

基因工程人 α 心钠素发酵研究

叶勤 陶坚铭 张嗣良

(华东理工大学生化工程研究所, 上海 200237)

蔡海波 李育阳

(复旦大学遗传所, 上海 200433)

摘要 本研究采用的基因工程菌为酵母 Y33::YFD71-3, 其基因型为 α , his, leu, ade, suc, 摇瓶培养时心钠素的表达水平为 1—2mg/L。在含有葡萄糖、YNB 以及不同量腺嘌呤、组氨酸和亮氨酸的 YG 培养基中作摇瓶培养, 当细胞的生长由腺嘌呤限制时, 蛋白的分泌有明显增加, 在 YG 培养基中加入 5g/L 的 CAA 后腺嘌呤成为限制性基质, 培养基中腺嘌呤、YNB 和亮氨酸用量对心钠素的表达有很大影响。在 5L 反应器中进行补料分批培养, 流加葡萄糖、YNB、CAA、腺嘌呤、组氨酸和亮氨酸, 心钠素的最高浓度达到 24.8mg/L。

关键词 人 α 心钠素, 发酵, 限制性基质, 流加补料

心钠素 (Atrial Natriuretic Peptide, ANP) 是哺乳动物心房组织心肌细胞产生的一种多肽类激素, 具有很强的利尿、排钠、调节血压的功能^[1,2], 有希望成为治疗充血性心力衰竭、高血压等疾病的有效药物。心钠素实际上包括一系列大小不同的多肽化合物, 其中由 28 个氨基酸组成的人 α 心钠素 (h α ANP) 分子量较小而作用较强。应用基因重组技术使微生物表达心钠素, 有可能实现心钠素的大规模生产, 因而受到各国的重视, 我国在这方面也取得了许多成果^[3-5]。外源基因在微生物中的表达受到许多因素的影响, 如重组质粒的结构和稳定性、启动子的作用强度、宿主的特性及其与载体间的相互影响、工程菌所处的环境条件以及生物反应器的性能等。对工程菌的培养过程加以适当的控制, 有可能使外源基因的表达得到大幅度的提高^[6,7]。本文报道一株生产人 α 心钠素的基因工程酵母菌 Y33::YFD71-3 的培养条件研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

本研究采用的菌种为酵母 Y33::YFD71-3, 由复旦大学李育阳教授课题组构建。这是一株整合有心钠素表达质粒 YFD71 的酵母菌 Y33, 其基因型为 α , his, ade, leu, suc, 有关其构建过程将另文发表。

1.2 培养基

YG 培养基 (g/L) :: YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco) 6.67, 葡萄糖 20, 腺嘌呤 0.02, 组氨酸 0.02, 亮氨酸 0.04。平板培养基: 在 YG 培养基中补充琼脂 20g/L。发酵培养基: 在 YG 培养基中补充 CAA (Casamino Acid, Difco) 5g/L。摇瓶复合培养基: 腺

嘌呤为 40mg/L, 其它成分同发酵培养基。

1.3 培养方法

种子培养: 挑取保存在 YG 平板上的 Y33::YFD71-3 一环, 接到 250ml 三角瓶中的 50ml YG 培养基中, 于 30℃ 旋转摇床培养 24 小时。发酵: 将上述种子培养液按 3% 接种量接入 250ml 三角瓶中的 25ml 发酵培养基或 RIBE-5 型发酵罐中的 3L 发酵培养基中, 30℃ 培养 36—48 小时。

1.4 测定方法

菌体浓度的测定: 将培养液用去离子水进行适当稀释, 测定在波长 600nm 处的光密度 (OD_{600})。葡萄糖的测定: 将培养液样品离心, 取上清液适当稀释, 用二硝基水杨酸 (DNS) 试剂显色, 测定波长 520nm 处的光密度, 与标准曲线对照求出葡萄糖浓度。蛋白浓度的测定: 培养液的离心上清液与蛋白测定试剂 (Bio-Rad) 作用显色, 在 595nm 测定光密度, 与标准曲线对照。心钠素活性的测定: 用放射免疫法测定。

