

人血清白蛋白和干扰素 $\alpha 2b$ 融合蛋白在毕赤酵母中表达及质量控制

钱凯¹, 雷健勇², 关波¹, 陈蕴², 饶志明^{*1}, 金坚^{*2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 筛选获得毕赤酵母工程菌 GS115/pPIC9K/hsa-ifn $\alpha 2b$, 胞外分泌表达 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 药物蛋白。经摇瓶及 5 L 发酵罐条件优化, 确定最佳发酵条件。经 50 L 发酵罐工艺放大, 发酵产量稳定, 可达到 350 mg/L。离心获得发酵上清液, 超滤浓缩 10 倍, 再依次通过 Blue Sepharose 6FF 亲和层析、Phenyl Sepharose 6FF 疏水层析及 Q Sepharose 6FF 离子柱纯化。纯化产品进行 SDS-PAGE 纯度检测、SEC-HPLC 检测、相对分子质量测定、N 端测序、内毒素检测和生物活性检测。筛选获得一株高产菌, 优化获得最佳的发酵条件。纯化产品检测 (SEC-HPLC) 纯度大于 95%, 相对分子质量为 85 821, 氨基酸的 N 端测序为 DAHKSEVAHRFKDLG, 与预期的相符。内毒素含量小于 5 EU/mg, 符合国家药典的要求。体外生物细胞活性高达 1.6×10^6 IU/mg。具有良好的工业应用价值。

关键词: 干扰素 $\alpha 2b$ (IFN $\alpha 2b$), 人血清白蛋白 (HSA), 毕赤酵母, 质量检测, 融合蛋白

中图分类号: TS 261.11 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)12—1269—06

Expression and Quality Control of the Recombinant Human Serum Albumin and Interferon- $\alpha 2b$ Fusion Protein in *Pichia pastoris*

QIAN Kai¹, LEI Jian-yong², GUAN Bo¹, CHEN Yun², RAO Zhi-ming^{*1}, JIN Jian^{*2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The engineering pichia pastorios GS115 is constructed which express recombinant human serum albumin and interferon- $\alpha 2b$ fusion protein. The fermentation conditions are optimized in flask and 5 L fermentor. The supernatant was purified by Blue Sepharose 6FF affinity chromatography, Phenyl Sepharose 6FF hydrophobic chromatography and Q Sepharose 6FF ion-exchange chromatography. The purified protein was detected by SDS-PAGE, molecular weight determination, nitrogen terminal sequence, endotoxin determination and anti-virus biological activity detection. The fermentation technology condition is stable and the harvest can reach 350 mg/L. The

收稿日期: 2012-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970029)。

* 通信作者: 饶志明 (1975—), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物育种和发酵代谢方面的研究。

E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

金坚 (1960—), 男, 江苏苏州人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事长效蛋白重组药物与肿瘤多药耐药机制方面的研究。E-mail: jinjian31@126.com

purity of purification protein is more than 95%. Molecular weight is 85 820.9 Da and amino acid sequence of nitrogen terminal is DAHKSEVAHRFKDLG. The result is correspond to the expected. The endotoxin is less than 5 EU/mg, which meet the standard requirement. The anti-virus activity of the protein is 1.6×10^6 IU/mg by bio-assay. It has excellent properties for industrial applications.

Keywords: interferon-alpha 2b (IFN α 2b), human serum albumin (HSA), *Pichia pastoris*, quality detection, fusion protein

干扰素 α 2b (IFN α 2b) 作为国内第一批上市的细胞因子类药物, 已经广泛应用于病毒性疾病、病毒性肝炎(乙型、丙型等)、尖锐湿疣、毛细胞白血病、慢性粒细胞白血病、恶性黑色素瘤等疾病的治疗^[1]。人血清白蛋白(HSA)含量占人体血浆蛋白质总量的60%, 承担着物质转运的功能, 如脂肪酸、类固醇、乙酰胆碱和功能性多肽等物质的转运^[2]。单体 IFN α 2b 药物分子比活性为 1.0×10^8 IU/mg, 半衰期为 2 h, 单体药物治疗时需要隔天注射一次。有研究认为, 给药前期的高活性是导致患者流感样等副作用。rHSA-IFN α 2b 的半衰期是 100 h 左右, 可以将给药周期提高到 15 d^[3]。rHSA-IFN α 2b 活性 (1.6×10^6 IU/mg) 适中, 且 HSA 是血液的载体蛋白, 期望 rHSA-IFN α 2b 可以减少给药者的副作用。

