

## pH 对毕赤酵母表达重组人复合 $\alpha$ 干扰素的降解影响

张 盛, 郝玉有, 储 炬, 王永红, 郭美锦, 张嗣良, 庄英萍

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

**摘 要:** 使用 *Pichia pastoris* 表达重组人复合 $\alpha$ 干扰素(cIFN)会发生降解、聚合等不均一表达的现象。在 5 L 发酵罐中考察了不同诱导pH对cIFN表达产生降解的影响, 结果发现在适合酵母生长的pH 3.0~7.0 范围内, 当诱导pH为 4.0~5.0 时, cIFN不均一表达现象最少, 生物活性达到  $2.5 \times 10^8$  IU/mL。通过测定发酵液中总蛋白酶活和细胞活性寻找了cIFN降解出现的原因: 发现低诱导pH下细胞死亡率升高释放更多酶系, 高诱导pH下蛋白酶活性明显增大, 两者都使蛋白酶作用加强, 加剧cIFN的降解; 特别是诱导pH为 7.0 时, 适宜的pH使蛋白酶活陡升, 将cIFN完全降解。

**关键词:** pH, cIFN, 降解, 流式细胞仪

## Effect of pH on Proteolytic Degradation of Consensus Interferon- $\alpha$ Expressed by *Pichia pastoris*

Sheng Zhang, Yuyou Hao, Ju Chu, Yonghong Wang, Meijin Guo, Siliang Zhang, and Yingping Zhuang

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

**Abstract:** We observed the heterogeneity of consensus interferon (cIFN) expressed by *Pichia Pastoris*, such as aggregation and degradation. The effect of induction pH on degradation of cIFN was studied in a 5-L bioreactor. The heterogeneity of cIFN was less serious when induced at pH 4.0~5.0. The bioactivity of the fermentation supernatant reached  $2.5 \times 10^8$  IU/mL when pH was controlled between 4.0 and 5.0. To seek the reason of cIFN degradation, we analyzed the activity of protease and cell mortality by flow cytometry. At lower pH, cell mortality was higher and more protease was released. Protease activity increased at higher pH. The proteolytic degradation of cIFN was enhanced at either high or low pH. The cIFN was degraded entirely when pH was 7.0, where the protease had its optimal pH.

**Key words:** pH, consensus interferon, protease, degradation, flow cytometry, *Pichia pastoris*

重组人复合 $\alpha$ 干扰素(Consensus Interferon, cIFN)是一种氨基酸序列重组的非天然存在的人 $\alpha$ 型干扰素, 其分子量约为 19 kD, 集中了多种天然 $\alpha$ 干扰素的优点, 具有更强、更广谱的抗病毒作用<sup>[1]</sup>。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是一种比较理

想的真核微生物表达系统, 但也会出现分泌蛋白聚合、降解等现象, 降低蛋白的生物活性和产量, 并给蛋白的纯化和工业化带来了很大困难<sup>[2]</sup>。因此在毕赤酵母表达cIFN时, 就会产生严重的不均一表达现象<sup>[2]</sup>。研究表明通过降低诱导温度可以明显改善

Received: April 5, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30560006) and Shanghai Dawn Tracking Plan (No. 06GG07).

Corresponding author: Yingping Zhuang. Tel: +86-21-64253658; Fax: +86-21-64253702; E-mail: ypzhuang@ecust.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30560006), 上海市曙光跟踪计划(No. 06GG07)

cIFN表达的聚合现象,得到稳定单体<sup>[1,3]</sup>。在此基础上,本文继续研究诱导pH对cIFN降解的影响。

酵母表达系统中外源蛋白的降解主要是由酵母产生的蛋白酶引起的,细胞死亡或裂解而释放胞内蛋白酶导致分泌型重组蛋白降解的机理已被广泛接受<sup>[4]</sup>。不同的蛋白酶有不同的最适pH作用范围,通过选择适当的发酵pH可以有效降低蛋白酶的活性,减少目的蛋白的降解<sup>[5]</sup>。同时,改变pH这一重要的生理指标,对细胞的活性也会产生很大影响。本研究分析了诱导pH、cIFN降解、发酵液中总蛋白酶活和细胞死亡率之间的相关性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)GS115/pPIC9-cIFN (R164S)由北京军事医学科学院提供。