2 结果与讨论

2.1 分批培养及补料的初步试验

Y33::YFD71-3 在 5L 发酵罐中用 YG-CAA 培养基分批培养时, OD_{600} 可达 5—6 (图

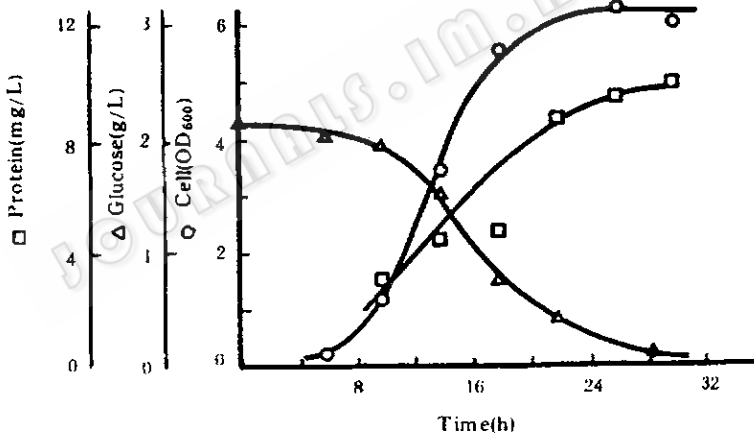


图 1 酵母 Y33::YFD71-3 的分批培养

Fig. 1 Time course of batch cultivation of yeast Y33::YFD71-3.

1), 蛋白浓度约为 10mg/L, ANP 表达量 1—2mg/L, 比 Y33 (YFD36) 和 Y33 (YFD42) 等^[2]均高。培养 28 小时左右, 培养液中的葡萄糖已基本耗尽, 菌体浓度不再增加。为了提高培养液的菌体浓度, 从而增加心钠素的生产量, 在分批培养的 24 小时开始流加葡萄糖, 到 36.5 小时菌体浓度 (OD 值) 为 7.05, 蛋白含量为 11.1mg/L, 与分批培养相比均无明显增加。为考察补料的作用又进行了一些试验, 如在 12 小时补加培养基全料, 并流加葡萄糖和腺嘌呤, 在 41 小时菌体浓度达到 OD 为 19.0, 蛋白浓度增加到 18.8mg/L, 但心钠素仅 2.70mg/L; 在发酵 13 小时补加培养基全料并流加葡萄糖、腺嘌呤、YNB、亮氨酸和组氨酸, 到 60 小时菌体浓度达到 OD 为 22.5, 蛋白浓度增加到 78.13mg/L, 但心钠素也只有 3.68mg/L。补料的初步结果表明, 在分批培养中限制菌体

生长的主要因素不是葡萄糖,培养基中其它成分的用量对 Y33::YFD71-3 的生长和蛋白的生产有很大影响。

2.2 摇瓶培养

为了了解培养基中各种成分对心钠素工程菌发酵过程的影响,进行了以下摇瓶试验。

2.2.1 合成培养基 (YG) 中腺嘌呤、组氨酸和亮氨酸用量的影响: 本实验采用 YG 培养基作为发酵培养基,以避免 CAA 的干扰。将含有不同量腺嘌呤 (Ade)、组氨酸 (His) 和亮氨酸 (Leu) 的 YG 培养基接种后,30℃ 振荡培养 36 小时,结果见表 1。由表 1 可以看到, YG 培养基中腺嘌呤和组氨酸的含量大约过量一倍左右,将它们的含量各减少一半时,未见到对菌体生长和蛋白合成的影响。当它们的含量进一步减少时, Y33::YFD71-3 的生长受到很明显的抑制,而蛋白的分泌则有增加的趋势。但是,减少 YG 培养基中亮氨酸的含量则同时抑制菌体生长和蛋白合成。由此看来,以腺嘌呤作为限制性基质最为有利,因为当菌体的生长受到限制时,过量存在的各种氨基酸可用于蛋白的合成,从而大大提高蛋白的得率系数。

