

氮源对转基因小球藻异养生长及兔防御素表达的影响

韩兴梅¹, 李元广¹, 魏晓东¹, 孙勇如², 王义琴²

(1. 华东理工大学海洋生化工程研究所生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;
2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 在 250 ml 摇瓶中研究了氮源对转兔防御素(NP-1)基因小球藻的异养生长和 NP-1 表达的影响, 结果表明, 转 NP-1 基因小球藻异养培养的最适氮源为硝酸钾和酵母粉, 二者的最佳浓度分别为 0.9 和 9 g/L, 藻细胞密度达 5.11 g/L, 是不添加硝酸钾时细胞密度的 1.55 倍, 而 NP-1 表达量基本不变. 5 L 生物反应器分批培养结果表明, 转 NP-1 基因小球藻在含有硝酸钾和酵母粉两种混合氮源的培养基中培养时, 硝酸钾被快速消耗而有机氮源充足, 藻细胞内的叶绿素和蛋白质含量下降, 但 NP-1 表达量基本不变.

关键词: 转基因小球藻; 兔防御素; 氮源; 异养培养; 表达

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2004)01-0016-06

1 前言

防御素是广泛分布于动植物及昆虫体内的一类抗菌肽, 含量极少, 却执行着重要的机体防御功能^[1]. 目前, 从生物界分离到的防御素已达 30 多种, 其中兔防御素(NP-1)的抗菌谱最广, 它对很多革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、被膜病毒和鼠肿瘤细胞, 尤其是对幽门螺杆菌和艾滋病毒有显著的毒杀作用^[2]. 因此, NP-1 在医药方面具有重要的应用价值.

目前, 通过化学合成法和直接提取法可获得防御素, 但由于工艺路线复杂, 成本极高, 不具有应用价值^[3]. 因此, 通过基因工程方法生产防御素成为该领域的研究热点. Piers 等^[4]通过融合蛋白途径试图在细菌中表达人的防御素 HNP-1, 但得到的 HNP-1 没有生物学活性; 徐志南等^[5]通过融合蛋白途径在大肠杆菌中表达 β -人防御素, 但表达量很低且尚不知所表达的产物是否有活性. Chen 等^[6]用电激法将 NP-1 基因成功地导入小球藻细胞中, 体外离体抑菌实验证明 NP-1 基因已稳定整合到小球藻基因组中, 并进行了正确转录和表达, 因此利用转 NP-1 基因小球藻有望规模化制备 NP-1.

转 NP-1 基因小球藻高密度高表达培养是规模化制备 NP-1 的关键技术之一. 众所周知, 氮源是影响基因工程菌生长及外源蛋白表达的重要因素. 目前, 氮源对小球藻异养生长的影响有较多的研究^[7,8], 而有关氮源对转基因小球藻异养生长及外源基因产物表达的影响却未见报道. 本工作考察了氮源对转基因小球藻异养生长和 NP-1 表达的影响, 为该转基因藻高密度高表达培养工艺优化奠定了基础.

2 材料与方法

2.1 材料

藻种: 转 NP-1 基因小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供,

收稿日期: 2003-04-29, 修回日期: 2003-06-11

基金项目: 国家 863 计划海洋生物技术主题资助项目(编号: 2002AA629110)

作者简介: 韩兴梅(1978-), 女, 黑龙江省鸡西市人, 硕士研究生, 海洋生化工程专业; 李元广, 通讯联系人, E-mail: ygli@ecust.edu.cn.

具体构建方法参见文献[6], NP-1 基因是由 Ubiquitin 启动子控制, 无需外界条件诱导.

2.2 培养方法

摇瓶培养于 250 ml 摇瓶中进行, 接种量为 0.05 g/L, 装液量为 100 ml, 培养温度 28°C, 摇床转速 140 r/min. 反应器培养于 5 L 生物反应器(上海保兴生物工程设备有限公司制造)中进行, 装液量为 3 L, 培养温度 28°C, 转速 200 r/min, 通气量 3 L/min.

2.3 培养基

所用 3 种培养基成份见表 1. 微量元素溶液配方为(g/L): H_3BO_4 0.061, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.287, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.169, $(NH_4)_6MoO_{24} \cdot 4H_2O$ 0.01235, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.00249, 水 1 L.

