$  时诱导菌晚 1h 达到稳定生长期, 菌体表达水平与 30  $OD_{600}$  时诱导菌及摇瓶表达菌相当, 而最后菌体  $OD_{600}$  值与对照没有区别; 在 60  $OD_{600}$  时诱导, 3h 后达到稳定生长期, 最后菌体  $OD_{600}$  值也与对照没有区别, 但是表达水平下降了约 28%。因而选择在 45  $OD_{600}$  时诱导较为理想, 既利于菌体量的积累, 又利于 HEV239 蛋白的表达, 达到了高密度、高表达的要求。这是由于在对数期中期时, 菌体的生长处于新陈代谢与生长旺盛期, 利于合成 HEV239 蛋白; 当菌体进入对数生长期晚期, 代谢副产物以及废物的不断积累而造成生长环境的恶化, 新陈代谢减弱, 生长速度减慢, 不利于 HEV239 蛋白的表达。

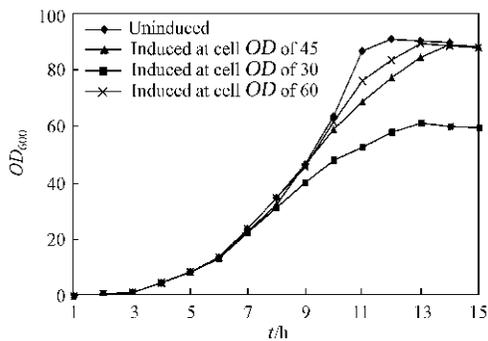


图3 在不同时期诱导的细菌生长动力学曲线  
Fig. 3 Growth kinetics of *E. coli* after induced at different stages of growth

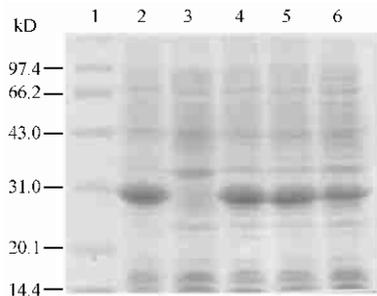


图4 在不同时期诱导的细菌表达的 SDS-PAGE  
Fig. 4 The SDS\_PAGE of expression of *E. coli* after induced at different stages of growth

1: protein molecular weight marker; 2: induced in batch of shake flask;  
3: uninduced in fed\_batch;  
4, 5, 6: induced at 30  $OD_{600}$ , 45  $OD_{600}$ , 60  $OD_{600}$  in fed\_batch

### 2.4 不同诱导温度对表达包含体在不同浓度尿素溶液中溶解度的影响

为了使 HEV239 蛋白包含体更好溶于相对较低浓度的尿素溶液, 在 37℃ 培养菌体浓度到 45  $OD_{600}$  时, 检测了 33℃、37℃、40℃ 三个不同温度下诱导表达的包含体在不同浓度尿素溶液中的溶解度 (33℃、40℃ 重组菌的最终浓度与表达量都与 37℃ 相当, 分别到达 84  $OD_{600}$  与 30%), 结果如图 5: 诱导

温度在 33℃ 时, 包含体主要溶解在 2mol/L 尿素溶液中, 蛋白浓度达到 4.3mg/mL, 复性率为约 82%, 但是由于杂蛋白在 2mol/L 尿素溶液中有较大的溶解度, 达到了约 1.0 mg/mL, 不利于下游的纯化; 37℃ 诱导表达的包含体 80% 以上溶解在 4mol/L 尿素溶液中, 蛋白浓度达到 14 mg/mL, 杂蛋白浓度约为 1.3 mg/mL, 而且溶解蛋白易于复性成类病毒颗粒, 复性率高达 80%; 40℃ 诱导表达的包含体主要溶解在 8mol/L 尿素溶液中, 蛋白浓度达到 4.21 mg/mL, 杂蛋白含量约为 1.8 mg/mL, 更主要的是包含体复性率很低, 约为 46%。所以选择 37℃ 为 HEV239 蛋白的表达诱导温度。

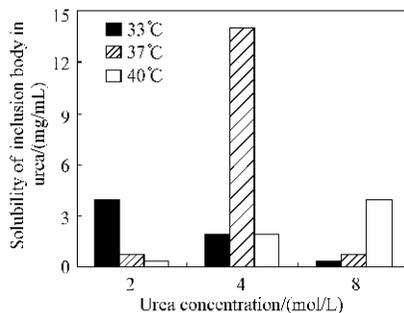


图5 HEV239 蛋白包含体在不同浓度尿素中的溶解度  
Fig. 5 Effect of different urea concentrations on solubility of inclusion body