毕赤酵母表达系统对外源蛋白质进行 N-乙酰糖基化修饰的糖基为甘露糖型, 更接近于高等生物, 且聚糖末端不含 α 1-3 连接的甘露糖残基有强的免疫原性, 更适用于药物蛋白的生产^[4]。干扰素 α 2b 单体药物已经在国内多家企业生产, 企业多是在大肠杆菌中生产, 存在内毒素去除困难、产率低等问题。作者选用蛋白质表达修饰人缘化的毕赤酵母 GS115 (His⁻Mut⁺) 作为宿主菌。通过 pPIC9K 载体转运, 与毕赤酵母的基因组同源重组, 表达稳定性好^[5]。并进一步优化主要的发酵因素, 提高 rHSA-IFN α 2b 的表达水平。纯化获得样品, 对样品进行质量检测和控制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌体 作者所在实验室自行构建重组质粒 pPIC9K/hsa-ifn α 2b; 中间不加连接肽; *Pichia pastoris* GS115: 购自 Invitrogen 公司; *Escherichia coli* JM109、水泡性口炎病毒 (VSV) 和人羊膜细胞 (WISH) 细胞: 均为作者所在实验室保存。

1.1.2 抗体 Interferon α 2b 鼠源单克隆抗体 (sc-34799): 购自 Abcam 公司; 白蛋白鼠源单克隆抗体: 购自北京博奥森公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L): 购自上海康成生物有限公司。

1.1.3 试剂 所用填料均购自 GE 公司。质粒提取试剂盒、DNA Marker、Bradford 蛋白检测试剂盒、遗传霉素 (G418)、酵母粉、蛋白胨: 均购自生工生物工程 (上海) 有限公司; 酵母基因组 DNA 提取试剂盒: 购自于天根生化科技 (北京) 有限公司; 微量白蛋白测定试剂盒: 购自上海名典生物公司; 毒素检测试剂盒: 购自厦门市莹试剂实验厂有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.4 培养基 YPD 培养基、BMGY 培养基、BMMY 培养基: 参照 Invitrogen 公司毕赤酵母表达手册, 5 L 发酵培养基。

1) 种子培养基: YPD 培养基 (一级种子) 和 BMGY 培养基 (二级种子)。

2) 初始培养基: 甘油 4%, 酵母粉 1 g/dL, 胰蛋白胨 2 g/dL, YNB 1.34 g/dL, 100 mmol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲液。

3) 流加培养基: 甘油 50%, 酵母粉 5 g/dL, 胰蛋白胨 10 g/dL, YNB 6.7 g/dL。

4) 诱导培养基: 甲醇 100%。

5) 防降解培养基: 酵母粉 5 g/dL, 胰蛋白胨 10 g/dL, YNB 6.7 g/dL。

1.2 方法

1.2.1 工程菌构建 重组基因 hsa-ifn α 2b, 中间不加连接肽^[6]。质粒 pPIC9K/hsa-ifn α 2b, PCR 扩增, 测序验证无误。用 *Sal*I 将重组质粒线性化, 取 5 μ L 线性化的重组质粒和 80 μ L 的感受态细胞于电转杯中。5 kV 5 ms 电击转化, 立即向电击杯中加入 600 μ L 预冷的 1 mol/L 山梨醇, 涂布至两块 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~6 d, 挑取菌落进行筛选。