表 1 培养基组成

Table 1 Composition of medium

Composition	1 [#] medium	2 [#] medium	3 [#] medium
Glucose (g)	3	15	15
Yeast extract (g)	3	9	9
KNO ₃ (g)	0	0	0.9
KH ₂ PO ₄ (g)	0.025	0.1	0.1
Ca(NO ₃) ₂ (g)	0.1	0.2	0.2
MgSO ₄ (g)	0.025	0.05	0.05
KCl (g)	0.012	0.06	0.06
FeCl ₃ (g)	0.001	0.01	0.01
Trace elements (ml)	0	1	1

2.4 分析方法

生物量的测定: 在一定范围内, 藻细胞浓度 C_X (用细胞干重表示)与 OD 值呈线性关系, 根据波长 540 nm 的光密度 OD_{540} , 由标准曲线计算: $C_X(g/L) = 0.431OD_{540} - 0.02$ ($R^2 = 0.988$).

NP-1 的测定^[2]: 外源蛋白 NP-1 为胞内产物, 其含量采用抑菌圈法间接测定. 将一定细胞浓度的藻液离心, 藻体用去离子水清洗 3 遍后, 根据藻体湿重加入 3 倍体积的水进行超声破碎, 使每次破碎液中藻细胞浓度相同. 将培养过夜的大肠杆菌均匀涂布于 LB 固体培养基上, 待表面液体消失后, 用无菌打孔器在培养基上做点样孔(孔径 13 mm), 加入 100 μ l 超声破碎后的藻液, 在 37°C 培养箱中培养 12 h, 测量抑菌圈的大小.

葡萄糖的测定采用葡萄糖试剂盒(卫生部上海生物制品所); NO₃的测定采用水杨酸比色法^[9]; 氨基氮的测定采用甲醛滴定法^[10]; 叶绿素的测定采用丙酮提取比色法^[11].

3 结果与讨论

3.1 氮源种类对转基因藻生长的影响

氮是蛋白质、核酸以及叶绿素的重要组成成份, 因此氮源种类和浓度必然对藻细胞的生长和外源蛋白的表达产生影响. 小球藻能够利用包括硝酸盐、铵盐、尿素、氨基酸、酵母粉等多种形式的无机和有机氮源^[12], 不同的藻种最适的氮源也不同. 因此首先考察氮源种类对转基因小球藻生长的影响.

在不添加氮源的 1[#]培养基中考察了硝酸钾、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、尿素、甘氨酸、酵母粉 7 种氮源(浓度均为 3 g/L)对转 NP-1 基因小球藻生长的影响, 结果见图 1. 由图可见, 在所用的 7 种氮源中, 转 NP-1 基因小球藻的生长差别很大. 分别以氯化铵、硝酸铵、硫酸铵、甘氨酸为唯一氮源时, 转基因藻几乎不能生长; 以硝酸钾或尿素为氮源时, 转 NP-1 基因小球藻生长缓慢, 培养 70 h, 细胞密度仅从接种时的 0.05 g/L 增加到 0.25 g/L 左右, 平均生长速率不足 3 mg/h. 而以

酵母粉为唯一氮源的转基因藻所得的生物量最高, 培养到 70 h 时, 细胞密度已达 1.12 g/L, 是硝酸钾和尿素的 4.48 倍. 由此可见当采用单一氮源培养转 NP-1 基因小球藻时, 酵母粉是最佳氮源.

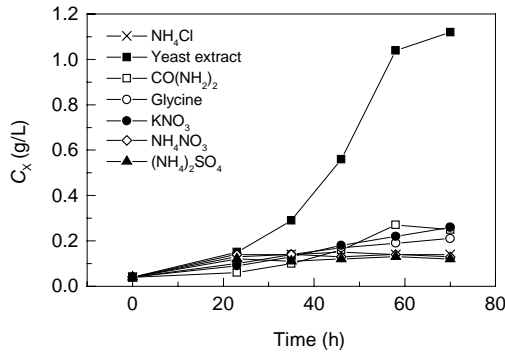


图 1 不同氮源对异养培养转 NP-1 基因小球藻生长的影响

Fig.1 Effects of different nitrogen sources on the growth of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene

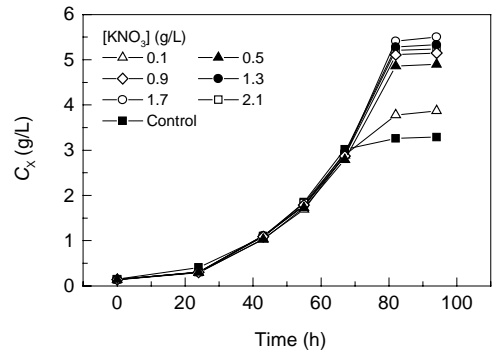


图 2 添加不同浓度的硝酸钾对转 NP-1 基因小球藻生长的影响

Fig.2 Effect of initial KNO_3 conc. added on the growth of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene

3.2 混合氮源对藻细胞生长和 NP-1 表达的影响

3.2.1 添加硝酸钾的影响

对碳源、氮源、无机盐进行单因素优化, 得到 2[#]培养基. 目前, 在小球藻的异养培养中, 硝酸钾被认为是一种较好的氮源^[13-15], 但同时采用硝酸钾和有机氮源异养培养小球藻的研究未见报道. 因此, 在 2[#]培养基中添加不同浓度(0.1~2.1 g/L)的硝酸钾, 研究硝酸钾和酵母粉混合氮源对转基因小球藻生长和 NP-1 表达的影响. 对照(control)不含硝酸钾(即 2[#]培养基).

由图 2 可以看出, 当细胞密度较低时, 在 2[#]培养基中添加硝酸钾与否不影响转 NP-1 基因小球藻的生长; 从 67 h 开始, 添加不同浓度的硝酸钾对转基因藻的生长表现出明显的促进作用, 细胞密度比对照有了明显的提高. 培养到 96 h, 按照硝酸钾浓度由低到高的顺序对应的生物量分别为 3.78, 4.86, 5.11, 5.28, 5.41, 5.21 g/L, 而对照只有 3.29 g/L.

由表 2 可见, 当硝酸钾浓度在 0.1~0.9 g/L 时, 抑菌圈直径变化较小, 当硝酸钾浓度超过 0.9 g/L 时, 抑菌圈直径从 21 mm 下降到 17 mm 左右, 这可能是因为高浓度的 K^+ 增加了藻细胞膜的通透性, 而 NP-1 是分子量为 3 kDa 的短肽, 细胞膜通透性的增加可能导致胞内的部分 NP-1 外泄. 由于抑菌圈的大小反映胞内 NP-1 的表达量, 随着 K^+ 浓度的增加, 细胞膜的通透性逐渐加大, 胞内外泄的 NP-1 量相应增加, 因而抑菌圈直径也下降较大. 因此从转基因藻的细胞密度和 NP-1 表达量来看, 硝酸钾的添加浓度以 0.9 g/L 为宜. 在此浓度下, 藻细胞的密度为对照的 1.55 倍, 而抑菌圈直径(即 NP-1 的表达量)基本不变.

表 2 添加不同浓度的硝酸钾对转基因小球藻中 NP-1 表达量的影响

Initial KNO_3 concentration (g/L)	0	0.1	0.5	0.9	1.3	1.7	2.1
Antimicrobial diameter (mm)	21.9	22.2	21.5	21	17	17.9	17.9

3.2.2 初始酵母粉浓度的影响

在 2[#]培养基中添加 0.9 g/L 硝酸钾, 得到 3[#]培养基. 由于前述研究发现酵母粉是转基因藻的最佳氮源, 因此改变 3[#]培养基中酵母粉浓度, 考察其对转基因小球藻生长和 NP-1 表达量的影响.