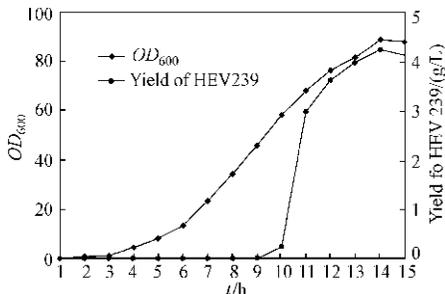


图6 重组菌发酵过程中菌体生长与蛋白表达曲线  
Fig. 6 Recombinant *E. coli* growth and protein expression in fed\_batch culture

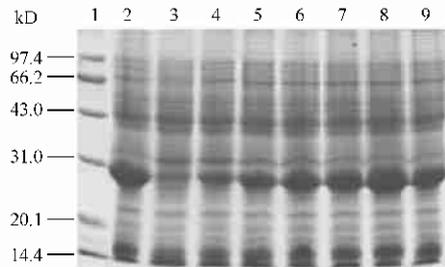


图7 分批补料发酵诱导不同时间蛋白表达 SDS-PAGE  
Fig. 7 SDS\_PAGE analysis of recombinant protein at different stages after induced in fed\_batch culture

1: protein molecular weight marker;  
2: induced in batch of shake flask culture;  
3: uninduced in fed\_batch culture;  
4, 5, 6, 7, 8, 9: induced 1, 2, 3, 4, 5, 6 hours in fed\_batch culture

## 2.5 分批补料发酵中重组菌的生长、诱导后 HEV239 蛋白表达与时间的关系

采用分批补料的方式在 10L 自控发酵罐中发酵(工作体积为 8L), 37℃ 培养 9h 后达到 45  $OD_{600}$ , 加入 IPTG 到终浓度为 1.5 mmol/L 诱导 6h, 在诱导后每隔 1h 取一次样, 进行 SDS-PAGE 鉴定表达量, 结果如图 7, HEV239 蛋白在诱导 1h 后开始表达, 诱导 5h 后达到最大值。特别是在诱导 2h 后菌体蛋白的表达量从 0.32g/L 提高到 2.4g/L, 在诱导 5h 后菌体生物量不再增加, 溶氧开始上升, 细菌生长达到稳定期, 继续培养细菌开始自溶。从菌体的生物量以及 HEV239 蛋白的表达来看, 诱导 5h 为最佳菌体收获期。

## 2.6 30L 发酵罐放大发酵

为了考察在 10L 发酵罐中(工作体积 8L) 确定发酵工艺放大的可行性, 在 30L 发酵罐上进行了发酵放大试验(工作体积为 30L), 用 10L 发酵罐确定的工艺参数连续发酵 3 罐, 结果如表 3,  $OD_{600}$  达到了 81.35, 目标蛋白表达水平达到了 29.25%, HEV239 蛋白产量达到了 2.8 g/L (三罐的平均值), 与 10L 发酵罐的结果非常接近。最终菌体湿重产量达到了每升培养基 66.71g。而且从表中可以看出发酵的重复性好, 这说明 10L 发酵罐中确定的发酵工艺具有可放大性, 为戊型肝炎衣壳蛋白的大批量生产打下了基础。

表 3 重组菌在 30L 发酵罐上的放大培养结果

Table 3 Scale up culture of recombinant *E. coli* in 30L fermentor

| Experiment No. | Cell $OD_{600}$ | Expression level of HEV239/ % | Yield of HEV239 (g/L) | Total HEV239 soluted in 4 mol/L urea/g |
|----------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|--|
| iv             | 81.21           | 29.21                         | 2.76                  | 66.24                                  |
| ⊕              | 83.47           | 29.74                         | 2.85                  | 68.40                                  |
| ⊖              | 79.10           | 28.80                         | 2.79                  | 66.96                                  |

