

# 發明專利說明書

※申請案號：091113315

※IPC 分類：

## 一、發明名稱：

以左旋阿拉伯糖誘導方式來控制T7表達系統

Control of The T7 Expression System by L-Arabinose

## 二、中文發明摘要：

本發明之控制方法係建構一株能以左旋阿拉伯糖來誘導生產T7 RNA聚合酶的大腸桿菌重組菌種BL21(BAD)，此菌種的染色體上籍含有以*araBAD*啟動子控制的T7基因1。而這株重組菌種生成的T7 RNA聚合酶可以誘導活化T7啟動子，以製造選殖在此啟動子下游的目標基因的產物。本發明旨在利用左旋阿拉伯糖為誘導物，並使用二階段碳源和區段式進料發酵方法，來達到使菌種大量生產重組蛋白質的目的。

## 三、英文發明摘要：

The Present invention is drawn to processes for biologically controlling T7 expression system in Recombinant Escherichia coli strain BL21(BAD) by using L-arabinose to active T7 promoter. The strain BL21(BAD) are useful to produce a variety of heterologous proteins. Also disclosed is large scale operations of the strain BL21(BAD), it is convenient to carry out the culture in a fermentation tank with two-stages carbon source and stage input system.

## 四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第1圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

## 五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

[n] 本發明係關於一種以誘導物控制大腸桿菌中基因表達載體(expression vector)的方法，更明確的是，本發明是一種以左旋阿拉伯糖誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，此方法佐以二階段碳源和區段式進料的饋料批次發酵策略，以達到大量生產重組蛋白質的目的。

### 【先前技術】

[n] 以生物細胞來生產具有商業價值或醫療用途的重組蛋白質(recombinant proteins)可謂是一項極為重要且具經濟前瞻性的生技產業。大體而言，可用來作為蛋白質生產的生物細胞包括微生物、昆蟲、動物和植物細胞等，其中又以利用微生物細胞來生產重組蛋白質的方法較具經濟競爭力，其原因在於微生物細胞較易大量培養、生長快速和培養所需營養基質配方簡單且價格低廉。過去數十年來，由於許多的科學研究均以大腸桿菌(*Escherichia coli*)作為核心主題，學術界因此累積了龐大且詳盡的攸關此菌種之生化相關知識，無疑的，發展大腸桿菌以製造重組蛋白質的生產系統相對的也較使用其他生物細胞發展的系統更為成功。

[n] 為期利用生物細胞達到有效生產蛋白質的目的，基因表達載體(expression vectors)是一項不可或缺的利器，在大腸桿菌中有許多針對不同需求而發展出來的基因表達載體(Markides, Microbiol. Rev., 60:512-538, 1996)，其中最為實驗室普遍使用的首推T7表達系統(T7 expression system)。T7表達系統包含T7 RNA聚合酶(T7 RNA

polymerase)和一個能被T7 RNA聚合酶驅動的T7啟動子(T7 promoter)。T7 RNA聚合酶每是噬菌體(phage)T7基因1(T7 gene 1)的產物，相較於大腸桿菌的RNA聚合酶，它對於選殖基因(cloned gene)具有極為優越的轉錄(transcription)能力(Colomb and Chamberlin, J. Biol. Chem., 249:2858-2863, 1974)，再則它對於T7啟動子特具專一性(Tabor and Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1074-1078, 1985)，基於T7 RNA聚合酶的專一選擇性和優越轉錄能力，Studier等人(Studier and Moffatt, J. Mol. Biol. 189:113-130, 1986; Studier et al., U. S. patent 4,952,496, 1990)首先據此發展T7表達系統。此系統包含一株重組菌種BL21(DE3)和一個含有T7啟動子的基因表達質體，而重組菌種BL21(DE3)的染色體上則含有一個以lacUV5啟動子控制的T7基因1。

- [n] 在T7表達系統中，雖然加入化學物質以誘導生產目標蛋白質的方法極為簡單和容易操作，然而加入的化學物質價格昂貴，且會污染發酵母液，不利於生產具醫療功用的蛋白質，而且無法達到均勻誘導每一細胞。
- [n] 一種習知技術係以化學物質 $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)為誘導物，使菌種可以生產大量的重組蛋白質，然而，一個可作為工業規模生產蛋白質的基因表達質體需具有幾項要件：即在發酵規模使用時具有簡單且經濟的誘導方式、高基因表達能力和穩定性。因此，以IPTG為誘導方式的T7表達系統顯然無法達到工業化使用之目的，其原因為(1)IPTG的價格昂貴，(2)IPTG不被細菌細胞代謝，而容易造成發酵液的污染而使得發酵產品純化不易，(3)IPTG具有潛在的毒性，因此不適用在生產醫療用的產品(Figge et al., Cell, 52:713-722, 1988)，(4)由於lacUV5啟動子的調控性不夠嚴謹而導致菌種BL21(DE3)在非誘導情況下即產生微量的T7 RNA聚合酶，造成選殖在質體上以T7啟動子控制表達的目標基因產物因而產生，尤其是目標基因產物對於宿主細胞具有潛在毒性時，細胞的生長將會受到抑制，進而使得含目標基因的質體產生不穩定的現象(Studier et al., Methods in Enzymology, 185:60-89, 1991)，這些缺點顯然限制了T7表達系統的工業實用性。
- [n] 在另一習知技術Wycuff和Mattews(Anal. Biochem., 277:67-73, 2000)，曾發展以araBAD啟動子調控T7基因1，進而控制選殖在T7啟動子下的目標基因之表達。然而，該習知技術係將受araBAD啟動子調控的T7基因1選殖在具pACYC184複製源點(origin)的質體上，所以導致過高未誘導時蛋白質的生成，並不適合用來生產具有潛在毒性的重組蛋白質。

