

流式细胞术检测毕赤酵母发酵过程中胞内活性氧水平

Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry in *Pichia pastoris* Fermentation

肖安风, 周祥山, 周利, 张元兴*

XIAO An-Feng, ZHOU Xiang-Shan, ZHOU Li and ZHANG Yuan-Xing*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

摘 要 以 2', 7'-二氯二氯荧光黄双乙酸钠 (DCFH-DA) 和碘化丙锭 (PI) 为标记探针, 通过 DCFH-DA/PI 双染色与 PI 单染色的对照, 检测毕赤酵母胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平及其影响。研究发现发酵过程细胞活性下降与胞内 ROS 积累相关。在甘油生长期, 细胞几乎没有 ROS 积累, 细胞活性接近 100%。在甲醇诱导初期, 部分细胞积累少量的 ROS, 细胞活性仍然很高, 死亡细胞所占比例只有 1.5%。在甲醇诱导后期, 94.0% 的细胞积累了大量的 ROS, 高含量的 ROS 造成细胞损伤, 引起部分细胞丧失了活性, 在总共 29.1% 的死亡细胞中, 高 ROS 积累的死亡细胞占了 25.4%。

关键词 流式细胞术, 毕赤酵母, 活性氧, 细胞活性

中图分类号 Q2-33 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0273-05

Abstract In *Pichia pastoris* fermentation, methanol was oxidized into carbon oxide and produced a byproduct H_2O_2 , one of the partially reduced forms of molecular oxygen known as reactive oxygen species (ROS). ROS are highly damaging towards cellular constituents. Flow cytometry (FCM) is an excellent method that permits the rapid, optical analysis of individual cells and has many advantages over conventional cytometry. However, its use in detecting intracellular ROS levels during *Pichia* fermentation was rarely reported. In our work, by means of flow cytometry, two fluorescent dye 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and propidium iodide (PI) were used to detect ROS. The effect of intracellular ROS on *Pichia pastoris* cells during fermentation was studied through the comparison between DCFH-DA/PI double-stained cells and PI single-stained cells. In this study, the loss of cell viability during fermentation was correlated with the accumulation of ROS. At the glycerol batch and fed-batch phase, little ROS was accumulated intracellularly and cell viability reached almost 100%. At the early methanol fed-batch phase, intracellular ROS accumulation took place but 98.5% cells still kept viable. At the later methanol fed-batch phase, 94.0% cells accumulated high ROS. As a result, some cells lost their viability because of the damage of ROS. 25.4% dead cells accumulated high ROS in the total 29.1% dead cells.

Key words flow cytometry, *Pichia pastoris*, reactive oxygen species, cell viability

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是指氧的某些衍生物如超氧负离子 (O_2^-)、羟自由基 ($OH\cdot$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 等, 过量的 ROS 能够使生物大分子如

DNA、蛋白质、脂类发生过氧化链式反应, 造成细胞结构的损伤, 影响生理活性^[1,2]。检测细胞内活性氧的方法很多, 有分光光度计法、化学发光法、激光

扫描共聚焦显微镜法和电子自旋共振法等。流式细胞技术(Flow cytometry, FCM)能够快速地对个体细胞进行光化学分析,使研究人员建立个体细胞在群体中的多维表象,与常规的细胞计数方法相比具有很多优势^[3],如精确度高,重复性好等优点。

流式细胞术可以检测细胞的多种生理生化指标,如细胞周期^[4]、细胞凋亡^[5]、细胞活性^[6]、抗原特性^[7]等。人们最早从动物细胞开始利用流式细胞术检测胞内 ROS。Rothe 等 1990 年利用流式细胞术检测了噬细胞的呼吸活性^[8],Luo 等建立了一种检测受损脊髓神经细胞 ROS 水平的新方法^[9]。微生物细胞胞内 ROS 的流式细胞术检测的报道不多,Howlett 检测了铜离子所引起的酿酒酵母胞内 ROS 的变化,发现 ROS 水平对细胞周期有一定影响^[10]。

