一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及基因工程技术领域，具体地，涉及一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌及其制备方法和应用。

背景技术

角质细胞生长因子-2（Keratinocyte Growth Factor-2，KGF-2），也称成纤维细胞生长因子-10（FGF-10），是成纤维细胞生长因子（Fibroblast Growth Factor，FGFs）家族的第 10 个成员，是机体内自身存在的多肽生长因子。KGF-2 为单拷贝基因，由 3 个外显子和 2 个内含子组成，定位于 15 号染色体，是一条单链多肽，含有 5 个半胱氨酸残疾，其中 4 个半胱氨酸形成 2 对二硫键，另一个半胱氨酸在折叠的肽中，为三叶草型；人的 KGF-2 成熟蛋白由 171 个氨基酸组成，理论分子量为 19.4kD，GenBank 中公布的人 KGF-2 基因序列登录号为 NM_004465.1。

KGF-2 对上皮组织具有高度特异性，同时还具有物理、化学和生物稳定性，其不仅能够促进角膜上皮损伤的愈合，并且还不会促进角膜新生血管的生长，适用于角膜上皮损伤的治疗。KGF-2 促进表皮角质细胞生长，修复受损细胞，加速细胞的新陈代谢，通过 KGF-2 专一性的角皮修复后，增加皮肤的免疫力和抵抗力，使肌肤回复健康，亮白状态，还广泛用于制备能够修复组织的化妆品或药品。

当今 KGF-2 一般通过基因工程的方法获取重组的人角质细胞生长因子-2（rhKGF-2），一般都是通过大肠杆菌表达系统进行表达生产，并且已经能够通过包涵体表达、可溶性表达和分泌表达等多种方式进行表达生产。现有技术（重组人角质细胞生长因子-2 工程菌的发酵条件研究）中构建了一种 KGF-2，其通过使用大肠杆菌工程菌[pET26b/KGF-2/BL(DE)21]发酵生产 rhKGF-2 蛋白，经过发酵罐放大生产后，rhKGF-2 蛋白的收率仅为 30%左右；且其发酵培养基中添加氨苄青霉素，说明其生产 rhKGF-2 蛋白的大肠杆菌工程菌为氨苄抗性的工程菌。

而使用携带氨苄青霉素的工程菌生产 KGF-2 已经不符合中国药典要求，并且现有技术中用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌的蛋白表达量低，收率仅有 30%左右；同时其质粒稳定性差，发酵后期质粒丢失率达到 50%以上，不能实现稳定传代生产 KGF-2 蛋白。

因此，目前急需一种无需利用氨苄青霉素筛选，更重要是 KGF-2 蛋白表达量高且具

备优异质粒稳定性的工程菌，能够实现 KGF-2 蛋白的高效生产。

发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术的上述不足，提供一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌及其制备方法和应用。

本发明的第一目的是提供一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌。

本发明的第二目的是提供上述工程菌在生产 KGF-2 蛋白中的应用。

本发明的第三目的是提供一种生产 KGF-2 蛋白的方法。

为了实现上述目的，本发明是通过以下方案予以实现的:

一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌，所述工程菌为转染有重组载体的大肠杆菌；

所述重组载体为携带有 KGF-2 蛋白编码序列的 pET-30a 载体、pET-28a 载体或 pET-42a 载体，所述 KGF-2 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示；

所述大肠杆菌为 OverExpress C43(DE3)大肠杆菌、Rosetta(DE3)大肠杆菌或 BL21 Star(DE3)大肠杆菌。

优选地，所述重组载体为携带有 KGF-2 蛋白编码序列的 pET-30a 载体，所述大肠杆菌为 Rosetta(DE3)大肠杆菌或 OverExpress C43(DE3)大肠杆菌。

更优选地，所述 KGF-2 蛋白编码序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

更优选地，所述重组载体为携带有 KGF-2 蛋白编码序列的 pET-30a 载体，所述大肠杆菌为 Rosetta(DE3)大肠杆菌。

本发明还请求保护上述任一所述的工程菌在生产 KGF-2 蛋白中的应用。

上述工程菌不仅无需利用氨苄青霉素筛选，而且对于 KGF-2 蛋白的蛋白表达量高，同时在发酵生产 KGF-2 蛋白的过程中质粒保持稳定，能够稳定表达 KGF-2 蛋白；利用上述工程菌生产 KGF-2 蛋白的收率高达 40%～50%。

本发明还请求保护一种生产 KGF-2 蛋白的方法，所述方法利用上述任一所述工程菌发酵生产 KGF-2 蛋白。

优选地，包括以下步骤:

S1.将上述任一所述的工程菌按照体积比为 1:20～200 接种至 LB 培养基中，充分培养后得到一级种子液，将一级种子液按照体积比为 1:20～200 接种至 LB 培养基中，充分培养后得到二级种子培养液；

S2.将步骤 S1 得到的二级种子培养液与发酵底料按照体积比为 2～10:20～100 混合得

到培养液，调整培养液的 pH 为 6.2～8.2，在溶氧＞10%、温度为 25～45℃、转速为 100～1600rpm 和通风量为 5～100 L/min 的条件下进行培养，待培养液的 OD_{600} 为 10～50 时，向培养液中加入终浓度为 0.1～3.0 mM 的 IPTG 和占总体积 1.0～30%的补料液，充分培养得到发酵后工程菌细胞；

所述发酵底料为底料 1 培养基、底料 2 培养基和 1～20g/L 的硫胺素溶液按照 15～25L:0.5～1.5L:6～10mL 混合得到；

其中底料 1 培养基含有终浓度为 15～25g/L 的蛋白胨、15～25g/L 的酵母粉、3～7g/L 的氯化钠、1～3g/L 的磷酸二氢钾、2～4g/L 的磷酸氢二钾和 1～3g/L 的氯化铵；底料 2 培养基含有终浓度为 2～10g/L 的一水葡萄糖、0.2～0.8g/L 的无水硫酸镁和 0.01～0.09g/L 的氯化钙；

所述补料液含有终浓度为 15～25g/L 的蛋白胨、15～25g/L 的酵母粉、3～7g/L 的氯化钠、1～3g/L 的磷酸二氢钾和 2～4g/L 的三水磷酸氢二钾；

S3.将步骤 S2 得到的发酵后工程菌细胞均质破碎，固液分离收集上清液进行 CM 层析得到粗纯的 KGF-2 蛋白，将粗纯的 KGF-2 蛋白进行肝素层析，得到 KGF-2 蛋白。

优选地，步骤 S1 中所述 LB 培养基为含有终浓度为 2～10g/L 酵母浸粉、9～21g/L 蛋白胨和 9～21g/L 氯化钠的 LB 培养基，pH 值为 6.2～8.2。

更优选地，步骤 S1 中所述 LB 培养基为含有终浓度为 5.0g/L 酵母浸粉、10.0g/L 蛋白胨和 10.0g/L 氯化钠的 LB 培养基，pH 值为 6.2～8.2。

优选地，步骤 S2 中所述硫胺素溶液为硫胺素水溶液。

优选地，步骤 S2 中为：待培养液的 OD_{600} 为 40 时，向培养液中加入终浓度为 0.1～3.0 mM 的 IPTG 和总体积 1.0～30%的补料液。

优选地，步骤 S3 中所述均质破碎具体为：将步骤 S2 得到的发酵后工程菌细胞和 Buffer A 按照 1g:1～100mL 充分混合，在 4～40℃下均质破碎；

所述 Buffer A 的配方为:15～45mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.2～1.8M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

更优选地，所述 Buffer A 的配方为:30mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.2M 的氯化钠和 20M 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

优选地，步骤 S3 中所述 CM 层析具体为：

平衡 CM 层析柱，将步骤 S3 中所述上清液按照 0.01～10.0g/mL 加入平衡后的 CM 层析柱中，收集流穿峰，再用 Buffer A 复平衡 CM 层析柱，使用 Buffer E 充分洗杂，接着使

用 Buffer C 洗脱 0.5～10 个柱体积，收集 UV_{280}＞20mAU 时的洗脱液，得到粗纯的 KGF-2 蛋白；

所述 Buffer C 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.2～1.8M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2；

所述 Buffer E 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.2～1.8M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

更优选地，所述平衡 CM 层析柱具体为：向 CM 层析柱中加入 Buffer A 平衡 0.5～10 个柱体积至 CM 层析柱基线平稳，且电导值不大于 100ms/cm，CM 层析柱的流出液 pH 值为 6.2～8.2，UV_{280} 吸收基线平稳，得到平衡后的 CM 层析柱。

更优选地，使用 Buffer C 洗脱 4 个柱体积。

更优选地，所述 Buffer C 的配方为：30mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.6M 的氯化钠和 20mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2；

所述 Buffer E 的配方为：30mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.3M 的氯化钠和 20mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

优选地，步骤 S3 中所述肝素层析具体为：

平衡肝素层析柱，将步骤 S3 中所述粗纯的 KGF-2 蛋白与 Buffer A 等体积混合，按照 0.10～2.00g/mL 上样平衡后的肝素层析柱，收集流穿峰，再用 Buffer B 复平衡肝素层析柱，使用 Buffer C 充分洗杂，接着使用 Buffer D 洗脱 0.5～10 个柱体积，收集 UV_{280}＞20mAU 时的洗脱液，即得 KGF-2 蛋白；

所述 Buffer B 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.1～3M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2；

所述 Buffer D 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.1～3M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

更优选地，所述平衡肝素层析柱具体为：向肝素层析柱中加入 Buffer B 平衡 0.5～10 个柱体积至肝素层析柱基线平稳，且电导值不大于 100ms/cm，肝素层析柱的流出液 pH 值为 6.2～8.2，UV_{280} 吸收基线平稳，得到平衡后的肝素层析柱。

更优选地，使用 Buffer D 洗脱 2 个柱体积。

更优选地，所述 Buffer B 的配方为：30mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.4M 的氯化钠和 20mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2；

所述 Buffer D 的配方为：30mM 的磷酸缓冲液（PB）、0.8M 的氯化钠和 20mM 的

EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明提供了一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌，所述工程菌为转染有重组载体的大肠杆菌；所述重组载体为携带有 KGF-2 蛋白编码序列的 pET-30a 载体、pET-28a 载体或 pET-42a 载体；所述大肠杆菌为 OverExpress C43(DE3)大肠杆菌、Rosetta(DE3)大肠杆菌或 BL21 Star(DE3)大肠杆菌。所述工程菌用于生产 KGF-2 蛋白时，KGF-2 的表达量高，同时在发酵生产 KGF-2 蛋白的过程中质粒能够保持稳定，进而稳定表达 KGF-2 蛋白，达到长期发酵生产 KGF-2 蛋白的目的；并且利用所述工程菌发酵生产 KGF-2 蛋白的收率高达 40%～50%，比现有收率提高约 66%，具有很好的应用价值。

