

以甘油为碳源发酵 *Pichia pastoris* 组成型表达人血管生成抑制素 Constitutive Expression of Human Angiostatin in *Pichia pastoris* Using Glycerol as only Carbon Source

屠发志¹, 符策奕², 张添元³, 罗进贤³, 张爱联^{1*}

TU Fa-Zhi¹, FU Ce-Yi², ZHANG Tian-Yuan³, LUO Jin-Xian³ and ZHANG Ai-Lian^{1*}

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101

2 海南省药品检验所, 海口 570216

3 中山大学基因工程教育部重点实验室, 生物化学系, 广州 510275

1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology / National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101, China

2 Hainan Provincial Institute for Drug Control, Haikou 570216, China

3 The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education and Department of Biochemistry, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

摘要 在 *Pichia pastoris* 组成型表达外源蛋白中碳源起着重要的调控作用。分别以葡萄糖、甘油、甲醇和油酸为碳源研究它们对摇瓶发酵 GS115(pGAP9K-AS)表达 hAS 的影响。结果如下:油酸(163mg/L),甘油(83mg/L),葡萄糖(76mg/L),甲醇(57mg/L)。根据以上结果,以甘油为碳源在 30L 生物反应器中进行 GS115(pGAP9K-AS)工程菌的高密度发酵。48h 后测得 hAS 的产量为 169mg/L。产物 hAS 具有免疫活性并能抑制 bFGF 诱导的 CAM 血管生成和实验小鼠黑色素瘤的生长。治疗 12d 后,抑瘤率达到 90%。统计学分析结果表明 hAS 治疗组和 PBS 治疗组小鼠的肿瘤体积呈现显著性差异($P < 0.01$)。

关键词 血管生成抑制素 组成型表达, *Pichia pastoris*, 甘油

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0902-05

Abstract Carbon source plays an important role in the constitutive expression of foreign proteins in *Pichia pastoris*. In present study, glucose, glycerol, methanol and oil acid, was used respectively as the only carbon source to constitutively express hAS in *Pichia pastoris* GS115(pGAP9K-AS) in shaking flask. The result shows that oleic acid is the best (163mg/L) compared with glycerol (83mg/L), glucose (76mg/L) and methanol (57mg/L). Since oleic acid is insoluble in water, glycerol was used as the carbon source in the high-density cell culture of GS115(pGAP9K-AS) in a 30 liter bioreactor and 169 mg/L of angiostatin was obtained after 48h of culture. The expressed angiostatin is immunologically active as shown by Western blotting. The recombinant hAS inhibits bFGF induced CAM angiogenesis and suppresses the growth of B16 melanoma in C57BL/6J mice. The tumor inhibition rate is 90% after 12 days of treatment. Statistics analysis revealed that the tumor volume difference of mice between the hAS group and PBS group is prominent ($P < 0.01$).

Key words Angiostatin, constitutive expression, *Pichia pastoris*, glycerol

Received: January 9, 2007; Accepted: April 3, 2007.

This work was supported by the grants from Emphases Science and Technology Program of Hainan Province (No.05204) and "225" Science and Technology Program of Guangzhou Municipal Government of China (No. 99-Z-004-001).