#### 【發明內容】

- [n] 過去的研究發現，能被左旋阿拉伯糖誘導的araBAD啟動子具有嚴密調控性(tight regulation)、迅速被誘導活化(prompt activation)和高基因表達能力(high-level expression)等特性(Guzman et al., J. Bacteriol., 177:4121-4130, 1995)，因此本發明特別以左旋阿拉伯糖為誘導物應用在控制T7表達系統。
- [n] 本發明的主要目的旨在提供一種以誘導物控制大腸桿菌中的T7表達系統的方法，以便改善T7表達系統並使其具有工業實用性。
- [n] 本發明的另一目的，係利用左旋阿拉伯糖為誘導物，以控制T7表達系統的方法，並配合二階段碳源和區段式進料發酵策略，而達到使菌種大量生產重組蛋白質。
- [n] 本發明係建構一株能以左旋阿拉伯糖來誘導生產T7RNA聚合酶的菌種BL21(BAD)，此菌種的染色體上籍含有以araBAD啟動子控制的T7基因1和araC控制基因(regulatory gene)。基本上，AraC控制蛋白質(regulatory protein)與左旋阿拉伯糖結合所形成的複合蛋白質可以驅動活化araBAD啟動子，而AraC控制蛋白質本身則具有抑制araBAD啟動子之效能，因此重組菌種T7RNA聚合酶的生產實繫於左旋阿拉伯糖的存在與否，而選殖在T7啟動子下游的目標基因之表達自然為左旋阿拉伯糖所控制。
- [n] 在本發明的一種較佳實施例中，以生產*Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291的carbamoylase蛋白質為例，未加入左旋阿拉伯糖誘導時，carbamoylase在菌種BL21(BAD)中幾乎沒有生成，然而以300  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導時，菌種BL21(BAD)即生產高達30%總細胞蛋白質量的carbamoylase，這個結果顯示本發明發展的系統具有工業發酵生產重組蛋白質的潛能。以高細胞密度饋料批次發酵並施以足量的左旋阿拉伯糖誘導，菌種BL21(BAD)可以生產多出以搖瓶發酵生產所得蛋白質1000倍以上的量。
- [n] 在整個饋料批次發酵步驟中係應用「二階段碳源方法」，在初期發酵階段使用葡萄糖以穩定重組質體，而在進料階段，則以葡萄糖和甘油混合物以利誘導效能和降低成本。此外，為達大量生產重組蛋白質的目的，本發明在進料階段更進一步發展「區段式進料法」以達高細胞密度發酵。在加入適量的左旋阿拉伯糖或是大豆萃取液誘導，菌種BL21(BAD)可以生產多出以搖瓶規模生產所得蛋白質1000倍以上的量。綜合言之，本發明發展的系統

具有以下多項優點：

- [n] (1)可以左旋阿拉伯糖誘導來生產重組蛋白質，左旋阿拉伯糖的來源可取自植物如大豆萃取液，不但價格較有經濟競爭性而且可為細菌代謝分解而不造成發酵液污染。
- [n] (2)araBAD啟動子極具敏感性，10  $\mu$ M的左旋阿拉伯糖即可誘導重組菌種生產大量的蛋白質。
- [n] (3)本發明菌種BL21(BAD)極具穩定性可以維持含carbamoylase基因質體100%穩定度達100細胞世代(generations)，相對的菌種BL21(DE3)只可維持相同的質體穩定度僅達20細胞世代。
- [n] (4)本發明發展的「區段進料式」發酵策略可將本發明菌種以發酵槽規模培養至高細胞密度，細胞密度達每升37.5 g乾重細胞。
- [n] (5)本發明發展的「二階段碳源方法」策略可有效維持重組質體的穩定性，以1-2%的大豆萃取液誘導本發明發展的菌種，菌種可產生高出搖瓶規模1000倍的重組蛋白質，由此顯示結合本發明發展的發酵方法和本發明所建構的菌種BL21(BAD)可以用來大量生產重組蛋白質，實具有工業實用性。

#### 【實施方式】

- [n] 本發明以左旋阿拉伯糖誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，包含以下步驟：建構一株重組菌種，該重組菌種含有一個內含T7啟動子的質體，且該重組菌種的染色體上籍含有以araBAD啟動子控制的T7基因1和araC控制基因；以饋料批次發酵方法培養該重組菌種，在批次發酵階段，提供的發酵液中含有葡萄糖為碳源，而在進料階段，提供的進料液中含有甘油和葡萄糖為碳源，使達到高細胞密度發酵；以及在細胞達到一定高密度後，加入含有左旋阿拉伯糖的誘導物，使該重組菌種產生一重組蛋白質。
- [n] 本發明的控制方法，進一步地包含：以左旋阿拉伯糖誘導建構出的重組菌種BL21(BAD)，進行異源蛋白質(heterologous protein)搖瓶規模的生產，而在此處選擇生產異源蛋白質係作為檢測模式。
- [n] 以下伴隨著相關圖示並經由圖例說明本發明的原理，而詳細揭露本發明的其他方面和優點。