附图说明

图 1 为实施例 1 中 500109-pET-28a(+)的图谱；

图 2 为实施例 1 中 500109-pET-30a(+)的图谱；

图 3 为实施例 1 中 500109-pET-42a(+)的图谱；

图 4 为实施例 1 中 500109-S9 工程菌培养后的观察图；

图 5 为实施例 1 中 500109-S9 工程菌培养后电子显微镜的观察结果图；

图 6 为实施例 1 中重组工程菌 500109-S2～500109-S5 诱导 4h 后的电泳检测结果图；

图 7 为实施例 1 中重组工程菌 500109-S6～500109-S9 诱导 4h 后的电泳检测结果图；

图 8 为实施例 1 中重组工程菌 500109-S10～500109-S13 诱导 4h 后的电泳检测结果图；

图 9 为实施例 1 中重组工程菌 500109-S2～500109-S5 诱导 16h 后的电泳检测结果图；

图 10 为实施例 1 中重组工程菌 500109-S6～500109-S9 诱导 16h 后的电泳检测结果图；

图 11 为实施例 1 中重组工程菌 500109-S10～500109-S13 诱导 16h 后的电泳检测结果图；

图 12 为实施例 1 中改变诱导温度时的 SDS-PAGE 电泳检测结果图；

图 13 为实施例 1 中改变诱导剂浓度时的 SDS-PAGE 电泳检测结果图；

图 14 为实施例 3 中不同接种量的重组工程菌的生长曲线图；

图 15 为实施例 3 中不同接种量的重组工程菌的 SDS-PAGE 结果图；

图 16 为实施例 3 中不同发酵底料的重组工程菌的生长曲线图；

图 17 为实施例 3 中不同发酵底料的重组工程菌的 SDS-PAGE 结果图；

图 18 为实施例 3 中不同时间加入诱导剂的重组工程菌的生长曲线图；

图 19 为实施例 3 中不同时间加入诱导剂的重组工程菌的 SDS-PAGE 结果图；

图 20 为实施例 3 中不同诱导剂浓度的重组工程菌的生长曲线图；

图 21 为实施例 3 中不同诱导剂浓度的重组工程菌的 SDS-PAGE 结果图；

图 22 为实施例 3 中不同温度的重组工程菌的生长曲线图；

图 23 为实施例 3 中不同温度的重组工程菌的 SDS-PAGE 结果图；

图 24 为实施例 3 中的低柱高阳离子交换层析图谱；

图 25 为实施例 3 中的高柱高阳离子交换层析图谱；

图 26 为实施例 3 中的低柱高亲和层析图谱；

图 27 为实施例 3 中的高柱高亲和层析图谱；

图 28 为实施例 3 中不同柱高的 SDS-PAGE 结果图；

图 29 为实施例 3 中纯化温度为 10℃的阳离子交换层析图谱；

图 30 为实施例 3 中纯化温度为 10℃的亲和层析图谱；

图 31 为实施例 3 中纯化温度为 10℃的 SDS-PAGE 结果图；

图 32 为实施例 3 中洗杂后的阳离子交换层析图谱；

图 33 为实施例 3 中洗杂后的亲和层析图谱；

图 34 为实施例 3 中洗杂后的 SDS-PAGE 结果图；

图 35 为实施例 3 中尿素洗杂后的阳离子交换层析图谱；

图 36 为实施例 3 中尿素洗杂后的亲和层析图谱；

图 37 为实施例 3 中对照组 3 的 SDS-PAGE 结果图；

图 38 为实施例 3 中 pH 为 7.2 时的阳离子交换层析图谱；

图 39 为实施例 3 中 pH 为 6.8 时的亲和层析图谱；

图 40 为实施例 3 中 pH 为 7.0 时的亲和层析图谱；

图 41 为实施例 3 中 pH 为 7.4 时的亲和层析图谱；

图 42 为实施例 3 中 pH 为 6.8 时的 SDS-PAGE 结果图；

图 43 为实施例 3 中 pH 为 7.0 时的 SDS-PAGE 结果图；

图 44 为实施例 3 中 pH 为 7.4 时的 SDS-PAGE 结果图；

图 45 为实施例 3 中对照组 7 亲和层析图谱；

图 46 为实施例 3 中对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 SDS-PAGE 结果图；

图 47 为实施例 3 中对照组 8 阳离子交换层析图谱；

图 48 为实施例 3 中对照组 8 亲和层析图谱；

图 49 为实施例 3 中对照组 8 的 SDS-PAGE 结果图；

图 50 为实施例 3 中实验组 5 阳离子交换层析图谱；

图 51 为实施例 3 中实验组 5 亲和层析图谱；

图 52 为实施例 3 中对照组 9 亲和层析图谱；

图 53 为实施例 3 中对照组 10 亲和层析图谱；

图 54 为实施例 3 中不同上样载量的 SDS-PAGE 结果图；

图 55 为实施例 3 中对照组 11 阳离子交换层析图谱；

图 56 为实施例 3 中对照组 11 亲和层析图谱；

图 57 为实施例 3 中不同洗脱 Buffer 的 SDS-PAGE 结果图；

图 58 为实施例 3 中对照组 12 阳离子交换层析图谱；

图 59 为实施例 3 中对照组 12 亲和层析图谱；

图 60 为实施例 3 中不同 pH 的 Buffer 的 SDS-PAGE 结果图；

图 61 为实施例 3 中实验组 7 阳离子交换层析图谱；

图 62 为实施例 3 中实验组 7 亲和层析图谱；

图 63 为实施例 3 中层析后增加置换包膜的 SDS-PAGE 结果图；

图 64 为实施例 3 中实验组 8 阳离子交换层析图谱；

图 65 为实施例 3 中实验组 8 亲和层析图谱；

图 66 为实施例 3 中不同 rhKGF-2 蛋白浓度的 SDS-PAGE 结果图；

图 67 为实施例 3 中实验组 9 阳离子交换层析图谱；

图 68 为实施例 3 中实验组 9 亲和层析图谱；

图 69 为实施例 3 中实验组 9 的 SP 层析图谱；

图 70 为实施例 3 中实验组 9 的肝素层析洗脱液和置换液的 SDS-PAGE 结果图；

图 71 为实施例 3 中实验组 9 中 SP 洗脱液的 SDS-PAGE 结果图；

图 72 为实施例 4 中的 SDS-PAGE 结果图；

图 73 为对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 SDS-PAGE 结果图。

具体实施方式

下面结合说明书附图及具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述，所述实施例只用于解释本发明，并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明，均为常规方法；所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，为可从商业途径得到的试剂和材料。

实施例 1 用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌的筛选构建

以 NCBI 中公布的人 KGF-2 基因序列（NM_004465.2）作为参考基因组，合成核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示的 500109 基因（KGF-2 蛋白编码序列），其编码的 KGF-2 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示。

一、表达载体的构建

以核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示的 500109 基因为模板，在其 5’端引入 Xba1I 限制性酶切位点，在 3’端引入 XhoI 限制性酶切位点，得到核苷酸序列如 SEQ ID NO：3 所示的插入基因 1；以核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示的 500109 基因为模板，在其 5’端引入 NdeI 限制性酶切位点，在 3’端引入 XhoI 限制性酶切位点，得到核苷酸序列如 SEQ ID NO：4 所示的插入基因 2。

将插入基因 1（SEQ ID NO：3）和 pET-28a(+)载体分别利用 Xba1I 限制性酶和 XhoI 限制性酶进行酶切，然后利用 T4 连接酶连接，得到携带有核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示基因的 pET-28a 载体，即 500109-pET-28a(+)，图谱如图 1 所示。

将插入基因 2（SEQ ID NO：4）和 pET-30a(+)载体分别利用 NdeI 限制性酶和 XhoI 限制性酶进行酶切，然后利用 T4 连接酶连接，得到携带有核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示基因的 pET-30a(+)载体，即 500109-pET-30a(+)，图谱如图 2 所示；

将 pET-30a(+)载体替换为 pET-42a(+)载体，进行同等处理，得到携带有核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示基因的 pET-42a(+)载体，即 500109-pET-42a(+)，图谱如图 3 所示。

二、工程菌的构建

1、方法

以 BL21(DE3)plysS 感受态细胞（唯地生物 EC1003）、BL21 Star(DE3)感受态细胞（Thermo 44-00049）、Rosetta(DE3)感受态细胞（索莱宝 C1420）和 Over Express C43(DE3)感受态细胞（唯地生物 EC1040）分别作为宿主菌。

以 BL21(DE3)plysS 感受态细胞作为宿主菌为例:将宿主菌置于离心管中并冰浴 15 min 后，将步骤一得到的 500109-pET-28a(+)与宿主菌按照体积比为 100:6 混合，混合均匀后冰浴 20 min，冰浴结束后摇匀，在 42℃水浴 90 s，接着放回冰浴中 2 min，冰浴结束后向离心管汇中加入无抗 LB 液体培养基（含有 5g/L 酵母浸粉、10g/L 蛋白胨和 10g/L 氯化钠），混合均匀后置于 37℃恒温震荡培养箱中培养 50 min，收集菌液并将涂布于含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 固体培养基平板（含有 5g/L 酵母浸粉、10g/L 蛋白胨和 10g/L 氯化钠）上，用封口膜封口，倒置于 37℃恒温培养箱中培养 16 h。

培养结束后挑选 2 个大小均一的单克隆菌株，分别接种到 2 个含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中，以 37℃，220rpm 的条件培养至 OD_{600} 处于 2～3 之间得到培养后菌液，向培养后菌液中加入甘油至甘油终浓度为 20%（v/v），混合均匀后得到含有载体为 500109-pET-28a(+)、宿主菌为 BL21(DE3)plysS 感受态细胞的重组工程菌的甘油菌。

将宿主菌依次替换为 BL21 Star(DE3)感受态细胞、Rosetta(DE3)感受态细胞和 Over Express C43(DE3)感受态细胞，进行同等处理，得到以不同感受态细胞作为宿主菌的重组工程菌。

将 500109-pET-28a(+) 依次替换为步骤一得到的 500109-pET-30a(+) 和 500109-pET-42a(+)，进行同等处理，得到相应的重组工程菌；不同重组工程菌的具体信息如表 1 所示，共制备得到 12 中重组工程菌。

表 1 重组工程菌信息

序号	工程菌编号	载体	宿主菌	制备数量
1	500109-S2	500109-pET-28a(+)	BL21(DE3)plysS	20 支/克隆×2 克隆
2	500109-S3	500109-pET-28a(+)	BL21 Star(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
3	500109-S4	500109-pET-28a(+)	Rosetta(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
4	500109-S5	500109-pET-28a(+)	Over Express C43(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
5	500109-S6	500109-pET-30a(+)	BL21(DE3)plysS	20 支/克隆×2 克隆
6	500109-S7	500109-pET-30a(+)	BL21 Star(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
7	500109-S8	500109-pET-42a(+)	Over Express C43(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
8	500109-S9	500109-pET-30a(+)	Rosetta(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
9	500109-S10	500109-pET-42a(+)	BL21(DE3)plysS	20 支/克隆×2 克隆
10	500109-S11	500109-pET-42a(+)	BL21 Star(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
11	500109-S12	500109-pET-42a(+)	Rosetta(DE3)	20 支/克隆×2 克隆
12	500109-S13	500109-pET-30a(+)	Over Express C43(DE3)	20 支/克隆×2 克隆

对表 1 所示 12 种重组工程菌进行测序，测序结果显示重组工程菌中均携带有有核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示基因。

以构建得到的 500109-S9 工程菌为例，将其涂布于含有 30mg/L 硫酸卡那霉素的 LB 琼脂培养平板（含有 5g/L 酵母浸粉、10g/L 蛋白胨和 10g/L 氯化钠）中，在 37℃培养 16h，培养结束后拍照观察，并将培养后的菌株利用结晶紫染色后在电子显微镜下观察形态特征。

2、实验结果

500109-S9 工程菌培养后的观察图如图 4 所示，电子显微镜的观察结果图如图 5 所示，结果显示:500109-S9 工程菌培养后均呈现典型的大肠杆菌菌落形态，且未见其他杂菌的生长；电子显微镜观察结果未见杂质污染。

三、工程菌筛选

1、重组工程菌诱导 4h 蛋白表达测试

（1）实验方法

分别利用步骤二表 1 中所示 12 个重组工程菌发酵表达 KGF-2 蛋白，每个重组工程菌设置一个克隆平行（共两组），以 500109-S2 为例，具体如下：

向 500109-S2 中加入甘油至甘油终浓度为 20%（v/v），混合均匀后得到 RCB 甘油菌，将 RCB 甘油菌按照 0.5%（v/v）的接种量接种至含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中以 37℃、150rpm 的条件培养 16 h，得到 1 级菌液。

将 1 级菌液按照 1%（v/v）接种到含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中以 37℃、200rpm 的条件培养至 OD_{600} 为 0.8～1.2（即菌株处于对数生长期），向培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1.5mM，以 40℃、200rpm 的条件继续诱导培养 4 h，培养结束后，充分离心收集菌体并利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平。

对 500109-S2 的克隆菌株进行同等处理，并对表 1 中所示 500109-S3～500109-S13 进行同等处理，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平。