基因工程巴斯德毕赤酵母在分泌表达外源蛋白已经得到了广泛的应用,它容易培养,可以进行高密度发酵培养,外源蛋白表达量高,分泌蛋白易于纯化,是最有前景的商业蛋白质生产工具之一^[11,12]。在毕赤酵母发酵过程中,甲醇氧化产生代谢副产物过氧化氢,过氧化氢积累可能会对细胞产生氧化性损伤,并可能影响酵母细胞的生长并且引起外源蛋白的降解,但目前国内外对这个问题并没有确凿的实验数据证明。利用流式细胞术对毕赤酵母代谢甲醇所产生的过氧化氢等 ROS 产物的检测目前在国内外也未见文献报道,本文首次通过以 2',7'-二氯二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)和碘化丙啶(PI)为探针,建立流式细胞术检测胞内 ROS 的方法并对发酵过程胞内 ROS 含量变化对细胞的定量影响加以分析。

1 材料与方法

1.1 菌株

Mut⁺ 型毕赤酵母基因工程菌由山东东阿阿胶股份有限公司提供。

1.2 细胞培养

种子培养:2 L 三角瓶中装入 500mL 种子培养基(无氨基酸酵母氮源 YNB 1.34g/L,甘油 15mL/L,生物素 0.4mg/L)0.1MPa 湿热灭菌 30min,接入单菌落 30℃、200r/min 培养至 OD_{600} 为 6.0。

5 L 罐发酵:发酵罐内装入 3L 发酵培养基(85% H_3PO_4 21.36mL/L, KOH 4.13g/L, $CaSO_4$ 0.82g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.90g/L,甘油 40g/L, ANTIFOAM 204 (Sigma) 0.33mL/L), 1×10^5 Pa 湿热灭菌 30min,再加入 4.4mL/L 微量元素溶液 PTM, 1:10 接种, 28℃, 溶

解氧 > 40% 培养 22 h 以补料培养基(50% 甘油, 1×10^5 Pa 湿热灭菌 30min, 再加入 4.4mL/L PTM)限制性补料至菌体湿重 200g/L, 然后以甲醇为唯一碳源限制性流加^[13]。

1.3 荧光试剂

碘化丙啶(PI, Sigma)溶液:1mg PI 溶于 1mL 去离子水中, 4℃ 避光保存。2',7'-二氯二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA, Sigma)溶液:0.02mmol DCFH-DA 溶于 1mL DMSO 中, -20℃ 避光保存。

1.4 FCM 检测

DCFH-DA/PI 双染色:用 PBS 溶液将发酵样品稀释为 1×10^7 cells/mL 的细胞悬液,吸取 1mL,加入 5 μ L DCFH-DA 溶液, 37℃、50r/min 避光负载 30min, 然后将溶液置于冰上避光保藏。检测前加入 5 μ L PI 溶液,然后于流式细胞仪(FACSCalibur, 美国 BD 公司)上检测,激发光波长 488nm,每个样品收集 1×10^4 个细胞, CellQuest 软件分析结果。PI 单染色:另取 1mL 上述细胞悬液,加入 5 μ L PI 溶液,流式细胞仪检测,每个样品收集 1×10^4 个细胞,作为双染色的阴性对照。

2 结果与讨论

2.1 ROS 的 FCM 图谱

DCFH-DA 可以通过细胞膜进入细胞内,在胞内非特异性脂酶的催化下,变成 2',7'-二氯二氯荧光黄(DCFH), DCFH 不能发出荧光。当细胞内有 ROS 存在时, DCFH 可以被氧化成 2',7'-二氯二氯荧光黄(DCF), 在激光激发下发出绿色荧光,波长在 660nm 左右。

当酵母的细胞膜不完整时,PI 可以进入细胞,与 DNA 结合,发出波长 530nm 左右的红色荧光,而 PI 不能进入具有完整细胞膜的活细胞,因此可以通过 PI 染色检验毕赤酵母发酵过程的细胞活性。当 PI 染色为阳性(PI⁺)时为死亡细胞,而 PI 染色为阴性(PI⁻)时为活细胞。

取诱导 60 h 后的发酵液,稀释到所需浓度后,分成 A、B、C 三份, A 中只加入 PI 进行单染色, B 加入 PI 和 DCFH-DA 两种试剂,进行双染色, C 在 B 的基础上还加入 5g/L 的甲醇,然后分别对 A、B、C 进行 FCM 检测,得到以下结果(图 1)。DCF 发出绿色荧光,强度对应胞内 ROS 含量,以 FL1-H1 表示,PI 发出红色荧光,强度以 FL3-H 表示。