* Corresponding author. Tel: +86-898-66984197; E-mail: zhangailian6@yahoo.com.cn

海南省重点科技计划(No.05204)和广州市"225"科技工程"重大项目"(No.99-Z-004-001)资助。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是近年迅速发展的一种真核表达宿主,具有安全、高效和适于进行高密度发酵的优点,已广泛应用于生产重组蛋白。目前应用得较多的是以 P_{AOXI} 为代表的诱导型表达系统,其特点是在甘油为碳源的培养基中进行细胞的增殖,然后以甲醇为唯一碳源诱导基因的大量表达^[1]。它对表达产物对宿主细胞有毒害作用的基因表达特别有效。但甲醇是易挥发的有毒物质,在生产中使用,容易造成环境污染;另外,发酵过程中进行诱导时需从一种碳源转换成另一种碳源,操作不方便;并且,外源蛋白的生产周期较长。 P_{CAP} 是*P. pastoris*的组成型强启动子, P_{CAP} 组成型表达系统除了可以以甲醇作为碳源之外,还可以以葡萄糖和甘油等无毒性的物质作为唯一碳源,并且外源蛋白的表达不需诱导、操作方便、不需要进行碳源转换^[2],具有诱导型表达不可比拟的优点。尤其是由于能够使用无毒性的物质作为唯一碳源,使pGAP组成型表达系统更适合应用于大规模发酵生产外源蛋白。所以,采用 P_{CAP} 组成型启动子在*P. pastoris*中表达外源蛋白正在受到越来越多的关注^[3-5]。在*P. pastoris*组成型表达外源蛋白中碳源起着强烈的调控作用^[6]。在*P. pastoris*的诱导型表达系统中,碳源的使用已经研究的很充分,形成了以甘油为碳源增殖*P. pastoris*细胞,然后用甲醇作为唯一碳源诱导外源蛋白表达的模式^[7]。但在PGAP组成型表达系统中,对碳源的研究报道较少^[3-6,8-9]。血管生成抑制素(Angiostatin, AS)是一种血管生成抑制因子,具有抑制癌的生长和转移的作用^[10,11],深入研究重组血管生成抑制素生产的条件和技术,对于为当前的研究和以后的应用提供足够的样品极为重要。本研究以发酵*P. pastoris*工程菌生产重组人血管生成抑制素(human angiostatin, hAS)为例,探讨*P. pastoris* P_{CAP} 表达系统的碳源选择及应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂:*P. pastoris*工程菌GS115(pGAP9K-AS)由中山大学罗进贤教授实验室构建^[5]。人纤溶酶原抗血清和G418为Sigma产品,辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌蛋白A是上海生物制品研究所产品,SP-Sepharose Fast Flow和Sephadex G-100由Pharmacia公司提供,其他生化试剂均为国

产分析纯。

1.1.2 实验动物与发酵罐:6天鸡胚是海南龙泉集团公司产品,黑色素瘤细胞株和实验小鼠由中山大学实验动物中心提供。30 L B. Brown型生物反应器是德国产品。

1.1.3 培养基、发酵液及补料成分:

YP培养基:2%蛋白胨,1%酵母提取物。

发酵种子液和PTM4参照文献[12]。

发酵液(每L):85%磷酸26.7 mL, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.93 g, K_2SO_4 18.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9 g, KOH 4.13 g, 甘油40 g, PTM4 4 mL, 蛋白胨20 g, 酵母粉10 g。

补料成分:每L 50%甘油(+12 mL/L PTM4)。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶发酵:*P. pastoris* GS115(pGAP9K-AS)的组成型表达参考Waterham H. R.等[2]的方法,基础培养基为2×YP(4%蛋白胨,2%酵母提取物)。以不同碳源发酵*P. pastoris* GS115(pGAP9K-AS)组成型表达hAS实验按如下方法进行:在每管2×YP培养基中别加入一种碳源(葡萄糖溶液,或甘油、油酸、甲醇溶液),并使每种碳源的终浓度(%)分别为:0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50、2.75、3.00、3.25、3.50,分装于20mL容量试管(每管3.5mL),分别接种等量(1%接种量)的 $A_{600} = 1.5$ 的GS115(pGAP9K-AS)菌液,30℃摇床培养2 d,取样通过SDS-PAGE和蛋白含量测定分析hAS表达情况。

1.2.2 高密度发酵:将GS115(pGAP9K-AS)接种于YPD培养基,摇床培养至 $A_{600} = 1.5$ 时取8mL接种于800 mL YPD培养基,用8个500 mL三角瓶分装,每瓶100mL,30℃和250r/min摇床培养至 $A_{600} = 10$ 时,将其转入30L容量已经装了10L发酵液的B. Brown型生物反应器中。发酵参数设计:搅拌100~750r/min、通气7~10L/min和调节补料速率以维持溶氧25%~30%,温度设定30℃,用7mol/L NH_4OH 维持pH 5。自动调节连续补料。在发酵期间,每隔6 h取样测定生物量和分析hAS表达情况。

