

文章编号: 1006-3080(2026)03-0325-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250915001

大肠杆菌生产携带多拷贝重复序列的 DNA 疫苗的发酵工艺

赵 莉¹, 杨建业², 刘 琴², 鲍恩东¹, 邵 帅²

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 华东理工大学生物工程学院,
生物反应器工程全国重点实验室, 上海 200237)

摘要:携带多拷贝 CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) 序列的 DNA 疫苗在水生动物疾病防控领域展现出巨大潜力, 但其规模化生产工艺仍是制约产业化的关键瓶颈。本研究以重组大肠杆菌 Stb13 为工程菌, 对携带多拷贝重复序列的质粒 DNA 疫苗发酵工艺进行了优化。通过摇瓶实验筛选确定葡萄糖为最适的碳源种类, 最佳质量浓度为 5 g/L; 在 5 L 发酵罐中对接种时机、接种量、溶氧水平、补料策略及温度诱导条件等进行了优化, 最终确认工艺条件为: 于对数中期按 4.5% 接种量接种、维持溶氧水平在 30%、并在发酵后期采用 42 °C 温度诱导。该工艺在 30 L 发酵罐中完成了验证, 最终菌体浓度 OD₆₀₀ 达到 42.3, 质粒产量提升至 178.6 mg/L。质粒纯化产物经质量检验: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值处于 1.8~2.0, 符合纯度要求; 宿主基因组 DNA 与 RNA 污染物含量(质量分数)均低于 1%; 质粒超螺旋占比(质量分数)不低于 80%, 目标多拷贝重复序列片段经 PCR 验证完整性良好。动物实验表明, 该 DNA 疫苗表现出良好的生物安全性; 免疫攻毒实验保护率达到 70% 以上。利用重组大肠杆菌 Stb13 对多拷贝重复序列质粒的发酵工艺优化为水产 DNA 疫苗的产业化发展提供了应用基础。

关键词:大肠杆菌 Stb13; 多拷贝重复序列; 发酵优化; 质粒稳定性; 虹鳟免疫

中图分类号:Q815

文献标志码:A

随着全球鱼类养殖业的快速发展, 传染性病害已经成为制约该行业健康持续发展的重要因素之一。传统鱼类疫苗主要依赖灭活病毒或其组分, 存在制备成本高、免疫效果不稳定等局限性^[1]。因此, 开发高效、安全的鱼类 DNA 疫苗成为当前研究的热点。自 20 世纪 80 年代起, 鱼类疫苗已在养殖业中广泛应用, 其中以灭活菌苗为主, 基因工程重组疫苗较少^[2-3]。1996 年, 针对传染性造血器官坏死病毒(IHNV)的 DNA 疫苗首次被报道, 该疫苗通过携带 IHNV G 基因的质粒免疫虹鳟, 显示出了良好的保护效果^[4]。2005 年, 加拿大批准首款 IHNV DNA 疫苗作为新型兽药。2007 年, 首个水产用 DNA 疫苗正式

获批, 推动了相关研究进入新的阶段^[5]。DNA 疫苗的应用显著提高了鱼类的存活率和养殖产量, 但其在大规模生产上仍面临着质粒产量低、免疫原性不足等问题。

多拷贝重复序列设计是提升 DNA 疫苗免疫效果的关键策略之一。该结构能够显著增加抗原表达量, 提供更强的抗原刺激; 其中未甲基化的 CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) 序列还可通过激活 Toll 样受体 9 (TLR9) 信号通路, 促进炎症因子和干扰素分泌, 增强先天免疫应答^[6-8]。鱼类免疫系统以先天免疫为主, 尤其在低温环境下适应性免疫较弱, 多拷贝重复序列片段可以模拟病原体信号, 有效弥补了

收稿日期: 2025-09-15

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC2812102)

作者简介: 赵 莉(1982—), 女, 江苏泰州人, 硕士生, 高级兽医师, 主要研究方向: 新型疫苗研制。E-mail: 383196331@qq.com

通信联系人: 鲍恩东, E-mail: b_endong@njau.edu.cn; 邵 帅, E-mail: shaoscott@ecust.edu.cn

引用本文: 赵 莉, 杨建业, 刘 琴, 等. 大肠杆菌生产携带多拷贝重复序列的 DNA 疫苗的发酵工艺 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2026, 52(3): 325-334.

Citation: ZHAO Li, YANG Jianye, LIU Qin, *et al.* Fermentation Process of *Escherichia coli* Producing DNA Vaccine with Multiple Copies of Repetitive Sequences[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(3): 325-334.

这一缺陷。然而,多拷贝重复序列在质粒扩增过程中易发生同源重组,导致序列缺失或重排。DH5 α 菌株最常被提及的特征之一是其 *recA1* 突变,这个突变确实削弱了 RecA 蛋白的功能,使其成为一种“重组缺陷型”菌株。然而,与大肠杆菌 Stb13 中的 *recA13* 突变相比,*recA1* 对同源重组的抑制可能并不彻底。DH5 α 细胞内可能仍然保留了所有进行同源重组所需的酶系统,细胞内残余的 RecA 活性以及其他 RecA 非依赖性重组途径,在面对质粒上存在大量、完整的重复序列底物时,依然能够催化重组。已有实验研究直接支持了这一观点,Rohilla 等^[9] 在尝试扩增一个含有 20 个 GGGGCC 六核苷酸重复序列的质粒时,使用 DH5 α 菌株进行扩增以失败告终,而其他更稳定的菌株如 Stb13 则表现更优。这表明 DH5 α 的重组抑制能力确实不足以应对这类高强度的重组挑战。而菌株 Stb13 在质粒稳定性和产量方面表现更优,因此特别适用于多拷贝重复序列 DNA 疫苗的大规模制备^[10]。

相较于 DH5 α 、BL21 等常用生产菌株,Stb13 在高密度发酵过程中的生长代谢特性、质粒稳定性的动态变化以及关键工艺参数等的优化尚缺乏系统性的探索。因此,本研究旨在系统评估 Stb13 菌株在发酵水平生产携带多拷贝重复序列的 DNA 疫苗的工艺潜力。本文考察了培养基组成、接种策略及供氧水平等关键工艺参数对重组大肠杆菌 Stb13 发酵过程及其质粒产量的影响,并在 30 L 发酵规模下对优化后的培养条件进行了验证。本研究可为含有多拷贝重复序列片段的 DNA 疫苗在规模化生产中的稳定性问题提供关键数据支撑和可行的工艺方案。

