

## 人基因工程 $\gamma$ -干扰素发酵过程的研究

周永春 刘登奇 浦兆伟 陆德如

(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所, 上海 200433)

刘新垣 王子轩

(中国科学院生物化学研究所, 上海 200031)

王启松

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

分析大肠杆菌 K802 (pLY-4) 生产人  $\gamma$ -干扰素的发酵过程后发现, 采用丰富培养基 (改良 LB+M9), 既适合于细菌生长, 又适合于  $\gamma$ -干扰素的表达。采用逐步升温、控制不同发酵阶段的 pH 及保持高的溶解氧浓度, 可提高重组质粒的稳定性和细胞的生长速率, 使  $\gamma$ -干扰素的表达量达  $4.0 \times 10^6$  IU/ml, 表达水平约占菌体蛋白的 55%。

关键词  $\gamma$ -干扰素; 基因工程菌发酵

$\gamma$ -干扰素具有抑制病毒复制、抑制细胞增殖和免疫调节功能, 有希望成为治疗病毒病、癌症和免疫性疾病的药物。 $\gamma$ -干扰素基因的克隆和表达首先由美国 Genetech 公司的 Gray 等<sup>[1]</sup>于 1982 年完成, 接着比利时的 Devos<sup>[2]</sup>也报道类似工作。由于其潜在的经济价值和社会效益, 国外已有八家公司能生产人基因工程  $\gamma$ -干扰素<sup>[3]</sup>, 但由于商业竞争, 其生产工艺还没有公开报道, 为了开发我国自行构建的  $\gamma$ -干扰素工程菌, 我们对该菌的培养和产生  $\gamma$ -干扰素的条件进行了研究, 现将结果报道如下。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 实验菌株

大肠杆菌 K802(pLY-4): 其遗传标记为 hsdR(+), hsdM(+), gal(-), met(+), SupE, 由美国加州大学 H.Boyer 赠送。质粒 (pLY-4), 的结构见图 1, 由中国科学院上海生物化学研究所刘新垣小组构建。

#### (二) 培养基

实验过程中基本培养基为 LB、M9。LB 培养基 (为每升中含): 10.0g polypepton (日本制药株式会社), 5.0g 酵母抽提物 (Oxid, B.R.), 10g NaCl (A.R)。M9 培养基成份 (g/L): 6.0g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3.0g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5g NaCl, 1.0g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2ml 1mol/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.1ml 1mol/L  $\text{CaCl}_2$ 。

### (三) 发酵

在 LB(含 60 $\mu$ g/ml 青霉素) 琼脂平板上挑一环菌接种于 2ml LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 摇床 (Series 25 Incubator Shaker, NBS, N. J., USA) 培养 12 小时, 振荡速度为 250r/min, 取 1ml 试管种子接入 200ml LB/500ml 三角瓶中, 于摇床上振荡培养, 培养条件同上。12 小时, 当 OD<sub>600</sub> 约 1.2 时接入 15L 发酵罐, 装培养基 10L, 通气量和搅拌转速由溶解氧控制系统调节。发酵过程操作参数的控制按实验方案进行。

### (四) 发酵过程分析

#### 1. 每隔 1 小时取样, 样品稀释后于

OD<sub>600</sub> 测定细胞生长量, 样品经离心后上清液用于葡萄糖浓度的分析。分析葡萄糖浓度的方法为 Fehling 热滴定法<sup>[4]</sup>。

2. 重组质粒稳定性的分析: 样品经充分振荡适当稀释后涂布于 LB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 10 小时, 随机挑 50 个左右单菌落点种于 LA(LB+60 $\mu$ g/ml Amp) 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 10 小时, 计算 LA 平板上的菌落数。每一样品取三次重复涂布的菌落数。重组质粒的稳定性定为 ST, 其值为 LA 平板上活细胞菌落数与 LB 平板上活细胞菌落数的比值。

