维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)01－0046－04

毕赤酵母高密度发酵生产重组人内皮细胞抑制素

刘先俊[1], 周慧云[2], 黎　波[2]

(1.重庆医科大学基础医学院生化教研室,重庆　400016;2.重庆康尔威药业股份有限公司,重庆　400060)

【摘　要】目的:在 micro DCU－400 发酵罐中探讨表达人血管内皮细胞抑制素(Endostatin)的毕赤酵母(GS115)工程菌株的高密度发酵条件。方法:在发酵过程中,控制溶氧 30%以上、温度 30℃、pH5.3(生长阶段)或 5.0(诱导表达阶段),在无机盐培养基中生长约 18～22h 后,补加 50%甘油继续生长约 3～5h,OD_{600}达到 450 以上,开始进行甘油－甲醇混合物逐渐过渡至甲醇、甲醇浓度由低至高、8h 后达到最大诱导浓度(0.08ml/min/L)的诱导方式,维持诱导约 60h。离心收集上清液。利用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳、酶标检测试剂盒检测表达产物。结果:在诱导表达阶段,OD_{600}最高达到 580 以上(细胞湿重达到 375g/L),表达产量为 27.2mg/L,高于摇瓶表达水平(16.3mg/L)。结论:在 15L 发酵罐中成功表达了人血管内皮细胞抑制素,为进一步大批量生产作了准备。

【关键词】人血管内皮细胞抑制素;毕赤酵母;高密度发酵

【中国图书分类法分类号】Q554　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－07－14

High cell－density fermentation of Pichia pastoris that express endostatin

LIU XianJun, et al

(*Department of Biochemstry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop a high cell－density fermentation process in micro DCU－400 fermentor of Pichia pastoris GS115 containing a recombinant vector pPICZ α/endostatin. *Methods*: Cells were grown in the basal salts medium(BSM) at 30℃, $pO_2 \geqslant$ 30%, pH 5.3(growing) or pH 5.0(inducing), and the feed operation using 50% glycerol was performed when dissolved oxygen(pO_2) increased(after approximately 16－18h). It lasted 3－5hrs. When cell density(OD_{600}) reached 450, the inducement was began. After the transition from glycerol－methanol mixture to methanol, methanol from 0.03ml/min/L to 0.08ml/min/L in 8h was used to induce the endostatin expression. The inducement lasted for approximately 60h. Then centrifugation, the supernatant was collected. The expression was examined using 12% SDS－PAGE and ELISA. *Results*: In inducing phase, OD_{600} reached 580(wet wt 275g/L). The production of endostatin is 27.2mg/L, exceeding that in spinner flask(16.3mg/L). *Conclusion*: The human endostatin had been successfully expressed in 15L fermentor.

【Key words】Endostatin; High cell－density fermentation; Pichia pastoris

恶性肿瘤已成为危害人类健康的首要疾病。其发生、发展与治疗长期以来一直困扰着研究者。早在 1971 年,Folkman 等人[1]提出,肿瘤在生长至 1～2mm 大小后必需要有自己的血管供给营养和氧气,才能继续生长。因此,肿瘤新生血管形成是肿瘤生长、转移赖以存在的条件。阻断恶性肿瘤新生血管的生长已有望成为治疗恶性肿瘤的新手段。人血管内皮细胞抑制素(Endostatin)是较早发现的内源性新生血管生长阻断因子之一[2]。其作用及作用机制,国内外已有较多的研究。日前,作为抗肿瘤药物开发,重组人血管内皮细胞抑制素国外已进入临床试验阶段[3]。我们在毕赤酵母中克隆和表达了人血管内皮细胞抑制素,并在发酵罐中对其高密度发酵工艺进行了研究。现将结果报道如下:

