

毕赤酵母发酵液的脱色和重组水蛭素的分离

周卫斌 周祥山 张元兴*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘 要 用毕赤酵母表达重组水蛭素的发酵液中含有大量色素和一些杂蛋白。本文对发酵上清的脱色和重组水蛭素的分离进行了探讨。鉴于水蛭素的稳定性, 用加热法预处理发酵上清取得了满意的效果。对离子交换、疏水层析、凝胶过滤、羟基磷灰石吸附层析以及它们的优化组合进行了研究, 结果表明, 阳离子交换层析、凝胶过滤和阴离子交换层析的组合对发酵上清的脱色和重组水蛭素的分离是有效的。

关键词 重组水蛭素, 脱色, 分离

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0683-05

水蛭素(Hirudin)是由 65 或 66 个氨基酸残基组成的酸性多肽, 相对分子量为 7kD 左右^[1], pI 为 4.0。天然水蛭素存在多种变体, 主要的 3 种(HV1、HV2、HV3)均含有一个结构紧密的 N 端疏水性核心区(含有三个二硫键)和一个空间无序但为抗凝活性所必需的 C 末端区^[2,3], 具有很好的物理、化学及生物学稳定性^[4]。水蛭素是最有效的凝血酶特异性抑制剂, 能有效预防和治疗弥散性血管内凝结、心血栓及脑血栓等疾病^[5]。

从医用水蛭中提取天然水蛭素满足不了临床需求, 利用大肠杆菌、酿酒酵母、汉逊酵母^[6-8]等宿主表达重组水蛭素已见报道, 但产量较低(< 0.5mg/mL)。用毕赤酵母作为宿主^[9]可大大提高重组水蛭素的产量(> 2mg/mL), 具有良好的应用前景。但毕赤酵母发酵生产重组水蛭素的过程中会产生大量色素和一些杂蛋白, 色素的存在严重影响下游的分离纯化, 因而, 脱色是毕赤酵母生产的重组水蛭素初步分离的主要任务。目前文献报道的脱色和分离方法一般采用 HPLC^[10], 不利于大规模生产。本文首先利用加热、离心对发酵上清进行预处理, 然后考察离子交换(XIE)、凝胶过滤(GF)、疏水层析(HIC)、羟基磷灰石(HA)等层析方法在重组水蛭素分离和脱色中的应用可行性, 通过对比实验和优化组合, 提出有效的初分离工艺, 为进一步分离纯化和规模化生产奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

凝血酶、纤维蛋白原购自 Sigma 公司, Acrylamide 购自 Canalab 公司, N,N'-Methylene Bisacrylamide 购自 Serva 公司。

发酵液来源: 在 5L 发酵罐中 30℃, pH3.0 下, 毕赤酵母以 5% 的甘油为碳源分批发酵, 20h 后甘油耗尽, 再流加甘油 5h, 然后流加甲醇诱导表达重组水蛭素(r-HV2-Lys⁴⁷)90h, 得发酵液。其中, 毕赤酵母菌种来自山东东阿阿胶集团。培养基配方见参考文献^[11]。

1.2 方法

水蛭素活性及比活测定^[1]: 取 5~20μL 样品(视水蛭素含量而定)与 200μL 0.5% (W/V) 的纤维蛋白原溶液(pH7.4)混匀, 每隔 1min 加入适量 40ATU/mL 的凝血酶, 直至出现凝固现象即为终点。水蛭素活性由其抑制凝血酶催化纤维蛋白原的能力决定。水蛭素与凝血酶按 1:1 的比例反应^[3]。比活性为水蛭素活性(ATU/mL)与总蛋白浓度(mg/mL)之比, 其中, 蛋白浓度采用 Lowry^[12]法测定。

样品预处理: 含约 2mg/mL 重组水蛭素的毕赤酵母发酵液, 经冷冻离心机离心(4℃, 9000g, 30min)除去细胞碎片, 得澄清上清液, 于 -70℃ 下冻存备用。

收稿日期: 2001-06-18, 修回日期: 2001-08-18。

* 通讯作者。 Tel: 86-21-64253065; Fax: 86-21-64253025; E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

离子交换层析: Q Sepharose F F, DEAE Sepharose F F, SP Sepharose F F, CM Sepharose F F (均购自 Pharmacia 公司) 分装于 8.5cm × 2.6cm 柱, 流动相 A 依次为 20mmol/L HAC-NaOH (pH5.0), 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 50mmol/L 柠檬酸-NaOH (pH3.0) 及 50mmol/L Gly-HCl (pH3.0)。流动相 B 为 1mol/L NaCl + 流动相 A。线性梯度或非线性梯度洗脱, 收集含水蛭素活性的峰, 测其抗凝活性。

