

重组毕赤酵母高密度发酵表达猪表皮生长因子及其纯化鉴定

焦晓军, 黄显会, 刘帅帅, 谭清甜

(华南农业大学 兽医学院, 广东省兽药研制与安全评价实验室, 广东 广州 510642)

摘要:采用高密度发酵法在 5.5 L 发酵罐中对 pPIC9-pEGF/GS115 重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* 菌株进行发酵, 在培养至酵母菌体密度($D_{600\text{nm}}$)约 150 时, 以甲醇诱导目的蛋白表达, 48 h 后菌体密度达 315, 目的蛋白表达产量约 300 mg/L. 发酵上清液经 0.45 μm 和截留相对分子质量 30 000 的超滤膜、亲和层析、透析后目的产物的纯度达 90% 以上. 鉴定结果表明: 纯化的表达产物 pEGF 对 BALB/c 3T3 细胞具有显著的增殖作用.

关键词:猪表皮生长因子; 毕赤酵母; 高密度发酵; 纯化; 生物活性

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0103-05

Expression, Purification and Bioactivity Analysis of Porcine Epidermal Growth Factor in Recombinant *Pichia pastoris* by High-Density Fermentation

JIAO Xiao-jun, HUANG Xian-hui, LIU Shuai-shuai, TAN Qing-tian

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharamaceutics Development Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The recombinant *Pichia pastoris* strain infected with pPIC9-pEGF/GS115 for expression of strain porcine epidermal growth factor was high cell density cultured in a 5.5 L fermentor. Following pre-fermentation and reaching $D_{600\text{nm}}$ density to 150, the yeast cells were induced by addition of methanol, which elevated cell density $D_{600\text{nm}}$ to 315. As the result, the medium concentration of secreted pEGF reached 300 mg/L. The pEGF fermentation product was purified to 90% by ultrafiltration, His-tag affinity column chromatography and dialysis. *In vitro* biological activity test results showed that the expressed pEGF fusion protein could enhance significantly the proliferation of BALB/c 3T3 cells. The above results demonstrated successful preparation of biologically active pEGF by the *P. pastoris* eukaryotic expression system.

Key words: porcine epidermal growth factor; *Pichia pastoris*; high density culture; purification; bioactivity

表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)是一种在多种动物中存在的具有丝裂原性的含有 53 个氨基酸的多肽, 其具有多种生物学功能: 能够激发细胞分裂、增殖与分化, 促进离子交换、物质转运、糖代谢和细胞外基质的合成, 增强细胞和上皮组织蛋白质和 DNA 的合成等. 猪表皮生长因子(pEGF)作

为 EGF 家族的一员, 与人、牛、鼠等动物的 EGF 的结构极其相似. 有研究表明 pEGF 是卵巢和子宫局部重要的调节因子, 对猪的繁殖性能具有一定的影响^[1]. McGlone 等^[2]研究表明大肠杆菌表达的重组 pEGF 可提高窝产仔数 20.79%. 对于初生的仔猪和早期断奶仔猪, 乳源性的表皮生长因子的供应突然中断, 使

收稿日期: 2010-03-26

作者简介: 焦晓军(1984—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 黄显会(1969—), 男, 高级兽医师, E-mail: xh Huang@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30771627)

仔猪的胃肠黏膜难以适应饲料,而引发断奶应激,进而引起腹泻,免疫力下降,导致断奶仔猪生长停滞或死亡,给养猪生产带来较大经济损失^[3].有研究发现,在母猪妊娠早期子宫内膜不仅含有 pEGF,而且有 pEGFR 的 mRNA 的表达^[4-5].pEGF 能够刺激仔猪胃肠道表皮和内皮细胞的生长发育、诱导小肠消化酶的表达以及影响小肠的免疫应答^[6-7].国外已有研究表明,EGF 对动物的被毛生长起到抑制作用,并呈剂量依赖性,而且还与给药方式有关^[8-9].由于 EGF 对毛发生长具有抑制作用,而且用药后,毛囊恢复生长所需要的时间比其他脱毛剂短^[10],所以 EGF 在畜牧业及羊毛生产工业上有一定的应用前景.