1.2.3 产物纯化、产物的SDS-PAGE分析、蛋白质含量测定和Western blotting参照文献[13]的方法。

1.2.4 鸡胚尿囊膜(CAM)血管生成抑制活性分析:参考文献[5]的方法。重组hAS用量为25 μ g/鸡胚。

1.2.5 抑瘤实验参考文献[14]方法,抑瘤活性的结果分析参照文献[15]。

2 结果

2.1 不同碳源对于 *P. pastoris* pGAP 组成型系统表达 hAS 的影响

不同碳源对于 *P. pastoris* pGAP 组成型系统表达 hAS 影响的试验按照 1.2.1 的方法进行。以不同浓度的碳源摇瓶发酵 *P. pastoris* GS115(pGAP9K-AS) 表达 hAS 的分析结果如下: 甘油的最佳浓度为 1.25%, 其 hAS 表达量为 83mg/L; 葡萄糖的最佳浓度为 1%, 其 hAS 表达量为 76mg/L; 油酸的最佳浓度为 0.75%, 其 hAS 表达量为 163mg/L; 甲醇的最佳浓度为 1%, 其 hAS 表达量为 57mg/L。四种碳源的最佳浓度和 hAS 表达量结果综合于图 1。从图 1 可见 hAS 的分泌表达产量依次为: 油酸 > 甘油 > 葡萄糖 > 甲醇。

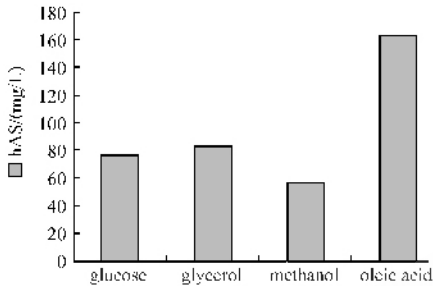


图 1 碳源对于表达 hAS 的影响

Fig. 1 Carbon sources and hAS expression

2.2 以甘油为碳源高密度发酵 GS115(pGAP9K-AS) 表达 hAS

将高密度发酵不同时期收取的样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 2。从图 2 可见 hAS 的分泌在发酵的初期随着 GS115(pGAP9K-AS) 细胞的增殖而增多, 在发酵 36h 细胞的增殖进入稳定生长期时, hAS 的表达也达峰值, 发酵持续 48h 放罐, 收获 hAS 的产量为 169mg/L。

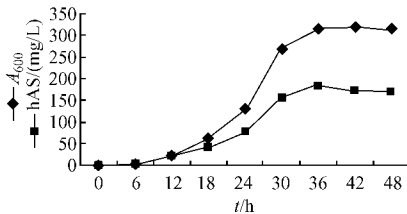


图 2 高密度发酵 GS115(pGAP9K-AS) 组成型表达 hAS

Fig. 2 Constitutive expression of hAS in GS115(pGAP9K-AS) by high-density cell culture

2.3 免疫活性分析

将组成型表达产物的上清液进行 SDS-PAGE, 将电泳胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜后, 进行免疫印迹分析(图 3)。从图 3 结果可见, pGAP9K-AS 重

组子表达的新蛋白带能与人纤溶酶原抗血清特异结合, 显示组成型表达产物具免疫活性。

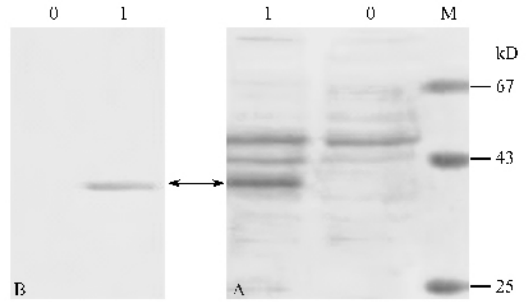


图 3 表达产物的蛋白印迹分析

Fig. 3 Western blot analysis of expressed products
A: SDS-PAGE; B: Western blot; 0: GS115(pGAP9K); 1: GS115(pGAP9K-AS); M: protein marker.