#### [n] (一)、建構重組菌種BL21(BAD)

- [n] 為了發展以左旋阿拉伯糖來控制T7表達系統，首先將建構一株重組菌種使其染色體上籍含有一個以araBAD啟動子調控的T7基因1和araC控制基因。

#### [n] A. T7基因1的選殖操作

##### [n] (1)基因選殖使用的菌種和搖瓶培養方式

- [n] 基因選殖過程中均採用大腸桿菌DH5  $\alpha$  (deoR end A1 gyr96 hsdR17 supE444 thi  $\Delta$ (lacIZYA-argF 169)rec A1 lacZM15)，液態培養菌種時，首先由固態培養皿中點取數顆菌落至含營養基值的搖瓶中，在37°C、每分鐘200轉條件的水浴旋轉培養槽中培養過夜，隔日以百倍稀釋的體積取出菌液並接種至含新鮮營養基質的搖瓶中，依相同培養條件繼續培養。營養基質的成分是需求而定，在本例中採用Luria-Bertani(LB)營養基在下培養。而抗生素也視需要而決定是否加入培養基中，在本例中則加入抗生素安培西林(ampicillin)，使用量為0.1 mg/mL。

##### [n] (2)T7基因1的選殖

- [n] 根據T7基因1的發表序列(Grachev and Pletnev, Bio org. Chem., 10:824-843, 1984)，我們設計一組涵蓋T7基因1編碼區(coding region)但排除啟動子區域的寡核苷酸，其序列如下-CGGAATTCCTCCCAACCGCGTGGCACAAC和CCGGATCCTCGAGCTAACTCACATTAATTGC，並委由GENSET Singapore Biotech公司合成。相關選殖技術均參照Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982)一書。以含T7基因1的質體pMR-7wt(Mallet et al., Gene, 199:149-156, 1997)為DNA樣版(DNA template)，依照一反應條件使用PCR(polymerase chain reaction, 聚合酶連鎖反應)反應來擴增製造2.7 kb的T7基因1 DNA產物，其中此反應條件係為：50  $\mu$ L反應溶液中包含樣板DNA(10 ng/mL)、2.5活性單元Pfu聚合酶每、一對寡核苷酸(oligonucleotide)(0.5  $\mu$ M)和四種核苷酸(200  $\mu$ M)，首先將反應溶液加熱至94°C 3分鐘，隨後以底下條件重複28循環：以94°C加熱1分鐘、55°C4分鐘、72°C1分鐘，所有循環結束後再以72°C維持加熱10分鐘。

