

猪 IFN $\alpha$  在毕赤酵母中分泌表达条件的  
优化及高密度发酵

蓝胜芝<sup>1 2</sup> , 于瑞嵩<sup>2 3</sup> , 俞明月<sup>1 2</sup> , 董世娟<sup>2 3</sup> , 曹祥荣<sup>1</sup> , 李震<sup>2 3</sup>

( 1. 南京师范大学生命科学学院 , 江苏 南京 210097 )  
( 2. 上海市农业遗传育种重点实验室 , 上海 201106 )  
( 3. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 , 上海 201106 )

[ 摘要 ] 从发酵时间、接种量、pH 值、诱导剂量等方面对重组基因工程( 毕赤酵母甲醇利用缓慢型 ) 的摇瓶发酵条件进行了优化 , 进一步探索了酵母菌表达猪 IFN $\alpha$  的发酵工艺 , 包括种细胞密度对初始发酵期的影响 , 补加甘油、甲醇速率条件的控制等。结果表明 , 摇瓶发酵时 , 诱导最佳时间为 96 h , 甲醇最适浓度为 8 g/L , 发酵 pH 范围为 6.4 ~ 9.0 , 最适接种量 2:1。在分批发酵、接种量为 10% 且种子细胞光密度( OD<sub>600</sub> ) 为 5 ~ 6 时 , 最有利于细胞的高密度培养 , 在补料发酵时 , 根据溶氧控制甘油流加速率与时机 , 细胞干重达到 118.75 g/L , 在 48 h 重组猪 IFN $\alpha$  表达量达到 1.304 g/L。

[ 关键词 ] 猪 IFN $\alpha$  , 毕赤酵母 , 摇瓶发酵 , 高密度发酵

[ 中图分类号 ] Q939.9 [ 文献标识码 ] A [ 文章编号 ] 1001-4616( 2006 ) 03-0076-05

Studies on Expression Conditions of PoIFN $\alpha$  and High-density Fermentation  
for Genetically Engineered Pichia Pastoris

Lan Shengzhi<sup>1 2</sup> , Yu Ruisong<sup>2 3</sup> , Yu Mingyue<sup>1 2</sup> , Dong Shijuan<sup>2 3</sup> , Cao Xiangrong<sup>1</sup> , Li Zhen<sup>2 3</sup>

( 1. School of Life Sciences , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China )  
( 2. Shanghai Key Laboratory for Agricultural Breeding , Shanghai 201106 , China )  
( 3. Institute of Shanghai Key Laboratory for Livestock Breeding and Veterinarian , Shanghai 201106 , China )

**Abstract** The optimum fermentation conditions of genetically engineered Pichia pastoris in shake-flask cultivation and in fed-batch fermentation are reported respectively in this paper. Experimental results revealed that the fermentation period induced with methanol is 96 h. The optimum methanol is 8 g/L , pH range is 6.4 ~ 9.0 and the seed inoculum amount is 2 :1 in shake-flask fermentation. Although the seed inoculum amount increases , the target protein concentration decreases. The 10% inoculum and 5 ~ 6 OD<sub>600</sub> of seed are benefit to the high density cultivation. With glycerol feeding strategy based on DO level , the cell dry weight of broth reaches 118.7 g/L and the IFN concentration is 1.034 g/L by methanol inducement for 48 hours at the fed-batch fermentation phase.