2.4 表达产物的纯化

将原来保存于 20% 乙酸钠、20% 乙醇中的 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换剂装于柱中, 用 1 倍柱体积的 dH₂O 充分洗去乙酸钠和乙醇, 用 2 倍柱体积的 50mmol/L 磷酸氢二钠、24 mmol/L 柠檬酸平衡, 进样后分别用 2 倍柱体积的 0.3mol/L 氯化钠、50mmol/L 磷酸氢二钠、24 mmol/L 柠檬酸、2 倍柱体积的 0.6mol/L 氯化钠、50mmol/L 磷酸氢二钠、24 mmol/L 柠檬酸和 2 倍柱体积的 1mol/L 氯化钠、50mmol/L 磷酸氢二钠、24mmol/L 柠檬酸进行分步洗脱收集; 从 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换剂柱出来的含 hAS 的收集液, 经超滤除盐和浓缩后上 Sephadex G-100 凝胶柱进行过滤, 用 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 进行洗脱。图 4 显示纯化回收目标蛋白的 SDS-PAGE 分析。将图 4 中的泳道 1 进行凝胶光密度积分扫描分析, 结果表明纯化后的 hAS 纯度为 93.6%。

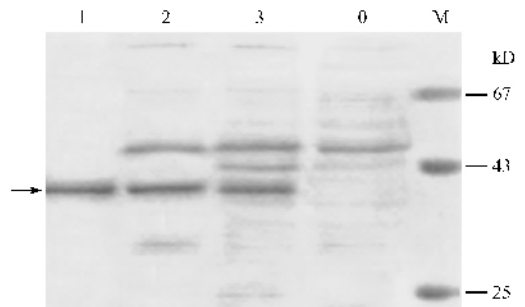


图 4 生物反应器发酵表达及产物纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed and purified products from bioreactor

1: after Sephadex G-100; 2: after SP-Sepharose Fast Flow; 3: culture supernatant of GS115(pGAP9K-AS); 0: culture supernatant of GS115(pGAP9K); M: protein marker.

2.5 表达产物对 CAM 血管生成的抑制作用分析

将载样滤纸(0.8cm × 0.5cm)置于消毒平板中,

各加 30ng bFGF;在试验组的每只鸡胚的载样滤纸上各加 25 μ g(10 μ L)溶解于 PBS 的纯化的 hAS,在对照组的每只鸡胚的载样滤纸上各加 10 μ L PBS。鸡胚消毒后,在气室上打开一个小孔,然后立即用透明胶封口。用砂轮在胚头与气室之间磨出开窗区,去除其蛋壳及膜壳,载样滤纸片放于 CAM 上,用透明带封开窗区。37~39 $^{\circ}$ C、饱和湿度下孵化 48h。孵化结束在开窗区内注入数 1mL 固定液(甲醛:丙酮=1:1),室温放置 10min。揭开卵壳与壳膜暴露 CAM,以载样滤纸为中心,将尿囊膜剪下,放在盛有水的平皿中展开,贴在一张滤纸上,扫描记录结果。结果如图 5 所示,加 bFGF 和 PBS 的对照组鸡胚形成明显的血管丛,而加 bFGF 和甘油为碳源表达的 hAS 的鸡胚只形成少量的血管,说明以甘油为碳源组成型表达的重组 hAS 能抑制 bFGF 诱导的 CAM 血管生成。

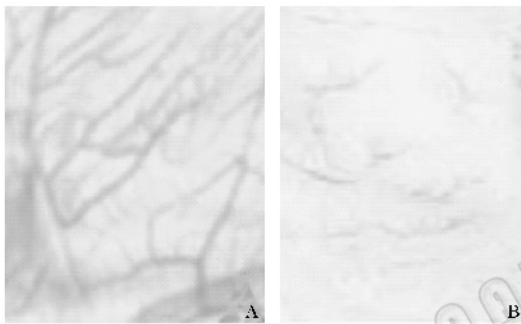


图 5 hAS 抑制 bFGF 诱导的 CAM 血管生成

Fig. 5 hAS inhibits CAM angiogenesis induced by bFGF
A: bFGF + PBS; B: bFGF + hAS.

