

發明專利說明書

※申請案號：091113951

※IPC分類：

一、發明名稱：

以熱誘導方式來控制T7表達系統

Control of The T7 Expression System by heat

二、中文發明摘要：

本發明之控制方法係建構一株能以熱來誘導生產T7RNA聚合酶的重組大腸桿菌種BL21(G2)，此菌種的染色體上籍含有以 λ P_L和P_R雙啟動子控制的T7基因1(T7 gene 1)和一個c1857抑制基因(repressor gene)。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。本發明旨在利用溫度為誘導方式，進一步以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(G2) by using heat. The strain BL21(G2) are useful to produce a variety of heterogonous proteins. Also disclosed is a biologically large scale operations of the strain BL21(G2), it is convenient to carry out the culture in a fermentation tank with 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熱誘導控制大腸桿菌中基因表達載體(expression vector)的方法，更明確的是，本發明是一種以熱誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，此方法進一步含有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(T7expression system)。T7表達系統包含T7 RNA聚合酶(T7 RNA polymerase)和一個含有能被T7 RNA聚合酶驅動的T7啟動子(T7 promoter)之質體。T7 RNA聚合酶是噬菌體(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 β -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: 即在大規模發酵時使用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IPTG需藉由細菌細胞的lacY蛋白質以主動運輸方式來輸送至細胞內, 因此使用非飽和量的IPTG來誘導, 必導致被誘導的細胞群中含有已誘導和非誘導的細胞族群, 此種非均勻狀態造成發酵的菌種產生不穩定性, 並且難以達到精微調控菌種的基因表達程度之目的, (5)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。

【發明內容】

[n] 過去的研究發現, 重組菌種在其染色體中籍含有一個以lacUV5啟動子控制的T7基因1, 在加入IPTG後, 選殖在T7啟動子下的目標基因即可在此重組菌種中誘導表達, 而達到大量生產重組蛋白質的目標。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。再則, 由於低嚴謹調控性的lacUV5啟動子, 使得重組菌種即便在非誘導狀況下也能合成微量的T7 RNA聚合酶, 以致含有潛在毒性基因的質體難以在重組菌種中穩定存在, 這些缺點顯然限制了T7表達系統的工業實用性, 因此本發明特別以熱誘導方式應用在控制T7表達系統。

[n] 本發明的主要目的旨在提供一種以熱誘導方式控制大腸桿菌中的T7表達系統, 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, 係運用熱誘導方式來控制T7表達系統, 並進一步以區段式進料發酵策略, 以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熱誘導生產T7 RNA聚合酶的重組菌種BL21(G2), 此菌種的染色體上籍含有以 λP_L 和 P_R 雙啟動子控制的T7基因1和cI857抑制基因(repressor gene)。基本上, 在高溫狀態下cI857抑制蛋白質失去活性, 導致 λP_L 和 P_R 雙啟動子活化啟動, 使T7基因1產生T7 RNA聚合酶, 促使T7啟動子驅動表達該選殖基因, 而產生該重組蛋白質, 因此選殖在T7啟動子下游的目標基因之表達自然為熱誘導所控制。

[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, 培養溫度在30°C時, carbamoylase在菌種BL21(G2)中幾乎沒有生成, 然而溫度由30°C提昇至33°C時, 菌種BL21(G2)即生產可量測到酵素活性的carbamoylase, 將溫提昇至39°C時, 只需5-10分鐘菌種BL21(G2)即可生產達20%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溫度誘導, 菌種BL21(G2)可以生產多出以搖瓶發酵生產所得蛋白質 1.8×10^6 倍以上的量。本發明發展的系統具有以下多項優點:

[n] (1)可以熱誘導方式來生產重組蛋白質, 此種物理誘導方式兼具簡單和經濟競爭性, 不造成發酵液污染, 尚且可以不同溫度來精微調控菌種的基因表達程度。

[n] (2)由於選擇使用的噬菌體 λP_L 和 P_R 雙啟動子具有較高強度, 使得重組菌種對於溫度特具高敏感性, 例如菌種極易為溫度(如33°C)所誘導生產選殖蛋白質, 而以較高溫度(如39°C)誘導時則只需數分鐘誘導時間重組菌種即可累積生產大量的蛋白質。

