

基因工程菌 *Pichia pastoris* 高密度培养条件研究^{*}

郭美锦^{1,2} 吴康华¹ 杭海峰¹ 储 炬¹ 庄英萍¹ 张嗣良^{1**}

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)¹

(江西农业大学生物技术研究开发中心 南昌 330045)²

摘 要: 基因工程菌 *pichia pastoris* 最佳种子培养基为添加 4mL/L PTMI 的 BMGY 培养基; 全合成高密度摇瓶培养基是甘油 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g/L, CaSO_4 0.93g/L, K_2SO_4 18.2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.9g/L,

• 国家自然科学基金资助项目 (No. 29976013)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 29976013)

教育部高等学校骨干教师资助项目

** 联系人

收稿日期: 2000-01-03, 修回日期: 2000-06-27

0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH=6.0) 配制, 培养 26h 后细胞密度 OD_{600} 可达到 65。经 SDS-PAGE 电泳图谱分析, 甲醇诱导培养 72h 结果: 12h 有重组人血清白蛋白表达, 24h 达到最大。此全合成摇瓶培养基与批补料发酵培养基相类似, 有利于指导发酵罐上发酵培养。

关键词: 甲醇营养型毕赤酵母, 高密度培养, 重组人血清白蛋白

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 03-0006-05

STUDIES ON CONDITIONS OF CELL HIGH DENSITY CULTIVATION FOR GENETICALLY ENGINEERED METHYLOTROPHIC *PICHA PASTORIS*

GUO Mei-Jin WU Kan-Hua HANG Hai-Feng CHU Ju ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang

(State Key Lab of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)¹

(Research and Development Center for Biotechnology, Jiang Xi Agricultural University Nanchang 330045)²

Abstract: Recently the methylotrophic *Pichia pastoris*, with many advantages such as high expression, stable genetics and protein secretion, has been used extensively as a host expressing heterologous proteins. The optimal seed medium among seven media MM, MD, MGY, BMGY, YMPD, YMPGy and MGyB is BMGY with addition of 4ml/L PTM1. The high density synthesized medium in shake flask culture is as follows: Glycerol 4% ($(NH_4)_2SO_4$ 10g/L, $CaSO_4$ 0.93g/L, K_2SO_4 18.2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9g/L, add 0.1mol/L PBS (pH=6.0) to 1.0 liter. The harvested yeast cell optical density (OD_{600}) reached 65 or more after 26 hours cultivation. By analysis of SDS-PAGE, the results of *Pichia pastoris* culture by methanol inducement for 72 hours showed that the expression of recombinant human serum albumin had been achieved by methanol inducement after 12 hours, and the amount of targeted protein reached the summit after 24 hours inducement by methanol. The high density synthesized medium in shake flask culture in this experiment, which is similar to the mediums of batch fermentation and batch-fed fermentation, is benefit to direct the *P. pastoris* fermentation in the fermentor.

Key words: Methylotrophic *Pichia pastoris*, High density cultivation, Recombinant human serum albumin

甲醇营养型巴斯德毕赤酵母 (Methylotrophic *Pichia pastoris*) 是一种具有表达率高, 遗传稳定, 产物可分泌等优点的外源分泌蛋白和胞内蛋白表达的一优秀宿主^[1]。它能够生长在以甲醇作为唯一碳源和能源的培养基上, 拥有一条高效诱导的甲醇利用途径该途径中第一个酶为醇氧化酶 (Alcohol Oxidase, AOX)。在利用甲醇营养型毕赤酵母构建载体时就采用了这高效和严谨调控的醇氧化酶启动了 (P_{AOX1})。自 Cregg 等^[2]于 1987 年首次报道甲醇营养型毕赤酵母表达外源蛋白以来, 该系统表达的外源蛋白已达 50 多种, 其中不乏贵重药物, 如肿瘤坏死因子^[3]、鼠表皮生长因子^[4]等。

基因工程菌细胞高密度培养是高表达外源蛋白的一重要策略。它能够在单位时间单位体积的条件下获得更高的外源蛋白产率, 如大肠杆菌 (*E. coli*)^[5]、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)^[6]、植物细胞等。目前国内外对基因工程菌毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 高密度培养的报道极少, 一般研究者对毕赤酵母为宿主菌在摇瓶培养时均采用 INVITROGEN 公司的复合培养基进行培养, 但复合培养基与发酵罐上批培养或批补料培养的培养基迥然不同, 尤其对于基因表型为 Mut⁻ 的菌株更是如此。作者首次采用全合成培养基对毕赤酵母 (Mut⁺) 进行了摇瓶高密度培养条件的探索, 同时在该条件下进行了重组人血清白蛋白 (Recombinant Human Serum Albumin, rHSA) 表达培养。SDS-PAGE 电泳图谱分析, 本试验方法完全可表达目的蛋白, 现报道结果。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

