

发酵条件对毕赤酵母表达重组人干扰素 ω 糖基化的影响

The Effect of Fermentation Conditions on Glycosylation of Recombinant Human Interferon Omega in Yeast *Pichia pastoris*

刘 红^{1,2}, 潘红春^{1,2}, 蔡绍哲^{1*}, 陈真文², 郑小峰², 杨红涛², 肖中元²

LIU Hong^{1,2}, PAN Hong-Chun², CAI Shao-Xi^{1*}, CHEN Zhen-Wen², ZHENG Xiao-Feng², YANG Hong-Tao² and XIAO Zhong-Yuan²

1. 重庆大学 生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044

2. 太极集团 西南药业股份有限公司, 重庆 400038

1. College of Bioengineering, Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China

2. Southwest Pharmaceuticals Limited Company, Taiji Group, Chongqing 400038, China

摘 要 发酵条件是影响毕赤酵母(*P. pastoris*)表达外源重组糖蛋白时糖基化的重要因素。通过菌体浓度、起始 pH 值、甲醇诱导浓度和周期、装液量等摇瓶发酵实验,研究不同发酵条件对毕赤酵母表达分泌型重组人干扰素 ω (rhIFN ω)过程中糖基化的影响;同时,在连续培养过程中考察 pH 值变化对 rhIFN ω 糖基化的影响和分批发酵过程中 rhIFN ω 糖基化的变化。结果表明,控制菌体密度 250 g/L(WCW)、起始 pH 值 6.0、装液量小于 30 mL、甲醇诱导浓度 15 g/L、甲醇诱导 3 次(每 24 h 诱导一次)等发酵条件,有利于摇瓶发酵过程中 rhIFN ω 的糖基化;控制 pH 值 7.0~7.5 可促进 rhIFN ω 的糖基化;分批发酵过程中,糖基化与非糖基化 rhIFN ω 的含量有同比变化趋势,但糖基化 rhIFN ω 所占比例明显低于摇瓶发酵实验的结果,其原因有待进一步研究。

关键词 糖基化, 重组人干扰素 ω , 毕赤酵母, 发酵条件

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0107-06

Abstract To investigate the influence of the fermentation conditions on glycosylation of heterologous recombinant protein in yeast *Pichia pastoris*, the glycosylation of recombinant human interferon omega(rhIFN ω) under various fermentation conditions, e. g., cell density, initial pH, methanol concentration, duration of the induction, and medium volume were studied. The glycosylation of rhIFN ω in the continuous fermentation process under various pH values and in batch fermentation were also investigated. In 250 mL flask, the optimal cell density, initial pH, medium volume, methanol concentration and frequency of methanol induction were 250 g/L(WCW), pH6.0, less than 30 mL, 15 g/L and 3 (in every 24 h), respectively. In the continuous process, the glycosylation of rhIFN ω could be effectively improved by maintaining the pH value at 7.0~7.5. In the batch fermentation process, the expression level of glycosylated and non-glycosylated rhIFN ω were the same, but the specified value of glycosylation/non-glycosylation was significantly lower than that in the flask culture. The reason of this phenomenon will be further studied. This research lay the foundation for the scale-up of production and the enhancement of rhIFN ω glycosylation in *Pichia pastoris*.

Key words *Pichia pastoris*, recombinant human interferon omega (rhIFN ω), glycosylation, fermentation condition

Received: May 5, 2004; Accepted: October 13, 2004

This work was supported by Grant from the Chongqing Science and Technology Department Fund.