1 实验材料与方法

1.1 原料及仪器

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Stb13 购自上海碧云天生物技术股份有限公司,本研究所用的 pcDNA3.1(+)-CpG 质粒是以商业化载体 pcDNA3.1(+) 为骨架进行构建,使用卡那霉素抗性基因替换氨苄青霉素抗性基因,添加 Kozak 翻译增强元件和 CpG 序列。该质粒的一个核心特征是:将一个总长度为 492 bp、由 3 个 CpG 基序的重复单元所组成的片段插入至 fl-ori 元件的下游。该设计旨在利用多拷贝 CpG 序列作为分子佐剂,以增强 DNA 疫苗的免疫原性。转化了带有 pcDNA3.1 (+)-CpG 的重组大肠杆菌 Stb13 由本实验室构建、保藏^[11]。

1.1.2 实验仪器 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司 SW-CJ-1FD 型),恒温摇床(太仓医疗器械厂

THZ-703A 型),可见分光光度计(上海精科实业有限公司 721G 型),稳压电泳仪(上海天能科技有限公司 EPS300 型),5 L、30 L 生物反应器(上海国强生化工程装备有限公司 FMG-5L、FUS-30L 型),立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂 LDZX-75L 型)。

1.1.3 培养基 LB (Luria-Bertani) 培养基配方为:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L。在此基础上,通过以下方式制备不同功能的培养基:添加 15 g/L 琼脂,配制 LB 固体培养基;分别添加 3 g/L 不同类型的碳源(如葡萄糖、甘油、蔗糖),制备得到 LB+单一类型碳源的系列培养基;针对特定碳源(葡萄糖),设置不同质量浓度梯度(1~9 g/L)进行添加,制备得到 LB+梯度浓度碳源的培养基。发酵罐用培养基为:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 5 g/L、葡萄糖 5 g/L、MgSO₄·7 H₂O 2.05 g/L、KH₂PO₄ 2 g/L、K₂HPO₄ 4 g/L、Na₂HPO₄ 2.75 g/L;葡萄糖补料溶液:600 g/L。

1.1.4 健康易感虹鳟 实验用 5~15 g 健康易感虹鳟幼鱼由甘肃某渔场提供。健康易感虹鳟幼鱼标准:(1)体表完整、腹部无肿胀等异常症状;(2)游动正常,摄食正常;(3)鱼便颜色正常,无白便等异常症状^[12]。

1.1.5 毒株 传染性造血器官坏死病毒 IHNV-GS21 株由本实验室提供、保藏^[11]。

1.2 实验方法

1.2.1 种子活化 将保存的重组大肠杆菌甘油管种子划线接种于含有卡那霉素抗性的 LB 固体平板中,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 14~16 h。随后挑取平板中的单菌落,接种至质量浓度为 50 mg/L 卡那霉素抗性的 5 mL LB 液体培养基中,随后置于温度 37 ℃、转速 220 r/min 的恒温摇床中培养 12 h。

1.2.2 摇瓶培养 将种子培养液按照 1% 的接种量接种至装有 300 mL 摇瓶培养基(含有终质量浓度为 50 mg/L 的卡那霉素抗性)的 1000 mL 摇瓶中。随后置于 37 ℃、转速 220 r/min 的恒温摇床中培养 12 h,培养结束后取样分别进行菌体浓度和质粒产量的测定。

1.2.3 发酵罐培养 于 5 L 发酵罐中加入 3 L 发酵培养基,121 ℃ 灭菌 30 min,按不同的接种量接入摇瓶培养液。发酵过程中用浓氨水调节 pH 为 7.0,通过控制通气量和搅拌转速控制发酵液的溶氧(DO, %)维持不同的水平。补料分批培养过程:当发酵至 22 h 时开始流加葡萄糖补料溶液,补料过程中依据发酵液的 DO 和 pH 变化情况不断调整补料流加速率,始终保持发酵液中的葡萄糖浓度为零,直至发酵结束。分批培养过程:不改变发酵条件,持续培养直至

发酵结束^[13]。

于30 L发酵罐中装入20 L发酵培养基,121℃灭菌30 min,按4.5%的接种量接入摇瓶种子液。设置通气量为1 vvm,通过调整搅拌转速维持发酵液DO不低于30%。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体浓度的测定 将发酵液稀释适当倍数,以去离子水为对照,使用分光光度计在600 nm处进行比色测定,根据稀释倍数计算最终的菌体浓度。

1.3.2 质粒产量的测定 取适量体积的菌液,使用诺唯赞生物科技股份有限公司提供的质粒提取试剂盒进行质粒的纯化分离;取适量待检样品用磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH = 6.8)稀释适当倍数,取稀释后的待检样品装入石英超微量比色皿中,测定在波长为260 nm处的吸光度值,每个样品重复测量3次,取平均值。质粒产量 $\rho=50OD_{260}\times n$,其中 n 为稀释倍数。

1.3.3 质粒纯度的测定 取适量待检样品用PBS溶液稀释适当倍数,取稀释后样品装入石英超微量比色皿中,分别测定在波长为260、280 nm处的吸光度值,每个样品重复3次,取平均值,样品DNA纯度以 OD_{260}/OD_{280} 的比值表示,结果在1.8~2.0之间认定样品DNA纯度较好。

1.3.4 基因组DNA和RNA污染检测 制备含有溴化乙锭(终质量浓度10 ng/mL)的1.0%(琼脂质量浓度为10 g/L,下同)琼脂凝胶;将待检样品用PBS稀释至浓度0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;取9 μL 稀释后的待检样品,加入1 μL 10 $\times$ Loading buffer,混匀后注入凝胶孔内,每个样品重复3次,电压120 V,电泳时间45~60 min,至电泳条带清晰。用凝胶成像系统观察电泳结果,获取电泳图,分析软件分别计算每批污染杂质基因组DNA和RNA图像映像点(pixel)跟样本DNA质粒图像映像点比值表示,基因组DNA和RNA污染物含量(质量分数,下同)不得超过1.0%。