- [n] (3)本發明菌種可以維持含carbamoylase基因質體100%穩定度達60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(Chao et al., Biotechnol. Prog., 18:394-400, (2002))。
- [n] (4)本發明菌種可以工業級發酵槽放大培養至高細胞密度，溫度誘導後可產生高出實驗室發酵槽規模900倍和搖瓶規模 1.8×10^6 倍的重組蛋白質，而發酵終止後的質體穩定性達96%，由此顯示本發明所建構的菌種BL21(G2)具有工業實用性。

【實施方式】

- [n] 本發明以熱誘導方式來控制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 λP_L 和 P_R 雙啟動子控制的T7基因1(T7 gene 1)和c1857抑制基因(repressor gene)；以饋料批次發酵方法培養該重組菌種，並在進料階段開始後一定時間內，提供加熱誘導方式，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：以熱誘導建構出的重組菌種BL21(G2)，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] 為了發展以熱誘導方式來控制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 λP_L 和 P_R 雙啟動子調控的T7基因1和一個熱敏感性的c1857抑制基因。
- [n] 基因選殖過程中均採用大腸桿菌DH5 α (deoRendA1 gyr96 hSdR17 supE444 thi Δ (lacIZYA-argF169)recA1 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30°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。營養基質的成分視需求而定，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] 根據T7基因1的發表序列(Grachev and Pletnev, Bioorg. 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-GAGGATCCTTAACATCGCTAAGAACG 和TAAGCTTTGGCGTTACGCGAAC，並委由GENSETSingapore 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, 聚合鏈鎖反應)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 μ L反應溶液中包含樣板DNA(10ng/mL)、2.5活性單元Pfu聚合酶、一對寡核苷酸(oligonucleotide)(0.5 μ M)和四種核苷酸(200 μ 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(NuceloSpinNucleic Acid Purification Kit, Clontech Lab., Inc.)純化，並利用BamH1、HindIII限制酵素切割和再純化，最後使用T4DNA粘接酶(T4DNA ligase)將DNA產物粘接至質體pBluescript(Stratagene, CA)中。接著使用EcoRI、XhoI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pND707(Elvin et al., Gene, 87:123-126, (1990))中得到質體pND-G1-2。選殖在質體pND-G1-2上的T7基因1則位於 λP_L 和 P_R 雙啟動子下游，而接鄰在雙啟動子的上游區則含有c1857抑制基因。
- [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(phage lysate)，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1M的檸檬酸鈉，由試管中取出0.1 mL的混合液灑養在篩選培養基上。