* Corresponding author. Tel: 86-23-65102507; E-mail: sxcai@cqu.edu.cn

重庆市科技攻关项目资助。

糖基化是真核细胞中常见和复杂的翻译后修饰方式之一,具有重要的生物学意义。糖蛋白的糖链能修饰并改变蛋白的内在特性,对糖蛋白整体生物学功能的体现至关重要^[1]。影响蛋白糖基化的因素很多:外源目的蛋白的氨基酸序列和三维空间结构决定着潜在糖基化位点的分布和数目;表达系统中细胞的类型和培养条件等因素决定糖基化所形成的糖链结构,细胞的类型是决定糖基化程度和形式的主要因素。

甲醇营养型毕赤酵母(*Methylotrophic Pichia pastoris*)表达系统具有表达率高、遗传稳定、产物可分泌等优点,是外源分泌蛋白和胞内外源蛋白表达的一个优秀表达系统^[2,3]。可使表达的外源目的蛋白糖基化是该系统的另一个主要优势,通常在蛋白天冬酰胺残基酰胺键氮上实现糖基化,糖基化的识别序列为 Asn-Xaa-Thr/Ser,也可以在蛋白的苏氨酸和/或丝氨酸残基的羟基处进行 O-糖基化,产生高甘露糖型糖链的糖蛋白^[4]。已有多种外源糖蛋白在甲醇营养型毕赤酵母表达系统中获得成功表达。

干扰素 ω 具有较强的抗病毒复制、抗细胞增殖和免疫调节等生物活性,有望用于多种肿瘤和病毒性疾病的治疗^[5,6],尤其适用于对 IFN α 产生耐药性的患者^[7]。人干扰素 ω 成熟蛋白中有一个潜在的 N-糖基化位点 Asn⁸⁰-Met⁸¹-Thr⁸²,天然蛋白在该位点上有糖基化^[8]。利用甲醇营养型毕赤酵母表达系统成功实现重组人干扰素 ω (rhIFN ω) 的表达^[9],其目的蛋白部分被糖基化,而另一部分不能实现糖基化,并且糖基化部分与非糖基化部分的比例随发酵条件而变化。环境条件影响动物细胞糖基化的研究有报道^[10-14],而发酵条件对甲醇营养型毕赤酵母表达外源目的蛋白糖基化的影响的报道较少,为此,我们针对发酵条件对毕赤酵母表达重组人干扰素 ω 糖基化的影响进行了较为详细的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Pichia pastoris* GS115 菌株 w1,遗传表型 aox⁺ his⁺,醇氧化酶启动子 P_{aox1},载体 pMEX9K,蛋白信号肽序列为酿酒酵母的 α 杂交因子 AMF,外源基因为人干扰素 ω 的 cDNA,载体呈线性整合在染色体上。该菌株由军事医学科学院微生物流行病研究所构建^[9]。

1.1.2 培养基:

YPD 固体培养基 1L 含:酵母提取物(英国, Ox-

oid)10 g,水解酪蛋白(日本,日本制药株式会社)20 g,葡萄糖(国产分析纯试剂)20 g,琼脂(国产分析纯试剂)20 g。

摇瓶生长培养基(BMGY)1 L 含:酵母提取物(英国, Oxoid)10 g,水解酪蛋白(日本,日本制药株式会社)20 g, YNB 13.4 g,甘油 10 g, 1 mol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲液 100 mL,生物素 0.4 mg。

摇瓶诱导培养基(BMMG)1 L 含:为 BMGY 培养基中的甘油换成甲醇 10 g。

发酵培养基(BSM)1 L 含:85%磷酸 26.7 mL, CaSO₄·2H₂O 0.93 g, K₂SO₄ 18.2 g, MgSO₄·7H₂O 14.9 g, KOH 4.13 g,甘油 40 g, PTM1 溶液 4.35 mL, 28%氨水调 pH 至 5.0。

PTM1 溶液 1L 含: CuSO₄·5H₂O 6.0 g, KI 0.8 g, MnSO₄·H₂O 3.0 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g, CoCl₂ 0.5 g, ZnCl₂ 20.0 g, FeSO₄·7H₂O 65.0 g,生物素 0.2 g,硫酸 5 mL。

补料 1 培养基 1 L:甘油 500 g,生物素 2.4 mg, PTM1 溶液 12 mL。

补料 2 培养基 1 L:甲醇 500 mL,生物素 2.4 mg, PTM1 溶液 12 mL。

连续诱导培养稀释液 1 L 含:甲醇 200 mL, 85%磷酸 13.5 mL, CaSO₄·2H₂O 0.47 g, K₂SO₄ 9.1 g, MgSO₄·7H₂O 7.45 g, KOH 2.07 g,生物素 0.87 mg, PTM1 溶液 4.35 mL。