由图 3 可见,改变培养基中酵母粉浓度对转 NP-1 基因小球藻生长有很大影响. 1 和 3 g/L 的酵母粉明显不利于小球藻的生长, 培养 96 h 的细胞密度仅分别为 2.22 和 3.31 g/L. 当细胞密度较低时, 其它几种氮源浓度对转基因藻生长影响不大; 从 72 h 开始, 9 g/L 的酵母粉逐渐表现出对转 NP-1 基因小球藻生长的促进作用. 培养到 84 h, 细胞密度已达 5.03 g/L. 从抑菌圈直径变化看, 酵母粉浓度对 NP-1 的表达量影响不大(表 3). 由此可见, 酵母粉浓度为 9 g/L 适合转基因小球藻生长和 NP-1 表达.

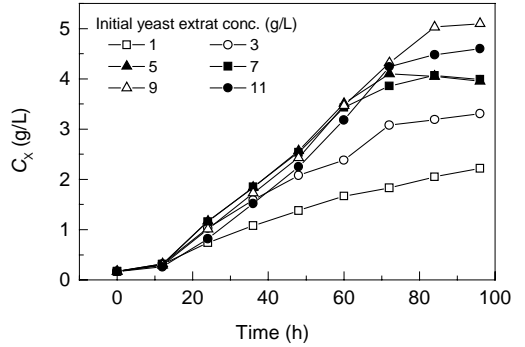


图 3 初始酵母粉浓度对转 NP-1 基因小球藻生长的影响
Fig.3 Effect of initial yeast extract conc. on the growth of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene

表 3 不同浓度的酵母粉对转基因小球藻中 NP-1 表达量的影响

Table 3 Effect of initial yeast extract concentration on NP-1 expression in transgenic *Chlorella*

Initial yeast extract conc. (g/L)	1	3	5	7	9	11
Antimicrobial diameter (mm)	22.4	21.9	21.7	20.1	21.4	20.5

3.3 转 NP-1 基因小球藻异养培养过程特征分析

通过摇瓶培养研究确定了硝酸钾和酵母粉的最佳浓度(即 3[#]培养基), 为了进一步考察转 NP-1 基因小球藻在含有硝酸钾和酵母粉两种混合氮源的 3[#]培养基中异养培养时氮源的利用情况以及藻细胞生长、NP-1 表达、蛋白质和叶绿素含量的变化特征, 同时也为考察转 NP-1 基因小球藻在生物反应器中的培养情况, 在 5 L 生物反应器中利用 3[#]培养基进行了转基因小球藻的分批异养培养, 结果见图 4~6.

由图 4 可以看出, 藻细胞经过一段延迟期后便快速生长, 72 h 后藻细胞密度基本不再增加. 72 h 时的细胞密度达 5 g/L, 培养液中的葡萄糖还有约 4 g/L, 这表明碳源不是限制转 NP-1 基因小球藻生长的主要原因. 从培养基中氨基氮含量来看, 有机氮源比较充足, 氨基氮也不是限制转 NP-1 基因小球藻生长的原因. 从硝酸钾的消耗曲线可以看出, 在延迟期硝酸钾浓度变化较小, 但藻细胞进入指数生长期后, 硝酸钾的消耗速率很快, 48 h 时培养液中已基本不含硝酸钾, 而此时的细胞密度仅为 3.25 g/L, 这说明转 NP-1 基因小球藻在缺乏硝酸钾的条件下还会利用有机氮源继续生长约 24 h. 由此可见, 在培养过程中硝酸钾被快速消耗而有机氮源较充足.

NP-1 是含 33 个氨基酸的短肽, 分子量约为 3 kDa, 因此藻体蛋白质含量的变化可能会影响 NP-1 的表达量. 由图 5 可见, 随着培养过程不断进行, 藻细胞中蛋白质含量缓慢下降, 从 36 h 时的 48.54% 下降到 84 h 时的 35.51%. 潘欣等^[16]报道异养培养的小球藻蛋白质含量仅为细胞干重的 23.67%, 而转 NP-1 基因小球藻的蛋白质含量较高的原因可能是培养基中有机氮源