表 1 YG 培养基中 Ade, His 和 Leu 对摇瓶培养的影响

Table 1 Effects of Ade, His and Leu on shaking flask cultures in the YG medium

No.	Ade (mg/L)	His (mg/L)	Leu* (mg/L)	Cell density (OD ₆₀₀)	Protein (mg/L)	Protein/cell density (mg/OD · L)
1	20	20	40	2.99	2.79	0.93
2	10	20	40	3.12	2.90	0.93
3	5	20	40	2.68	3.34	1.25
4	2.5	20	40	1.70	4.99	2.94
5	1	20	40	0.90	3.92	4.35
6	20	10	40	3.00	3.04	1.01
7	20	2.5	40	1.84	3.64	1.98
8	20	1	40	1.00	2.66	2.66
9	20	20	20	2.20	2.77	1.26
10	20	20	10	1.78	2.08	1.17
11	20	20	5	1.09	1.53	1.40

* Other components in the medium: YNB, 6.67g/L and glucose, 20g/L

2.2.2 发酵培养基中各种成分的影响: 发酵培养基中加有 CAA 以提供各种氨基酸, Y33::YFD71-3 在发酵培养基中的生长速度和菌体浓度都比在 YG 培养基中高。改变发酵培养基中腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸、CAA 和 YNB 的用量进行摇瓶培养,结果见表 2。

表 2 发酵培养基中各种成分对摇瓶培养的影响

Table 2 Effects of the constituents in the fermentation medium on shaking flask cultures

No.	Concentration (mg/L)					Cell density (OD ₆₀₀)	ANP (mg/L)	ANP/cell density (mg/OD · L)
	Ade	Leu	His	CAA	YNB			
1	10	20	10	2500	3335	4.81	2.19	0.46
2	20	40	20	2500	3335	9.94	8.86	0.89
3	10	40	20	5000	6670	4.63	2.50	0.54
4	10	20	20	5000	6670	4.05	0.31	0.08
5	20	20	10	5000	6670	8.60	7.10	0.83
6	20	40	10	5000	6670	9.88	8.69	0.88

CAA 对菌体生长的效果相当明显，即使含量只有 2.5g/L，培养 36 小时达到的菌体浓度是 YG 培养基中的 3 倍多。CAA 的添加使腺嘌呤成为限制性基质，减少腺嘌呤用量一半的几个试验，菌体浓度均下降了约一半，心钠素的表达量也明显减少。这表明了用发酵培养基培养时及时补充腺嘌呤的重要性。另外，虽然 CAA 提供了各种氨基酸，但亮氨酸的补充仍是必不可少的，如将其用量减少会影响心钠素的表达，而组氨酸的补充则影响不大。如将腺嘌呤和亮氨酸的用量同时减少，心钠素的表达将受很大影响。

2.2.3 复合培养基中 YNB 和 CAA 的影响：在发酵培养基中腺嘌呤已成为限制性基质，因而将培养基中的腺嘌呤用量增大，进一步作摇瓶考察。(1) YNB 的影响：YNB 中除了含有 $(NH_4)_2SO_4$ 外，还含有多种维生素和微量元素，对 Y33::YFD71-3 的生长代谢有较大影响。在复合培养基中不同 YNB 的用量下心钠素发酵的情况见表 3。YNB 的用量减

表 3 复合培养基中 YNB 的影响

Table 3 Effects of YNB in the complex medium

YNB (g/L)	Cell density (OD ₆₀₀)		μ (h ⁻¹)		ANP (mg/L)	ANP/cell density
	10h	36h	10—24h	24—36h	36h	(mg/OD · L)
6.67	0.81	15.3	0.18	0.03	4.36	0.29
3.33	0.44	10.7	0.19	0.04	6.44	0.60
1.67	0.32	7.16	0.13	0.11	20.53	2.87
0.83	0.25	3.48	0.04	0.17	2.64	0.76

Other constituents of the medium (g/L): Glucose, 20; CAA, 5; Ade, 0.04; Leu, 0.04; and His, 0.02.

