

## 培养基组分和发酵温度对重组酵母表达HBsAg的影响

施 源 唐孝宣 袁渭康 陈敏恒

(华东化工学院, 上海)

沈绿萍 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

分析酵母基因工程菌生产目的基因表达产物——乙型肝炎表面抗原的发酵过程, 降低培养基中葡萄糖浓度, 补充甘油和蔗糖, 能使乙型肝炎表面抗原相对浓度从 3.89 提高至 8.12, 比活值增加 2.69 倍。根据实验观察的结果, 造成发酵过程的温度序列, 能合理地分配受体细胞代谢能量的消耗, 使目的基因的表达量提高至 13.51 相对浓度。同时, 对流加式操作系统中表现出的重组质粒稳定性的变化规律给予描述和解释。另外, 提出了异源 DNA 与受体细胞的转化过程存在着一个分布, 此分布对通过发酵提高乙型肝炎表面抗原的产量造成影响。

**关键词** 酵母基因工程菌发酵; 乙型肝炎表面抗原; 重组质粒稳定性

作为第一个用于人类的基因工程疫苗——乙型肝炎疫苗目前已经能投放市场<sup>[1]</sup>。乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)损害肝脏引起的全身性传染病, 是世界上广泛传播的一种病毒性疾病。在我国, 仅带毒者据统计可达人口的 1/10 强, 正严重地危害着公众的健康。因此, 在近 10 年期间, 各国科学家们对此项研究抱着极大的热忱, 并投入了大量的人力和物力。利用各种受体细胞表达乙型肝炎表面抗原(HBsAg), 在大肠杆菌<sup>[2-5]</sup>、酵母<sup>[6-8]</sup>、哺乳动物细胞<sup>[10,11]</sup>、重组牛痘病毒疫苗<sup>[12,13]</sup>中都获得一定的成功。当实验室的结果达到较高水平时, 基因工程菌大规模培养的过程研究则成为相当重要的一个环节。

本研究在酵母 3- 磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)启动子下表达HBsAg。由于GAPase是糖酵解途径中的一个酶, 菌体内含量较

高, 酶的启动基因作用较强。但组成型酶系的合成速率既不受诱导物诱导也不受辅阻遏物的控制, 基因表达在任何时刻都在进行。因此, 重组质粒和酵母染色体基因竞争利用共同的蛋白质表达系统、代谢能量以及生物合成的前体等造成受体细胞生长缓慢, 同时也造成重组质粒的不稳定。常规采用的方法是在受体细胞发酵的不同时期使培养基具有选择性压力, 但由于它的存在往往造成发酵过程中细胞群总生长速率明显低于丰富培养基条件时细胞的生长。因此, 保持高的重组质粒稳定性是以昂贵的培养基和受体细胞低的生长为代价。

经实验观察, 受体细胞的生长和重组质粒的拷贝、表达既相互影响又有着明显的差异。本文通过对酵母基因工程菌生产目的基因表达产物——乙型肝炎表面抗原发酵过程分析, 从培养基组成, 发酵温度

本文于1988年9月20日收到,

等条件的改变来利用和扩大这种差异,探讨在丰富培养基介质中使受体细胞高密度、目的基因高表达的方法。

## 方法和材料

### (一) 实验菌株

发酵中使用的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) DBY-745(MAT<sup>+</sup>HML<sup>+</sup>HMR<sup>+</sup>Ade1-100 Leu2-3 Leu2-113 Ura3-52 MAL2) 带有酵母-大肠杆菌穿梭质粒pYGH<sub>3</sub>-16-S<sup>[14]</sup>。此重组质粒具有Leu2酵母筛选标志、2 $\mu$ 酵母质粒复制区以及GAP启动子、HBV表面抗原基因(S基因)、pBR322的抗氨苄青霉素基因和colE1基因复制区,在S基因下游还带有GAP120bp及Trp-1基因3'端650bp不翻译区。用醋酸锂方法完成重组质粒的转化,在亮氨酸缺陷(Leu<sup>-</sup>)的合成培养基筛选Leu<sup>+</sup>表型菌落为转化菌株。