目前国外对 pEGF 的结构、功能和作用机制等方面做了较深入的研究,国内有该基因在大肠杆菌^[12]和毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中的摇瓶表达及纯化的报道^[3].本研究是在完成含 pEGF 基因重组表达载体的毕赤酵母菌株 pPIC9-pEGF/GS115 摇瓶表达的基础上,进一步试验 pPIC9-pEGF/GS115 的高密度发酵表达、纯化工艺和方法,并对产物的生物活性进行了鉴定分析.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株和细胞株 含 pEGF 基因重组表达载体菌株 pPIC9-pEGF/GS115,由广东省兽药研制与安全评价实验室构建;BALB/c 3T3 细胞购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心.

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器设备 酵母培养采用 MD、YPD、BMGY/BMMY 培养基,发酵用基础盐培养基及 PTM1 的配方详见 Invitrogen 公司实验手册;DMEM 基础培养基、胎牛血清、青链霉素、谷氨酰胺均为 GBICO 公司产品.人表皮生长因子(Human EGF, hEGF)为 Invitrogen 公司产品. Cell Counting Kit-8(CCK-8)为 Dojindo Molecular Technologies 公司产品;Ni-NTA His·Band® Resins 为 Novagen 公司产品;截留相对分子质量 3 000 的透析袋为广州美津公司产品;BIOFLO 3000 型 5.5 L 发酵罐(美国 NBS 公司);0.45 μm 超滤膜、截留相对分子质量 30 000 超滤膜(MILLIPORE 公司),核酸-蛋白测定仪(Eppendorf Biophotometer).

1.2 方法

1.2.1 目的蛋白 pEGF 的诱导表达 从 MD 平板挑取基因工程酵母菌单菌落接种于 5 mL YPD 培养基中,28.5 °C 摇床培养 14~18 h,直到 $D_{600\text{nm}}$ 为 2~6

时,按体积分数 1% 接种至 200 mL BMGY 培养基中,28.5 °C,250 r/min 振摇培养 14~18 h 至 $D_{600\text{nm}}$ 为 2~6,再按体积分数 10% 接种于发酵罐内已灭菌的 2.7 L 基础盐培养基中,用氨水调 pH 至 5.0,加入 4 mL/L PTM1 微量元素,30 °C 进行发酵.根据摇瓶^[3]及前期发酵条件优化试验的结果,确定发酵罐发酵的参数为:溶氧 $\geq 20\%$,pH 5.0,通气量 4 L/min.在基础盐培养基中培养 18~22 h 后开始按照 24 mL/(h·L) 补加 50% 甘油(含 12 mL/L PTM1),甘油补加 3.5 h 后停止,饥饿培养 0.5 h 进行甲醇(含 12 mL/L PTM1)诱导,梯度流加甲醇[3.6 和 9 mL/(h·L) 均流加 2 h,15 mL/(h·L) 流加 64 h].从诱导开始按发酵液体积计算,每隔 24 h 加入 10 g/L 的灭菌酪蛋白水解物(CAA).从诱导开始每 6 h 采样 1 次,进行 $D_{600\text{nm}}$ 测定及 Tricine-SDS-PAGE 分析.诱导 72 h 后停止甲醇流加,用氨水调节 pH 到 7.8,放罐下机,将发酵液移至灭菌棕色瓶,4 °C,8 000 r/min 离心 10 min,转移发酵上清液至新的灭菌棕色瓶中,4 °C 保存备用.

1.2.2 目的蛋白 pEGF 的纯化 超滤:将离心后的发酵上清液用蔡氏滤器过滤,滤膜孔径为 0.8 μm.所得滤液在超滤系统先后用 0.45 μm 和截留相对分子质量 30 000 的超滤膜进行超滤.分别收集以下超滤后的截留液和透过液:超滤前上清液、0.45 μm 超滤膜截留液、0.45 μm 超滤膜透过液、截留相对分子质量 30 000 超滤膜截留液和透过液,进行 Tricine-SDS-PAGE 分析超滤效果.