1.2.2 工程菌筛选 两块 MD 平板随机挑取 16 株

菌,参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册诱导表达。所得发酵上清液利用 15 g/dL 的 SDS-PAGE 电泳比较发酵产量,选择蛋白质表达量高的菌体作为实验出发菌。

1.2.3 重组菌的鉴定 按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒说明书,提取酵母的基因组。用 pPIC9K 载体的 AOX1 基因的通用引物,PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 1 min,65 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 150 s,30 次循环;72 °C 延伸 10 min;10 °C 保温。将 PCR 样品到生工生物工程(上海)有限公司测序验证。取发酵上清液进行 15 g/dL SDS-PAGE 电泳。在 100 V、1 h 下转到硝酸纤维素膜上,分别用 IFN $\alpha 2b$ 的单克隆抗体和 HSA 的单克隆抗体做 Western Blot 验证,设置对照实验。具体步骤参照产品操作说明书。

1.2.4 摇瓶表达条件的正交优化 配制 150 mL 的 BMGY 培养基于 500 mL 摇瓶中,接种体积分数为 3%,工程菌在 BMGY 培养基中培养 36 h。无菌离心管离心浓缩至设计的倍数的 BMMY 培养基中诱导发酵。详见 Invitrogen 毕赤酵母表达手册。选择 4 个关键的因素,三水平设计正交实验(9 组实验),详见因素水平设计,见表 1。

表 1 摇瓶条件正交优化

Tab.1 Orthogonal optimization of flask

| 试验号 | pH 值 | 甲醇体积分数/% | 诱导时间/h | 浓缩倍数 | 结果/(mg/L) |
|-----|------|----------|--------|------|-----------|
| 1 | 5.5 | 1.5% | 72 | 2 | 243.3 |
| 2 | 5.5 | 2% | 84 | 3 | 325 |
| 3 | 5.5 | 2.5% | 96 | 4 | 272.7 |
| 4 | 6.5 | 1.5% | 84 | 4 | 349.5 |
| 5 | 6.5 | 2% | 96 | 2 | 157.2 |
| 6 | 6.5 | 2.5% | 72 | 3 | 212.5 |
| 7 | 7 | 1.5% | 96 | 3 | 230.2 |
| 8 | 7 | 2% | 72 | 4 | 208.5 |
| 9 | 7 | 2.5% | 84 | 2 | 218.7 |

1.2.5 发酵罐发酵表达 5 L 发酵罐发酵表达,初始装液量为 2.4 L,制备二级种子液,接种体积分数为 3%。以 1~2 vvm(通气比)的通气量,培养温度 30 °C、pH 6.0,转速 600 r/min 培养。以 30 g/dL 的磷酸和 2 mol/L 的氢氧化钾调节 pH。初始培养基甘油消耗完全后,溶氧反弹至 45% 时以 60 mL/h 的流速补

加流加培养基,补加 500 mL。发酵罐培养基甘油再次消耗完全后,溶氧再次上升,一次性补加 25 mL 甲醇。待溶氧升至 35%,采用溶氧与甲醇负相关的流加策略^[6],将溶氧控制在 35% 的水平,同时以 8 mL/h 流速流加防降解培养基。诱导后每隔 6 h 取样,通过 Bradford 检测试剂盒检测上清液的总蛋白质含量。

1.2.6 蛋白质的分离纯化 发酵液 8 000 r/min、离心 10 min 获得上清液,用 0.45 μ m 的膜过滤除菌。用截留相对分子质量 10 000 的超滤仪超滤浓缩 10 倍。第一步选用 Blue Sepharose 6FF,20 mmol/L NaPB(pH 7.2),0.1 mol/L NaCl 平衡,浓缩液上样,淋洗平衡。2 mol/L NaCl(pH 7.2)为 B 液,分别以 50% B 液和 100% B 液梯度洗脱。第二步进行 Phenyl Sepharose 疏水层析,20 mmol/L NaPB(pH 7.2)、2 mol/L NaCl 为 A 液平衡疏水柱,用第一步的 2 mol/L NaCl(pH 7.2)洗脱液上样,以 20 mmol/L NaPB(pH 7.2)溶液一步洗脱。第三步经 Q Sepharose 纯化,以 20 mmol/L NaPB(pH 7.2)平衡,用第二部的洗脱液上样,0.5 mol/L NaCl(pH 7.2)为 B 液,分别以 50% B 液和 100% B 液梯度洗脱,50% B 液洗脱液为纯化样品。

