

# 重组人干扰素 $\omega$ 在对数生长期毕赤酵母中的高效表达特性研究

潘红春<sup>1,2</sup>, 刘 红<sup>2</sup>, 王伯初<sup>1\*</sup>, 陈真文<sup>2</sup>, 郑小峰<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 重庆大学生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室 重庆 400044)

(<sup>2</sup> 太极集团 西南药业股份有限公司 重庆 400038)

**摘 要** :用不同比生长速率  $\mu$  的毕赤酵母探讨其表达外源重组蛋白的差异性,通过起始 pH 值、甲醇诱导浓度和周期、菌体浓度、装液量等实验,优化具有较高  $\mu$  的对数生长期毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  的摇瓶条件。结果表明,  $\mu$  对毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  有显著影响。 $\mu$  为 0.1612h<sup>-1</sup> 的毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  最高为 558mg/L,较  $\mu$  为 0.1321、0.0505 和 0.0052h<sup>-1</sup> 的毕赤酵母分别提高 50%、68% 和 99%。对数生长期的毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  的最适摇瓶表达条件为: 250mL 摇瓶装入 30mL BMMY 控制菌体浓度达到 200~300g/L(WCW),起始 pH 值自然,每 24h 添加甲醇 15g/L 一次,诱导表达周期为 4d。通过表达条件的优化, rhIFN $\omega$  的表达量达到 1070mg/L,较优化前提高 149%。

**关键词** :毕赤酵母;比生长速率;对数生长期;重组人干扰素  $\omega$ ;表达条件

中图分类号: TQ929.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0418-04

甲醇营养型毕赤酵母(*Methylotrophic Pichia pastoris*)已发展成为能够表达多种外源蛋白的卓越表达系统,迄今为止,已有 400 多种外源蛋白在该体系中成功表达<sup>[1-3]</sup>。毕赤酵母表达外源重组蛋白时的表达量高低差别很大,高可达 12g/L<sup>[4]</sup>,最低仅有 1mg/L<sup>[5]</sup>,这主要取决于外源基因的性质,但通过基因的改造和发酵表达条件的研究,在最适条件下可以大幅度提高表达量。毕赤酵母表达干扰素  $\omega$  的水平差别也较大,Rodriguez 等<sup>[6]</sup>在毕赤酵母中分泌表达重组牛干扰素  $\omega$ 1 可达 400mg/L,而齐连权等<sup>[7]</sup>在毕赤酵母中分泌表达重组人干扰素  $\omega$  则只有 18mg/L 左右。

影响毕赤酵母表达外源蛋白的环境因素很多,如溶解氧<sup>[8-10]</sup>、pH 值、培养基组成、甲醇浓度和诱导时间<sup>[11-13]</sup>、菌体密度等因素对外源蛋白的表达均有很大影响。Leowen 等<sup>[14]</sup>在研究鱼抗冻蛋白过程中发现,在生长阶段毕赤酵母维持细胞较高的比生长速率  $\mu$ ,有利于获得外源基因的高表达,但未进行更细致的研究。本研究在优化毕赤酵母表达重组人干扰素  $\omega$ (rhIFN $\omega$ )的发酵条件时发现,用处于不同生长阶段即比生长速率不同的细胞进行实验, rhIFN $\omega$  的表达量差别非常大。比生长速率越高,表达 rhIFN $\omega$  越多,处于对数生长期的细胞有利于获得高表达。这表明比生长速率  $\mu$  对毕赤酵母表达外源蛋白也有极

大影响,且未见相关报道。为此,我们针对对数生长期毕赤酵母高效表达 rhIFN $\omega$  进行了详细的摇瓶发酵特性研究,以期获得优化的摇瓶表达条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** :毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 菌株 w1 遗传表型 aox<sup>+</sup> his<sup>+</sup>,醇氧化酶启动子 P<sub>aox1</sub> 载体 pMEX9K,蛋白信号肽序列为酿酒酵母的  $\alpha$  杂交因子 AMF,外源基因为人干扰素  $\omega$  的 cDNA,载体呈线性整合在染色体上。该菌株由军事医学科学院微生物流行病研究所构建<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器** :5L 全自动发酵罐,德国 B. Braun Biotech 公司;摇瓶震荡培养器,哈尔滨东联仪器厂;酵母提取物,英国 Oxoid 公司;水解酪蛋白,日本制药株式会社;其它试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基** :YPD 平板固体培养基、BMGY 摇瓶和发酵罐生长培养基以及 BMMY 摇瓶诱导表达培养基配方均参照文献<sup>[15]</sup>。