- [n] 隨後將PCR產物以核苷酸純化組(NuceloSpin Nucl eic Acid Purification Kit, Clontech Lab., Inc.)純化，並利用EcoRI、HindIII限制酵素切割和再純化，最後使用T4 DNA粘接酶(T4 DNA ligase)將DNA產物粘接至質體pKF2(Hashimoto-Gotoh et al., Gene, 137:211-216, 1993)中。接著使用EcoRI、HindIII限制酵素把含有T7基因1的DNA片段切下回收，再粘接至質體pBAD18(Guzman et al., J. Bacteriol., 177:4121-4130, 1995)。隨後使用ClaI、HindIII限制酵素將含有araC基因和選殖於araBAD啟動子下游的T7基因1之DNA片段切割，並粘接至質體pACYC177得到質體pACYC-G1或pACYC184得到質體pACYC-G2。選殖在質體pACYC-G1或pACYC-G2上的T7基因1位於araBAD啟動子下游，而接鄰在啟動子的上游區則含有araC基因。
- [n] B. 選殖基因片段鑲入菌種染色體
- [n] (1)噬菌體P1因子轉移法(P1 transduction)
- [n] 以內含LB和5 mM氯化鈣營養基的搖瓶培養基因供給細胞(donor cell)，待細胞生長至 $OD_{550}$ (波長550 nm吸光度)達0.3時，加入濃度約每毫升 $10^8$ 個P1vir噬菌體分解顆粒(phagelysate)，繼續培養直至細胞完全分解為止，將分解液回收並加入0.1 mL的氯仿，以4500 g離心10分鐘並回收上層液。另一方面，以內含LB營養基的搖瓶過夜培養基因接收細胞(recipient cell)，以15000 g離心十分鐘回收細胞，隨即以2.5 mL濃度為10 mM的硫酸鎂和5 mM氯化鈣重新溶解回收細胞。取出0.1 mL的菌液放入試管中，並加入等量體積的分解液，在37°C下反應30分鐘，最後加入0.1 mL濃度為1 M的檸檬酸鈉，由試管中取出0.1mL的混合液灑養在篩選培養基上。
- [n] (2)重組菌種建構
- [n] 為了將選殖基因片段鑲入菌種染色體中，隨即由質體pACYC-G1將含有位於araBAD啟動子下游的T7基因1和上游區的araC基因之DNA片段以HindIII、XhoI限制酵素切除並回收，最後插接入質體pBRINT-Cm(Balbas et al., Gene, 172:65-69, 1996)所含的lacZ基因當中得到質體pBRINT-G1。接著把質體pBRINT-G1轉殖入以氯化鈣處理的菌種JC7623(recBC sbcBC)中，其質體轉殖程序乃採用氯化鈣製備升任細胞(competent cell)法，相關技術主要參照Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982)一書。
- [n] 利用lacZ同源基因重組(homologous recombination)方式將質體上的基因鑲入菌種染色體中，轉植後的菌種隨即灑養在含0.005 mg/mL氯黴素(chloramphenicol)和0.004%5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside(X-gal)的洋菜培養基上。其中一個呈現白色的菌落以搖瓶培養作為噬菌體P1因子轉移法的基因供給細胞，依據B的第(1)項方法製備分解液並感染基因接收細胞大腸桿菌BL21，經基因轉移後的細胞則灑養在含0.005mg/mL氯黴素和0.004% X-gal的洋菜培養基上，選擇一株顯現白色的細胞再利用PCR方法來檢視其染色體上是否含有T7基因1，如此得到的菌種命名為BL21(BAD)。
- [n] (二)、以菌種BL21(BAD)進行搖瓶規模的檢測模式
- [n] 檢驗重組菌種BL21(BAD)產生異源重組蛋白質的可行性，在此我們選擇生產carbamoylase為檢測模式。生產異源蛋白質(heterologous protein)最大的挑戰莫過於該蛋白質易形成內涵體(inclusion body)和具有毒害細胞的特性，而carbamoylase來自A. radiobacter是屬於異源蛋白質，況且極易形成內涵體和潛在毒性，因此以此蛋白質作為生產模式正足以對本發明建構的系統提供最嚴苛的檢測方式。
- [n] A. 培養方法與營養基質
- [n] 與建構重組菌種BL21(BAD)中A項培養方法相同，使用搖瓶來培養菌種。S-M9基質配方包含每升6 g磷酸化二鈉、3 g磷化鉀、0.5 g氯化鈉、1 g氯化銨、0.01 mM氯化鈣、1 mM硫化鎂、1 mg維他命B1和5g酵母萃取。
- [n] B. Carbamoylase酵素活性分析
- [n] Carbamoylase酵素活性分析主要依據過去已發表的方法(Chao et al., Biotechnol. Prog., 15:603-607, 1999)，而一個單位酵素活性(U)定義為每分鐘一毫莫耳產物生成，比酵素活性單位為U/mg乾重細胞，體積酵素活性則以測得的比酵素活性與獲得的細胞濃度之乘積所得，單位為U/mL。
- [n] C. 蛋白質電泳膠分析