2.6 表达产物抑制实验小鼠 B16 黑色素瘤的生长

在 7 周雄性 C57BL6/J 小鼠的背部接种 B16 黑色素瘤细胞,当肿瘤达到 200mm³ 时,将动物分为两组($n=4$),对照组注射 PBS 溶液,实验组每天注射 100mg/kg/d 重组 hAS。用药 12d。hAS 的抑瘤活性分析见图 6。注射 PBS 的对照组小鼠背部肿瘤迅速生长,而用 hAS 治疗的实验组小鼠的肿瘤随着治疗时间的推移而减小。统计学分析 hAS 治疗组和 PBS 对照组小鼠的肿瘤体积呈现显著性差异($P < 0.01$),在治疗 12d 后,抑瘤率达到 90%。

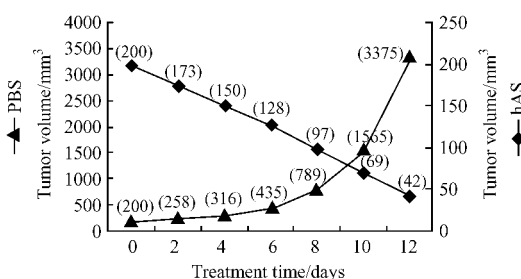


图 6 hAS 抑制实验小鼠 B16 黑色素瘤生长

Fig. 6 Effect of hAS on the growth of mouse B16 melanoma

3 讨论

虽然 *P. pastoris* 的 pAOX1 系统广泛地应用于生产重组蛋白,但由于该系统需具有毒性的甲醇作为碳源,并且生产过程中需要进行碳源转换等缺点,制约了 *P. pastoris* 的 pAOX1 系统的在外源蛋白大规模生产中的应用^[6]。Waterham HR 等首先成功地从 *P. pastoris* 基因组中克隆了 pGAP^[2],此后陆续有报道应用 pGAP 调控在 *P. pastoris* 中成功地表达异源蛋白^[2-5]。由于 pGAP 系统不需要甲醇作为碳源,避免了使用甲醇对于环境的污染,并且,外源蛋白的表达发生于细胞增殖的过程中,在发酵 *P. pastoris* 的过程中不需要进行碳源转换,操作方便,所以 pGAP 系统更适合应用于外源蛋白的大规模生产^[6]。提高 *P. pastoris* 表达外源蛋白的产量是大家十分关心的问题。启动子的强度是影响外源基因在 *P. pastoris* 中表达的主要因素之一。Waterham HR 等证明 pGAP 是组成型强启动子^[2],Döring F 等比较了应用 pAOX1 和 pGAP 在 *P. pastoris* 中表达 rPEPT2,后者的产物量较前者高 5 倍^[3]。Lin J 等报道用 pAOX1 系统在生物反应器中发酵 *P. pastoris* 90h 表达 hAS 17mg/L^[16],本研究应用 pGAP 系统在生物反应器中发酵 *P. pastoris* 48h 表达 hAS 169mg/L。以上结果进一步说明可应用 pGAP 系统替代 pAOX1 系统在 *P. pastoris* 中表达血管生成抑制素及其他外源蛋白。