## 3 讨论

近几十年来的研究已使大肠杆菌成为现代分子生物学研究中最常用的材料之一, 大肠杆菌也成为最广泛的合成异源蛋白的表达系统。重组大肠杆菌的高密度培养是增加 HEV239 蛋白产率的最有效方法。工程菌的发酵不仅要求重组大肠杆菌高水平表达外源蛋白, 而且要提高菌体密度, 最终提高产物的比生产率, 尽可能减少宿主细胞本身蛋白的污染。分批补料技术则是在培养过程中不断补充培养基, 延长菌体的对数生长期, 使菌体在较长的时间内保持较高的生长速率, 从而达到高密度, 该技术已广泛用于重组大肠杆菌的高密度发酵。

但是一般来说, 单位菌体的生产能力在高密度时往往低于低密度时的生产能力<sup>[14, 15]</sup>。这主要与培养基成分的组成与配比有关。因而我们对培养基进行了筛选与优化, 结果优化的培养基不但能提高菌体得率, 而且成功地实现了 HEV239 蛋白的高效表达。我们在发酵 4.5h 后发现溶氧与 pH 开始上升, 说明培养基中葡萄糖消耗完全, 应该向培养基中补充葡萄糖, 但是特别注意严格控制葡萄糖的流加速率, 避免产生“葡萄糖效应”而积累大量有机酸(如乙酸)等有害代谢物而抑制菌体的生长与 HEV239 蛋白的有效表达<sup>[6]</sup>, 因而我们始终将葡萄糖浓度在一个较低的低浓度范围内, 既能够保证菌体以较低的比生长速率生长与重组菌体表达的需要, 又不至于产生“葡萄糖效应”。另外添加一定量的酵母粉、蛋白胨等天然物质可加速菌体生长, 缩短发酵周期, 有利于高密度发酵与高表达, 这在我们的发酵过程中收到了一定的效果。通过分批补料后, 重组菌  $OD_{600}$  从分批发酵的 14.6 提高到 89, 表达水平从 18% 提高到 30%, 表达 HEV239 蛋白产量从 0.33g/L 提高到 2.88g/L。

每一种重组菌都有其生长和表达规律, 考察其诱导最佳  $OD_{600}$  以及诱导的持续时间可以了解外源蛋白在菌体中的表达与积累情况, 据此可以判断最适的诱导时间以及菌体收获时间, 因为诱导过晚, 菌体老化, 其生长与外源蛋白的表达会下降, 特别是诱导过晚时大量的能量会消耗在外源蛋白上而使菌体提前进入衰亡期; 收获太慢时菌体会出现自溶。本文通过对重组菌体生长规律诱导、 $OD_{600}$  以及诱导持续时间的研究发现, 在发酵达到 45  $OD_{600}$  时(约 9h) 诱导比较合理, 诱导 5h 后溶氧上升, 说明菌体对氧的利用率下降, 开始进入稳定生长期, 此时菌体蛋白达到最大值, 为最适收获时期。

温度是影响包含体的主要因素, 为了有利于下游的分离、纯化与复性, 使包含体溶解在比较低浓度的尿素溶液, 因而对诱导温度进行了研究。经过在不同温度下诱导, 发现 33℃ 诱导时包含体主要溶于 2mol/L 尿素溶液, 尽管复性率高, 但同时也溶解了许多菌体蛋白, 不利于后续蛋白纯化; 当 40℃ 诱导时包含体主要溶于 8mol/L 尿素溶液, 不但溶解了大量的菌体蛋白, 更主要的是包含体复性率低; 当 37℃ 诱导时包含体主要溶解在 4mol/L 尿素溶液, 溶解度高达 14mg/mL, 溶解包含体易于复性成类病毒颗粒, 而且相对来说杂蛋白少, 因而发酵温度定为 37℃。最后在 30L 规模罐上验证了 10L 罐确定的发酵工艺的可放大性与重复性, 为重组 HEV239 蛋白的规模生产, 加速重组戊肝疫苗的产业化打下了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE *et al.* editors. Fields virology. (2). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, pp 3051- 3061
- [2] Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski K *et al.* Preliminary evidence that a tpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Vi-*