- [n] 主要依據過去發表的方法(Chao and Liao, J. Biol. Chem., 269:5122-5126, 1994)操作，將離心收集到的細胞用法式細胞粉碎機(French Press)打破，以15000g離心5分鐘後回收上層液，使用Bradford分析法(Bio-Rad)量測蛋白質濃度，將20 mg的蛋白質樣本逐一置入電泳膠中。
- [n] D. 左旋阿拉伯糖誘導生產重組蛋白質之特性
- [n] 將含有以T7啟動子調控carbamoylase基因表達的質體pTAHL10(Chao et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 54:348-353(2000))和含有以araBAD啟動子調控groELS基因表達的質體pAR3-GRO-Km同時轉殖到菌種BL21(BAD)中，得到重組菌種BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km。質體pAR3-GRO-Km源自於質體pAR3-GRO(Perez and Gutierrez, Gene, 158:141-142, 1995)，一個抗卡那黴素的基因片段由質體pKRP11(Reece and Philip, Gene, 165:141-142, 1995)以EcoRI限制酵素切下回收，隨即粘接入質體pAR3-GRO得到質體pAR3-GRO-Km。首先以不同營養基質並使用搖瓶方式培養重組菌，待細胞生長至OD<sub>550</sub>達0.5時，加入300  $\mu$ M左旋阿拉伯糖，隨後繼續培養細胞至停滯生長時期，以15000 g離心10分鐘回收細胞並測定酵素活性，結果整理在表一。
- [n] 相較於非誘導菌種而言，以左旋阿拉伯糖誘導的菌種可產生50-100倍可溶性carbamoylase。而營養基中含有葡萄糖可有效降低非誘導時蛋白質生成量，但即加入左旋阿拉伯糖卻也難以誘導產生大量重組蛋白質，這是由於araBAD啟動子會受到基質抑制(substrate inhibition)效應所造成的結果。另一方面，非誘導時生產的蛋白質量在較豐富的營養基如LB中也較高，其中我們發現LB營養基中所含的胰化胨(tryptone)是造成高非誘導時蛋白質生成量的主因。這些結果顯示，本發明發展的菌種卻可利用左旋阿拉伯糖誘導方式來控制T7表達系統以生產重組蛋白質，且具有嚴密調控和高蛋白質生產之效能。
- [n] 由表一可知，本發明發展的菌種可藉由左旋阿拉伯糖來誘導生產重組蛋白質，而不同濃度的左旋阿拉伯糖將影響菌種蛋白質生產量。因此，重組菌種BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km以LB為營養基以搖瓶在37°C條件下培養，待細胞生長至OD<sub>550</sub>達0.5時，加入不同濃度的左旋阿拉伯糖，隨後繼續培養細胞至停滯生長時期，以15000 g離心10分鐘回收細胞並測定酵素活性如圖一(a)所示，菌種生成的蛋白質量隨著左旋阿拉伯糖的誘導濃度增加而增加，當濃度達300  $\mu$ M時蛋白質產量達到飽和。參考圖一(b)的蛋白質電泳分析，其中徑1：蛋白質標準物；徑2：未經誘導；徑3：以10  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導；徑4：以30  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導；徑5：以50  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導；徑6：以100  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導；徑7：以300  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導；徑8：以2000  $\mu$ M左旋阿拉伯糖誘導。左旋阿拉伯糖的誘導以蛋白質電泳分析並佐以影像分析(GAS9000, UV1tech, UK)可定量出最大可溶性蛋白質量達到總細胞蛋白質量的30%，而微量的左旋阿拉伯糖如10  $\mu$ M即可誘導菌種生產出相當於10%的總細胞蛋白質。這些結果顯示本發明發展的表達系統具有優越的蛋白質生產效能和高敏感之特性。
- [n] E. 重組菌種質體穩定度測試
- [n] 重組菌種BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km以內含20 mL未含抗生素營養基質之搖瓶在37°C、每分鐘200轉條件下培養過夜，取出0.2 mL菌液接種至另一個含有20 mL新鮮基質之搖瓶，依相同條件繼續培養至隔日，即完成一個培養循環。在每一培養循環終止時，取出0.1 mL樣本並注入含1 mL的無菌生理食鹽水的試管中，如此經過一系列連續稀釋後，取出0.1 mL樣本灑養在洋菜培養基，於30°C下培養16小時後，再挑選100顆菌落分別點劃在一個洋菜培養基和另一個含抗生素的洋菜培養基上，於30°C下培養16小時後，估計每一個培養基生成的菌落數，而質體穩定度即定義成在含有抗生素的洋菜培養基上之菌落數除以在洋菜培養基形成之菌落數。相同培養循環則依需要持續進行到終止，而每一培養循環估計約經過10個細胞世代。同樣的，我們將質體pTAHL10和pAR3-GRO-Km同時轉殖到過去發明所發展的菌種BL21(DE3)中得到重組菌BL21(DE3)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km，並依照上述方式測試菌種BL21(DE3)對於質體的穩定性。
- [n] 結果如表二顯示，在所測試的營養基質中菌種BL21(BAD)可以維持100%的質體穩定度達100細胞世代，而菌種BL21(DE3)在LB營養基下經過50細胞世代只維持50%的質體穩定度，在S-M9營養基下經過50細胞世代只維持68%的質體穩定度，由此可知本發明發展之菌種BL21(BAD)具有極高的質體穩定性。
- [n] (三)、以饋料批次發酵培養BL21(BAD)達到高細胞密度
- [n] 一個基因表達系統的實用性決定在放大規模時仍具可行性，除此之外，在工業化量產重組蛋白質時，高蛋白質的產量乃是必然的考量，而其成功的關鍵則在於重組菌種發酵誘導後



能同時獲得高細胞密度和高酵素比活性。基於此，本發明在饋料批次發酵的進料階段，首先發展所謂的「區段式進料法」以達高細胞密度培養的目的。

#### [n] A. 區段式進料法

[n] 饋料批次發酵法是培養高細胞密度最佳的方法，其基本理論在於利用進料量來控制細胞比生長速率，以使得菌種無法或是降低製造發酵產物如醋酸等。本發明發展的區段式進料法乃將進料區分成*i*個區段( $i=1\sim n$ )，每個進料區段以定流速*F*進料 $\Delta t$ 分鐘。根據生長率定義可得程式(1)，細胞比生長速率定義得到程式(2)，而程式(1)、(2)可導出程式(3)。程式(3)說明在欲控制的細胞比生長速率和生長率條件下，可以計算出每個區段的進料流量。

[n]  $Y=(V_i X_i - V_{i-1} X_{i-1}) / (F \Delta t S)$  (1)  $d(V_i X_i) / dt = \mu (V_i X_i)$  (2)  $F = \{V_{i-1} X_{i-1} [\exp(\mu \Delta t) - 1]\} / (Y S \Delta t)$  (3) *F*: 進料流量(mL/min) *S*: 進料濃度(mg/mL)  $\Delta t$ : 階段進料時間(min) *m*: 比生長速率(1/min) *V*: 發酵槽體積(mL)  $Y = \Delta X / \Delta S$ : 生長率(mg/mg) *X*: 細胞濃度(mg/mL)  $V_{i-1}$ 、 $V_i$ : 第*i*區段起始體積和最終體積  $X_{i-1}$ 、 $X_i$ : 第*i*區段起始細胞濃度和最終細胞濃度

