

毕赤氏酵母工程菌高密度发酵表达恶性疟原虫融合抗原的研究

郭美锦^{2,3} 吴康华² 储炬² 庄英萍² 张嗣良² 黄大庆¹ 张青锋¹ 潘卫庆^{*1}

¹(第二军医大学病原生物学教研室 上海 200433)

²(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

³(江西农业大学生物工程系 南昌 330045)

关键词 甲醇营养型毕赤酵母,恶性疟原虫融合抗原,发酵条件优化,高密度发酵

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0456-04

疟疾目前仍是危害人类健康的主要传染病,现全球每年新增疟疾病例 3~5 亿人,其中约 300 万人死于该病。特别是病原虫抗药性的产生和扩散已给疟疾防治工作带来极大困难,因此研制新的预防措施已成为当务之急。研制有效的疟疾疫苗被认为是人类控制乃至消灭疟疾的重要途径,已越来越受到重视,并已构建和鉴定多个疫苗候选抗原^[1,2]。本研究进行高密度优化表达的融合抗原就是一个疫苗候选抗原。

近年来,甲醇营养型毕赤酵母(*Methylotrophic Pichia pastoris*)已被公认是外源分泌蛋白和胞内外源蛋白表达的一个优秀表达系统^[3]。本文报道采用 P_{AOX1} 启动子的毕赤氏酵母工程菌,发酵表达恶性疟原虫融合抗原高密度发酵条件优化试验和提高目的蛋白的表达产量。

1 材料与方法

1.1 菌种

毕赤氏酵母 GS115/pfcp 菌株,含有恶性疟原虫融合抗原基因表达质粒,能稳定表达出约 34~36kD 的融合蛋白,该菌株由第二军医大学病原生物学教研室构建。

1.2 培养基

1.2.1 平板培养基:YPD 培养基^[4]。

1.2.2 种子培养基:MGY 培养基^[4]。

1.2.3 摇瓶生长培养基:MGY 培养基^[4]。

1.2.4 摇瓶诱导培养基(g/L):Yeast Extract(OXOID 产品)10, Polypepton(日本制药株式会社产品)20, YNB(不含氨基酸, DIFCO 产品)100, 生物素 X(单独过滤除菌),用 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH=6.0)配制 0.08MPa 灭菌 15min。

1.2.5 分批发酵培养基用 FM21 基础盐配成含甘油 4%(W/V)和 4mL/L PTM1 微量元素溶液^[7]。

1.2.6 补料生长培养基:50%甘油(W/V,含 12mL/L PTM1)补料液。

1.2.7 发酵诱导培养基:100%甲醇(含 12mL/L PTM1)诱导液。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶培养法:从平板上挑一单菌落,接入装 20mL 摇瓶生长培养基的 250mL 三角瓶中,30℃,220r/min,培养 16~24h(OD_{600} = 20 左右),4℃,3000r/min 离心收集菌体,弃去上清液,再接入至 20mL 诱导培养基中,30℃,220r/min,培养 96~120h。每 24h 补加 100%甲醇(A.R.),使甲醇在发酵上清液中终浓度(W/V)在一定范围(0~15g/L)。

1.3.2 补料分批发酵方法:从新鲜 YPD 平板上挑一单菌落到种子培养基中,30℃,220r/min 培养 20~25h 后,按 10%接种量接入到装 2.5L 分批发酵培养基的 5L 发酵罐中进行分批培养(用氨水调 pH 至 5.5 左右),当碳源甘油耗尽后(DO 陡然上升,1min 内),流加补料生长培养基(流加速率维持溶氧大于 10%)。当细胞光度密为 500~700 时停止补料,甘油耗尽后,补入发酵诱导培养基进行甲醇诱导表达发酵(pH 用 25%NH₃·H₂O 控制为 5.7~7.0),通过调节转速、罐压、空气流量和流加甲醇速度使溶氧大于 20%,并使发酵上清液中甲醇浓度小于 10g/L,诱导发酵 100h 左右(FMG-5L 自动发酵罐为华东理工大学国家生化工程技术研究中心(上海)提供)。

1.4 分析方法

1.4.1 pH pH 电极在线检测并采用 PID 闭环控制方式控制(GIO80pH 电极为华东理工大学国家生化工程技术中心研制)。

1.4.2 溶氧(DO)溶氧电极在线检测(瑞典 Ingold 公司产品 CD951-06)。

1.4.3 细胞光密度(OD)分析:发酵液稀释后于波长 600nm 处以去离子水为对照进行比色测定。 $OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.4.4 甘油测定方法:采用高碘酸钠氧化滴定法^[5]。