3.  $\gamma$ -干扰素表达量的测定: 取 1ml 发酵液离心, 去上清液, 用 1ml PBS 清洗二次, 去上清液, 加 100 $\mu$ l 7mol/L 盐酸胍, 充分振荡, 4 $^{\circ}$ C 冰箱存放 2 小时, 离心, 上清液再用 PBS 稀释 10 倍, 用病毒病变抑制法 (WISH/VSV 系统) 测定  $\gamma$ -干扰素生物活性。另取 1ml 发酵液菌体, 加入 200 $\mu$ l 蛋白电泳样品缓冲液, 充分振荡, 用 SDS-PAGE 电泳系统 (分离胶浓度为 14.5%, 浓缩胶浓度为 4.5%) 分析  $\gamma$ -干扰素的表达水平。

## 结 果 和 讨 论

### (一) 培养基组成对 *E. coli* K802(pLY-4) 生长和 $\gamma$ -干扰素表达的影响

培养基的选择要考虑到两个方面的因素, 既要提高工程菌的生长速率, 又要保持重组质粒的稳定性, 使外源基因高效表达。我们从常规发酵培养基出发, 选择培养基的组成, 摇瓶培养的结果列于表 1。在 M9 中补充 LB 培养基, 不仅可以提高工程菌的细胞浓度, 同时也大幅度提高了  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 表达的浓度。从 IFN- $\gamma$  表达水平来看, 补充 LB 培养基, 细胞的比生长速率增加, 并没有使 IFN- $\gamma$  表达水平下降, 尤其当使用复合培养基, 无机盐浓度适当调整后,  $\gamma$ -干扰素的相对浓度达 4.2, 表达水平接近工程菌在 M9 培养基中的水平。

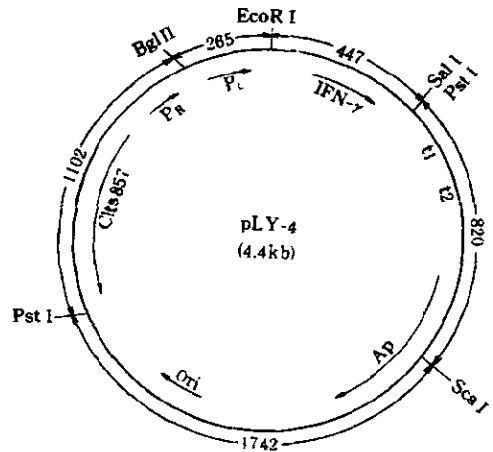


图 1 pLY-4 质粒的结构

Fig. 1 Structure of pLY-4 plasmid

表 1 培养基组成对 *E. coli* K802(pLY-4) 细胞生长和  $\gamma$ -干扰素表达的影响  
Table 1 Effect of components of culture media on growth of cell and expression of IFN- $\gamma$  by *E. coli* K802(pLY-4)

培养基组成 Components of culture medium	比生长速率 Specific growth rate	细胞相对浓度 * Relative concentration of cell	$\gamma$ -IFN 相对表达浓度 * Relative Concentration of IFN- $\gamma$	$\gamma$ -IFN 相对表达水平 * Relative expression level of IFN- $\gamma$ (%)
Mg+CAA	0.32	1.6	1.4	95
Mg+10%LB	0.36	1.8	1.6	95
LB	0.43	2.8	2.4	90
Mg+LB	0.56	3.8	3.3	90
Modified(Mg+LB)	0.67	4.6	4.2	95

\* 相对浓度为相对 *E. coli* K802(pLY-4) 在 M9 培养基的浓度。

Relative concentration is the the ratio of concentration in M9 mudium to that in experimental culture medium.