### 1.2 培养方法

#### 1.2.1 种子培养方法

挑取 YPG 平板上的新鲜单菌落,接入含有 50 mL BMGY 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,于 30<sup>o</sup>C, 220 r/min 培养至 OD 为 6~8 时,将 50 mL 种子培养液全部接入 5 L 发酵罐中(含 1.8 L 的基础盐培养基)。

#### 1.2.2 5 L 罐发酵培养

甘油生长相和过渡相温度控制 30<sup>o</sup>C, pH 为 5.4,通过调节搅拌转速 200~900 r/min 之间来维持溶解氧(DO)在 30%以上。当基础料中的甘油耗尽后,此时 DO 急剧上升,开始流加浓度为 50%甘油,并以维持 DO 在 40%为依据控制甘油补料速率,甘油相补料时间约为 5 h。随后停止补甘油,进入甲醇诱导相,一次性加入 5 g 甲醇,以在线甲醇电极监控发酵液中的甲醇残留浓度来控制甲醇流加速率,并维持 DO>20。后期溶氧过低,则控制甲醇流加速度,优先维持溶氧。通过氨水和酵母生长自身产酸控制甲醇诱导相的 pH,诱导温度为 20<sup>o</sup>C。

#### 1.2.3 发酵培养基

基础盐培养基: 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 26.7 mL/L, CaSO<sub>4</sub> 0.93 g/L, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18.2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, PTM<sub>1</sub> 4 mL/L。121<sup>o</sup>C 湿热灭菌 30 min。

补料: 50%的甘油,100%甲醇,分别加入PTM<sub>1</sub> 12 mL于每升补料溶液中。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 菌体浓度

菌体浓度通过测定细胞密度(OD<sub>600</sub>)来确定:菌

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

#### 1.3.2 总蛋白浓度的测定

Bradford考马斯亮蓝法<sup>[6]</sup>测定。

#### 1.3.3 蛋白电泳

凝胶配方和电泳操作过程参照《蛋白质电泳实验技术》<sup>[7]</sup>方法进行。还原电泳浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%;天然电泳浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 6%,考马斯亮蓝染色。采用BandScan5.0凝胶图像处理软件分析,根据电泳条带染色强度进行定量分析。

#### 1.3.4 cIFN 免疫印迹(Western blotting)

电泳后的凝胶不进行染色,直接将上面的蛋白转到硝酸纤维膜上,先用 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6 缓冲液洗涤,再用 5%的脱脂奶粉(PBST 稀释, PBST: 0.01 mol/L PBS + 0.05% Tween, pH 7.5)作为封闭液封闭,再用含有 1:1000 的鼠抗 $\alpha$ 干扰素单抗(Abcam 公司)室温反应 2h,洗涤后用含有 1:500 羊抗鼠过氧辣根化酶(KPL 公司)室温反应 2 h,洗涤后最后用新鲜制备的底物二氨基联苯胺溶液(DAB 溶液)显色 5 min,用去离子水冲洗终止显色反应。

#### 1.3.5 生物活性测定

采用细胞病变抑制法<sup>[8]</sup>,采用WISH细胞/VSV系统测定。

#### 1.3.6 细胞死亡率测定

采用流式细胞仪方法<sup>[9]</sup>。

样品处理:取发酵液,用 0.1 mol/L PBS溶液稀释使细胞数目约为(1~5)×10<sup>6</sup> 个/mL,取 3 mL稀释液,加入 20  $\mu$ L PI (Sigma; 1 mg/mL),摇匀,10 min 内测定。

流式细胞仪检测:使用 BD 流式细胞仪 FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), PBS 溶液作为流动鞘液(sheath fluid),PI用氩离子激发荧光,使用 530/30 BP filter (FL1)作细胞自发荧光分析,660/16 BP filter (FL3) 作 PI 荧光分析。