**Key words** PoIFN $\alpha$  , pichia pastoris , shake-flask fermentation , high-density fermentation

0 引言

干扰素是动物中出现最早、作用最快的第一抵御病毒体系 , 能够诱导一系列细胞内的蛋白表达 , 继而发挥抗病毒、抗细胞增殖和调节免疫应答等作用<sup>[1]</sup>。使用干扰素防治家畜病毒性疾病克服了传统抗病毒药物成本高、副作用大、疗效不佳等缺点。

目前 , 国内用于防治病毒性疾病的猪 IFN $\alpha$  主要由诱导的猪白细胞中提取 , 成本较高 , 限制了它的广泛

收稿日期 : 2005-12-06。  
基金项目 : 上海市农业科学院青年技术带头人培养基金、上海市农业科学院青年科技发展基金资助项目( 上海农青科 2005 - 2 )。  
作者简介 : 蓝胜芝 , 女 , 1981— , 硕士研究生 , 主要从事细胞与分子生物学的学习与研究。 E-mail : lanshengzhi@sohu.com  
通讯联系人 : 李震 , 1963— , 博士 , 研究员 , 主要从事动物生物技术的教学与研究。 E-mail : zhenli60@public3.sta.net.cn

应用<sup>[2]</sup>. 为了解决这个问题,我们选择具有高表达、高分泌、高稳定等特点的甲醇利用缓慢型( Mut<sup>s</sup> )毕赤酵母为宿主菌,并实现了 IFN $\alpha$  基因在其中的分泌表达<sup>[3]</sup>.

目前国内外关于甲醇利用慢型毕赤酵母的研究多集中在基因表达方面,而关于摇瓶表达和高密度发酵优化的报道比较少. 本文分别在不同的时间、不同的诱导型、不同的 pH、不同的诱导剂量方面进行了详细的对比研究,得到了一套较完善的在甲醇利用慢型毕赤酵母中表达猪 IFN $\alpha$  基因的优化条件,并根据结果对基因工程菌毕赤酵母高密度发酵表达重组猪 IFN $\alpha$  基因的工艺优化进行了研究.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

巴斯德毕赤酵母( *Pichia pastoris* )KM71H( IFN $\alpha$ -pPICZ $\alpha$ A )菌株( Mut<sup>s</sup>his<sup>-</sup>, P<sub>AOX1</sub>, 载体 pPICZ $\alpha$ , 蛋白信号肽序列为来自毕赤酵母  $\alpha$ -MF, 外源基因为猪 IFN $\alpha$  cDNA, 载体呈线型整合在染色体上),由本实验室构建.

#### 1.1.2 培养基

酵母培养采用 YPD, BMGY, BMMY, 发酵用基本培养基及 PTM1 见 INVITROGEN 公司实验手册.

#### 1.1.3 仪器

5 L 不锈钢发酵罐购自德国 B. brau 公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 摇瓶发酵方法

从新鲜培养基上挑一单菌落到 100 mL 摇瓶生长培养基中, 30℃, 250 ~ 300 r/min, 培养至 OD<sub>600</sub> 值为 2 ~ 6, 1 500 ~ 3 000 g 室温离心 5 min 收集菌体, 菌体沉淀用 20 mL BMMY 重悬, OD<sub>600</sub> 值为 1 左右, 28 ~ 30℃, 250 ~ 300 r/min 培养 4 ~ 5 d, 每 24 h 补加甲醇至一定浓度, 并在 0, 24, 48, 72, 96, 120 h 分别取少量的培养上清进行分析.

#### 1.2.2 补料高密度发酵方法

接种单菌落于 5 mL BMGY 中, 30℃, 250 ~ 300 r/min, 培养过夜, 将菌液转入 300 mL BMGY 中培养至 OD<sub>600</sub> 到 5 ~ 6, 按 10% 接种量接入到 3 L 分批发酵培养基进行培养( 用 25% NH<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O 调 pH 至 5.0 ), 通过调节转速、通气量和补料速度等控制溶氧不低于 20%. 培养约 18 ~ 20 h, 此时培养基中的甘油大部分已消耗完毕, 进入补料阶段. 以溶氧为反馈控制参数流加甘油, 既补加甘油, 直至溶氧开始下降, 停止补加; 后在溶氧回升的过程中补加甘油, 待溶氧出现下降现象后停止补料. 如此流加 8 ~ 10 h 左右( 整个过程通过控制通气量、搅拌速度等控制溶氧不低于 20% ). 细胞光密度达到 300 ~ 500, 结束补料. 当溶氧迅速回升到最高值后, 饥饿 0.5 h, 以消耗掉残余的甘油, 开始甲醇诱导. 最初 6 h 以每升培养基 1.0 mL/h 的速度, 流加甲醇( 12 mL PTM 1/L ), 6 h 后将补料速度升至每升培养基 2.0 mL/h, 溶氧稳定. 之后每隔 6 h 左右缓慢增加甲醇的补入量, 最大不超过 3 mL/h, 并维持溶氧值在 20% 以上. 发酵过程中每 12 h 取样, 进行 SDS-PAGE 分析.