1.2 方法

1.2.1 培养:

摇瓶培养:用 250 mL 三角瓶装 50 mL BMGY 培养基,置于 200 r/min, 30℃振荡培养 48 h。离心收集菌体,以一定菌体浓度悬浮于适量 BMMY 培养基中, 30℃诱导表达 72~96 h,每 24 h 添加甲醇 1 次。

分批培养:在 5 L 全自动不锈钢发酵罐(Biostat B, B. Braun Biotech)中进行连续培养,工作体积 3 L。前期补料分批培养,接种量 10%,通过改变通气量、搅拌转速和通纯氧等措施保持溶氧水平不低于 20%,用磷酸或氨水根据需要调节 pH 值 5.0。当最初甘油耗尽,溶氧大幅度上升时,开始以 1 mL/min 的速度流加补料 1 培养基,6 h 后停止补料,约 2 h 后溶氧又大幅度上升,以一定的速度开始流加补料 2 培养基,通过甲醇在线检测和流加控制系统控制整个发酵过程中甲醇浓度为 5 g/L,控制溶氧 30%左右。

连续诱导培养:前期同分批培养,当启动补料 2

培养基 8 h 后,以 $D = 0.03\text{ h}^{-1}$ 的稀释率流加连续诱导培养稀释液进行连续诱导表达,同时以相同流量收集培养液,保持罐内培养液体积恒定。用磷酸或氨水根据需要调节 pH 值 5.0 ~ 8.0,每增加 0.2 pH 值,维持 16 h 后取样测定细胞湿重(WCW, wet cell weight),同时离心收集上清液置 -20°C 冻存待测。

1.2.2 糖蛋白的 N-糖基化分析:在 $30\text{ }\mu\text{L}$ 纯化 rhIFN ω 溶液中加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ PNGase F 糖苷酶,总反应体系 $50\text{ }\mu\text{L}$, 37°C 消化 5 ~ 15 h,经 SDS-PAGE 检测进行糖基化分析。

1.2.3 测定方法:菌体浓度的测定:采用湿重法,取 5 mL 发酵液置于离心管中 5000 r/min 离心 5 min,称重离心菌体,计算菌体浓度(本文均为 WCW, wet cell weight,单位为 g/L),上清液于 -20°C 冻存待测。pH 值的测定:采用 pHs-3C 型精密酸度计测定。发酵液中 rhIFN ω 含量的测定:采用 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后电泳凝胶经计算机扫描,根据电泳条带染色强度进行定量分析(采用 Kodak 1D 数码凝胶图像分析系统,2.0.3 版本,按说明书操作,自动消除背景,用自制纯度大于 98.5% 的 rhIFN ω 绘制标准曲线)。糖基化 rhIFN ω 比值(Specific value)的计算:每组实验中相应的糖基化 rhIFN ω /非糖基化 rhIFN ω 。

2 结 果

2.1 rhIFN ω 糖基化的酶消化鉴定

利用 SDS-PAGE 进行 rhIFN ω 的分子量检测,目标蛋白条带在 22 000 处,该蛋白相对分子质量大于理论值,推测可能为糖基化所致。将纯化的 rhIFN ω 溶液用 PNGase F 糖苷酶消化处理和 SDS-PAGE 检测结果表明,经 N-糖基化酶处理后的目的蛋白变小(见图 1),经 MALDI-TOF 测定分子量由 22 166.10 减小为 20 340.71,与理论值基本一致,说明本系统表达的 rhIFN ω 确实发生了 N-糖基化^[8]。

2.2 菌体浓度对 rhIFN ω 糖基化的影响

用 BMMY 悬浮从 BGMY 培养得到的菌体,使其菌体浓度达到 150 ~ 400 g/L,进行正常诱导表达的结果见图 2。菌体浓度为 250 g/L 时糖基化 rhIFN ω 表达量和糖基化比值均最高,随着菌体浓度的增加,糖基化 rhIFN ω 的表达量下降迅速;菌体浓度对非糖基化 rhIFN ω 的影响不大,但也有随菌体浓度增加而表达量下降的趋势。因此,要获得高表达的糖基化目标蛋白,必须控制合适的菌体浓度。

