

## 人三叶因子 3 在毕赤酵母中表达条件的研究

王艳茹 方 敏 安 琳 李令媛 茹炳根\*

(北京大学生命科学学院 蛋白质工程国家重点实验室 北京 100871)

**摘 要** 为提高人三叶因子 3(Human Trefoil factor 3, hTFF3)在毕赤酵母中的表达量,研究了转化子生长的培养条件,包括不同碳源对转化子生长的影响和接种量、甲醇浓度、pH 值、摇瓶转速及不同诱导时间对人三叶因子 3 表达的影响。结果表明转化子在生长阶段加入葡萄糖生长旺盛,培养 14h 后  $OD_{600}$  就可达到 5.0。在 100mL 生长培养基上的菌液以 1:1 接入诱导培养基时蛋白表达量最高;转化子在 1% 的甲醇、pH6.0、摇瓶转速 240r/min 的条件下诱导 48h,菌体密度  $OD_{600}$  为 15,目的蛋白表达量达到 20mg/L。用 5L 发酵罐进行了高密度发酵,经 2% 甲醇 32h 诱导,最终菌体密度  $OD_{600}$  达到 120,每升发酵液中含目的蛋白 100mg。

**关键词** 三叶因子 3, 毕赤酵母, 表达, 发酵

**中图分类号** TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0648-04

人三叶因子 3(hTFF3)是一种胃肠道粘膜修复因子,分子中有 59 个氨基酸,其中有 6 个 Cys 结合成分子内二硫键,状似三片叶子,因而得名<sup>[1,2]</sup>。分子 C 端第 57 位的 Cys 不参与肽链内二硫键的形成却与另一个 hTFF3 形成分子间二硫键,构成双体形式<sup>[3]</sup>。人三叶因子 3 可与粘蛋白在胃肠道粘膜表面形成一种物理屏障,防止外界因子的攻击,阻止溃疡的发生<sup>[4,5]</sup>。

毕赤酵母已成功地用于许多外源蛋白的表达<sup>[6]</sup>,它可以利用甲醇为唯一碳源进行生长,所使用的醇氧化酶启动子可以在甲醇的诱导下进行外源蛋白的高效表达。我们曾利用毕赤酵母表达了人 TFF3,蛋白以双体形式分泌到发酵液上清中,本文对其分泌表达和扩大化培养条件进行了研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株和培养基

1.1.1 表达人 TFF3 的毕赤酵母菌转化子 GS115/pPIC9K/hTFF3 为本实验室构建。

1.1.2 培养基成分(g/L):基础生长培养基:酵母氮源碱基 13.4,生物素  $4 \times 10^{-4}$ ,蛋白胨 20,酵母提取物 10,pH6.0;基础诱导培养基:酵母氮源碱基 13.4;生物素  $4 \times 10^{-4}$ ,pH6.0;发酵培养基:酵母氮源碱基 13.4,生物素  $4 \times 10^{-4}$ ,蛋白胨 20,酵母提取物 10;微

量元素混合物:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2.0, NaI 0.08,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.02,  $\text{CoCl}_2$  0.5,  $\text{ZnCl}_2$  7.0,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,每升发酵培养基中加入 4.4mL 微量元素混合物。

1.1.3 培养条件: A)三角瓶培养:100mL 培养基装于 500mL 三角瓶中,接种后在 200r/min 28℃ 不同条件进行培养。 B)发酵罐培养:3.5L 发酵培养基装于 5L 全自动发酵罐中(德国 B. Braun 公司产品),接入 10% 种子液,800r/min,28℃ 培养,用氨水控制发酵 pH。

#### 1.2 转化子摇瓶发酵条件的研究

培养条件的研究设计按单因子顺序进行,各项实验重复 3 次,每项优化结果都用于以后的实验。

1.2.1 碳源对转化子生长的影响:将 5mL 菌液接入 100mL 分别以 2% 葡萄糖,2% 甘油,2% 甲醇,2% 乙醇为碳源的基础生长培养基上,定时取样,监测各种培养基中菌体密度  $OD_{600}$  达到 5.0 的时间。

1.2.2 接种量对 hTFF3 表达的影响:菌体密度  $OD_{600}$  达到 5.0 后,分别将 50mL, 100mL, 200mL, 300mL 培养基生长的菌体离心,接种到 100mL 含有 0.5% 甲醇,pH6.0 的诱导培养基上,每隔 24h 补加一次初始浓度的甲醇,培养 48h 后收获发酵液,检测菌体生长密度及上清中总蛋白含量,进行 SDS-PAGE

电泳,紫外薄层扫描检测上清蛋白表达量。

**1.2.3 甲醇浓度对 hTFF3 表达的影响:**将生长培养基的菌体等量接入含有甲醇百分比浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 的诱导培养基上进行培养,24h 后补加相同浓度的甲醇,诱导 48h 后收获发酵液,按上述方法进行检测。