作者介绍:刘先俊(1964－　),男,副教授,硕士,主要研究方向:生物制药。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　工程菌与主要试剂　表达人血管内皮细胞抑制素的工程菌由本公司构建(已申报国家专利,申请号:01102221.3)。表达载体为 pPICZα(购自 Invitrogen 公司),宿主菌为 GS115(his4mut$^+$)(购自 Invitrogen 公司)。低分子量蛋白质标准购自上海西巴斯生物技术开发有限公司,人血管内皮细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞抑制素酶标试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司,其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.2 主要设备 15L 发酵罐(德国 B. Braun 公司,micro DCU-400 发酵系统,含 pH 控制器、溶氧控制器、温度控制器、搅拌控制器、空气混合器、补料进样系统等。控制软件为 MFCS/win 2.0、自动控制发酵罐与记录数据);分光光度计(Agilent 8453);酶标检测仪(北京普朗新技术有限公司);离心机(Beckman Coulter Avanti™ J-20)等。

1.1.3 主要培养基组成 YPD 平板(10g/L 酵母膏、20g/L 蛋白胨、20g/L 葡萄糖、20g/L 琼脂);BMGH(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.0、10g/L 硫酸铵、3.4g/L 酵母氮碱、4×10^{-4}g/L 生物素、10g/L 甘油);BMGY(10g/L 酵母膏、20g/L 蛋白胨、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 pH6.0、10g/L 硫酸铵、3.4g/L 酵母氮碱、4×10^{-4}g/L 生物素、10g/L 甘油);BMMH(0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.0、10g/L 硫酸铵、3.4g/L 酵母氮碱、4×10^{-4}g/L 生物素、5.0g/L 甘油);生长培养基(每升含:H_3PO_4 26.7ml、$CuSO_4\cdot2H_2O$ 0.93g、K_2SO_4 18.2g、$MgSO_4$ 14.9g、KOH 4.13g、甘油 40ml);微量元素(PTM_1 每升含:$CuSO_4$ 0.93g、$MgSO_4$ 3g、H_3BO_3 0.02g、$ZnCl_2$ 20g、生物素 0.4g、KI 0.08g、Na_2MoO_2 0.2g、$CoCl_2$ 0.5g、$FeSO_4$ 64g、亚硫酸 5ml);补料培养基:50% 甘油(含 PTM_1 4ml/100ml)。

1.2 方法

1.2.1 上罐种子液制备 挑取在 YPD 平板上分离良好的单个细胞克隆,接种至 10ml BMGH(含 Zeocin 100μg/ml),30℃、250r/min 振荡培养过夜。镜检无杂菌污染后,分别取 5ml 菌液转种至 500ml BMGY 中(共 2 瓶),30℃、250r/min 振荡培养过夜,作为上罐种子液。

1.2.2 摇瓶培养与表达 按文献[4]进行。

1.2.3 上罐与发酵 在发酵罐中配制 10L 生长培养基,121℃灭菌 30min 后,冷却至 30℃后,用氨水调节 pH 至 5.3。加入消泡剂 20ml(泡敌)、1% 组氨酸 100ml、PTM_1 50ml、上罐种子液 1L。设定 pO_2 自动控制 30% 以上(自动调节转速与氧气供给)、pH 5.3(自动用氨水调节)、温度设定 30℃,开始进行发酵。约 14~16h 后,改为恒定转速(600rpm)、pO_2 自动控制 30% 以上(空气混合器自动调节)。约经过 18~22h,当 pO_2 急剧开始升高时,补给 50% 甘油(含 PTM_1 4ml/100ml)继续生长至 OD_{600} 达到 450 以上(同时设定 pH 至 5.0,仍用氨水自动调节),开始进行甲醇诱导。在诱导后的不同时间取样测定 OD_{600}、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表达产物。当 OD_{600} 不再继续增加、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表达产物无明显增多时,停机下罐。

1.2.3 电泳检测表达产物 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表达产物。

1.2.4 人血管内皮细胞抑制素的酶标检测:参照试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 重组人血管内皮细胞抑制素(Endostatin)在摇瓶中的表达

