

从毕赤酵母中提取外源重组蛋白的 超声破碎条件及优化

戴佳锟^{1,2,3}, 李 燕⁴, 马 齐^{1,2}, 关正君³, 张 超³, 张艳婷³, 赵荣荣³, 尉亚辉^{3,*}

(1.陕西省科学院酶工程研究所, 陕西 西安 710600; 2.陕西省酶工程技术中心, 陕西 西安 710600;

3.西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术省部共建重点实验室, 陕西 西安 710069;

4.陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043)

摘 要: 建立适用于从毕赤酵母菌中提取外源重组蛋白的超声破碎方法。采用 Western Blotting 免疫印记技术检测从毕赤酵母菌中提取的外源人脂联素蛋白活性, 并以外源人脂联素蛋白活性作为考察指标, 采用单因素和 $L_9(3^3)$ 正交试验设计, 对超声破碎条件进行优化。结果表明: 在外源人脂联素蛋白活性最高的情况下, 超声破碎条件为超声破碎功率 450W、时间 25min、时间间隔(工作时间:间歇时间)10:10(s/s), 此时细胞破碎率为 $(67.8 \pm 2.1)\%$ 。若在超声破碎时添加 1mmol/L PMSF, 虽对细胞破碎率并无显著影响, 但外源人脂联素蛋白活性将会明显增高。

关键词: 毕赤酵母; 超声破碎法; 人脂联素蛋白; Western Blotting 免疫印记技术

Optimization of Ultrasonic Treatment for Recovery of Recombinant Protein from *Pichia pastoris*

DAI Jia-kun^{1,2,3}, LI Yan⁴, MA Qi^{1,2}, GUAN Zheng-jun³, ZHANG Chao³, ZHANG Yan-ting³,

ZHAO Rong-rong³, WEI Ya-hui^{3,*}

(1. Institute of Enzyme Engineering, Shaanxi Academy of Sciences, Xi'an 710600, China; 2. Enzyme Engineering Technology Center of Shaanxi, Xi'an 710600, China; 3. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 4. Shaanxi Provincial Institute of Microbiology, Xi'an 710043, China)

Abstract: In order to establish an appropriate ultrasonic treatment method for the recovery of recombinant protein from *Pichia pastoris*, the activity of human-adiponectin recombinant protein was evaluated by Western Blotting analysis. A $L_9(3^3)$ orthogonal array design based on single-factor tests was employed to optimize the conditions for ultrasonic treatment. The results showed that the optimal ultrasonic treatment conditions were ultrasonic power of 450 W, ultrasonic treatment time of 25 min and ultrasonic treatment interval of 10 s. Under the optimal ultrasonic treatment conditions, the breaking rate of cell walls was $(67.8 \pm 2.1)\%$. The activity of human-adiponectin recombinant protein could be significantly improved by adding 1 mmol/L of PMSF although the addition of PMSF had no effect on breaking rate of cell walls.

Key words: *Pichia pastoris*; ultrasonication; human-adiponectin protein; Western Blotting analysis

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0057-04

酵母菌已广泛应用于食品、饲料以及发酵行业^[1-4]。其不仅含有丰富的蛋白质、维生素等营养物质, 而且也是基因工程技术应用中十分重要的宿主菌^[5]。酵母菌所表达的外源蛋白经过糖基化、酰基化以及添加二硫键等加工修饰后, 结构和功能均与原蛋白相差无几。但是, 酵母细胞的细胞壁厚且结构复杂, 主要由葡聚糖、甘露聚糖和蛋白质等形成的网络结构组成^[6-7], 十分不利

于外源蛋白提取。因此, 建立高效、实用的酵母细胞破壁方法尤为重要。

目前, 虽已有多种方法应用于酵母细胞破碎, 但仍存在不少弊端。例如: 玻璃珠法操作复杂, 液体损失大; 酶裂解法成本高且易造成产物抑制; 化学法作用时间长、效率低, 所用试剂毒性较大^[8]。而超声破碎技术, 作为一种设备需求低、使用便捷、安全性好的

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 陕西省科学院科技计划项目(2011K-17); 西北大学自主创新类项目(10YZZ36)

作者简介: 戴佳锟(1984—), 男, 初级研究员, 硕士, 研究方向为基因工程及细胞工程制药。E-mail: djka@163.com

* 通信作者: 尉亚辉(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为基因工程及细胞工程制药。E-mail: weiyahui@nwu.edu.cn

细胞破碎方法, 现已广泛应用于裂解原核^[9-10]以及真核细胞^[11]。然而, 在超声破碎法的推广使用中, 研究人员一直致力于如何提高细胞破碎率, 增加外源蛋白得率, 却缺乏在提高细胞破碎率的同时, 对外源蛋白损坏、降解的探索。本研究采用表达人脂联素蛋白的重组毕赤酵母菌株做为实验材料^[12], 以保证外源蛋白高活性为首要指标, 探寻适于从毕赤酵母 GS115、乃至其他酵母菌株中提取外源重组蛋白的超声破碎方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