1.2.7 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 的质量检测

1) SDS-PAGE 纯度检测:变性处理样品,15 g/dL SDS-PAGE 电泳检测,分析软件(Image-J)分析样品纯度。

2) 凝胶分子排阻-高效液相法(SEC-HPLC)检测:选择理论塔板数不低于 1 000 的凝胶分子排阻毛细管柱。样品质量浓度 1 mg/mL 以上,上样量为 10 μ L。流动相为 50 mmol/L PB,0.1 mol/L NaCl 缓冲液(pH 7.0),检测波长为 280 nm。按面积归一化法计算 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 的纯度。

3) 相对分子质量的测定:利用 Bruker Autoflex (MALDI-TOF-TOF-MS)检测仪器,根据各肽段不同相对分子质量的飞行时间不同对样品进行分离,得到质量肽谱图,委托上海中科新生命生物科技有限公司检测。

4) N 端序列测定:上海中科新生命生物科技有限公司代检测。根据 Edman 测序原理利用 ABI491A 蛋白序列测序系统测 N 端序列的 15 个氨基酸。

5) 内毒素检测:所用实验器皿除热源^[7-8]。利用内毒素检测试剂盒(检测灵敏度为 0.25 EU),快速凝胶法检测纯化样品的内毒素残留。

6) rHSA-IFN α 2b 活性测定: 采用 WISH 细胞病变抑制法对纯化的重组蛋白进行体外生物学活性测定, 做 3 次平行实验。参照《中国药典 2010 版》中《干扰素效价测定(细胞病变抑制法)》的方法测定^[9]。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株的筛选

测序结果与预期相符, 在 2 块 MD 板上长出菌落随机挑选 16 株菌。诱导表达, 将发酵液进行 15 g/dL 的 SDS-PAGE 电泳比较, 见图 1。目标蛋白质相对分子质量约为 90 000。利用图像分析与处理软件(Image-J)将目标蛋白与 Marker 比较估算蛋白质产量。结果显示 2 号菌株目标蛋白质的浓度最高, 此作为出发菌株。

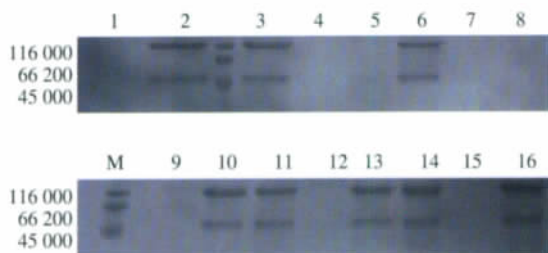


图 1 工程菌的诱导表达

Fig.1 Induction expression of the engineering bacterium

2.2 重组菌的鉴定

提取工程菌的基因组, PCR 扩增并送至生工生物工程(上海)有限公司测序。结果表明: hsa-ifn α 2b 基因成功整合于酵母基因组中。Western Blot 结果显示: 目标蛋白具有白蛋白和干扰素 α 2b 的双抗原性(见图 2,3), 且相对分子质量大小都与理论相对分子质量相符, 确定筛选的菌为我们期望的目标工程菌。在 HSA 一抗的检测中发现, 66 000 片段也具有 HSA 的抗原性, 可能是 rHSA-IFN α 2b 的降解片段。

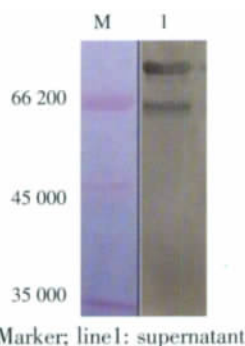
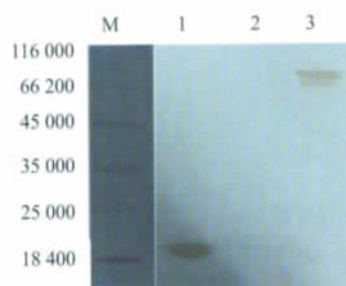