#### [n] B. 高細胞密度培養

[n] 採用5L實驗室規模的發酵槽(Biostat, B. Braun, Germany)作為放大規模菌種的培養。發酵槽操作的條件設定在37°C、pH 6.5-7.0、溶氧度為15%的飽和溶氧度。先期以搖瓶培養300 mL的BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km菌種作為接種菌(實例一A項)，而營養基質為S-M9加上0.2%葡萄糖，待細胞培養至 $OD_{550}$ 達1時，將所有菌液接種至含1.5 L營養基的發酵槽中，而發酵槽中培養基成分為每升溶液含3.3 g磷酸鉀、15.3 g磷酸化二鉀、3.46 g氯化氮、0.19 g硫酸鎂、0.12 g硫化鐵、0.09 g氯化鈣、0.03 mg維他命B1、5 g酵母萃取和11.5 g葡萄糖。當細胞在批次發酵階段生長進入停滯生長期，0.5 L的進料液隨即以A項程式(3)決定的流速使用幫浦打入發酵槽中直到進料結束。而進料液的營養基質成分為每升溶液含6 g氯化氮、9 g硫酸鎂、0.146 g硫化鐵、20 g酵母萃取和300 g葡萄糖。如圖二所示，在批次發酵結束後隨即以區段式方法進料，最後發酵結果可得到總細胞乾重達75g。

[n] (四)、以左旋阿拉伯糖誘導高細胞密度的菌種BL21(BAD)生產發酵槽規模的重組蛋白質

[n] 本發明的饋料批次發酵係應用「二階段碳源方式」以達到高細胞密度發酵。在批次發酵階段採用葡萄糖作為碳源，來穩定重組菌種中的質體，而在區段進料發酵階段，則改採葡萄糖和甘油混合物為碳源，以期一方面有效以左旋阿拉伯糖誘導araBAD啟動子以促進大量重組蛋白質生產，另一方面則考量降低發酵成本。

#### [n] A. 二階段碳源方式與區段式進料法進行高細胞密度發酵

[n] 採用5 L實驗室規模的發酵槽(Biostat, B. Braun, Germany)作為放大規模菌種的培養。發酵槽操作的條件設定在37°C、pH 6.5-7.0、溶氧度為15%的飽和溶氧度。先期以搖瓶培養300 mL的BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km菌種作為接種菌(實例一A項)，而營養基質為S-M9加上0.2%葡萄糖，待細胞培養至 $OD_{550}$ 達1時，將所有菌液接種至含1.5 L營養基的發酵槽中，而發酵槽中培養基成分為每升溶液含3.3 g磷酸鉀、15.3 g磷酸化二鉀、3.46 g氯化氮、0.19 g硫酸鎂、0.12 g硫化鐵、0.09 g氯化鈣、0.03 mg維他命B1、5 g酵母萃取和11.5 g葡萄糖。當細胞在批次發酵階段生長進入停滯生長期，1 L的進料液隨即以程式(3)決定的流速使用幫浦打入發酵槽中直到進料結束。而進料液的營養基質成分為每升溶液含12 g氯化氮、14 g硫酸鎂、0.2 g硫化鐵、40 g酵母萃取、100 g葡萄糖和400 g甘油。在整個發酵過程中所使用的培養液均排除使用抗生素。

#### [n] B. 以微量左旋阿拉伯糖誘導大量的重組蛋白質

[n] 在上述重組菌種BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km進行饋料批次發酵的進料階段末期以左旋阿拉伯糖進行誘導。在細胞密度為每升18g乾重細胞時，以每升5g左旋阿拉伯糖誘導，另一方面考量降低發酵成本，左旋阿拉伯糖含量豐富的植物萃取液如大豆萃取液亦被用來作為誘導物。另外由圖二的發酵曲線選擇適當誘導時機如區段進料後10小時或16小時。結果得到在誘導條件為區段進料後10小時或16小時，以推算的左旋阿拉伯糖為誘導飽和量或是0.1-0.2%的大豆萃取液來誘導，發酵培養的細胞密度可達每升約35g乾重細胞，而酵素體積活性達2.92 U/mL。整個發酵產生的重組蛋白質總計有8760 U，這個產量是以搖瓶方式所獲得蛋白質量的1000倍。此外，在發酵結束後檢測菌種所含質體之穩定度也達100%。這些結果顯示，本發明發展的菌種具有高穩定性且可放大生產大量的重組蛋白質，極有工業實用潛力。

[n] 根據本發明所實施以左旋阿拉伯糖誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，只需微量的左旋阿拉伯糖或是採用價格低廉的植物萃取液如大豆萃取液即可達到誘導生產大量的重組蛋

白質之效能，特具經濟效益。此外，為有效利用本發明的菌種以達工業量產重組蛋白質之目的，本發明發展高細胞密度發酵策略，成功的將重組蛋白質以發酵規模大量生產，其產量超出搖瓶規模產量的1000倍。

[n]

表一

| 營養基質     | 酵素比活性 (U/mg 乾重細胞) |       |
|----------|-------------------|-------|
|          | 誘導                | 非誘導   |
| LB       | 0.202             | 0.004 |
| LB+葡萄糖   | 0.033             | 0.003 |
| S-M9+甘油  | 0.191             | 0.002 |
| S-M9+葡萄糖 | 0.021             | 0.001 |

