

毕赤酵母发酵生产中的水蛭素降解顺序

杨继忠^{1,2} 周祥山¹ 解锡军² 尤金花² 张元兴^{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

(山东东阿阿胶股份有限公司 聊城 252201)²

摘要: 水蛭素 (rHV2-Lys⁶⁷) 是一个具有 65 个氨基酸的抗凝活性肽。在毕赤酵母高密度发酵分泌表达过程中, 发酵上清中可检出 4 个水蛭素活性组份, 分别为 Hir65 及其 C-末端切除 1~3 个氨基酸的 Hir64、Hir63 和 Hir62。但目前 4 种组份间的衍生关系还不清楚, 以从发酵上清液中纯化分离所得的 4 个组份作为底物, 加入到菌体裂解液中, 发现 Hir64、Hir63 和 Hir62 组份是由羧肽酶依次降解 Hir65 肽链 C-末端 1 个氨基酸后的产物。

关键词: 毕赤酵母, 水蛭素, 降解, 裂解液

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0024-04

Emerging Order of Species of Hirudin in Recombinant *Pichia pastoris* Fermentation

YANG Ji-Zhong^{1,2} ZHOU Xiang-Shan¹ XIE Xi-Jun² YOU Jin-Hua²
ZHANG Yuan-Xing^{1*}

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

(Dong E E Jiao Co. LTD, Liaocheng 252201)²

Abstract: Hirudin (rHV2-Lys⁶⁷) is a polypeptide of 65 amino acids, as the most potent and specific inhibitor of thrombin so far known. Four active fractions including the intact rHV2 (Hir65) and its three C-terminally truncated forms, Hir64, Hir63 and Hir62, were purified from the culture supernatant of *Pichia pastoris*. The emerging order of four species of hirudin was investigated by adding purified Hir65, Hir64 and Hir63 to cell-free extract respectively. Hir64, Hir63 and Hir62 were found to derive from Hir65 by truncating carboxy-terminal amino acid one by one by carboxypeptidase.

Key words: *Pichia pastoris*, Hirudin, Degradation, Cell-free extract

水蛭素是一种 65~66 个氨基酸的无糖基化的多肽, 是迄今为止已发现的对凝血酶抑制作用最强的抗凝药物。1989 年, 法国的 Riehl-Bellon 等^[1]报道, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 分泌表达 65 个氨基酸的水蛭素 HV2 时, 发酵上清中除了目的蛋白 HV2 以外, 还有 HV2 的 C-末端切除 1~2 个氨基酸的产物。1995 年, 德国的 Weydemann 等^[2]报道在重组多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 的发酵中也有类似现象。2001 年, 周卫斌等^[3]从毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 发酵生产 HV2 的上清中分离出 Hir65、Hir64、Hir63 和 Hir62 组份, 且分析表明 Hir64、Hir63 和 Hir62 是 Hir65 的 C-末端依次切除 1 个, 2 个和 3 个氨基酸的产物。但以上报道均未研究水蛭素及其降解组份间的衍生关系。目前还不清楚 Hir64、Hir63 和 Hir62 是由 Hir65 从 C-末端分别切除 1~3 个氨基酸

作者还有: 解福生²

*联系人 Tel: 021-64253065, Fax: 021-64253025, E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2003-10-22, 修回日期: 2003-12-22

直接生成 Hir64、Hir63 或 Hir62, 还是由 Hir65 降解为 Hir64, 再由 Hir64 降解生成 Hir63, 然后由 Hir63 降解为 Hir62。本文通过纯品水蛭素组份在菌体裂解液中的降解变化规律, 揭示了 Hir64、Hir63 和 Hir62 组份之间的衍生关系。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

表达重组水蛭素 (rHV2-Lys⁴⁷) 的毕赤酵母基因工程菌^[4], 由山东东阿阿胶股份有限公司提供。种子培养基: YNB 1.34 g, 甘油 15 mL, 生物素 0.4 mg, 定容至 1 L。发酵培养基: 85% H₃PO₄ 21.36 mL, KOH 4.13 g, CaSO₄ 0.82 g, K₂SO₄ 18.20 g, MgSO₄·7H₂O 14.90 g, 甘油 31.73 mL, ANTIFOAM 204 (Sigma) 0.33 mL, PTM 4.4 mL, 定容至 1 L。补料培养基: 50% 甘油, 1 × 10⁵ Pa 湿热灭菌 30 min, 再加入 4.4 mL/L PTM。

1.2 试剂和缓冲液

蜗牛酶, 购自华美生物试剂公司, 在蜗牛酶消解缓冲液中按每克湿菌体加入 2 mg 蜗牛酶。水蛭素纯品 Hir65、Hir64、Hir63 和 Hir62 由本实验室纯化制备^[3], 蛋白质浓度分别为 4.405、0.719、1.163 和 1.768 g/L。蜗牛酶消解缓冲液^[5]: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂, 1 mol/L 山梨醇, 1 或 30 mmol/L DTT。磷酸缓冲液: 50 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 3, 10 mmol/L MgCl₂。