疏水层析: Butyl Sepharose 4 F F (Pharmacia 公司) 装于 10cm × 2.6cm 柱, Phenyl (high sub) 为 HiPrep 16/10 预装柱 (Pharmacia 公司)。用加一定浓度硫酸铵 (前者为 3.5mol/L, 后者为 1.5mol/L) 的 50mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠 (pH3.0) 流动相 A 平衡。在上清中分别加入 3.5mol/L 和 1.5mol/L 的硫酸铵, 调 pH 至 3.0 后上柱, 10~20 倍柱体积 (CV) 的线性梯度洗脱, 收集活性峰。

羟基磷灰石吸附层析: 羟基磷灰石 (购自华美生物工程公司) 装于 1.0cm × 2.6cm 柱, 调整上清的 pH 至 6.8 后上样, 用 0.01~0.32mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 线性梯度洗脱, 收集活性峰。

凝胶过滤: Bio-Gel P-10 (购自 Bio-Rad 公司) 和 Sephadex G-25 (购自 Pharmacia 公司) 分装于 100cm × 2.6cm 柱, 用 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 平衡后上 10mL 上清, 洗脱, 收集活性峰。

反相 HPLC 层析: 用 15% 含 0.1% TFA 的乙腈-水溶液平衡 C₈ 反向柱 (Koromasil 5μm 200 × 4.6mm, 购自天津特纳科学仪器公司), 以 1mL/min 的流速, 在 15%~35% 乙腈浓度内线性梯度洗脱, 时间为 20min。

水蛭素纯度鉴定: 由电泳和反向 HPLC 相结合鉴定。电泳采用修正的 Laemmli system 方法^[13] 和银染法^[14]。

2 结 果

2.1 粗分级分离

利用水蛭素和一般蛋白质在热稳定性上的差别, 对发酵上清 (pH3.0) 在不同温度下处理不同时间, 然后离心去除部分已热变性的蛋白, 粗分级分离结果见表 1。由表可知, 发酵上清在 100℃ 下处理 10~20min 左右为最佳选择。

表 1 加热对发酵上清中水蛭素的回收率和比活性的影响

Table 1 The influence of heat treatment of fermentation broth on the recovery and specific activity of hirudin

T/℃	20	55	70	100	100	100	100
t/min	0	30	30	10	20	30	60
Activity/(10 ⁴ ATU/mL)	2.79	2.74	2.74	2.73	2.71	2.56	0.719
Protein conc./(mg/mL)	8.52	8.27	8.09	7.95	7.92	8.02	8.65
Recovery/%	100	99	98	98	97	94	26
Specific activity /(10 ³ ATU/mg)	3.28	3.31	3.39	3.44	3.43	3.19	0.831

2.2 层析分离

经粗分级分离处理后的上清用不同的层析方法处理, 观察收获的活性峰的色素残存情况, 测定活性峰的蛋白浓度和水蛭素的活性。结果如表 2 中所示, 表明凝胶过滤、疏水层析和阳离子交换层析的脱色效果较好, 而凝胶过滤、阴离子交换层析 (Q Sepharose F F) 和阳离子交换层析 (SP Sepharose F F) 在回收率上占优势。

根据表 2, 对以上几种层析方法进行优化组合实验, 考虑到总回收率、目的蛋白纯度和实际操作可行性, 可知阳离子交换层析 (SP Sepharose F F)、凝胶过滤 (G-25) 和阴离子交换层析 (Q Sepharose F F) 的组合为最佳选择, 结果见表 3, 阴离子交换层析洗脱

图如图 1 所示。

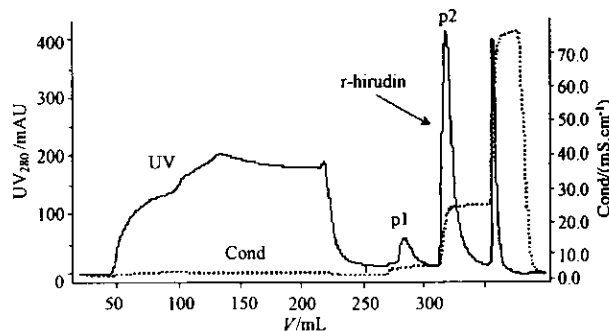


图 1 重组水蛭素的阴离子交换层析 (Q Sepharose F F) 图

Fig.1 Q Sepharose F F chromatography of r-hirudin

表 2 不同种层析方法对重组水蛭素脱色和分离的效果比较
Table 2 Comparison of recombinant hirudin decolorization and separation with various column