GS115 菌株 (遗传表型 $aox^+ his^+$, 醇氧化酶启动子 (P_{AOX1}), 载体 pPIC9K, 蛋白引导序列为来自酿酒酵母的 α -杂交因子 (AMF), 外源基因为人血清白蛋白 cDNA, 载体呈线型整合在染色体上), (由上海贸基生物工程研究所提供)。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基: MM, MD, MGY, BMGY, YMPD, YMPGy, MGyB 按文献 [7] 配制。

1.2.2 基础培养基: $CaSO_4$ 0.93g, K_2SO_4 18.2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9g, 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS pH=6) 配制, 定容 1L。

1.2.3 PTM1 溶液: 按文献 [7] 配制。

1.3 培养方法

温度 30℃, 摇床转速 220r/min (偏心距 2.5cm), 摇瓶装量 20mL/250mL 三角瓶。

1.4 分析方法

1.4.1 酵母细胞密度分析: 菌液稀释后于波长 600nm 处以去离子水为对照进行比色测定。 $OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.4.2 甘油测定方法: 采用高碘酸钠氧化滴定法^[8]。

1.4.3 NH_2-N 测定: 采用甲醛滴定法^[9]。

1.4.4 溶磷测定: 采用磷钼酸比色法^[9]。

1.4.5 总蛋白测定 (OD_{595}): 考马斯亮兰染色法^[10]。

1.4.6 rHSA 测定方法: SDS-PAGE 凝胶电泳^[10]计算机扫描分析。

2 结果与讨论

2.1 不同种子培养基对毕赤酵母菌种生长的影响

将甘油管种子 (OD_{600} 为 15~20) 按接种量 2% 分别接种到 7 种种子培养基中, 培养 24h 和 30h, 测定各瓶 pH 和 OD_{600} 的值, 结果如图 1。在不同的培养时间毕赤酵母在不同培养基上细胞生长密度不同, 培养 24h YMPD 上酵母细胞生长量最大, 培养 30h 后 BMGY 上酵母细胞生长量则最大, OD_{600} 为 36.2, 而 YMPD 上细胞密度 OD_{600} 仅为 22.5, 比在 BMGY 上的细胞密度少了 60.9%。结果的差异主要是由于培养基组成及丰富程度不同引起, 如 BMGY、MGyB、YMPD 中碳、氮源比其它培养基中的高, 细胞生长密度则大, 其中 BMGY 的 C、N 源及微量元素、维生素和生物素等均均为最丰富, 利于毕赤酵母生长, 因而 OD_{600} 最大; 另外, 毕赤酵母生长可能也受到培养基 pH 的影响, 即由于 *Pichia pastoris* 细胞生长代谢后产生大量有机酸, 使培养基过于酸而不利于细胞生长可能也是一个原因, 如酵母在 MM、MD、MGY 中培养 30h 后 pH 下降到 2.0 左右, 其它培养基 pH 均在 3.0 以上, 适于细胞生长。尤其是 BMGY 和 MGyB 培养基, 由于是由磷酸缓冲液配成, pH 一直较稳定于 6.0 左右, 这样的培养环境可能更利于细胞生长。因此, 以 BMGY 培养基为种子培养基最好, 其次为 MGyB 和 YMPD 培养基, 最不利于毕赤酵母生长的培养基为 MM、和 MD, 细胞密度只有 BMGY 上的 25% 左右。

2.2 PTM1对重组 *Pichia pastoris* 生长的影响

以 BMGY 为种子培养基添加不同浓度 PTM1 后, 培养基随 PTM1 浓度增加由清亮变混浊, pH 值由高变低。接种培养 24h, 结果见表 1。

表 1 PTM1 对 *Pichia pastoris* 生长的影响

处理水平 (mL/L)	接种前 (pH)	培养后 (pH)	细胞密度 (OD_{600})	溶磷 ($\mu\text{g/mL}$)
0	5.94	4.34	23.5	229.5
4	5.90	4.18	28	438.5
12	5.54	3.95	24.5	258.7
48	4.48	3.26	17.9	172.7