- [n] 為了將選殖基因片段鑲入菌種染色體中，隨即由質體pND-G1-2將含有位於 λ P_L和P_R啟動子下游的T7基因1和上游區的cl857抑制基因之DNA片段以PstI、XhoI限制酵素切除並回收，最後插接入質體pBRINT-Km(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-G2轉殖入以氯化鈣處理的菌種JC7623(recB21 recC22 sbcB15 sbcC201)(Oden et al., Gene, 96:29-36, 1990)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籍入菌種染色體中，轉植後的菌種隨即灑養在含0.01 mg/mL卡那黴素(kanamycin)和0.004% β -chloro-3-indolyl- β -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0.01 mg/mL卡那黴和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，如此得到的菌種便命名為BL21(G2)。
- [n] 檢驗重組菌種BL21(G2)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] 與建構重組菌種BL21(G2)中A項培養方法相同，使用搖瓶來培養菌種。
- [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] 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15000 g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] 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T7啟動子調控groELS基因表達的質體pT-GroE(Yasukawa et al., J. Biol. Chem., 270:25328-25331(1995))同時轉殖到菌種BL21(G2)中，得到重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE。在30°C條件下以搖瓶培養重組菌，待細胞生長至OD₅₅₀達0.5時，將培養溫度提昇至33、35、37、39和40°C，隨後繼續培養細胞至停滯生長時期，以15000g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，carbamoylase的生產量隨著高溫度而增加，而其中以37°C誘導時得到最大可溶性蛋白質。在非誘導情況下，重組蛋白質的產量幾乎無法偵測到，但在33°C下即可產生可量測的蛋白質量。這些結果顯示，本發明發展的系統確可利用熱誘導方式來生產重組蛋白質，而且頗具溫度敏感性。
- [n] 由表一中可發現，當溫度過高如超過39°C蛋白質的產量反而大量減少，經由蛋白質電泳分析判斷，這是因為多數誘導生產的蛋白質聚集形成不可溶性的內涵體所致。另一方面，過量生產的carbamoylase足以嚴重抑制細胞的生長，而這個情況也隨著誘導溫度的增加益形嚴重。顯然低溫可以減緩內涵體的形成，因此若以高溫誘導生產蛋白質，熱誘導一段時間後再將溫度降回細胞最適生長溫度如37°C，此種所謂「二階段溫度誘導」方式預期將有助於生產更大量可溶性蛋白質。基於此，重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE以搖瓶在30°C條件下培養，同D項方式將培養溫度提高至39°C，10分鐘後再將溫度降至37°C，結果可得到酵素比活性達0.16U/mg乾重細胞的蛋白質量，與單以37°C誘導所得的酵素活性比較則增加30%。表二列出在39°C誘導時間之長短對於重組蛋白質產量的影響，由此可發現蛋白質最大產量發生在誘導時間介於10-20分鐘之範圍，有趣的是，僅僅5分鐘的誘導時間即可生產出相當於70%最大蛋白質生產量的蛋白質。參考圖一的蛋白質電泳分析，其中徑1：蛋白質標準物；徑2：未經誘導；徑3：熱誘導5分鐘；徑4：熱誘導10分鐘；徑5：熱誘導20分

