[文章编号] 1003－4684(2025)01-0070-06

高密度培养工艺对质粒菌质粒产量的影响

张 乐，王润杨，石晓太，胡 翰，汪 洋，刘滨磊

（湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 为通过优化质粒 pUC57 的复制起始位点，提高其在宿主菌中的拷贝数，利用随机突变 PCR 技术对质粒 pUC57 的复制起始位点进行了定向突变，发现突变后的质粒 pUC57-Mu-Ori-kana（Mu 代表突变）显示更高的拷贝数。采用分子克隆技术中的同源重组方法，将 pUC57-Mu-Ori-kana 作为载体，连接新的目的基因片段。通过使用商品化感受态细胞 DH10B 对质粒进行转化，发现质粒产量显著提升。经过传代稳定性验证，进一步在生物反应器中使用改良的 MLB 培养基对新质粒菌进行放大培养。最终，从发酵罐中取得的样本显示，质粒的终产量可达到 600 mg/L。突变后的复制起始位点显著提升了质粒的拷贝数，挑取阳性单克隆测序，最终获得了两个不同的质粒目的片段序列。通过同源重组技术，将突变后的片段和未突变的片段与原始载体连接起来，对比发现，在相同的转化情况和提取工艺条件下，pUC57-Mu-Ori-kana 提取量是原始 pUC57-kana 的 1.5 倍。此外，DH10B-pUC57-Mu-Ori-kana 在生物反应器放大培养后，也得到了令人满意的产量。

[关键词] 复制起始位点；质粒拷贝数；生物反应器

[中图分类号] R153 [文献标识码] A

质粒生产的上游技术对其终产量具有显著影响，涉及多个关键因素，这些因素包括质粒的高拷贝数性质、质粒的复制起始位点、质粒的启动子选择、不同类型的大肠杆菌感受态以及同一大肠杆菌菌种中个体（即单菌落）之间容纳质粒的情况等。在生物反应器中，培养方式、培养条件以及诱导方式对于质粒产量的提升尤为重要。

以往的研究多集中于探索大肠杆菌菌株的生长策略，而非菌株优化[1]。本实验选用高拷贝 pUC 类型质粒中 pUC57 质粒，主要原因是质粒 pUC57 是 pUC 系列中碱基最少的质粒，便于目的片段的重组。用于 DNA 疫苗的质粒通常为高拷贝质粒的衍生物，其存在拷贝数的调控突变，这种突变常常存在于质粒的复制起始位点上，如缺失引物基因抑制物[2]或者点突变 G→A[3-4]。在启动子方面，采用 CMV 强启动子以提高质粒终产量。在选择大肠杆菌感受态时，通过比较实验室中各类型感受态转化后的产量，最终选用 DH10B 感受态。通过质粒菌传代稳定性验证，得到产量高、传代稳定的质粒用于进一步的生物反应器培养。优化了 LB 培养基和发酵策略，使用生物反应器获得大量优质且稳定的质粒菌，为下游实验打下基础。

质粒发酵旨在实现高生物量和高质粒产量，以提高纯化效率[5-6]。这在质粒 DNA 疫苗的生产中尤其重要，因为可能需要相对较大的剂量[7-8]。补料分批发酵是高细胞密度培养的首选方法[9]，在获得比摇瓶或发酵罐分批培养更高的特定质粒产量方面也是有用的，因为细胞的特定生长速度可以通过控制营养饲料速率来限制。通常，较低的生长速率会导致质粒拷贝数增加[10-13]。

1 实验材料

1.1 实验试剂与耗材

实验相关试剂及耗材见表 1、表 2。

表 1 试剂及耗材

试剂耗材名称	厂家
2×Phanta Master Mix	诺唯赞
QuickMutation 基因随机突变试剂盒	碧云天
ClonExpress Ⅱ One Step Cloning Kit	诺唯赞
TAE 电泳缓冲液	索莱宝
DNA Marker	碧云天
琼脂糖	索莱宝
胶回收/DNA 纯化试剂盒	诺唯赞
质粒小提试剂盒	诺唯赞
6×Loading buffer	擎科
Ultra GelRed	诺唯赞
卡那霉素	BioFroxx