1.3.5 超螺旋质粒百分比测定 制备含有溴化乙锭(终质量浓度10 ng/mL)的琼脂凝胶(1.0%);将待检样品用PBS稀释至质量浓度为0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;取稀释后的待检样品9 μL ,加入1 μL 10 $\times$ Loading buffer,混匀后注入凝胶孔内,每个样品重复3次,电压120 V,电泳时间45~60 min,至电泳条带清晰。用凝胶成像系统观察电泳结果,获取电泳图,再以相应的分析软件计算超螺旋体DNA质粒在总DNA质粒中的百分比,超螺旋占比(质量分数,下同)应不低于80.0%。

1.3.6 序列完整性 通过质粒PCR(Polymerase Chain Reaction)方法对pcDNA3.1上的多拷贝重复序列

CpG片段(492 bp)进行验证,引物序列如下: Forward sequence (5'→3'): CCTCTGAAAGAGGAAGTGGTTAGGTAC; Reverse sequence (5'→3'): CCTAACTGACACACATTCCACAGCT。本研究使用的特异性引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

PCR反应结束后,取5 μL 产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,并在凝胶成像系统下观察条带。

1.3.7 DNA疫苗安全性检测 实验用鱼见1.1.4节健康易感虹鳟标准。将100尾的健康易感虹鳟幼鱼禁食48 h后,随机分为两组,每组50尾;用50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三卡因浸泡麻醉,实验组每尾鱼各经背部肌肉注射DNA疫苗50 μL (20 μg),重复3组实验^[11,14];对照组每尾各经背部肌肉注射生理盐水50 μL 。免疫后禁食48 h,连续观察14 d,记录虹鳟摄食、游动、死亡情况,养殖水温控制在12~15℃^[15]。

1.3.8 DNA免疫攻毒效果检测 实验用鱼见1.1.4节健康易感虹鳟标准。免疫组每组随机取用5~15 g健康易感虹鳟60尾,各经背部肌肉注射DNA疫苗25 μL (10 μg),重复3组实验^[14];另取条件相同的虹鳟60尾,各经背部肌肉注射生理盐水25 μL ,作为对照;免疫前后禁食48 h。免疫28 d后,随机选取50尾免疫组虹鳟和50尾对照组虹鳟,各经腹腔注射IHNV GS21株病毒液100 μL (10^3 TCID₅₀/尾)^[11],攻毒后停止喂食,连续观察14 d,以特异性死亡数计算死亡率,养殖水温控制在12~15℃^[15]。

死亡虹鳟出现以下特征之一者,被判定为感染传染性造血器官坏死病毒导致的特异性死亡:(1)腹腔积液肿大、眼球突出、白便等异常症状;(2)脾脏充血肿胀、肠壁及腹腔膜出血^[12]。除特异性死亡外的其他死亡,均归入非特异性死亡。

1.3.9 统计学处理 数据作图使用GraphPad Prism 10.4.0软件进行分析。本文的实验数据均为3次平行实验后的统计数据,结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。实验数据分析采用t-检验法和方差分析。 $P<0.05$ 在统计学上认为有显著性差异(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$)。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶水平发酵条件优化

2.1.1 碳源种类的单因素实验 在微生物发酵过程中,碳源作为关键营养成分,对菌体生长及目标产物合成具有显著影响。为探究不同种类的碳源对于携带多拷贝重复序列质粒的大肠杆菌Stbl3生长及质粒产量的影响,本文以LB培养基为基础分别添加3 g/L

不同类型的碳源(葡萄糖、甘油、蔗糖),制备得到 LB+单一类型碳源的系列培养基,考察不同种类碳源对质粒产量的影响,实验结果如图 1 所示。相比于对照组的基础 LB 培养基,各实验组的菌体浓度与质粒产量均有显著提升,其中以葡萄糖为碳源的优化培养基质粒产量最高。因此确认以葡萄糖为基础碳源的培养基为大肠杆菌 Stb13 的最适碳源组分。

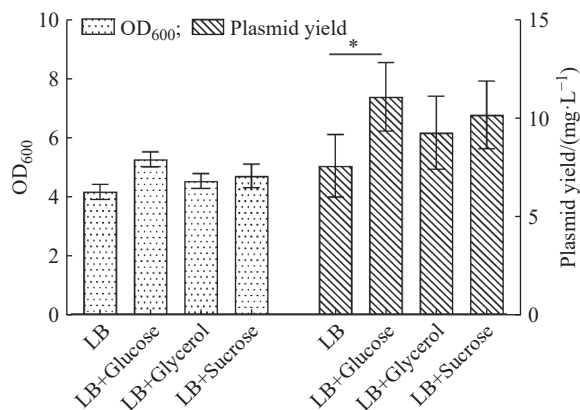


图 1 碳源种类对 OD₆₀₀ 与质粒产量的影响

Fig. 1 Effect of carbon source type on OD₆₀₀ and plasmid yield

2.1.2 碳源浓度的单因素实验 培养基中不同浓度碳源会导致菌体异常繁殖,对菌体的代谢、产物的合成及氧的传递产生不良影响,可能是由于其分解产物会对终产物合成产生抑制作用。因此,控制碳源的浓度也是非常重要的。需要根据具体的发酵工艺和菌种特性,优化碳源浓度来实现对发酵过程的精确控制。本文针对特定碳源葡萄糖设置不同质量浓度梯度(1~9 g/L),制备得到 LB+梯度浓度碳源的培养基,考察不同质量浓度碳源对质粒产量的影响。实验结果如图 2 所示,当碳源质量浓度为 5 g/L 时质粒产量最高。