鐘；；徑6：熱誘導30分鐘；徑7：熱誘導45分鐘；徑8：熱誘導60分鐘。

- [n] 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質量達到總細胞蛋白質質量的20%，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短暫熱誘導時間即可累積生產重組蛋白質之特性。
- [n] 重組菌種BL21(G2)/pTAHL 10/pT-GroE以LB未含抗生素為營養基質，使用內含20 mL基質之搖瓶在30°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pTAHL 10和pT-GroE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)/pTAHL 10/pT-GroE，並依照上述方式測試菌種BL21(DE3)對於質體的穩定性。
- [n] 結果顯示，在所測試的營養基質中菌種BL21(G2)可以維持100%的質體穩定度達60細胞世代，而菌種BL21(DE3)在相同的情況下只維持100%的質體穩定度達20細胞世代，由此可知本發明發展之菌種BL21(G2)具有極高的質體穩定性。
- [n] 實施例(三)、以熱誘導控制T7表達系統來生產實驗室發酵槽規模的重組蛋白質。
- [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，基於此，我們以饋料批次發酵法來檢測本發明發展的菌種之潛在實用性。
- [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30°C、pH 7.0、溶氧度為15%的飽和溶氧度。先期以搖瓶培養300 mL的菌種作為接種菌(實施例(一)A項)，而營養基質的組成份為每升溶液含3 g磷酸鉀、6 g磷酸化二鈉、1 g氯化氨、0.248 g硫酸鎂、0.1 g硫化鐵、11.1 mg氯化鈣、0.03 mg維他命B1、2 g酵母萃取和5g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6.25 g磷酸鉀、28.75g磷酸化二鈉、3.75 g氯化氨、0.2g硫酸鎂、0.175 g硫化鐵、0.09 g氯化鈣、0.065 g維他命B1、5 g酵母萃取和16.5 g葡萄糖。當細胞在批次發酵階段生長進入停滯生長期，1L的進料液隨即依據事先決定的進料流量使用幫浦打入發酵槽中，進料流量的預估則採用對數進料法計算而來(Korz et al., J. Biotechnol., 39:59-65(1995))，而進料液的營養基質成分為每升溶液含6 g氯化氨、9 g硫酸鎂、0.146 g硫化鐵、20 g酵母萃取和150 g葡萄糖。在整個發酵過程中所使用的培養液均排除使用抗生素。
- [n] 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] 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15000 g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] 依據A項方式培養重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE，在進料階段以二階段熱誘導方式進行誘導，發酵槽培養溫度由30°C逐步上升至39°C，5分鐘後隨即逐步降溫至37°C，而整個加熱和降溫過程約計費時15分鐘，如圖二(a)所示，其中圖中箭頭所示為熱誘導時機，在發酵結束後培養的細胞密度可達 $OD_{550}=90$ ，估計約有每升32.4 g乾重細胞生成，而酵素體積活性達5.83 U/mL。另一方面，由蛋白質電泳分析也顯示誘導後重組蛋白質大量累積，由圖二(b)所示蛋白質電泳分析圖，其中，徑1：蛋白質標準物；徑2：溫度誘導時；徑3：熱誘導後3小時；徑4：熱誘導後6小時；徑5：熱誘導後9小時；整個發酵產生的重組蛋白質總計有14,256 U，這個產量是以搖瓶方式所獲得蛋白質質量的2000倍。此外，在發酵結束後檢測菌種所含質體之穩定度也達100%。
- [n] 實施例(四)、以熱誘導控制T7表達系統來生產工業規模的重組蛋白質。
- [n] 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，而其成功的關鍵在於工業規模發酵時重組菌種受誘導後能同時獲得高細胞密度和高酵素比活性。基於此，我們發展

所謂的「區段進料式發酵法」以達高細胞密度培養，並同時檢測本發明發展的菌種於工業規模發酵時的潛在實用性。

[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 Δt 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。 $Y=(V_i X_i - V_{i-1} X_{i-1}) / (F \Delta t S)$ (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) Δt ：階段進料時間(min) μ ：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] 採用5000 L工業規模的發酵槽作為放大規模菌種的培養。發酵槽操作的條件設定在30°C、pH 7.0、溶氧度15%的飽和溶氧度。先期以搖瓶培養300 mL的菌種作為接種菌(實例一A項)，待細胞培養至 OD_{550} 達1時，將所有菌液接種至含4L營養基的發酵槽中，待細胞生長至 OD_{550} 達1時，再接種至含40 L營養基的發酵槽中，接種過程中使用的營養基質的組成份為每升溶液含3 g磷酸鉀、6 g磷酸化二鈉、1 g氯化氨、0.248 g硫酸鎂、0.1 g硫化鐵、11.1 mg氯化鈣、0.03 mg維他命B1、2g酵母萃取和5g葡萄糖。俟40 L發酵的菌種密度達 OD_{550} 為1時，再接種至含2800 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6.25 g磷酸鉀、28.75 g磷酸化二鈉、3.75 g氯化氨、0.2 g硫酸鎂、0.175 g硫化鐵、0.09 g氯化鈣、0.065 g維他命B1、1%酵母萃取和4%葡萄糖。待細胞在批次發酵階段生長進入停滯生長期，1200 L的進料液隨即依據方程式(3)決定的進料流量使用幫浦打入發酵槽中，進料流量則以控制 0.2 hr^{-1} 比生長速率來估算，而進料液的營養基質成分為每升溶液含6 g氯化氨、9 g硫酸鎂、0.146 g硫化鐵、20 g酵母萃取和120 g葡萄糖。在整個發酵過程中所使用的培養液均排除使用抗生素。