经诱导可表达人脂联素蛋白的毕赤酵母 GS115 菌株(简称为 GS115-AP), 由西北大学西部资源与现代生物技术省部共建重点实验室构建并保存。

人脂联素单克隆抗体(一抗) 美国 ALEXIS 公司; 单克隆抗体 IgG(二抗)、Western Blotting 化学发光底物美国 Pierce 公司; PMSF、蜗牛酶 美国 Sigma 公司; PVDF 杂交膜 美国 Millipore 公司; BMGY、BMMY 液体培养基 实验室自制; 其余试剂均为国产分析纯。

BMGY 液体培养基: 含有质量分数 1% 酵母浸出物、2% 蛋白胨、1.34% YNB、 4×10^{-7} 生物素、体积分数 1% 甘油、0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液, pH 6.0; BMMY 培养基: 含有质量分数 1% 的酵母浸出物、2% 蛋白胨、1.34% YNB、 4×10^{-7} 生物素, 体积分数 0.5% 甲醇, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.0; 裂解液: 50 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mmol/L EDTA-2Na, 体积分数 5% 甘油, pH 7.4。

1.2 仪器与设备

S-250D 超声破碎仪 上海生析超声仪器有限公司; 5415D 低温高速离心机 德国 Eppendorf 公司; Western Blotting 实验设备 北京六一公司; BX50-F4 显微镜 日本 Olympus 公司; GelDoc XR 凝胶电泳成像分析系统 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的培养和收集

挑取 GS115-AP 菌株单克隆至 5 mL BMGY 液体培养基中, 于 28℃、250 r/min 振荡培养 18 h。吸取 0.5 mL 菌液再次接种于 50 mL 新鲜 BMGY 液体培养基中, 同条件培养至 OD₆₀₀ 约为 2.0。将菌液在 6000 r/min 离心 5 min, 然后收集菌体, 重悬于 100 mL BMMY 培养基中同条件下继续培养, 并且每 24 h 向培养液中补充 0.5 mL 甲醇。诱导表达 96 h 后, 离心收集菌体, 用蒸馏水洗 3 遍后分成数份, 每份 0.5 g。

1.3.2 毕赤酵母细胞的超声破碎

将 1.3.1 节制备的 1 份酵母菌体转入 50 mL 离心管中,

加入 15 mL 预冷的裂解液, 振荡混匀后, 冰浴 20 min。将超声破碎仪探头置于离心管液面下约 1 cm 处, 在冰浴条件下进行超声破碎。

1.3.3 破碎率检测

将超声破碎前后的细胞悬液分别稀释至适当倍数后, 在显微镜下观察, 用细胞计数板对完整形态细胞进行计数, 通过计算得到细胞破碎率, 每组统计 3 次, 取平均值。

$$\text{细胞破碎率} / \% = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100$$

式中: A_1 为破碎前的细胞计数结果; A_2 为破碎后的细胞计数结果。

1.3.4 外源人脂联素蛋白质活性检测

超声破碎结束后, 以 12000 r/min 离心裂解悬液 10 min。吸取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 然后经转膜、一抗(浓度 1:5000)和二抗(1:2000)孵育后, 在暗室中由化学发光底物显色并用感光胶片记录保存^[13]。胶片成像后, 用 Quantity One 凝胶成像分析软件对条带进行定量分析, 以测得的灰度密度值数值大小直接反映外源人脂联素蛋白活性高低(此数值只用于反映同 1 张图片上各个条带之间的强弱关系, 不作为不同图片上条带之间对比的依据)。

2 结果与分析

2.1 破碎功率的影响

细胞悬液经冰浴处理后, 分别在破碎功率 180、270、360、450、540、630 W 的条件下超声破碎, 破碎时间 20 min, 时间间隔(工作时间: 间歇时间)为 10:8 (s/s)。结果如图 1 所示, 破碎率随着破碎功率的增加而相应增高, 在最大功率 630 W 时达到(72.3 ± 1.9)%。而外源蛋白活性(以灰度密度值数值大小表示)却与之不同。当破碎功率增加时, 外源蛋白活性先是不断升高, 在 450 W 时达到最大, 而随后开始逐渐下降。为了保证外源蛋白活性最大, 将超声破碎功率选定为 450 W 左右较为适宜。

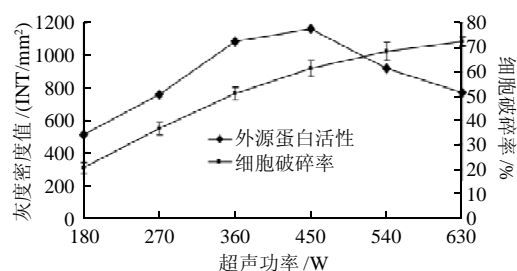


图 1 超声功率对破碎率及外源蛋白活性的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on breaking rate of cell walls and protein activity

