

双碳源交替刺激毕赤酵母高效表达人尿激酶原

马善康, 李强, 顾小勇

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要:用毕赤酵母表达人尿激酶原, 确定了基本的发酵条件: 生长阶段 pH 控制在 5.6, 表达阶段 pH 控制在 6, 生长和表达阶段发酵温度 28°C. 研究发现细胞内乙醇氧化酶(AOX)酶活性的变化与目的蛋白尿激酶原(Pro-UK)酶活性的变化存在很好的对应关系, 得到一种新的高效表达目的蛋白的调控方法, 即交替加入甘油和甲醇, 这一双碳源交替刺激法使表达的酶活性比对照提高了 70%.

关键词:毕赤酵母; 发酵; 尿激酶原; AOX 酶

中图分类号: Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2002)05-0448-05

1 前言

血栓病是人类高死亡率疾病之一, 极大地危害着人类健康. 尿激酶原(Pro-urokinase 或 Pro-UK)是尿激酶的前体, 能选择性激活纤维蛋白表面的纤溶酶原, 而对循环血液中纤溶酶原、纤维蛋白的影响较小^[1,2], 是一种有效且副作用小的新型溶栓药物. 从 20 世纪 80 年代初, 人们就开始研究通过基因工程的方法构建基因工程细胞, 用细胞大规模培养的方法来制备这种溶栓剂^[3].

迄今为止, 人们已尝试用各种宿主细胞以及外源基因载体构建出不同的表达系统: (1) 利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达尿激酶原^[4], 这种方法能得到较高酶活力, 但由于培养复杂、周期长, 成本高, 还不适于进行大规模生产; (2) 用 CHO 细胞在低血清培养情况下酶活力最高可达 6614 IU/ml^[5], 表达水平很高, 但也存在与昆虫细胞表达系统同样的问题; (3) 大肠杆菌表达系统具有经济、简便、生长周期短、容易控制等优点, 并且尿激酶原在大肠杆菌中的表达产物形成包涵体, 避免了被蛋白酶降解的可能, 但是表达水平很低, 多在 2% 以下. 彭贵洪等^[6]构建的基因工程菌表达量超过 15%, 酶活力只有 1000 IU/ml; (4) 在 BHK21 细胞中表达水平也很低, 为纳克级, 要达到具有工业生产价值的程度很困难.

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是近十几年兴起的真核表达系统, 此表达系统具有原核生物发酵速度快、简便的特点, 同时又具有真核生物对表达蛋白进行翻译后修饰的能力, 特别是糖基化能力. 其基因表达产物既可在胞内聚集, 又可以被分泌到胞外^[7-9], 酶活力高达 10000 IU/ml 以上. 本工作针对一株表达 Pro-UK 的毕赤酵母 GS115 展开研究. 从质粒的构建方式可以看出, 当甲醇诱导时, 乙醇氧化酶(AOX)合成同时就表达目的蛋白 Pro-UK; 不合成 AOX 的情况下也不生成目的蛋白, 加入甘油可使毕赤酵母大量生长, 而此时不生成 AOX, 当然也就不会产生目的蛋白 Pro-UK. 这就是产物合成与底物的关系. 在菌体浓度一定时, 菌体中 AOX 酶量是有限的, 不能无限增加. 当 AOX 浓度上升到一定值时, 就不再表达, 也就是目的产物 Pro-UK 不再生成. 如果在表达阶段交替加入甲醇和甘油, 就可能打破细胞中利用甲醇的 AOX 的平衡, 在反复合成 AOX 的过程中, 使目的蛋

收稿日期: 2002-04-17, 修回日期: 2002-07-05

基金项目: 清华大学“985”项目资助

作者简介: 马善康(1977-), 男, 回族, 重庆市人, 硕士研究生, 生物化工专业.

白分泌量增加,就有可能大量积累 Pro-UK. 因此本研究提出甲醇、甘油双碳源交替流加的新工艺,考察用双碳源交替刺激 *Pichia pastoris* 基因工程菌表达重组 Pro-UK 的基本条件及效果.