**1.2.4 pH 对 hTFF3 分泌的影响:**以 100mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  为缓冲液,将生长培养基的菌体等量接入 pH4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的诱导培养基,诱导 48h,按上述方法进行检测。

**1.2.5 摇瓶转速对 hTFF3 表达的影响:**分别在 80、120、160、200、240r/min 不同转速下诱导培养 48h,按上述方法进行检测。

**1.2.6 诱导时间对 hTFF3 表达的影响:**将生长培养基的转化子离心后菌体接入诱导培养基,诱导 64h,每隔 6h 取样 1 次,测定菌体密度和蛋白量。

**1.3 转化子的高密度发酵**

GS115/pPIC9K/hTFF3 转化子的发酵在 5L 自控式发酵罐中进行。生长培养基的菌液按 10% 的接种量接入发酵培养基,800r/min,28℃ 培养,以氨水控制 pH 值在 6.0。通过观察溶氧来监测菌体生长情况,控制溶氧在 20% ~ 30% 之间。溶氧上升则流加 2% 的甘油,培养大约 48h 后停加甘油,让菌体将剩余甘油消耗净,等溶氧上升到 70% ~ 80% 以后开始流加 2% 的甲醇诱导外源蛋白的表达,控制溶氧在 20% ~ 30% 之间。诱导 48h 之后停加甲醇,待溶氧再次上升时表示甲醇已经消耗完全,离心,收获发酵液上清。诱导过程中每隔 8h 取样,检测菌体密度及蛋白表达量。

**2 结 果**

**2.1 转化子摇瓶发酵培养条件的研究**

**2.1.1 碳源对转化子生长的影响:**由于转化子分为生长与诱导两个阶段,我们研究了生长培养基上碳源对转化子生长的影响,结果表明,菌体在含有 2% 葡萄糖的培养基上生长旺盛,14h  $OD_{600}$  值达到 5.0,在含甘油的培养基上生长 18h  $OD_{600}$  达到 5.0,而在以甲醇和乙醇为碳源的培养基上要分别培养 26h 和 28h  $OD_{600}$  才能达到 5.0。因此采用 2% 葡萄糖作为碳源进行培养,使酵母发酵周期提前至少 4h。

**2.1.2 接种量对 hTFF3 表达的影响:**提高诱导初期菌体的生物量可以提高目的蛋白的产量,但过高的菌体浓度反而会因为营养消耗太快或通氧量的不足

而降低蛋白产量,通过研究不同接种量对蛋白产生的影响发现,以 1:1 接种量进行诱导培养,菌体蛋白分泌较高,在较低(1:2)的接种比率时由于菌体数量过低,减少了蛋白的分泌总量。而在较高的接种比率(2:1 和 3:1)时,由于培养基中菌体相对密度太大,使养分和溶氧不足,转化子生长状态不好,反而使蛋白表达量降低(图 1)。

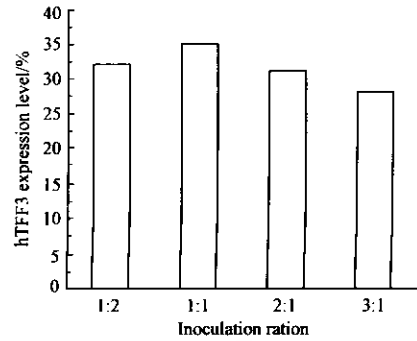


图 1 接种比率对 hTFF3 表达的影响

Fig.1 Influence of inoculation ration on hTFF3 expression

**2.1.3 甲醇浓度对 hTFF3 表达的影响:**由于毕赤酵母以醇氧化酶启动子启动外源基因的表达,当培养基以甲醇为唯一碳源时,毕赤酵母会表达醇氧化酶以利用甲醇,而 hTFF3 基因整合在醇氧化酶基因的下游,所以其表达与醇氧化酶的表达成正比。由于甲醇既是酵母的碳源也是诱导物,因此提高甲醇的浓度可能会提高外源蛋白表达量,我们研究了不同浓度的甲醇对蛋白表达量的影响,结果见图 2,可见在摇瓶培养中当甲醇的浓度由 0.5% 提高到 1% 时,蛋白的表达量提高,而甲醇浓度达到 3% 时蛋白表达量和菌体密度逐渐下降,这可能由于过高的甲醇浓度对细胞产生毒害作用,使蛋白分泌减少。

