



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111254103 A

(43)申请公布日 2020.06.09

(21)申请号 201911131823.7

C12R 1/19(2006.01)

(22)申请日 2019.11.19

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

申请人 郑州倍赛泰生物科技有限公司

(72)发明人 王云龙 李玉林 毕胜利 伊瑶

范雪亭 张怡青 程蕾 王继创

王国强

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页

(54)发明名称

一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基及发酵工艺

(57)摘要

本发明属于微生物发酵技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基及发酵工艺。该非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基包括葡萄糖40-280g/L、甘氨酸50-300g/L、 $MgSO_4$ 20g/L和 $(NH_4)_2SO_4$ 20g/L;所述非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列包括下述片段:选自p72蛋白的至少1个中和抗原表位、选自p54蛋白的至少1个中和抗原表位和选自p30蛋白的至少1个中和抗原表位。本发明的发酵工艺可显著提高非洲猪瘟基因工程疫苗的产量。

1. 一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基, 其特征在于, 所述补料培养基包括葡萄糖40-280g/L、甘氨酸50-300g/L、 MgSO_4 20g/L和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20g/L; 所述非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列包括下述片段: 选自p72蛋白的至少1个中和抗原表位、选自p54蛋白的至少1个中和抗原表位和选自p30蛋白的至少1个中和抗原表位。

2. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基, 其特征在于, 所述补料培养基中包含葡萄糖80-280g/L和甘氨酸100-300g/L。

3. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵培养基, 其特征在于, 所述补料培养基包括葡萄糖160g/L和甘氨酸200g/L。

4. 一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 在发酵罐培养表达所述非洲猪瘟基因工程疫苗的重组大肠杆菌的过程中, 采用一次性补料的方式补加如权利要求1-3中任意一项所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基。

5. 根据权利要求4所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 所述非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺在进行发酵罐培养前还包括如下工艺: (1) 菌种活化; (2) 种子培养; (3) 摇瓶培养; (4) 将摇瓶培养液接种于发酵罐中进行发酵培养; 所述菌种活化的方法为: 将保存于 -70°C 菌株管内的用于表达所述非洲猪瘟基因工程疫苗的重组大肠杆菌转接到斜面培养基上, 并在 37°C 环境中过夜培养, 之后再在 37°C 、225r/min条件下二次摇瓶活化菌株10h, 随后接种于含卡那霉素的平板培养基上, 4°C 环境下保存。

6. 根据权利要求5所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 所述种子培养的步骤为: 用接种环在含有卡那霉素的平板上挑取单菌落, 采用划线接种方式转移菌种至已灭菌种子培养基内, 37°C 、220r/min振荡培养14-16h; 所述摇瓶培养的步骤为: 将经所述种子培养后的重组大肠杆菌转移入摇瓶培养基, 37°C 、220r/min振荡培养至摇瓶培养液OD值达到0.6-1.5。

7. 根据权利要求6所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 所述摇瓶培养至摇瓶培养液OD值达到0.8-1.0。

8. 根据权利要求5所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 将经所述摇瓶培养得到的摇瓶培养液按照1:15的比例接种于发酵罐中。

9. 根据权利要求4所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 当发酵罐中所述重组大肠杆菌生长至对数生长中后期时, 使用诱导剂IPTG诱导培养。

10. 根据权利要求4所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺, 其特征在于, 所述非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺的基础培养基为LB液体培养基。

一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基及发酵工艺

技术领域

[0001] 本发明属于微生物发酵技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基及发酵工艺。

背景技术

[0002] 基因工程亚单位疫苗利用DNA重组及DNA序列合成多肽的技术生产的仅包含从病原体中鉴定的保护性蛋白和表位的疫苗。通常情况,其生产的第一步是确定病原体中带有免疫原性的特定抗原DNA片段,第二步是选择适宜的载体进行表达扩增。目前生产上常用大肠杆菌作为原核细胞基因的表达式系统。与常规疫苗相比,亚单位疫苗具有以下优点:在大幅度降低抗原数量的同时保留特异性,减少无关抗原引起的副反应;疫苗中不含有任何可致感染的组分、不含有致病因子的核酸成分,因此安全可靠;疫苗还能除去或降低全菌体疫苗引起的免疫抑制反应;便于实现工厂化生产,大量的表达载体能够产出量大、安全、有效、廉价的抗原。