根据图 1 的结果,设定特定的“十字门”将双染色图谱分为四个区:左下区域为双阴性区(DCF⁻/PI⁻)对应于无(或低)ROS 积累活细胞;右下区为

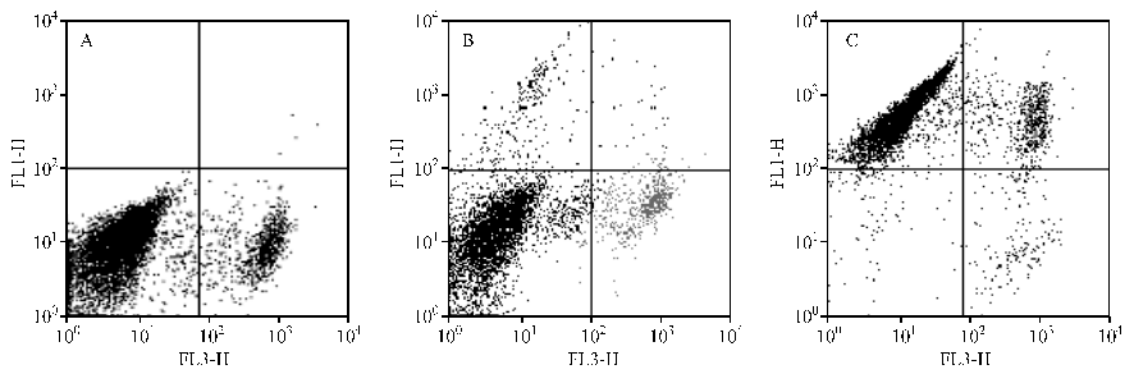


图1 不同染色方式流式细胞检测结果 (FL1-H : DCF 染色强度 ; FL3-H : PI 染色强度)

Fig.1 The results of different staining methods with FCM (FL1-H : DCF staining height ; PI staining height)

A : PI single-stained dot plots (the control) ; B : DCFH-DA/PI double stained dot plots ; C : DCFH-DA/PI double stained dot plots (adding 5g/L methanol).

DCF 阴性 PI 阳性区 (DCF⁻/PI⁺), 为无 (或低) ROS 积累的死亡细胞 ; 左上为 DCF 阳性 PI 阴性区 (DCF⁺/PI⁻) 高 ROS 积累活细胞 ; 右上为双阳性区 (DCF⁺/PI⁺), 为高 ROS 积累死亡细胞。

图 1A 为只加 PI 的阴性对照, 通过“门”的设立, 可以将细胞分为两部分, 其中 PI 染色阳性的为死亡细胞, 而没有被 PI 染色的为活细胞。在毕赤酵母的发酵过程中, 甲醇氧化产生代谢副产物过氧化氢, 而过氧化氢又被细胞自身产生的过氧化氢酶除去, 加入荧光染料 DCFH-DA, 就可以检测到胞内 ROS 的残留量。图 1B 为 DCFH-DA/PI 双染色的图谱, 与图 1A 相比, 某些细胞已被 DCF 染色, 显示出较强的荧光强度, 细胞内部有过量 ROS 存在, 这说明甲醇代谢所产生的过氧化氢等 ROS 副产物并不能完全被除去。由于发酵过程中甲醇不断地补加, 酵母连续地消耗甲醇, 过氧化氢不断地产生, 考虑到培养基中总是有甲醇存在这种情况, 在 DCFH-DA/PI 双染色过

程中添加 5g/L 甲醇, 得到如图 1C 的图谱。图 1C 中几乎所有的细胞在纵坐标的荧光强度值都很高, 即处于 ROS 过量的情况。

图 1A、B、C 比较可知, 毕赤酵母自身的过氧化氢酶具有除去 ROS 的能力, 但并不能即时除去, 细胞内仍然有大量 ROS 存在。

2.2 甘油补料期 ROS 含量

在甘油补料期 (20 h), DCFH-DA/PI 双染色的 FCM 图谱 (图 2B) 与 PI 单染色的 FCM 图谱 (图 2A) 几乎完全相同。当 DCFH-DA 进入细胞后, 生成 DCFH, 由于甘油的氧化途径不产生 ROS 副产物, 酵母细胞内几乎没有 ROS 存在, 因此 DCFH 不能转化为 DCF, 也就不会发出荧光, FCM 图谱上细胞显示为 DCF⁻/PI⁻。对图 2A 进行“门”分析, 此时期的细胞活性接近 100%。