Isolation method	Chromatography medium	Chromatographies					
		Decolorization result ^a	Hirudin activity /(10^4 ATU/mL)	Protein concen. / (mg/mL)	Specific activity /(10^4 ATU/mg)	Recovery yield/ %	Purification fold
- - - -	Supernatants	+ + + + +	2.79	8.62	0.34	100	- - - -
AIE	Q Sepharose F F	+ +	2.96	2.01	1.48	93	4.5
AIE	DEAE Sepharose F F	+ + +	3.44	3.44	1.01	81	3.2
CIE	SP Sepharose F F	+	2.86	2.60	1.10	96	3.5
CIE	CM Sepharose F F	+	3.67	4.19	0.87	75	2.7
HIC	Butyl Sepharose 4 F F	+	0.00	- - - -	- - - -	0	- - - -
HIC	Phenyl (high sub)	+	3.24	2.93	1.12	85	3.4
GF	Bio-Gel P-10	-	2.75	5.73	0.48	100	1.5
GF	Sephadex G-25	-	2.81	4.02	0.70	98	2.2
HA	Hydroxyapatite	+ + + +	3.72	4.23	0.88	74	2.7

a: + to + + + + + indicates the heavy levels of color, - indicates colorlessness

表 3 重组水蛭素的组合分离过程
Table 3 Combined isolation procedures of recombinant hirudin

Step	Total protein /g	Total Hirudin activity /(10^6 ATU)	Total recovery /%	Specific activity /(10^4 ATU/mg)	Purification fold
Supernatants	2.42	6.75	100	0.279	- - - -
SP Sepharose F F	0.567	6.28	93.0	1.12	4.0
Sephadex G-25	0.563	6.21	92.1	1.12	1.0
Q Sepharose F F	0.430	5.66	83.7	1.32	1.2

2.3 纯度分析

经阳、阴离子交换层析组合后分离得到的重组水蛭素为无色液体,采用 20% 胶浓度的 SDS-PAGE, 银染后得单一条带,并可见蛋白分子量在 7kD 左右 (图 2)。

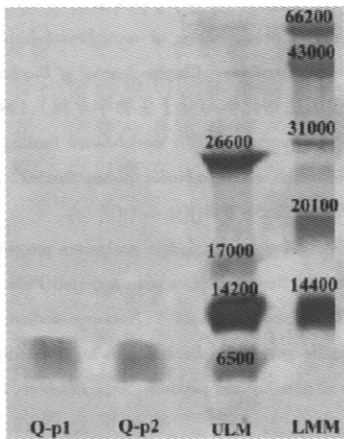


图 2 阴离子交换层析所得水蛭素的电泳图

Fig.2 The electrophoresis of r-hirudin isolated by anion exchange chromatography

-p1/p2: the peak 1/2 of Fig.1; ULM: Ultra-low molecular marker; LMM: Low molecular marker

阴离子交换层析所得活性峰 (p2, 图 1), 用 RP-HPLC 分析, 可知纯度大于 85% (图 3)。

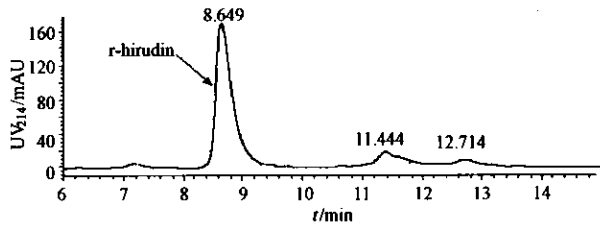


图 3 阴离子交换层析所得水蛭素的 RP-HPLC 图

Fig.3 The RP-HPLC of r-hirudin isolated by anion exchange chromatography

经测定, 活性峰 (p2) 的比活性为 12000ATU/mg 蛋白, C-末端的 5 个氨基酸序列为 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln, 与预期序列^[7]吻合。故可知所得峰为目的蛋白峰。

3 讨 论

人工合成的外源水蛭素基因在大肠杆菌、酿酒酵母等宿主中表达存在着不少问题, 如: 易形成包涵体, 表达产率不高及产生较多杂蛋白等。用毕赤酵母作为表达系统克服了上述不足, 但其在发酵过程中产生大量色素, 给下游分离纯化带来很大不便。