[0003] 基因工程菌,是采用基因工程相关技术制成的重组菌。一般是把目的基因导入细菌细胞内,从而表达所需蛋白。高密度发酵技术,也称为高密度细胞培养技术,通常是根据细菌的培养特性,优化改进培养条件和方式后,细菌密度能够大幅度提高,进而表达产物的量也有所提升的一种细菌培养技术。

[0004] 基因工程菌高密度发酵的最终目的是获得大量的外源基因表达产物,因此,人们利用基因重组技术,使更多的外源基因可以在微生物中表达,以期获得更多量的外源基因表达产物。因此,对基因工程菌高密度发酵技术的研究,顺应当前生物制品生产的需要。

[0005] 人类对大肠杆菌(E.coli)的遗传背景较为了解,加之其容易培养,生长速度快,可以表达大量的蛋白产物,所以成为了目前最成熟的一种表达式系统,应用十分广泛。在过去,获得某些天然蛋白常常是无法实现的,但对基因工程重组大肠杆菌进行高密度发酵后诱导表达,可以生产出很多天然蛋白。重组大肠杆菌高密度发酵技术,使得培养体积大幅较少,还能够强化下游工艺中的分离、提取,在生产过程中,不需要过多的设备投资,能够有效提高生产效率,降低生产成本。Riesenberg D(Riesenberg D.High-cell-density cultivation of E.coli[J].Curr Op-in Biotechnol,1991,2(3):380-384.)在研究中发现,大肠杆菌菌体在培养过程中,考虑培养基和培养条件等其他因素后,其理论上的最高密度可达200g/L;通常情况下,当大肠杆菌菌体干细胞质量超过50g/L,就可以认为大肠杆菌达到了高密度发酵水平。

[0006] 在使用半合成培养基进行大肠杆菌高密度发酵时,通常需要加入其它营养物质来促进菌体生长及代谢产物的形成。现代科学研究表明,向培养基中添加适当量的营养物质能够有效改善大肠杆菌的生长代谢,但要掌握好添加量,倘若营养物质的浓度过高会对菌体生长形成抑制从而降低产量。根据Riesenberg报道,培养基中各成分的浓度上限分别为:氮2.9g/L、葡萄糖48g/L、 Mg^{2+} 8.8g/L、 Fe^{2+} 1.13g/L、 PO_4^{3-} 9.5g/L、 Zn^{2+} 0.039g/L。重组大肠杆

菌高密度发酵技术,通常选取的基础培养基是LB培养基,然后在此基础上运用统计学方法设计实验,优化培养基组分及各组分添加的比例和量,最终得到优化培养基。

[0007] 细菌结构组成与功能实现的首要物质就是碳化合物,一般情况,碳的来源有无机和有机两种,常以有机碳源为主。肠杆菌发酵常用碳源是葡萄糖,它可以维持大肠杆菌较快速度的生长,且其分子结构简单,易于定量。李民等研究得出,菌体密度最高、目标蛋白表达最优时,初糖浓度为10g/L。但是,以葡萄糖作为碳源会产生大量代谢抑制物乙酸,其不仅对细菌的生长繁殖产生影响,也阻碍外源蛋白的表达。Li Ying等研究者在采用高密度发酵技术生产谷胱甘肽时,研究了WSH-KE1对葡萄糖浓度的耐受性和不同阶段培养物对葡萄糖的消化水平,结果表明,当葡萄糖浓度高于20g/L时,细胞生长及谷胱甘肽的合成均受限。