2 材料和方法

2.1 菌种及培养基

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115 基因工程菌由北京大学蛋白质工程国家重点实验室提供.

种子培养基(g): 蛋白胨 20, 酵母粉 10, YNB 3.4, (NH₄)₂SO₄ 10, 甘油 10, L-Lysine 1, 生物素 0.0004, 用浓度为 1 mol/L 的 HCl 调节 pH=7, 定容至 1 L.

发酵培养基: H₃PO₄ 26.7 ml, CaSO₄·2H₂O 0.93 g, MgSO₄·7H₂O 14.9 g, KOH 4.13 g, K₂SO₄ 18.2 g, 甘油 20 g, 微量元素 4.35 ml, 用浓度为 1 mol/L 的 HCl 调节 pH=5.6, 定容至 1 L, 培养基在 121°C 灭菌 20 min.

微量元素配比(g): CuSO₄·5H₂O 2.0, KI 0.088, MnSO₄·H₂O 3.0, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2, H₃BO₄ 0.02, CoCl₂·6H₂O 0.5, ZnCl₂·7.0, FeSO₄·7H₂O 22, 生物素 0.2, H₂SO₄ 1 ml, 定容至 1 L.

2.2 培养方法

种子培养: 300 ml 三角瓶中装入 30 ml 种子培养基, 灭菌后挑单菌落于其中进行培养, 28°C 及 200 r/min 条件下培养 24 h, 接发酵摇瓶或发酵罐.

基本发酵条件: 用 *Pichia pastoris* 表达 Pro-UK, 分为生长阶段和表达阶段, 生长阶段用甘油作碳源, 表达阶段用甲醇作碳源. 300ml 三角瓶中装入 30 ml 发酵培养基, 用浓氨水调节 pH, 28°C 及 200 r/min 条件下培养 24 h, 确定生长阶段和表达阶段最佳 pH; 设定不同的温度, pH 在 5.6 和 6 及 200 r/min 条件下培养 24 h, 分别确定生长阶段和表达阶段的适宜温度.

摇瓶发酵对比培养: 在 pH=6、温度 28°C、转速 200 r/min 条件下, 将种子按 5%接种量接入三角瓶, 300 ml 三角瓶中装入 30 ml 发酵培养基. 对照培养: 生长 36 h 后, 加入 1.5 ml 甲醇诱导表达 24 h, 离心留上清液测酶活力. 双碳源交替刺激法: 在甘油和甲醇总加入量与对照相同的前提下, 甘油和甲醇按如下方法加入: 起始加入甘油 0.5 ml, 生长 12 h, 加入甲醇 0.5 ml, 表达 12 h, 再加入甘油 0.5 ml, 生长 10 h, 加入甲醇 0.5 ml, 表达 10 h, 再加入甘油 0.5 ml, 生长 8 h, 加入甲醇 0.5 ml, 表达 8 h, 离心留上清液测酶活力.

发酵罐对比培养: 方法同摇瓶实验. 2 个流加瓶中分别装有 50%甘油和无水甲醇, 发酵过程中控制发酵液中溶氧在 30%附近进行流加. 对照培养: 流加甘油 30 h, 开始流加甲醇至 96 h 发酵结束. 双碳源交替刺激法分别在 20, 42, 68 h 流加甘油; 在 30, 46, 71 h 流加甲醇, 至 96 h 结束. 过程中每 4 h 取样离心, 留上清液测酶活力. 发酵系统由 WSP-B-10L-1 型微生物培养器及其控制器组成, 其主体结构是容积为 5 L 的不锈钢罐体, 装液量 3 L, 接种量为 200 ml, 采用插入式直接传动搅拌, 双层六叶轮搅拌桨, 转速控制在 900 r/min, 温度为 28°C, pH 为 6.8, 通气量为 5 ml/min.