经过以上实验, 我们确定了发酵生产工艺中培养基的组成为 M9 加 LB。

## (二) 热诱导程序对 *E. coli* K802 (pLY-4) 生长和 $\gamma$ -干扰素表达的影响

大肠杆菌 K802(pLY-4) 中  $\gamma$ -干扰素基因的表达受  $\lambda$  噬菌体温敏突变的 CI857 免疫基因控制, 因此整个发酵分两个阶段, 前期温度控制在 30 °C, 此时细菌细胞正常合成阻遏蛋白, 使  $\gamma$ -干扰素基因的表达受到阻遏而有利于菌体生长及重组质粒的稳定。发酵后期升温至 42 °C 使阻遏蛋白失活,  $\gamma$ -干扰素开始合成。从图 2 可知, 工程菌在 30 °C 培养时, 不表达 IFN- $\gamma$ , 当细菌经热诱导后,  $\gamma$ -干扰素开始大量合成。过量的表达产物形成及其细胞内生理条件的限制, 在细胞内形成包涵体 [5,6], 它们对细胞的生长和质粒的稳定性产生一定的影响 [7,8]。因此升温的时间选择要合理, 一般选择在对数生长期中后期, 这样不仅能提高整个细胞密度, 又能提高 IFN- $\gamma$  的表达量。

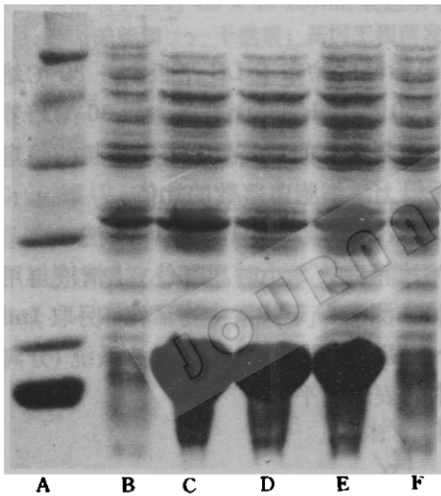


图 2 发酵过程中  $\gamma$ -干扰素的表达情况

A. 标准分子量蛋白; B. 热诱导前; C. 热诱导后 3.0h;  
D. 热诱导后 2.0h; E. 热诱导后 1.0h; F. 热诱导后 0.1h

Fig. 2 Expression of IFN- $\gamma$  during fermentation process of thermo-induction

A. Protein MW markers; B. Before thermo-induction;  
C. 3.0 h after thermo-induction; D. 2.0 h after thermo-induction;  
E. 1.0 h after thermo-induction; F. 0.1 h after thermo-induction

热诱导的升温程序对工程菌的生长及  $\gamma$ -干扰素基因的表达影响很大, 图 3 反映出突然热冲击对细胞的损伤作用, 这表现在突然升温后, 细胞的生长速率和质粒的稳定性明显低于逐步升温, 致使后期细胞密度和  $\gamma$ -干扰素表达量相应地下降。

## (三) pH 对工程菌 K802(pLY-4) 生长和产物的影响

采用两阶段培养工艺, 前期着重于优化工程菌最佳的生长条件, 后期着重于优化 IFN- $\gamma$  表达的条件。基于上述考虑, 我们对发酵过程 pH 操作参数进行了较系统的研究。在发

酵过程中 pH 的变化由工程菌的代谢、培养基的组成和发酵条件所决定。细胞自身具有一定调节能力但当外界条件变化过于激烈时, 细胞失去自身调节能力而影响细胞的正常生长。图 4 分别为 pH7.0、pH6.5、pH6.0 时, 工程菌 *E. coli* K802(pLY-4) 细胞生长及  $\gamma$ -干扰素表达情况, 图 5 为 pH 对细胞生长速率影响曲线。