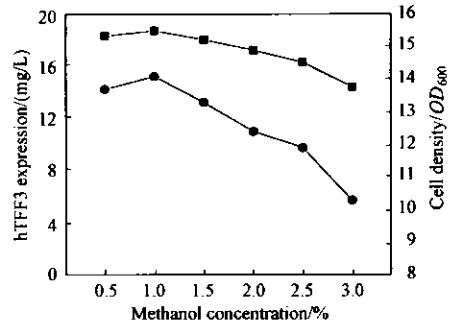


图 2 甲醇诱导浓度对 hTFF3 的表达及菌体密度的影响

Fig.2 Influence of methanol induction concentration on hTFF3 expression and cell density  
■ hTFF3 expression (mg/L); ● Cell density/OD<sub>600</sub>

**2.1.4 pH 对 hTFF3 表达的影响:**结果见图 3。在 pH6.0 时菌体密度、蛋白的表达量都比较高。而在

较高和较低的 pH 下,蛋白表达量都有所下降,相应的菌体密度也减少。

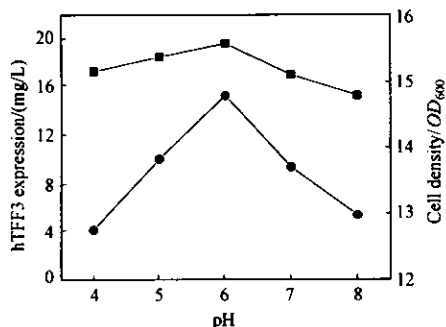


图 3 pH 对 hTFF3 的表达及菌体密度的影响

Fig.3 Influence of pH on hTFF3 expression and cell density

■ hTFF3 expression (mg/L); ● Cell density/OD<sub>600</sub>

**2.1.5 摇瓶转速对 hTFF3 表达的影响:**实验结果见图 4。由于转化子在生长和诱导阶段对溶氧的需求很高,提高溶氧含量往往会增加转化子的生物量和蛋白的表达量,实验结果表明,随着摇瓶转速的增加,酵母的菌体密度和 hTFF3 的蛋白产量都有明显提高。

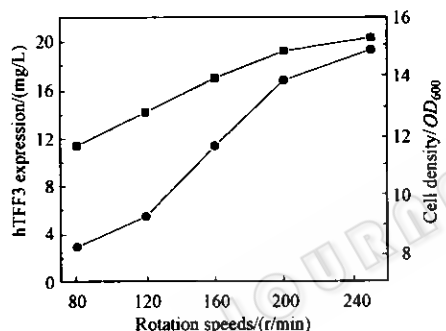


图 4 摇瓶转速对 hTFF3 的表达及菌体密度的影响

Fig.4 Influence of rotation speeds on hTFF3 expression and cell density

■ hTFF3 expression (mg/L); ● Cell density/OD<sub>600</sub>

**2.1.6 诱导时间对 hTFF3 表达的影响:**以 1% 的甲醇, pH6.0, 240r/min 条件下对转化子进行摇瓶诱导表达,不同诱导时间的结果见图 5 和图 6。在甲醇

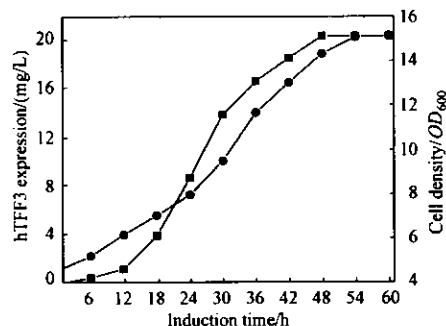


图 5 诱导时间对 hTFF3 的表达及菌体密度的影响

Fig.5 Influence of induction time on hTFF3 expression and cell density

■ hTFF3 expression (mg/L); ● Cell density/OD<sub>600</sub>

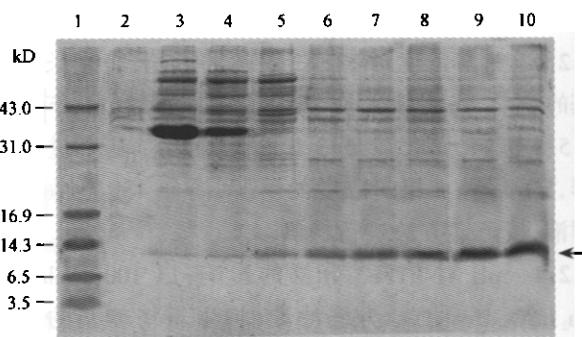


图 6 不同诱导时间蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳

Fig.6 SDS-PAGE of expressed proteins in the flask with different time

1. Marker; 2 ~ 10. Fermentation after induction of 0, 12, 18, 24, 30, 36,

48 and 54. → indicates the expressed hTFF3

诱导 12h 后就有表达产物出现,但表达量很低,随时间的延长表达产物含量也增加,到 48h 达到高峰,表达量占总蛋白的 40%,菌体密度  $OD_{600}$  达到 15,时间延长到 56h 之后菌体密度及目的蛋白占总蛋白的含量不再增加。