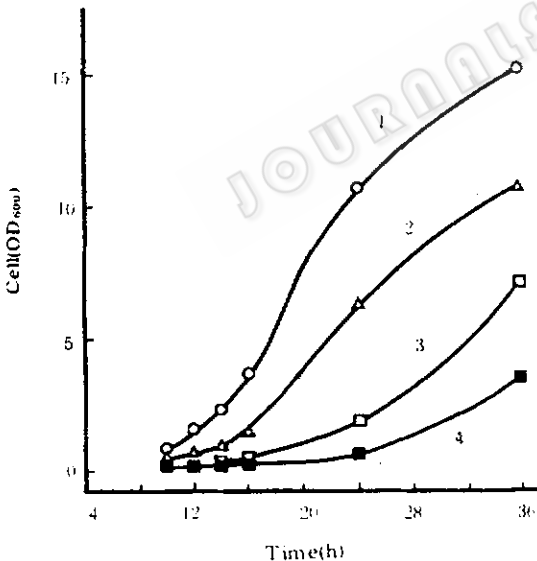


图 2 YNB 对 Y33::YFD71-3 生长的影响

Fig. 2 Effect of YNB on the growth of Y33::YFD71-3

Initial YNB concentration: 1. 6.67g/L, 2. 3.33g/L, 3. 1.67g/L, 4. 0.83g/L

少后，虽然菌体浓度会有所下降，但在一定范围内心钠素的表达却有明显的增加。YNB 对 Y33::YFD71-3 在分批培养的延迟期影响较大(图 2)，对比生长速率的影响则不太严重。当 YNB 的用量较多(3.33—6.67g/L)时，10—24 小时的平均比生长速率(μ)为 0.18—0.19h⁻¹，而 24—36 小时因某些基质的消耗降到 0.03—0.04h⁻¹，心钠素的生成很少。当 YNB 的用量很低(0.83g/L)时，Y33::YFD71-3 表现出很长的延迟期，后期比生长速率达到 0.17h⁻¹，与 YNB 用量较多时的前期相似，但高比生长速率并不与高心钠素生产对应。当 YNB 的用量为 1.67g/L (Ade/YNB 约为 1/42)时，24—36 小时仍有较高的比生长速率，心钠素的生产则有较大的增加。

(2) CAA 的影响：复合培养基中 CAA 的用量与菌体生长、心钠素产生的关系见表 4。减少 CAA 的用量使菌体和心钠素浓度均有明显的下降，其用量很低时会严重影响心钠素的生成。这一表现与酵母 DCO4 (YFD Δ 21)^[27]相似。复合培养基中腺嘌呤的含量较 YG 高

一倍,虽加入了CAA可补充组氨酸和亮氨酸,但它们(特别是亮氨酸)仍是限制性基质,因而CAA对生长和心钠素表达影响较大。

表4 CAA用量对ANP发酵的影响

CAA (g/L)	Cell density (OD ₅₀₀)	ANP (mg/L)	ANP/cell density (mg/OD · L)
5	15.3	4.36	0.29
1	10.2	3.36	0.33
0.5	8.1	0.30	0.04

Composition of the medium (g/L): YNB 6.67, glucose 20, adenine 0.04, histidine 0.02 and leucine 0.04.
Cultivation time: 36h

2.3 补料分批培养

补料是对培养过程进行控制的有效手段,而限制性基质的选择对产物的生产有很大影响。限制性基质选择得恰当,可使微生物初级代谢产物^[8]或酶^[9]的产量大幅度提高。在基因工程大肠杆菌的培养中,控制限制性基质葡萄糖的浓度可大大增加 α 干扰素^[10]或 γ 干扰素^[11]的生成。对于Y33::YFD71-3,以腺嘌呤

作为限制性基质,控制YNB的用量,并使氨基酸过量,可提高心钠素的生产。为了提高心钠素发酵的菌体浓度从而增加心钠素的生产,则必须补充腺嘌呤和有关的氨基酸特别是亮氨酸,同时还要适当补充CAA和YNB。此外,为了维持适当的比生长速率,不但要有较恰当的补料液配比,还要有合适的补料速度。