- ol, 1993, **41**: 90–94
- [ 3 ] Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU *et al.* Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 10198–10202
- [ 4 ] Zhang M, Emerson SU, Nguyen H *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kD truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine*, 2001, **20**: 853–857
- [ 5 ] Li SW(李少伟), Zhang J(张军), He ZQ(何志强) *et al.* The study of aggregate of the ORF2 peptide of hepatitis E virus expressed in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(4): 463–467
- [ 6 ] Zhang J, Ge SX, Huang GY *et al.* Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of Hepatitis E Virus infection in a rhesus monkey model. *J Mal Virol*, 2003 (已较样)
- [ 7 ] Ge SX(葛胜祥), Zhang J(张军), Peng G(彭耿) *et al.* Development and evaluation of ELISAs for anti-hepatitis E virus IgM and IgG detection based on polymerized recombinant antigen. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2003, **19**(1): 78–86
- [ 8 ] Ge SX(葛胜祥), Zhang J(张军), Huang GY(黄果勇) *et al.* The immune-protect study of a hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2003, **43**(1): 35–42
- [ 9 ] He ZQ(何志强), Zhang J(张军), Li SW(李少伟) *et al.* Expression of hepatitis E virus capsid protein particle in *E. coli* and its antigenicity and immunogenicity. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2004, **20**(2): 262–268
- [ 10 ] Gu Y(顾颖), Ge SX(葛胜祥), Huang GY(黄果勇) *et al.* Identification of neutralizing monoclonal antibodies to the hepatitis E virus. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2003, **19**(3): 217–223
- [ 11 ] Zhang J(张军), Li YM(李益民), Li SW(李少伟) *et al.* Protective efficacy of a particular recombinant (*E. coli*) hepatitis E vaccine on rhesus monkey. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), (已接受)
- [ 12 ] Li Y(李原), Chen SS(陈松森), Wang WC(王渭池). Genetically Engineered Pharmaceuticals (基因工程药物). Chemistry Industry Publishing House(化学工业出版社), 2002, pp108–109
- [ 13 ] Riesenber D. High cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1991, **2**: 380
- [ 14 ] Makrides SC. Strategies for achieving high level expression of genes in *Escherichia coli* [J]. *Microbiological review*, 1996, **60**(3): 512
- [ 15 ] Yan Z, Zhang YQ, Li M. High cell density fermentation of recombinant human thymosin  $\alpha 1$ . *Pharmaceut biotechnol*, 2000, **7**(4): 209
- [ 16 ] Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth acetate production and acetate inhibition of *E. coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applicati on Environment Microbiology*, 1990, **56**: 1004

## Hepatitis E Virus Capsid Protein Production by High Cell Density Culture of Recombinant *Escherichia coli*

LIU Ru\_Shi<sup>1</sup> HE Zhi\_Qiang<sup>1</sup> LI Shao\_Wei<sup>1</sup> YANG Kun\_Yu<sup>1</sup> XIAN Yang\_Ling<sup>2</sup>  
PANG Shu\_Qiang<sup>2</sup> ZHANG Jun<sup>1</sup> LI Yi\_Min<sup>2</sup> XIA Ning\_Sha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen 361005, China)

<sup>2</sup>(Beijing Wantai Pharmacy Enterprise Co. Ltd., Beijing 102200, China)

**Abstract** Production of Hepatitis E Virus capsid protein by high cell density culture in recombinant *E. coli* has been studied in 10L and 30L fermentors. The effects of different factors on growth and producing recombinant protein of *E. coli* have been studied by batch culture, such as different media, the ratio of phosphate and Magnesium sulfate. Comparison of fermentation performance for recombinant *E. coli* in different fed-methods culture has been investigated by fed-batch culture. The effects of inducing at different stages of growth and time of inducing on growth and producing recombinant protein, also obtained by fed-batch culture. At last, the solubility of inclusion body in different urea concentrations also has been obtained by fed-batch culture. The results show that the concentration of phosphate and Magnesium sulfate in the optimal media is 80mmol/L and 20mmol/L in batch culture respectively, that induction with 1.0mmol/L IPTG at mid log phase (about 45 OD at 600 nm) is suitable for growth and recombinant protein expression, the cells were approaching stationary growth phase and the maximum cell OD at 600 nm of 80 was achieved in 5h of fed-batch culture, and the expression level is 29.74%. The results also indicate that the solubility of inclusion body in 4mol/L urea solution induced at 37°C reaches 14mg/mL, over 80% inclusion body was resolved. The culture process achieved in 10L fermentor could be successfully scaled up to 30L fermentor with good reproducibility.

**Key words** Hepatitis E virus, capsid protein, recombinant *Escherichia coli*, high cell density culture

Received: 09-04-2003

\* Corresponding author. Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-21841110; E-mail: nsxia@jxjxian.jmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net