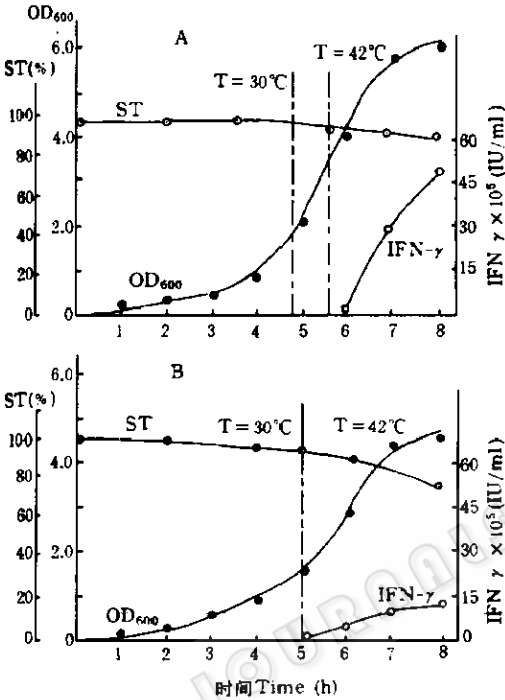


图 3 热诱导过程对细胞代谢的影响

A. 逐步升温热诱导; B. 一步升温热诱导

Fig. 3 Effect of temperature induction on metabolism of *E. coli* K802(pLY-4) in fermentation process  
A. Gradual thermo-induction; B. One step thermo-induction

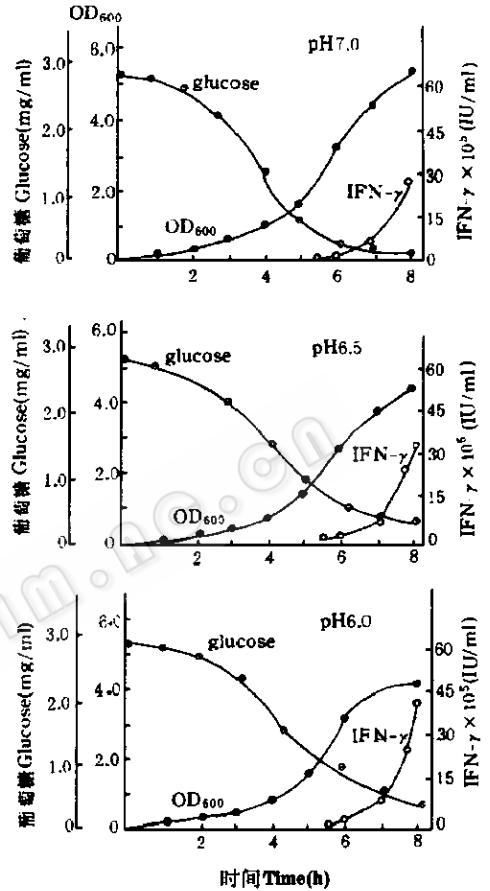


图 4 pH 对工程菌细胞代谢的影响

Fig. 4 Effect of pH on metabolism on *E. coli* K802(pLY-4) in fermentation process

由以上实验可知, 细胞生长的最佳 pH 值在 6.8 左右, 而  $\gamma$ -干扰素的表达的最佳 pH 约为 6.0, 故整个发酵过程就有两个 pH 操作范围。根据实验结果, 我们设计了 pH 调节顺序, 发酵前期, pH 控制在 6.8 左右, 当开始热诱导时, 关闭碱泵, 由于细胞自身代谢的结果, pH 值逐步下降, 当降至 6.1 时, 重新启动碱泵, 采用 pH 调节序列, 避免了环境 pH 激烈变化对细胞生长和代谢的不利, 细胞生长的密度达到了 6.0 ( $\text{OD}_{600}$ ) 以上,  $\gamma$ -干扰素的表达量达  $4.0 \times 10^6$  IU/ml, 表达水平占菌体蛋白的 55% (电泳扫描)。

#### (四) 发酵过程中溶解氧浓度对细胞生长和 $\gamma$ -干扰素表达的影响

*E. coli* K802(pLY-4) 发酵时, 随着溶氧 (DO) 浓度的下降, 细胞生长减缓, ST 值下降, 尤其在  $\text{IFN-}\gamma$  表达期, 随着 DO 浓度下降, ST 值下降幅度更大。外源基因高水平的转录和转译, 细胞需要大量的能源代谢<sup>[9]</sup>, 以促进细胞的呼吸作用, 提高对氧的需求, 因此