### 1.2 菌体培养和 rhIFN $\omega$ 的诱导表达

**1.2.1 菌体培养** :先将保藏菌株划线于 YPD 平板培养基上,28~30℃ 恒温培养 24~32h,得到单菌落;再从 YPD 平板培养基上挑出单菌落,接入 250mL 三角瓶装的 50mL BMGY 培养基中,于 200r/min 28~

基金项目:重庆市科技攻关项目(2003-7682)

\* 通讯作者。Tel: 86-23-65112840; Fax: 86-23-65111633; E-mail: wangbc2000@126.com

作者简介:潘红春(1966-),女,重庆市巫山县人,高级工程师,博士研究生,从事生物药物的研究开发。E-mail: jhphch@126.com

其他作者:杨红涛,肖中元

收稿日期:2005-07-04 接受日期:2005-07-28 修回日期:2005-08-15

30℃振荡培养 24h,作为摇瓶种子;最后,以 10%(V/V)摇瓶种子接入 5L 发酵罐的 BMGY 培养基中,28~30℃进行搅拌培养,当湿菌体浓度达到 120g/L 左右(即菌体处于对数生长中后期)时,4℃离心收集菌体,作为摇瓶诱导试验菌体。

**1.2.2 rhIFN $\omega$  的诱导表达:**按各组试验的需要,称取经发酵罐培养的对数生长期菌体,并悬浮于适量 BMMY 培养基中,28~30℃诱导表达 72~120h,每 24h 添加甲醇一次。每个实验做 3 个摇瓶。

### 1.3 rhIFN $\omega$ 表达条件的优化

为实现 rhIFN $\omega$  在基因工程毕赤酵母中的高水平表达,对对数生长期毕赤酵母的摇瓶表达条件进行了优化,包括起始 pH 值、甲醇浓度、甲醇诱导时间、起始菌体浓度、装液量等多种参数。

### 1.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

毕赤酵母表达的 rhIFN $\omega$  含有一个 N-糖基化寡糖链,分子量约为 22.16kDa,采用 SDS-PAGE 能有效地将其与杂蛋白分开,电泳结果经计算机扫描,根据电泳条带染色强度进行定量分析<sup>[15]</sup>。

### 1.5 菌体生长量的测定

采用湿重法和干重法测定毕赤酵母生长量。取 3 份 5mL 发酵液置于离心管中 5000r/min 离心 5min,弃上清液,称重离心菌体,计算菌体湿重(WCW, wet cell weight,单位为 g/L)。将离心菌体置于 108℃烘至恒重,称重菌体,计算菌体干重(DCW, dry cell weight,单位为 g/L)。

## 2 结果

### 2.1 不同比生长速率 $\mu$ 细胞对 rhIFN $\omega$ 表达的影响

用 5L 全自动发酵罐,按典型方式培养毕赤酵母,其中 0~28h 为甘油碳源的生长阶段,28~36h 为甲醇诱导阶段,每 4h 取样测定菌体浓度,分别在 12、16、24 和 36h 取菌体离心,再悬浮于 BMMY 培养基中进行 rhIFN $\omega$  的诱导表达。图 1 为毕赤酵母的对数生长曲线和比生长速率  $\mu$  随时间的变化曲线。箭头所示分别为 12、16、24 和 36h 时毕赤酵母的比生长速率 0.1612、0.1321、0.0505 和 0.0052h<sup>-1</sup>,可以看出 12 和 16h 正处于对数生长中后期,24h 处于减速期,36h 处于静止期。

用上述 4 种比生长速率  $\mu$  的细胞进行诱导表达的结果表明,比生长速率  $\mu$  为 0.1612h<sup>-1</sup> 的毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  最高为 558mg/L,而比生长速率为 0.0052h<sup>-1</sup> 的毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  最低为 6mg/L,随着比生长速率的降低, rhIFN $\omega$  的表达量大幅度下

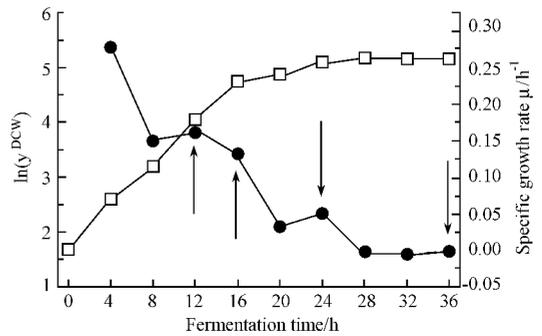


图 1 在分批发酵过程中,基因工程 *P. pastoris* 的对数生长曲线和比生长速率  $\mu$  变化曲线

Fig.1 Logarithm growth curve ( $\square$ ) and the time curves of  $\mu$  ( $\bullet$ ) during recombinant *P. pastoris* batch fermentation.