2.3 起始 pH 对 rhIFN ω 糖基化的影响

用不同 pH 值的磷酸缓冲液配制 BMMY 诱导培

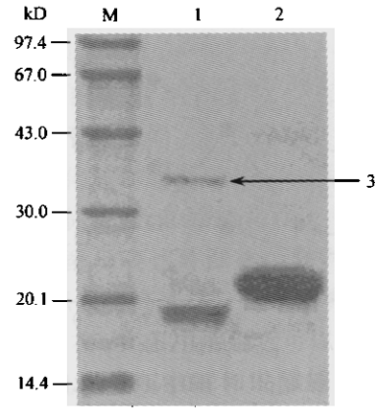


图 1 rhIFN ω 糖苷酶消化后的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of PNGase F digested rhIFN ω
M: protein molecular weight marker; 1: rhIFN- ω digested by PNGase F;
2: purified rhIFN ω ; 3: PNGase F.

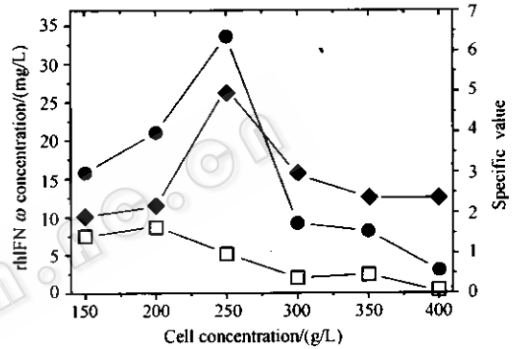
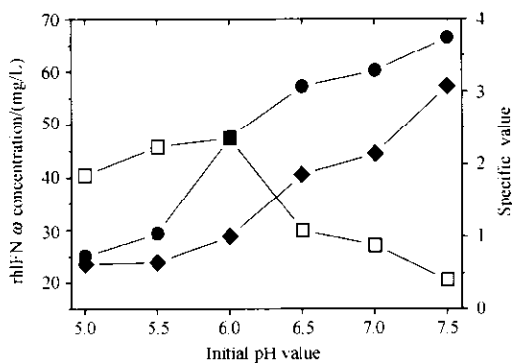


图 2 菌体浓度对 rhIFN ω 糖基化的影响
Fig. 2 Influence of cell density on the glycosylation of rhIFN ω
● glycosylation; □ non-glycosylation; ◆ specific value (glycosylation/
non-glycosylation).

培养基,使其起始 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5,控制菌体浓度 250 g/L 进行实验,其结果见图 3。糖基化的 rhIFN ω 随起始 pH 值的升高呈逐渐增加,在起始 pH 值 6.5 ~ 7.5 时可获得最较高糖基化表达;对于非糖基化的 rhIFN ω ,当起始 pH 值大于 6.0 时呈逐渐降低的趋势,在 pH 6.0 获得高表达。从糖基化比值的变化可知,在实验的起始 pH 值范围内,较高的起始 pH 值有利于毕赤酵母 rhIFN ω 的糖基化。各个实验发酵液的终 pH 值均保持逐步升高的趋势,但范围缩小在 5.5 ~ 7.0 之间。结果提示,在毕赤酵母表达 rhIFN ω 的发酵过程中,控制较高的 pH 值将有利于 rhIFN ω 的糖基化。

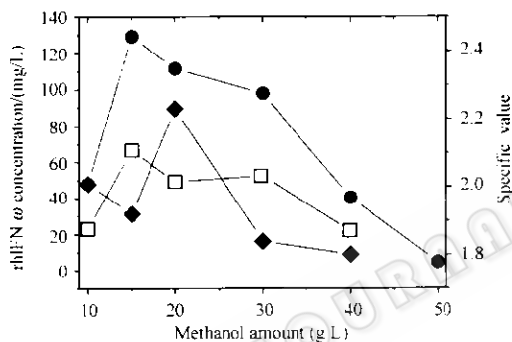
2.4 甲醇诱导浓度对 rhIFN ω 糖基化的影响

甲醇是甲醇营养型毕赤酵母表达外源蛋白诱导剂,其浓度对外源目标蛋白的表达影响很大。按摇瓶诱导培养方式,每 24 h 添加一次甲醇进行诱导(共 72 h),控制每次添加甲醇量分别为 10、15、20、

