

重组人血清白蛋白在 *Pichia pastoris* 中分泌表达影响因素的研究

杨 晟¹ 黄 鹤¹ 章如安¹ 钱美琴² 余有浩³ 钱雪明¹ 袁中一^{1*}

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

²(上海第一生化药业公司 上海 200080)

³(上海大学生物工程系 上海 200180)

摘 要 为获得高产稳产重组人血清白蛋白的 *Pichia pastoris* 细胞株用于高密度发酵, 构建了多种分泌表达载体, 在 *Pichia pastoris* 中作表达, 研究表达载体构建等因素对表达量的影响。发现采用酿酒酵母 α 性成熟因子前导肽比人血清白蛋白天然前导肽作为分泌信号肽的表达量要高 10% 左右。而载体整合方式、整合拷贝数、5' 非翻译区的改造和甲醇利用表型等对表达量无规律性影响。筛选到的高表达株经高密度发酵, 细胞湿重达 460 g/L, 发酵液上清的人血清白蛋白含量为 1.0 g/L。

关键词 重组人血清白蛋白, *Pichia pastoris*, α 性成熟因子前导肽, 高密度发酵

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0675-04

人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)在体内起着维持血液渗透压、运输营养和保护其他重要生物物质作用。临床医疗中用于手术输血和危重病人补液, 治疗烧伤休克、发烧、水肿, 低蛋白血症(Hypoproteinemia)和红细胞过多症(Erythroblastosis)等, 是重要药物^[1]。

市售 HSA 均来自人血清抽提。然而人血来源有限, 加上艾滋病及肝炎的蔓延, 更威胁人血制品的安全性。显然, 通过基因工程手段, 改变 HSA 的传统生产途径, 以重组细胞生产 HSA 已十分必要了。

目前, HSA 在 *Pichia pastoris* 中表达工作领先的是 Research Corp. Tech Inc.(RCTech)和 Green Cross Inc./Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd. 虽然, RCTech 取得了 3.39 g/L 的单罐表达水平纪录^[2], 但是在 HSA 的大规模生产应用上, Green Cross 走在了前头。

Green Cross 公司生产的重组 HSA 已通过 III 期临床试验, 并于 1997 年 10 月开始申请将重组 HSA 用于白血病治疗的生产许可(GB-1057)。如今, 其母公司 Yoshitomi 公司正在日本的 Hokkaido 兴建大规模的重组 HSA 生产设施, 计划在 2000 年年中投产^[3], 并已准备打入中国市场。由于重组 HSA 的生产技术事关巨大的商业利益, 有很多关键技术和数据都没有公开, 需要我们自己探索以生产

有自主知识产权的重组 HSA 产品。

我们构建了重组人血清白蛋白多种表达载体, 在 *Pichia pastoris* 中作了小规模表达试验和发酵研究。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 XL1-Blue, TG1 由本实验室保存。克隆质粒为 pUC18 和 pBluescript SK(+), *Pichia pastoris* GS115, KM71 表达宿主细胞, *Pichia pastoris* 整合表达质粒 pPIC3.5K, pPIC9, pPIC9K 和 pAO815 来自 Invitrogen。载有 *hsa* 基因的 M13mp18 由中国科学院上海生物化学研究所戚正武教授提供。所用引物由 Sangon 合成。限制酶, *Taq* 聚合酶, T4 DNA 连接酶, Geneticin(G418)购自 Gibco BRL。兔抗人血清白蛋白抗血清由本实验室制备, HSA 购自上海市中心血站。随机引物标记试剂盒购自 Takara。杂交尼龙膜购自 Boehringer Mannheim。其他试剂均为国产或进口分装分析纯。

1.2 方法

1.2.1 有关 *Pichia pastoris* 的实验方法: 根据 Invitrogen *Pichia* Expression Kit 进行。小规模表达方法同以前报道^[4]。发酵参照 *Pichia* Fermentation Guideline 进行。其他根据分子克隆实验指南进行。DNA 序列测定由皓嘉公司自动测序仪完成。T 载

两种前导肽对 HSA 表达的影响,采用 MF α -1 prepro 作为前导肽的 GS115 (pPIC9K-*hsa*) 表达量比采用 HSAprepro 的 GS115 (pPIC3.5K-*hsa*) 表达量平均要高 20% 左右。为了排除 5' 非翻译区的影响,我们又构建了 5' 非翻译区和 AOX1 的 5' 非翻译区完全相同的表达载体。5' 非翻译区的优化并没有如 Sreekrishna 等^[7]报道那样,使 HSA 的表达量显著提高。但 5' 非翻译区改造前后 HSA 的表达量表明了 MF α -1 prepro 作为前导肽的菌株表达量高于 HSA prepro 作为前导肽的菌株。因此我们认为以 MF α -1 prepro 作为前导肽可能对提高 HSA 的表达量会更有利,但并没有如 Davis 所报道的那样比用天然肽要高 2~3 倍^[8]。但是为何其他研究者却并没有采用 MF α -1 prepro,其原因值得深究。是否是 MF α -1 prepro 会造成成熟 HSA 氨基端加工的不均一?我们将要进行的纯化和 N 端测序工作将能回答这一问题。