（2）实验结果

重组工程菌诱导 4h 的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 6～图 8 所示；其中图 6 为 500109-S2～500109-S5 的 SDS 电泳检测结果，泳道 1 和 2 为 500109-S2 的电泳结果，泳道 3 和 4 为 500109-S3 的电泳结果，泳道 5 和 6 为 500109-S4 的电泳结果，泳道 7 和 8 为 500109-S5 的电泳结果，泳道 9 为 marker 的电泳结果；图 7 为 500109-S6～500109-S9 的 SDS 电泳检测结果，泳道 10 和 11 为 500109-S6 的电泳结果，泳道 12 和 13 为 500109-S7 的电泳结果，泳道 14 和 15 为 500109-S8 的电泳结果，泳道 16 为 marker 的电泳结果，泳道 17 和 18 为 500109-S9 的电泳结果；图 8 为 500109-S10～500109-S13 的 SDS 电泳检测结果，泳道 19 和 20 为 500109-S10 的电泳结果，泳道 21 为 marker 的电泳结果，泳道 22 和 23 为 500109-S11 的电泳结果，泳道 24 和 25 为 500109-S12 的电泳结果，泳道 26 和 27 为 500109-S13 的电泳结果。

KGF-2 蛋白的大小为 20KD 左右，结果显示：12 种重组工程菌在诱导 4h 后，均能够表达 KGF-2 蛋白，但是以 BL21(DE3)plysS 感受态细胞作为宿主菌的 3 种重组工程菌

（500109-S2、500109-S6 和 500109-S10）的 KGF-2 蛋白表达量相较于其他重组工程菌较低，不适合作为 KGF-2 蛋白表达生产菌株；而 500109-S3、500109-S9、500109-S11、500109-S12 和 500109-S13 的 KGF-2 蛋白表达量相对较高，且 500109-S9 和 500109-S13 工程菌的 KGF-2 蛋白表达量更高（电泳检测结果中蛋白条带更明显）。

2、重组工程菌诱导 16h 蛋白表达测试

（1）实验方法

分别利用步骤二表 1 中所示 12 个重组工程菌发酵表达 KGF-2 蛋白，同步骤三中 1.（1）所述实验方法的区别在于：加入 IPTG 至终浓度为 1.5 mM，以 40℃、200rpm 的条件继续诱导培养 16 h，培养结束后，充分离心收集菌体并利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平；其余实验步骤相同。

（2）实验结果

重组工程菌诱导 16h 的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 9～图 11 所示；其中图 9 为 500109-S2～500109-S5 的 SDS 电泳检测结果，泳道 1 和 2 为 500109-S2 的电泳结果，泳道 3 和 4 为 500109-S3 的电泳结果，泳道 5 和 6 为 500109-S4 的电泳结果，泳道 7 和 8 为 500109-S5 的电泳结果，泳道 9 为 marker 的电泳结果；图 10 为 500109-S6～500109-S9 的 SDS 电泳检测结果，泳道 10 和 11 为 500109-S6 的电泳结果，泳道 12 和 13 为 500109-S7 的电泳结果，泳道 14 和 15 为 500109-S8 的电泳结果，泳道 16 为 marker 的电泳结果，泳道 17 和 18 为 500109-S9 的电泳结果；图 11 为 500109-S10～500109-S13 的 SDS 电泳检测结果，泳道 19 和 20 为 500109-S10 的电泳结果，泳道 21 为 marker 的电泳结果，泳道 22 和 23 为 500109-S11 的电泳结果，泳道 24 和 25 为 500109-S12 的电泳结果，泳道 26 和 27 为 500109-S13 的电泳结果；其中图 10 所示电泳结果图中的高亮条带为脱色过程中胶破裂所导致，不影响电泳结果的判读，图 9～图 11 所示电泳检测结果图仅仅是肉眼观察目的蛋白表达情况，不作为定量用。

结果显示：12 种重组工程菌在诱导 16h 后，均能够表达 KGF-2 蛋白；但是 500109-S11 和 500109-S12 的 KGF-2 蛋白表达量不高；而 500109-S3、500109-S9 和 500109-S13 的 KGF-2 蛋白表达量显著高于其他重组工程菌。

3、重组工程菌的质粒丢失率检测

（1）实验方法

以 500109-S3、500109-S9、500109-S13 和 500109-S6 作为测试菌株，分别收集 4 种重组工程菌诱导 8 h（按照步骤三中 1 所示方法，将诱导培养时间改变为 8h）和诱导 16 h（步

骤三中 2 所示方法诱导）后的菌液（共 8 份菌液），分别将每份菌液稀释至 10^6 菌/mL 后涂布于不含抗生素的 LB 琼脂培养基上（含有 5g/L 酵母浸粉、10g/L 蛋白胨和 10g/L 氯化钠），在 37℃培养 16 h 后，从每个培养基中挑取 100 个单菌落，接种到含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 琼脂培养基和不含抗生素的 LB 琼脂培养基中，每个培养基接种 50 个单菌落，在 37℃培养 16 h，计算各个培养基中的菌落数量，得到抗性培养基生长菌落数和非抗性培养基生长菌落数。

基于抗性培养基生长菌落数和非抗性培养基生长菌落数，结合质粒丢失率检查法（基于《中国药典》2015 年版三部附录 IX G）计算质粒丢失率。

（2）实验结果

质粒丢失率检测结果如表 2 所示。

表 2 质粒丢失率检测结果

工程菌编号	诱导 8 h 的菌株中质粒丢失率	诱导 16h 的菌株中质粒丢失率
500109-S3	丢失 2%	丢失 11%
500109-S6	丢失 1%	丢失 1%
500109-S9	丢失 0%	丢失 8%
500109-S13	丢失 0%	丢失 2%

结果显示：4 种重组工程菌的质粒稳定性均较好，诱导 16h 的菌株中的质粒丢失率均小于 50%；且 500109-S9 和 500109-S13 在诱导 8h 后，质粒丢失率均为 0%，说明 500109-S9 和 500109-S13 的质粒稳定性较好。

4、重组工程菌表达生产 KGF-2 蛋白的条件优化

（1）实验方法

1）诱导温度优化，以 500109-S6 为例，具体如下：

向 500109-S6 中加入甘油至甘油终浓度为 20%（v/v），混合均匀后得到 RCB 甘油菌 1，将 RCB 甘油菌 1 按照 0.5%（v/v）的接种量接种至含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中以 30℃、150rpm 的条件培养 16 h，得到 1 级菌液 1。

将 1 级菌液 1 按照 1%（v/v）接种到含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中以 37℃、200rpm 的条件培养至 OD_{600} 为 0.5～2.0（即菌株处于对数生长期），向培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1.5 mM，以 40℃、200rpm 的条件继续培养 12h，培养结束后，充分离心收集菌体并利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平。

将加入 IPTG 后的培养温度改变为 45℃，其余步骤不变，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋

白表达水平；将 500109-S6 分别替换成 500109-S9 和 500109-S13，其余处理步骤不变，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平。

2）诱导剂浓度优化，具体如下：

向 500109-S9 中加入甘油至甘油终浓度为 20%（v/v），混合均匀后得到 RCB 甘油菌 2，将 RCB 甘油菌 2 按照 0.5%（v/v）的接种量接种至含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中以 30℃、150rpm 的条件培养 16 h，得到 1 级菌液 2。

将 1 级菌液 2 按照 1%（v/v）接种到含有 30mg/L 硫酸卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，在恒温震荡培养箱中以 37℃、200rpm 的条件培养至 OD_{600} 为 0.5～2.0（即菌株处于对数生长期），向培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1.5mM，以 40℃、200rpm 的条件继续培养 10h，培养结束后，充分离心收集菌体并利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平。

将 IPTG 的终浓度改变为 2.0mM，其余步骤不变，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平。

（2）实验结果

改变诱导温度时的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 12 所示；其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为 40℃诱导的 500109-S6 的电泳结果，泳道 3 为 45℃诱导的 500109-S6 的电泳结果，泳道 4 为 40℃诱导的 500109-S9 的电泳结果，泳道 5 为 45℃诱导的 500109-S9 的电泳结果，泳道 6 为 40℃诱导的 500109-S13 的电泳结果，泳道 7 为 45℃诱导的 500109-S13 的电泳结果。

结果显示：500109-S9 和 500109-S13 在诱导温度为 40℃时，KGF-2 蛋白的表达量相较于诱导温度为 45℃时更高；且 500109-S9 在诱导温度为 40℃时的 KGF-2 蛋白表达量显著高于其他重组工程菌。

改变诱导剂浓度时的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 13 所示；其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 和 3 为 IPTG 终浓度为 1.5mM 时诱导的 500109-S9 的电泳结果，泳道 4 和 5 为 IPTG 终浓度为 2.0mM 时诱导的 500109-S9 的电泳结果。

结果显示：无论是 IPTG（诱导剂）终浓度为 1.5mM 还是 2.0mM，KGF-2 蛋白的表达量没有显著差异，IPTG（诱导剂）浓度的上升并不能提高 KGF-2 蛋白的表达量。

综合上述结果，500109-S9 重组工程菌，即以 Rosetta(DE3)作为宿主菌，转化有 500109-pET-30a(+)载体的重组工程菌不仅含有卡那霉素抗性基因，而且 KGF-2 蛋白的表

达量相较于其他重组工程菌更高，同时还具有优异的质粒稳定性，能够作为 KGF-2 蛋白生产表达的工程菌；并且 500109-S9 在诱导温度为 40℃，诱导剂（IPTG）终浓度为 1.5mM 时的蛋白表达量最高。

实施例 2 一种生产并纯化 rhKGF-2 蛋白的方法

1、KGF-2 蛋白生产方法

S1.一级种子液制备：将实施例 1 构建得到的 500109-S9 与甘油混合至甘油终浓度为 20%（v/v），得到甘油菌；将 LB 培养基（含有 5g/L 酵母浸粉、10g/L 蛋白胨和 10g/L 氯化钠）的 pH 调节至 7.2，并将其转移至摇瓶中，将甘油菌和 LB 培养基按照体积比为 1:50 混合，在摇床中以 40℃，150rpm 的条件培养 18 h，得到一级种子液。

S2.二级种子液制备：将步骤 S1 得到的一级种子液按照体积比为 1:200 接入 LB 培养基中，在摇床中以 40℃，150rpm 的条件培养 8 h，得到二级种子液。

S3.发酵：将底料 1 培养基在主发酵罐中湿热灭菌后，加入无菌的硫胺素水溶液（20g/L），接着向主发酵罐中加入底料 2 培养基，混合均匀后得到发酵底料；其中底料 1 培养基、底料 2 培养基和硫胺素的加入体积比为 20～40L:0.5～1.5L:6～10mL；

将步骤 S2 得到的二级种子液（含有 500109-S9 菌株）按照 8%（v/v）的接种量接种至主发酵罐中，并记录初始发酵液体积，控制主发酵罐中的 pH 为 7.2，在温度为 40℃、溶氧量为 10%、通风量为 50L/min 和转速为 1000rpm 的条件下进行发酵，当 OD_{600}=40 时，加入终浓度为 1.5mM 的 IPTG（以初始发酵液计）和占总体积 8%的补料液（含有 20g/L 蛋白胨、23g/L 酵母粉、4g/L 氯化钠、1g/L 磷酸二氢钾和 3g/L 三水磷酸氢二钾），继续培养 6 h，培养结束后得到发酵后工程菌。

其中底料 1 培养基含有终浓度为 20g/L 的蛋白胨、23g/L 的酵母粉、4g/L 的氯化钠、1g/L 的磷酸二氢钾、3g/L 的磷酸氢二钾和 2g/L 的氯化铵；底料 2 培养基含有终浓度为 5g/L 的一水葡萄糖、0.6g/L 的无水硫酸镁和 0.013g/L 的氯化钙。

S4.纯化：

依次配置用于柱层析的 Buffer A～Buffer E，并控制 Buffer A～Buffer E 的温度为 15℃；

Buffer A 的配方为：30mM 的 PB、0.2M 的 NaCl 和 20mM 的 EDTA-2Na，pH6.2；

Buffer B 的配方为：30mM 的 PB、0.4M 的 NaCl 和 20mM 的 EDTA-2Na，pH6.2；

Buffer C 的配方为：30mM 的 PB、0.6M 的 NaCl 和 20mM 的 EDTA-2Na，pH6.2；

Buffer D 的配方为：30mM 的 PB、0.8M 的 NaCl 和 20mM 的 EDTA-2Na，pH6.2；

Buffer E 的配方为：30mM 的 PB、0.3M 的 NaCl 和 20mM 的 EDTA-2Na，pH6.2；

将步骤 S3 得到的发酵后工程菌与 Buffer A 按照 1g:20mL 混合，充分搅拌均匀得到混合液，在 15℃下，先以 200Bar 均质破碎一次，再以 700Bar 均质破碎两次，待破碎完全后（即混合液中无完整菌体，OD_{600}＜30），收集均质后液体于 10℃下以 7000rpm 离心 20 min，收集上清液并过滤，收集滤液。