流式细胞仪测定细胞活性标准的建立:取生长相后期 16~18 h(对数增长期)发酵液,通过未加热处理样品和沸水水浴 10 min(杀死全部细胞)两种方式处理样品,稀释后加 PI 处理测定细胞活性,其死亡率分别为 0 和 100%,来校正流式细胞仪测定参数。

#### 1.3.7 蛋白酶活的测定

采用紫外光谱法测定<sup>[10]</sup>,发酵液在一定的温度与对应pH值条件下,水解酪素底物,水浴 60<sup>o</sup>C 灭酶,

然后加入三氯乙酸使未水解的酪素沉淀除去，滤液在 275 nm 处有吸收，由酪氨酸标准溶液制作标准曲线，计算出蛋白酶活力。缓冲溶液采用不同 pH 值的磷酸氢二钠和柠檬酸溶液。

## 2 结果

### 2.1 pH 对蛋白表达、cIFN 活性和稳定性的影响

按照 1.2.2 方法分别控制诱导 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 发酵，结果表明(图 1)，诱导 pH 为 5.0 时，总蛋白表达量最高，达到 2.18 g/L，升高与降低 pH 都造成总蛋白量下降。pH 升至 7.0 时，诱导 24 h 后总蛋白浓度上升至 0.71 g/L，之后迅速下降，发酵后期一直停留在 0.4 g/L 左右。结合还原电泳分析(图 2a)，说明此 pH 下蛋白发生严重的降解，目的蛋白条带消失，而 pH 4.0 和 5.0 下诱导时能较好控制降解。对此电泳做 western blotting(图 2b)，并用 BandScan5.0 分析软件粗略估算，pH 4.0 和 5.0 的降

解量分别占目的蛋白相关物总量的 5.9%和 7.3%。诱导 pH 降到 3.0 或升到 6.0，都使降解现象加剧，相应比例分别增加到 14.4%和 32.7%。pH 7.0 诱导 66h 的样品在图 2b 上没有免疫反应，这进一步证明，此时发酵液中已不存在任何 cIFN 蛋白。

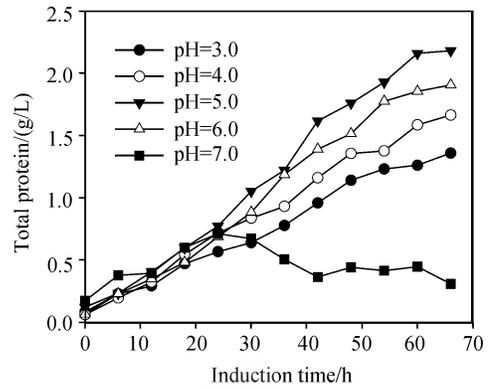


图 1 不同诱导 pH 下总蛋白的表达量  
Fig. 1 Effect of induction pH on the expression level of total proteins

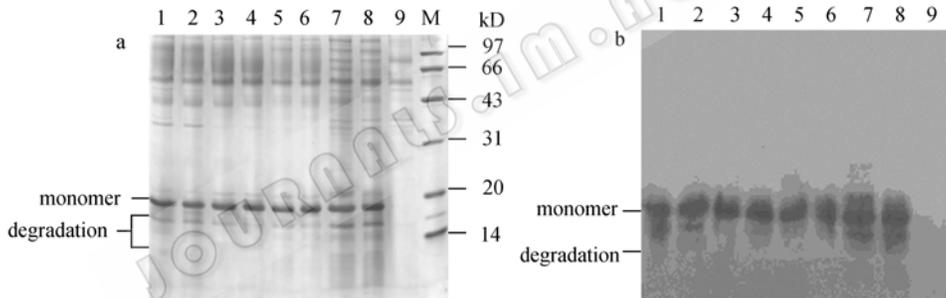


图 2 不同诱导 pH 下发酵上清液还原电泳(a)和对应的免疫印记结果(b)  
Fig. 2 SDS-PAGE (a) and Western blotting (b) analyses of supernatants under different induction pH  
1-2, 3-4, 5-6, 7-8: pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 induced at 60, 66 h, respectively; 9: pH 7.0, induced at 66 h; M: marker