### (二) 培养基

实验使用具有选择性压力的培养基YNB<sub>1</sub>、最低培养基YNB<sub>1</sub>-1和丰富培养基YPD-s。

YNB<sub>1</sub>成分(%): 2.0g葡萄糖; 0.67g酵母基础氮(Difco, Lab. Detroit, Michigan, USA); 2.0mg腺嘌呤(Ade); 4.0mg尿嘧啶(Ura); 微量元素和维生素。

YNB<sub>1</sub>-1成分(%): 在YNB<sub>1</sub>培养基中补充4.0mg亮氨酸(Leu)。

YPD-s成分(%): 2.0g Polypeptone (大五营养化学株式会社, 日本); 1.0g酵母抽提物(Difco, Lab., Detroit, Michigan, USA); 葡萄糖:甘油:蔗糖 1:0.1:0.1; 4.0mg Ade; 4.0mg Ura; 无机盐; 微量元素和维生素。

以上培养基中Ade、Ura、Leu、微量

元素和维生素都各自配成高浓缩液,过滤灭菌,其余为120℃ 30min高压灭菌。

在培养皿中使用的上述培养基则增加1.7%琼脂粉。

### (三) 酵母工程菌发酵

挑培养皿 YNB<sub>1</sub>琼脂上生长的单菌落于5ml YNB<sub>1</sub>培养基, 30℃, 振荡器(Yamata Shaker Model SA-31, Japan)培养20h, 3000rpm离心细胞5min 4℃, 新鲜YNB<sub>1</sub>培养基悬浮细胞接入50ml/250ml三角烧瓶, 于30℃, 摇床培养(250r/min) 15h后按2%接种量接入YPD-s培养基, 再在摇床上振荡培养 8—10h 后接入5L发酵罐(MF-250, NBSCo., Edison, N.Y., USA), 起始体积 1.2L, 通气量和搅拌转速由溶解氧浓度控制系统(DO-81, NBSCo., Edison, N.Y., USA)调节、记录, 起始 pH4.50, 以高浓度混合碳氮源分别流加, 其流加方案随不同的实验要求而变。

### (四) 发酵过程分析

每隔2h取样, 样品稀释后于OD<sub>600nm</sub>测定细胞生长。样品经离心和洗涤后称干细胞重量(DCW)。离心上清液用于分析葡萄糖、氨基氮和磷酸根的含量。重组质粒稳定性分析: 以Leu基因表型为标志, 计算含HBsAg基因质粒的细胞在总体细胞中的比值。同一样品经充分振荡适当稀释后分别涂布于YNB<sub>1</sub>和YNB<sub>1</sub>-1两种琼脂合成培养基上, 30℃, 静止3天后分别计数菌落数, 每一样品取三次重复涂布结果的平均值。HBsAg蛋白浓度分析: 收获的酵母细胞, 经离心洗涤后悬浮于PBS缓冲液(pH7.50), 在冰浴中用直径0.3—0.5mm玻璃珠在Vertex上强烈振荡, 在4℃, 12000rpm离心10min, 分离细胞碎片, 酵母细胞内大颗粒蛋白和HBsAg。上清液用PBS足够稀释后, 经放射免疫药盒

(Ausria, II-125, Aobott Lab. North, Chicago, USA)测定HBsAg 蛋白颗粒的有效浓度。破碎后的上清液为防止其含有的蛋白水解酶降解,加入0.5% 200mmol/L PMSF, 4℃ 保存。酵母 3-磷酸 甘油 醛脱氢酶 (GAPase) 活力测定: 每隔 0.5 min读取酶反应的 $A_{340nm}$ , 连续3min, 取反应最初线性部分, 采用酶空白为对照计算每分钟A的增值, 可得单位细胞 GAPase 活力 $u/OD_{600}$ 。