#### 1.2.3 细胞光密度( OD<sub>600</sub> )分析

菌液稀释后于波长 600 nm 以去离子水为对照进行比色测定 OD<sub>600</sub> = 读数 × 稀释倍数.

#### 1.2.4 细胞干重分析

10 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 水洗 2 次, 60℃ 烘干至恒重.

#### 1.2.5 IFN $\alpha$ 分析

发酵产物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 凝胶图像处理系统进行分析.

## 2 结果

### 2.1 摇瓶发酵

#### 2.1.1 基因工程菌 *P. Pastoris* 甲醇诱导培养表达猪 IFN $\alpha$

按摇瓶培养方法对基因工程菌( *P. Pastoris* )用 5 g/L 甲醇浓度诱导培养 120 h, 每 24 h 取样进行分析.

万方数据

结果见图 1.

在 120 h 的甲醇诱导培养过程中 ,随着诱导时间的增长 ,目的蛋白表达量也逐渐增多 ,96 h 显著提高 ,达到 323. 109 mg/L ,之后目的蛋白量基本不变. 从缩短发酵周期及防止蛋白酶对表达产物的可能降解 ,将最适诱导时间定为 96 h.

2. 1. 2 甲醇浓度对基因工程菌 *P. Pastoris* 表达 IFN $\alpha$  的影响

按摇瓶培养方法每 24 h 分别补加甲醇使其在培养基中浓度为 5、8、10、20、30、40 g/L. 诱导培养 96 h. 结果见图 2.

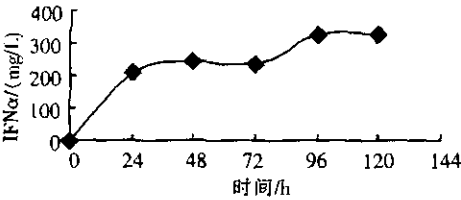


图 1 不同摇瓶时间表达猪 IFN $\alpha$

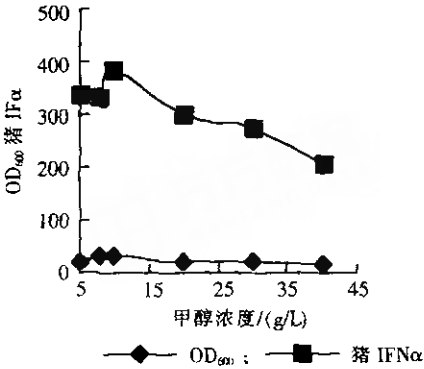


图 2 不同甲醇浓度对重组 *P.pastoris* 表达猪 IFN $\alpha$  的影响

由图可知 ,在摇瓶条件下 ,甲醇浓度在 5 ~8 g/L 范围内 ,目的蛋白表达量较高. 在 10 g/L 时达到最大 ,为 381. 618 mg/L. 随着甲醇浓度的继续升高 ,目的蛋白表达量开始下降 ,到 30 g/L 杂蛋白显著增多( 电泳图略) ,目的蛋白量及细胞光密度显著下降 ,可能诱导阶段甲醇浓度过高 ,对细胞产生损伤 ,从而影响目的蛋白的表达. 所以在摇瓶培养条件下最有利于目的蛋白表达的甲醇浓度为 8 g/L.