Ni-NTA 亲和层析:按照 Novagen 公司的 Ni-NTA His·Band® Resins 的使用说明制备亲和层析柱.制备好层析柱后,以流速每小时小于 10×柱床体积的速度将预处理好的发酵上清液流过层析柱.分段收集洗脱液装于灭菌离心管中,每管装液 50 mL,并取样进行 Tricine-SDS-PAGE 分析.

透析:通过 Tricine-SDS-PAGE 分析,将含 pEGF 的洗脱液移入截留相对分子质量 3 000 的透析袋中,在 1 L 的 10 mmol/L PBS 透析液中透析 24 h.将透析后的蛋白液冻干,同时从每个透析袋取样进行 Tricine-SDS-PAGE 分析.

1.2.3 表达产物的生物学活性鉴定 BALB/c 3T3 细胞用含体积分数为 10% 小牛血清的 DMEM 培养基(完全培养液)传代培养,用完全培养基稀释至 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,以每孔 100 μL 加入到 96 孔细胞培养板中,37 °C 培养 24 h,用含体积分数为 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养基(维持培养液)饥饿培养 12 h,加入

系列用维持培养液稀释的含纯化的 pEGF 样品和 hEGF 标准品的培养基 (hEGF 对照组), 同时维持培养液作空白对照, 每个浓度水平做 5 个重复; 37 °C 继续培养 48 h, 换成含体积分数为 10% CCK-8 的基础培养基, 继续孵育 1.5 h, 然后用酶标仪测定 $D_{450\text{ nm}}$, 检测数据用 Excel 2000 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 目的蛋白 pEGF 的诱导表达

酵母菌株高密度发酵诱导前, 一般需要增殖 20 h, 酵母菌密度 $D_{600\text{ nm}}$ 为 150 左右; 经 48 h 甲醇诱导, $D_{600\text{ nm}}$ 可达 320 左右。发酵过程酵母菌密度 $D_{600\text{ nm}}$ 的变化如图 1 所示。加入甲醇诱导后, 培养液上清中 pEGF 的表达变化情况见图 2, 从图 2 可以看到, 目的蛋白 pEGF 表达量在诱导 48 h 后达到高峰, 诱导 72 h 后 pEGF 表达量增加不多。纯化后经核酸-蛋白测定仪测定, pEGF 的产量约为 300 mg/L。

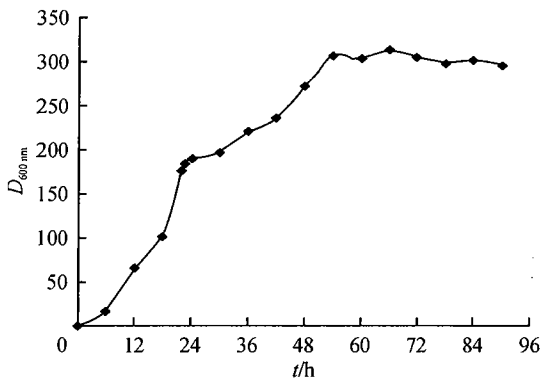
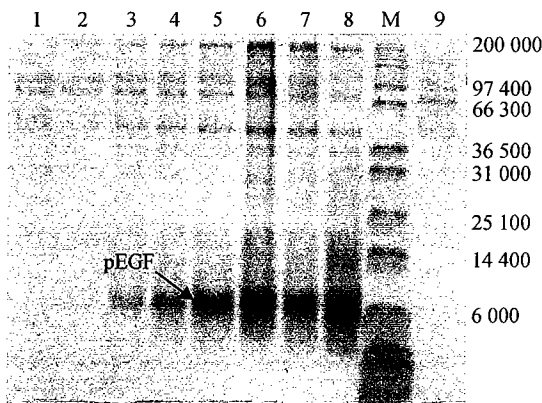


图 1 发酵过程中酵母菌的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Pichia pastor* fermentation



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1~9: 分别为甲醇诱导后 6、18、30、36、42、48、60、72、0 h 的表达上清。