拷贝数对取得最高表达是一个极为重要的因素。有些情况下,单拷贝已经足够,醇氧化酶的基因能产生占总 mRNA 5% 的转录量,表明单拷贝的表达盒能产生高水平的 mRNA。而实际上大多数单拷贝外源基因的 mRNA 远低于 AOX1 mRNA 的水平。其中一个主要原因是外源 mRNA 不如 AOX1 的稳定。对于分泌表达,倾向于选择最适的拷贝数而不是越高越好。Davis 等的结果是含 2 拷贝 *hsa* 基因的转化子比单拷贝的表达量提高 1 倍^[8]。而 Sreekrishna 的结果相反,单拷贝的转化子表达量为 1 g/L,而 2 拷贝的转化子表达量为 0.754 g/L,2 拷贝以上的表达量就只有 0.185 g/L 了^[2]。我们的结果表明 *hsa* 的基因拷贝数与表达量的关系规律性不强。图 2 中的 A2 拷贝数高达 10 以上,但表达量并不高。其中表达较高的反而是 D3 和 D5,而 D5 的拷贝数明显较低,约为 2。GS115 (pPIC9K-*hsa*) 的表达结果也表明一个拷贝数为 3 的转化子取得了最高表达。甲醇利用表型对 HSA 的表达量没有显著

影响(表 1)。将 *hsa* 表达载体转化到蛋白酶缺陷的宿主细胞(SMD1168)也未能使 HSA 的表达量提高(结果未发表)。我们在 *Pichia pastoris* 表达株的筛选时还发现,表达株的株间差异较大。即使是同一表达载体的同一批转化子,它们之间的表达量也会有较大差异,造成这一现象的原因不明。因此,需要筛选大量转化子以筛选高表达株。同时,有必要对所得的高表达株进行基因水平的分析来获得对 *Pichia pastoris* 这一表达系统的更深了解。

我们在 GS115 (pPIC9-*hsa*) 表达株中挑取 100 个转化子作了表达,得到的第 43 号转化子表达量较高而且很稳定,43 号表达株在优化条件下可以获得 200 mg/L 的表达量,比我们以前报道^[4]的更进了一步,超过国外的最高报道 160 mg/L^[9]。

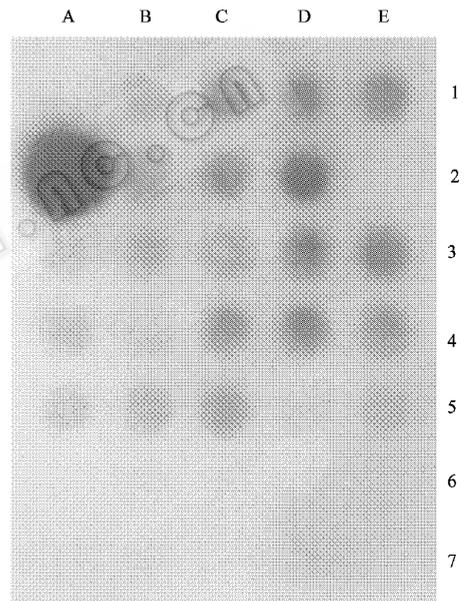


图 2 GS115 (pPIC3.5K-*hsa*) 的 DNA 定量点杂交

Fig. 2 Quantitative dot blot Analysis of GS115 (pPIC3.5K-*hsa*)

A1 is the control strain GS115 (pPIC3.5K), others are transformants from G418 plate. Line 6 and 7 are single-copy transformants. Other dot blots can then be quantified for copy number by densitometry of the film.

表 1 以不同前导肽在 *Pichia pastoris* 中分泌 HSA 的表达量比较

Table 1 Secretion of HSA from *Pichia pastoris* directed by different leader sequence

Vector	pPIC3.5K- <i>hsa</i>		pPIC9K-HSA		pAO815- <i>hsa</i>		pAO815-a- <i>hsa</i>	
Lead sequence	HSAprepro		MF α -1 prepro		HSAprepro		MF α -prepro	
Methanol utilization type	Mut ⁺	Mut ^S	Mut ⁺	Mut ^S	Mut ⁺	Mut ^S	Mut ⁺	Mut ^S
HSA amount in supernatant (mg/L)	75	70	90	100	80	80	90	90
The percentage of 45 kD HSA fragment (%)	0~15		0~14		0~13		0~18	

Mut⁺ methanol utilization plus (obtained by using GS115 as host strain);

Mut^S methanol utilization slow (obtained by using KM71 as host strain) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