图3 起始 pH 对 rhIFN ω 糖基化的影响Fig. 3 Effect of initial pH on rhIFN ω glycosylation

● glycosylation; □ non-glycosylation;
◆ ratio of glycosylation/non-glycosylation.

25、30、35、40、45 和 50 g/L, 其实验结果见图 4。在摇瓶培养中, 控制甲醇诱导浓度为 15~30 g/L 有利于 rhIFN ω 的表达, 20 g/L 的甲醇浓度可以获得最大的糖基化比例; 过高或过低的甲醇诱导浓度均不利于 rhIFN ω 表达和糖基化。

图4 甲醇诱导浓度对 rhIFN ω 糖基化的影响Fig. 4 Effect of methanol concentration on rhIFN ω glycosylation

● glycosylation; □ non-glycosylation;
◆ specific value of glycosylation/non-glycosylation.

2.5 甲醇诱导周期对 rhIFN ω 糖基化的影响

甲醇诱导的周期也是极其重要的, 每 24 h 添加甲醇 15 g/L 一次, 共添加甲醇诱导 5 次 (120 h) 的结果见图 5。甲醇诱导前期, 主要表达糖基化的 rhIFN ω , 并随诱导时间的延长而快速增加, 72 h 时达到最高, 随后维持相对稳定; 在甲醇诱导的前 72 h 内非糖基化的 rhIFN ω 一直维持较低的水平, 72 h 后非糖基化 rhIFN ω 的表达量开始快速增加。这种可能与培养基中糖基化前体物质充足与否有关。

2.6 装液量对 rhIFN ω 糖基化的影响

在 250 mL 三角瓶中装入 30、40、50 和 100 mL BMMY 进行装液量试验, 结果见图 6。在摇瓶诱导表达条件下, 装液量为 30 mL 时有较高表达, 糖基化

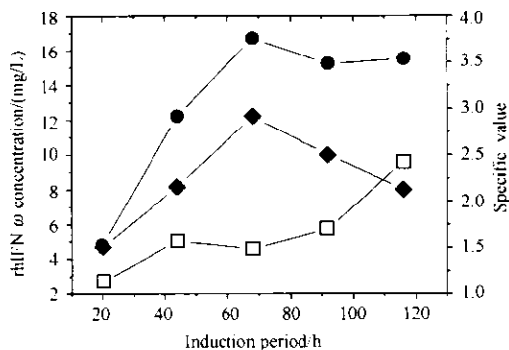
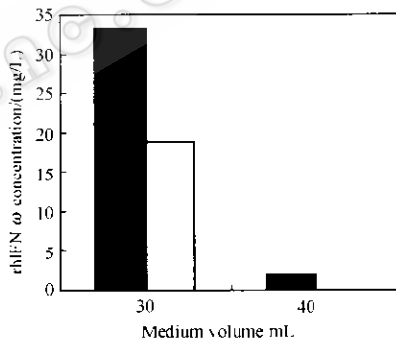
图5 甲醇诱导周期对 rhIFN ω 糖基化的影响

Fig. 5 Influence of the induction duration and frequency

on rhIFN ω glycosylation

● glycosylation; □ non-glycosylation;
◆ specific value (glycosylation/non-glycosylation).

rhIFN ω 的表达量高出非糖基化 rhIFN ω 表达量 40%, 糖基化比值为 1.69; 装液量增加为 40 mL 时, rhIFN ω 的表达受到严重抑制, 糖基化的 rhIFN ω 仅有 30 mL 时表达的 10% 左右, 未检测到非糖基化 rhIFN ω , 进一步增加装液量时无 rhIFN ω 表达。

图6 装液量对 rhIFN ω 糖基化的影响Fig. 6 Influence of medium volume on rhIFN ω glycosylation

■ glycosylation; □ non-glycosylation.