我们通过 PCR 获得编码人血管内皮细胞抑制素的 cDNA 序列,用 T-A 克隆方式克隆至毕赤酵母表达载体——pPICZα 中,在毕赤酵母细胞——GS115(his4mut$^-$)中进行表达,通过摇瓶培养结果表明,所表达的重组人血管内皮细胞抑制素为可溶性外分泌形式,表达产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳显示,与预计的理论分子量大小相符合(图 1)。酶标检测结果显示,表达产量为 16.3mg/L。说明通过毕赤酵母表达系统,我们已成功表达出重组人血管内皮细胞抑制素。



图 1 重组人血管内皮细胞抑制素在摇瓶中的表达

1,2,3:不同诱导时间摇瓶中表达的重组人血管内皮细胞抑制素;4:蛋白质分子量标准

2.2 毕赤酵母的高密度发酵

与大肠杆菌表达系统比较,毕赤酵母的优越性之一是能进行高密度发酵,从而为以毕赤酵母作为基因工程菌株在发酵罐中获得高水平产量提供了基础[5]。为了获得发酵罐中的高密度工程菌,先在上罐生长培养基中加入适量甘油,使毕赤酵母工程菌能获得数目的大量增加,待这部分甘油消耗完后,(表现为 pO_2 急剧开始升高),接着逐量增加甘油的补给,使毕赤酵母工程菌细胞数目短时间内迅速增多,表现为氧气消耗迅速增多、OD_{600} 数值急剧增大、氨水补给不断增多。在我们的发酵条件下,消耗生长培养基中的甘油约需 18~22h,OD_{600} 值通常能达到 300 左右。在随后补充甘油阶段,通常约耗时 3~5h,OD_{600} 值达到 500 以上(表 1)、随即开始进行甲醇诱导。在诱导阶段,OD_{600} 值达到 580 以上(湿重 375g/L,表 1),以后 OD_{600} 值有下降趋势,可能与

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞不断死亡有关。

表 1 发酵时间与毕赤酵母细胞密度关系表

t/h	0	1	2	18	20	21	22	23	24	25	28	32	50	75	100	125
OD_{600}	7.0	7.2	7.6	143	215	303	318	343	435	492	550	580	582	586	580	522

2.3 罐内表达的诱导方式

毕赤酵母能以甘油或甲醇作为唯一碳源,以甲醇诱导其外源基因的表达。在有甘油存在时,毕赤酵母以甘油为碳源,使细胞大量生长。在无甘油存在、有甲醇存在时,则只能以甲醇作为碳源,此时,细胞产生大量的醇氧化酶,从而诱导外源基因的表达,但是,过量的甲醇对于毕赤酵母是有毒的。因此,在发酵罐内毕赤酵母有一个从利用甘油到利用甲醇的转变过程。怎样使毕赤酵母工程菌很好地适应这一转变过程,直接关系到表达产量的高低,这也是毕赤酵母工程菌发酵研究中的重点问题。我们比较了甘油-甲醇混合物进行过度期、随后是甲醇诱导与直接甲醇诱导的表达情况。具体方法是:在补充甘油的末段,当 OD_{600} 值达到 450 左右时(此时,50% 甘油补给速度通常为 0.3ml/min/L),更换为 50% 甘油:甲醇 = 4:1(含 PTM_1 4ml/100ml)、速度降为 0.1ml/min/L、时间 1h;接着更换为 50% 甘油:甲醇 = 2:1(含 PTM_1 4ml/100ml)、速度降为 0.06ml/min/L、时间 1h;随后是 50% 甘油:甲醇 = 1:4(含 PTM_1 4ml/100ml)、速度降为 0.05ml/min/L、时间 1h;最后是不含甘油的甲醇(含 PTM_1 4ml/100ml),速度 0.05ml/min/L,在 5h 内自动增加甲醇供应至 0.1ml/min/L,维持该甲醇供应速度诱导约 60h,停机下罐。直接甲醇诱导的方法是:在补充甘油的末段,当 OD_{600} 值达到 500 左右时(此时,50% 甘油补给速度通常为 0.3ml/min/L),开始供给不含甘油的甲醇(含 PTM_1 4ml/100ml),速度 0.03ml/min/L,在 8h 内自动增加甲醇供应至 0.08ml/min/L,维持该甲醇供应速度诱导约 60h,停机下罐。酶标检测结果表明,甘油-甲醇混合物的过渡阶段诱导方法的产量为 27.2mg/L,直接甲醇诱导方式的产量为 18.6mg/L。因此,采用甘油-甲醇混合物的过渡阶段诱导方法优于直接甲醇诱导方式。