2.3 甲醇诱导期 FCM 图谱

当发酵进行至 29h 后, 更换碳源, 使用甲醇诱

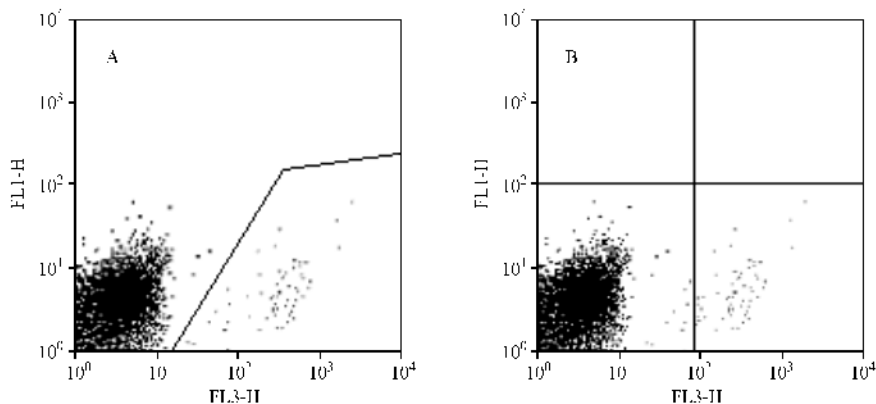


图2 发酵 20 h 样品的 FCM 图谱

Fig. 2 Staining dot plots of *P. pastoris* cells at 20 h

A : PI single-stained dot plots ; B : DCFH-DA/PI double-stained dot plots (adding 5g/L methanol)

导 酵母产生催化甲醇的氧化酶 利用甲醇获得能量 用于生长与蛋白表达 ,同时 ,也不断产生代谢副产物 H_2O_2 。

甲醇诱导初期(37h)的 FCM 图谱如图 3 所示。DCF 的荧光强度要高于 20h 的荧光强度 ,这说明 ROS 已经开始在细胞中产生积累。由于这时甲醇的消耗速率较低 ,ROS 的积累量不高 ,细胞仍能够承受这种压力 ,大部分细胞仍处于 PI^- 状态 ,保持较高的活性 死细胞所占比例只有 1.5%。

经过一段时间的适应后 ,酵母利用甲醇的速度加快 ,产生的过氧化氢也相应增加。在甲醇诱导后

期(88 h) ,如图 4 ,细胞基本上分为 DCF^+ / PI^- 和 DCF^+ / PI^+ 两个部分 ,这两部分总计为 94.0% ,即 94.0% 的细胞都显示出高水平的 ROS 积累 ,其它低水平的 ROS 积累两部分的细胞很少。

同时从图中也可看出 ,过量的 ROS 使细胞所承受的氧化压力大大高于甲醇诱导初期 ,造成细胞结构损伤 ,引起细胞活性的丧失 ,图中只有 68.6% 的细胞为高 ROS 积累的活细胞 ,而 25.4% 细胞为高 ROS 积累的死亡细胞 ,还有 3.7% 细胞为低 ROS 积累的死亡细胞 ,死细胞总比例为 29.1% ,远高于甲醇诱导初期(如图 3)的 1.5%。

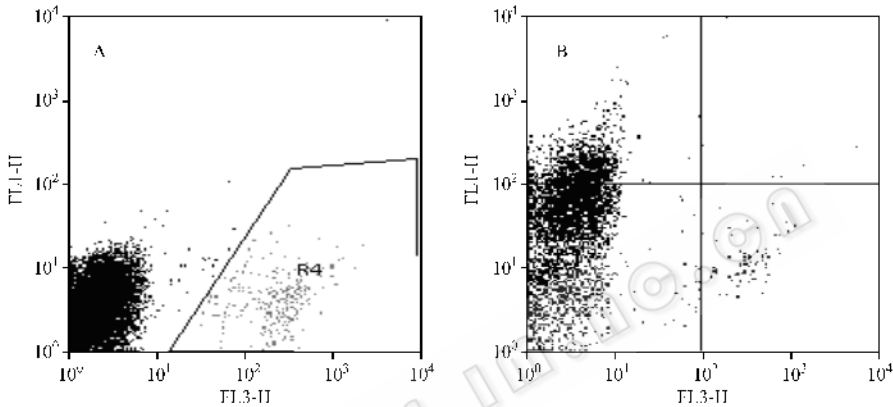


图 3 发酵 37 h 样品的 FCM 图谱

Fig. 3 Staining dot plots of *P. pastoris* cells at 37 h

A : PI single-stained dot plots ; B : DCFH-DA/PI double-stained dot plots (adding 5g/L methanol).