2.1.3 生长曲线的测定 将种子液按上述筛选确定的最适碳源种类及质量浓度,1% 接种至装有 300 mL

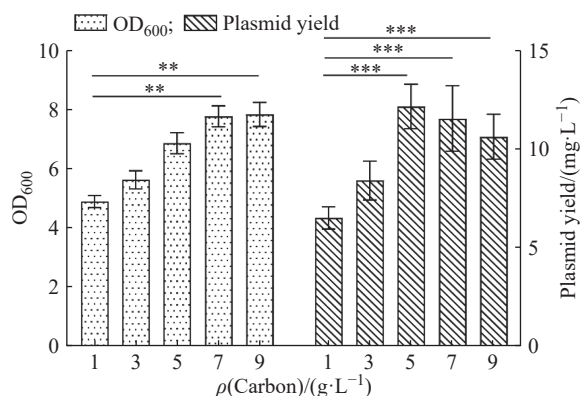


图 2 碳源质量浓度对 OD₆₀₀ 与质粒产量的影响

Fig. 2 Effect of carbon source mass concentration on OD₆₀₀ and plasmid yield

优化培养基的 1 L 摇瓶中;随后将摇瓶置于 37 °C 恒温摇床,以 220 r/min 的转速振荡培养 14 h。培养过程中,每 1 h 在无菌操作条件下取样,通过分光光度法测定菌液的 OD₆₀₀ 值,并据此绘制重组大肠杆菌 Stb13 的摇瓶生长曲线。由图 3 所示,重组大肠杆菌在优化培养基中培养 4~6 h 后进入指数生长期,培养至 11~14 h 时开始进入衰亡期。

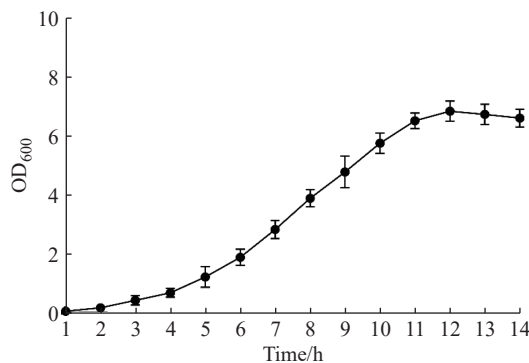


图 3 摇瓶生长曲线图

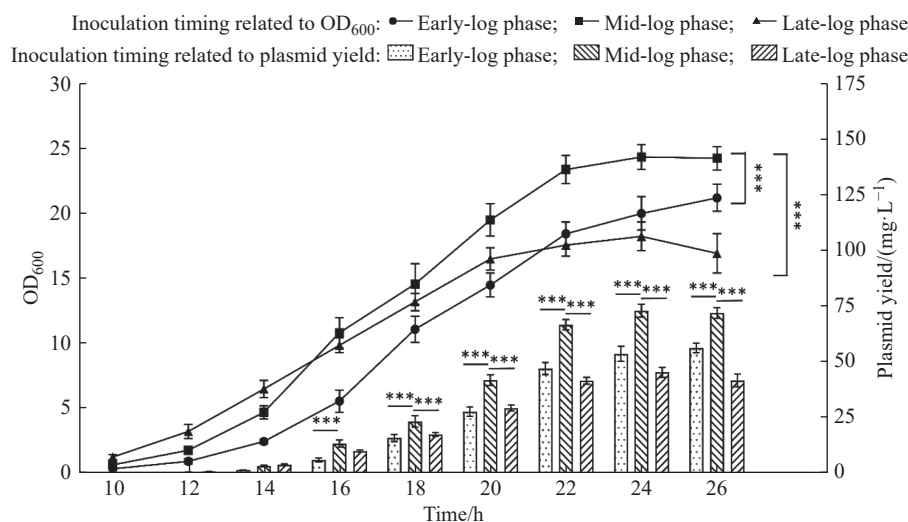
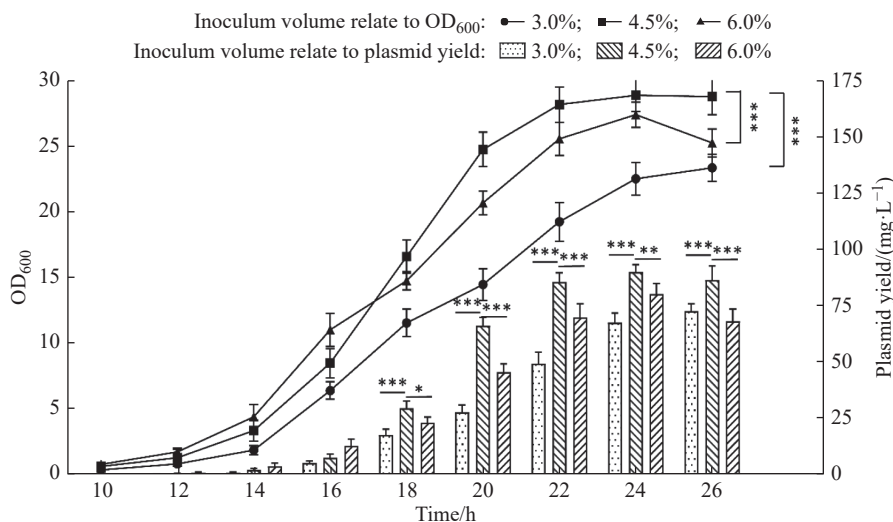
Fig. 3 Shake flask growth curve chart

2.2 5 L 反应器发酵培养实验

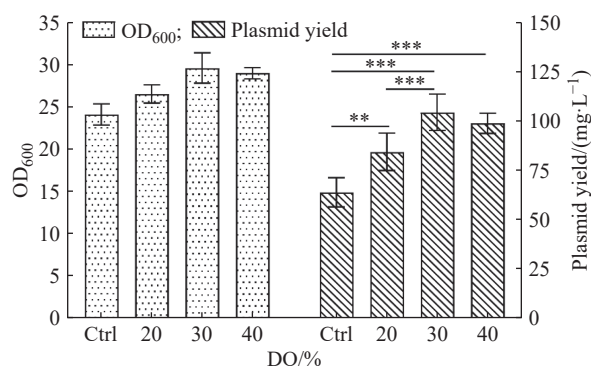
2.2.1 接种时机的确定 观察大肠杆菌 Stb13 在摇瓶中的生长曲线,选择 3 个时期作为实验组:发酵至 5 h 的对数前期、发酵至 8 h 的对数中期、发酵至 11 h 的对数后期。为考察接种时机对质粒产量的影响,将处于不同时期的菌液均以 3% 的接种量接种至 5 L 反应器中进行发酵,不同接种时机对 OD₆₀₀ 与质粒产量的影响如图 4 所示,以对数中期的菌液作为种子液进行发酵时,OD₆₀₀ 均高于其他两组实验,原因可能是由于对数前期种子细胞代谢通路未完全激活、环境适应能力弱,导致质粒合成滞后;对数后期细胞积累应激代谢物、资源优先分配给生存维持,质粒合成效率下降;而对数中期细胞代谢活性较为旺盛,资源分配均衡,故菌体浓度与质粒产量最优。因此,实验将以对数生长中期作为重组大肠杆菌 Stb13 培养的最适接种时机。