1.4.5 甲醇测定:气相色谱(GC)分析发酵上清液中甲醇浓度^[6]。

收稿日期 2001-01-04,修回日期 2001-03-06。

基金项目 国家“九五”863 计划资助项目(102-07-04-04)和自然科学基金资助项目(29976013)。

* 通讯作者。Tel 86-21-25070250,E-mail:malaria@guomai.sh.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.4.6 目的蛋白分析:按文献[7]SDS-PAGE 凝胶电泳分析和 Western blot 分析,将电泳胶经计算机扫描,由于目的蛋白为融合蛋白,本实验以牛血清白蛋白为标准,根据电泳带染色强度进行定量分析(GIS-1000 数码凝胶图像分析系统, 2.0 版本,按说明书操作,背景消除按自动进行,低分子标准蛋白为上海丽珠东风生物技术有限公司产品)。

2 结果与讨论

2.1 甲醇诱导周期对蛋白表达的影响

每 24h 按 5.0g/L 甲醇终浓度补加甲醇,诱导培养基因工程菌 *P. pastoris* 至 120h,每 24h 取 2 瓶发酵瓶进行分析。从图 1 可以看出,随着诱导时间的延长,细胞光密度(OD_{600})和表达蛋白量逐渐增加。细胞生长以 0~48h 较快,此后生长减慢,放瓶最终 OD_{600} 为 27.5,而蛋白表达前 48h 速率增长较慢,此后逐渐加大,96h 表达量为最大,54mg/L 左右,随后表达量下降。根据细胞光密度(OD_{600})和蛋白量的曲线变化,诱导前 48h 的细胞比生长速率(μ)与表达蛋白比产率(q_p)基本呈线性增加,细胞比蛋白表达速率(q_p)为 0.33mg(L·h) (直线斜率),而诱导 48h 后细胞生长基本处于维持状态,表达蛋白比产率却继续增加,达到 1.1mg(h·L)。因此,细胞在以甲醇为唯一碳源和能源进行生长和表达外源蛋白的发酵时,前期以细胞生长为主,中后期则以细胞维持生长和表达外源蛋白为主。另外,在整个摇瓶发酵过程中甲醇残量均较低,约为 1g/L,甚至更低(数据未列),这说明在细胞生长期和蛋白表达期以 5g/L 甲醇浓度进行发酵均可能受到甲醇碳源的限制,有进一步研究甲醇诱导浓度的必要。

通过 SDS-PAGE 电泳图谱分析(图 2)和 Western blot 分析,目的蛋白——恶性疟原虫融合抗原的分子量为 34~36kD(2 条电泳带均有免疫活性)。

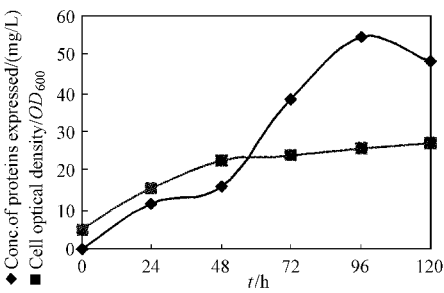


图 1 甲醇诱导时间对细胞生长和蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of methanol inducement period on cell growth and protein expression

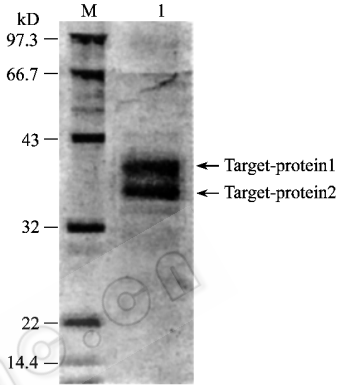


图 2 SDS-PAGE 电泳图谱分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of target-proteins expressed in *P. pastoris*

1. Supernatant sample after 96h with methanol inducement (20uL per well); M. Marker

2.2 甲醇诱导浓度对重组 *P. pastoris* 生长与蛋白表达的影响

在摇瓶诱导发酵时,每 24h 补加甲醇,使终浓度分别为 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0g/L,培养 96h 后取下摇瓶进行数据分析,结果如表 1。

表 1 甲醇浓度诱导基因工程菌 *P. pastoris* 生长与蛋白表达试验结果

Table 1 Results of cell growth and target-proteins expression in recombinant *P. pastoris* with methanol inducement

Methanol conc. (g/L)	Total conc. of Met added S_0 (g/L)	pH	Cell optical density / OD_{600}	Protein conc. (mg/L)	Residual conc. of methanol S (g/L)	Cell productivity ΔX (g/L)	Cell yield coefficientcy $Y_{x/s}$ (g/g)
2.5	10	6.41	21.7	13.71	0.891	3.82	0.42
5.0	20	6.10	31.9	54.48	0.762	6.16	0.32
7.5	30	5.63	37.5	65.81	0.720	7.44	0.25
10.0	40	5.44	42.0	79.40	0.850	8.47	0.22
12.5	50	5.26	47.0	61.28	0.747	9.62	0.20
15.0	60	5.00	43.0	29.56	0.100	8.74	0.15

Note: 1 $OD_{600} \approx 0.229/g/L$, Initial $OD_{600} = 5$; $\Delta X = (OD_{600} - \text{Initial } OD_{600}) \times 0.229$ (g/L); $Y_{x/s} = \Delta X / (S_0 - S)$ (g/g); Replication number is 2 in this experiment.