CM 层析：连接 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：20.2cm，CV：107mL），以 100cm/h 的线速度用 Buffer A 平衡 3 个柱体积直至 CM 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，CM 层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将滤液（CM 上样液）按照 0.5g/mL 上样，收集流穿液再用 Buffer A 复平衡 CM 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，接着使用洗杂液（Buffer E）冲洗 2 个柱体积，在 UV＞20mAU 时开始收集，UV＜20mAU 时停止收集，得到洗杂液，观察峰型、UV 和电导，记录杂质峰体积。洗杂结束后用 Buffer C 洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞100mAU 时开始收集洗脱液，UV_{280}＜100mAU 时停止收集，收集 CM 层析洗脱液，CM 层析洗脱液即为粗纯的 rhKGF-2 蛋白，并对 CM 层析柱进行再生、清洗和保存。

肝素层析：连接 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：15 cm，CV：80mL），以 60cm/h 的线速度用 Buffer B 平衡 3 个柱体积至直至 Heparin 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，肝素层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将 CM 层析洗脱液与 Buffer A 等体积混合后，按照 0.5g/mL 上样，收集流穿峰，再用 Buffer B 复平衡 Heparin 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，接着使用 Buffer C 洗杂，待 UV_{280} 吸收基线冲洗平稳后，收集肝素洗杂液，洗杂结束后用 Buffer D 洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞100mAU 时开始收集洗脱液，UV_{280}＜100mAU 时停止收集，得到 Heparin 层析洗脱液（肝素洗脱液），即为精纯后的 rhKGF-2，并测定精纯后的 rhKGF-2 的质量；并对 Heparin 层析柱进行再生、清洗和保存。

2、rhKGF-2 蛋白表达量检测

利用 Lowry 法检测步骤 1 中 S4 得到的精纯后的 rhKGF-2 的蛋白质含量，并对步骤 1 中 S4 得到的精纯后的 rhKGF-2 进行高效液相色谱检测（HPLC）和 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，得到步骤 1 中 S4 得到的精纯后的 rhKGF-2 的纯度。

并根据精纯后的 ruKGF-2 的纯度，结合步骤 1 得到的精纯后的 rhKGF-2 蛋白的质量，计算得到 rhKGF-2 蛋白的质量。

3、实验结果

步骤 1 中 S4 得到的精纯后的 rhKGF-2 蛋白表达量检测结果如表 3 所示。

表 3 精纯后的 rhKGF-2 蛋白表达量检测结果

	浓度（mg/mL）	HPLC（%）	SDS-PAGE（%）
精纯后的 rhKGF-2 蛋白	6.03	97.0	97.2

结果显示：利用实施例 1 构建得到的 500109-S8 结合步骤 1 所示方法生产并纯化 KGF-2 蛋白，能够得到纯度较高的 KGF-2 蛋白；并且纯化后的 rhKGF-2 蛋白的质量为 7g，收率达到了 50%（理论产量为 14g）。

实施例 3 一种生产并纯化 rhKGF-2 蛋白的方法优化

一、实验方法

1、重组工程菌接种量对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响

按照实施例 2 步骤 1 所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S3 中的二级种子液接种量改变为 15%（v/v），进行发酵生产 rhKGF-2 蛋白并进行纯化（记为 F2023040218）。

在发酵过程中，每隔 2h 记录发酵罐中物质的 OD_{600}，以发酵时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制接种量为 15%时的菌株生长曲线；分别收集发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 的菌株，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平；利用质粒丢失率检查法检测质粒丢失率。

以实施例 2 步骤 1 所示方法作为对照组，检测接种量为 8%时的菌株（记为 F2023042321）生长曲线、蛋白表达水平和质粒丢失率。

2、发酵底料对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响

按照实施例 2 步骤 1 所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将步骤 S3 中的底料 1 培养基替换为 M9Y 培养基，底料 2 培养基替换为 4g/L 的碳源培养基，进行发酵生产 rhKGF-2 蛋白并进行纯化（记为 F2023042317）；其中 M9Y 培养基的成分为：10g/L 蛋白胨、10g/L 酵母粉、12g/L 磷酸二氢钾、3g/L 磷酸氢二钾、2g/L 硫酸铵、1g/L 一水柠檬酸、0.02g/L 七水硫酸亚铁和 3g/L 无水硫酸镁。

在发酵过程中，每隔 2h 记录发酵罐中物质的 OD_{600}，以发酵时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制菌株生长曲线；分别收集发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 的菌株，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平；利用质粒丢失率检查法检测质粒丢失率。

以实施例 2 步骤 1 所示方法作为对照组（记为 F2023042321），检测使用实施例 2 步骤 1 中所示发酵底料进行发酵培养时的菌株生长曲线、蛋白表达水平和质粒丢失率。

3、诱导剂（IPTG）加入时间对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响

按照实施例 2 步骤 1 所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将步骤 S3 中 IPTG 的加入时间改

变为：OD_{600}=50，进行发酵生产 rhKGF-2 蛋白并进行纯化（记为 F2023042318）。

在发酵过程中，每隔 2h 记录发酵罐中物质的 OD_{600}，以发酵时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制菌株生长曲线；分别收集发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 的菌株，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平；利用质粒丢失率检查法检测质粒丢失率。

以实施例 2 步骤 1 所示方法作为对照组，检测在 OD_{600}=40 时加入 IPTG 进行发酵培养时的菌株生长曲线、蛋白表达水平和质粒丢失率（记为 F2023042321）。

4、诱导剂（IPTG）浓度对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响

按照实施例 2 步骤 1 所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S3 中 IPTG 的终浓度改变为 2.0 mM，进行发酵生产 rhKGF-2 蛋白并进行纯化（记为 F2023043019）。

在发酵过程中，每隔 2h 记录发酵罐中物质的 OD_{600}，以发酵时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制菌株生长曲线；分别收集发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 的菌株，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平；利用质粒丢失率检查法检测质粒丢失率。

以实施例 2 步骤 1 所示方法作为对照组（记为 F2023042321），检测 IPTG 终浓度为 1.5 mM 时的菌株生长曲线、蛋白表达水平和质粒丢失率。

5、诱导温度对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响

按照实施例 2 步骤 1 所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将步骤 S3 中发酵罐的温度调整为 45℃（即保持诱导温度为 45℃），进行发酵生产 rhKGF-2 蛋白并进行纯化（记为 F2023042622）。

在发酵过程中，每隔 2h 记录发酵罐中物质的 OD_{600}，以发酵时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制菌株生长曲线；分别收集发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 的菌株，利用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达水平利用质粒丢失率检查法检测质粒丢失率。

以实施例 2 步骤 1 所示方法作为对照组（记为 F2023042321），检测诱导温度为 40℃时发酵培养的菌株生长曲线、蛋白表达水平和质粒丢失率。

6、纯化过程中层析柱柱高对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 1 为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 13.3cm 的 CM 层析柱，将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 7.5cm 的 Heparin 层析柱；将 CM 层析和肝素层析中的线速度调整为 150cm/h，并且在 CM 层析过程中不使用洗杂液（Buffer E）进行洗杂，其余处理相同，得到低柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白，并记录 CM 层析过程中的层析图谱（低柱高阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（低柱高亲和层析图谱）。

并按照实施例 2 步骤 2 所示方法，检测低柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

对照组 1 为：将柱高为 13.3cm 的 CM 层析柱替换为柱高为 20.2cm 的 CM 层析柱，将柱高为 7.5cm 的 Heparin 层析柱替换为柱高为 15cm 的 Heparin 层析柱，并控制 CM 层析的线速度为 120cm/h，肝素层析的线速度为 120cm/h，得到高柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白，并记录 CM 层析过程中的层析图谱（高柱高阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（高柱高亲和层析图谱）。

并按照实施例 2 步骤 2 所示方法，检测高柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

7、纯化过程温度对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

对照组 2 为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，对 S4 中用于柱层析的 Buffer A～Buffer D 的温度进行控制，控制 Buffer A～Buffer D 的温度在 10℃，并且在 CM 层析过程中不使用洗杂液（Buffer E）进行洗杂，其余处理相同，得到纯化温度为 10℃粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和纯化温度为 10℃精纯后的 rhKGF-2 蛋白；对肝素层析时得到的肝素层析洗脱液分段收集，得到肝素洗脱 1（80-791-500mAU 收集）、肝素洗脱 2（500-200mAU）和肝素洗脱 3（200-800mAU）。

并记录 CM 层析过程中的层析图谱（纯化温度为 10℃的阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（纯化温度为 10℃的亲和层析图谱）；按照实施例 2 步骤 2 所示方法，检测纯化温度为 10℃粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和纯化温度为 10℃精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE），并对肝素洗脱 1、肝素洗脱 2、肝素洗脱 3 和 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

8、CM 层析过程中洗杂步骤对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 2 为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 21cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：21cm；CV：422mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 31 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：31cm；CV：165 mL），其余处理相同，得到洗杂粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和洗杂精纯后的 rhKGF-2 蛋白。

并记录 CM 层析过程中的层析图谱（洗杂后的阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（洗杂后的亲和层析图谱）；并按照实施例 2 步骤 2 所示方法，检测洗杂粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和洗杂精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和

SDS-PAGE）。

对照组 3 同实验组 2 的区别在于：Buffer E 中还含有 2 M 尿素，其余步骤完全相同，得到尿素洗杂粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和尿素洗杂精纯后的 rhKGF-2 蛋白，并记录 CM 层析过程中的层析图谱（尿素洗杂后的阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（尿素洗杂后的亲和层析图谱）；按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测尿素洗杂精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）；同时对 CM 层析过程中的 CM 上样液、流穿液、洗杂液、尿素洗杂粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和尿素洗杂精纯后的 rhKGF-2 蛋白进行 SDS-PAGE 纯度检测，并对不含蛋白的 Blank 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。

9、肝素层析过程中 pH 值对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 3 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：100mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：50 mL），其余处理相同，得到肝素层析过程中 pH 为 7.2 时粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和肝素层析过程中 pH 为 7.2 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白；并记录 CM 层析过程中的层析图谱（pH 为 7.2 时的阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（pH 为 7.2 时的亲和层析图谱），按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测 pH 为 7.2 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

对照组 4 同实验组 3 的区别在于：Buffer A～Buffer D 的 pH 改变为 7.0，其余处理不变，得到肝素层析过程中 pH 为 7.0 时粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和肝素层析过程中 pH 为 7.0 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白；记录 CM 层析过程中的层析图谱（pH 为 7.0 时的阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（pH 为 7.0 时的亲和层析图谱），并按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测肝素层析过程中 pH 为 7.0 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）；同时对肝素层析过程中的肝素洗杂液和肝素层析过程中 pH 为 7.0 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白进行 SDS-PAGE 纯度检测。

对照组 5 同实验组 3 的区别在于：Buffer A～Buffer D 的 pH 改变为 6.8，其余处理不变，得到肝素层析过程中 pH 为 6.8 时粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和肝素层析过程中 pH 为 6.8 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白；记录肝素层析过程中的层析图谱（pH 为 6.8 时的亲和层析图谱），并按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测肝素层析过程中 pH 为 6.8 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）；同时对 CM 层析过程中的 CM 上样

液、流穿液、洗杂液、肝素层析过程中 pH 为 6.8 时粗纯后的 rhKGF-2 蛋白以及肝素层析过程中的肝素洗杂液和肝素层析过程中 pH 为 6.8 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白进行 SDS-PAGE 纯度检测。