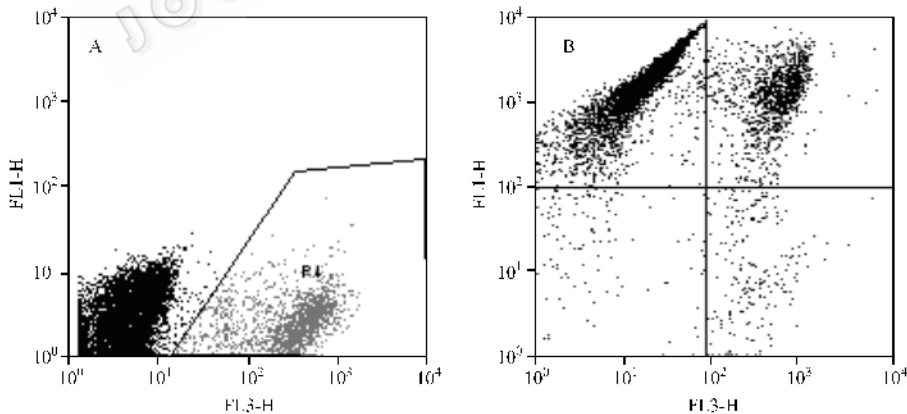


图 4 发酵 88 h 样品的 FCM 图谱

Fig. 4 Staining dot plots of *P. pastoris* at 88 h

A : PI single-stained dot plots ; B : DCFH-DA/PI double-stained dot plots (adding 5g/L methanol).

3 结论

本文以 DCFH-DA 和 PI 两种试剂对酵母进行染色 ,通过对荧光强度信号的分析 ,可以检测毕赤酵母胞内 ROS 水平 ,并首次定量分析了 ROS 积累对毕赤

酵母细胞活性的影响。实验证明 ,不同发酵时期胞内 ROS 水平不一 ,对细胞膜的损伤程度不一。甘油补料期检测不到 ROS 的积累 ,细胞活性高。在甲醇诱导初期 ,有少量的 ROS 积累 ,细胞仍能维持完整的膜结构 ,保持较高的活性。在甲醇诱导后期 ,

94.0%的细胞内积累了大量的 ROS ,25.4% 的细胞已经死亡。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Storz G , Christman MF , Sies H *et al.* Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1987 , **84** : 8917 – 8921
- [2] Wolff SP , Garner A , Dean RT. Free radicals , lipids and protein degradation. *Trends Biochem Sci* , 1986 , **11** : 27 – 31
- [3] Davey HM. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci* , 2002 , **24** : 91 – 97
- [4] Yi X , Sun X , Zhang Y. Effects of osmotic pressure on recombinant BHK cell growth and von willebrand factor (vWF) expression. *Process Biochem* , 2004 , **39** : 1817 – 1823
- [5] Raha S , Robinson BH. Mitochondria , oxygen free radicals , and apoptosis. *Am J Med Genet* , 2001 , **106** : 62 – 70
- [6] Hohenblum H , Borth N , Mattanovich D. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *J Biotechnol* , 2003 , **102** : 281 – 290
- [7] Dietrich MA , Truax RE , French DD *et al.* Measurement of antibody binding to intact bacteria using flow cytometric technique. *J Microbiol Meth* , 1991 , **13** : 281 – 291
- [8] Rothe G , Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2' , 7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* , 1990 , **47** : 440 – 448
- [9] Luo J , Li N , Paul Robinson J *et al.* Detection of reactive oxygen species by flow cytometry after spinal cord injury. *J Neurosci Meth* , 2002 , **120** : 105 – 112
- [10] Howlett NG , Avery SV. Flow cytometric investigation of heterogeneous copper-sensitivity in asynchronously grown *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* , 1999 , **176** : 379 – 386
- [11] Cregg JM , Cereghino JL , Shi J *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* , 2000 , **16** : 23 – 52
- [12] Curvers S , Brixius P , Klauser T *et al.* Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnol Prog* , 2001 , **17** : 495 – 502
- [13] Yang JZ(杨继忠) , Zhou XS(周祥山) , Xie XJ(谢锡军) *et al.* Emerging order of species of hirudin in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Microbiology* (微生物学通报) , 2004 , **31** (5) : 24 – 27