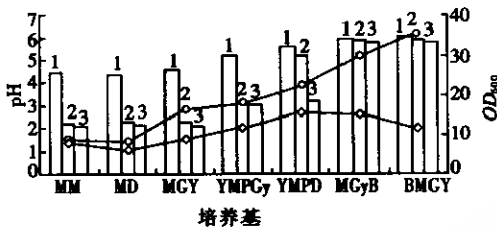


图 1 种子培养基与毕赤酵母细胞培养密度关系图

1 pH0, 2 pH24, 3 pH30, \diamond OD_{600} 24, \circ OD_{600} 30

Mg^{2+} 等离子发生沉淀反应而过量减少, 也可能不利于酵母细胞的生长导致细胞密度 OD_{600} 的下降。因此, PTM1 的加入量不能过大, 以 4mL/L 水平最佳。

2.3 高密度摇瓶培养培养基优化

以甘油为 A 因素 (处理水平为 2%, 4%, 8%) 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 B 因素 (处理水平为 5g/L, 10g/L, 20g/L) 进行二因素三水平二重复全实施试验, 培养时间 30h, 结果如表 2。

统计直观分析可知, A 因素 2% 水平 OD_{600} 只有 4% 和 8% 水平的一半, 此时 4% 甘油刚好耗尽, 8% 甘油水平则剩余 4% 左右, 说明毕赤酵母能够在 8% 甘油浓度条件下生长, 并没有出现 *Pichia pastoris* 细胞在高于 5% 甘油培养条件下可能会有害的结果。4% 甘油浓度处理水平的细胞密度与在分批培养条件下的细胞密度基本一样, 即甘油的菌体细胞得率系数 ($Y_{X/S}$) 基本一样 (数据未列)。

对于 B 因素分析, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度最好不大于 10g/L, 浓度为 20g/L 则明显对细胞生长有抑制作用。继续对 A_3B_1 和 A_3B_2 培养至 53h 细胞密度 OD_{600} 分别达到 70.0 和

加入 4mL/L PTM1 处理的 OD_{600} 比对照高了 19.14%, 比 48mL/L 处理的细胞生长量则高了 56.42%; 结果同时表明 *Pichia pastoris* 细胞生长量的变化与培养基中的溶磷含量变化趋势基本一致, 因此推测认为这可能是加入的 PTM1 中的金属离子如 Ca^{2+} , Fe^{3+} 等与磷酸缓冲液中的 PO_4^{3-} 作用沉淀而变混浊, 导致磷酸缓冲液中 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 向电离产生 PO_4^{3-} 和 H^+ 的方向进行而使溶液中的 H^+ 浓度增加, pH 值下降。当加入的 PTM1 量过大时, 因金属离子 (Ca^{2+} , Fe^{3+} 等) 与 PO_4^{3-} 沉淀反应而使 PBS 失去缓冲作用。一旦培养基失去缓冲作用, 酵母细胞在代谢过程中产生的有机酸使培养基中的 pH 变得更低, 这样的酸性培养环境可能不利细胞生长, 尤其当 pH 低于 3.0 时。同时, 由于 Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ,

表 2 *Pichia pastoris* 高密度摇瓶培养培养基优化

A 因素 甘油浓度	B 因素 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	pH	甘油残量 (%)	平均 OD_{600}
A_1 (2%)	B_1 (5g/L)	5.05	0	30
	B_2 (10g/L)	5.06	0	28
	B_3 (20g/L)	5.07	0	26
				84
A_2 (4%)	B_1 (5g/L)	4.93	0	62.5
	B_2 (10g/L)	4.95	0.015	61.5
	B_3 (20g/L)	4.88	0.056	55.8
				179.8
A_3 (8%)	B_1 (5g/L)	4.93	4.18	62
	B_2 (10g/L)	4.94	4.17	61.5
	B_3 (20g/L)	4.87	4.21	55.7
				179.2

74.4, $\text{NH}_2\text{-N}$ 分别为 105.9mg/100mL 和 195.7mg/100mL, 而培养至 65h 时 OD_{600} 分别为 74 和 77.6, $\text{NH}_2\text{-N}$ 分别为 103.8mg/100mL 和 198.6mg/100mL, NH_4^+ 的利用率分别为 24% 和 27% 左右。因此, 在 *Pichia pastoris* 高密度摇瓶培养时 (同时考虑到外源蛋白表达也需要一定氮源), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 选 B_2 水平 (10g/L) 即可。