2.2.2 接种量的确定 将重组大肠杆菌 Stb13 培养 8 h 至对数生长中期,随后按 3.0%、4.5%、6.0% 的接种量接种于 5 L 反应器中培养,每 2 h 进行取样,测量 OD₆₀₀ 及质粒产量,结果如图 5 所示,4.5% 接种量的实验组中菌体浓度及质粒产量均处于最高;3.0% 低接种量因菌体生长滞后、代谢资源积累不足等限制质粒总量;6.0% 的高接种量导致碳源消耗过快、有机酸积累及代谢负荷过载最终抑制质粒合成。因此最终确认 4.5% 为最适接种比。

2.2.3 DO 水平对菌体生长和质粒产量的影响 发酵过程中的 DO 水平是影响重组大肠杆菌生长及质粒

图4 接种时机对 OD_{600} 及质粒产量的影响Fig. 4 Effect of inoculation timing on OD_{600} and plasmid yield图5 接种量对 OD_{600} 及质粒产量的影响Fig. 5 Effect of inoculum volume on OD_{600} and plasmid yield

产量的关键参数之一,在生物反应器中可通过调节通气量与搅拌转速从而实现对培养环境中 DO 的控制。当 DO 维持在充足水平时,细胞可以通过高效的有氧呼吸将碳源彻底氧化,最大化生成 ATP 与 NADPH,为菌体的分裂、DNA 复制以及质粒复制所需的核苷酸前体合成提供充足的能量与物质基础;而 DO 不足会造成细胞的有氧呼吸受阻,能量代谢效率降低,菌体分裂速度下降;同时能量供应不足会直接限制质粒复制相关的“高耗能”过程,导致质粒拷贝数显著降低。本实验采用溶氧串联转速控制策略,分别维持 DO 水平为 20%、30%、40%,同时设置对照组:通气量 1 vvm、搅拌转速固定为 400 r/min。结果如图 6 所示,当 DO 水平稳定维持在 30% 时,菌体浓度与质粒产量均达到最高,故确定 30% 为重组大肠杆菌发酵的最适 DO 水平。

图6 DO 对 OD_{600} 与质粒产量的影响Fig. 6 Effect of DO on OD_{600} and plasmid yield

2.2.4 补料分批培养对质粒产量的影响 根据前文 5 L 发酵罐分批培养的研究结果,重组大肠杆菌 Stb13 在 5 L 反应器中培养 22 h 后进入衰亡期,本研究进一步设置补料分批培养与分批培养两组实验进

行对比,其中待重组大肠杆菌 Stbl3 培养 22 h 进入衰亡期后开始补加补料培养基,在补料阶段流加质量浓度为 600 g/L 的葡萄糖溶液并始终保持发酵液中的葡萄糖浓度为零;分批发酵则是不改变培养条件持续发酵 28 h 直至发酵结束。补料阶段每 1 h 在无菌操作下取样,测定 OD_{600} 值,并测定质粒产量,结果

如图 7 所示。补料分批培养自 22 h 开始补料后,重组菌 OD_{600} 与质粒产量均呈持续上升趋势,于 27 h 达到峰值;而分批培养因发酵后期碳源、氮源等关键营养物质耗尽,细胞生长停滞并进入衰亡期,有效菌体数量减少,最终 OD_{600} 仅为 24,质粒产量也随菌体活性下降而显著降低。

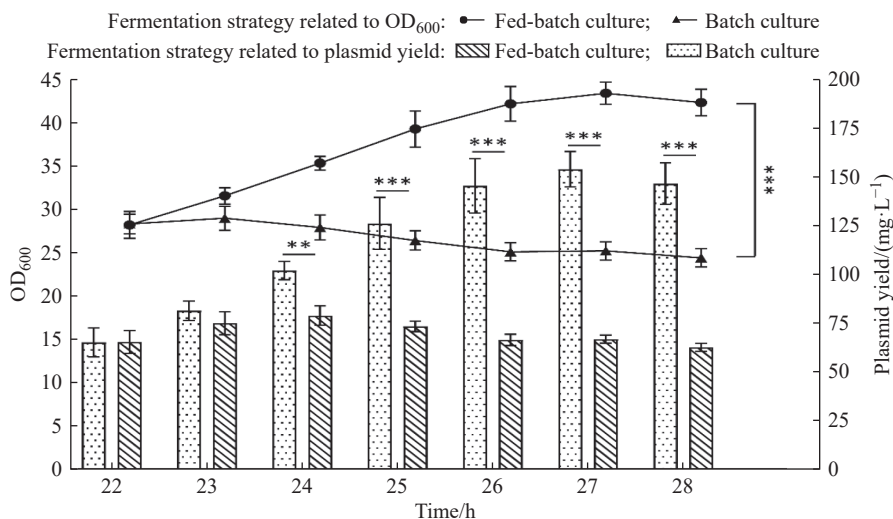


图 7 发酵策略对 OD_{600} 及质粒产量的影响

Fig. 7 Effects of fermentation strategies on OD_{600} and plasmid yield

2.2.5 变温控制对质粒产量的影响 有研究表明质粒的产生主要发生在对数生长后期与平稳期,发酵中后期将温度提升到 42 °C 可以提高单位菌体质粒产量^[16]。因此,本文依据重组菌在 5 L 发酵罐中的生长曲线,在优化培养基中先控制温度为 37 °C 进行补料分批培养,当发酵至 24 h、菌体进入生长中后期时,再于 42 °C 下诱导并继续培养。对照组全程于 37 °C 条件下继续发酵至培养结束。发酵结束后,取样测定 OD_{600} 值并对提取质粒 DNA 进行定量分析。结果如图 8 所示,经 42 °C 温度诱导后,质粒产量明显提高,表明升高温度有利于质粒拷贝数提高。