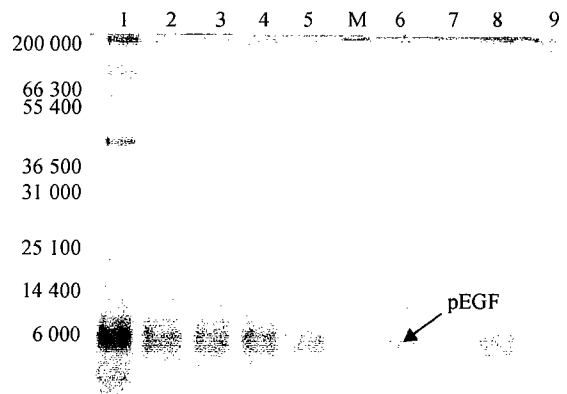
图 2 发酵过程中 pEGF 表达量的变化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of pEGF expression changes of the fermentation

2.2 表达产物的纯化

将发酵上清液经过 0.8 μm 滤膜、0.45 μm 和截

留相对分子质量 30 000 的超滤膜超滤后, 透过液无臭味, 颜色清澈, 浅绿色, 过层析柱时无杂质堆积, 不影响流速。发酵上清液超滤前、后进行 Tricine-SDS-PAGE 分析 (图 3), 从图 3 可以看出, 0.45 μm 超滤膜能阻止部分 pEGF 透过 (泳道 2、4); 截留相对分子质量 30 000 的超滤膜能使大部分透过 (泳道 6、8), 且截留液中无目的蛋白 pEGF。

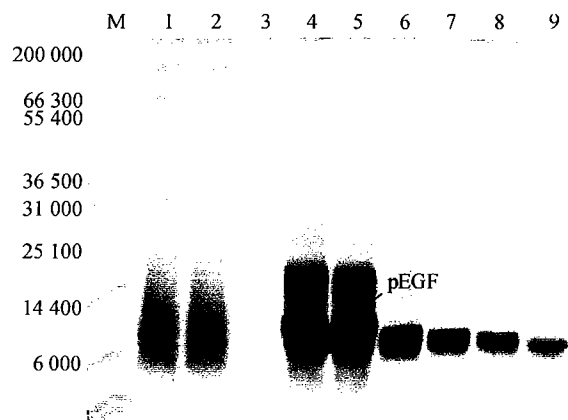


M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 超滤前发酵上清液; 2、4: 0.45 μm 超滤截留液; 3、5: 0.45 μm 超滤透过液; 6、8: 为截留相对分子质量 30 000 超滤膜透过液; 7、9: 为截留相对分子质量 30 000 超滤截留液。

图 3 表达上清液超滤过程采样电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the products purified by ultrafiltration

截留相对分子质量 30 000 超滤膜透过液过 Ni-NTA 亲和层析柱后, 分段收集洗脱液进行 Tricine-SDS-PAGE (图 4)。从图 4 可以看出, 通过 Ni-NTA 亲和柱的透过液中没有观察到目的条带 (泳道 3); pEGF 主要集中在第 1~2 管洗脱液中 (泳道 4、5), 含量很高; 在第 4~6 管洗脱液中有少量 pEGF (泳道 8、9)。

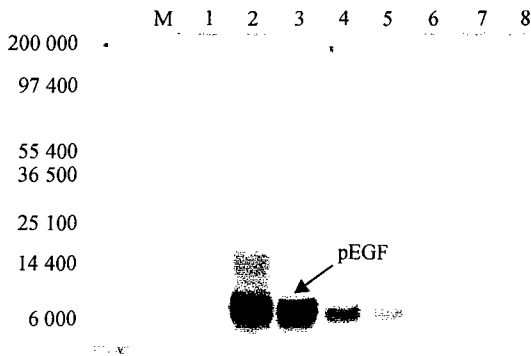


M: 蛋白质相对分子质量标准; 1、2: 为 Ni-NTA 亲和层析前的表达上清液; 3: 为透过 Ni-NTA 亲和层析的表达上清; 4~9: 为第 2~7 离心管接收的分段洗脱液。

