

毕赤酵母表达重组人白细胞介素 11 的连续培养研究

孙 瑛* 李 辉 田方曦 钟文韬

(杭州九源基因工程有限公司 杭州 310018)

摘要 对毕赤酵母表达重组人白细胞介素 11 (rhIL-11) 工程菌的连续培养进行了工艺研究。连续培养在 10L 工作体积的发酵罐中进行, 整个发酵过程历时约 20 天, 发酵上清中 rhIL-11 表达浓度约 400mg/ml。在稀释率 $D = 0.05/h$ 下, 菌浓 OD_{600} 达到 100 以上。

关键词 毕赤酵母 重组人白细胞介素 11 连续培养

人白细胞介素 11 (hIL-11) 是一种多功能细胞调节因子, 它可以刺激巨核细胞及血小板的生成, 临床试验表明重组 rhIL-11 可显著恢复化疗引起的严重血小板减少症^[1,2]。目前国内外都采用大肠杆菌 (*E. coli*) 融合表达 rhIL-11, 仅有杭州九源基因工程有限公司采用毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分泌表达 rhIL-11。所采用的毕赤酵母是一种新型的外源基因表达系统^[3], 具有许多明显优点, 其诱导分泌表达的启动子 AOX1 可用甲醇严格调控, 表达产物分泌到上清, 不需复杂的破菌手段等。与 *E. coli* 表达系统相比, 它既具有 *E. coli* 表达系统操作简便、生产成本低等优点, 又对重组蛋白有一定的折叠和加工能力, 特别是它可以避免现有的融合表达方法在生产过程中需酶切处理、工艺复杂、成本高等缺点。由于 IL-11 临床剂量较大, 国内每次 3mg, 需连续使用 1 周以上。这就要求在生产过程中尽量提高 rhIL-11 蛋白的产出率, 降低生产成本, 尤其是在发酵过程中应尽量减少 rhIL-11 蛋白的降解。

1 材料和方法

1.1 菌种

菌种系杭州九源基因工程有限公司研究所自行构建的表达 rhIL-11 的重组甲醇酵母 JYL4。宿主菌为毕赤酵母菌 GS115 菌株 (复旦大学李育阳教授惠赠), 表达载体为 pGENYk (为杭州九源基因工

程有限公司研究所保存)。

1.2 培养基

YPD 培养基: Yeast Extract (Oxoid, England) 10g, Polypepton (日本制药株式会社) 20g, Glucose (国产分析纯试剂) 20g, 加去离子水至 1L。

YPD 固体培养基: 在 YPD 培养基中加 2% 琼脂 (国产分析纯试剂)。

发酵培养基: H_3PO_4 (85%) 26.7ml; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.93g; K_2SO_4 18.2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9g; KOH 4.13g; glycerol 40g; D-biotin (AMRESCO) 0.87mg; Trace salts Solution 4.35ml; 去离子水至 1L (所有成分未特别注明的均为国产分析纯试剂)。

Trace salts Solution: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 65g; $ZnSO_4$ 42.19g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6.0g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.0g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2g; NaI 0.08g; H_3BO_3 0.02g; 去离子水至 1L (所有成分未特别注明的均为国产分析纯试剂)。

补料 1 培养基: glycerol 500g; D-biotin 2.4mg; Trace salts Solution 12ml; 去离子水至 1L。

补料 2 培养基: methanol 500ml; D-biotin 2.4mg; Trace salts Solution 12ml; 去离子水至 1L。

连续培养稀释液: methanol 200ml; H_3PO_4 (85%) 13.35ml; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.47g; K_2SO_4 9.1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.45g; KOH 2.07g; D-biotin 0.87mg; Trace salts Solution 4.35ml; 去离子水至 1L。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶培养 用 250ml 三角瓶装 50ml YPD 培

修回日期: 2002-09-12

* 电子信箱: suy69@sina.com

培养基,接入一环保存于 YPD 固体平板的 JYIL4 菌种,置 200~250r/min,30 摇床,振荡培养过夜。

1.3.2 连续培养 整个培养过程在 15L 全自动不锈钢发酵罐 (Biostat C, B. Braun Biotech) 中进行,工作体积为 10L。在进行连续培养之前,先进行一段时间的补料分批培养,接种量为 10%,培养过程中通气量 30L/min,通过通纯氧和改变搅拌转速保持溶氧水平不低于 20%,用磷酸或氨水根据需要调节 pH 为 5。