2. 1. 3 pH 对基因工程菌( *P. Pastoris* )表达 IFN $\alpha$  的影响

按摇瓶培养方法把菌种接至用 0. 1 mol/L 磷酸缓冲液配制好的摇瓶诱导培养基中 ,pH 分别 5. 40、5. 63、5. 79、6. 96、7. 52、7. 73. 结果见图 3.

由图可知 ,在酸性范围内 ,目的蛋白表达量与细胞光密度都很低 ,pH 在 6. 96 ~7. 73 的范围内蛋白表达量较高 ,且细胞光密度基本相同. 为了进一步确定最有利于目的蛋白表达的 pH 范围 ,又进一步做了两个不同 pH 范围浓度的摇瓶实验 ,分别为 5. 79、6. 4、6. 96、7. 52、8. 19、8. 55、9. 65 与 5. 79、6. 4、7. 0、7. 4、7. 73、8. 19、8. 85. 我们发现 ,在 pH 为 6. 4 ~8. 85 这个范围内较有利于目的蛋白的表达 ,且细胞光密度波动不大. 可见 ,在摇瓶条件下 ,碱性环境不仅适合目的蛋白的表达 ,同样适合重组菌株的生长.

2. 1. 4 接种量对基因工程菌( *P. Pastoris* )表达 IFN $\alpha$  的影响

按摇瓶培养方法培养细胞 ,根据摇瓶生长培养基体积与摇瓶诱导培养基体积之比分别为 0. 5:1 ,1:1 ,2:1 ,3:1 ,4:1 ,5:1 ,离心摇瓶生长培养基中菌体 ,弃去上清液 ,分别接入摇瓶诱导培养基中 ,培养 96 h. 结果见图 4.

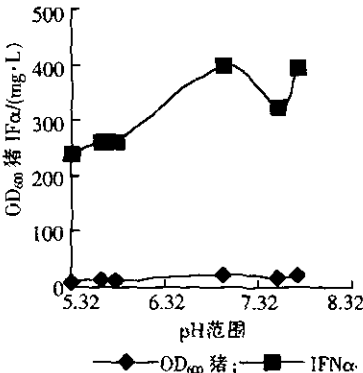


图 3 不同 pH 对重组 *P.pastoris* 表达猪 IFN $\alpha$  的影响

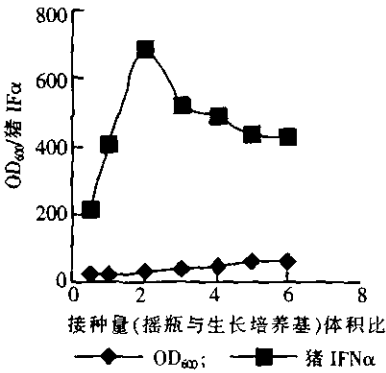


图 4 不同接种量对重组 *P.pastoris* 表达猪 IFN $\alpha$  的影响

在接种量为 0.5:1 时,目的蛋白表达较少,随着接种量的增加,细胞光密度与目的蛋白表达量也逐渐升高,细胞光密度在 5:1 时达到最高,之后开始下降.而目的蛋白表达量则在 2:1 时最大(678.66 mg/L).这可能是由于接种量过多,往往使菌丝生长过快、培养液粘度增加,造成溶解氧不足,从而影响产物合成.可见在摇瓶条件下,最适接种量为 2:1.

2.2 基因工程菌( *P. Pastoris* )高密度发酵

2.2.1 接种龄对重组菌株前期生长的影响

通常接种龄以菌丝处于生命力极为旺盛的对数生长期,且培养液中菌体量还未达到最高峰时,较为合适.我们针对毕赤酵母的对数生长期(OD<sub>600</sub> 为 2~6),分别将不同种龄的种子接入发酵罐中进行高密度发酵,发现其对重组菌株前期生长影响显著,结果见图 5.