[收稿日期] 2023－03－13

[第一作者] 张 乐（1998—），男，湖北武汉人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为生物工程。

[通信作者] 刘滨磊（1962—），男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

续表 1　试剂及耗材

试剂耗材名称	厂家
胰蛋白胨	Biosharp
琼脂粉	Biosharp
酵母提取物	Biosharp
NaCl	国药
$MgCl_2$	国药
KCl	国药
甘油	国药
磷酸二氢钾	国药
浓盐酸	国药
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	国药
$ZnCl_2$	国药
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	国药
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	国药
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	国药
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	国药

表 2　实验材料

实验材料名称	来源
pUC57-kana	实验室保存
pHG52d34.5-CMV-PD-L1/CD3-BsAb	实验室保存
DH10B 感受态细胞	实验室保存

1.2　实验配方

1.2.1　痕量元素　1.2 mol/L 浓盐酸、27 g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$、2 g/L $ZnCl_2$、2 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$、2 g/L $Na_2 2MoO_2 \cdot 2H_2 2O$、1 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.5 g/L H_3BO_4、1.3 g/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$。

1.2.2　MLB(Modified LB)液体培养基　称取 30 g 胰蛋白胨，45 g 酵母粉，15 g NaCl 和 15 g K_2HPO_4，15 g 甘油，加 3 L 注射水，充分溶解。121℃高压灭菌 30 min，灭菌后加入 10 mmol/L $MgSO_4$ 和 1 mL 痕量元素。

2　实验方法

2.1　pUC57-Mu-Ori-kana 突变复制起始位点基因的制备

利用随机突变试剂盒易错 PCR 的特性，将质粒 pUC57-kana 上的复制起始位点为目的片段进行扩增，扩增的片段有一定概率会发生突变。目的基因中引入随机突变可能会导致蛋白水平上氨基酸的突变，最终影响质粒拷贝数，既可能导致拷贝数提升，也可能造成拷贝数降低，具体随机突变 PCR 反应见表 3。反应程序为：

94℃ 预变性 3 min → 94℃变性 30 s →
55℃退火 30 s → 72℃延伸 40 s → 反应循环 30 次 →
72℃彻底延伸 10 min 后置于 4℃保存。

表 3　随机突变 PCR 反应

成分	用量
RandomMut buffer(10×)	5 μL
Mutation enhancer(10×)	5 μL
dNTP(2.5 μM each)	5 μL
pUC57-kana	20 ng
Ori-F	1 μL
Ori-R	1 μL
RandomMut DNA polymerase	1 μL
DEPC 水	补充至 50 μL

2.2　qPCR 检测 pUC57-Mu-Ori-kana 菌液拷贝数

为探索菌液 OD_{600} 在 0.4～0.8 时与 CT 值正相关性，以 pUC57-kana 标准质粒作为对照。将 10 个单克隆菌株移植至 10 mL LB 的培养基中，并添加 10 μL 的卡那霉素(50 μg/μL)，然后，将培养基置于 37℃、200 r/min 的恒温振荡条件下进行培养。培养 6 h 后，取出菌液进行 OD 值测定，每隔 0.5 h 测量一次。当 OD 值在 0.4～0.8 之间，则立即将其转移到超净工作台进行 qPCR 检测。qPCR 反应体系详见表 4。反应程序为：95℃预变性 1 min→95℃变性 15 s→60℃采集荧光信号 30 s→反应循环40 次。

表 4　qPCR 反应体系

成分	用量
2×T5 fast qPCR Mix(Probe)	10 μL
Taqman-Ori-F	0.7 μL
Taqman-Ori-R	0.7 μL
Taqman-Probe	0.6 μL
50×Rox	0.4 μL
DNA 模板	1 μL
DEPC 水	补充至 20 μL