1.3 培养方法

种子培养: 三角瓶 (2 L 容积) 中装入 500 mL 种子培养基, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min, 冷却后接入单菌落, 30℃、250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 6.0。

30 L 罐发酵: 15 L 发酵培养基罐内 1 × 10⁵ Pa 湿热灭菌 30 min 后, 用氨水调 pH 值至 5.0, 然后加入 4.4 mL/L PTM, 1: 10 接种, 于 29℃, 溶解氧 > 45% 培养 20 h 后以补料培养基限制性持续补料 10 h, 然后以甲醇作为唯一碳源限制性流加 (10 mL/L/h) 并诱导表达 60 h。

1.4 裂解液制备

在发酵的不同时间取样。发酵液于 4℃, 1,500 g 离心 5 min, 收集发酵上清, 并将菌体用 4 倍体积的冰水重悬, 立即于 4℃, 1,500 g 离心 5 min; 弃上清, 将菌体用等体积含 30 mmol/L DTT 的蜗牛酶消解缓冲液重悬, 室温放置 15 min 后于 4℃, 1,500 g 离心 5 min; 弃上清, 菌体再用 3 倍体积含 1 mmol/L DTT 的蜗牛酶消解缓冲液重悬, 按每克湿菌体加入 2 mg 蜗牛酶, 于 30℃, 50 r/min 摇床中温育 40 min。再于 4℃, 1,500 g 离心 5 min 收集原生质体并用磷酸缓冲液洗涤 1 次后重悬于 10 倍该溶液中超声破碎 30 min, 超声破碎使用冰浴。最后以 13,000 g 离心 10 min, 收获上清即为裂解液。

1.5 降解研究方法

按 1.3 发酵方法培养, 对不同时间取样的发酵液离心收集酵母菌体, 菌体按 1.4 处理获取裂解液。取裂解液 5 mL 分别加入 1 mL Hir65、Hir64、Hir63 纯品, 于 50 r/min, 30℃ 恒温摇床温育, 各组分别温育 0 h、2 h、6 h、12 h 和 20 h 时取样分析 Hir65、Hir64、Hir63 和 Hir62 组份的变化情况。

1.6 RP-HPLC 分析方法

用 HP1100 液相色谱仪, Kramasil C8 反相柱 (150 × 4.6 mm, 5 μm), T = 30℃, 进样量 20 μL, 流速 1 mL/min, 流动相 A (含 0.1% TFA 的纯水), 流动相 B (含 0.1% TFA

的乙腈), 15% B平衡柱子, 采用线性梯度洗脱, 17 minB由15%线性升为32%。

2 结果与讨论

2.1 发酵上清及裂解液中水蛭素组份分析

诱导 30 h 的发酵液离心取上清经 RP-HPLC 分析, 与 Zhou^[4] 报道的一致, 诱导表达 30 h 时 Hir65 已发生降解, 在保留时间 9.4、11.2、13.7 和 14.9 min 处分别出现 Hir62、Hir63、Hir64 和 Hir65 洗脱峰。对酵母细胞裂解液分析表明, 在 4 个组份的相应保留时间位置无水蛭素活性组份洗脱峰, 且不同发酵时间样品的裂解液 (不加 Hir65), 无论温育时间长短, 均无 4 种水蛭素组份出现 (数据未列出), 表明毕赤酵母在分泌表达过程中胞内不积累水蛭素。

由于发酵上清中已含有水蛭素降解组份, 不利于研究各水蛭素组份间的衍生关系的细胞。裂解液中无水蛭素降解组份干扰, 在加入不同水蛭素纯品组份后便于分析各组分的降解过程。另外, 不同时期的细胞裂解液对水蛭素的降解活性强度不同 (数据未列出), 为便于研究降解顺序, 选取在发酵 20 h 的菌体裂解液中加入 Hir65, 在发酵 30 h 的菌体裂解液中分别加入 Hir64 和 Hir63。

2.2 Hir65 降解生成 Hir64

向发酵 20 h 的菌体裂解液中加入 Hir65 纯品, 如图 1 (A) 所示, 温育 0 h 只在 13.7 min 处有 Hir65 洗脱峰, 未检测到 Hir65 的降解组份。如图 1 (B) 所示, 温育 10 h 可于保留时间 14.9 min 检测到 Hir64 组份, 同时 Hir65 的含量减少, 而 Hir63 及 Hir62 未出现, 说明 Hir65 首先被降解成 Hir64。另外发现, 如图 1 (C) 所示, 温育 20 h 可在保留时间 11.2 min 检测到 Hir63 组份。