降,依次只有前者的 50%、32% 和 1%。

实验结果表明,处于不同比生长速率  $\mu$  的毕赤酵母,表达 rhIFN $\omega$  的能力有很大差别。要获得 rhIFN $\omega$  的高表达,必须保持毕赤酵母良好的生长状态,即具有高的比生长速率  $\mu$ 。该结论与 Leowen 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。由于对数生长期的毕赤酵母具有 rhIFN $\omega$  高表达的能力,为此,作者以下实验均是以发酵罐培养、处于对数生长期的毕赤酵母进行摇瓶表达特性研究,获得优化的摇瓶表达条件。

### 2.2 起始 pH 对 rhIFN $\omega$ 表达的影响

用不同 pH 值的磷酸缓冲液配制 BMMY 诱导培养基,使其起始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,控制菌体浓度 200g/L(WCW),装液量 30mL,甲醇浓度 15g/L,每 24h 添加一次甲醇(共 3d)进行实验,其结果见图 2。rhIFN $\omega$  表达量随起始 pH 值的升高呈逐渐增加,在起始 pH 值 7.0 时可获得最高表达为 430mg/L;随着起始 pH 值的继续升高, rhIFN $\omega$  的表达稍有下降,起始 pH 值高达 8.0~9.0 时也能维持较高的 rhIFN $\omega$  表达量。结果表明,对数生长期毕赤酵母摇瓶表达 rhIFN $\omega$  的最适起始 pH 值为 6.5~7.5。通过测定, BMGY 培养基用蒸馏水配制灭菌后,其起始 pH 值为 6.5 左右,因此,下面的实验中培养基的起始 pH 值自然。

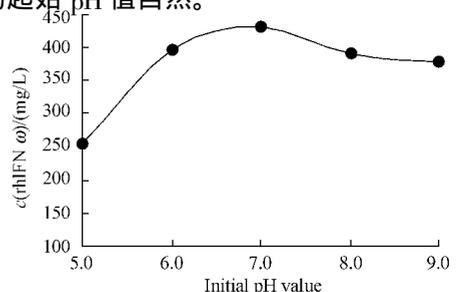


图 2 起始 pH 对 rhIFN $\omega$  表达的影响

Fig.2 Effect of initial pH value on rhIFN $\omega$  expression.

### 2.3 甲醇诱导浓度对 rhIFN $\omega$ 表达的影响

甲醇是甲醇营养型毕赤酵母表达外源蛋白诱导剂,其浓度对外源目标蛋白的表达影响很大。按摇瓶诱导培养方式,装液量 30mL,菌体浓度 200g/L (WCW),起始 pH 值自然,每 24h 添加一次甲醇(共 3d)控制每次添加甲醇量分别为 10、15、20 和 25g/L 进行实验,结果见图 3(A)。甲醇诱导浓度在 10~25g/L 浓度范围内对毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  影响不是非常显著,15g/L 时相对较高为 512mg/L。

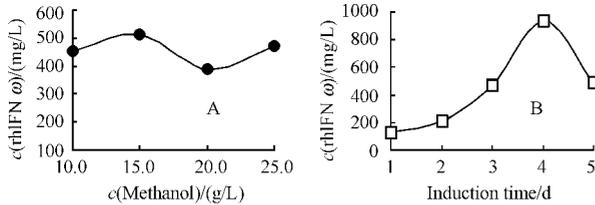


图3 甲醇诱导浓度(A)和甲醇诱导周期(B)对 rhIFN $\omega$  表达的影响

Fig.3 Effect of methanol amount (A) and the induced period of methanol (B) on rhIFN $\omega$  expression.

### 2.4 甲醇诱导周期对 rhIFN $\omega$ 表达的影响

控制菌体浓度 200g/L (WCW),装液量 30mL,起始 pH 值自然,按每 24h 添加甲醇 15g/L 一次,共添加甲醇诱导 5 次(120h)进行甲醇诱导周期对对数生长期毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  影响的实验,结果见图 3(B)。甲醇诱导开始 1~2d, rhIFN $\omega$  的表达量增加较缓慢,3~4d 增加迅速;第 4 天达到表达高峰为 933mg/L;诱导延长到第 5d, rhIFN $\omega$  表达量迅速降低。因此,对数生长期毕赤酵母摇瓶表达 rhIFN $\omega$  的最适诱导周期为 4d。