在前人所作的工作中^[9]未曾提及色素的去除。研究发现,管云红等^[10]提出的采用阳离子交换层析的方法并不能完全去除毕赤酵母发酵液中的色素。疏水层析虽然很好地去除色素,但因交换容量较小,或结合力太弱,或活性回收率较低等原因,使其应用受到限制。凝胶过滤也能很好地去除色素,但用于分级分离的介质受上样量的限制而不能应用于规模化生产,用于脱盐和交换缓冲液的凝胶过滤介质则不受此限。用阳离子交换层析(SP)一步可去除大部分色素和大大提高水蛭素比活性,同时浓缩样品。在其后采用凝胶过滤可在达到脱盐及交换缓冲液目的的同时进一步去除残余的色素,解决了脱色问题。凝胶过滤后的阴离子交换层析在不同盐浓度梯度下洗脱可进一步除去部分杂蛋白,一定程度上提高了目的蛋白的纯度。整体上而言,阳离子交换层析、凝胶过滤和阴离子交换层析的简单组合除对去除核酸等非蛋白类物质和大分子热源等有效(数据未显示)外,更可达到完全脱色和维持较高的总活性回收率及纯度的双重目的。和其它层析方法相比,该方案在活性回收率、速度和交换容量等方面占明显优势,更能满足规模化生产的需要。

加热实验中,在 100℃ 下作用 10~20min 的发酵液上清可在基本完全保持水蛭素活性的情况下,提高目的蛋白组分的比活性。尽管由于上清液中含有的大量成分复杂的色素在加热过程中产生的一些物质对蛋白浓度测定(Lowry 法)产生了一定干扰,但研究表明,发酵液中存在的其它蛋白质,尤其是能对水蛭素进行降解等作用的羧肽酶类,在加热过程中失活。因而,加热法预处理发酵上清对于分离和维持目的蛋白的稳定性是很有价值的。

用常规 Laemmli 系统进行 SDS-PAGE 得不到根据氨基酸组成计算所得的 6.95kD 左右的蛋白条带。对样品采取加碱、 β -巯基乙醇及延长热处理时间等措施,并采用修正的 Laemmli 系统进行电泳,结果表明,所测得的重组水蛭素的分子量为 7kD 左右。该电泳法可用于分析易形成多聚体的小分子多肽或热稳定性蛋白的分子量。

由阴离子交换层析所得到的两个峰(p1, p2, 图 1)均有抗凝活性,C-末端氨基酸序列分析表明,与用酿酒酵母作为载体发酵生产重组水蛭素一样,用毕赤酵母作为载体发酵生产重组水蛭素会在培养过程中产生能降解目的蛋白的羧肽酶^[15]。在发酵期间抑制羧肽酶对水蛭素的降解作用,或对原有表达系统进行基因改良,使之缺失表达该羧肽酶的基因,将

提高水蛭素的利用效率。

上述脱色和分离工艺已能在满足规模化生产需要的同时维持较高的总活性回收率和取得较高的纯度,经过后续的纯化工艺可望得到高纯度的重组水蛭素。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor. *Methods in Enzymology*, 1970, 19: 924 ~ 932
- [2] Fareed J, Callas D, Debra A. Antithrombin agent as anticoagulants and antithrombotics: implications in drug development. *Semin in Hematology*, 1999, 36(Suppl 1): 42 ~ 56
- [3] Chang J Y. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. *FEBS Lett*, 1983, 164: 307 ~ 313
- [4] Gietz U, Alder R, Langguth P. Chemical degradation kinetics of recombinant hirudin(HV1) in aqueous solution: effect of pH. *Pharm Res*, 1998, 15: 1456 ~ 1462
- [5] Rydel T J, Ravichandran K G, Tulinsky A. The structure of a complex of recombinant hirudin and alpha-thrombin. *Science*, 1990, 249: 277 ~ 280
- [6] Harvey R, Degryse E, Stefani L. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the blood-sucking leech. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 1084 ~ 1088
- [7] Bellon N R, Carvallo D, Acker M. Purification and biochemical characterization of recombinant hirudin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 1989, 28: 2941 ~ 2949
- [8] Weydemann U, Keup P, Piontek M. High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* authentic processing of three different prepro-hirudins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 44: 377 ~ 385
- [9] Rosenfeld S A, Nadeau D, Tirado J. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Express Purific*, 1996, 8: 476 ~ 482
- [10] ZAN Y H(管云红), SUN M S(孙茂盛), LI Z H(李智华) et al. Purification and decolorization of recombinant hirudin produced by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Chinese Journal of Biochem and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 1999, 15: 779 ~ 781
- [11] d'Anjou M C, Daugulis A J. A model-based feeding strategy for fed-batch fermentation of recombinant *pichia pastoris*. *Biotechnol Techniques*, 1997, 11: 865 ~ 868
- [12] Copeland R A. Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols. New York: Chapman and Hall Press, 1994
- [13] Okajima T, Tanabe T, Ysuda T. Non-urea sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with high-molarity buffers for the separation of proteins and peptides. *Anal Biochem*, 1993, 211: 293 ~ 300
- [14] Swain M, Ross N. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1995, 16: 948 ~ 951
- [15] Heim J, Takabayashi K, Meyhack B. C-terminal proteolytic degradation of recombinant desulfato-hirudin and its mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 1994, 226: 341 ~ 353

