

毕赤酵母基因工程菌高密度发酵表达重组人源胶原蛋白

王安华 王孟兰

海南雁龙生物医药科技有限公司 海南 海口 570100

摘要:巴斯德毕赤酵母,是甲醇营养型酵母中的一类能够利用甲醇作为唯一碳源和能源的酵母菌。巴斯德毕赤酵母是单细胞真核生物,生长快,易于分子遗传学操作;巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶I(Alcohol Oxidase I, AOX1)基因的启动子具有强诱导性和强启动性,适于外源基因的高水平诱导表达;目的基因整合在染色体上具有高稳定性;可高水平分泌表达重组蛋白,纯化方便;发酵工艺成熟,易放大,且培养成本低,产品易分离。本文根据生产实践经验,就巴斯德毕赤酵母菌株的研究进展、高密度发酵菌株的优选及分离纯化技术进行了总结和综述。

关键词:毕赤酵母、菌株、优选、分离纯化

1 前言

1.1 背景和意义

近年来发酵工程迅速崛起,从“乐百氏奶”等乳酸菌饮料,到比黄金还贵的干扰素等药品,都是微生物对人类的无私奉献。微生物在发酵过程里充当着生产者的角色,这与它的特性密不可分的。它们对周围环境的温度、压强、酸碱度、干湿条件都有极强的适应力。发酵的规模越大,批次所需的种子也就越多。要使小小的微生物在短时间内完成如此巨大的发酵任务,那就必须使菌种扩大培养。而扩大培养的前提就是必须要有相对数量、相对稳定、代谢旺盛的种子。

菌种纯化是指从菌种的细胞或孢子群体中淘汰衰退的个体,分离出优良的个体,从而保持菌种的纯度和优良的特性。以巴斯德毕赤酵母为例:近年来毕赤酵母表达系统极受研究者的青睐,已有300多种外源蛋白在该表达系统中获得表达,主要用于人类药物的生产,还包括来自植物、动物和细菌的各种酶,膜受体蛋白,含辅基的蛋白质以及可用于研究晶体结构的蛋白质等。它还可以同时表达酶组分比例适当的一个酶系,使全细胞作为生物催化剂。例如,利用毕赤酵母分泌表达的硫代羟脲裂合酶已达到14.8g/L的高产率;而胞内表达的羟脲裂合酶达到22g/L的高产率。

然而在工业生产中,菌种呈现出自然变异能力,这种自然变异的结果往往导致菌种退化,表现出活力减弱、产孢子能力下降和发酵产物合成能力降低,甚至合成其他产物等。而造成菌种退化的本质原因是基因突变。在培养和保藏过程中,个别细胞或孢子发生基因突变而引起性状改变,在经历连续接种传代后,含突变基因的个体在数量上占优势时,即呈现出菌种退化现象。基因突变可以在自然条件下发生,更因菌种使用不当、

保藏不善等因素而增加发生的机率,此外还与菌种的遗传稳定性有关。为防止巴斯德毕赤酵母菌种的退化,除控制传代次数、妥善保藏以及选择遗传稳定性高的菌种外,积极有效的菌种分离纯化工作就显得尤为重要。

1.2 研究进展

经过十几年的发展,毕赤酵母已经基本成为较完善的外源基因表达系统,具有易于高密度发酵,表达基因稳定,营养要求低、生产快、易于进行操作和培养等特点。利用强效可调控启动子AOX1,已高效表达了HBsAg、TNF、EGF、破伤风毒素C片段、基因工程抗体等多种外源基因,证实该系统为高效、实用、简便,以提高表达量并保持产物生物学活性为突出特征的外源基因表达系统,而且非常适宜扩大为工业规模。此外巴斯德毕赤酵母还有以下优点:

- (1) 具有醇氧化酶AOX1基因启动子,这是目前最强、调控机理最严格的启动子之一。
- (2) 表达质粒能在基因组的特定位点以单拷贝或多拷贝的形式稳定整合。
- (3) 菌株易于进行高密度发酵,外援蛋白表达量高。
- (4) 毕赤酵母中存在过氧化物酶体,表达的蛋白贮存其中,可免受蛋白酶的降解,而且减少对细胞的毒害作用。