维持高水平的溶解氧浓度 (DO 在 65% 左右), 能提高带有重组质粒的细胞生长。图 6 为发酵过程中 DO 的瞬时下降对细胞代谢的影响, 可以看出 DO 的瞬时下降对细胞生长和重组质粒稳定性都能产生了一定的负作用。

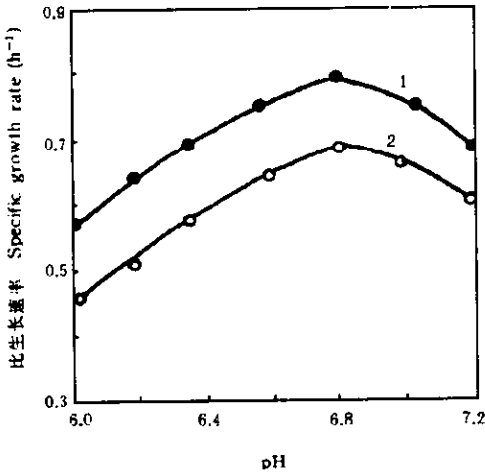


图 5 pH 对工程菌细胞生长的影响

1. 热诱导后生长; 2. 热诱导前生长

Fig. 5 Effect of pH on cell growth rate of *E. coli*

K802 (pLY-4) in fermentation process

1. Growth after thermoinduction;

2. Growth before thermo-induction

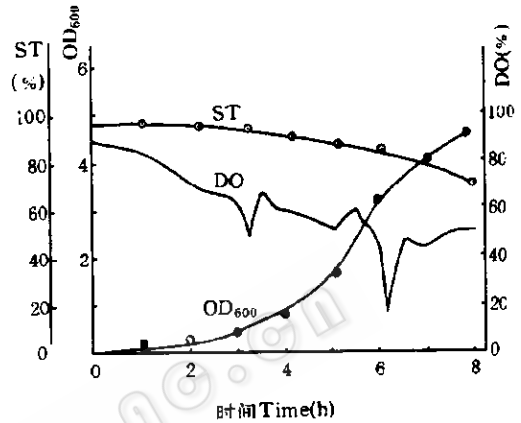


图 6 溶解氧浓度对细胞代谢的影响

Fig. 6 Effect of DO concentration to metabolism on cells of *E. coli* K802 (pLY-4) in fermentation process

### (五) 补料工艺的初步研究

工程菌在培养过程中, 产物的合成量直接与细胞密度有关。提高带有重组质粒细胞的密度, 保持细胞的比生长速率, 相应地  $\gamma$ -干扰素表达量也就增加。工程菌经热诱导, 大量合成  $\gamma$ -干扰素, 细胞代谢旺盛, 需消耗大量的营养物, 图 4 也反映出热诱导时, 培养基中残糖浓度已低于 0.8mg/ml。营养物质的缺乏限制了后期细胞的生长和产物的表达。

我们研究了在培养过程中, 进行葡萄糖或复合培养基补料以及不同的补料方式, 其结果见表 2。方法 I、II 仅补葡萄糖, 方法 I 为仅在升温诱导后补料, 方法 II 为热诱导前后分两次补料, 其补料量与方法 I 相同。方法 III、IV 为补加复合培养基, 补加分式与方法 I、II 相同。通过复合培养基的补料, 细胞密度比不补料时增加了二倍多,  $\gamma$ -干扰素的产量相应地提高了二倍。

表 2 补料对细胞生长和 IFN- $\gamma$  产量的影响

Table 2 Effect of adding medium on growth of *E. coli* K802 (pLY-4) and production of IFN- $\gamma$