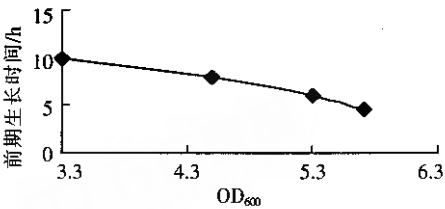


图 5 种细胞密度对细胞前期生长的影响

由图可知,种细胞密度在 3.3 时,前期生长缓慢(10 h),从而延长了整个发酵周期,产物开始形成的时间也随之推迟,且表达量较低.随着接入的种细胞密度的增大,前期生长时间也逐渐缩短(种细胞密度为 5.7 时,前期生长时间仅为 3.3 时的 45%),这不仅缩短了发酵周期,也使目的蛋白在较短时间内得到表达.

2.2.2 甘油流加方式对工程菌生长的影响

不同的补料措施,对细胞密度、生长速率及生产率会产生不同的效果.为了有效的进行中间补料,必须选择适当的反馈参数.我们比较了两种不同流加甘油的方式.一种为参考 Pichia Fermentation Process Guidelines(Invitrogen),每小时每升培养基加入 20 mL 甘油;一种为以溶氧作为反馈控制参数补加甘油.两种流加方式对工程菌生长的影响见图 6.

根据 IVITROGEN 推荐的补料流加方式,不仅所需补料时间长,且细胞光密度较低,达不到高密度发酵的目的(补料约 12 h,OD<sub>600</sub> 值不到 200).而以溶氧为反馈控制参数流加甘油,则可在较短时间内获得比较高的菌体密度(补料约 8.5 h,OD<sub>600</sub> 值达到 305.7).

2.2.3 补料高密度发酵表达猪 IFN $\alpha$  的结果

根据补料高密度发酵方法进行多批高密度发酵.在补加甲醇之前,目的蛋白含量几乎为零,开始补加后,重组猪 IFN $\alpha$  蛋白浓度迅速升高,在发酵 48 h 达到 1.304 g/L,后目的蛋白量相差不大,SDS-PAGE 电泳图显示,在诱导之后,相对分子质量为 18 000~24 000 范围有一片弥散的蛋白带出现,可能为目的蛋白降解产物(图 7).

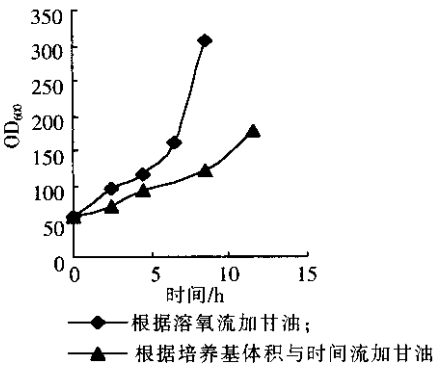


图 6 甘油流加方式对细胞生长的影响—补料生长阶段

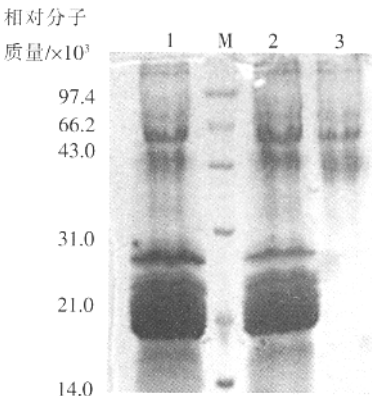


图 7 不同时间的发酵上清  
M:Maker; 1:48 h; 2:24 h; 3:0 h

3 讨论

摇瓶试验的结果显示,在摇瓶条件下最有利于目的基因表达的范围在 6.5~8.85.在高密度发酵时将甘油利用期的 pH 值定为 5.诱导期的 pH 值定为 6.5~7.0,这样既可以使细胞处于较好的生长状态,又保

万方数据

证了外源基因的高表达,低 pH 值也减少了细菌污染的可能性.