天然电泳结果表明(图 3)，pH 4.0 到 5.0 范围也有利于减少发酵液中单体 cIFN 发生聚合的程度，此时发酵液中单体含量明显高于其他 pH 下的情况。生物

活性分析(表 1)也证实，pH 为 4.0 与 5.0 时，生物活性最高，达到  $2.5 \times 10^8$  IU/mL，而较低或较高 pH 下引发的聚合和降解，都不同程度得降低了生物活性，pH 7.0 没有检测出生物活性。由于聚合和降解产物的复杂性，导致无法准确测得单体蛋白的表达量，造成比活力计算的困难，若以总蛋白表达量计算比活，则诱导 pH 4.0 下比活性最高。

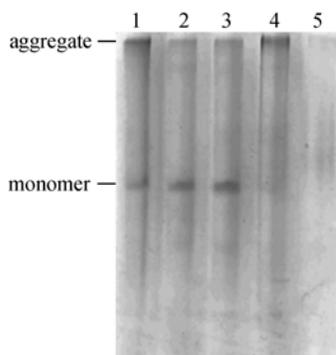


图 3 不同 pH 诱导发酵上清液天然电泳  
Fig. 3 Native-PAGE of supernatants under different induction pH  
1: pH 3.0; 2: pH 4.0; 3: pH 5.0; 4: pH 6.0; 5: pH 7.0

表 1 不同 pH 诱导 cIFN 生物活性  
Table 1 Effect of induction pH on cIFN bioactivity

Induction pH	cIFN bioactivity ( $10^8$ IU/mL)	Specific cIFN bioactivity ( $10^8$ IU/mL/g protein)
6.0	1.15	0.60
5.0	2.57	1.23
4.0	2.52	1.51
3.0	1.51	1.11

## 2.2 cIFN 降解与蛋白酶活性分析

由图 4 可见, 胞外总蛋白酶活随诱导 pH 变化的趋势与图 2 看到的结果有一定相关性, 降解严重时, 胞外蛋白酶活往往较高。诱导 pH 4.0 下发酵液酶活最低。随着诱导 pH 的升高, 发酵液的酶活也升高, 降解较严重的 pH 6.0 条件, 后期蛋白酶活已达 19.5 u/mL。诱导 pH 7.0 时, 蛋白酶活在发酵初期就超过 20 u/mL, 且居高不下, 造成目的蛋白的快速降解, 这可能是中性蛋白酶活力高所致。当 pH 降到 3.0 时, 酶活又有所上升, 同时带来降解的加重。可见不同诱导 pH 导致蛋白酶活产生差异, 而蛋白酶活性的变化直接影响 cIFN 的降解。

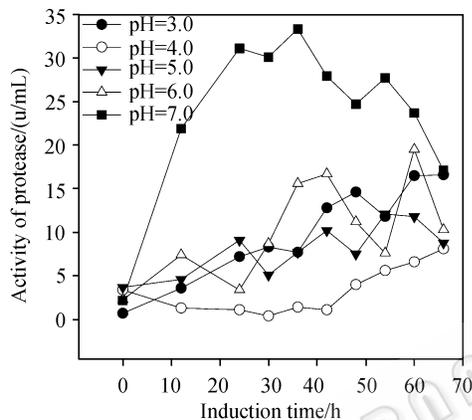


图 4 不同诱导 pH 下的胞外蛋白酶活  
Fig. 4 Effect of induction pH on the activity of extracellular protease

## 2.3 细胞死亡率分析

由流式细胞仪测得不同诱导 pH 下的细胞死亡率见图 5。pH 4.0~6.0 下的细胞死亡率分别维持在 5%、3%、2%附近, 诱导 pH 为 3.0 时, 发酵后期死