补料方法 Method of adding medium	细胞浓度 Density of cells(OD <sub>600</sub> )	IFN- $\gamma$ 产量 Production of IFN- $\gamma$ (U)	IFN- $\gamma$ 表达水平 Expression level of IFN- $\gamma$ (%)
I	7.6	4.6 $\times$ 10	50
II	8.8	5.4 $\times$ 10	50
III	12.2	6.8 $\times$ 10	55
IV	14.0	8.7 $\times$ 10	55

在采用补料工艺时, 由于营养条件的改善, 细胞生长速率增大, 耗氧增加, 致使 DO 浓度大幅度下降, DO 成为限制性基质。由于发酵罐本身的传质特性, 供氧速率此时已小于细胞耗氧速率, 若以后的工艺中采用流加 (Fed-Batch) 操作方式, 适当补充纯氧, 提高发酵罐传质性能, 对于提高细胞的生长速率和 IFN- $\gamma$  表达都是值得进一步探索的。

## 结 论

利用基因工程大肠杆菌 K802(pLY-4) 生产 HuIFN- $\gamma$  的发酵过程受控于下列因素: 培养基组成、温度、pH 值和溶解氧浓度。采用复合培养基能明显提高细胞的比生产速率和 IFN- $\gamma$  产量。温度的顺序变化有利于受体细胞的生长, 避免热冲击对受体细胞的损伤, 提高重组质粒的稳定性, 经发酵温度和 pH 调节序列的操作, 同时 DO 控制在 65% 饱和度, 在复合培养基上发酵, 细胞密度达 6.0(OD<sub>600</sub>) 以上, IFN- $\gamma$  表达量达  $4.0 \times 10^6$  IU/ml。通过补料, 细胞密度和 IFN- $\gamma$  合成量都增加了二倍。中密度, 高表达的发酵工艺不仅有利于发酵操作, 而且有利于 IFN- $\gamma$  下游纯化。

## 参 考 文 献

- [1] Gray, P. W. et al.: *Nature*, 295:503, 1982.
- [2] Devos, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10:2487, 1982.
- [3] *Biotechnology News*, 9:13, 1989.
- [4] 蔡武城: 生物物质常用化学分析法, 第 115—118 页, 科学出版社, 北京, 1982 年。
- [5] David, L. et al.: *Bio/Technology*, 9:443—448, 1991.
- [6] James, F. et al.: *TIBTECH*, 6:95—101, 1988.
- [7] Steuber, D. et al.: *EMBO. J.*, 1: 1982.
- [8] 李永红等: 生物工程学报, 4(2):81—86, 1988.
- [9] Siegel, R. et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 28—33, 1985.

## STUDIES ON FERMENTATION PROCESS OF HUMAN RECOMBINANT INTERFERON- $\gamma$ (HU-rIFN- $\gamma$ )

Zhou Yongchun Liu Dengqi Pu Zhaowei Lu Deru

(*Institute of Medical Biotechnology and Molecular Genetics, Second Military Medical University,  
Shanghai 200433*)

Liu Xinyuan Wang Zixuan

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

Wang Qisong

(*Genetics Institute, Fudan University, Shanghai 200433*)

After analysing the fermentation process of Hu-rIFN- $\gamma$  by *E. coli* K802(pLY-4), it was found that complex medium (LB+M9) was suitable both for cell growth and IFN- $\gamma$  expression. High level of dissolved oxygen in fermentation process, gradually raising temperature in thermo-induction and controlling pH value on growth stage and IFN- $\gamma$  synthesis stage at 6.8 and 6.2 respectively were favourable for maintaining the stability of recombinant plasmid and high level expression of IFN- $\gamma$ . In these conditions the level of expression and activity of IFN- $\gamma$  could be reached to  $4.0 \times 10^6$  IU/ml, about 55% of total protein.

**Key words** Human recombinant interferon- $\gamma$ ; Fermentation by recombinant *E. coli*