2.4 诱导阶段时间长短的选择

当毕赤酵母利用甲醇作为碳源以后,随着细胞产生醇氧化酶而外源基因同时被表达并被分泌至细胞外,因此,随着诱导阶段的时间延长,表达产物不断积聚,但同时细胞分泌降解外源蛋白的蛋白水解酶也增多,表达产物的降解也不断增加,特别是发酵的最后阶段,细胞死亡的不断加剧,使表达产物的降解更甚。所以,诱导阶段时间长短的选择对于表达产量有着重要的影响。我们的结果表明,在诱导后的 5~6h,上清液浓缩 10 倍后在 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳上即有肉眼可见的特异表达条带(图 2),诱导 60h 后,表达产物明显增加,但降解似乎也加剧(图 2),诱导 72h 后,降解更甚,同时杂蛋白也明显增多。因此,我们选择诱导阶段时间为 60h。

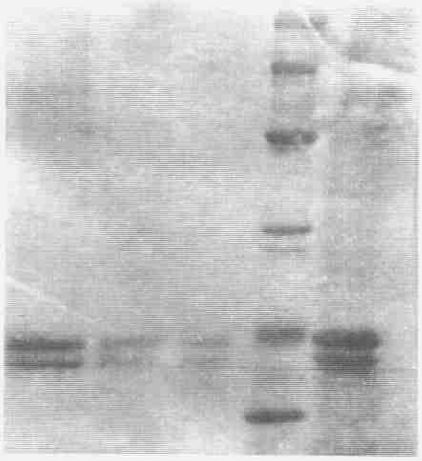


图 2 诱导不同时间的表达情况

3:诱导 12h 后;2:诱导 25h 后;1:诱导 48h 后;5:诱导 72h 后;4:蛋白质分子量标准

2.5 发酵过程中 pH 的变化

毕赤酵母细胞有广泛的 pH 生长范围(pH 3~8)。而细胞在生长阶段会逐渐产酸使环境 pH 有不断减低的趋势(在恒定 pH 条件下,氨水补给不断增加),此外,细胞分泌的水解表达产物的蛋白水解酶以碱性蛋白水解酶为主。因此,为了减少表达产物的降解,我们选择了在生长阶段的 pH 恒定在 5.3(用氨水自动调节),在诱导表达阶段选择 pH 恒定在 5.0。实验结果表明,对毕赤酵母细胞的生长(OD_{600} 值)与表达无明显影响,但可以减轻表达产物的降解。

3 讨 论

毕赤酵母表达系统是近年来应用较多的基因工程表达系统,作为真核表达系统,它具有其它蛋白质表达系统所不具备的优点[5],如以分泌形式表达可

维普资讯 http://www.cqvip.com

溶性产物而方便对产物的分离纯化[6];可进行高密度发酵从而可获得很高的表达产量[7]等。已对多种蛋白质进行了成功表达。对毕赤酵母工程菌在发酵罐中的发酵工艺研究也是基因工程产业化研究的重点之一。发酵过程中培养基选择直接与随后的分离纯化有关。利用毕赤酵母对培养基要求低的特点,采用无机盐作为培养基,在我们的发酵条件下,毕赤酵母工程菌能很好地生长(OD_{600}值最高达到586,细胞湿重达到 275g/L,已达到高密度发酵)。这些无机盐培养基为随后的产品分离纯化提供了方便。