註解：表中所列的碳源濃度均為 0.4%。

[n]

表二

| 細胞世代 | BL21(BAD) |      | BL21(DE3) |      |
|------|-----------|------|-----------|------|
|      | LB        | S-M9 | LB        | S-M9 |
| 10   | 100%      | 100% | 100%      | 100% |
| 30   | 100%      | 100% | 70%       | 84%  |
| 50   | 100%      | 100% | 50%       | 68%  |
| 100  | 96%       | 100% | 20%       | 35%  |

註解：S-M9 營養基包含 0.4%葡萄糖。

**【圖式簡單說明】**

[n] 本發明進一步的較佳特徵，係位於申請專利範圍的獨立項以及其後的實施例說明中，其係參考以下附圖：

[n] 圖一(a)為顯示本發明實施例之曲線圖，係說明不同濃度的左旋阿拉伯糖誘導菌種所產生的蛋白質量。

[n] 圖一(b)為顯示本發明實施例之蛋白質電泳分析圖。

[n] 圖二為顯示本發明實施例之曲線圖，係說明饋料批次發酵的進料階段以區段式進料法(長條狀區域)進行重組菌種BL21(BAD)/pTAHL10/pAR3-GRO-Km的高細胞密度發酵。

[n] 表一為不同營養基質對於重組蛋白質生產的效應。

[n] 表二為質體在重組菌種BL21(BAD)和BL21(DE3)中之穩定性。

**【主要元件符號說明】**

**七、申請專利範圍：**

1. 一種以左旋阿拉伯糖誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，包含以下步驟：建構一株重組大腸桿菌菌種BL21(BAD)，該重組菌種含有一個內含T7啟動子的質體，且該重組菌種的染色體上籍含有以araBAD啟動子控制的T7基因1(T7gene 1)和araC控制基因；以饋料批次發酵方法培養該重組菌種，發酵槽操作的條件設定在20-39°C、pH6.5-7.5、溶氧度為5%-30%的飽和溶氧度，在批次發酵階段，提供的發酵液中含有每升2g-30g的葡萄糖為碳源，而在進料階段，提供的進料液中含有每升100g-800g的甘油和葡萄糖為碳源，使達到高細胞密度發酵；以及在細胞達到一定高密度後，加入含有每升2g-20g的左旋阿拉伯糖的誘導物，使該重組菌種產生一重組蛋白質。
2. 如申請範圍第1項所述之控制方法，其中該內含T7啟動子的質體係具有一選殖基因。
3. 如申請範圍第2項所述之控制方法，其中該左旋阿拉伯糖與araC控制基因產生的蛋白質結合成複合蛋白質，活化araBAD啟動子，使T7基因1產生T7 RNA聚合酉每，促使T7啟動子驅動該選殖基因，而產生該重組蛋白質。
4. 如申請範圍第1項所述之控制方法，其中在發酵階段，提供的發酵液中含有葡萄糖為碳

源，係以穩定該質體。

5. 如申請範圍第2項所述之控制方法，其中在進料階段，提供的進料液中含有甘油和葡萄糖為碳源，以利左旋阿拉伯糖誘導生產該選殖基因的產物和穩定該質體。

6. 如申請範圍第2或5項所述之控制方法，其中該選殖基因的產物即為該重組蛋白質。

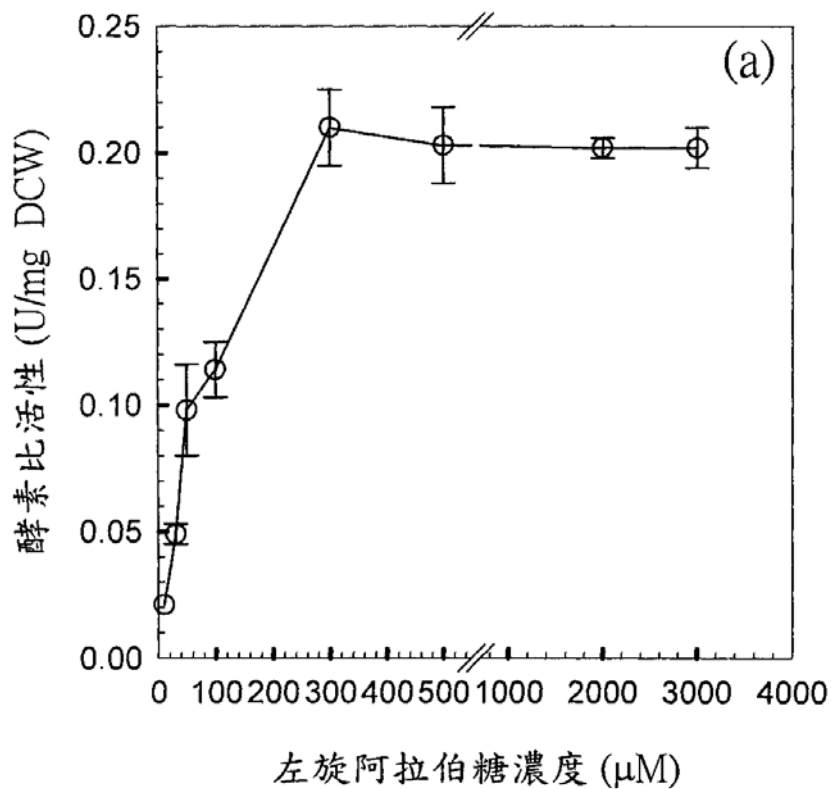
7. 如申請範圍第1項所述之控制方法，其中該細胞所達到的高密度係每升18 g乾重細胞。