对照组 6 同实验组 3 的区别在于：Buffer A～Buffer D 的 pH 改变为 7.4，其余处理不变，得到肝素层析过程中 pH 为 7.4 时粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和肝素层析过程中 pH 为 7.4 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白；记录肝素层析过程中的层析图谱（pH 为 7.4 时的亲和层析图谱），并按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测肝素层析过程中 pH 为 7.4 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）；同时对肝素层析过程中的肝素洗杂液进行 SDS-PAGE 纯度检测。

10、肝素层析过程中 Buffer 对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 5 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：100mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：50 mL），其余处理不变，得到实验组 5 精纯后的 rhKGF-2 蛋白。

对照组 7 同实验组 5 的区别在于：在肝素层析中，以 100cm/h 的线速度用 Buffer C 平衡 3 个柱体积直至 Heparin 层析柱基线平稳，接着将 CM 层析洗脱液按照 0.01～10.0g（菌泥）/mL（CM 填料）上样，得到对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白；记录肝素层析过程中的层析图谱（对照组 7 亲和层析图谱），并按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

对照组 8 同对照组 7 的区别在于：将 CM 层析洗脱液按照 0.01～10.0g（菌泥）/mL（CM 填料）上样后，收集肝素流穿液，再用 Buffer C 复平衡 3 个柱体积，收集复平衡肝素流穿液，接着用 Buffer F（Buffer C 和 Buffer D 按照体积比为 1:3 混合，NaCl 浓度为 0.8M）洗脱 2 个柱体积，收集 100mAU＜UV_{280}＜400mAU 时的洗脱液，得到对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白；记录 CM 层析过程中的层析图谱（对照组 8 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（对照组 8 亲和层析图谱），并按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

11、肝素层析过程中上样载量对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 5 的肝素层析上样载量为 1g/mL（肝素填料），具体为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva

CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：100mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：50 mL），其余处理不变，得到实验组 5 粗纯后 rhKGF-2 蛋白和实验组 5 精纯后 rhKGF-2 蛋白；并记录 CM 层析过程中的层析图谱（实验组 5 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（实验组 5 亲和层析图谱）。

对照组 9 同实验组 5 的区别在于：肝素层析过程中，将 CM 洗脱液与 Buffer A 等体积混合后，按照 0.6g/mL（肝素填料）上样，其余处理相同，得到对照组 9 精纯后 rhKGF-2 蛋白，并记录肝素层析过程中的层析图谱（对照组 9 亲和层析图谱）。

对照组 10 同实验组 5 的区别在于：肝素层析过程中，将 CM 洗脱液与 Buffer A 等体积混合后，按照 0.9g/mL（肝素填料）上样，其余处理相同，得到对照组 10 精纯后 rhKGF-2 蛋白，并记录肝素层析过程中的层析图谱（对照组 10 亲和层析图谱）。

按照实施例 2 步骤 2 所示方法分别检测实验组 5 粗纯后 rhKGF-2 蛋白、实验组 5 精纯后 rhKGF-2 蛋白、对照组 9 精纯后 rhKGF-2 蛋白和对照组 10 精纯后 rhKGF-2 蛋白分别的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

12、肝素层析过程中洗脱 Buffer 对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

对照组 11 同实施例 2 所示方法的区别在于：在肝素层析中，使用 Buffer G 洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞100mAU 时开始收集洗脱液，UV_{280}＜100mAU 时停止收集，得到对照组 11 精纯后 rhKGF-2 蛋白，其中 Buffer G 同 Buffer D 的区别在于：Buffer G 中不含有 20 mM 的 EDTA-2Na；记录 CM 层析过程中的层析图谱（对照组 11 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（对照组 11 亲和层析图谱），按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测对照组 11 精纯后 rhKGF-2 蛋白分的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE），同时对 CM 层析过程中的 CM 上样液、流穿液、洗杂液、对照组 11 粗纯后 rhKGF-2 蛋白、肝素洗杂液和对照组 11 精纯后 rhKGF-2 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。

13、肝素层析过程中 Buffer 的 pH 以及添加吐温 80 对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 6 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：100mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：50 mL），其余处理不变，得到实验组 6 精纯后的 rhKGF-2 蛋白。

对照组 12 同实验组 6 的区别在于：将 Buffer A～Buffer E 的 pH 值调整为 7.2，并且在

Buffer A～Buffer E 分别添加吐温 80 至终浓度为 0.05%（w/w），其余处理不变，得到对照组 12 精纯后 rhKGF-2 蛋白，记录 CM 层析过程中的层析图谱（对照组 12 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（对照组 12 亲和层析图谱），按照实施例 2 步骤 2 所示方法检测对照组 12 精纯后 rhKGF-2 蛋白的蛋白质含量以及纯度（HPLC），同时对 CM 层析过程中的 CM 上样液、流穿液、洗杂液、对照组 12 粗纯后 rhKGF-2 蛋白、肝素洗杂液和对照组 12 精纯后 rhKGF-2 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。

14、层析后置换包膜对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 7 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：373mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：165 mL），其余处理不变，得到实验组 7 粗纯后 rhKGF-2 蛋白和实验组 7 精纯后 rhKGF-2 蛋白；并记录 CM 层析过程中的层析图谱（实验组 7 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（实验组 7 亲和层析图谱）。

对照组 13 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：373mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：165 mL），进行 CM 层析和肝素层析，收集 Heparin 层析洗脱液，以 Buffer H（pH=7.2，30 mM 的 PB）作为置换膜液，与 Heparin 层析洗脱液等体积混合后，使用 2KD 透析膜置换 3 次，得到对照组 13 精纯后 rhKGF-2 蛋白并收集对照组 13 透过液。

对照组 14 与对照组 13 的区别在于：将 2KD 透析膜替换为 5KD 透析膜，得到对照组 14 精纯后 rhKGF-2 蛋白和对照组 14 透过液。

按照实施例 2 步骤 2 所示方法，分别检测实验组 7 粗纯后 rhKGF-2 蛋白、实验组 7 精纯后 rhKGF-2 蛋白、对照组 13 精纯后 rhKGF-2 蛋白、对照组 13 透过液、对照组 14 精纯后 rhKGF-2 蛋白和对照组 14 透过液的蛋白质含量以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

15、rhKGF-2 蛋白浓度对稳定性的影响

实验组 8 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 19cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：19cm；CV：373mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 25 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva

Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：25cm；CV：165 mL），进行 CM 层析和肝素层析，收集 Heparin 层析洗脱液，并记录 CM 层析过程中的层析图谱（实验组 8 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（实验组 8 亲和层析图谱）。

以 Buffer H（pH=7.2，30 mM 的 PB）作为置换膜液，将 Heparin 层析洗脱液与置换膜液等体积混合后，使用 2KD 透析膜置换 5 次后，收集置换液并用 Buffer H 分别稀释至 rhKGF-2 蛋白浓度为 3.3mg/mL、3.0mg/mL、2.0mg/mL、1.0mg/mL 和 0.5mg/mL 的稀释液，将不同浓度的稀释液，在 4℃静置 1 天后，对不同浓度的稀释液分别进行高效液相检测（HPLC）和 SDS-PAGE 检测。

16、肝素层析后增加 SP 层析对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响

实验组 9 设置为：按照实施例 2 步骤 1 中所示 KGF-2 蛋白的生产方法，将 S4 中的 CM 层析柱替换为柱高为 21.5cm 的 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，柱高：21.5cm；CV：422mL），将 S4 中的 Heparin 层析柱替换为柱高为 31 cm 的 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，柱高：31cm；CV：165 mL），进行 CM 层析和肝素层析，得到实验组 9 精纯后 rhKGF-2 蛋白，并记录 CM 层析过程中的层析图谱（实验组 9 阳离子交换层析图谱）和肝素层析过程中的层析图谱（实验组 9 亲和层析图谱）。

在肝素层析后，收集肝素层析洗脱液与等体积的 PB（pH=7.2，20mM）混合，使用 3KD 透析膜置换 5 次后，收集置换液；分别对肝素层析洗脱液和置换液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

连接 SP 层析柱（博格隆 Diamond SP Mustang，柱高：25cm；CV：50mL），以 150cm/h 的线速度用 30 mM 的 PB（pH=7.2）平衡 2 个柱体积直至 SP 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，CM 层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将置换液按照 3mg/mL 上样，收集流穿液，再用 30 mM 的 PB（pH=7.2）复平衡 SP 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳。

接着用 30 mM 的 PB（pH=7.2）与 Buffer I（20mM 的 PB+1M 的 NaCl，pH7.2）混合进行 40 个柱体积的梯度洗脱，分段收集洗脱液 1；接着用 Buffer I 再洗脱 3 个柱体积，分段收集洗脱液 2（10mAu＜UV_{280}＜10mAu），得到 SP 层析样品 1。

将 SP 层析样品 1 和 30 mM 的 PB（pH=7.2）等体积混合后，利用 30 mM 的 PB（pH=7.2）稀释至 NaCl 浓度为 0.6M，得到上样液；

将 SP 层析柱以 150cm/h 的线速度用 30 mM 的 PB（pH=7.2）平衡 3 个柱体积直至 SP 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，CM 层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线

平稳，将上样液以 3mg/mL 上样，再用 30 mM 的 PB（pH=7.2）复平衡 SP 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，用 Buffer I 洗杂 3 个柱体积，接着用 30 mM 的 PB（pH=7.2）与 Buffer I 混合进行 15 个柱体积的梯度洗脱，分段收集 SP 洗脱液，得到 SP 层析后 rhKGF-2 蛋白；其中分段收集 SP 洗脱液为收集 UV_{280} 处于 5～10mAu 时的 SP 洗脱液、18～38mAu 时的 SP 洗脱液、230～560mAu 时的 SP 洗脱液、560～峰顶～560mAu 时的 SP 洗脱液、560～350mAu 时的 SP 洗脱液、130～45mAu 时的 SP 洗脱液和 20～10mAu 时的 SP 洗脱液，并对分段收集的 SP 洗脱液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

分别对肝素层析液、置换液、230～560mAu 时的 SP 洗脱液、560～峰顶～560mAu 时的 SP 洗脱液和 560～350mAu 时的 SP 洗脱液进行蛋白质含量（Lowry）、高效液相纯度（HPLC）和 SDS-PAGE 纯度检测。

二、实验结果

1、重组工程菌接种量对 rhKKG-2 蛋白表达量的影响结果

不同接种量的重组工程菌按照实施例 2 步骤 1 所示方法生产 rhKGF-2 蛋白时，菌株的生长曲线图如图 14 所示；SDS-PAGE 检测结果如图 15 所示，其中泳道 1 和泳道 6 均为 marker 的电泳结果，泳道 2～5 依次为接种量为 8%的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果，电泳 7～10 依次为接种量为 15%的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果；质粒丢失率检测结果如表 4 所示。

表 4 不同接种量的重组工程菌生产 rhKGF-2 蛋白时的质粒丢失率检测结果

	接种量为 8%时	接种量为 15%时
发酵 4 h	6%	6%
发酵 6 h	8%	8%
发酵 8 h	3%	3%

结果显示：在生产 rhKGF-2 蛋白的过程中，无论重组工程菌（500109-S9）的接种量是 8%还是 15%，菌株的生长曲线未见明显差异；并且 rhKGF-2 蛋白的表达量和质粒丢失率均无明显差异；说明提高重组工程菌接种量不会提高 rhKGF-2 蛋白表达水平，发酵条件（温度、pH 和发酵底料）已经达到了最适细胞生长和 rhKGF-2 蛋白表达的状态，因此选择 8%的接种量作为生产 rhKGF-2 蛋白的最适接种量。

2、发酵底料对 rhKKG-2 蛋白表达量的影响结果

利用不同发酵底料按照实施例 2 步骤 1 所示方法生产 rhKGF-2 蛋白时，菌株的生长曲线图如图 16 所示；SDS-PAGE 检测结果如图 17 所示，其中泳道 1 和泳道 6 均为 marker 的电泳结果，泳道 2～5 依次为利用 M9Y 培养基时的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h

时的电泳结果，泳道 7～10 依次为利用实施例 2 步骤 1 中所示发酵底料时的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果；质粒丢失率检测结果如表 5 所示。

表 5 利用不同发酵底料生产 rhKGF-2 蛋白的重组工程菌的质粒丢失率检测结果

	发酵底料为 M9Y 培养基（F2023042317）	发酵底料为实施例 2 步骤 1 中所示（F2023042321）
发酵 4 h	2%	4%
发酵 6 h	1%	5%
发酵 8 h	2%	4%