2.3　质粒菌传代稳定性验证

由于同种感受态细胞转化后的菌落间存在个体差异，且每个菌落对质粒的容纳量不同，加之质粒对宿主构成负荷，大肠杆菌在传代过程中为满足自身生长可能会将质粒弃去。为判断大肠杆菌是否会发生以上情况，将摇混的质粒菌分别涂布在含对应抗性和无抗性的平板上，若大肠杆菌无法在抗性板上生长的，则表明质粒丢失。通过此方法，经过 4 轮传代，最终筛选出传代稳定、超螺旋比例高、拷贝数高的质粒菌，作为适合大规模生产质粒菌的种子。

2.3.1　质粒菌保菌　将 40%甘油和 60% LB 在培养基中混合，以 1∶1 的体积比配制成细菌冻存液，并将其均匀倒入 1.5 mL 的冻存管内，然后放于－80℃的超低温冰箱中冷冻保存。

2.3.2　质粒菌涂板　将无抗生素平皿与有抗生素平皿用直尺对半划分为两个区域(一半为 10^5 区域，

一半为10^6区域),再将质粒菌用LB培养基稀释至10^5和10^6倍,然后取50 μL菌液滴在平皿上,轻轻涂匀直至感到轻微阻力,之后转移至37℃生化培养箱中倒置培养12～16 h。

2.3.3 比较2个平皿中菌落数 从生化培养箱中取出平皿,比较有抗生素平皿和无抗生素平皿中的菌落数,判定标准为:有抗生素平皿中的菌落数≥(0.75×无抗生素平皿中的菌落数),表示质粒菌传代稳定性良好。反之,传代稳定性较差,应舍去该质粒菌。

2.3.4 第1轮传代稳定性验证 上述步骤仅代表1轮质粒菌传代稳定性验证。为确保完全得到传代稳定的质粒菌,还需重复3轮稳定性验证。

2.3.5 第4轮传代稳定性验证 最终选取第4轮中质粒浓度高且满足有抗生素平皿中的菌落数≥(0.75×无抗生素平皿中的菌落数)条件的质粒菌,作为本次筛选的稳定性良好的质粒菌。

2.4 生物反应器培养质粒菌

传代稳定的DH10B-pUC57-Mu4-Ori-CMV-CD3/PDL1-BsAb-kana质粒菌能够确保超螺旋比例和质粒产量,这对于大批量生产质粒菌以进行后续纯化至关重要,同时也为临床前和临床研究提供大量质粒。

2.4.1 罐前准备工作 在反应器完成灭菌并连接至控制系统后,通入冷凝水,启动搅拌器200 r/min,先使反应器降温,打开空气压缩机,设定系统通气量3 L/h,至少通入空气2 h以确保系统稳定。

2.4.2 质粒菌接种 当温度降低至30℃且通入空气超过2 h后,校准溶氧电极DO(溶氧)100%,取出约200 mL培养基,用于后续测定OD_{600}值与质粒浓度。将摇床培养的质粒菌按1∶1000的比例接入反应器中,加入预先过滤好的硫酸镁、盐酸硫铵、微量元素、抗生素和消泡剂。连接NaOH碱泵以控制pH在7.0左右,并打开控制系统,记录本次运行起始时间(00:00)。在控制面板上,打开DO控制策略,选择"DO+搅拌+通氧"的串级功能。

2.4.3 30℃发酵与补料 严格控制发酵温度在30℃。尽管此时质粒菌生长速度缓慢,但不会发生因满足菌株生长而质粒丢失的现象。由于质粒菌生长过程中代谢物呈酸性,会持续消耗碱,而基础培养基的营养有限,因此在接种8～11 h时可能会出现pH升高的现象。此时,需要连接补料瓶至补料泵进行补料,并用紫外分光光度计每隔1 h测量其OD_{600}值(即在波长600 nm下菌液的吸光度)。