Decolorization and Isolation of Recombinant Hirudin Expressed in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*

ZHOU Wei-Bin ZHOU Xiang-Shan ZHANG Yuan-Xing*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract Schemes for decolorization of broth and isolation of recombinant hirudin from the fermentation supernatants of recombinant yeast *Pichia pastoris* were developed to remove a great deal of non-desired proteins and coloring matters. Based on the stability of hirudin, heating is desirable to pre-treat the fermentation broth. Several different column chromatographies, including anion-exchange, cation-exchange, hydroxyapatite adsorption, hydrophobic interaction, gel filtration and their combination were investigated on the efficiencies of decolorization and isolation. Among these methods, the combination of cation-exchange and anion-exchange was found to be a success in both decolorization and isolation of hirudin.

Key words recombinant hirudin, decolorization, isolation

Received: June 18, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-21-64253065; Fax: 86-21-64253025; E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

征 稿 简 则

《生物工程学报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,国内外公开发行的学术期刊。主要报道生物工程研究的新进展、新成果、新技术。刊登的内容包括:基因工程、细胞工程、酶工程和生化工程等方面的研究论文,简报,有关的会讯及少量介绍国内外生物技术最新动态的综述性文章。

1. 来稿须一式两份。是否涉及保密,署名是否无误,务请出示第一作者所在单位的证明信,并随寄 100 元审稿费。有 E-mail 地址的作者,请在来稿时注明,便于我们同您联系。

2. 本刊只接受未公开发表的文章,请勿一稿两投。

3. 来稿要论点明确,数据可靠,简明通顺,突出重点。稿件应以大于 5 号的字体打印在 A4 纸上,注意行距不要太密。全文(含图表)一般不超过 6 000 字。具体要求如下:

题 目:简明确切,不用副题,一般不超过 25 个字。中英文的题目应一致。

作 者:文章的署名最好不要超过 5 人,其他参加者可注于篇首页脚注处。

摘 要:应以第三人称简明概括出本文的目的、方法、结果和结论。这部分内容应能独立成章,在 200~400 字之间。英文摘要可适当详尽些。

关键词:选取表示全文主要内容的单词或词组 3~10 个,一般应取自《汉语主题词表》和各专业主题词表。

引 言:不列标题,约 250 字。

文 献:参考文献按文内引用的先后排序,具体格式参见近期本刊。未公开发表的资料请勿引用。

4. 文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。照片应黑白分明,反差适中。小图的宽度应小于 8cm (占半栏);大图的宽度应小于 17cm (通栏)。图上、表内文字及图表注释一律用英文,图表题应中英对照。

5. 科技名词与术语的译法,请采用全国自然科学名词审定委员会公布的规范名词。

6. 获得基金资助的论文必须在脚注内写上基金来源及基金号。

(下转 p. 702)

7. 凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文,请先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL(欧洲)或 GenBank(美国)或 DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投来。计算机尚未联网的作者,可通过我所信息中心代为申请,编辑部备有表格请函索。

8. 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知,对不录用的稿件,一般在收到来稿 3 个月之内致函说明原因。打印及复印稿不退,请自留底稿及原图,特殊情况请在来稿时注明。

9. 凡在本刊通过审稿,同意刊出的文章,所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议,敬请事先声明。

10. 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工,但涉及内容的删改,将请作者过目同意。

11. 文责自负。作者必须保证论文的真实性,因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果,由作者自负。

12. 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准,对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表,请在投稿的同时提出书面报告,说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性,经过我刊的严格审查并通过后,可予提前刊出。

13. 论文一经刊出,将根据版面收取一定的发表费,并酌付稿酬,寄送样刊及单行本。

来稿请寄:(100080)北京市中关村 中国科学院微生物研究所《生物工程学报》编辑部收

电 话:(010)62554303

E-mail:cjb@sun.im.ac.cn

<http://www.im.ac.cn/cjb>