当菌体生长至最初的甘油被耗尽,表现为溶氧大幅度上升,这时开始以 3ml/min 的速度启动补料 1 培养基,约 4~6h 后以 0.65ml/min 的速度开始补料 2 培养基,至甲醇补料浓度为 0.5%~1%。

在补料分批培养过程补料 2 培养基启动 6h 后,以 $D=0.05/h$ 的稀释率补入连续培养稀释液进入连续培养阶段,同时以相同流量收集培养液,使罐内培养液的体积保持恒定。整个过程历时约 20 天,发酵过程取样测菌体 OD_{600} 值,同时取 1ml 发酵样品经 10 000r/min,离心 5min,将上清液置 -20 冻存待测。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体浓度 采用比色法,将培养液稀释到一定程度,在 721 分光光度计上于波长 600nm 处测定其光密度值,光程为 1cm。

1.4.2 rhIL-11 表达浓度测定 用 12.5% SDS-PAGE 分析,并用 Pharmacia 公司 VDS (凝胶扫描系统) 扫描定量。SDS-PAGE 采用 Laemmli 法^[4]。

2 结果与讨论

2.1 连续培养时稀释率(D)的确定

对连续培养时的各物质,可按式(1)进行物料平衡:

流入速率 = 流出速率 + 反应消耗速率 + 积累速率,由于加入的培养基中不含细胞,因此

$$0 = XF - V(dX/dt)_G + V(dX/dt) \quad (1)$$

上式中 F 为液体流量, V 为罐内培养液体积, $(dX/dt)_G$ 为因细胞生长造成的细胞浓度变化率, (dX/dt) 为培养液中细胞浓度变化率。由式(1)整理,得

$$(dX/dt) = (dX/dt)_G - XF/V = (\mu - F/V)X \quad (2)$$

式(2)中 F/V 由 D 表示, D 为稀释率,即 $D = F/V$ 。于是由式(2)得

$$(dX/dt) = (\mu - D)X \quad (3)$$

当连续培养达到稳态时, $(dX/dt) = 0$, 由式(3)得

$$\mu = D \quad (4)$$

这是连续培养过程的一个很重要的特征,由式(4)可以通过控制培养基的流加速率来控制稳态下细胞的比生长速率(据测定重组甲醇酵母 JYIL4 在连续培养稀释液中的比生长速率为每 10h1 代)。

2.2 稀释培养基的选择对连续培养的菌体浓度(OD_{600})与 rhIL-11 表达浓度的影响

A:10% 甲醇 + 1/2BSM; B:20% 甲醇 + 1/2BSM; C:16% 甲醇 + 4% 甘油 + 1/2BSM; D:20% 甲醇 + 5% 甘油 + 1/2BSM; E:20% 甲醇 + 5% 甘油 + 1/4BSM

BSM (Basal Salts Medium): H_3PO_4 (85%) 26.7ml; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.93g; K_2SO_4 18.2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9g; KOH 4.13g; 去离子水至 1L。

分别采用上述 5 种培养基作为稀释培养基进行连续培养,达到稳态时,5 种培养基的菌体浓度(OD_{600})与 rhIL-11 表达浓度结果见表 1,结果表明, B、C 培养基 rhIL-11 表达浓度较高,均为 0.4mg/ml,考虑到收获的上清体积的量,所以选用 B 培养基作为稀释用培养基。

表 1 流加不同培养基下的菌浓(OD_{600})和 rhIL-11 表达浓度(C_{IL-11})

Result	A	B	C	D	E
OD_{600}	120	120	160	190	160
C_{IL-11} (mg/ml)	0.22	0.40	0.40	0.32	0.2

2.3 菌体浓度(OD_{600})、rhIL-11 表达浓度随发酵时间的变化

在连续培养过程中,发酵至 72h 左右, rhIL-11 表达浓度进入平台期,菌浓 OD_{600} 保持在 120~150 范围内, rhIL-11 表达浓度维持在 0.4mg/ml 左右(图 1)。