[n] 酵素活性分析主要依據過去已發表的方法(Chaoet 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] 依據B項方式培養重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE，在進料階段1小時或3小時後以加熱方式進行誘導，發酵槽培養溫度由30°C逐步上升至37°C，如圖三(a)(b)所示，其中圖中箭頭所示為熱誘導時機，在發酵結束後培養的細胞密度分別可達 $OD_{550}=56$ 或65，估計約有每升20.2或23.4g乾重細胞生成，而酵素體積活性分別得到3.2或2.9 U/mL。整個發酵產生的重組蛋白質總計有 1.28×10^7 U，這個產量是以小發酵槽規模方式(實施例(三))所獲得蛋白質量的900倍，是以搖瓶規模方式所獲得蛋白質量的 1.8×10^6 倍。此外，在發酵結束後檢測菌種所含質體之穩定度也達96%。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，具有工業實用價值。

[n] 根據本發明所實施以熱誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，只需控制溫度高低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 1.8×10^6 倍。

【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、為顯示本發明實施例(二)之蛋白質電泳分析圖。

[n] 圖二(a)、為顯示本發明實施例(三)之曲線，係說明重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE依據A項方式培養，在進料階段以二階段熱誘導方式進行誘導。

[n] 圖二(b)、為顯示本發明實施例(三)之蛋白質電泳分析圖。

[n] 圖三(a)、為顯示本發明實施例(四)之曲線，係說明重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE依據B項方式培養，在進料階段1小時後發酵槽溫度由30°C提升至37°C。

[n] 圖三(b)、為顯示本發明實施例(四)之曲線，係說明重組菌種BL21(G2)/pTAHL10/pT-GroE 依據B項方式培養，在進料階段3小時後發酵槽溫度由30°C提升至37°C。

[n] 表一、為不同溫度誘導對於重組蛋白質生產的效應。

[n] 表二、為二階段溫度誘導時間對於重組蛋白質生產的效應。

【主要元件符號說明】

[n]

表一

溫度 (°C)	酵素比活性 (U/mg 乾重細胞)
30	無法偵測*
33	0.018±0.003 [#]
35	0.070±0.005
37	0.122±0.007
39	0.011±0.003
40	0.011±0.003

註解：*測得之酵素活性在實驗誤差值範圍內

[#]實驗數據取自二次獨立的實驗結果

[n]

表二

誘導時間 (分鐘)	酵素體積活性 (U/mL)
5	0.100±0.007 [#]
10	0.140±0.008
20	0.132±0.005
30	0.082±0.007
45	0.051±0.003
60	0.032±0.003

註解：菌種首先接受 39°C 誘導，熱誘導時間如表二所列，
隨後將溫度降至 37°C 直到細胞生長進入停滯生長期。

[#]實驗數據取自二次獨立的實驗結果

七、申請專利範圍：

1. 一種以熱誘導方式來控制T7表達系統的控制方法，包含以下步驟：建構一株重組菌種「Escherichia coli BL 21(G2)」，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以lambda P_L和P_R雙啟動子控制的T7基因1(T7 gene 1)和c1857抑制基因；以饋料批次發酵方法培養該重組菌種，並在進料階段開始後一定時間內，提供加熱誘導方式其溫度範圍為33°C至39°C，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，其中該加熱誘導方式為控制c1857抑制蛋白質的活性，在高溫狀態下該c1857抑制蛋白質失去活性，導致lambda P_L和P_R雙啟動子活化啟動，使T7基因1產生T7 RNA聚合酶，促使T7啟動子驅動表達該選殖基因，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，其中加熱誘導方式，提供加熱溫度的範圍在33至