8. 如申請範圍第1項所述之控制方法，其中在進料階段所使用的進料方式，係包含區段式進料法。

9. 如申請範圍第1項所述之控制方法，進一步包含一種檢測方法，該檢測方法係以小規模提高該重組菌種數量，加入左旋阿拉伯糖誘導產生一異源蛋白質(heterologous protein)。

10. 如申請範圍第9項所述之控制方法，其中該異源蛋白質易形成內涵體(inclusion body)和具有潛在毒性，用於檢測該T7表達系統的可行性。

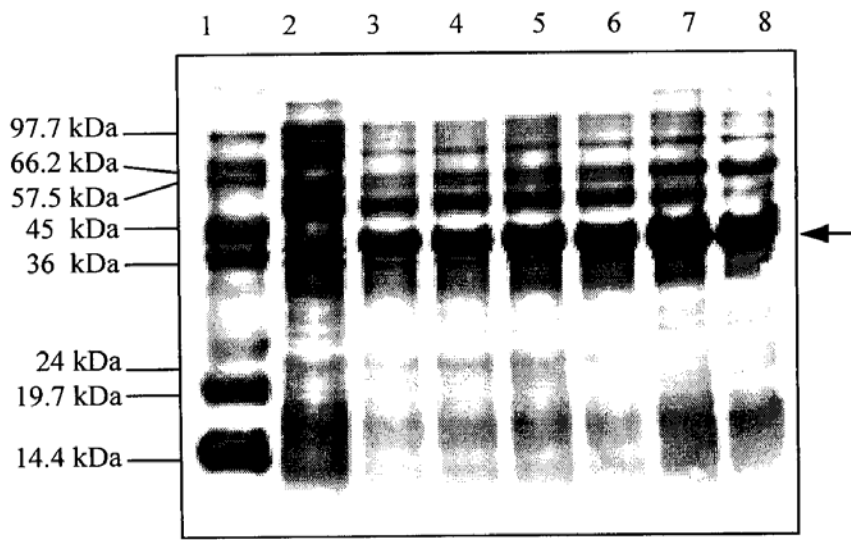
## 八、圖式：



圖一(a)

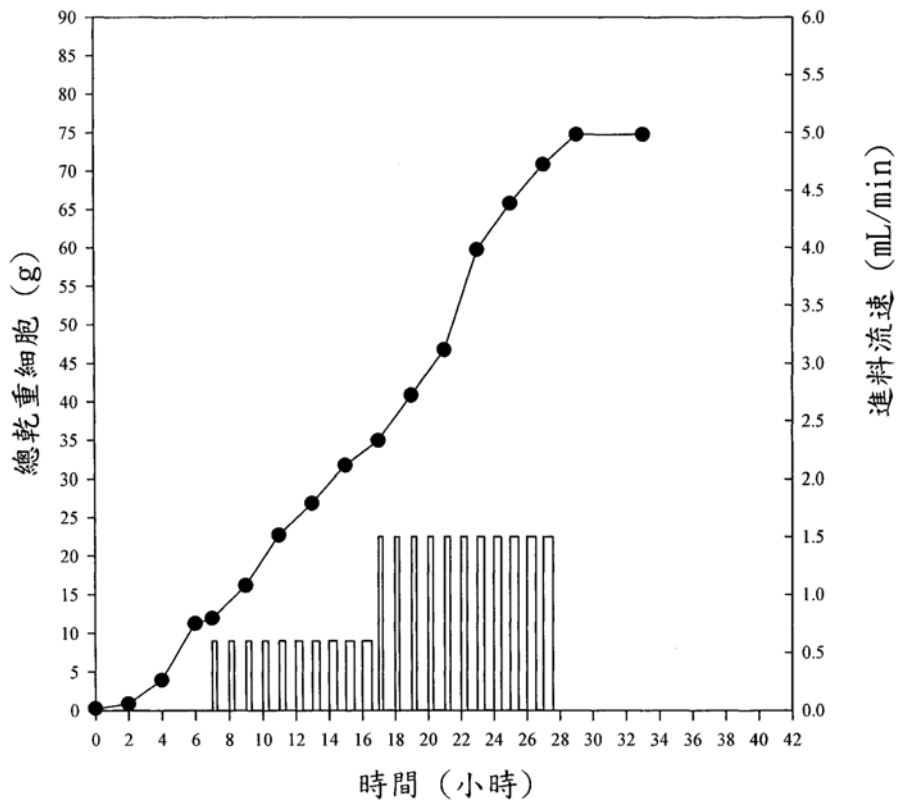
圖一(a)





圖一(b)

圖一(b)



圖二

圖二