从表 1 中可看出:此基因工程菌 *P. pastoris* 在以甲醇为基质进行生长和蛋白表达发酵时的最适浓度以 10g/L 为好。

2.3 pH 对基因工程菌 *P. pastoris* 蛋白表达的影响

用磷酸缓冲液配制不同 pH 值的摇瓶诱导培养基(甲醇浓度为 10g/L)进行基因工程菌 *P. pastoris* 诱导摇瓶培养,结

果(表 2)可知:基因工程菌 *P. pastoris* 表达恶性疟原虫融合抗原的初始 pH 范围为 6.0~7.0,且愈高愈好。

2.4 补料分批培养高密度发酵表达外源蛋白

根据摇瓶发酵表达外源目的蛋白的优化结果,进行了补料分批发酵。中国微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表 2 不同 pH 值时基因工程菌 *P. pastoris* 目的蛋白表达的试验结果

Table 2 Concentration of targetted proteins expressed in recombinant *P. pastoris* at different pH value

pH	pH(after autoclaved)	pH(at end of cultivation)	Cell optical density(OD_{600})	Proteins conc.(mg/L)	Residual conc. of methanol(g/L)
5.0	4.97	4.58	26.5	0.75	2.24
5.7	5.71	5.14	26.5	4.59	2.24
6.0	6.07	5.53	26.7	21.58	2.06
6.3	6.25	5.84	27.3	46.50	1.83
6.6	6.48	6.11	30.0	106.53	1.70
7.0	6.91	6.41	32.0	198.28	1.67
7.4	7.35	7.16	34.2	196.70	1.56

Note :Replication number is 2 in this experiment.

2.4.1 分批培养基因工程菌 *P. pastoris* 的菌体生长 采用分批发酵培养基进行基因工程菌 *P. pastoris* 的分批培养 ,培养 22h 后甘油耗尽 ,细胞光密度(OD_{600})达到 112.5。由于 1 OD_{600} 约为 $0.229g^{DCW}/l$ (DCW ,dry cell weight) ,即菌体干重达到 25.76g/L ,因此甘油底物得率系数 $Y_{X/S}$ 为 0.65g/g。通过细胞光密度(OD_{600})对培养时间(t)进行线性回归得 :

$$Y_{OD_{600}} = 1.1497 e^{0.214t}$$

线性相关系数 $R^2 = 0.9947$,其中 $Y_{OD_{600}}$ 为细胞光密度 , t 为培养时间。

这说明采用二级发酵时 ,摇瓶菌种接种后能迅速进入指数生长期 ,由指数方程可知细胞比生长速率(μ)为 $0.214h^{-1}$,与恒化培养最大菌体产率($0.199h^{-1}$)(另文发表)基本吻合 ,此方程可用于进行指数流加发酵的基础 ,但由于发酵培养时甘油不能过量 ,只能是限制状态 ,否则由于溶氧供应不足 ,甚至为零 ,因此容易导致甘油的厌氧发酵而产生乙醇、乳酸等 ,对基因工程菌 *P. pastoris* 的外源目的蛋白的表达极为不利^[8] ,因此应尽量控制甘油补料流速。

2.4.2 补料高密度培养表达目的蛋白 :高密度发酵是基因重组菌提高外源蛋白表达量的重要策略之一。本试验在整个发酵周期中 ,菌体细胞光密度在前期(即分批发酵阶段)是按指数生长上升 ,此后进入补料生长期(图 3)。通过从 22h 开始补加补料生长培养基 ,细胞光密度仍继续上升 ,当细胞

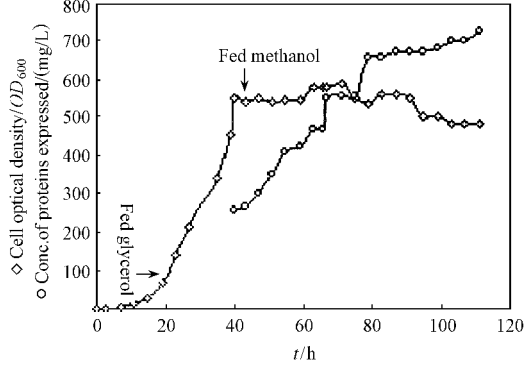


图 3 细胞光密度和蛋白表达浓度在补料发酵中的变化

Fig.3 Cell optical density and concentration of proteins expressed in *P. pastoris* during fed-batch fermentation