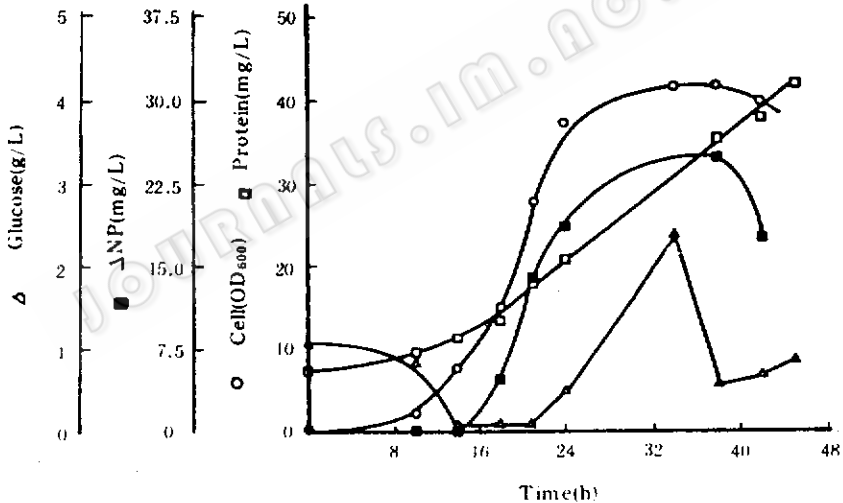


图3 Y33::YFD71-3的补料分批培养(流加复合培养基)

Fig. 3 Time course of batch cultivation fed with glucose, YNB, CAA, adenine, histidine and leucine

补料分批培养在华东理工大学生化工程研究所研制的RIBE-5型玻璃发酵罐中进行,温度、溶解氧、搅拌转速、pH等由智能控制器控制和显示,排气通入二氧化碳分析仪测定二氧化碳含量,发酵过程由上位计算机发酵控制软件包FCS控制并显示和收集有关数据。发酵过程中流加CAA、YNB、腺嘌呤、亮氨酸和组氨酸的混合溶液(其中Ade/YNB为1/50)以及60%葡萄糖,根据排气二氧化碳的变化调整补料速率,使排气中二氧化碳的含量维持在一个较高的水平,经34小时培养,培养液中的心钠素达到24.8mg/L(图3),比分批培养有了大幅度的增加。

参 考 文 献

- [1] De Bold A J. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1982, **170**: 133—138.
[2] De Bold A J and Flynn T G. *Life Science*, 1983, **33**: 297—302.
[3] 施涛涛, 郑 坚, 王勇雄等. *上海医科大学学报*, 1986, **13**: 161—166.
[4] 秦 宁, 李育阳. *科学通报*, 1988, (5): 398—399
[5] 魏 楠, 秦 宁, 李育阳等. *遗传学报*, 1990, **17**: 63—69.
[6] Bailey F J *et al.*; *J Ind Microbiol*, 1987, **2**: 47—52.
[7] 秦 宁, 李育阳, 杨 迪等. *生物工程学报*, 1989, **5**: 24—29.
[8] White C E *et al.* *J Dent Res*, 1976, **55**: 239—243.
[9] Acevedo F and Cooney C L, *Biotech Bioeng*, 1973, **15**: 493—508.
[10] Ye Q, *et al.* *Biochemical Engineering for 2001*, Furusaki S (ed.), Tokyo: Springer, 1992, 221—224.
[11] 张嗣良. 叶 勤等. *全国生化反应工艺及工程学术报告会论文摘要集*, 1991, p. 30.

Human α Atrial Natriuretic Peptide Fermentation by Using a Genetically Engineered Yeast Strain

Ye Qin Tao Jianming Zhang Siliang

(*Research Institute of Biochemical Engineering,*

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Cai Haibo Li Yuyang

(*Institute of Genetics, Fu Dan University, Shanghai 200433*)

Abstract The genotype of the recombinant yeast strain Y33::YFD71-3 used in this study was α , his, leu, ade and suc. Preliminary batch cultures in shake flasks showed the expression level of atrial natriuretic peptide (ANP) was 1—2 mg/L. Shake flask cultures were carried out in YG media which contained glucose, yeast nitrogen base (YNB), and different amounts of adenine, histidine and leucine. When cell growth was limited by adenine, protein secreted from Y33::YFD71-3 cells was increased obviously. Adenine became the limiting substrate when the YG medium was supplemented with 5g/L of casamino acid (CAA) and the level of ANP expression was influenced by the concentrations of adenine, YNB and leucine in the medium. In fed batch cultures carried out in a RIBE-5 fermenter, the cultures were fed with glucose and a mixture of YNB, CAA, adenine, histidine and leucine to improve cell growth and ANP expression, and the maximum ANP concentration in the culture reached 24.8mg/L.

Key words Human α atrial natriuretic peptide, fermentation, limiting substrate, feeding