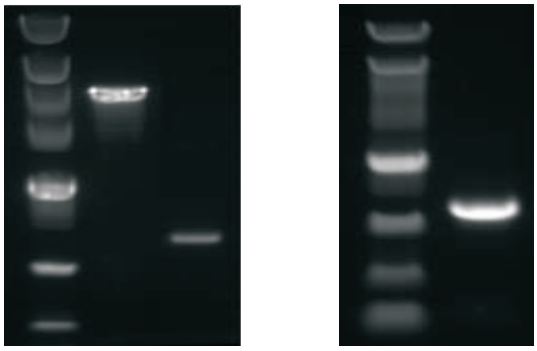
2.4.4 42℃诱导发酵 持续测量OD_{600}值,直至其达到15～20。然后,调节系统温度至42℃。这一温度有利于质粒菌的高密度生长,但此阶段时间不宜过长,以免菌株加速衰老死亡;也不宜过短,以免影响致菌液密度和质粒终浓度。42℃诱导时间应尽量控制在补料后12～16 h。

2.4.5 收集菌液 在下罐之前3 h,每小时使用Vazyme小提质粒试剂盒对样品进行提取,并密切关注提取物的浓度变化。一旦发现提取物浓度有明显的下降,应立即停止提取。

3 实验结果

3.1 载体片段与目的片段电泳分析

以质粒pUC57-kana为模板,通过PCR扩增去除了质粒复制起始位点的片段,并采用1%琼脂糖电泳来检测PCR扩增条带。如图1a所示,第1泳道为空载体,第2泳道为随机突变的质粒复制起始位点的目的片段,理论上,空载体大小为2002 bp,而突变后的质粒复制起始位点大小为589 bp左右,电泳结果与理论预测相符。未突变的质粒复制起始位点的PCR结果如图1b所示,其大小也为589 bp,与电泳结果相符。

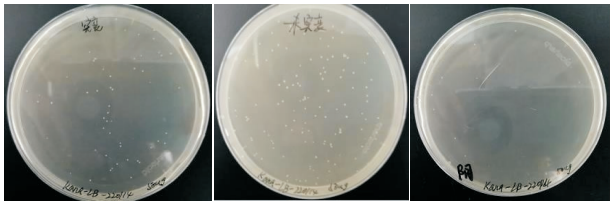


(a)易错PCR复制起始位点 (b)PCR复制起始位点

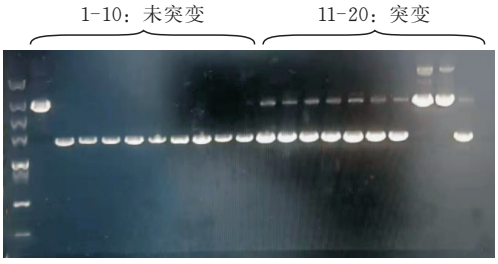
图1 易错PCR复制与PCR复制起始位点的电泳

3.2 重组产物转化及电泳分析

重组产物是通过突变的质粒复制起始位点,与载体pUC57-kana空载体的同源重组而得到的,而对照组则是由PCR产物的质粒复制起始位点与载体pUC57-kana空载体同源重组而成。空载体pUC57-kana转化作为重组产物转化的阴性对照。经过筛选,挑选了10个未突变和10个突变的单克隆菌落接种扩培,并提取质粒后电泳分析(图2)。



(a)突变PCR复制起始位点转化结果 (b)PCR复制起始位点转化结果 (c)PCR载体转化结果



(d)10个阴性对照与10个突变后的单克隆质粒电泳结果

图 2　10 个未突变和 10 个突变单克隆菌落接种扩培后质粒电泳

3.3　qPCR 检测菌液拷贝数、OD 值与 CT 值间的关系

以标准质粒 pUC57-kana 作为标准品，根据下式计算质粒拷贝数：

$$\theta = \frac{6.02 \times 10^{23} \times c}{\mathrm{DNA(bp\ 数)} \times 660} \times 10^{-9}$$