光密度达到 550 左右(细胞密度约为 120g/L)时停止流加补料生长培养基 ,发酵过渡到甲醇诱导蛋白表达阶段(过渡期为 30min 左右)。从 41h 开始补加甲醇 ,从而进入甲醇诱导蛋白表达阶段。甲醇加入后 ,诱导启动子(P_{AOXI})启动 ,表达目的蛋白 ,但诱导初期蛋白表达产率不高 ,当甲醇补入 1 ~ 4h 即细胞在甘油与甲醇两种底物转换适应后 ,目的蛋白表达产率迅速提高 ,并不断分泌到发酵液中。发酵后期 ,目的蛋白表达产率逐渐减少 ,而目的蛋白被蛋白酶降解却愈来愈多 ,杂蛋白增多 ,因此最佳放罐点的选择十分重要。本试验以摇瓶表达目的蛋白的优化条件为基础 ,经过 4 罐批发酵 ,蛋白表达量最高达到 780mg/L ,比摇瓶优化结果提高了 4 倍左右。致 谢 :华东理工大学生物工程学院 96 级方旭燕同学参与部分实验 ,在此表示衷心的感谢 !

REFERENCES(参考文献)

[1] Weiqing P ,Ravot E ,Tolle R *et al.* Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum* :a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* ,1999 **27** :1094 ~ 1103

[2] Patarroy M E ,Romero P ,Torres M L *et al.* Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* ,1987 **328** :629 ~ 632

[3] Romanos M A ,Clare C A ,Clare J J. Foreign gene expression in yeast : a review. *Yeast* ,1992 **8** (2) :423 ~ 488

[4] Klaus W (ed). Nonconventional yeasts in biotechnology ,Berlin ,Germany ,Springer ,1996 ,pp203 ~ 253

[5] FU W (傅伍尧). Rapid determination method for glycerol with sodium periodate. *Chemistry World* (化学世界) ,1953 **8** (10) :366 ~ 367

[6] ZHAO X (赵霞). Study on cultural characteristics of recombinant *Escherichia coli* in cell-high-density fermentation ,Doctate Theses for East China University of Science & Technology ,1995 ,pp. 37 ~ 40

[7] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual .2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

[8] Wenhui W ,Mark A B ,Bradley A P *et al.* Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein ,the Heavy-chain fragment C of *Botulinum* neurotoxin ,Sero-type A. *Biothchnology and Bioengineering* 2000 **20** (1) :1 ~ 8

Expression of Chimeric Protein of *Plasmodium falciparum* in Yeast Recombinant *Pichia pastoris* in Cell-high-density Fermentation

GUO Mei-Jin^{2,3} WU Kang-Hua² CHU Ju² ZHUANG Ying-Ping² ZHANG Si-Liang²
HUANG Da-Qing¹ ZHANG Qing-Feng¹ PAN Wei-Qing^{1*}

¹(Department of Etiologic Biology ,Second Military Medical University ,Shanghai 200433 ,China)

²(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ,East China University of Science & Technology ,Shanghai 200237 ,China)

³(Department of biotechnology ,Agricultural University of Jiangxi ,Nanchang 330045 ,China)

Abstract The effects of cultural conditions ,which were fermentation period when methanol was as sole carbon source ,methanol concentration ,range of pH ,on the expression of the chimeric protein of *Plasmodium falciparum* in genetically engineered methylotrophic *Pichia pastoris* were investigated by shake flask experiments in this paper. The results showed (1)fermentation period with methanol inducement is about 96 hours (2)the optimum methanol concentration as sole carbon source is 10g/L (3)the range of pH is from 6.0 to 7.0. On the base of above experimental results the cell high-density fermentation had been done on the FMG-5L fermentor with multi-sensors. The results showed that the cell optical density (OD_{600}) can reached 550 and the maximum expression level of target proteins was 780mg/L which was 4 times higher or more than the shake flask culture 's.

Key words methylotrophic *Pichia pastoris* , chimeric protein of *Plasmodium falciparum* , optimization of cultural conditions , high-density fermentation

Received January 4 2001

This work was supported by grant from National Ninth-five 863 Plan(102-07-04-04) and National Nature Sciences Foundation of China(29976013).

* Corresponding author. Tel 86-21-25070250 ;E-mail :malaria@guomai.sh.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>