2.7 连续培养过程中 pH 变化对 rhIFN ω 糖基化的影响

在 rhIFN ω 连续诱导研究过程中发现 pH 值变化对 rhIFN ω 的糖基化影响较大。为此, 以 $D = 0.03$ h⁻¹ 的稀释率流加连续诱导培养稀释液进行连续诱导表达研究, 通过自动流加磷酸或氨水控制罐内 pH 值 5.0~8.0, 每增加 0.2 pH 值, 使其达到稳态 (约 16 h) 后取样测定 pH 值变化对 rhIFN ω 糖基化的影响, 结果见图 7。控制连续诱导过程中 pH 值 6.7~7.8 有利于 rhIFN ω 的糖基化, 其中最适糖基化 pH 值为 7.0~7.6, pH 值小于 6.7 或大于 7.8 均不利于 rhIFN ω 的糖基化。这与摇瓶中不同起始 pH 值试验的结果基本一致, 控制发酵过程中较高的 pH 值有

利于 rhIFN ω 的糖基化。

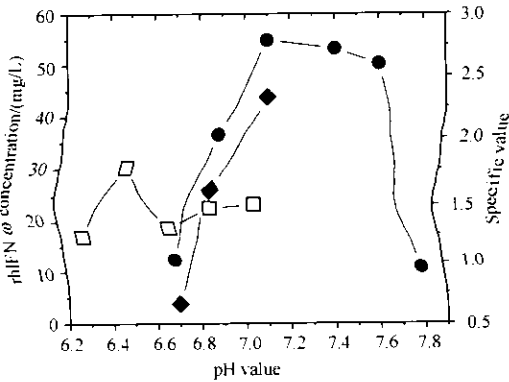


图 7 连续培养过程中 pH 变化对 rhIFN ω 糖基化的影响

Fig. 7 Effect of pH changes on rhIFN ω glycosylation during continuous culture

● glycosylation; □ non-glycosylation;
◆ specific value (glycosylation/non-glycosylation).

2.8 分批发酵过程中 rhIFN ω 糖基化的变化

按毕赤酵母常规的培养和诱导表达方式进行 rhIFN ω 的分批发酵,结果见图 8。在分批发酵过程中, rhIFN ω 的糖基化和非糖基化表达量随时间呈基

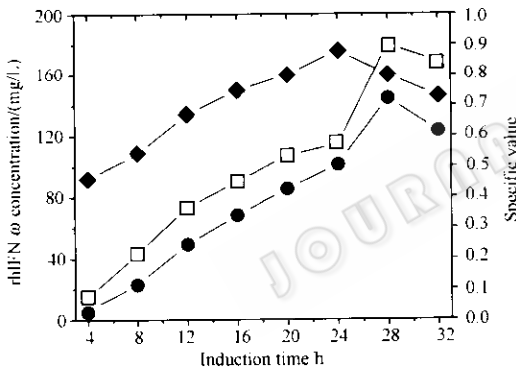


图 8 典型分批发酵过程中 rhIFN ω 糖基化的变化

Fig. 8 rhIFN ω glycosylation in the typical

batch fermentation process

● glycosylation; □ non-glycosylation;
◆ specific value (glycosylation/non-glycosylation).

本相同的变化趋势,诱导 28 h 前 rhIFN ω 表达量逐渐增加,28 h 后开始下降;糖基化比例(糖基化表达量/非糖基化表达量)24 h 前逐渐上升,之后开始下降。多次分批发酵结果表明,毕赤酵母在发酵罐中表达 rhIFN ω 时, rhIFN ω 糖基化的比例远低于在摇瓶发酵中的比例。

3 讨论

菌体密度是影响毕赤酵母表达外源重组蛋白的重要因素,重组蛋白的高密度诱导表达一直是许多学者感兴趣的课题,菌体密度对毕赤酵母表达外源

重组蛋白时糖基化影响的研究还未见报道。图 1 结果表明,当菌体密度增加到某一值时,糖基化 rhIFN ω 的表达量迅速下降,而非糖基化 rhIFN ω 的表达量并未出现相应的下降趋势,这可能与菌体数量增加消耗大量与糖基化前体物质有关。因此,要获得高表达的糖基化目标蛋白,必须控制合适的菌体密度。