## 结 果

### (一) 酵母工程菌株中比活值的随机分布

培养实验发现, 尽管控制相同的培养条件, 但从DBY-745生长的 YNB<sub>5</sub>琼脂培养基上任意挑选50个  $Leu^+$ 表型单菌落培养, 经分析, 在细胞比生长速率、基因表达产物量以及细胞比活等数据存在着较大的差异。图1为 50 个单菌落比活值的分

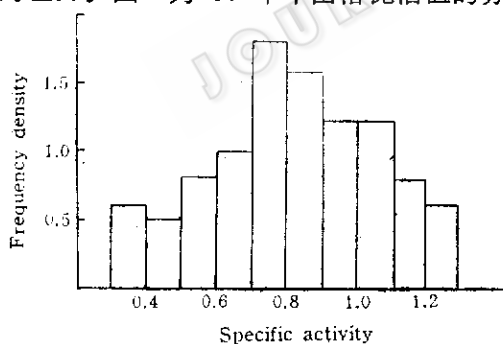


图 1 比活值频率统计关系

Fig.1 Statistical relation between frequency and specific activity

布。比活定义为:  $HBsAg (ng/ml)/Leu^+$ 表型活细胞浓度 (细胞/ml  $\times 10^6$ )。

从  $Leu^+$  表型菌落间对照可直观地得到, 转化的菌落形态是不一致的。挑选小菌落细胞培养, 其比活值有规律地偏低, 颜色暗、无光泽的菌落细胞同样其基因表

达能力低下。但受体细胞来源于同株, 可能是重组质粒的转化过程影响  $Leu^+$ 表型细胞形成的菌落形态。

50个  $Leu^+$ 表型随机单菌落培养中基因表达产物含量以及比活值的变化预示了受体细胞对异源 DNA 的调节和控制。酵母细胞在醋酸锂、聚乙二醇作用下呈感受态造成壁的缝隙, 接受异源 DNA 的过程存在着一个物理冲撞频率, 进入的异源DNA影响着重组质粒拷贝数和目的基因表达强度。这是由于受体细胞自身的2 $\mu$ 质粒和重组的pYGH<sub>3</sub>-16-S所带的2 $\mu$ 自主复制基因存在相同或部分相同的控制机制, 它们之间相互干涉和排斥受到各自数量的影响。同样地, 目的基因表达强度对应于  $Leu^+$ 表型细胞内亮氨酸含量的高低, 客观上可能就表现出在 YNB<sub>5</sub>琼脂培养基上不同菌落的形成。由于异源 DNA 进入受体细胞并在胞内自主复制的复杂性, 受体细胞自身适应能力的差异, 菌落形态直观的差别是细胞内多种因素综合影响的结果。

### (二) 培养基组分对 HBsAg 表达的影响

在保持细胞较高比生长速率条件下, 改变培养基碳源结构, 摇瓶培养的结果列于表1。

甘油的补充能提高细胞生长速率, 胞内 GAPase 活力增加明显, 尤其当补充蔗糖后HBsAg相对浓度可增加至8.12而且比活值有成倍的改善。图2把 GAPase 活力和 HBsAg 表达作为培养基碳源结构的函数, 可见到较一致的对应关系。

### (三) 温度对酵母工程菌代谢的影响

选择5种不同的发酵温度, 考察受体细胞的生长条件。从图3可见, 20℃时受体细胞生长缓慢, 33℃时细胞生长的延迟期缩短, 细胞生长曲线在27℃比25℃的条件下表现出较大的差异。从代谢过程分析

表 1 培养基组分对DBY-745细胞生长和HBsAg生产的影响  
Table 1 Effect of components of culture media on cellular growth and Production of HBsAg by strain DBY-745 in shake flask

培养基组成 Components of culture medium	比生长速率 $\mu\text{T}$ Specific growth rate	酶活力 $\text{u}/\text{OD}_{600}$ GAPase activity	HBsAg相对浓度* Relative concentration of HBsAg	比活 Specific activity
葡萄糖 Glucose	0.28	195	3.89	1.05
葡萄糖:甘油 Glucose:glycerol 1:0.1	0.31	267	5.74	1.98
葡萄糖:蔗糖 Glucose:sucrose 1:0.1	0.29	310	7.02	2.17
葡萄糖:甘油:蔗糖 Glucose:glycerol:sucrose 1:0.1:0.1	0.30	315	8.12	2.82