结果显示：在生产 rhKGF-2 蛋白的过程中，将实施例 2 步骤 1 中所示发酵底料更换为 M9Y 培养基后，重组工程菌的前期生长趋势明显变差；使用两种不同的发酵底料结合重组工程菌生产 rhKGF-2 蛋白时，蛋白表达量没有明显区别；虽然利用 M9Y 培养基作为发酵底料培养重组工程菌生产 rhKGF-2 蛋白时，质粒丢失率更低，但是利用 M9Y 培养基培养工程菌时，菌株的生长趋势明显不如使用实施例 2 步骤 1 中所示发酵底料培养重组工程菌；因此选择实施例 2 步骤 1 中所示发酵底料用于对重组工程菌进行发酵生产 rhKGF-2 蛋白。

3、诱导剂加入时间对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响

按照实施例 2 步骤 1 所示方法，在不同时间加入诱导剂（IPTG）生产 rhKGF-2 蛋白，菌株的生长曲线图如图 18 所示；SDS-PAGE 检测结果如图 19 所示，其中泳道 1～4 依次为在 OD_{600}=50 时加入 IPTG 的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果，泳道 5 为 marker 的电泳结果，泳道 6～9 依次为在 OD_{600}=40 时加入 IPTG 的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果；质粒丢失率检测结果如表 6 所示。

表 6 在不同时间加入 IPTG 生产 rhKGF-2 蛋白的重组工程菌的质粒丢失率检测结果

	OD_{600}=50	OD_{600}=40
发酵 4 h	1%	4%
发酵 6 h	1%	5%
发酵 8 h	6%	4%

结果显示：无论是在 OD_{600}=40 还是 OD_{600}=50 时加入诱导剂（IPTG），菌株的生长曲线未见明显差异；并且 SDS-PAGE 检测结果显示蛋白表达量没有显著差异。

而较高的 OD_{600} 会导致菌细胞处于应激状态，面临更多的代谢负荷，代谢平衡被打破，导致生长速率下降并产生不良代谢产物和废物；同时较低的 OD_{600} 能够控制 rhKGF-2 蛋白的表达水平，使其处于较低的合成速率，降低蛋白聚集或降解的发生。因此选择在 OD_{600}=40

时加入诱导剂（IPTG）进行诱导。

4、不同诱导剂浓度对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响结果

按照实施例 2 步骤 1 所示方法，加入不同终浓度的诱导剂（IPTG）生产 rhKGF-2 蛋白，菌株的生长曲线图如图 20 所示；SDS-PAGE 检测结果如图 21 所示，其中泳道 1 和泳道 6 均为 marker 的电泳结果，泳道 2～5 依次为 IPTG 终浓度为 1.5 mM 时的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果，泳道 7～10 依次为 IPTG 终浓度为 2.0 mM 时的重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果；质粒丢失率检测结果如表 7 所示。

表 7 加入不同终浓度诱导剂生产 rhKGF-2 蛋白的重组工程菌的质粒丢失率检测结果

	IPTG=1.5mM	IPTG=2.0mM
发酵 4 h	2%	4%
发酵 6 h	4%	5%
发酵 8 h	2%	4%

结果显示：将实施例 2 步骤 1 中的 IPTG 终浓度从 1.5 mM 改变为 2.0mM 后，重组工程菌的生长趋势增高；SDS-PAGE 检测结果显示，将实施例 2 步骤 1 中的 IPTG 终浓度从 1.5 mM 改变为 2.0mM 后，rhKGF-2 蛋白的表达量出现下降，但未有显著差异；将实施例 2 步骤 1 中的 IPTG 终浓度从 1.5 mM 改变为 2.0mM 后，发酵生产 rhKGF-2 蛋白过程中质粒丢失率也呈现增高趋势，但差别不大；而过高浓度的 IPTG 会对细胞产生毒性作用，导致细胞生长受到抑制或代谢紊乱，因此选择使用终浓度为 1.5 mM 的 TPTG 作为诱导剂诱导重组工程菌生产 rhKGF-2 蛋白。

5、不同诱导温度对 rhKGF-2 蛋白表达量的影响结果

按照实施例 2 步骤 1 所示方法，在不同温度下生产 rhKGF-2 蛋白时的重组工程菌的生长曲线图如图 22 所示；SDS-PAGE 检测结果如图 23 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2～5 依次为诱导温度为 40℃时重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果，泳道～9 依次为诱导温度为 45℃时重组工程菌发酵 2 h、4 h、6 h 和 8 h 时的电泳结果；质粒丢失率检测结果如表 8 所示。

表 8 不同诱导温度生产 rhKGF-2 蛋白的重组工程菌的质粒丢失率检测结果

	诱导温度 40℃	诱导温度 45℃
发酵 4 h	1%	4%
发酵 6 h	1%	5%
发酵 8 h	4%	4%

结果显示：将实施例 2 步骤 1 中发酵罐的温度改变为 45℃（即诱导温度为 45℃）后，

重组工程菌生产 rhKGF-2 蛋白过程中的菌株生长趋势下降，并且 rhKGF-2 蛋白的表达量出现了显著下降。

因此选择在 40℃的诱导温度下诱导重组工程菌发酵生产 rhKGF-2 蛋白。

6、层析柱柱高对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响结果

低柱高阳离子交换层析图谱如图 24 所示，高柱高阳离子交换层析图谱如图 25 所示，低柱高亲和层析图谱如图 26 所示，高柱高亲和层析图谱如图 27 所示。

不同柱高的 SDS-PAGE 检测结果如图 28 所示，泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为高柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 3 为低柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果；不同柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白检测结果如表 9 所示。

表 9 不同柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白检测结果

样品	HPLC(%)	SDS-PAGE(%)	备注
高柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白	96.65	94.0	高柱高
低柱高精纯后的 rhKGF-2 蛋白	96.22	92.5	低柱高

结果显示：增加纯化过程中的 CM 层析柱和 Heparin 层析柱的柱高，得到的精纯后的 rhKGF-2 蛋白的纯度未见明显提升，说明提高层析柱的柱高对 rhKGF-2 蛋白的纯化效果影响不大。

7、纯化温度对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响结果

纯化温度为 10℃的阳离子交换层析图谱如图 29 所示，纯化温度为 10℃的亲和层析图谱如图 30 所示；纯化温度为 10℃的 SDS-PAGE 检测结果如图 31 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为纯化温度为 10℃粗纯后的 rhKGF-2 蛋白（即 CM 洗脱）的电泳结果，泳道 3 为肝素洗脱 1（80-791-500mAU）样品的电泳结果，泳道 4 为肝素洗脱 2（500-200mAU）样品的电泳结果，泳道 5 为肝素洗脱 3（200-800mAU）样品的电泳结果，泳道 6 为纯化温度为 10℃精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 7 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）的电泳结果。

纯化温度为 10℃粗纯后的 rhKGF-2 蛋白和纯化温度为 10℃精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果如表 10 所示。

表 10 纯化温度为 10℃后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果

样品	浓度(mg/ml)	HPLC(%)	SDS-PAGE(%)
纯化温度为 10℃粗纯后的 rhKGF-2 蛋白	7.15	74.27	N/A
纯化温度为 10℃精纯后的 rhKGF-2 蛋白	2.74	96.57	93.8

结果显示：纯化温度为 10℃精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 SDS-PAGE 纯度为 93.8%，HPLC

纯度为96.57%；与实施例2所示方法的结果相比，肝素洗脱峰（精纯后的rhKGF-2蛋白）的纯度基本没有改变，说明对纯化层析过程中的Buffer控温（4～12℃），进而控制纯化温度不会对KGF-2蛋白的纯化效果产生显著影响。

8、CM层析过程中的洗杂步骤对rhKGF-2蛋白纯化效果的影响结果

洗杂后的阳离子交换层析图谱如图32所示，洗杂后的亲和层析图谱如图33所示；洗杂后的SDS-PAGE检测结果如图34所示，其中泳道1为洗杂粗纯后的rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道2为marker的电泳结果，泳道3为洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道4为KGF-2原液（只含有KGF-2蛋白的样品）的电泳结果。

洗杂粗纯后的rhKGF-2蛋白和洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果如表11所示。

表11 洗杂粗纯后的rhKGF-2蛋白和洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果

样品	浓度(mg/ml)	HPLC(%)	SDS-PAGE(%)
洗杂粗纯后的rhKGF-2蛋白	5.08	93.59	N/A
洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白	6.4	95.92	96.1

结果显示：在CM层析过程中，增加洗杂步骤（使用Buffer E进行洗杂），粗纯后的rhKGF-2蛋白的杂质条带明显减弱，能够提高粗纯后的rhKGF-2蛋白的纯度（CM层析洗脱液）。

尿素洗杂后的阳离子交换层析图谱如图35所示，尿素洗杂后的亲和层析图谱如图36所示；对照组3的SDS-PAGE检测结果如图37所示，其中泳道1为marker的电泳结果，泳道2为CM上样液的电泳结果，泳道3为流穿液的电泳结果，泳道4为洗杂液的电泳结果，泳道5为尿素洗杂粗纯后的rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道6为Blank样品的电泳结果，泳道7为尿素洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道8为KGF-2原液（只含有KGF-2蛋白的样品）的电泳结果。

尿素洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果如表12所示。

表12 尿素洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果

样品	浓度 (mg/ml)	HPLC(%)	SDS-PAGE(%)
尿素洗杂精纯后的rhKGF-2蛋白	6.36	97.17	94.2

结果显示：与实验组2相比，在CM层析过程中使用加入2 M尿素的Buffer E进行洗杂，得到的粗纯rhKGF-2蛋白的杂质条带和聚体条带减弱（图37泳道5），并且得到的精纯后的rhKGF-2蛋白的HPLC纯度能够达到97.17%，SDS-PAGE纯度为94.2%。

而尿素作为一种变性剂，在低浓度下能够改变蛋白疏水性进而影响蛋白间的相互作

用，而高浓度的尿素能够通过破坏疏水键和氢键进而破坏蛋白质的三级和四级结构，提高蛋白的溶解性；因此在 Buffer E 中加入尿素后可能会破坏 rhKGF-2 蛋白的结构，并且蛋白纯度并未显著提升，因此洗杂液（Buffer E）中不添加尿素。

9、肝素层析过程中的 pH 对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响结果

pH 为 7.2 时的阳离子交换层析图谱如图 38 所示，pH 为 6.8 时的亲和层析图谱如图 39 所示，pH 为 7.0 时的亲和层析图谱如图 40 所示，pH 为 7.4 时的亲和层析图谱如图 41 所示。

pH 为 6.8 时的 SDS-PAGE 检测结果如图 42 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）的电泳结果，泳道 3 为肝素层析过程中 pH 为 6.8 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 4 为 Blank（空白对照）的电泳结果，泳道 5 为洗杂液的电泳结果，泳道 6 为 CM 上样液的电泳结果，泳道 7 为流穿液的电泳结果，泳道 8 为肝素层析过程中 pH 为 6.8 时粗纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 9 为肝素洗杂液的电泳结果；

pH 为 7.0 时的 SDS-PAGE 检测结果如图 43 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为肝素洗杂液的电泳结果，泳道 3 为肝素层析过程中 pH 为 7.0 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 4 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）的电泳结果；

pH 为 7.4 时的 SDS-PAGE 检测结果如图 44 所示，其中泳道 1 为肝素层析过程中 pH 为 7.4 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 2 为肝素洗脱峰顶的电泳结果，泳道 3 为 marker 的电泳结果，泳道 4 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）的电泳结果。

不同 pH 值进行肝素层析得到的精纯后 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果如表 12 所示。

表 12 不同 pH 值进行肝素层析得到的精纯后 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果

样品	HPLC(%)	SDS-PAGE(%)	备注
肝素层析过程中 pH 为 6.8 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白	96.8	91.2	pH6.8
肝素层析过程中 pH 为 7.0 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白	96.3	92.5	pH7.2
肝素层析过程中 pH 为 7.4 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白	96.33	91.9	pH7.4
肝素层析过程中 pH 为 7.2 时精纯后的 rhKGF-2 蛋白	95.92	96.1	pH7.2