研究细胞内 AOX 酶与目的蛋白对应关系的发酵罐培养: 具体操作条件同上. 分别在 19, 97 h 流加甘油, 在 57, 115 h 流加甲醇, 130 h 结束. 过程中每 4 h 取样, 用发酵液测 AOX 酶活力, 样品离心后留上清液测尿激酶原活力.

2.3 分析方法

将发酵液以 4000 r/min 离心 10 min, 留上清液用溶酶圈法测 Pro-UK 活性^[10]; 浊度法测菌体浓度; 溶氧法测细胞内 AOX 酶活性, 酶活力 A 定义为在特定条件下、单位时间内 AOX 酶催化 DO 的变化量: $A=Q_{O_2, \max}=\Delta[DO]/t$; 单位菌体浓度的酶活力为酶比活力 S, $S=A/OD_{600}=Q_{O_2, \max}^{[11]}$.

3 结果与讨论

3.1 基本条件的确定

pH 对生长阶段和酶比活力的影响见图 1, 表明在 pH=5.6 时生长阶段菌体的生长状况最好, 高 pH 对 *Pichia pastoris* 酵母的生长和表达都是很不利的. pH 在 6.0 附近时, 酶的比活力最高. 所以在实验中表达阶段取 pH=6.

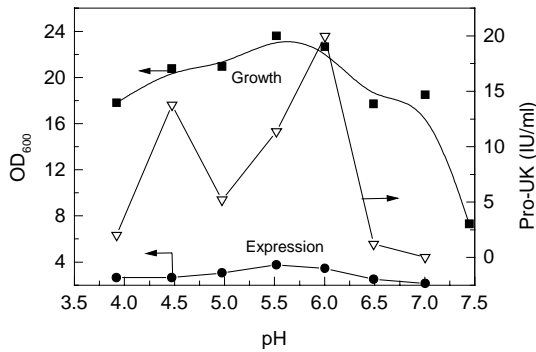


图 1 pH 对菌体浓度和酶比活性的影响

Fig.1 The influence of pH on bacteria concentration and specific activities of Pro-UK

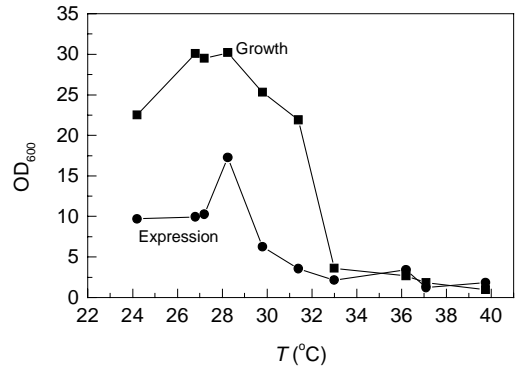


图 2 温度对菌体浓度的影响

Fig.2 The influence of temperature on bacteria concentration

温度对菌体浓度的影响见图 2, 可以看出, 发酵温度控制在 28°C 左右时对菌的生长最为有利. 在温度升高到 33°C 时, 菌体浓度接近于 0. 发酵温度控制在 28°C 左右时对表达阶段菌的生长也是最有利的, 这与对生长阶段的研究结果是一致的.

3.2 摇瓶发酵对比培养实验结果

双碳源交替刺激法在摇瓶中培养, 得到最终酶活力为 32.5 IU/ml 的发酵液, 比通常方法摇瓶培养(对照)提高了 114%, 证明双碳源交替刺激法有效.