## 2.2 发酵罐诱导培养

发酵罐发酵结果见图 7,由于在发酵罐上可以通过控制溶氧量、pH 值、甲醇诱导量,搅动速度及补

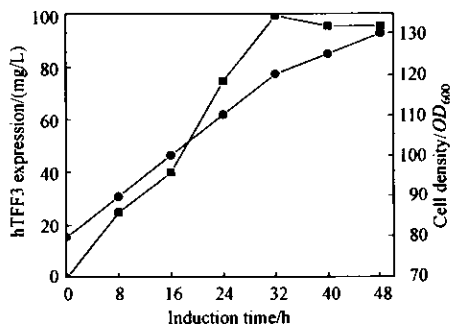


图 7 诱导时间对 hTFF3 及菌体密度的影响

Fig.7 Influence of induction time on hTFF3 expression and cell density

■ hTFF3 expression (mg/L); ● Cell density/OD<sub>600</sub>

料而使菌体密度大大增加,相应的蛋白表达量也会提高。摇瓶实验已显示随着转速的提高,菌体密度和蛋白表达量也相应提高,由于在发酵罐发酵过程中转速可提高到 800r/min,氧气补给量达到 10L/min,所以菌体生长旺盛。根据溶氧量来补加 2% 甲醇进行诱导,32h 后,菌体密度  $OD_{600}$  可达到 120,随着诱导时间的延长,菌体密度有所提高,但外源蛋白的表达量不再增高,这可能由于菌体代谢旺盛,密度过高导致其很快进入生长停滞期。由于发酵罐培养基成分复杂,不能够换液培养,发酵过程菌体代谢产

物如色素等含量增多,与摇瓶培养相比目的蛋白在总蛋白的含量有所下降,只有 27%(图 8),但每升中的蛋白表达量为 100mg/L,仍然比摇瓶提高了 5 倍的产量。

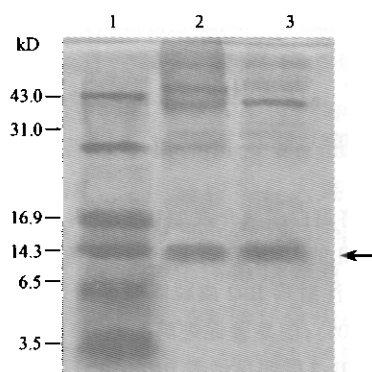


图 8 hTFF3 在转化子中表达电泳图

Fig.8 SDS-PAGE of hTFF3 expressed in transformant

1. Marker; 2. Proteins in fermentor for 32h; 3. Proteins in flask for 48h.

→ indicates the expressed hTFF3

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Sueqiori S, Lynch-Devaney K, Podolsky D K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(4): 1017 ~ 1021
- [ 2 ] Sands B E, Podolsky D K. The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol*, 1996, **58**(34): 253 ~ 273
- [ 3 ] Chinery R, Bates P A, Amitabha D. Characterisation of the single copy trefoil peptides intestinal trefoil factor and pS2 and their ability to form covalent dimers. *FEBS Lett*, 1995, **357**(1): 50 ~ 54
- [ 4 ] Wright N A, Hoffmann W, Otto W R *et al*. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett*, 1997, **408**(2): 121 ~ 123
- [ 5 ] Babyatsky M W, DeBeaumont M, Thim L, Podolsky D K. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*, 1996, **110**(2): 489 ~ 497
- [ 6 ] Cereghino J L, Clegg J M. Heterologous protein expression in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**(1): 45 ~ 66

## Studies on the Expression Condition of Human Trefoil Factor 3 in *Pichia pastoris*

WANG Yan-Ru FANG Min AN Lin LI Ling-Yuan RU Bing-Gen

(College of Life Science, Peking University National Laboratory of Protein Engineering, Beijing 100871, China)

**Abstract** In order to enhance the expression level of human trefoil factor 3 (hTFF3) in *Pichia pastoris*, we optimized the transformant growth conditions in shake flasks including carbon sources in growth medium, inoculation ratio, methanol concentration, pH rotation speed and inducing time. The transformant could grow on the glucose to  $OD_{600}$  5.0 after 14 hours inoculation. The best inoculation ration of 100mL growth medium to the induction medium was 1:1. The expression level of dimeric human trefoil factor 3 induction with 1% methanol for 48 hours at pH 6.0, agitation speed 240r/min could reach 20mg/L with  $OD_{600}$  15. The protein was expressed in 5-liter fermentor with 2% methanol induction for 32 hours, finally the cell density reached  $OD_{600}$  120. 100mg/L of recombinant hTFF3 was obtained in the supernatant.

**Key words** human trefoil factor 3, *Pichia pastoris*, expression, fermentation

Received: June 29, 2001

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842; Fax: 86-10-62751842; E-mail: rulab@pku.edu.cn

## 重要声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部