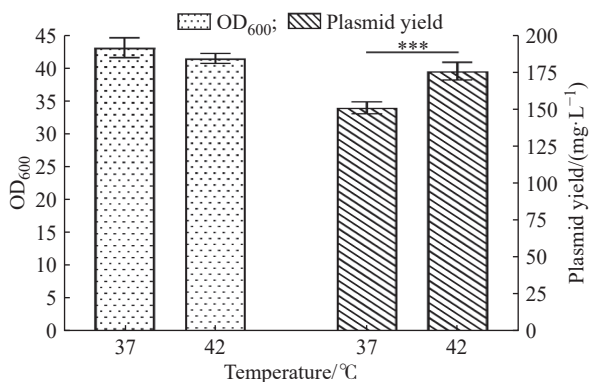


图 8 温度诱导对 OD_{600} 与质粒产量的影响

Fig. 8 Effect of temperature induction on OD_{600} and plasmid yield

2.3 30 L 反应器的发酵培养实验

基于以上优化实验得出发酵培养基成分为:胰蛋白胍 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 5 g/L、葡萄糖 5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 2.05 g/L、 KH_2PO_4 2 g/L、 K_2HPO_4 4 g/L、 Na_2HPO_4 2.75 g/L;葡萄糖补料溶液质量浓度为 600 g/L。接种时按照对数生长中期、4.5%的接种量进行接种。采用溶氧串联转速的补料分批培养方式,22 h 开始补料,培养至 24 h 将温度控制为 42 °C 进行温度诱导,直至 28 h 发酵结束。整个发酵阶段每 2 h 在无菌操作下取样,测定 OD_{600} 值,并测定质粒产量。结果如图 9 所示,发酵工艺优化后,重组大肠杆菌 Stbl3 最终获得的 OD_{600} 为 42.3,质粒产量为 178.6 mg/L。

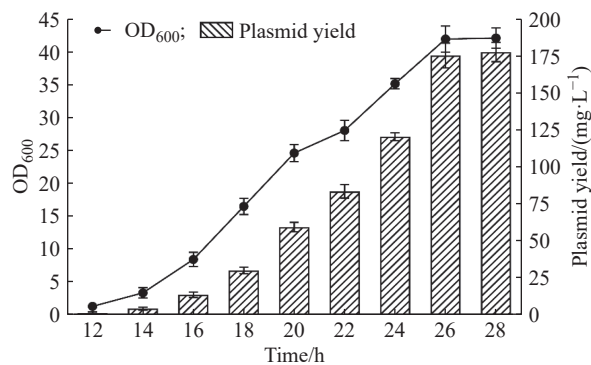


图 9 30 L 发酵体系下发酵工艺的验证

Fig. 9 Validation of fermentation process in a 30 L fermentation system

2.4 发酵产物的质量检测

将发酵所得菌液离心并收集菌体,通过碱裂解法和两步柱层析法得到纯净的质粒 DNA 溶液。

2.4.1 质粒产量测定 取适量纯化后的质粒 DNA 溶液,将待检样品用 PBS 稀释适当倍数,按照 1.3.2 节方法测定 OD₂₆₀ 值,结果如表 1 所示。工艺纯化后,质粒溶液在 260 nm 处的吸光度平均值为 0.1676,计算得到质粒产量为 419 mg/L。

2.4.2 质粒纯度测定 取适量纯化后的质粒 DNA 溶液,将待检样品用 PBS 稀释适当倍数,按照 1.3.3 节方法分别测定 OD₂₆₀ 值与 OD₂₈₀ 值,结果如表 2 所示。工艺纯化后,质粒溶液 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间,表明经纯化后的质粒溶液纯度较好。

2.4.3 基因组 DNA 和 RNA 污染检测 取适量纯化后的质粒 DNA 溶液,根据质粒产量的测定结果,将待检样品用 PBS 溶液稀释至质量浓度为 0.1 μg/μL,按照 1.3.4 节方法进行图像映像点 (pixel) 测定,实验重复 3 次,测定结果如表 3 和图 10 所示。基因组 DNA 和 RNA 污染物含量均不超过 1.0%,质粒 DNA 的纯度较高。

2.4.4 质粒超螺旋比例的测定 取适量纯化后的质粒 DNA 溶液,根据质粒产量的测定结果将待检样品

表 1 质粒产量测定结果

Table 1 Plasmid yield assay results			
Number	OD ₂₆₀	Average	Plasmid yield/(mg·L ⁻¹)
1	0.1682	0.1676	419
2	0.1684		
3	0.1662		

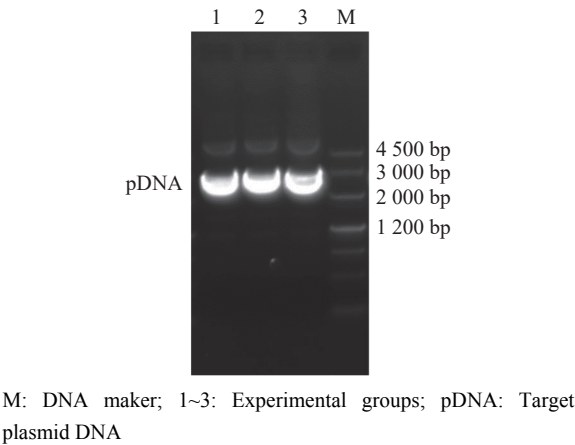
表 2 质粒纯度测定结果

Table 2 Plasmid purity assay results		
OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀
0.1682	0.0859	1.96
0.1684	0.0872	1.93
0.1662	0.0851	1.95

用 PBS 溶液稀释至质量浓度为 0.1 μg/μL,按照 1.3.5 节方法进行超螺旋比例图像映像点 (pixel) 的测定,实验重复 3 次,电泳结果如图 11 所示。在 4500 bp 处出现开环条带,在 2000~3000 bp 处出现超螺旋条带;通过数据分析软件得到超螺旋占比测定结果,如表 4 所示。3 次实验的超螺旋占比分别为 93.56%、93.83%、94.69%,均不低于 80%,证明主要产物均为超螺旋质粒 DNA。