在发酵罐中,毕赤酵母发酵达到高密度后,诱导时间与诱导方式的选择对其表达产量影响较大。怎样选择诱导时间与诱导方式是毕赤酵母发酵研究中的重要课题。甲醇,一方面作为诱导物,可诱导外源基因的表达;同时,在诱导阶段,它也作为毕赤酵母的碳源。此外,过量甲醇会导致毕赤酵母的甲醇中毒。在毕赤酵母利用甘油而转变为利用甲醇时,需要一定时间产生利用甲醇的酶(即诱导醇氧化酶的表达)。因此,在诱导的初期,通常采用甲醇从低浓度逐渐增加至最大诱导浓度。我们探索了甘油-甲醇混合物的过渡阶段诱导方法与直接甲醇诱导方式,从 OD_{600}值、pO_2 变化、氨水消耗情况以及表达产物的酶标检测结果等指标判断,甘油-甲醇混合物的过渡阶段诱导方法优于直接甲醇诱导方式,与 Zhang 等人[8]的报道相似。此外,甲醇浓度从低达到最大诱导浓度所用时间差异较大[9],这可能与不同的工程菌有关。我们采用在 8～10h 内达到甲醇的最大诱导浓度并维持约 60h 左右的诱导时间。

甲醇最大诱导浓度的选择也是毕赤酵母发酵研究中的重要问题。很明显:甲醇浓度太低,表达产量低;甲醇浓度太高,会导致工程菌甲醇中毒,表达产量反而降低。因此,在保证工程菌不致甲醇中毒的前提下,通常选择工程菌能耐受的最大甲醇浓度(有条件时,最好检测发酵液中的甲醇浓度[10]而调整甲醇的供给量)。该浓度的高低,与工程菌种类、诱导方式等有关。在我们的诱导方式下(甘油-甲醇混合物的过渡阶段诱导),当甲醇供给速度达到 0.1ml/min/L 以后,约 20-30h 后即可出现 pO_2、pH 的升高,表达产量明显降低等。初步考虑与甲醇中毒有关。因此,我们选择最大甲醇供给速度为 0.08ml/min/L 而维持诱导。酶标检测结果表明,表达产量为 27.2mg/L。仅稍高于摇瓶的表达量(16.3mg/L)。考虑到在诱导阶段,发酵罐中的细胞密度远高于摇瓶中的细胞密度(约高 10 倍),我们在罐内的表达量与其细胞密度明显不相称,说明尚需要进一步探讨甲醇的诱导方式与最大甲醇诱导浓度。

参 考 文 献

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. N. Engl. J. Med., 1971;285:1182-1186.

[2] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997;88:277-285.

[3] Herbst R S, Hess K R, Tran H T, et al. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors[J]. J Clin Oncol, 2002;20:3792-3803.

[4] 刘先俊,刘方欣,漆洪波,等. 人瘦素在毕赤酵母中的表达与分离纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27:252-253.

[5] Michael AR, Carol AS, Jeffrey JC. Foreign gene expression in yeast: a Reniew[J]. Yeast, 1992;8:423-488.

[6] Rosenfeld SA, Nadeau D, Tirado J, et al. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. Protein Expr Purif. 1996;8:476-482.

[7] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in Pichia pastoris strains containing multiple tandem integrations of the gene[J]. Biotechnology (NY), 1991;9:455-460.

[8] Zhang W, Hywood Potter KJ, Plantz BA, et al. Pichia pastoris fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003;30:210-215.

[9] Lerner-Marmarosh N, Gimi K, Urbatsch IL, et al. Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from Pichia pastoris cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins[J]. J Biol Chem, 1999;274:34711-34718.

[10] Katakura Y, Zhang W, Zhuang GQ, et al. Effect of methanol concentration on the production of human β_2-glycoprotein I domain V by a recombinant PichiaPastoris: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor[J]. Journal of Bioengineering and Fermentation, 1998;86:482-487.