图 2 HSA 单克隆抗体 Western Blot
Fig.2 Western Blot of HSA McAb

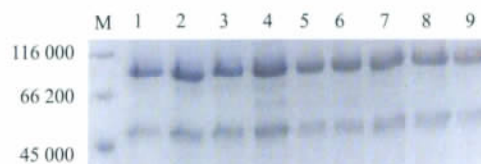


M:Marker; line1:IFN α 2b;
line2:HSA; line3:rHSA-IFN α 2b
图 3 IFN α 2b 单克隆抗体的 WB

Fig.3 Western Blot of IFN α 2b McAb

2.3 发酵条件优化

通过单因素条件优化确定各因素水平, 摇瓶发酵分泌的蛋白质经 15 g/dL SDS-PAGE 电泳, 见图 4。目标蛋白质相对分子质量约 90 000, 经图像分析与处理软件(Image-J)与蛋白质 Marker 对比, 估算每种条件下的蛋白质产量。经正交分析得出最佳的摇瓶发酵条件是: pH 5.5, 甲醇体积分数 1.5%, 诱导时间 84 h, 浓缩 4 倍。优化后摇瓶的表达量是优化前的 2 倍, 高达约 350 mg/L。在摇瓶优化条件的基础上进行 5 L 发酵罐的发酵表达。诱导期间间隔 6 h 取样, 尿微量白蛋白试剂盒检测 rHSA-IFN α 2b 含量, 见图 5。结果显示, 发酵 58 h 时蛋白质质量浓度最高, 5 L 发酵罐产量高达 420 mg/L。将工艺条件放大到 50 L 发酵罐, 发酵产量稳定, 约 350 mg/L。



M:Marker; line1-9:The result of the condition1-9

图 4 正交结果图

Fig.4 Result of orthogonal optimization

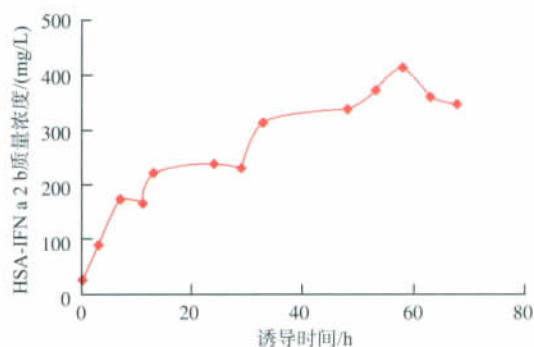


图 5 rHSA-IFN α 2b 质量浓度
Fig.5 Content of rHSA-IFN α 2b

2.4 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 的分离纯化

发酵液经 8 000 r/min 离心 10 min, 获得上清液。经截留相对分子质量 10 000 的超滤仪超滤, 达到除盐和浓缩的目的。样品经 Blue Sepharose 纯化, 用 1 mol/L NaCl 液除杂, 收集纯度较高的 2 mol/L NaCl 液洗脱液, 见图 6。Phenyl Sepharose 层析见图 7, 以达到浓缩和快速置换缓冲液的目的。最后一步经 Q Sepharose 纯化, 见图 8, 在 0.25 mol/L NaCl 下即可将样品洗脱下来。纯化的样品用于后续的检测。

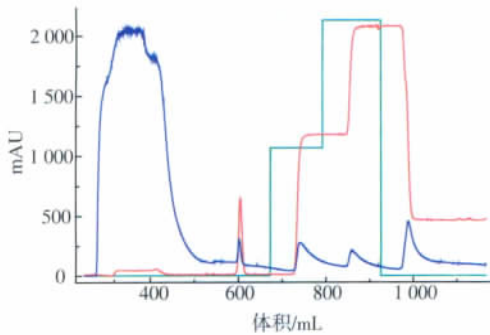


图 6 Blue Sepharose 亲和层析纯化 rHSA-IFN $\alpha 2b$

Fig.6 Purification of rHSA-IFN $\alpha 2b$ by blue sepharose affinity chromatography