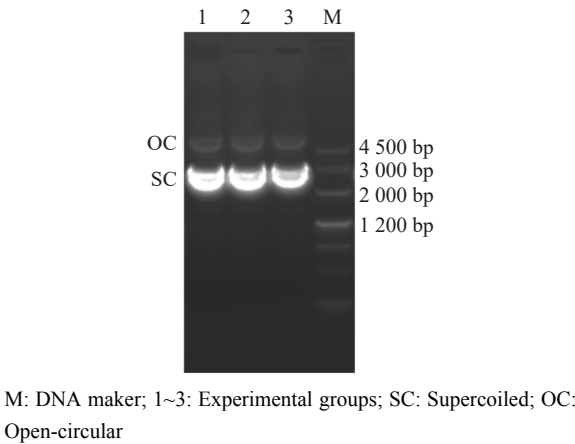
表 3 基因组 DNA 和 RNA 污染测定结果

Table 3 Genomic DNA and RNA contamination assay results					
Number	Pixel of plasmid DNA	Pixel of genomic DNA	Genomic DNA/%	Pixel of contaminant RNA	Contaminant RNA/%
1	17261.773	131.092	0.76	145.314	0.84
2	18943.359	174.849	0.92	121.728	0.64
3	16874.238	100.849	0.60	163.335	0.97



M: DNA maker; 1~3: Experimental groups; pDNA: Target plasmid DNA

图 10 基因组 DNA 和 RNA 污染电泳测定结果
Fig. 10 Electrophoresis results for genomic DNA and RNA contamination



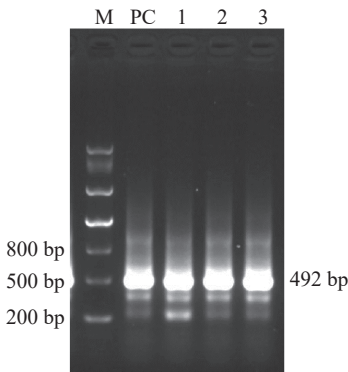
M: DNA maker; 1~3: Experimental groups; SC: Supercoiled; OC: Open-circular

图 11 超螺旋比例电泳测定结果
Fig. 11 Supercoiling electrophoresis results

表 4 超螺旋比例测定结果
Table 4 Superhelix ratio determination results

Number	Pixel of supercoiled (SC)	Pixel of opencircular (OC)	Supercoiled ratio/%
1	31457.79	2164.43	93.56
2	31047.21	2042.43	93.83
3	33482.59	1877.48	94.69

2.4.5 序列完整性验证 取适量纯化后的质粒 DNA 溶液,根据质粒产量的测定结果将待检样品用 PBS 溶液稀释至质量浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,按照 1.3.6 节方法进行检测,PCR 反应结果如图 12 所示。实验组均在 492 bp 处出现了较为明显的条带,与实际 CpG 片段大小相符,证明由 Stb13 扩增的多拷贝重复序列片段保留完整。然而,在扩增多拷贝重复序列时,在主条带下方出现一个更小且稳定存在的条带,可能是 DNA 聚合酶在扩增过程中在重复序列模板上发生“停顿”或“滑动”,产生与目的条带大小不一致的产物,或者由于多拷贝重复序列的存在,引物可能在重复序列内部的非目的位点结合,从而导致更短产物的扩增。进一步针对大小一致的目标条带进行纯化回收,测序表明序列正确。



M: DNA Maker; PC: Positive control; 1~3: Experimental groups

图 12 多拷贝重复序列电泳结果验证
Fig. 12 Verification of electrophoresis results for multiple copies of repeat sequences

2.5 免疫效果

2.5.1 DNA 疫苗的安全性 取制备好的质粒 DNA 疫苗,按照 1.3.7 节方法测定,结果如表 5 所示。免疫组存活率均不低于 98%,并且在观察期间没有出现摄食、游动等异常现象。

2.5.2 DNA 疫苗的免疫攻毒效果 取制备好的质粒 DNA 疫苗,按照 1.3.8 节方法测定,攻毒后停止喂食,连续观察 14 d,结果如图 13 所示。对照组在攻毒 5 d 后开始出现大量死亡,最终存活率不超过 20%,对照组的病鱼表现出疑似 IHNV 感染的症状,如白便、眼

表 5 DNA 疫苗免疫安全性评价
Table 5 Safety evaluation of DNA vaccine immunization

Number	Number of fish vaccinated in safety trial	Survival rate/%
Contrl	50	100
1	50	98
2	50	100
3	50	100

球突出,对病鱼进行剖析可以观察到明显的腹腔积液、脾脏充血肿胀等异常现象^[12]。而免疫组存活率均不低于 70%,免疫攻毒保护率分别为 76%、80%和 78%,表明 DNA 疫苗为虹鳟抵抗 IHNV 感染提供了有效免疫保护。

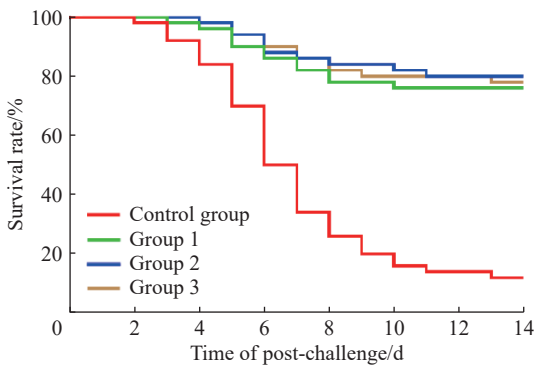


图 13 DNA 疫苗免疫虹鳟存活率
Fig. 13 Survival rate of DNA vaccine-immunized rainbow trout

3 结束语

本研究针对重组大肠杆菌 Stb13 发酵制备携带多拷贝 CpG 重复序列的 DNA 疫苗质粒的工艺参数进行了优化。通过从摇瓶至发酵罐水平的逐级条件优化,有效提升了发酵过程中的菌体浓度与质粒产量。首先摇瓶实验确定以 5 g/L 葡萄糖作为碳源时,有利于菌体生长及质粒合成。进一步在 5 L 发酵罐中优化培养参数,确认采用对数生长中期 (8 h) 菌液、按 4.5% 接种量接种,控制 DO 水平为 30%,并于发酵后期实施葡萄糖补料及 42 $^{\circ}\text{C}$ 温度诱导,可显著提高菌体浓度与质粒产量。最终在 30 L 发酵罐中进行工艺放大验证,菌体 OD_{600} 和质粒产量分别达到 42.3 和 178.6 mg/L 。