2.4 *Pichia pastoris* 细胞高密度培养高表达外源蛋白

以 BMGY 加 4mL/LPTMI 为种子培养基, 培养 24h 后按接种量 10% 接入 A_2B_2 摇瓶培养基中进行培养, 甘油耗尽后用 1mol/L NaOH 调 pH 至 6.0, 并加入 0.1mol/L PBS (pH = 6) 1mL, 然后按 12mL/L 补加 PTM1 和加入甲醇 (AR) 至终浓度为 0.5% 进行诱导表达培养 (每 24h 补加甲醇一次), 结果如图 2。

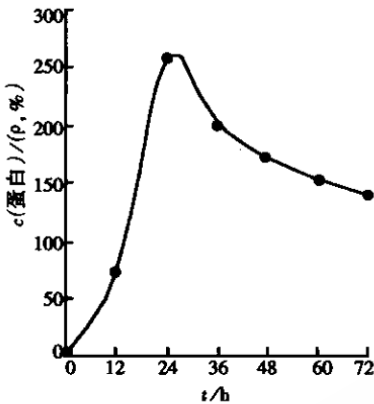


图 2 诱导时间与蛋白变化关系

诱导 12h 有明显的外源蛋白表达, 24h

后粗蛋白表达量 (OD_{595}) 超过 250mg/L, 随

后蛋白表达量逐渐下降, 可能是蛋白降解所致。从 SDS-PAGE 电泳结果 (图 3) 来看, 与标准蛋白牛血清白蛋白 (66, 700 Dalton) 相同电泳带处诱导时间 12h, 24h 和 72h 样品都有明显目的蛋白——重组人血清白蛋白 (rHSA) 表达。SDS-PAGE 电泳图谱经计算机软件扫描分析表明, 目的蛋白条带的蛋白含量约占分泌蛋白总量的 80%, 且 24h 样品电泳目的蛋白含量最大, 由上说明本试验方法完全可以适用于甲醇营养型毕赤酵母在摇瓶培养时的外源蛋白表达。

本试验培养基为全合成培养基, 与发酵罐批培养的培养基基本相似, 对在发酵罐上进行批培养和批补料培养表达所需的目的蛋白具有很强的指导作用; 克服了采用复合培养基而不利于定量优化和不利于电泳、分离和提纯的缺点; 同时, 酵母细胞培养密度比 INVITROGEN 系统的摇瓶培养密度 (OD_{600} 为 20 ~ 30) 高两倍多; 此外, 细胞高密度培养后进行诱导培养时操作比 INVITROGEN 系统操作更简单, 且更易做到无菌。

参考文献

[1] Romanos M A, Clare C A, Clare J J. *Yeast*, 1992, 8: 423 ~ 488.
 [2] Gregg J M, Tschopp J F, Stilman C, et al. *Bio/Technology*, 1987, 5: 479 ~ 485.
 [3] Sreekrishna K, Provow S A, Craig W S, et al. *Bio-chemistry*, 1989, 28: 4117 ~ 4125.
 [4] Clare J J, Romanos M A, Rayment F B, et al. *Gene*, 1991, 105: 205 ~ 212.

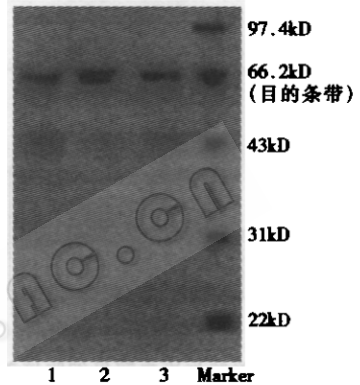


图 3 rHSA SDS-PAGE 电泳分析图

- 1 合成培养基诱导培养 12h 样品,
- 2 合成培养基诱导培养 24h 样品,
- 3 合成培养基诱导培养 72h 样品 (由脉上样量 40μL)

- [5] 李 民, 杨立宏, 王 垒. 生物工程学报, 1999, 14 (4): 470 ~ 476.
- [6] Noronha S B, Wagner L W, Matheson N H. *Biotech & Bioeng.*, 1999, 63 (3): 285 ~ 289.
- [7] Multi-copy pichia Expression Kit (Version B), Catalog no. K 1750 ~ 01.
- [8] 傅伍尧译. 化学世界, 1953, 8 (10): 366 ~ 367.
- [9] 朱 俭编著. 生物化学实验. 上海: 上海科学技术出版社, 1981, 61 ~ 63.
- [10] 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1998, 880 ~ 887.