3.3 细胞内 AOX 酶与目的蛋白的对应关系

由图 3 可以看出, 采用双碳源交替刺激法可以使细胞内的 AOX 酶量产生周期性变化, 而实验表明目的产物 Pro-UK 也随之变化. 细胞在碳源为甘油和甲醇的周期性变化过程中, 经历了生长和表达的周期性变化, 目的蛋白不断生成, 这就证明了胞内 AOX 酶活力的变化和目的产物表达量的变化存在对应关系, 双碳源交替刺激法不仅能使目的蛋白产量显著提高, 而且提供了一种调控胞内 AOX 酶量变化使目的蛋白不断生成的新思路. 在发酵过程中生物量也有所增加, 但不如产物增加程度大, 如图 4 所示. 将图 3 中 2 个表达阶段的相关数据处理后得到 AOX 酶活力与目的产物 Pro-UK 酶活力的对应关系, 如图 5 所示. 结果表明, 第 2 次表达阶段中的斜率较小, 但仍然符合随 AOX 酶活力的增加目的蛋白 Pro-UK 酶活力也增加的规律.

3.4 发酵罐实验结果

发酵罐实验结果见图 6, 可以看出, 在其它实验条件完全相同的情况下, 采用双碳源交替刺激法比通常方法可以明显提高 Pro-UK 的表达水平, 通常方法最高酶活性为 11000 IU/ml, 而采用双碳源交替刺激方法最高酶活力可达到 17220 IU/ml, 酶活力显著提高, 有利于增加目的产物浓度.

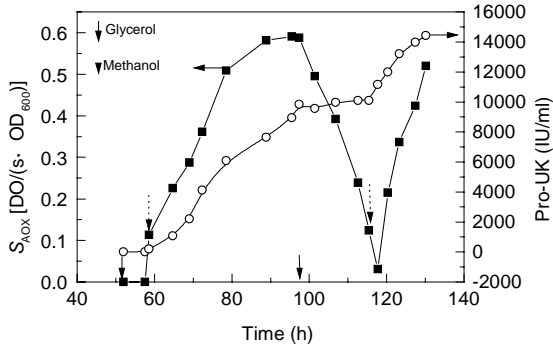


图 3 AOX 酶与 Pro-UK 酶活时间变化曲线
Fig.3 The enzyme activities of AOX and Pro-UK in fermentation process

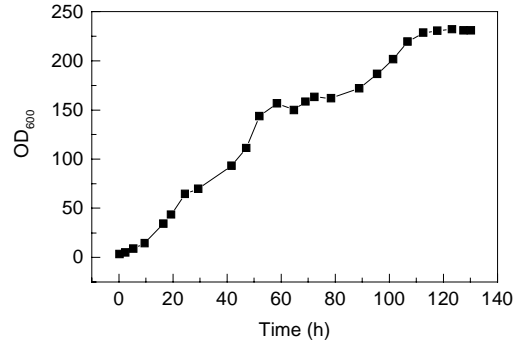


图 4 生长曲线
Fig.4 The biomass of *Pichia pastoris* in fermentation process

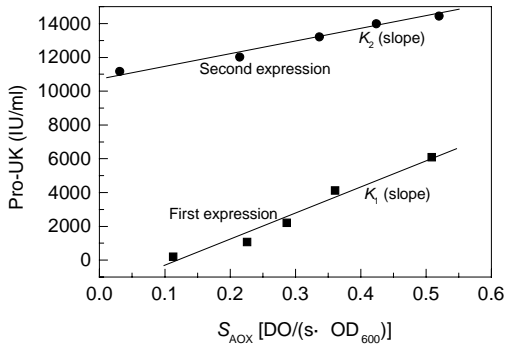


图 5 AOX 酶与 Pro-UK 酶活力对应关系
Fig.5 The relation between AOX and Pro-UK in fermentation process