纯化后的质粒 DNA 经多项质量测定表明:其纯度良好 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值介于 1.8~2.0),基因组 DNA 与 RNA 污染均低于 1%,超螺旋占比高于 93%,PCR 验证证实多拷贝 CpG 序列 (492 bp) 的完整性良好,符合标准。动物实验结果显示,该 DNA 疫苗安全性良好,免疫虹鳟后未出现异常反应,且存活率达

98%以上;攻毒保护实验表明,免疫组存活率超过70%,显著高于对照组,证明其具有良好的免疫保护效果。

本研究表明,通过对重组大肠杆菌 Stbl3 的系统性发酵优化,成功克服了多拷贝 CpG 重复序列质粒在规模化生产中的稳定性与产量瓶颈。然而,本研究仍存在一些不足之处。尽管我们对发酵终产物进行了取样检测,并确保了整个发酵工艺的优化可有效确保质粒的稳定性,但在发酵过程中未设置中间取样点监测中间过程质粒的遗传稳定性,缺乏过程动态的数据可能会限制我们对于整个发酵周期中质粒稳定性变化规律的认识。此外,我们在 30 L 发酵罐中的放大验证取得了成功,证明了工艺的可行性;但在从 5 L 到 30 L 的工艺放大过程中,我们主要移植了基于小规模发酵优化的生物学参数,对于放大后的搅拌、通气、剪切力等工程学参数尚未进行系统优化。这些参数在大规模生物反应器中直接影响传质效率与细胞所受的剪切应力,进而可能影响菌体生长与代谢。在今后研究中,需要设置中间取样点以直接监测质粒的遗传稳定性,并针对 30 L 的发酵体系做进一步的优化,实现更高效、更稳定的放大生产。

参考文献:

- [1] 王璐瑶, 李宁求, 张鹏, 等. 渔用疫苗灭活剂研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(12): 1402-1408.
- [2] GILMORE R D, ENGELKING H M, MANNING D S, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protects against viral challenge[J]. Nature Biotechnology, 2021, 6(3): 295.
- [3] BRUDESETH B E, WIULSRØD R, FREDRIKSEN B N, *et al.* Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1759-1768.
- [4] LEE J Y, CHO W J, DO J W, *et al.* Monoclonal antibodies raised against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) G protein and a cellular 90 kDa protein neutralize IHNV infection *in vitro*[J]. Journal of General Virology, 1996, 77(8): 1731-1737.
- [5] SALONIUS K, SIMARD N, HARLAND R, *et al.* The road to licensure of a DNA vaccine[J]. Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000), 2007, 8(8): 635-641.
- [6] TASSAKKA A C M A R, SAKAI M. The *in vitro* effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. Aquaculture, 2003, 220(1): 27-36.
- [7] CHEN X, WU Y, QIU Y, *et al.* CpG ODN 2102 promotes antibacterial immune responses and enhances vaccine-induced protection in golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 137: 108783.
- [8] LAI C Y, YU G Y, LUO Y, *et al.* Immunostimulatory activities of CpG-oligodeoxynucleotides in teleosts: Toll-like receptors 9 and 21[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 179.
- [9] ROHILLA K J, OVINGTON K N, PATER A A, *et al.* Systematic microsatellite repeat expansion cloning and validation[J]. Human Genetics, 2020, 139(10): 1233-1246.
- [10] AL-ALLAF F A, TOLMACHOV O E, ZAMBETTI L P, *et al.* Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3[J]. 3 Biotech, 2012, 3(1): 61-70.
- [11] WU D, WANG J, ZHANG Y, *et al.* Characterization and pathogenicity analysis of a newly isolated strain of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 185: 106443.
- [12] DIXON P, PALEY R, ALEGRIA-MORAN R, *et al.* Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV): A review[J]. Veterinary Research, 2016, 47(1): 63.
- [13] 柯伟, 夏杰, 陆兵, 等. 重组大肠杆菌发酵生产核酸疫苗的初步研究 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2006, 32(1): 38-42.
- [14] WU D, SHAO S, LIU Q, *et al.* Protection of a CpG-adjuvanted DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) nature infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2023, 572: 739555.
- [15] YU Z H, DENG M L, GENG Y, *et al.* An outbreak of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in southwest China[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(7): 2355-2362.
- [16] 丁满生, 马文峰, 郭美锦, 等. 温度诱导模式对重组大肠杆菌质粒拷贝数的影响 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2006, 32(1): 33-37.

Fermentation Process of *Escherichia coli* Producing DNA Vaccine with Multiple Copies of Repetitive Sequences

ZHAO Li¹, YANG Jianye², LIU Qin², BAO Endong¹, SHAO Shuai²

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: DNA vaccines carrying multiple copies of repetitive sequences show great potential in aquatic animal disease prevention and control, but their large-scale production process remains a key bottleneck hindering industrialization. To achieve high-yield, high-quality plasmid DNA, this study optimized the fermentation process for the recombinant *E. coli* Stbl3 harboring plasmid DNA vaccines with multiple copies of repetitive sequences. Shaker flask experiments identified glucose as the optimal carbon source at a concentration of 5 g/L. At a 5 L fermenter scale, parameters including inoculation timing, inoculum volume, dissolved oxygen level, feeding strategy, and temperature induction conditions were optimized. The final process conditions were established as follows: inoculation at 4.5% in the mid-log phase, maintaining dissolved oxygen at 30%, and setting induction temperature at 42 °C during the late fermentation stage. This process was successfully validated in a 30 L fermenter, yielding a final cell density with an OD₆₀₀ of 42.3 and a maximum plasmid yield reaching 178.6 mg/L. Quality inspection of the purified plasmid products showed that the OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio ranged from 1.8 to 2.0, meeting the purity requirements. The contents of host genomic DNA and RNA contaminants were both below 1%, and the proportion of supercoiled plasmid was no less than 80%. The integrity of the target multi-copy repetitive sequence fragment was verified to be satisfactory by PCR. Animal experiments demonstrated that the DNA vaccine exhibited favorable biosafety, and the protective efficacy in the immune challenge test exceeded 70%. The optimization of the fermentation process for the multi-copy repetitive sequence plasmid using recombinant *E. coli* Stbl3 lays an application foundation for the industrial development of aquatic DNA vaccines.

Key words: *E. coli* Stbl3; multiple copies of repetitive sequences; fermentation optimization; plasmid stability; rainbow trout immunity

(责任编辑: 王晓丽)