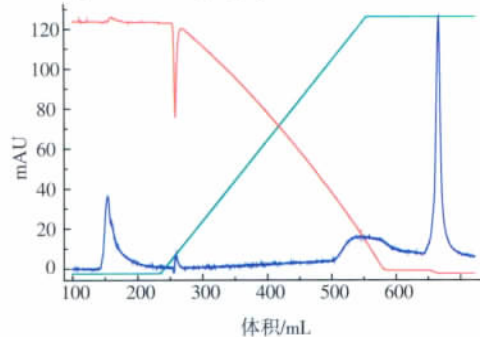


图 7 Phenyl Sepharose 亲和层析纯化 rHSA-IFN $\alpha 2b$

Fig.7 Purification of rHSA-IFN $\alpha 2b$ by phenyl sepharose hydrophobic chromatography

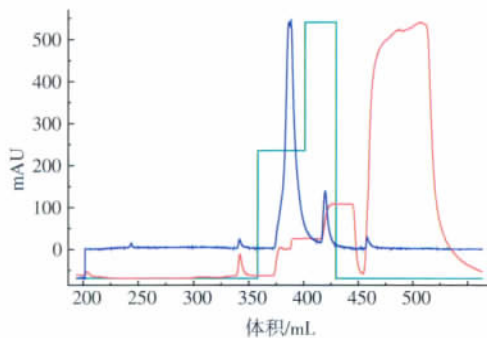


图 8 Q Sepharose 亲和层析纯化 rHSA-IFN $\alpha 2b$

Fig.8 Purification of rHSA-IFN $\alpha 2b$ by Q Sepharose ion-exchange chromatography

2.5 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 的质量检测

15 g/dL 的 SDS-PAGE 及凝胶分子排阻-高效液相法 (SEC-HPLC) 对 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 进行纯度检测, 获得样品的纯度为 97%, 见图 9。飞行质谱检测样品相对分子质量为 85 821, 见图 10。rHSA-IFN $\alpha 2b$ 理论相对分子质量 85 869, 偏差在理论范围内。N 端序列测定显示: N 端的 15 个 AA 序列为: NH₂-DAHKSEVAHRFKDLG, 与理论序列相符。将分析纯化后的样品通过鲎试剂检测, 内毒素浓度小于 5 EU/mg。《中国药典 2010 版》规定每次给药 10⁶ IU, 内毒素含量低于 10 EU。本实验的纯化样品每次注射小于 1 mg, 内毒素量小于 5 EU, 符合药典要求。参照《中国药典 2010 版》中《干扰素效价测定 (细胞病变抑制法)》的方法检测活性, 3 次平行实验显示样品活性为 1.6×10⁶ IU/mg。