[0008] 氮源是细胞物质和代谢产物的主要构成成分,在大肠杆菌生长过程中,碳氮比也是重要的影响因素。碳氮比过高,细菌繁殖量少,生长也比较缓慢,培养基中的主要营养物质多用于代谢产物的积累合成;而碳氮比较低,细菌生长初期的繁殖代谢旺盛,增加了代谢副产物的积累,溶液中氧浓度降低,致使发酵液黏度增高,菌体无法自由活动而生长受到抑制,继而使表达产物量下降,Jung G等的研究在诱导后补料碳源和氮源,外源基因表达量有了显著变化。

[0009] 微生物培养中主要的无机盐有K、Ca、Mg、Na等,无机盐维持细菌自身新陈代谢,对构成其微结构具有重要作用,因此是不可或缺的,所以在大肠杆菌高密度发酵时,应加入适量的无机盐。在镁离子对重组大肠杆菌表达羧肽酶B的影响研究中,张文超发现,用浓度为1g/L镁离子可以显著促进细菌生长和重组蛋白表达,OD600值和包涵体浓度均发生变化,OD600从5.2增至8,包涵体浓度从9g/L提高至17.4g/L,进行更深入的研究发现,镁离子浓度为1g/L时,菌体自溶现象被明显抑制,活细胞密度和质粒丢失率也发生变化,细胞密度由 $137 \times 10^6/\text{mL}$ 增加到 $376 \times 10^6/\text{mL}$,质粒丢失率由15.4%下降到1.1%,外源蛋白也更加稳定。

[0010] 除发酵条件外,所表达蛋白的氨基酸序列对大肠杆菌的发酵密度和蛋白表达量也有显著影响(《重组蛋白在大肠杆菌中表达水平的影响因素》,卫红飞,吉林大学博士论文,2014)。现有技术中通常采用LB培养基来培养非洲猪瘟基因工程疫苗的重组工程菌(大肠杆菌),重组蛋白的表达量低,影响非洲猪瘟基因工程亚单位疫苗的产能和成本。

发明内容

[0011] 本发明提供一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基,在发酵培养的过程中,通过向基础培养基中加入该补料培养基,可以解决采用大肠杆菌表达非洲猪瘟基因工程疫苗时表达量低的问题。

[0012] 本发明的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基采用如下技术方案:一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基,所述补料培养基包括葡萄糖40-280g/L、甘氨酸50-300g/L、 MgSO_4 20g/L和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20g/L;所述非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列包括下述片段:选自p72蛋白的至少1个中和抗原表位、选自p54蛋白的至少1个中和抗原表位和选自p30蛋白的至少1个中和抗原表位。

[0013] 优选的,所述补料培养基中包含葡萄糖80-280g/L和甘氨酸100-300g/L。

[0014] 优选的,所述补料培养基包括葡萄糖160g/L和甘氨酸200g/L。

[0015] 本发明还提供了一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺,具体技术方案为:

在发酵罐培养表达所述非洲猪瘟基因工程疫苗的重组大肠杆菌的过程中,采用一次性补料的方式补加如上述任意一项所述的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基。

[0016] 优选的,所述非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺在进行发酵罐培养前还包括如下工艺:(1)菌种活化;(2)种子培养;(3)摇瓶培养;(4)将摇瓶培养液接种于发酵罐中进行发酵培养;所述菌种活化的方法为:将保存于-70℃菌株管内的用于表达所述非洲猪瘟基因工程疫苗的重组大肠杆菌转接到斜面培养基上,并在37℃环境中过夜培养,之后再在37℃、225r/min条件下二次摇瓶活化菌株10h,随后接种于含卡那霉素的平板培养基上,4℃环境下保存。在菌种活化的过程中,对菌种进行预培养,这是为了获得更多处于对数生长期且活力高的细胞。