\* 相对浓度为相对于受体细胞在YNB<sub>1</sub>发酵中HBsAg浓度 $\mu\text{g}/\text{L}$   
Relative concentration is the ratio of HBsAg Concentration in YPD-s to that in YNB<sub>1</sub>

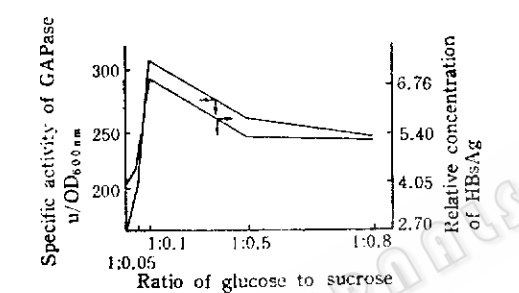


图 2 葡萄糖和蔗糖不同比例对细胞代谢的影响  
Fig.2 Effect of ratio of glucose to sucrose on metabolism of recombinant yeast DBY-745

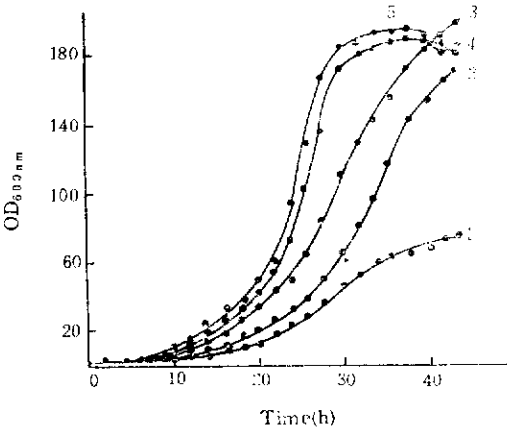


图 3 细胞生长和发酵温度的关系  
Fig.3 Relationship between temperature and cellular growth  
1.20 $^{\circ}\text{C}$  2.25 $^{\circ}\text{C}$  3.27 $^{\circ}\text{C}$  4.30 $^{\circ}\text{C}$  5.33 $^{\circ}\text{C}$

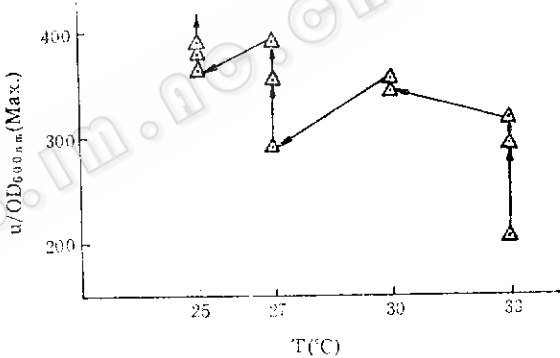


图 4 最高酶活力和发酵温度的关系  
Fig.4 Relationship between temperature and maximal GAPase activity

箭头所指为发酵时间的方向  
Arrow showing direction of fermentation processes

则得到图 4 结果。发酵温度对 GAPase 活力的影响表现为:(1) 发酵温度越高,在发酵初始对应的 GAPase 活力的峰值也越高,如图 4,初始酶活力达最大值在 33 $^{\circ}\text{C}$  时;(2) 随发酵时间的延续,u/OD<sub>600</sub> 的峰值向温度下降的方向迁移。这表明,发酵后期为保持高的 GAPase 活力必须采用下降温度的操作方式。(3) 在 20 $^{\circ}\text{C}$  条件下,由于细胞的酶系受温度的抑制,GAPase 活力不足 200,细胞生长速率低,HBsAg 基因转录、转译能力也较弱。