图 4 Ni-NTA 亲和层析采样电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the products purified by Ni-NTA affinity chromatography

将亲和层析洗脱液移入截留相对分子质量 3 000 透析袋中透析后进行 Tricine-SDS-PAGE 分析(图 5), 从图 5 可见截留相对分子质量 3 000 的透析袋能阻止 pEGF 穿过透析袋, 去除杂蛋白, 透析效果较好。



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 为透析液采样; 2~8: 分别为各段洗脱液透析采样。

图 5 透析采样电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the products purified by dialysis

2.3 表达产物的生物学活性鉴定

发酵上清液经超滤、Ni-NTA 亲和层析及透析后, 获得的 pEGF 进行 BALB/c 小鼠 3T3 细胞的增殖试验(图 6)。由图 6 可知, 质量浓度 < 100 ng/mL 的 hEGF 和 pEGF 对细胞有良好的增殖作用。其中 100 ng/mL 的 pEGF 对 BALB/c 3T3 细胞增殖作用最明显。pEGF 及 hEGF 各浓度的 $D_{450\text{nm}}$ 值与空白组比较差异显著 ($P < 0.05$); pEGF 和 hEGF 在相同质量浓度下的 $D_{450\text{nm}}$ 值差异不显著 ($P > 0.05$)。

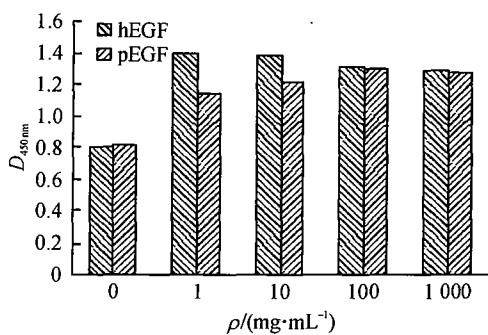


图 6 纯化产物 pEGF 对 BALB/c 3T3 的生物活性

Fig. 6 Bioactivity of purified pEGF on Balb/c 3T3 cells

3 讨论

毕赤酵母表达系统已成功表达多种外源蛋白质, 如人血清白蛋白、肿瘤坏死因子和人白细胞介素 2, 且它们的表达量都达到克级水平^[12], 因此 pEGF 的表达量有待于提高。鉴于我们采用 Mut⁺ 型高表达克隆, 因此, 诱导时控制甲醇终体积分数为 1%。开始

诱导时, 甲醇体积分数不宜太高, 一般在 8 h 内逐步加大甲醇的体积分数。最好在 48 h 后停止诱导, 本研究表明诱导 60 h 后, 菌体密度已经很高, 不利于酵母菌的继续生长, 反而会产生大量的死菌, 菌体破裂, 菌体蛋白释放出来, 一方面增加了杂蛋白, 给纯化带来困难, 另一方面杂蛋白中的蛋白酶容易降解目的蛋白。

在纯化过程中, 尝试了多种方法。目的蛋白 pEGF 存在于培养液上清中, 而且相对分子质量较小, 因此将培养液上清浓缩是纯化过程中最为关键的一步。我们采用超滤浓缩的方法, 可以去除小分子的杂蛋白, 再经过亲和层析和透析, 最终产品的纯度达到 90% 以上。纯化路线简单、有效, 而且可以线性放大, 用于产业化。

高密度发酵纯化的 pEGF 以 10、100 ng/mL 的质量浓度培养细胞, t 检验后, 发现 10 ng/mL 促进细胞增殖的效应与对照组差异不显著, 只有 100 ng/mL 的质量浓度才有显著差异性 ($P < 0.05$)。而摇瓶发酵纯化得出来的 pEGF 在 1 ng/mL 以上质量浓度能极显著地促进 BALB/c 3T3 细胞增殖^[3]。分析高密度发酵纯化的 pEGF 活性降低的原因可能有以下 2 个方面: 高密度发酵过程中大量的酵母自溶后产生的蛋白酶作用于 pEGF, 降解部分 pEGF; 整个纯化过程较长, 而且是在室温进行的, 容易引起 pEGF 变性。解决 pEGF 活性降低的方法有待后续试验探索: 注意在发酵过程中监控 pEGF 活性, 放罐后快速纯化、保持环境低温、加入蛋白质稳定剂等。