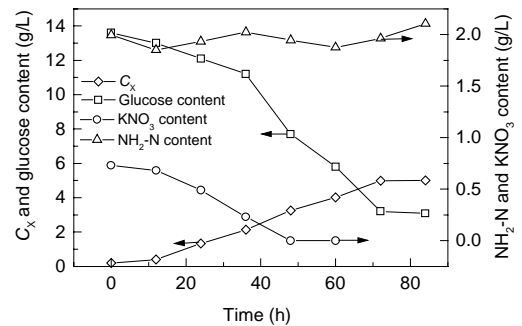


图 4 转 NP-1 基因小球藻在 5 L 反应器中的分批异养培养

Fig.4 Batch heterotrophic cultivation of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene in a 5 L bioreactor

较充足之故. 从图 5 还可看出, 在培养过程中虽然藻细胞的蛋白质含量下降, 藻细胞中 NP-1 的表达量(抑菌圈直径)并没有表现出相应的下降趋势, 这说明 NP-1 的表达量并不是与藻体的蛋白质含量呈简单的正相关关系.

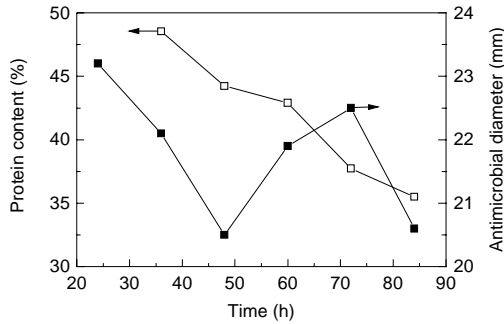


图 5 转 NP-1 基因小球藻在分批培养过程中蛋白质含量的变化

Fig.5 Protein content during batch culture of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene

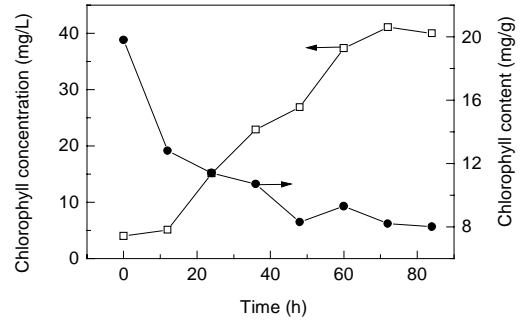


图 6 转 NP-1 基因小球藻在培养过程中叶绿素含量的变化

Fig.6 Chlorophyll content during batch culture of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene

由图 6 可以看出, 随着细胞密度的增加, 单位体积的叶绿素含量也不断增加, 最高含量可达 41.09 mg/L; 而单位藻体的叶绿素含量却呈下降趋势, 从接种时的 19.8 mg/g 到培养 82 h 时的 8.3 mg/g, 但下降速率并不相同. 0~12 h 下降较快, 对应的硝酸钾浓度却只减少了 0.05 g/L; 12 h 后单位藻体的叶绿素含量下降较慢, 36 h 之内将 0.68 g/L 的硝酸钾消耗完. 这表明在混合氮源共存的情况下, 硝酸钾消耗越快, 藻体的叶绿素含量下降越慢, 转基因小球藻可能将所利用的硝酸钾合成叶绿素而储存在叶绿体中; 48 h 后培养基中已不含硝酸钾, 单位藻体的叶绿素含量基本不变, 这可能是由于酵母粉为转基因藻提供充足的氮源用以合成叶绿素所致. 刘学铭等^[14]认为在硝酸钾供给充足的情况下, 叶绿素的含量不会减少. 本文的结果表明, 在硝酸钾仍然存在的条件下, 单位藻体的叶绿素含量却不断下降. 这种现象的出现可能是由于小球藻在以硝酸钾为唯一氮源和以硝酸钾、酵母粉这两种混合氮源进行异养培养时, 在利用氮源合成叶绿素的机制上有所差异.

4 结论

采用单一氮源异养培养转 NP-1 基因小球藻时, 最适氮源为酵母粉. 在含有酵母粉的培养基中添加硝酸钾有利于转基因藻的生长, 但硝酸钾浓度超过 0.9 g/L 时会抑制 NP-1 的表达. 转 NP-1 基因小球藻异养培养的最适氮源为硝酸钾和酵母粉, 二者的最佳浓度分别为 0.9 和 9 g/L. 转 NP-1 基因小球藻在含有硝酸钾和酵母粉两种混合氮源的培养基中培养时, 硝酸钾被快速消耗而有机氮源较充足, 藻细胞内的叶绿素和蛋白质含量会下降, 但 NP-1 表达量基本不变.