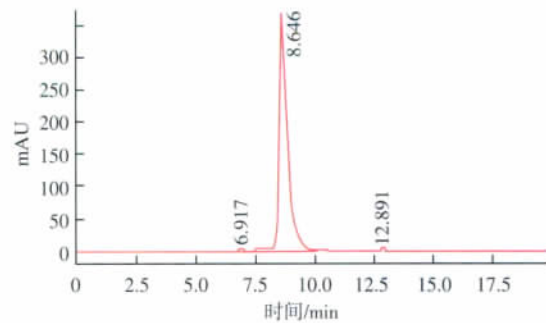


图 9 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 的 SEC-HPLC 纯度鉴定

Fig.9 Purity analysis of rHSA-IFN $\alpha 2b$ by SEC-HPLC

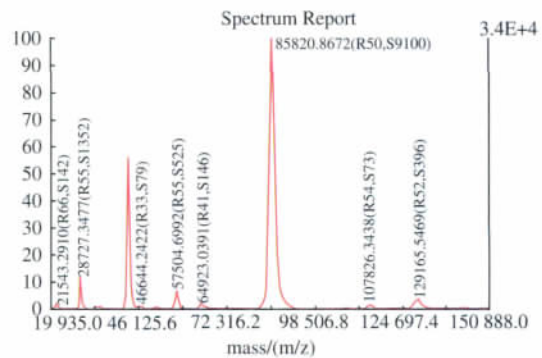


图 10 rHSA-IFN $\alpha 2b$ 的 MALDI-TOF 检测

Fig.10 MALDI-TOF analysis of rHSA-IFN $\alpha 2b$

3 结语

高的表达量是基因重组药物工业应用的前提。作者先优化摇瓶表达条件, 再在摇瓶条件的基础上优化 5 L 发酵罐的溶氧控制水平, 产量有明显的提

高,并且将工艺条件放大到 50 L,产量稳定在 350 mg/L。纯化工艺操作方便,步骤衔接紧密,前一步的洗脱液只需稍加处理就可以直接作为后一步上样液。且减少中间的样品处理步骤可避免中间处理环

节带来的内毒素、杂蛋白和 DNA 等的污染。质量检测符合 2010 版中国药典的规定,为 rHSA-IFN α 2b 的工业化应用提供参考。

参考文献:

- [1] Huang Y S, Chen Z, Yang Z Y, et al. Preparation and characterization of a potent long-lasting recombinant human serum albumin interferon- α 2b fusion protein expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Eur J Pharm Biopharm**, 2007, 67(2):301-308.
- [2] Osborn B L, Olsen H S, Nardelli B, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon- α fusion protein in cynomolgus monkeys[J]. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2002(2):540-548.
- [3] 黎刚,曹明媚,戚中田. 白蛋白-干扰素治疗慢性丙型肝炎的研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2000, 32(6):302-305.
LI Gang, CAO Ming-mei, QI Zhong-tian. Research progress in albinterferon for the treatment of chronic hepatitis C, 2000, 32(6):302-305. (in Chinese)
- [4] 刘永东,王云山,苏志国. 重组人血清白蛋白生产工艺研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 30(5):128-132.
LIU Yong-dong, WANG Yun-shan, SU Zhi-guo. The progress of research in recombinant human serum albumin production[J]. **Microbiology**, 2006, 30(5):128-132. (in Chinese)
- [5] 于平. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展[J]. 工业微生物, 2005, 35(3):50-54.
YU Ping. The research progress of *Pichia Pastorios expression system*[J]. **Industrial Microbiology**, 2005, 35(3):50-54. (in Chinese)
- [6] 金虎,高敏杰,史仲平等. 多变量在线测量条件下的猪 α 干扰素高效表达[J]. 过程工程学报, 2009, 9(3):563-567.
JIN Hu, GAO Min-jie, SHI Zhong-ping, et al. Effective expression of porcine interferon- α with on-line multi-variable monitoring[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2009, 9(3):563-567. (in Chinese)
- [7] 徐向荣,马国昌,王昌梅,等. 层析法去除重组人血清白蛋白干扰素 α 2b融合蛋白的内毒素[J]. 生物工程学报, 2008, 24(1):159-163.
XU Xiang-rong, MA Guo-chang, WANG Chang-mei, et al. Removing endotoxin from rHSA-IFN α 2b by chromatography [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2008, 24(1):159-163. (in Chinese)
- [8] 蔡慧丽. 生物技术药品分离纯化过程中内毒素的去除[J]. 海峡药学, 2006, 18(2):157-158.
CAI Hui-li. Removaing endotoxin from biotech drugs by purification[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2006, 18(2):157-158. (in Chinese)
- [9] 金光泽,段作营,张莲芬,等. 重组融合人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 突变体在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(4):595-601.
JIN Guang-ze, DUAN Zuo-yun, ZHANG Lian-feng, et al. Expression of the fusion protein human serum album/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(4):595-601. (in Chinese)
- [10] Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2007, 100(9):5022-5027.