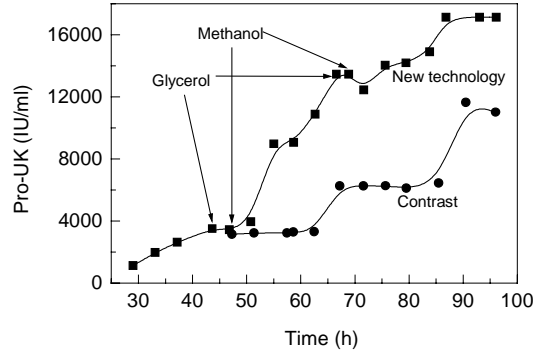


图 6 发酵罐对比实验结果
Fig.6 The contrast of tank fermentation results

4 结论

提出甲醇、甘油双碳源交替流加的新工艺, 生长阶段 pH 控制在 5.6, 表达阶段 pH 控制在 6, 生长和表达阶段发酵温度 28°C, 得到最终酶活力为 32.5 IU/ml 的发酵液, 比通常方法摇瓶培养(对照)提高了 114%, 证明双碳源交替刺激法有效。采用双碳源交替刺激法比通常方法可以明显提高 Pro-UK 的表达水平, 通常方法最高酶活力为 11000 IU/ml, 而采用双碳源交替刺激方法最高酶活力可达到 17220 IU/ml, 酶活力显著提高, 有利于增加目的产物浓度。

参考文献:

- [1] Pannell R, Gurewich V. Pro-urokinase: A Study of Its Stability in Plasma and of a Mechanism for Its Selective Fibrinolytic Effect [J]. *Blood*, 1986, 67: 1215-1221.
- [2] Gurewich V, Pannell R, Louie S, et al. Effective and Fibrin-specific Clot Lysis by a Zymogene Precursor Form of Urokinase, a Study in Vitro and in two Animal Species [J]. *J. Clin. Invest.*, 1984, 73: 1731-1738.
- [3] Robbins K C, Tanaka Y. Covalent Molecular Weight-92000 Hybrid Plasminogen Activator Derived from Human Plasmin Amino-terminal and Urokinase Carboxyl-terminal Domains [J]. *Biochemistry*, 1986, 25: 3603-3611.
- [4] 孙洪亮, 常韶华, 李佐虎. 昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达尿激酶原 [J]. *生物工程学报*, 1999, 15(3): 373-377.
- [5] Tetley L, Turner C M R, Barry J D. Onset of Expression of the Variant Surface Glycoproteins of Trypanosome Brunei in the Tsetse Fly Studied Using Immunoelectron Microscopy [J]. *J. Cell Sci.*, 1987, 87: 146-183.

- [6] 彭贵洪, 马忠, 薛宇鸣, 等. T7 启动子作用下人尿激酶原 cDNA 在大肠杆菌中的高效表达及分离纯化 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(4): 362–367.
- [7] Sreekrishna K, Potenz R. High-level Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* [J]. Biochemistry, 1989, 28: 4117–4125.
- [8] Digan M E, Lair S V, Brierley R A. Continuous Production of a Novel Lysozyme Via Secretion from the Yeast, *Pichia pastoris* [J]. Bio/Technology, 1989, 7: 160–164.
- [9] Clare J J, Romanos M A, Rayment F B. Production of Mouse Epidermal Growth Factor in Yeast: High-level Secretion Using *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Gene Copies [J]. Gene, 1991, 105: 205–212.
- [10] 韩素文, 俞伟源, 李秀珍, 等. 培养细胞分泌的血纤维蛋白溶酶原激活物的研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 1987, 48(2): 101–107.
- [11] 顾小勇, 李强, 曹竹安. 毕赤酵母基因工程菌胞内 AOX 酶的检测方法 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 474–477.

High Expression of Human Pro-urokinase Gene in *Pichia pastoris* Through Feeding Two Carbon Sources Alternatively

MA Shan-kang, LI Qiang, GU Xiao-yong

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Expression of human Pro-urokinase gene in *Pichia pastoris* and the influence of main variables on the production and expression of *Pichia pastoris* were investigated. pH in the growth phase was 5.6, pH in the expression phase was 6.0, and the temperature was always 28°C. It is found that there exists clear corresponding between the AOX and Pro-UK production in the fermentation process, and a new procedure by feeding methanol and glycerol alternatively was proved to be effective in improving the enzyme activity of Pro-UK in the fermentation broth.

Key words: *Pichia pastoris*; fermentation; Pro-urokinase; AOX