结果显示：改变肝素层析过程中的 pH 值，得到的精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 HPLC 纯度没有显著差异；而肝素层析过程的 pH 为 7.2 时，得到的精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 SDD-PAGE 纯度最高，且显著高于其他样品；因此肝素层析过程中的最适 pH 值为 7.2。

10、肝素层析过程中 Buffer 对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响结果

对照组 7 亲和层析图谱如图 45 所示；对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 SDS-PAGE

检测结果如图 46 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为肝素洗脱峰顶的电泳结果，泳道 3 为对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 4 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）的电泳结果；对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果如表 13 所示。

表 13 对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果

样品	HPLC（%）	SDS-PAGE（%）
对照组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白	98.44	95.7
实验组 5 精纯后的 rhKGF-2 蛋白	98.12	95.6

结果显示：与实验组 5 相比，在肝素层析过程中，使用 0.9M 的 NaCl（Buffer C）对 Heparin 层析柱进行平衡后，直接将 CM 层析洗脱液直接上样，SDS-PAGE 纯度未见明显区别；但是以 0.9 M 的 NaCl（Buffer C）进行柱平衡后直接上样，会使得目标蛋白（rhKGF-2 蛋白）以及与目标蛋白电负性接近的杂蛋白同时挂在层析柱上，并且高浓度的 NaCl 会使得目标蛋白与层析柱之间的结合能力减弱，导致回收率低。

对照组 8 阳离子交换层析图谱如图 47 所示，对照组 8 亲和层析图谱如图 48 所示；对照组 8 的 SDS-PAGE 检测结果如图 49 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 3 为客户原液的电泳结果，泳道 4 为 CM 上样液的电泳结果，泳道 5 为流穿液的电泳结果，泳道 6 为洗杂液的电泳结果，泳道 7 为对照组 8 粗纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 8 为肝素流穿液的电泳结果，泳道 9 为复平衡肝素流穿液的电泳结果；对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果如表 14 所示。

表 14 对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果

样品	SDS-PAGE(%)	HPLC(%)
对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白	94.5	95.14

结果显示：使用 0.9M 的 NaCl（Buffer C）对 Heparin 层析柱进行平衡，直接将 CM 层析洗脱液直接上样后，接着在浓度为 0.8M 的 NaCl 下进行洗脱，rhKGF-2 蛋白的纯度没有提高，并且 SDS-PAGE 检测结果显示对照组 8 精纯后的 rhKGF-2 蛋白下方仍然存在杂带，说明使用含有 0.8M 的 NaCl 的 Buffer F 进行洗脱不会提高 rhKGF-2 的纯度。

11、肝素层析过程中上样载量对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响效果

实验组 5 阳离子交换层析图谱如图 50 所示，实验组 5 亲和层析图谱如图 51 所示，对照组 9 亲和层析图谱如图 52 所示，对照组 10 亲和层析图谱如图 53 所示；不同上样载量的 SDS-PAGE 检测结果如图 54 所示，其中泳道 1 为实验组 5 粗纯后 rhKGF-2 蛋白的电泳

结果，泳道2为对照组9精纯后rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道3为实验组5精纯后rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道4为对照组10精纯后rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道5为客户02原液的电泳结果，泳道6为marker的电泳结果。

实验组5精纯后rhKGF-2蛋白、对照组9精纯后rhKGF-2蛋白和对照组10精纯后rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果如表15所示。

表15 蛋白检测结果

样品	SDS-PAGE（%）	HPLC（%）	备注
对照组9精纯后rhKGF-2蛋白	93.7	96.38	0.60g 菌泥/ml 填料
实验组5精纯后rhKGF-2蛋白	95.5	96.55	1g 菌泥/ml 填料
对照组10精纯后rhKGF-2蛋白	95.0	96.54	0.90g 菌泥/ml 填料

结果显示：肝素层析过程中的上样载量高低对精纯后rhKGF-2蛋白的分离度有一定影响，肝素层析过程中上样载量为1g/ml时，精纯后的rhKGF-2蛋白的纯度最高。

12、肝素层析过程中洗脱Buffer对rhKGF-2蛋白纯化效果的影响结果

对照组11阳离子交换层析图谱如图55所示，对照组11亲和层析图谱如图56所示；不同洗脱Buffer的SDS-PAGE检测结果如图57所示，其中泳道1为marker的电泳结果，泳道2和泳道4均为对照组11精纯后rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道3为KGF-2原液（只含有KGF-2蛋白的样品）的电泳结果，泳道5为CM上样液的电泳结果，泳道6为流穿液的电泳结果，泳道7为对照组11粗纯后rhKGF-2蛋白的电泳结果，泳道8为洗杂液的电泳结果，泳道9为肝素洗杂液的电泳结果。

对照组11精纯后rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果如表16所示。

表16 对照组11精纯后rhKGF-2蛋白的蛋白检测结果

样品	浓度(mg/ml)	SDS-PAGE (%)	HPLC (%)
对照组11精纯后rhKGF-2蛋白	4.25	95.6	94.12

结果显示：按照对照组11所示方法纯化rhKGF-2蛋白，使用Buffer G（即不添加EDTA-2Na）进行肝素层析洗脱时，相较于实施例2的实验结果，得到的rhKGF-2的HPLC纯度下降到94.12%，SDS-PAGE纯度为95.6%；说明在肝素层析洗脱时，在Buffer中加入EDTA-2Na能够使得到的rhKGF-2的纯度更高。

13、肝素层析过程中Buffer的pH以及添加吐温80对rhKGF-2蛋白纯化效果的影响效果

对照组12阳离子交换层析图谱如图58所示，对照组12亲和层析图谱如图59所示；不同pH的Buffer的SDS-PAGE检测结果如图60所示，其中泳道1为marker的电泳结果，泳道2为KGF-2原液（只含有KGF-2蛋白的样品）的电泳结果，泳道3为对照组12精纯

后 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 4 为 CM 上样液的电泳结果，泳道 5 为流穿液的电泳结果，泳道 6 为洗杂液的电泳结果，泳道 7 为对照组 12 粗纯后 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 8 为肝素洗杂液的电泳结果。

对照组 12 精纯后 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果如表 17 所示。

表 17 对照组 12 精纯后 rhKGF-2 蛋白的蛋白检测结果

样品	浓度 (mg/ml)	HPLC (%)	SDS-PAGE (%)
对照组 12 精纯后 rhKGF-2 蛋白	2.01	N/A	83.3

结果显示：将纯化过程中的 Buffer A～Buffer E 的 pH 值调整为 7.2，并且在 Buffer A～Buffer E 分别添加吐温 80 至终浓度为 0.05%（w/w），电泳结果显示目的蛋白条带出现降解，且杂质蛋白条带明显加深；并且得到的 rhKGF-2 蛋白的纯度发生显著下降，HPLC 检测结果异常；说明吐温 80 并非适用于所有蛋白纯化，在纯化 Buffer 中加入吐温-80 并调节 pH 会使最终的纯化效果发生显著下降。

14、层析后置换包膜对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响结果

实验组 7 阳离子交换层析图谱如图 61 所示，实验组 7 亲和层析图谱如图 62 所示；层析后增加置换包膜的 SDS-PAGE 检测结果如图 63 所示，其中泳道 1 为实验组 7 粗纯后 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 2 为 marker 的电泳结果，泳道 3 为实验组 7 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 4 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）的电泳结果，泳道 5 为对照组 14 精纯后 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 6 为对照组 14 透过液的电泳结果，泳道 7 为对照组 13 精纯后 rhKGF-2 蛋白的电泳结果，泳道 8 为对照组 13 透过液的电泳结果。

蛋白检测结果如表 18 所示。

表 18 蛋白检测结果

样品	浓度(mg/ml)	HPLC(%)	SDS-PAGE(%)	备注
实验组 7 精纯后 rhKGF-2 蛋白	6.4	95.92	96.1	N/A
对照组 13 精纯后 rhKGF-2 蛋白	6.20	96.26	96.9	N/A
对照组 13 透过液	0	N/A	N/A	无蛋白透过
对照组 14 精纯后 rhKGF-2 蛋白	0.84	95.10	95.6	N/A
对照组 14 透过液	1.84	N/A	N/A	有蛋白透过

结果显示：与实验组 7 相比，以不含 NaCl 和 EDTA 的 Buffer H 作为置换膜液，结合 2KD 透析膜进行置换后得到的对照组 13 精纯后 rhKGF-2 蛋白的浓度、HPLC 纯度和 SDS-PAGE 纯度没有显著差异；而将 2KD 透析膜替换为 5KD 透析膜后，rhKGF-2 蛋白会透过 5KD 透析膜，得到的对照组 14 精纯后 rhKGF-2 蛋白的浓度发生了显著下降；因此，

在肝素层析后无需使用透析膜进行置换。

15、rhKGF-2 蛋白浓度对稳定性的影响效果

实验组 8 阳离子交换层析图谱如图 64 所示，实验组 8 亲和层析图谱如图 65 所示；不同 rhKGF-2 蛋白浓度的 SDS-PAGE 检测结果如图 66 所示，其中泳道 1 为 marker 的电泳结果，泳道 2 为 blank 的电泳结果，泳道 3 为客户原液的电泳结果，泳道 4 为 3.3mg/mL 的稀释液的电泳结果，泳道 5 为 3.0mg/mL 的稀释液的电泳结果，泳道 6 为 2.0mg/mL 的稀释液的电泳结果，泳道 7 为 1.0mg/mL 的稀释液的电泳结果。

不同浓度的稀释液的蛋白检测结果如表 19 所示。

表 19 不同浓度的稀释液的蛋白检测结果

样品	HPLC (%)	SDS-PAGE (%)
3.3mg/ml 的稀释液	95.48	94.2
3.0mg/ml 的稀释液	96.20	93.2
2.0mg/ml 的稀释液	95.71	95.6
1.0mg/ml 的稀释液	94.69	95.7
0.5mg/ml 的稀释液	92.98	98.2

结果显示：rhKGF-2 蛋白浓度越低的稀释液，其 SDS-PAGE 电泳结果中 KGF-2 蛋白和杂质蛋白条带越浅，HPLC 纯度越低；而 rhKGF-2 蛋白浓度过高会导致蛋白发生聚集。

因此，将 rhKGF-2 蛋白的浓度控制在 2.0mg/mL 时，rhKGF-2 蛋白的 SDS-PAGE 和 HPLC 纯度更高。

16、肝素层析后增加 SP 层析对 rhKGF-2 蛋白纯化效果的影响效果

实验组 9 阳离子交换层析图谱如图 67 所示，实验组 9 亲和层析图谱如图 68 所示，实验组 9 的 SP 层析图谱如图 69 所示；实验组 9 的肝素层析洗脱液和置换液的 SDS-PAGE 电泳图如图 70 所示，泳道 1 为肝素层析洗脱液的电泳结果，泳道 2 为置换液的电泳结果；实验组 9 中 SP 洗脱液的 SDS-PAGE 电泳结果如图 71 所示，其中泳道 1 为 marker，泳道 2 为客户 02 原液，泳道 3 为 5～10mAu 时的 SP 洗脱液，泳道 4 为 18～38mAu 时的 SP 洗脱液，泳道 5 为 230～560mAu 时的 SP 洗脱液，泳道 6 为 560～峰顶～560mAu 时的 SP 洗脱液，泳道 7 为 560～350mAu 时的 SP 洗脱液，泳道 8 为 130～45mAu 时的 SP 洗脱液，泳道 9 为 20～10mAu 时的 SP 洗脱液。

实验组 9 的蛋白检测结果如表 20 所示。

表 20 实验组 9 的蛋白检测结果

样品	浓度 (mg/ml)	HPLC (%)	SDS-PAGE (%)
肝素层析洗脱液	4.56	96.91	93.8

置换液	2.9	97.82	94.4
230～560mAu 时的 SP 洗脱液	1.88	96.88	93
560～峰顶～560mAu 时的 SP 洗脱液	3.09	97.94	94.4
560～350mAu 时的 SP 洗脱液	2.73	98.50	95.3