发酵罐中高密度发酵的初步结果见图 3。经 170 h 发酵(诱导期 138 h)细胞湿重达到 460 g/L, 上清中 HSA 浓度达 1.0 g/L。我们的小规模表达结果已超过国外报道的最高值 160 mg/L。由于摇

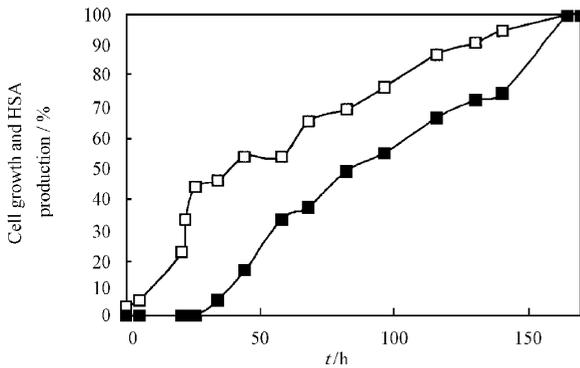


图 3 重组 HSA 在 *Pichia pastoris* 中的发酵曲线

Fig. 3 Fermentation course for production of recombinant HSA using *Pichia pastoris*
 -□- Cell growth ; -■- HSA

瓶中的表达条件和发酵罐中相差很大,在摇瓶培养中 *Pichia pastoris* 表达外源蛋白的水平往往不能准确反映其在发酵罐中的真实表达情况,我们最关注的还是发酵罐中的表达情况。国内目前尚无 *Pichia* 高密度发酵表达重组 HSA 的报道,国外有报道的一般为 1 g/L,单罐最高为 3.39 g/L,但诱导期长达 10d。我们取得的初步结果也达到 138 h 稳产 1 g/L,不亚于国外水平。从摇瓶结果看,我们获得的表达株在发酵罐中的表达量应还有进一步提高的潜力。

我们将来的工作将会注重于缩短高密度发酵的生产周期提高生产率。另外,发酵工艺还应根据下游纯化工艺的需要以及生产总成本的控制加以改进。如 Green cross 就不仅仅简单地追求 HSA 表达量,还加上了产品着色度这一指标。他们的一篇专利就是有关在发酵罐中加入活性碳类物质吸附色素以减轻纯化工作负担^[10]。这些都是我们在发酵工艺的确立时应该引起注意的。

参 考 文 献

- [1] Goodey A R. *TIBTECH*, 1993, **11**: 430~433
- [2] Sreekrishna K, Tschopp J F, Thill G P *et al.* US Patent 5,707,828, 1998
- [3] Kobayashi K, Nakamura N, Sumi A *et al.* *Therapeutic Apheresis*, 1998, **2**(4): 257~262
- [4] 邱容德, 李士云, 陈俊刚等. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32**(1): 59~62
- [5] Marchuk D, Drumm M, Saulino A *et al.* *Nucleic Acid Research*, 1991, **19**(5): 1154
- [6] Sleep D, Belfield G P, Goodey A R. *Bio/technology*, 1990, **8**: 42~46
- [7] Sreekrishna K, Barr K A, Hoard S A *et al.* 15th Int Congr on Yeast Genetics and Molecular Biology, Hague, The Netherlands, Topic No 09-37B, 1990
- [8] Davis G R. WO 92/13951, 1992
- [9] Hayasuke N, Nakagawa Y, Ishida Y *et al.* US Patent 5,503,993, 1996
- [10] Ohmura T, Sumi A, Ohtani W *et al.* US Patent 5,294,699, 1991

Study on Factors Influencing Secretion of Recombinant Human Serum Albumin from *Pichia pastoris*

YANG Sheng¹ HUANG He¹ ZHANG Ru-An¹ QIAN Mei-Qin²
 YU You-Hao³ QIAN Xue-Ming¹ YUAN Zhong-Yi¹

¹(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

²(Shanghai No.1 Biochem. & Pharma. Co., Shanghai 200080)

³(Department of Bioengineering, Shanghai University, Shanghai 200180)

Abstract To enhance the expression of recombinant human serum albumin(HSA) in *Pichia pastoris*, several expression vectors have been constructed and transformed to *Pichia pastoris*. It was found that the use of α factor from *Saccharomyces cerevisiae* as a leader sequence was better than that of the native human serum albumin(HSAprepro). Compared with latter, the former(MF α -1prepro) increased the yield of recombinant albumin about 10%. The data also showed that the integrate site, copy number of expression vectors, 5' untranslated region and methanol utilization type had no obvious influence on yield of HSA. The high productivity strain obtained by screening GS115(pPIC9-hsa) transformants reached cell mass of 460 g/L(Wet) and produced 1.0 g/L HSA in supernatant of culture broth via high density fermentation.

Key words Human serum albumin, *Pichia pastoris*, α -factor, secretion signal, high density fermentation