参考文献:

- [1] 陈颖, 葛毅强, 张利明. 哺乳动物防御素的研究进展及其应用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(1): 17-21.
- [2] 王义琴, 陈颖, 白琴华, 等. 以小球藻为载体生产防御素的研究 [J]. 高技术通讯, 2001, 11(9): 1-5.
- [3] Hancock R W, Robert L. Cationic Peptides: A New Source of Antibiotics [J]. Tibtech, 1998, 16: 82-88.
- [4] Piers K L, Brown M H, Hancock Robert E W. Recombinant DNA Procedures for Producing Small Antimicrobial Cationic Peptides in Bacteria [J]. Gene, 1993, 134: 7-13.

- [5] 徐志南, 彭力, 方向明, 等. β -人防御素-2 在大肠杆菌中的重组表达及优化 [J]. 精细与专用化学品, 2002, (增刊): 39-42.
- [6] Chen Y, Wang Y Q, Sun Y R, et al. Highly Efficient Expression of Rabbit Neutrophil Peptide-1 Gene in *Chlorella ellipsoidea* Cells [J]. Curr. Genet., 2001, 39: 365-370.
- [7] Shi X M, Zhang X W, Chen F. Heterotrophic Production of Biomass and Lutein by *Chlorella protothecoides* on Various Nitrogen Sources [J]. Enzyme Microb. Technol., 2000, 27: 312-318.
- [8] 刘学铭, 梁世中. 谷氨酸对异养培养小球藻生长的影响 [J]. 氨基酸与生物资源, 1999, 21(1): 1-3.
- [9] Hecht U, Mohr H. Factors Controlling Nitrate and Ammonium Accumulation in Mustard (*Sinapis alba*) Seedlings [J]. Physiol. Plantarum., 1990, 78: 379-387.
- [10] 大连轻工业学院. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997. 232.
- [11] Becker E W. Measurement of Algal Growth [A]. Becker E W. Microalgae Biotechnology and Microbiology [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 56-62.
- [12] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 61-62.
- [13] 刘世名, 孟海华, 梁世中, 等. 生物反应器高密度异养培养小球藻 [J]. 华南理工大学学报, 2000, 28(2): 21-27.
- [14] 刘学铭, 王菊芳, 余若黔, 等. 不同氮水平下异养小球藻生物量和叶绿素含量的变化 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 198-201.
- [15] McAuley P. Nitrogen Limitation and Amino-acid Metabolism of *Chlorella* Symbiotic with Green Hydra [J]. Planta, 1987, 171: 532-538.
- [16] 潘欣, 李建宏, 戴传超, 等. 小球藻异养培养的研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(4): 28-33.

Effect of Nitrogen Source on Heterotrophic Growth of Transgenic *Chlorella* and Rabbit Defensin Expression

HAN Xing-mei¹, LI Yuan-guang¹, WEI Xiao-dong¹, SUN Yong-ru², WANG Yi-qin²

(1. Inst. Marine Biopro. Eng., State Key Lab. Bioreac. Eng., East China Univ. Sci. & Technol., Shanghai 200237;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The influence of nitrogen sources on the heterotrophic growth of transgenic *Chlorella* and rabbit defensin (NP-1) expression in a 250 ml flask was investigated. The results showed that KNO_3 and yeast extract were the optimal nitrogen sources for the heterotrophic culture of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene. Dry weight cell density of transgenic *Chlorella* was improved from 3.29 g/L to 5.11 g/L and NP-1 expression capability kept unchanged as the concentration of KNO_3 and yeast extract were 0.9 g/L and 9 g/L respectively. Batch culture of transgenic *Chlorella* with NP-1 gene in a 5 L bioreactor with the optimized medium was conducted and the process characteristics were also analyzed. It was found that KNO_3 was consumed quickly and organic nitrogen was enough in the medium, and chlorophyll and protein contents of transgenic *Chlorella* decreased while NP-1 expression capability kept unchanged.

Key words: transgenic *Chlorella*; rabbit defensin; nitrogen source; heterotrophic culture; expression