2.4 rhIL-11 蛋白降解情况随发酵时间的变化

在连续培养过程中,发酵至第 17 天左右,在分

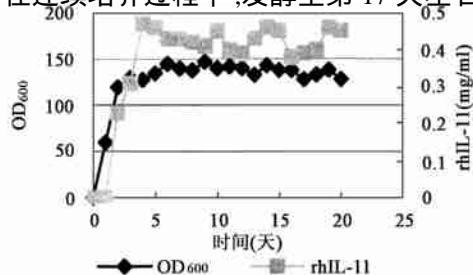


图 1 在连续培养下毕赤酵母表达的 rhIL-11

子量为 14kD 附近开始出现 rhIL-11 的降解条带(图 2),而常规的补料分批培养则早在第 2 天左右就出现了(图 3)。

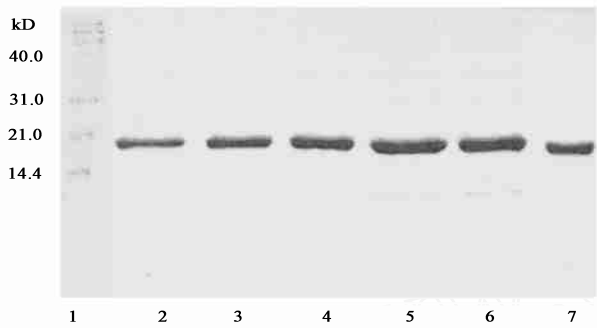


图 2 发酵过程中 rhIL-11 的 SDS-PAGE 图
1. Mark ;2 ~ 6. supernatant from continuous culture ,days 16 to 20;7. IL-11 standard

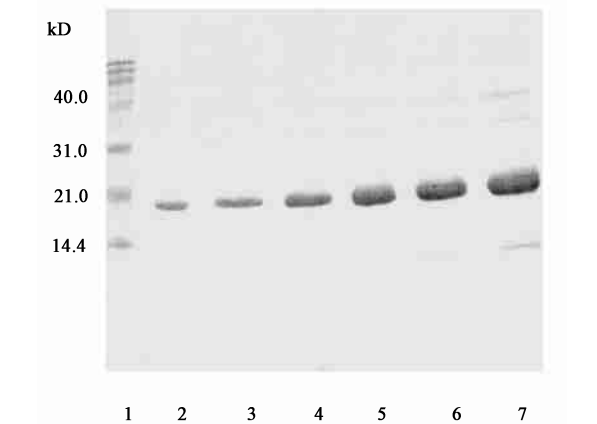


图 3 发酵过程中 rhIL-11 的 SDS-PAGE 图
1. Mark; 2. IL-11 standard; 3 ~ 7. Supernatant from fed-batch culture ; hours 36 ,42 ,54 ,66 ,72

2.5 单位时间单位体积内 rhIL-11 蛋白的产出量

从表 2 可以看出连续培养 rhIL-11 蛋白的产出率高于补料分批培养。

通过以上的实验结果表明,连续培养在单位时间单位体积内产出的 rhIL-11 蛋白量约是常规的补料分批培养方式的 1.5 倍左右。比较图 2 和图 3 可以看出,连续培养在发酵过程中 rhIL-11 的降解条带在发酵结束之前(约第 17 天左右)才出现,而常规的补料分批培养则早在发酵初期(约第 2 天左右)就出现了。这可能是由于连续培养比补料分批

表 2 不同培养方式下的发酵结果			
Mode/result	Total rhIL-11 (g)	fermentation time (d)	productivity level (g/d L)
Fed-batch (0603)	5.26	3.0	0.12
fed-batch (0701)	5.78	3.3	0.12
fed-batch (0702)	4.73	3.2	0.10
continuous (0801)	54.6	20	0.18
continuous (0901)	52	19.8	0.18
continuous (1001)	53	20.7	0.17

培养,更能及时地将表达蛋白从发酵液中分离出来,从而避免了发酵液中可能引起蛋白降解的各种因素(诸如 pH,蛋白酶等)对表达蛋白产生影响^[5~7]。因此,连续培养的工艺研究为有效控制发酵过程中不出现 rhIL-11 蛋白的降解情况创造了有利条件,不仅意味着能够简化后续纯化步骤,更有利于大大提高蛋白纯化的收率、降低生产成本。从而更进一步表明,表达 rhIL-11 的毕赤酵母工程菌的连续培养工艺研究对 rhIL-11 的生产具有较大的实用前景,值得作更深入的研究。目前,我们研制的白介素 11 即将完成二期临床试验。