### 2.5 菌体浓度对 rhIFN $\omega$ 表达的影响

用 BMMY 悬浮从 BGMY 培养得到的菌体,使其菌体浓度达到 150~350g/L (WCW),控制装液量 30mL,起始 pH 值自然,按每 24h 添加甲醇 15g/L 一次,诱导周期为 4d 进行实验,结果见图 4-A。菌体浓度对对数生长期毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  影响的不显著, rhIFN $\omega$  表达量维持在 800~900mg/L 范围内,最高可达 929mg/L。

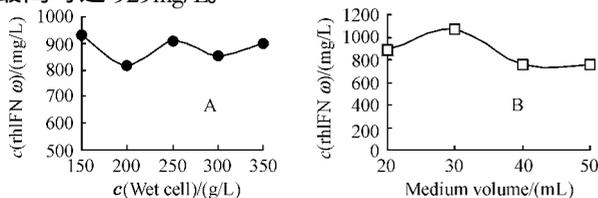


图4 菌体浓度(A)和装液量(B)对 rhIFN $\omega$  表达的影响

Fig.4 Effect of cell concentration (A) and medium volume (B) on rhIFN $\omega$  expression.

### 2.6 装液量对 rhIFN $\omega$ 表达的影响

在 250mL 三角瓶中装入 30、40、50 和 100mL BMMY,控制菌体浓度达到 200g/L (WCW),起始 pH 值自然,按每 24h 添加甲醇 15g/L 一次,诱导周期为 4d 进行实验,结果见图 4-B。对数生长期毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  会受到装液量的一定影响,呈现先增加后降低再平稳的变化趋势,但波动不大。30mL 装液量时 rhIFN $\omega$  获得最高表达为 1070mg/L,较 20mL 和 40mL 装液量时的 rhIFN $\omega$  表达(889mg/L 和 755mg/L)高 20.4% 和 41.7%。

综上所述,对数生长期毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  的摇瓶表达优化条件为:在 250mL 三角瓶中装入 30mL BMMY,控制菌体浓度达到 200~300g/L (WCW),起始 pH 值自然,按每 24h 添加甲醇 15g/L 一次,诱导表达周期为 4d。在此优化条件下, rhIFN $\omega$  的表达较优化前提高 149%。

## 3 讨论

本实验较细致地对具有不同比生长速率、处于不同生长阶段的毕赤酵母表达外源重组蛋白进行了研究,认为不同比生长速率  $\mu$  的毕赤酵母表达外源重组蛋白有较大影响。Leowen 等<sup>[14]</sup>也发现较高的比生长速率  $\mu$  有利于毕赤酵母获得外源基因的高表达。周祥山等<sup>[16]</sup>利用甘油-甲醇混合流加工工艺使毕赤酵母表达水蛭素的产量提高 26.3%。这是由于甘油的异化供能,增加了能量供应,改善了毕赤酵母诱导表达时的比生长速率  $\mu$ ,提高细胞活力,从而提高表达外源目标蛋白的能力。提示:在毕赤酵母表达外源重组蛋白的过程控制中,应充分注意比生长速率  $\mu$  对目标蛋白表达的影响。

胡光星等<sup>[17]</sup>在研究重组毕赤酵母表达系统发酵,从利用甘油为碳源生长到利用甲醇为碳源表达外源蛋白的表达过渡阶段碳源代谢途径关键酶酶活性变化时发现,甲醛脱氢酶和 6-P-葡萄糖脱氢酶分别增加了 6.1 和 2.5 倍,而丙酮酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶分别下降为原酶活的 29.4% 及 16.4%。其中酶活性降低的部分酶或许是影响外源重组蛋白高表达的关键因素,有关比生长速率较高的对数生长期毕赤酵母内的酶系变化值得深入研究。

我们在比较摇瓶培养 48h 的毕赤酵母和发酵罐培养至对数生长期毕赤酵母表达 rhIFN $\omega$  时发现,不同比生长速率  $\mu$  细胞在表达外源重组蛋白时对环境的敏感性有很大差别。结合文献<sup>[15]</sup>分析可知,比生长速率较高的对数生长期毕赤酵母受甲醇诱导浓度、细胞密度和装液量的影响不大,而比生长速率较低的摇瓶培养细胞则受这些因素影响较大,尤其受

菌体浓度和装液量的影响最为显著,而且前者(4d)较后者(3d)有更长的表达周期,在优化的表达条件下 rhIFN $\omega$  表达量前者较后者(最高 130mg/L)提高了 723%,也大大高于文献 [6] 和 [7] 报道的表达水平。分析表明,比生长速率较高的毕赤酵母在表达外源重组蛋白时对外界环境有更强的适应性,而比生长速率较低的毕赤酵母对环境更为敏感。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **24**: 45 - 66.