#### (四) 发酵温度对HBsAg基因表达的作用

对应于最大 GAPase 峰值随发酵温度的变化, 单位  $\text{Leu}^+$  表型细胞内目的基因表达HBsAg的能力也存在着对应的规律, 如图5所示。在发酵后期, 受体细胞生产HBsAg能力与温度的上升成反比。可认为, 随温度的升高, 细胞用于自身维持的能量消耗增加<sup>[15]</sup>, 维持系数随温度升高而加大, 造成了提供给细胞生长和产物合成能量水平的下降。

重组质粒稳定性定义为:

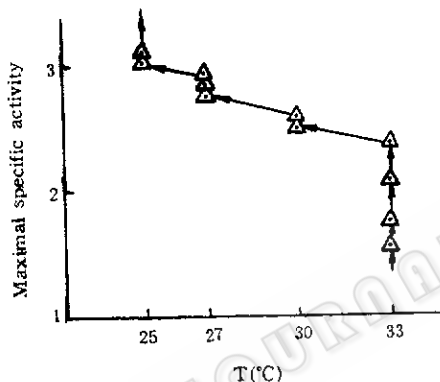


图5 最大比活和发酵温度的关系

Fig.5 Relationship between temperature and maximal specific activity

箭头所指为发酵时间的方向

Arrow showing direction of fermentation Processes,

$\text{ST}\% =$

$$\frac{\text{计数YNB}_4 \text{ 琼脂培养基上活菌落数}}{\text{计数YNB}_4 - 1 \text{ 琼脂培养基上活菌落数}} \times 100\%$$

在不同温度条件下, 重组质粒随受体细胞的生长表现出的稳定状态如图6中曲线所示。ST值的下降是由受体细胞生长过程中 $\text{pYGH}_3-16-S$ 的丢失和 $\text{Leu}^-$ 表型细胞竞争生长的协同结果。发酵前期温度低, 细胞总的生长缓慢, ST值可有较大的稳定

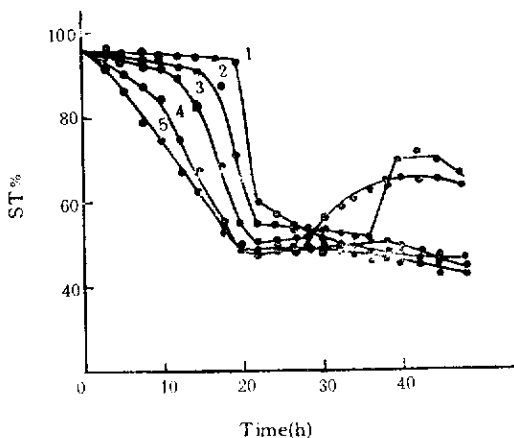


图6 重组质粒稳定性和发酵温度的关系

Fig.6 Relation between temperature and stability of recombinant plasmid

1. 20°C 2. 25°C 3. 27°C 4. 30°C 5. 33°C

区。随温度上升, 这一区域逐步消失。发酵中期尤其在细胞对数生长期, 丰富的YPD-s培养基使 $\text{Leu}^-$ 表型细胞生长优于 $\text{Leu}^+$ 表型细胞生长, 它们之间的差异加剧ST值的降低。至于发酵后期的维持, 由于细胞数可达 $8 \times 10^8$ 个/ml, 个体空间效应以及细胞代谢物在发酵液中的积累造成生长速率趋于下降和停止。图6中25°C和27°C条件所表现出的ST值的回升有待于进一步研究。

## 结 论

利用酵母基因工程菌DBY-745生产异源DNA的表达产物——HBsAg的发酵受控于过程的操作参数, 其中包括培养基组分和温度。葡萄糖含量的提高能加速细胞的生长但影响HBsAg多肽的形成和后加工。在碳源中补充甘油和蔗糖能较明显地改善比活值和HBsAg的相对浓度。但图2指出, 这种碳源配比的有效范围可能是较窄的, 通过流加操作可控制发酵罐中葡萄糖浓度处于100mg%以下。