P. pastoris 的 pGAP 受到碳源的强烈调控^[6],因此,研究和选择合适的碳源对于提高目标产物的表达产量有着重要的作用。Döring 等报道用葡萄糖为唯一碳源表达的 rPEPT2 是以甘油为唯一碳源的大约两倍^[3]。Menendez J 等的研究表明应用甘油作为唯一碳源能获得更多的产物^[17]。由于来自这些不同报道的基因拷贝数可能不同并且发酵的方法和基因不同等,很难对比出哪种碳源较好。本研究通过摇瓶发酵比较了以葡萄糖、甘油、甲醇和油酸为唯一碳源对 *P. pastoris* 工程菌 GS115(pGAP9K-AS) 表达 hAS 的影响。结果表明 hAS 的表达产量依次为:油酸 > 甘油 > 葡萄糖 > 甲醇。以甘油为碳源表达 hAS 的产量虽然低于以油酸为碳源的 hAS 表达产量,但从重组蛋白的生产成本考虑,油酸不仅价格高于甘油,而且油酸是油性物质,纯化过程中,存在于发酵液中的油酸不仅会影响填料对目标蛋白的吸附还对填料有损伤作用,不利于填料的回收与再生,从而影响表达蛋白质的纯化和生产成本的增加。

(我们接下来的研究将进一步探讨以油酸作为 *P. pastoris* 胞内表达 hAS 的唯一碳源) 据此, 本研究选择目标蛋白表达量仅次于油酸的甘油作为唯一碳源进行高密度发酵的进一步研究。

以甘油为唯一碳源在生物反应器中进行连续补料高密度发酵获得的 hAS 产量是摇瓶发酵的产量的两倍多。甘油是水溶性物质, 不具粘性, 在高密度发酵中作为补料成分容易操作, 分布于含甘油的发酵液中的蛋白能够用常规方法(例如离子交换和凝胶过滤)纯化, 并且不会影响填料的回收与再生; 甘油不具有变性蛋白质的作用, 以甘油为碳源表达的 hAS 仍然保持良好的抑制新生血管生成活性和抗实验小鼠癌的功能。以上结果说明, 甘油适合于作为 *P. pastoris* PGAP 组成型表达系统表达 hAS 及其他外源蛋白的唯一碳源。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 1993, **11**(8): 905 - 910
- [2] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, **186**(1) 37 - 44.
- [3] Döring F, Klapper M, Theis S, et al. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250**(2) 531 - 535
- [4] Goodrick JC, Xu M, Finnegan R, et al. High level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris*, expression system. *Biotechnol Bioengineering*, 2001, **74**(6): 492 - 497
- [5] Zhang AI(张爱联), Luo JX(罗进贤), Zhang TY(张添元), et al. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2004, **31**(6): 552 - 557.
- [6] Cos O, Ramon R, Montesinos JL, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: A review. *Microb Cell Fact*, 2006, **5**: 17.
- [7] Cereghino GPL, Cregg JM. Application of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(5): 422 - 427
- [8] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**(4) 367 - 375
- [9] Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1998, **15**, **14**(8): 783 - 790.
- [10] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, **79**(2): 315 - 328.
- [11] Luo JX(罗进贤), Lu WJ(卢文菊), Li WQ(李文清), et al. Cloning, sequencing of human angiostatin gene and its expression in *E. coli*. *Progress in Natural Science* (自然科学进展), 1999, **9**: 672 - 677.
- [12] Invitrogen Corp, San Diego, CA. 1998. A Manual of Methods of Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*.
- [13] Zhang TY(张添元), Luo JX(罗进贤), Lu XY(陆幸妍). Cloning and expression of kringle 123 gene of human plasminogen and the purification and bioactivity of its expressed product. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(5): 593 - 596.
- [14] O'Reilly MS, T Boehm, Y Shing, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, **88**: 277 - 285.
- [15] Kurebayashi J, McLeskey SW, Johnson MD, et al. Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and LacZ. *Cancer Res*, 1993, **53**: 2178 - 2187.
- [16] Lin J, D Panigraphy, LB Trinh, et al. Production process for recombinant human angiostatin in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, **24**: 31 - 35.
- [17] Menendez J, Valdes I, Cabrera N. The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, 2003, **20**(13): 1097 - 1108.