结果显示：在 CM 层析和肝素层析后添加 SP 层析，目的蛋白（KGF-2 蛋白）与杂带也不能进一步分离，无法进一步有效提高 KGF-2 蛋白的纯度。

实施例 4 一种生产并纯化 rhKGF-2 蛋白的方法的工艺放大

1、实验方法

（1）1L 工艺放大生产并纯化 rhKGF-2 蛋白

按照实施例 2 步骤 1 中 S1～S3 中所示方法，进行发酵，得到发酵后工程菌。

按照实施例 2 步骤 1 的 S4 中所示，配置用于柱层析的 Buffer A～Buffer E，并将 Buffer A～Buffer E 的 pH 值调整为 7.2。

将发酵后工程菌与 Buffer A 按照 1g:20mL 混合，充分搅拌均匀得到混合液，在 15℃先以 200Bar 均质破碎一次，再以 700Bar 均质破碎两次，待破碎完全后（即混合液中无完整菌体，OD_{600}＜30），收集均质后液体于 10℃下以 7000rpm 离心 20min，收集上清液并过滤，收集滤液。

连接 CM 层析柱（博格隆 CM Bestarose Fast Flow，CV:1.4L），以 100cm/h 的线速度用 Buffer A 平衡 3 个柱体积直至 CM 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，CM 层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将滤液（CM 上样液）按照 0.8g/mL 上样，收集流穿液，再用 Buffer A 复平衡 CM 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，接着使用洗杂液（Buffer E）冲洗 2 个柱体积，在 UV＞20mAU 时开始收集，UV＜20mAU 时停止收集，得到洗杂液，接着用 Buffer C 洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞100mAU 时开始收集洗脱液，UV_{280}＜100mAU 时停止收集，收集 CM 层析洗脱液，CM 层析洗脱液即为粗纯的 rhKGF-2 蛋白；洗脱结束后对 CM 层析柱进行再生、清洗和保存。

连接 Heparin 层析柱（博格隆 Heparin Bestarose Fast Flow，CV:450mL），以 60cm/h 的线速度用 Buffer B 平衡 3 个柱体积至直至 Heparin 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，肝素层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将 CM 层析洗脱液与 Buffer A 等体积混合后，按照 1g/mL 上样，收集流穿峰，再用 Buffer B 复平衡 Heparin 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，接着使用 Buffer C 洗杂，待 UV_{280} 吸收基线冲洗平稳后，收集肝素洗杂液，洗杂结束后用 Buffer D 洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞100mAU 时开始收集

洗脱液，UV_{280}＜100mAU 时停止收集，得到 Heparin 层析洗脱液，即为精纯后的 rhKGF-2；洗脱结束后对 Heparin 层析柱进行再生、清洗和保存。

以 Buffer H（pH=7.2，30 mM 的 PB）作为置换膜液，与精纯后的 rhKGF-2 等体积混合后，使用 2KD 透析膜置换 3 次，收集 rhKGF-2 置换液。

（2）蛋白表达量检测

分别对精纯后的 rhKGF-2、rhKGF-2 置换液和 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，并对 rhKGF-2 置换液进行 HPLC 检测和蛋白质含量检测。

2、实验结果

SDS-PAGE 凝胶电泳结果如图 72 所示，其中泳道 1 为 marker，泳道 2 为空白泳道，泳道 3 为 rhKGF-2 置换液，泳道 4 为精纯后的 rhKGF-2，泳道 5 为 KGF-2 原液（只含有 KGF-2 蛋白的样品）；rhKGF-2 置换液检测结果如表 21 所示。

表 21 rhKGF-2 置换液检测结果

样品	浓度（mg/mL）	HPLC（%）	SDS-PAGE（%）
rhKGF-2 置换液	3.32	94.74	96.40

结果显示：1L 工艺放大生产 rhKGF-2 蛋白时，得到的 rhKGF-2 蛋白的 HPLC 纯度和 SDS-PAGE 纯度与实施例 2 所示方法生产 rhKGF-2 没有明显区别，说明实施例 2 所示生产 rhKGF-2 蛋白的方法能够进行工艺放大。

对比例 1 重组人 KGF-2 蛋白的表达和纯化

1、实验方法

按照实施例 2 步骤 S1～S3 所示方法得到发酵后工程菌，并按照步骤 S4 中所述配置用于柱层析的 Buffer A～Buffer E。

将发酵后工程菌与 Buffer A 按照 1g:20mL 混合，充分搅拌均匀得到混合液，在 15℃下，先以 200Bar 均质破碎一次，再以 700Bar 均质破碎两次，待破碎完全后（即混合液中无完整菌体，OD_{600}＜30），收集均质后液体于 10℃下以 7000rpm 离心 20 min，收集上清液并过滤，收集滤液。

CM 层析：连接 CM 层析柱（Cytiva CM Sepharose Fast Flow，CV：70mL），以 60cm/h 的线速度用 Buffer A 平衡 3 个柱体积直至 CM 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，CM 层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将滤液（CM 上样液）按照 0.5g/mL 上样，收集流穿液再用 Buffer A 复平衡 CM 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，接着 Buffer C

洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞50mAU 时开始收集洗脱液，UV_{280}＜50mAU 时停止收集，收集 CM 层析洗脱液，CM 层析洗脱液即为粗纯的 rhKGF-2 蛋白，并对 CM 层析柱进行再生、清洗和保存。

肝素层析：连接 Heparin 层析柱（Cytiva Heparin Sepharose Fast Flow，CV：40mL），以 60cm/h 的线速度用 Buffer B 平衡 3 个柱体积至直至 Heparin 层析柱基线平稳，且电导值≤100ms/cm，肝素层析柱的流出液 pH 为 7.2，UV_{280} 吸收基线平稳，将 CM 层析洗脱液与 Buffer A 等体积混合后，按照 0.5g/mL 上样，收集流穿峰，再用 Buffer B 复平衡 Heparin 层析柱至 UV_{280} 吸收基线平稳，接着使用 Buffer C 洗杂，待 UV_{280} 吸收基线冲洗平稳后，收集肝素洗杂液，洗杂结束后用 Buffer D 洗脱 2 个柱体积，当 UV_{280}＞80mAU 时开始收集洗脱液，UV_{280}＜80mAU 时停止收集，得到 Heparin 层析洗脱液（肝素洗脱液），即为对比例 1 精纯后的 rhKGF-2，并对 Heparin 层析柱进行再生、清洗和保存。

按照实施例 2 步骤 2 所示方法，检测对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 的的蛋白质含量以及以及纯度（HPLC 和 SDS-PAGE）。

2、实验结果

对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 蛋白表达量检测结果如表 22 所示。

表 22 对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 蛋白表达量检测结果

	HPLC（%）	SDS-PAGE（%）
对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 蛋白	96.65	92.5

对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 蛋白的 SDS-PAGE 结果图如图 73 所示，结果显示：对比例 1 精纯后的 rhKGF-2 的蛋白图（SDS-PAGE 结果图）中显示目的蛋白条带下方有几条比较细的杂蛋白条带，积分显示 rhKGF-2 的纯度低于 95%。

最后应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，对于本领域的普通技术人员来说，在上述说明及思路的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动，这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1.一种用于生产 KGF-2 蛋白的工程菌，其特征在于，所述工程菌为转染有重组载体的大肠杆菌；

所述重组载体为携带有 KGF-2 蛋白编码序列的 pET-30a 载体、pET-28a 载体或 pET-42a 载体，所述 KGF-2 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示；所述大肠杆菌为 OverExpress C43(DE3)大肠杆菌、Rosetta(DE3)大肠杆菌或 BL21 Star(DE3)大肠杆菌。

2.根据权利要求 1 所述的工程菌，其特征在于，所述重组载体为携带有 KGF-2 蛋白编码序列的 pET-30a 载体，所述大肠杆菌为 Rosetta(DE3)大肠杆菌或 OverExpress C43(DE3)大肠杆菌。

3.权利要求 1～2 任一所述的工程菌在生产 KGF-2 蛋白中的应用。

4.一种生产 KGF-2 蛋白的方法，其特征在于，利用权利要求 1～2 任一所述工程菌发酵生产 KGF-2 蛋白。

5.根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于，包括以下步骤:

S1.将权利要求 1～2 任一所述的工程菌按照体积比为 1:20～200 接种至 LB 培养基中，充分培养后得到一级种子液，将一级种子液按照体积比为 1:20～200 接种至 LB 培养基中，充分培养后得到二级种子培养液；

S2.将步骤 S1 得到的二级种子培养液与发酵底料按照体积比为 2～10:20～100 混合得到培养液，调整培养液的 pH 为 6.2～8.2，在溶氧＞10%、温度为 25～45℃、转速为 100～1600rpm 和通风量为 5～100 L/min 的条件下进行培养，待培养液的 OD_{600} 为 10～50 时，向培养液中加入终浓度为 0.1～3.0 mM 的 IPTG 和占总体积 1.0～30%的补料液，充分培养得到发酵后工程菌细胞；

所述发酵底料为底料 1 培养基、底料 2 培养基和 1～20g/L 的硫胺素溶液按照 15～25L:0.5～1.5L:6～10mL 混合得到；

其中底料 1 培养基含有终浓度为 15～25g/L 的蛋白胨、15～25g/L 的酵母粉、3～7g/L 的氯化钠、1～3g/L 的磷酸二氢钾、2～4g/L 的磷酸氢二钾和 1～3g/L 的氯化铵；底料 2 培养基含有终浓度为 2～10g/L 的一水葡萄糖、0.2～0.8g/L 的无水硫酸镁和 0.01～0.09g/L 的氯化钙；

所述补料液含有终浓度为 15～25g/L 的蛋白胨、15～25g/L 的酵母粉、3～7g/L 的氯化钠、1～3g/L 的磷酸二氢钾和 2～4g/L 的三水磷酸氢二钾；

S3.将步骤 S2 得到的发酵后工程菌细胞均质破碎，固液分离收集上清液进行 CM 层析得到粗纯的 KGF-2 蛋白，将粗纯的 KGF-2 蛋白进行肝素层析，得到 KGF-2 蛋白。

6.根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 S1 中所述 LB 培养基为含有终浓度为 2～10g/L 酵母浸粉、9～21g/L 蛋白胨和 9～21g/L 氯化钠的 LB 培养基，pH 值为 6.2～8.2。

7.根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 S2 中为:待培养液的 OD_{600} 为 40 时，向培养液中加入终浓度为 0.1～3.0 mM 的 IPTG 和占总体积 1.0～30%的补料液。

8.根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 S3 中所述均质破碎具体为:将步骤 S2 得到的发酵后工程菌细胞和 Buffer A 按照 1g:1～100mL 充分混合，在 4～40℃下均质破碎；

所述 Buffer A 的配方为:15～45 mM 的磷酸缓冲液、0.2～1.8 M 的氯化钠和 5～35 mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

9.根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 S3 中所述 CM 层析具体为：

平衡 CM 层析柱，将步骤 S3 中所述上清液按照 0.01～10.0g/mL 加入平衡后的 CM 层析柱中，收集流穿峰，再用 Buffer A 复平衡 CM 层析柱，使用 Buffer E 充分洗杂，接着使用 Buffer C 洗脱 0.5～10 个柱体积，收集 UV_{280}＞20mAU 时的洗脱液，得到粗纯的 KGF-2 蛋白；

所述 Buffer C 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液、0.2～1.8M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2；

所述 Buffer E 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液、0.2～1.8M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。

10.根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，步骤 S3 中所述肝素层析包括以下步骤：

平衡肝素层析柱，将步骤 S3 中所述粗纯的 KGF-2 蛋白与 Buffer A 等体积混合，按照 0.10～2.00g/mL 上样平衡后的肝素层析柱，收集流穿峰，再用 Buffer B 复平衡肝素层析柱，使用 Buffer C 充分洗杂，接着使用 Buffer D 洗脱 0.5～10 个柱体积，收集 UV_{280}＞20mAU 时的洗脱液，即得 KGF-2 蛋白；

所述 Buffer B 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液、0.1～3M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2；

所述 Buffer D 的配方为：15～45mM 的磷酸缓冲液、0.1～3M 的氯化钠和 5～35mM 的 EDTA-2Na，pH=6.2～8.2。