式中：θ 为质粒拷贝数(Copies)；c 为质粒浓度(ng/μL)。

经计算，得出的结果是 8.0×10^{11}。将质粒拷贝数稀释至不同浓度 8×10^{8}、8×10^{7}、8×10^{6}、8×10^{5}、8×10^{4}、8×10^{3}，做成标准曲线(图 3)。挑选 10 个单克隆，扩培后控制 OD_{600} 在 0.4～0.8 范围内，测定这 10 种菌液的 CT 值，并绘制曲线(图 4)。利用理论 OD_{600} 值代入曲线计算出理论 CT 值(表 5)，CT 值越低，表示循环数越小，质粒拷贝数越高。最终，选择拷贝数高的质粒菌——4 号与 10 号单克隆。

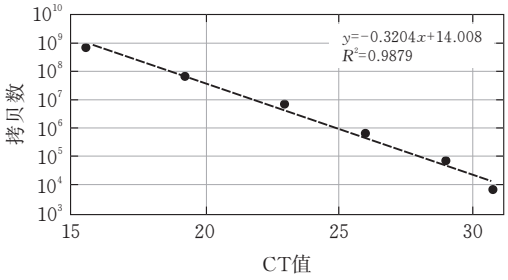


图 3　pUC57-kana 标准曲线

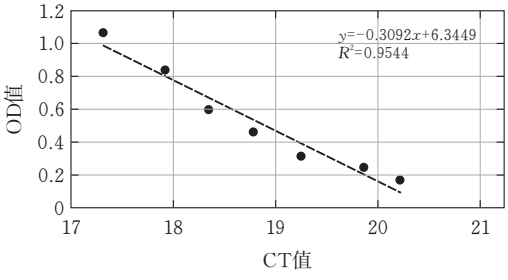


图 4　菌液 OD 值与 CT 值线性相关

3.4　质粒菌传代稳定性验证

对质粒菌进行 4 轮传代稳定性验证，从最初挑选的 20 个单克隆菌落中筛选出 3 个优质的单克隆。将这些菌落对应的冻存菌复苏并进行 3 轮扩培，使其活化，以获得最佳的大规模培养效果。四轮传代稳定性验证结果如图 5 所示。

表 5　CT 实际值与理论值比较

	Actual OD_{600}	CT 理论值	CT 实际值	CT(实际值)/CT(理论值)
1	0.639	18.778 684 34	17.06	0.908 476 85
2	0.779	18.421 723 61	17.28	0.938 022 976
3	0.794	18.383 477 82	17.49	0.951 397 781
4	0.66	18.725 140 23	16.625	0.887 843 818
5	0.73	18.546 659 87	16.765	0.903 936 349
6	0.66	18.725 140 23	17.215	0.919 352 26
7	0.716	18.582 355 94	18.85	1.014 403 128
8	0.727	18.554 309 03	16.99	0.915 690 257
9	0.63	18.801 631 82	17.425	0.926 781 258
10	0.635	18.788 883 22	16.145	0.859 284 706

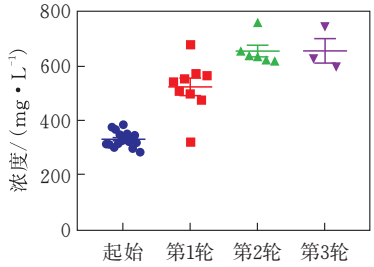
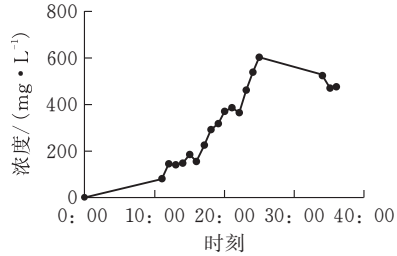