参考文献:

- [1] LEE Der-nan, KUO Tsun-yung, CHEN Ming-Cheng, et al. Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 649-654.
- [2] McGLONE J J, ANDERSON D L, VAUGHAN H L. Prepubertal administration of porcine epidermal growth factor increases litter size [EB/OL]. [2009-11-27]. http://www.depts.ttu.edu/PorkIndustryInstitute/research/pEGF_in_vivo_abstract_v2.htm.
- [3] 汪洋, 杨桂香. 猪表皮生长因子在毕赤酵母中的表达及鉴定 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(11): 2593-2599.
- [4] ABEYDEERA L R, WANG Wei-hua, CANTLEY T C, et al. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51(4): 395-401.

- [5] VAUGHAN T J, JAMES P S, PASCALL J C, et al. Expression of the genes for TGF alpha, EGF and the EGF receptor during early pig development [J]. *Development*, 1992, 116 (3): 663-669.
- [6] ZIJLSTRA R T, ODLE J, HALL W F, et al. Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus [J]. *Pediatric Gastroenterol Nutr*, 1994, 19(4): 382-390.
- [7] 范志勇, 王康宁, 周定刚. 不同水平表皮生长因子对早期断奶仔猪生产性能、血清理化指标及免疫功能的影响 [J]. *动物营养学报*, 2005, 17(3): 39-43.
- [8] HOLLIS D E, CHAPMAN R E, PANARETTO B A. Morphological changes in the skin and wool fibres of Merino sheep infused with mouse epidermal growth factor [J]. *Aust J Biol Sci*, 1983, 36(4): 419-434.
- [9] MOORE G P M, PANARETTO B A, ROBERTSON M. Effects of epidermal growth factor on hair growth in the mouse [J]. *J Endocrinol*, 1981, 88(2): 293-299.
- [10] MOORE G P M, PANARETTO B A, ROBERTSON D M. Inhibition of wool growth in Merino sheep following administration of mouse epidermal growth factor and a derivative [J]. *Aust J Biol Sci*, 1982, 35(2): 163-172.
- [11] 杨桂香, 黄伟华, 彭险峰. 猪表皮生长因子在大肠杆菌中的表达 [J]. *华南农业大学学报*, 2006, 4(27): 90-93.
- [12] CREGG J M. Recent advances in the expression of foreign genes *Pichia pastoris* [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 905-910.

【责任编辑 柴 焰】

.....

(上接第 102 页)

- [17] HAN Fei-fei, GE Bei-lei. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting vibrio vulnificus in raw oysters [J]. *Foodborne Pat Hogens and Disease*, 2008, 5(3): 311-320.
- [18] WEI Xiao-na, ZHENG Ze-jun, ZHANG Li-huan, et al. Sensitive and rapid detection of aeromonas caviae in stool samples by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(1): 113-116.
- [19] ZHAO Xi-hong, WANG Li, LI Yan-mei, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 5(37): 2183-2188.
- [20] KAWAI Y, MIYASHITA N, KISHI F, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of chlamydomphila pneumonia [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28: 801-805.
- [21] PLUTZER J, KARANIS P. Rapid identification of giardia duodenalis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods [J]. *Parasitol Res*, 2009, 104: 1527-1533.
- [22] LI Qiang, XUE Chun-yi, QIN Jian-ping, et al. An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of Newcastle disease virus [J]. *Arch Virol*, 2009, 154: 1433-1440.
- [23] CHEN Chang-mu, CUI Shang-jin, ZHANG Chao-fan, et al. Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of PRRSV [J]. *Virus Genes*, 2010, 40: 76-83.
- [24] BLOMSTROM A, HAKHVERDYAN M, REID M, et al. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus [J]. *J Virol Methods*, 2008, 147 (1): 188-193.

【责任编辑 柴 焰】