根据 INVITROGEN 的表达手册,摇瓶培养时,甲醇浓度高于 5 g/L 时就有可能对细胞产生毒性作用.但从摇瓶试验我们可以看出,重组菌株对于甲醇的耐受性很高(甲醇浓度为 40 g/L 时,目的蛋白表达量为 204.09 mg/L).而在高密度发酵时,重组菌株对于甲醇浓度却十分敏感,在高于 1% 的浓度下目的蛋白几乎不表达(结果略).分析原因,摇瓶培养时对甲醇的耐受性高,可能是在摇瓶培养时,溶氧不足,使得甲醇代谢的速率受到了限制,从而避免了细胞内甲醛和过氧化氢的过量积累<sup>[4]</sup>.因而在摇瓶发酵的连续诱导过程中适当提高甲醇浓度,应更有利于目的蛋白的表达.但在高密度发酵时,供氧充分,过高的甲醇浓度就会对细胞产生毒性作用,从而影响目的蛋白的表达.巴斯德毕赤酵母 KM71H( IFN $\alpha$ -pPICZ $\alpha$ A )菌株为甲醇利用缓慢型,在利用甲醇为碳源时,氧气消耗量很低,无法根据溶氧的波动控制流加甲醇.根据摇瓶发酵的研究结果,结合 Pichia Fermentation Process Guidelines( Invitrogen ),在发酵初始,甲醇以 1 mL/h/liter 的方式流加,之后缓慢提高,最终浓度不超过 3 mL/h/liter.

巴斯德毕赤酵母( *Pichia pastoris* )具有强烈的好氧生长偏爱性,有较宽的 PH 适应范围( 3.0 ~ 8.0 ),可在极高的培养密度下维持高水平表达,因而适合大规模工业化生产.但是其发酵周期长一直是无法逾越的难题.在酵母及不少其他微生物菌体的生产中,溶氧值是控制其代谢方向的最好指标之一.其原理是在发酵过程中添加碳源时,菌丝量和呼吸会因此增加,摄氧率多少取决于所补碳源的质和量,溶氧呈明显下降趋势.相反培养液中可以利用的碳源减少,便导致呼吸的减少,溶氧上升.本文在高密度发酵时,提高了种细胞光密度并结合根据溶氧来流加甘油后,将生长阶段缩短到 30 h 以内,大大缩短了整个发酵周期.这将非常有利于猪 IFN $\alpha$  的中试研究以及之后的发酵生产.

本文在完成酵母工程菌 KM71 的构建和 IFN $\alpha$  在毕赤酵母表表达的基础上,对工程菌的摇瓶表达及发酵工艺进行了研究.首先对工程菌生长和表达的最适条件进行了摸索,确定了摇瓶发酵的最适诱导时间、甲醇浓度、pH 和接种量.结合摇瓶表达的优化结果,又进行了多批 5 L 罐发酵,探索了猪 IFN $\alpha$  大批生产的发酵工艺流程及优化的重要参数.为重组猪 IFN $\alpha$  的规模化生产打下良好的基础.由于具体的发酵设备和其它条件的限制,最后的生物量和表达水平还不够高,还有改善和提高的余地.

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法[ M ].北京:人民卫生出版社,1999:540-541.
- [ 2 ] 黄海,谢蓓,于瑞嵩.猪 IFN $\alpha$  基因在毕赤酵母中的高效分泌表达[ J ].遗传,2005,27:215-220.
- [ 3 ] Huang Hai, Xie Pei, Yu Ruisong. High level secretion expression of PolIFN $\alpha$  in *Pichia pastoris*[ J ]. Hereditas, 2005, 27: 215-220.
- [ 4 ] David Files Masahiro Ogawa, Christine H Scaman, Susan A, Baldwin. A *Pichia pastoris* for producing high-levels of recombinant human cystatin-[ J ]. Enzyme and Microbial Techonology, 2001, 29: 335-340.

[ 责任编辑:孙德泉 ]