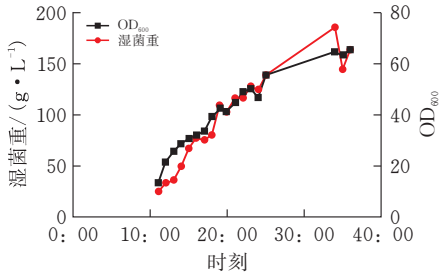
图 5　质粒菌传代稳定性验证

3.5　质粒菌高密度培养

在 0:00 时将质粒菌接种至生物反应器中，在 30℃培养，11:00 开始补料，并且在 42℃下诱导大肠杆菌扩增质粒。图 6 显示了发酵过程中质粒产量、OD600 及湿菌重的变化，在发酵 25 h 时，质粒产量达到最高值 602.8 mg/L，此时的 OD_{600} 为 55.68，湿菌重为 139.38 g/L。可以发现，OD_{600} 和湿菌重不能完全作为质粒产量的评判标准，尤其是在发酵后期，由于罐体体积限制和营养物质供应不足，会导致菌体的死亡，从而影响 OD_{600} 和湿菌重的准确性。



(a)质粒终产量发酵过程变化



(b)OD_{600} 和湿菌重发酵过程变化

图 6　发酵过程中质粒产量、OD_{600} 及湿菌重的变化

从每小时对应的质粒电泳图(图 7),可以发现质粒条带由暗变亮再变暗。0:00 时的样本为 50 mL离心管扩培的质粒菌,11:00—36:00 时的质粒菌均为稀释 50 倍后提取的质粒,因此条带没有 0:00时的亮。

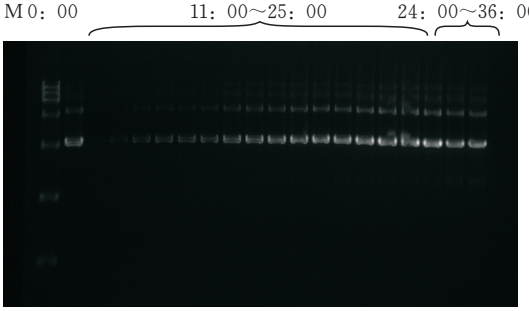


图 7 上罐质粒电泳

4 结论

本文验证了质粒菌生长过程中的一个关键问题:质粒对质粒菌构成负担,可能导致质粒丢失,从而使得提取的质粒量显著降低。为避免此情况的发生,通过传代稳定性验证筛选出了优势菌并将其保留下来。此外,本文还考察了不同感受态细胞在质粒提取上的差异,并从中选择出适用于质粒提取的最优感受态细胞。在同种感受态细胞中,笔者也发现了其存在质粒提取的个体差异,并从中选出了最适合质粒提取的最优单克隆质粒菌。进一步地,将保留的优质单克隆质粒菌进行 3 轮接种,并转移至 5 L 生物反应器扩培。结果表明,其最高收率可达到 600 mg/L 左右,发酵后的菌体数量众多,浓度高,这为后续的生产和纯化提供了高质量的原料。

[参 考 文 献]

[1] PHUE J N, LEE S J. TRINH L.et al.Modified Escherichia coli B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with Escherichia coli K (DH5 alpha) [J]. Biotechnology & Bioengineering,2010,101(04): 831-836.

[2] TWIGG A, SHERRATT D. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColEI[J]. Nature, 1980,7(11):283.

[3] LIN-CHAO S, CHEN W T,WONG T T.High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II[J]. Molecular Microbiology,2010,6(22): 3385-3393.

[4] LAHIJANI R, HULLEY G G,SORIANO N A. Horn and M. Marquet.high-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation [J]. Human Gene Therapy,1996,7(16): 1971-1980.

[5] CARNES A E, HODGSON C P.WILLIAMS J A.Inducible Escherichia coli fermentation for increased plasmid DNA production[J]. Biotechnol Appl Biochem,2006,45(03): 155-166.

[6] CARNES A E.Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA.[J]. BioProcess Intl, 2005,7(03):36-44.

[7] HOARE M, LEVY M S, BRACEWELL D G et al. Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m^3 fermentation scale for an influenza pandemic [J]. Biotechnology Progress,2010,21(06): 1577-1592.