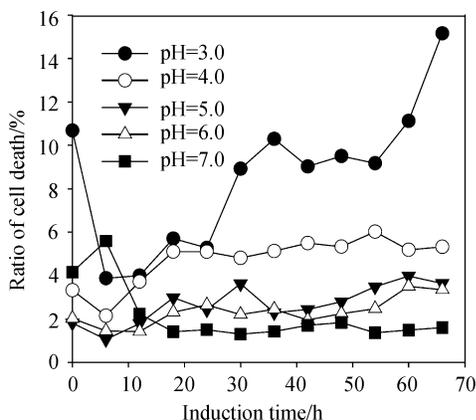


图 5 不同诱导 pH 对细胞死亡率的影响  
Fig. 5 Effect of induction pH on cell mortality

亡率最高, 达到 15.16%, 随着细胞大量死亡, 导致释放的胞内蛋白酶增多, 蛋白酶活也有所上升(图 4)。在最高的 pH 7.0, 死亡率却只在 1%~2%之间波动, 但细胞生长明显受到抑制, 蛋白表达量也低, 可能是酵母生长的负担较小, 造成细胞死亡率较低。虽然毕赤酵母可以在 3~7 的较宽 pH 范围内生长, 但其更适合在偏中性的环境存活, 偏酸性的环境造成细胞死亡率升高, 释放更多酶系引起蛋白降解。

## 3 讨论

发酵液中的蛋白酶一般有三种来源途径: 细胞分泌出来的胞外蛋白酶, 细胞外膜结合蛋白酶和细胞自噬或裂解释放的胞内蛋白酶<sup>[4]</sup>。改变环境 pH 既影响细胞死亡而释放的蛋白酶量, 也影响已分泌蛋白酶的活性。在诱导 pH 3.0 条件下, 细胞死亡率高, 释放出更多蛋白酶降解外源蛋白。高 pH 条件细胞死亡率相对不高, 也许是中性 pH 较适宜蛋白酶作用, 使蛋白酶活性加大, 降解作用增强。这在 pH 7.0 时尤为明显, 较高的蛋白酶活性使外源蛋白完全降解。

溶液 pH 也是蛋白质聚合的影响因素之一<sup>[11]</sup>, 实验中较高的 pH(6.0)和较低的 pH(3.0), 不仅引起 cIFN 降解, 也加剧 cIFN 的聚合。cIFN 聚合与降解的伴随现象, 说明两者之间有一定的内在联系, 值得进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Blatt LM, Davis JM, Klein SB, *et al.* The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon- $\alpha$  species, consensus interferon. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1996, **16**: 489-499.
- [2] Hao YY, Chu J, Wang YH, *et al.* Expression and aggregation of recombinant human consensus interferon- $\alpha$  mutant by *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(12): 905-909.
- [3] Hao YY, Chu J, Wang YH, *et al.* The inhibition of aggregation of recombinant human consensus interferon- $\alpha$  mutant during *Pichia pastoris* fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 2007, **74**: 578-584.
- [4] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**: 249-270.
- [5] Jahic M, Gustavsson M, Jansen A-K, *et al.* Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of biotechnology*, 2003, **102**:

- 45-53.
- [6] Wang JZ, Fan M. Protein Technical Handbook, Beijing: Science Press, 2000, 111-120.  
汪家政, 范明, 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000, 111-120
- [7] Guo RJ. The Laboratory Technology of Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press, 1999.  
郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999.
- [8] The National Committee of Biologics Standardization. Requirements for Biologics of China, Beijing: Chemical Industry Press, 2000.  
中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [9] Hohenblum H, Borth N, Mattanovich D. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *Journal of Biotechnology*, 2003, **102**: 281-290
- [10] Zhang HJ, Liu DC, Yang GY. Exploring the way of determining the activity of the different proteases by UV spectrophotometry. *Cereal & Feed Industry*, 2004, **9**: 44-45.  
张寒俊, 刘大川, 杨国燕. 紫外光谱法定量测定不同种蛋白酶活力研究. 粮食与饲料工业, 2004, **9**: 44-45.
- [11] Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical Research*, 2003, **20**(9): 1325-1336.

### 中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature(德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜、)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款(收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

电子信箱: gg@im.ac.cn

联系人: 武文 王闯

网址: <http://journals.im.ac.cn>