[0017] 优选的,所述种子培养的步骤为:用接种环在含有卡那霉素的平板上挑取单菌落,

[0018] 采用划线接种方式转移菌种至已灭菌种子培养基内,37℃、220r/min振荡培养14-16h;所述摇瓶培养的步骤为:将经所述种子培养后的重组大肠杆菌转移入摇瓶培养基,37℃、220r/min振荡培养至OD值达到0.6-1.5。将经所述种子培养得到的种子培养液进行摇瓶培养,有助于借助其生长优势进一步缩短发酵时间,提高生产强度。同其它细菌类似,大肠杆菌的生长也呈现中间高,两边低的趋势,菌体处于对数生长期(OD值达到0.6-1.5)时,细胞活力最强,生长速率达到顶峰,故将对数生长中后期的种子培养液接入发酵培养基可以保持较高的细胞活力,大幅缩短发酵时间,并减少染菌的可能。

[0019] 优选的,所述摇瓶培养至培养液OD值达到0.8-1.0。

[0020] 优选的,将摇瓶培养液按照1:15的比例接种于发酵罐中。

[0021] 优选的,当发酵罐中所述重组大肠杆菌生长至对数生长中后期时,使用诱导剂IPTG诱导培养。

[0022] 优选的,所述非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵工艺的基础培养基为LB液体培养基。

[0023] 本发明的有益效果是:本发明的非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基可显著提高非洲猪瘟基因工程疫苗的产量。

[0024] 本发明通过对自建的非洲猪瘟基因工程重组大肠杆菌BL21-ASFV高密度发酵工艺进行优化研究。通过对重组大肠杆菌摇瓶及发酵罐培养的培养基组成、培养条件、诱导时机、诱导时长及流加补料策略等参数进行优化,建立了重组大肠杆菌BL21-ASFV高密度发酵生产工艺。相对于本领域通常采用的LB液体培养基,非洲猪瘟基因工程疫苗的产量可提高5.2倍以上,最高可提高至LB液体培养基表达量的9.56倍。

具体实施方式

[0025] 下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 实施例1设计非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列

[0027] 其中,非洲猪瘟基因工程疫苗(融合蛋白)至少包括下述氨基酸片段:选自p30蛋白的至少1个中和抗原表位、选自p54蛋白的至少1个中和抗原表位和选自p72蛋白的至少1个

中和抗原表位(相应的氨基酸序列可为中国专利文献CN201911062920.5、CN201911052111.6或CN201911052128.1中列出的相应序列)。

[0028] 除上述必要氨基酸片段外,非洲猪瘟基因工程疫苗还可包括T细胞表位肽,例如p30蛋白T细胞表位肽、T淋巴细胞激活表位肽(包括但不限于流感病毒NP蛋白,例如选自流感病毒NP蛋白的片段NP₁₄₇₋₁₅₅,其氨基酸序列为TYQRTRALV)、免疫活性肽(例如tuftsin片段,其氨基酸序列为TKPR)、CD2v蛋白的至少一种中和表位肽、C-type lectin蛋白的至少一种中和表位肽、PP62蛋白的至少一种中和表位肽、p17蛋白的至少一种中和表位肽或p12蛋白的至少一种中和表位肽等中的任意一项或几项的组合。

[0029] 除上述两项具有抗原性的片段外,本发明的非洲猪瘟基因工程疫苗还包括连接臂、纯化标签等非抗原性片段(必要时还可包括接头肽、化学修饰部分、N端信号肽和C端多聚腺苷酸等),其中连接臂(不同的片段之间通过连接臂连接)的氨基酸序列可为KK、KKK、GGGSGGG或GPGPG中的任意一个或几个的组合;纯化标签可选用HHHHHH等。

[0030] 备注:本发明的非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列可与中国专利文献CN201911062920.5、CN201911052111.6和CN201911052128.1中公开的任意非洲猪瘟基因工程疫苗(非洲猪瘟中和表位融合蛋白、非洲猪瘟串联表位融合蛋白、非洲猪瘟融合蛋白)的氨基酸序列相同。

[0031] 下面以其中一种非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列为例来具体说明:

[0032] 实施例2构建重组大肠杆菌

[0033] 将待表达的非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列提交给生工生物(上海)股份有限公司,由该公司根据所提供的氨基酸序列合成编码待表达的非洲猪瘟基因工程疫苗的核苷酸序列(目的基因),并将合成的核苷酸序列克隆到合适的质粒载体pET28a上。得到含有目的基因的质粒转入BL21(DE3),得到重组大肠杆菌并置于-70℃菌株管(含75%甘油)内保存备用。

[0034] 其中,非洲猪瘟基因工程疫苗的氨基酸序列为:

[0035] TKPRKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTSPFFSTHMYTILGGGSGGRRNIRFKPWFIPGVINEISLTNNELYINNLFVTPEIHNLFVKRVFSLIRVHKTQGGGSGGGNETNECTSSFETLFEQEPSSEKKTYQRTRALVGGGSGGG

[0036] 实施例3重组大肠杆菌的高密度发酵

[0037] 1.1重组大肠杆菌培养

[0038] 主要分为菌种活化、种子培养、摇瓶培养和发酵罐培养四个阶段。

[0039] 1.1.1菌种活化

[0040] 重组大肠杆菌菌种保存于-70℃菌株管(含75%甘油)内,由于其活性低,需要将其转接到斜面培养基上,并在恒温培养箱(37℃)中过夜培养。然后在37℃,225r/min条件下二次摇瓶活化菌种10小时,随后在接种于含卡那霉素的平板上,4℃环境下保存。

[0041] 1.1.2种子培养

[0042] 用接种环在含有卡那霉素的平板上挑取单菌落,采取划线接种方式转移菌种至已灭菌的装有50mL种子培养基(LB液体培养基,每升含10gNaCl、10g蛋白胨、5g酵母粉、0.02M pH7.4PBS)的250mL锥形瓶内,37℃、220r/min振荡培养14-16h。

[0043] 1.1.3摇瓶培养

[0044] 摇瓶发酵培养主要用于确定重组大肠杆菌发酵的最优条件。经种子培养后,将锥形瓶放于37℃,220r/min的振荡器上培养一定时间后测定菌体浓度,待摇瓶培养的菌体浓度OD₆₀₀达到0.6-1.5时备用,当OD₆₀₀值为0.8-1.0时效果更好。其中,摇瓶规格为2L锥形瓶,其内装有500mL LB液体培养基(每升含10gNaCl、10g蛋白胨、5g酵母粉、0.02M pH7.4 PBS)。

[0045] 1.1.4发酵罐发酵

[0046] (1) 发酵罐空罐洗净后,加入配制好的培养基(LB液体培养基,每升含10gNaCl、10g蛋白胨、5g酵母粉、0.02M pH7.4 PBS),使用压力蒸汽121℃灭菌30min。待摇瓶中菌体浓度OD₆₀₀达到0.6-1.5(0.8-1.0时效果更好)时,将摇瓶培养液按照1:15的比例(发酵罐中培养基与摇瓶培养液的体积比为15:1)立即接入10L发酵罐进行发酵。

[0047] (2) 补料发酵

[0048] 在发酵罐中发酵2h时,向发酵罐中补入本发明的补料培养基,一次性补料加入。

[0049] 分别补入下表1中所列出的配方对应的补料培养基

[0050] 表1补料培养基配方

	添加物				基础液
	葡萄糖	甘氨酸	MgSO ₄	NH ₄ SO ₄	LB
对照	0	0	0	0	LB
[0051] 配方 1	40g	50g	20g	20g	LB
配方 2	80g	100g	20g	20g	LB
配方 3	160g	200g	20g	20g	LB
配方 4	240g	250g	20g	20g	LB
配方 5	280g	300g	20g	20g	LB

[0052] (3) IPTG诱导

[0053] 当发酵罐中的重组大肠杆菌生长至对数生长中后期(发酵罐培养4h)时,向发酵罐中加入IPTG(1mM/L)诱导培养。

[0054] 1.1.4种子生长曲线的绘制

[0055] 在发酵罐发酵培养的过程中,每隔两小时,采用可见分光光度计在600nm处测定光密度(OD₆₀₀)。测定结果如下表2所示:

[0056] 表2

	培养时间(h)	LB: OD ₆₀₀	配方 1:	配方 2:	配方 3:	配方 4:	配方 5:
[0057]	0	0.093	0.085	0.092	0.079	0.100	0.091
	2	0.397	0.597	0.659	0.957	0.882	0.795
	4	1.862	3.562	4.627	6.587	5.392	5.221
	6	3.851	5.214	5.724	8.279	6.875	6.544
	8	4.669	6.548	6.978	8.927	7.294	7.215

[0058] 1.2菌体收集

[0059] 在发酵罐培养4小时时进行IPTG诱导,共诱导4个小时。诱导结束后收集发酵液,在4℃、6500×g离心15min,弃去上清,按100mg/mL的比例将沉淀用1×PB洗液重悬,相同条件下洗涤菌体2次,最后一次准确称取固体质量,分装后置于-20℃冻存。

[0060] 1.3菌体破碎

[0061] 取少量菌泥,按30mg/mL的比例用1×PB洗液(0.02M pH7.4 PBS)重悬并充分吹打混匀。将样品置于外加冰盒的敞口烧杯中,放入破碎室内进行破碎(运行3s间隔3s,共计20min);4℃,10000×g离心10min,取沉淀物用1×PB洗液重悬,同样的条件下清洗包涵体3次,最后一次称量固体质量,分装后置于-20℃冻存。

[0062] 1.4包涵体的收集、变性与纯化

[0063] 取少量包涵体,按25mg/mL的比例用8M尿素充分溶解,4℃、1000×g离心10min,上清经0.45μm的滤膜过滤后,负载上Ni-NTA柱,用10倍柱体积的结合缓冲液(8M尿素,20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl,5mmol/L咪唑,pH 8.0)冲洗柱子,收集流出液;用6倍柱体积的洗涤缓冲液(8M尿素,20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl,20mmol/L咪唑,pH 8.0)冲洗柱子,收集流出液;最后用10倍柱体积的洗脱缓冲液(8M尿素,20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl,500mmol/L咪唑,pH8.0)对目的蛋白进行洗脱,收集洗脱液,洗脱至无蛋白检出,以除去杂蛋白。

[0064] 对纯化后的蛋白(非洲猪瘟基因工程疫苗)进行测定,补加不同配方的补料培养基表达、纯化得到的蛋白的产量如下表3所示:

[0065] 表3不同补料培养基制备得到的非洲猪瘟基因工程疫苗的产量

[0066]	LB:	配方1:	配方2:	配方3:	配方4:	配方5:
每升产量	89mg	465mg	757mg	859mg	712mg	643mg

[0067] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心

郑州倍赛泰生物科技有限公司

<120> 一种非洲猪瘟基因工程疫苗高密度发酵补料培养基及发酵工艺

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 149

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

```

Thr Lys Pro Arg Lys Lys Met Asp Ser Glu Phe Phe Gln Pro Val Tyr
1           5           10           15
Pro Arg His Tyr Gly Glu Cys Leu Ser Pro Val Thr Thr Pro Ser Phe
           20           25           30
Phe Ser Thr His Met Tyr Thr Ile Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
           35           40           45
Arg Arg Asn Ile Arg Phe Lys Pro Trp Phe Ile Pro Gly Val Ile Asn
           50           55           60
Glu Ile Ser Leu Thr Asn Asn Glu Leu Tyr Ile Asn Asn Leu Phe Val
65           70           75           80
Thr Pro Glu Ile His Asn Leu Phe Val Lys Arg Val Arg Phe Ser Leu
           85           90           95
Ile Arg Val His Lys Thr Gln Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asn Glu
           100          105          110
Thr Asn Glu Cys Thr Ser Ser Phe Glu Thr Leu Phe Glu Gln Glu Pro
           115          120          125
Ser Ser Glu Lys Lys Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Gly
           130          135          140
Gly Ser Gly Gly Gly
145

```