温度条件的实时变化有利于受体细胞

生长和 HBsAg 的高表达。尤其在发酵后期,温度的下降能保持较高的 ST 值。我们观察到发酵过程中 ST 值可划分成三个主要变化区域,作为对含重组质粒细胞生长过程中此质粒不稳定变化的模拟。根据这些规律,以受体细胞比生长速率作为温度的函数,其中在三个区域的临界点处都对应着比生长速率的激烈变化。发酵以27℃为起始条件,保持 ST 值稳定于90%左右,发酵中期为33℃以提高细胞生长速率,随后改换温度至27℃,最后控制在25℃直至结束。重复实验得 HBsAg 相对浓度达

13.51。

Matthew<sup>[16]</sup>提出重组质粒在受体细胞传代过程中稳定性下降正比于时间,Futcher<sup>[17]</sup>认为稳定性曲线应是先下降而后平缓。由于我们为适合工程菌发酵采用了流加式(Fed-batch)操作,此过程属非稳定态,因此重组质粒稳定性变化规律应补充新的内容。操作方式的改变使重组质粒稳定性表现出特殊的形式。尽管我们利用其规律已明显地改善了目的基因的表达量,但对此规律更深入的研究是必要和有意义的。

### 参 考 文 献

- [1] Carty, C.E. et al.: *J. of Industrial Microbiology*, 2:117, 1987.
- [2] Pasek, M. et al.: *Nature*, 282:575, 1979.
- [3] Roggendof, M. et al.: *J. Virol. Meth.* 6:61, 1982.
- [4] Pumpen, P. et al.: *Gene*, 30(1-3):201, 1984.
- [5] 敖世洲等:中国科学B辑, 3:252, 1985.
- [6] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 298:347, 1982.
- [7] Dawes, I. W. et al.: *Trends Biotechnol.*, 2(2):36, 1984.
- [8] Hamada, F.: EPA, 0165007, 15, 03, 1985.
- [9] 沈绿萍等:中国科学B辑, 11:1023, 1985.
- [10] Moriarty, A. M. et al.: *PNAS, USA*, 78:2606, 1981.
- [11] Kumanoto-Shi: EPA, 0101617, 29, 02, 1984.
- [12] Smith, G. L. et al.: *Nature*, 302:490, 1983.
- [13] 汪 垣等:中国科学B辑, 6:623, 1986.
- [14] 沈绿萍等:生物化学与生物物理学报, 19:433, 1987.
- [15] Wang, D. I. C.: *Fermentation and Enzyme Technology*, Wang, D. I. C. et al.: Eds., Acad. Press. N. Y., 1979.
- [16] Matthew, J. K. et al.: *Biotechn. Letters*, 8:225, 1986.
- [17] Futcher, A. B. et al.: *J. Bacterial*, 157:283, 1984.

# EFFECTS OF CULTURE MEDIA COMPOSITION AND TEMPERATURE ON EXPRESSION OF HBsAg BY RECOMBINANT YEAST IN FERMENTATION PROCESSES

Shi Yuan Tang Xiaoxuan Yuan Weikang Chen Minheng  
(East China University of Chemical Technology, Shanghai)

Shen Luping Li Zaiping  
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Fermentation was performed to produce exogenous protein-hepatitis B surface antigen (HBsAg) by recombinant yeast *S. cerevisiae* containing the HBsAg gene. These studies showed that relative concentrations of HBsAg were increased from 3.89 to 8.12 when glucose content was reduced and glycerol and sucrose were complemented in culture media, and also, specific activity was increased 2.09-fold. According to the results of experiments, the sequence of temperature variation in fermentation processes was set up. Then the expressed amount of HBsAg gene achieved 13.51 in relative concentration. The stability of a recombinant plasmid containing HBsAg gene was observed and explained by altering fermentation temperatures in fed-batch operation. On the other hand, there is a distribution within transformation between exogenous DNA and host yeast and it will affect the production of HBsAg by recombinant yeast in fermentation processes.

## Key words

Fermentation by recombinant yeast; hepatitis B surface antigen; stability of recombinant plasmid