[ 2 ] Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, **18**(2): 119 - 138.

[ 3 ] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**(4): 249 - 270.

[ 4 ] 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. *Biotechnology*, 1991, **9**: 455 - 460.

[ 5 ] Nourizad N, Eln M, Gharizadeh B, et al. Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for production of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Protein Expr Purif*, 2003, **27**(2): 229 - 237.

[ 6 ] Rodriguez M, Martinez V, Alazo K, et al. The bovine IFN-omega 1 is biologically active and secreted at high levels in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 1998, **60**(1-2): 3 - 14.

[ 7 ] 齐连权,付玲,于长明,等. 人  $\omega$  干扰素在巴斯德毕赤酵母中的表达及纯化. *军事医学科学院院刊*, 2003, **27**(4): 268 - 270.

[ 8 ] Lim HK, Choi SJ, Kim KY, et al. Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**(4): 342 - 348.

[ 9 ] Oliveira R, Clemente JJ, Cunha AE, et al. Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant *Pichia pastoris* cultivation in conditions of oxygen transfer limitation. *J Biotechnol*, 2005, **116**(1): 35 - 50.

[ 10 ] Trentmann O, Khatri NK, Hoffmann F. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*, 2004, **20**(6): 1766 - 1775.

[ 11 ] Ramon R, Feliu JX, Cos O, et al. Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(18): 1447 - 1452.

[ 12 ] Trinh LB, Phue JN, Shiloach J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **82**(4): 438 - 444.

[ 13 ] Surribas A, Cos O, Montesinos JL, et al. On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(21): 1795 - 1800.

[ 14 ] Loewen M C, Liu X, Davies P L, et al. Biosynthetic production of type II. Fish anti-freeze protein fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**(4): 480 - 486.

[ 15 ] 刘红,潘红春,蔡绍哲,等. 发酵条件对毕赤酵母表达重组人干扰素  $\omega$  糖基化的影响. *生物工程学报*, 2005, **21**(1): 107 - 112.

[ 16 ] 周祥山,范卫民,张元兴. 不同甲醇流加策略对重组毕赤酵母高密度发酵生产水蛭素的影响. *生物工程学报*, 2002, **18**(3): 349 - 351.

[ 17 ] 胡光星,郭美锦,储炬,等. 重组 *Pichia* 酵母(*Mut*<sup>s</sup>) 发酵过渡阶段关键酶活分析. *华东理工大学学报*, 2004, **30**(4): 392 - 397.

## High-level expression behaviors of recombinant human interferon omega in logarithm phrase *Pichia pastoris*

PAN Hong-chun<sup>1,2</sup>, LIU Hong<sup>2</sup>, WANG Bo-chu<sup>1\*</sup>, CHEN Zheng-wen<sup>2</sup>, ZHEN Xiao-feng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Bioengineering, Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(<sup>2</sup> Southwest Pharmaceuticals Limited Company, Taiji Group, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Expression difference of heterologous recombinant protein in *Pichia pastoris* with different specific growth rate ( $\mu$ ) was observed. The expression conditions of recombinant human interferon omega (rhIFN $\omega$ ) in logarithm phrase *Pichia pastoris* with higher  $\mu$  were optimized by shake flask tests under various initial pH, methanol concentration, duration of the induction, cell density, and medium volume. The results showed that there were prominent influences of  $\mu$  on expression of rhIFN $\omega$ . The maximum yield of rhIFN $\omega$  in the *Pichia pastoris* with  $\mu$  of 0.1612h<sup>-1</sup> was 558mg/L. However, these in the *Pichia pastoris* with  $\mu$  of 0.1321, 0.0505 and 0.0052h<sup>-1</sup> were reduced by 50%, 68% and 99%, respectively. In 250mL shake flask, the optimal medium volume, cell density, initial pH, methanol concentration, frequency and duration of methanol induction were 30mL, 200 - 300g/L (WCW), natural, 15g/L, 1 time in every 24h and 4d, respectively. Under the optimal expression condition, the maximum yield of rhIFN $\omega$  in logarithm phrase *Pichia pastoris* was 1070mg/L which was increased by 149% more than that under the initial condition.

**Keywords**: *Pichia pastoris*; Specific growth rate ( $\mu$ ); Logarithm phrase; Recombinant human interferon omega (rhIFN $\omega$ ); Expression condition