参考文献

[1] Kaye J A. FDA Licensure of Neumega to prevent Chemotherapy - induced thrombocytopenia ,Stem cells ,1998 :16(Suppl 2) :207 ~ 223

[2] Rust D M ,Wood L S ,Battiato L A. Oprelvekin : an alternative treatment for thrombocytopenia . Clin J Oncol Nurs ,1999 ,3(2) :57 ~ 62

[3] Cereghino J L ,Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev ,2000 ,24 (1) :45 ~ 66

[4] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual . 2nd Edition ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989

[5] Brierley R A ,Davis G R ,Holtz G C. Production of Insulin-Like Growth Factor-1 in Methylotrophic Yeast Cells. United States Patent , 1994 ,5 ,324 ,639

[6] Clare J J ,Romanos M A ,Rayment F B ,et al. Production of Epidermal Growth Factor in Yeast :High-level Secretion Using *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Gene Copies. Gene ,1991 ,105 : 205 ~ 212

[7] Siegel R S ,Buckholz R G ,Thill G P ,et al. Production of Epidermal Growth Factor in Methylotrophic Yeast Cells. International Patent (PCT) Application. Publication ,1990 ,No. WO90/10697

(下转第 100 页)

- [4] John A A ,Deborah M ,et al. A Phase study of amplitgen in human immunodeficiency virus-infected subjects. The Journal of Infectious Diseases ,1992 ,166 :717 ~ 722
- [5] William A C ,Daniel V ,et al. Mismatched double-stranded RNA , amplitgen ,demonstrates antiviral and immunostimulatory activities in HIV Disease. Int.J. Immunopharmac ,1991 ,Vol. 13 ,suppl. 1. 69 ~ 76
- [6] Isadore B ,David R ,et al. Clinical studies with amplitgen. Journal of Biological Response Modifiers 1985 ,4 :669 ~ 675
- [7] James L ,Paul OPTs 'o. Polyinosinic acid+polycytidylic acid and its mismatched analogues. Molccular Pharmacology ,1979 ,15 :165 ~ 173

Research on the Pyrogenic Effect in Rabbit Caused by Double Stranded RNA

Nie Shijian¹ Hu Dongqin²

(1 Tianjin University of Science and Technology Tianjin 300222 2 Brins-Live Pro Biotechnology Co.LTD Beijing 100054)

Abstract Mismatched double stranded RNA is one of the potential materials for anti-tumor and anti-virus because the mismatched base pair structure prominently reduce the toxic side effects. The pyrogenic effects in rabbit caused by double stranded RNA (Poly I:C) and its mismatched analogues (Poly I:C₁₂U) were tested. Poly I:C₁₂U have not appeared any toxicity and other side effect ,but Poly I:C caused rabbit fever and even death.

Key words Double stranded RNA Pyrogenic effects

(上接第93页)

Continuous Cultivation of Recombinant Human Interleukin 11 which Expressed by *Pichia pastoris*

Sun Ying Li Hui Tian Fangxi Zhong Wentao

(Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co.LTD Hangzhou 310018)

Abstract Continuous fermentation of recombinant human interleukin 11 which expressed by *Pichia pastoris* have been investigated. Continuous production of rhIL-11 by *Pichia pastoris* was demonstrated in a 10-L working volume fermentor using glycerol and methanol as the carbon source. The fermentation could be extended for 20 days with a steady-state protein concentration of approximately 400mg/ml. Cell densities (OD₆₀₀) were >100 at a dilution rate (D) of 0.05h⁻¹.

Key words *Pichia pastoris* Recombinant human interleukin 11 Continuous cuotivation

(上接第96页)

Cloning ,Sequencing and Prokaryotic Expression of Human Laminin alpha 4 Chain LG3 Module

Lian Jiqin Zhang Yujing Dai Xufang Zhang Yanyu Sun Zhaozeng Li Shize

(The Faculty of Animal Science the Quartermaster University Changchun 130062)

Abstract Total RNA was extracted from placenta by Trizol reagent ,and an unique RT-PCR fragment of human laminin alpha 4 chain LG3 module was obtained. The PCR product then was cloned into PMD-18T vector and sequenced after it was identified by enzyme digestion and PCR amplification. Recombinant LG3 prokaryotic expression vector was constructed through recombination of PET-28a vector and certificated by sequencing ,and the finally recombinant LG3 module was got expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain.

Key words Laminin LG3 module Clone Expression