2 菌株筛选及分离纯化实验方法

2.1 仪器和试剂

2.1.1 实验仪器

蒸汽灭菌器、无菌操作台、恒温振荡摇床、生物培养箱、电子天平、接种环、酒精灯、培养皿、试管、三角瓶。

2.1.2 实验试剂

酵母膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂(均为分析纯),

巴斯德毕赤酵母菌种（菌种购自国家菌种保藏中心）。

2.2 主要试剂配方

2.2.1 YPD液体培养基

1%酵母膏，2%蛋白胨，2%葡萄糖。

配置方法：（以1L为例）

将10g酵母膏，20g蛋白胨，20g葡萄糖溶于1L水中，搅拌至溶解。

2.2.2 YPD固体培养基

1%酵母膏，2%蛋白胨，2%葡萄糖，2%琼脂。

3 讨论

3.1 胶原蛋白的合成代谢 胶原分子是原胶原前体分裂的产物。原始前胶原经过翻译后的修饰是影响胶原分泌的关键步骤，受组织内氧和乳酸水平的调节，在细胞外胶原蛋白分子进一步聚合形成胶原纤维和胶原束。DCN与转化生长因子- β （TGF- β ）在调控胶原纤维的形成和排列中起重要作用。转化生长因子 β 1（TGF- β 1）其重要生物学功能是调节胶原合成，在转录水平、转录后水平及翻译水平增加胶原等间质蛋白质的合成，同时可通过抑制胶原酶等金属蛋白酶的分泌及刺激金属蛋白酶抑制剂的表达而抑制胶原的降解，参与组织器官纤维化形成过程。TGF- β 1能使体外培养细胞中I型和III型胶原mRNA表达增加，并增加I型胶原mRNA的稳定性^[4]。

Chen等^[5]发现与无盆底功能障碍的妇女相比，SUI患者盆底筋膜和皮肤的低胶原含量并非由于胶原合成降低或I、III型胶原选择性合成减少。2005年，谢飞等采用实时荧光定量PCR技术对绝经前汉族SUI患者阴道壁筋膜组织中III型胶原多肽mRNA表达水平进行了定量分析，发现SUI患者III型胶原合成没有改变，表明绝经前SUI患者胶原减少与合成无关，而可能是胶原分解加速所致，这提示了控制胶原分解可能是未来SUI防治的方向^[6]。

3.2 胶原蛋白的分解代谢 胶原蛋白主要由成纤维细胞合成分泌，胶原酶是对胶原蛋白分子进行分解的特异性蛋白酶，属基质金属蛋白酶（Matrix Metalloproteinases, MMPs）家族，所降解的主要底物有所不同，只对分泌细胞的局部组织的胶原纤维发挥作用，组织来源不同的胶原酶对不同类型的胶原水解能力大小不等，胶原蛋白的分解产物可进一步被明胶酶等水解，胶原酶还可以在其他蛋白酶的协同作用下对不溶性胶原聚合体进行分解，MMPs是一种重要的细胞外基质降解酶，其活性能被基质金属蛋白酶抑制剂（tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs）抑制，MMPs及TIMPs作为调控胶原代谢的重要酶系，活化的MMPs与TIMPs以1:1结合。

3.3 生理状态下，MMPs/TIMPs保持相对平衡，胶原

蛋白结构、功能正常。TIMP能与相应的MMP酶原及其活化形式的酶结合，抑制MMP的产生及活性，抑制其对胶原的降解^[7]。MMPs是唯一可降解纤维素类胶原的酶类，可能是压力性尿失禁患者盆底胶原代谢改变的一个重要机制。

3.4 目前，关于MMP和TIMP表达失衡与SUI发生、发展关系的研究，尚处于初始阶段，存在一些不同观点是正常的，这表明该领域还有许多问题有待于更广泛、更深入的研究和探讨。于文竹等^[8]认为通过药物抑制盆内筋膜中MMPs的表达、增加盆底支持结构中的胶原含量，有可能会成为治疗尿失禁的新途径。