39°C之間。

5. 如申請範圍第2項所述之控制方法，其中在進料階段開始後一定時間內，係指進料開始至進料結束時間範圍內中擇一作為加熱誘導方式的實施點。

6. 如申請範圍第2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。

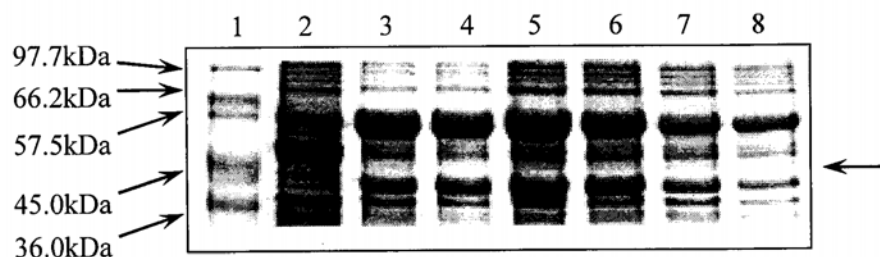
7. 如申請範圍第1項所述之控制方法，其中該細胞所達到的高密度係每升23.4 g乾重。

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，以加熱誘導方式產生一異源蛋白質(heterologous protein)。

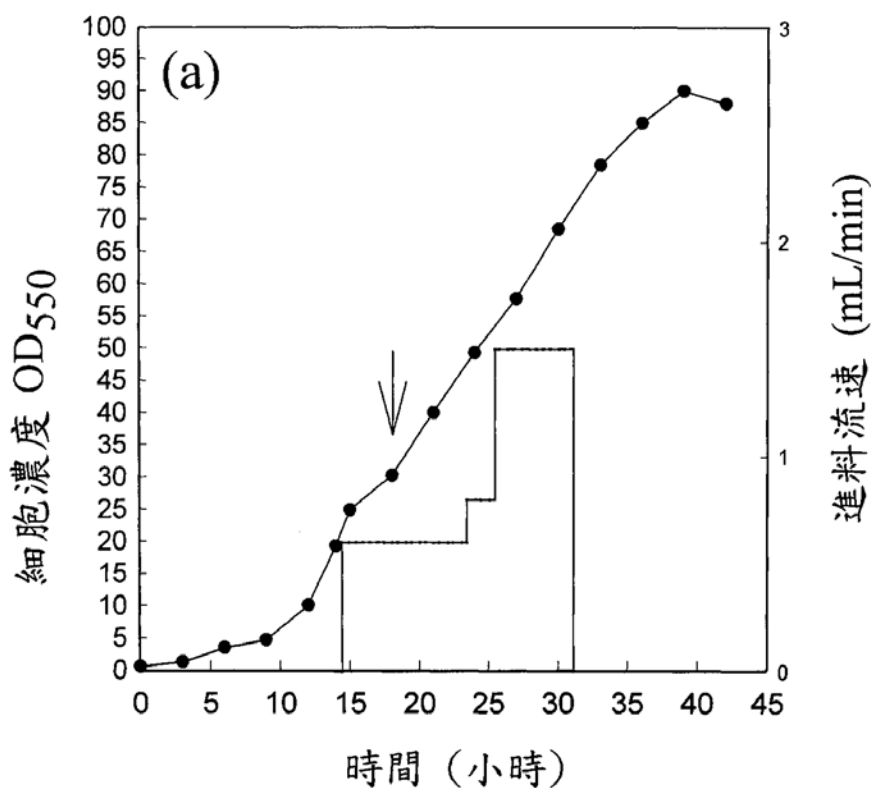
10. 如申請範圍第9項所述之控制方法，其中該異源蛋白質易形成內涵體(inclusion body)和具有潛在毒性，用於檢測該T7表達系統的可行性。