[8] BRAND E, RALLA K, NEUBAUER P.Strategies for plasmid DNA production in Escherichia coli, in: subramanian G (ed) Biopharmaceutical production technology[J]. Wiley- VCH, Weinheim, 2012,68(03): 3-41.

[9] SANG Y L.High cell-density culture of Escherichia coli[J].Trends in Biotechnology,1996,14(03): 98.

[10] LIN-CHAO S, BREMER H. Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in Escherichia coli.[J] Molecular & General Genetics Mgg,1986,203(01): 143-149.

[11] SEO J, BAILEY J E.Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in Escherichia coli[J].Biotechnology & Bioengineering,2010,27(12): 1668-1674.

[12] SATYAGAL V N,AGRAWAL P.A generalized model of plasmid replication[J]. Biotechnology & Bioengineering,2010,33(09): 1135-1144.

[13] ROZKOV A,AVIGNONE-ROSSA CA,ERTL P F, et al.Fed batch culture with declining specific growth rate for high-yielding production of a plasmid containing a gene therapy sequence in Escherichia coli DH1[J]. Enzyme & Microbial Technology,2006,39(01): 47-50.

High Density Culture Technology of Plasmid Bacteria

ZHANG Le, WANG Runyang, SHI Xiaotai, HU Han, WANG Yang, LIU Binlei

(*School of Biological Engineering and Food, Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*)

Abstract: This study first mutated the replication origin of plasmid pUC57 using a random mutation PCR kit, and found that the plasmid copy number of the mutated pUC57 Mu Ori kana (Mu: Mutation) increased. Using molecular cloning technique homologous recombination, plasmid pUC57 Mu Ori kana was used as a vector to connect new target fragments. The plasmid was transformed using commercialized competent cells DH10B and found that the plasmid yield increased. After the stability verification of the new plasmid bacteria through passage, the bioreactor and modified MLB medium were used for amplification culture. Finally, the bacterial liquid in the fermenter was sampled, and the final yield of plasmid in the tank reached 600 mg/L. By mutating the replication origin, the copy number of plasmid was increased, and positive single clones were selected for sequencing. Two different plasmid target fragment sequences were obtained. The mutated and unmutated fragments were connected with the original vector by homologous recombination method. Under the same transformation condition and extraction process, the extraction amount of plasmid pUC57 Mu Ori kana was 1.5 times that of original plasmid pUC57 kana. After amplifying culture of plasmid bacteria DH10B pUC57 Mu Ori kana in bioreactor, a good yield was also obtained.

Keywords: replication origin; plasmid copy number; bioreactor

[责任编校：张　众]

(上接第 60 页)

Named Entity Recognition of TCM Patent Based on RoBERTa-WWM

DENG Na, HE Xinyang, XIONG Caiquan, ZONG Zehua

(*School of Computer Science, Hubei Univ. of Tech.*, 430068, *China*)

Abstract: The components and functional entities of invention patents of traditional Chinese medicine have the characteristics of complex types and various ambiguities. The traditional named entity recognition methods cannot fully obtain the semantic feature representation, context information and polysemy of a word. A model for named entity recognition of Chinese medicine invention patents is proposed. The model combines three modules in series: RoBERTa WWM pre training model, tw-way short and long-term memory (BILSTM) network and conditional random field (CRF). The patent abstracts are sequentially extracted through RoBERTa-WWM to generate semantic words with prior knowledge; BILSTM network enhances the context feature information in word embedding; The CRF decoding sequence outputs the maximum probability result. The experimental results show that on the corpus of real Chinese medicine invention patents, the F1 value of the model has increased by 5.80% and 6.63% respectively compared with other mainstream methods in the identification of components and functions, and can effectively improve the accuracy of the identification of drug components and functions in the abstract of Chinese medicine invention patents.

Keywords: invention patent of traditional Chinese medicine; named entity identification; RoBERTa-WWM; BiLSTM

[责任编校：裴　琴]