4 雌激素与胶原蛋白代谢的关系

雌激素可改善尿道周围血流量，增加黏膜层的厚度，进而增加尿道周围的闭合压；亦可通过直接刺激成纤维细胞影响胶原合成后的翻译过程，从而影响依赖胶原支撑组织的功能；还可选择性作用于尿道上皮，增加下尿道 α 肾上腺素能神经的作用，在尿失禁的发病中发挥重要作用。

4.1 Goldberg等^[9]提出，妊娠期体内激素水平增高导致盆底结构水平异常，减弱尿道周围支持力而致漏尿。绝经后雌激素水平降低和ER状态改变，尿道血流减少和骨盆胶原代谢改变均可使尿道括约肌关闭不全而致尿失禁。ER广泛存在于盆底的组织中，包括：尿道上皮、盆底肌肉结缔组织的细胞核内、宫骶韧带平滑肌细胞核中，故盆底组织是雌激素作用的靶器官。

4.2 还有一些激素能影响胶原的降解速度如糖皮质激素和雌激素。雌激素不仅通过“尿道粘膜因素”影响排尿自禁功能，还通过控制膀胱出口的位置和神经调节来影响SUI的发生^[20]。

4.3 总之，盆底支持组织功能完整性不仅取决于胶原的含量，还取决于胶原的性质及女性体内的激素水平和不同类型胶原相应比例以及与其他基质成分的相互作用。综上所述，胶原蛋白形态结构的变化和胶原蛋白代谢异常是SUI的主要发病机制之一，但胶原蛋白含量变化与其代谢异常之间的确切关系及其他因素对之的影响仍不十分明确，有待于进一步的研究。

4.4 胶原蛋白海绵是随着现代工程材料学发展出现的一种新型的可用于治疗骨缺损的材料。从动物实验的结果来看，胶原蛋白可以很好的促进兔桡骨骨折治疗。肖智博、吕富荣、蒋电明等通过动物实验表明，胶原蛋白海绵在治疗骨缺损方面，相比于其他的传统材料，可以有效避免各种并发症，减轻患者疼痛感觉，促进治疗效果。但是目前关于胶原蛋白海绵在人体骨缺损患者的治

疗报道还很少见。

4.5 从骨缺损的治疗来看,在于细胞、细胞外支架材料以及生长调节因子三个基本生物学因素共同作用。胶原蛋白海绵在一定程度上承担了支架材料的功能,因此有利于促进骨缺损患者的治疗与恢复。从本研究的结果来看,经过I型胶原蛋白海绵治疗的患者在愈合情况、愈合时间以及功能评分上都要明显高于对照组,这无疑证明了I型胶原蛋白海绵在治疗骨缺损方面的巨大临床价值。

虽然本研究取得了一定的成绩,尤其是证明了I型胶原蛋白海绵在治疗骨缺损方面的潜在价值,但是由于研究时间和经费的原因,并没有对比其他治疗手段。目前治疗骨缺损的方法众多,因此要进一步肯定I型胶原蛋白海绵在骨缺损方面的疗效,还需要进一步的研究,从而为该种材料在骨缺损治疗方面提供更加广泛而有力的证据。

5 结论

从我院的实践来看,I型胶原蛋白海绵在治疗骨缺损方面具有较好的疗效。但是,目前关于I型胶原蛋白海绵用于人体的报道较少,该种材料是否可以广泛运用于骨缺损患者尚需更多的实验支持。

参考文献

- [1]肖智博,吕富荣,蒋电明.对比3种人工复合材料修复骨缺损实验研究[J].重庆医学,2011,(3)
- [2]顾晓东,梁庆威.纳米羟基磷灰石/胶原蛋白复合骨结合VEGF修复骨缺损的实验研究[J].中国医科大学学报,2011,(10)
- [3]宋坤修,何爱咏,谢求恩.纳米羟基磷灰石/胶原复合材料结合血管内皮生长因子修复兔桡骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,(34)