八、圖式：



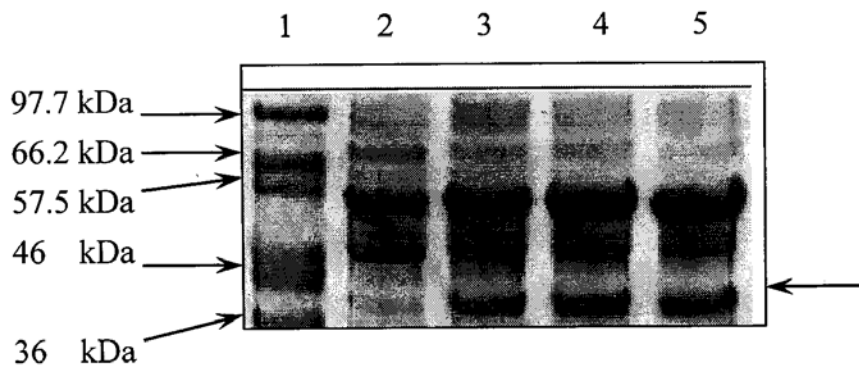
圖一

圖一



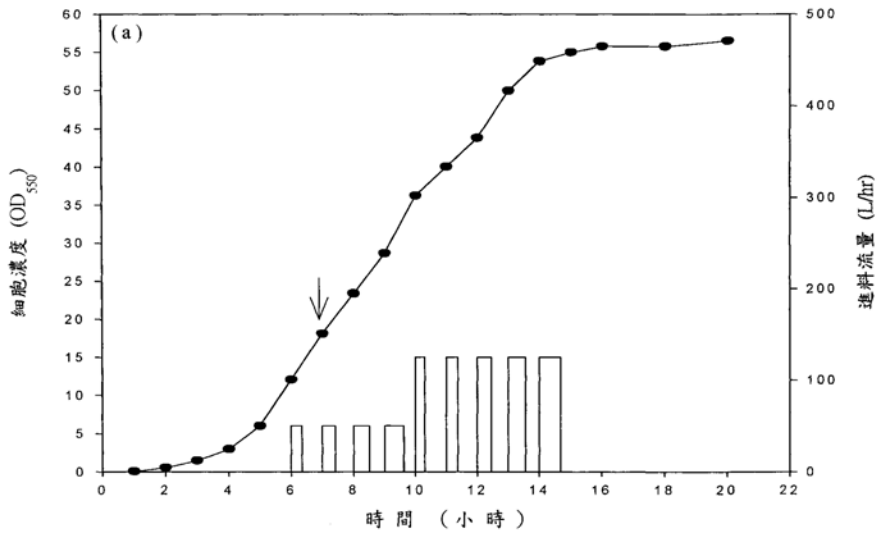
圖二(a)

圖二(a)



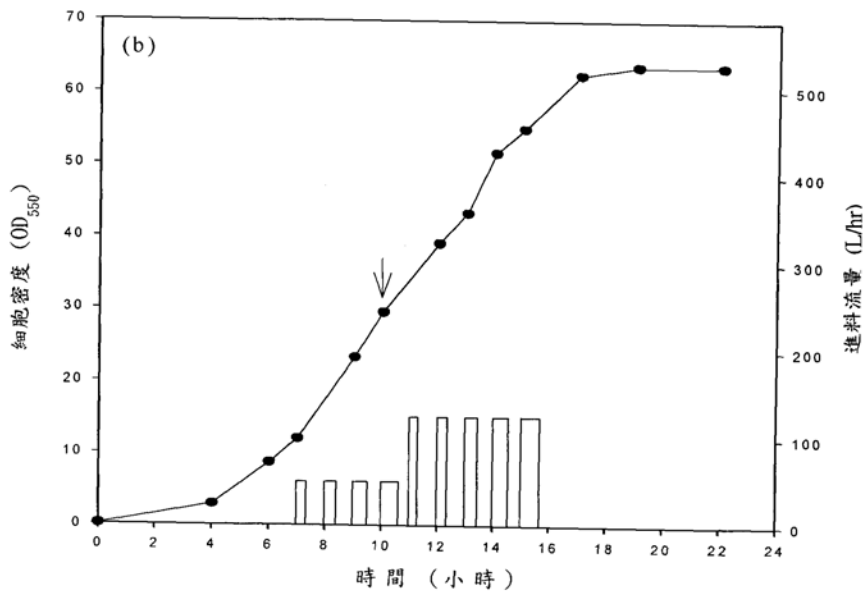
圖二(b)

圖二(b)



圖三(a)

圖三(a)



圖三(b)

圖三(b)