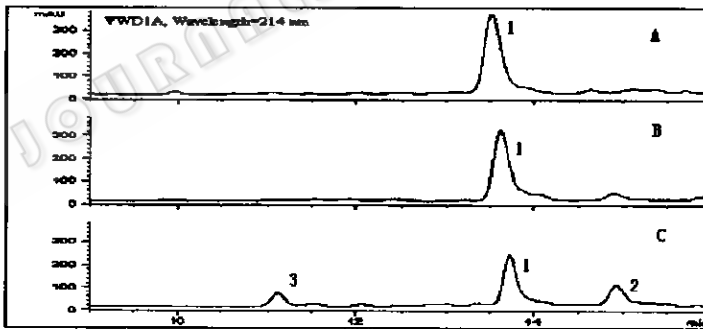


图 1 Hir65 加入发酵 20 h 菌体裂解液中不同时间的 HPLC 降解图谱

A 温育 0 h, B 温育 10 h, C 温育 20 h

1 Hir65, 2 Hir64, 3 Hir63

2.3 Hir64 降解生成 Hir63

向发酵 30 h 的菌体裂解液内加入 Hir64 纯品, 如图 2 (A) 所示, 温育 0 h 只在 14.9 min 处检出 Hir64 洗脱峰。温育 2 h 后, 如图 2 (B) 所示, Hir64 的含量减少, 并降解为大量的 Hir63 和少量的 Hir62, 随着温育时间的延长, Hir63 逐渐向 Hir62 转化, 如图 2 (D) 所示, 12 h 后 Hir63 被完全降解成 Hir62, 说明 Hir64 首先被降解成 Hir63。

2.4 Hir63 降解生成 Hir62

向发酵 30 h 的菌体裂解液内加入 Hir63, 如图 3 (B) 所示, 温育 2 h 可明显检测到 Hir62, 表明已有部分 Hir63 降解为 Hir62。随着温育时间延长, Hir63 的量逐渐减少,

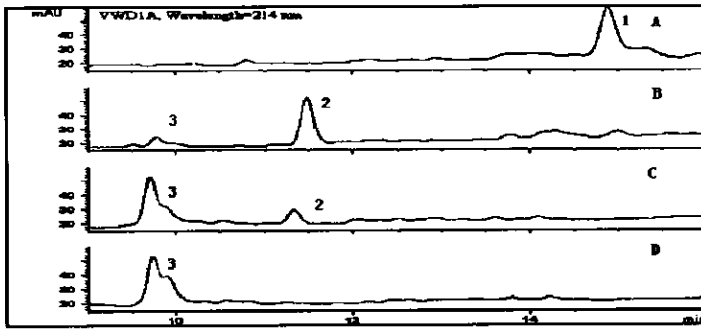


图2 Hir64加入发酵30 h菌体裂解液中不同时间的HPLC降解图谱
 A 温育0 h, B 温育2 h, C 温育6 h, D 温育12 h
 1 Hir64, 2 Hir63, 3 Hir62

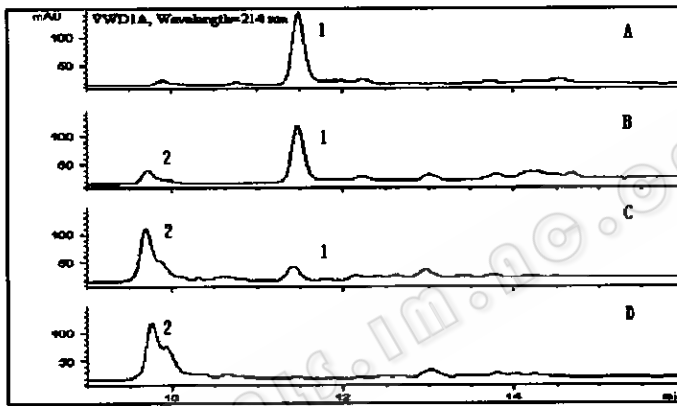


图3 Hir63加入发酵30 h菌体裂解液中不同时间的HPLC降解图谱
 A 温育0 h, B 温育2 h, C 温育6 h, D 温育12 h
 1 Hir63, 2 Hir62

Hir62的量逐渐增加。温育12 h后，如图3(D)所示，Hir63完全降解，说明Hir63被降解成Hir62。

综合分析以上结果，可以确定4个组份间的衍生关系为：Hir65先降解为Hir64，再由Hir64降解生成Hir63，然后由Hir63降解为Hir62，而不是直接由Hir65从C-末端分别切除1~3个氨基酸生成Hir64、Hir63或Hir62。这说明降解水蛭素的酶极可能是羧肽酶，而不是其他蛋白酶，但这需要进一步的实验证实。

参考文献

[1] Riehl-Bellon N, Dorothee C, Michele A, *et al.* *Biochemistry*, 1989, **28**: 2941 ~ 2949.
 [2] Weydemann U, Keup P, Piontek M, *et al.* *Appl Microbiol Biotech*, 1995, **44**: 377 ~ 385.
 [3] 周卫斌, 周祥山, 张元兴. *生物工程学报*, 2001, **17**: 683 ~ 687.
 [4] Zhou X S, Zhang Y X. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1449 ~ 1453.
 [5] F 奥斯伯(美)等著. 颜子颖, 王海林译. 《精编分子生物学实验指南》. 北京: 科学出版社, 1998.