通常毕赤酵母表达外源重组蛋白的 pH 值控制在 5 左右,可以获得高表达。但本研究发现,毕赤酵母表达 rhIFN ω 在 pH 值中性附近可以获得较高的糖基化比例,并且在摇瓶发酵和发酵罐发酵中取得了基本一致的结果,控制发酵过程中较高的 pH 值有利于 rhIFN ω 的糖基化。

甲醇是甲醇营养型毕赤酵母表达外源蛋白的诱导剂,其诱导浓度和诱导周期对目标蛋白的表达都有极大影响。图 4 结果表明,在相同的诱导表达时间内,甲醇浓度主要影响毕赤酵母表达 rhIFN ω 的量,对糖基化比例的影响不明显;而图 5 和图 8 结果显示了基本一致的糖基化变化趋势,在分批发酵过程中,当糖基化的前体物质耗尽后,非糖基化 rhIFN ω 的表达量增加迅速,糖基化比例开始下降。因此,为了获得高表达的糖基化 rhIFN ω ,既要控制适当的甲醇诱导浓度,又必须控制适宜的甲醇诱导周期。

分析上述结果的糖基化比例可知,发酵罐中表达毕赤酵母 rhIFN ω 时, rhIFN ω 糖基化的比例远低于摇瓶发酵中的比例。不清楚其原因,这可能与放大过程的多种因素,如放大过程中溶氧的控制、pH 值的控制等有关,值得进一步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Meynial-Sallers I, Combes D. *In vitro* glycosylation of proteins: an enzymatic approach. *J Biotechnol*, 1996, **46**: 1-14
- [2] Romanos MA, Clare CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8**(2): 423-488
- [3] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biol Technology*, 1993, **11**: 905-910
- [4] Roger KB, Francis JC. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, **30**: 193-200
- [5] Horton HM, Hernandez P, Parker SE *et al*. Antitumor effects of interferon- ω : *in vivo* therapy of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res*, 1999, **59**(16): 4064-4068
- [6] Hagelstein J, Kist A, Stremmel W *et al*. Antiviral potential of interferon- ω on hepatitis B virus replication in human hepatoma cells. *Arzneimittelforschung*, 1998, **48**: 343-347
- [7] Mathias MP, Helga M, Peter I *et al*. Open-label study of omega interferon in previously untreated HCV-infected patients. *Journal of Hepatology*, 2002, **36**(Category 6): 125

- [8] Adolf GR, Fruehbeis B, Hauptmann R *et al.* Human interferon omega 1: isolation of the gene expression in Chinese hamster ovary cells and characterization of the recombinant protein. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1089**(2): 167 - 174
- [9] Qi LQ(齐连权), Fu L(付玲), Yu CM(于长明) *et al.* Expression and purification of human interferon ω in yeast *Pichia pastoris*. *Bull Acad Mil Med Sci*(军事医学科学院院刊), 2003, **27**(4): 268 - 270
- [10] Goochee CF, Monica T. Environmental effects on protein glycosylation. *Bio/Technology*, 1990, **8**: 421 - 427
- [11] Grammatikos S, Valley U, Nimtz M *et al.* Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity: A mechanism of ammonium action on protein glycosylation. *Biotech Prog*, 1998, **14**: 410 - 419
- [12] Munzert E. Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effect on recombinant human antithrombin III integrity. *Biotech Prog*, 1996, **12**: 559 - 563
- [13] Kimura R, Miller WM. Glycosylation of CHO derived recombinant tPA produced under elevated pCO₂. *Biotech Prog*, 1997, **13**: 311 - 317
- [14] Megaw JM, Johnson LD. Glycoprotein synthesized by cultured cells; effects of serum concentrations and buffers on sugar content. *Proc Soc Exp Bio Med*, 1979, **161**: 60 - 65