2.2 破碎时间的影响

选定破碎功率 450W、时间间隔 10:8(s/s)，然后分别超声破碎 15、20、25、30、35、40min 并检测。结果如图 2 所示，破碎率与破碎时间呈正相关，并且在 25min 之前破碎率增加较为显著，之后则趋于缓慢。外源蛋白活性则随着破碎时间的延长而不断增加，在 30min 处到达峰值后便开始迅速降低。因此，选定破碎时间为 30min 左右较为适宜。

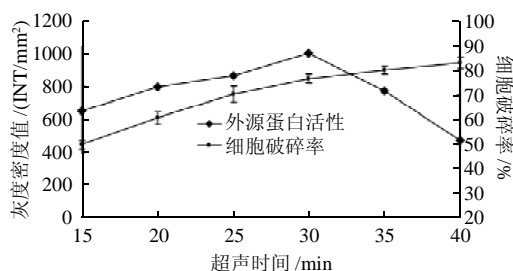


图 2 破碎时间对破碎率及外源蛋白活性的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic treatment time on breaking rate of cell walls and protein activity

2.3 破碎时间间隔的影响

在超声破碎过程中，时间间隔是一个重要指标：时间间隔的变化直接影响着细胞破碎率，而且，时间间隔的不同还会引起超声过程中热效应和空化效应的改变，制约着外源蛋白活性。本试验将破碎功率定为 450W，在时间间隔分别 5:10、8:10、10:10、10:8(s/s) 和 10:5(s/s) 的条件下超声破碎 30min。从图 3 可以看出，工作时间在时间间隔中所占比值越高，细胞破碎率越高。当时间间隔为 10:5(s/s) 时，细胞破碎率达到 $(91.2 \pm 2.1)\%$ 。而外源蛋白活性则先增后减，在时间间隔为 10:10(s/s) 时最高。因此，选定 10:10(s/s) 时间间隔较为适宜。

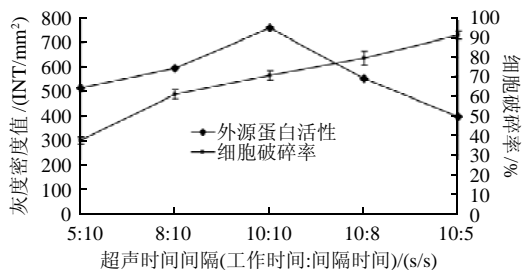


图 3 时间间隔对破碎率及外源蛋白活性的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic treatment interval on breaking rate of cell walls and protein activity

本试验结果与李永霞等^[11]研究的游离氨基酸总量在不同超声破碎条件下变化的情况一致。总体上，破碎功率、破碎时间以及破碎时间间隔的变化均可归结为破碎强度的变化。在破碎强度较低时，其适当的增加可以提高细胞破碎率，从而增加裂解悬液中蛋白质含量，最终促使外源蛋白总体活性升高。而当破碎强度达到一定程度后，虽然破碎率仍有大幅增加，但是过大的破碎强度加剧了破碎过程中的热效应和空化效应，致使蛋白质损伤剧增，最终导致外源蛋白总体活性降低^[14-15]。

2.4 超声破碎条件的正交试验优化

在单因素试验基础上，对影响外源人脂联素蛋白活性的超声功率、超声时间和超声时间间隔进行 $L_9(3^3)$ 正交试验，因素水平见表 1。在正交试验中，以外源蛋白活性，即测得的密度灰度值作为优化指标，结果如表 2 所示。

表 1 超声破碎条件正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal array design

水平	因素		
	A 超声功率/W	B 超声时间/min	C 超声时间间隔/(s/s)
1	360	25	8:10
2	450	30	10:10
3	540	35	10:8

表 2 超声破碎工艺优化正交试验设计及结果
Table 2 Design and results of orthogonal tests

试验号	A	B	C	灰度密度值/(INT/mm²)
1	1	1	1	427
2	1	2	2	715
3	1	3	3	429
4	2	1	2	800
5	2	2	3	499
6	2	3	1	424
7	3	1	3	648
8	3	2	1	568
9	3	3	2	292
k_1	523.7	625.0	473.0	
k_2	574.3	594.0	602.3	主次顺序: $B > C > A$
k_3	502.7	381.7	525.3	
R	71.7	243.3	129.3	最优方案: $A_2B_1C_2$

从表 2 可知，对外源人脂联素蛋白活性影响因素主次顺序为 $B > C > A$ ；从毕赤酵母中提取外源人脂联素蛋白的最佳工艺条件为 $A_2B_1C_2$ ，即超声功率 450W、超声时间 25min、超声时间间隔 10:10(s/s)。由表 3 可知，超声时间是影响外源人脂联素蛋白活性的显著性因素。

表3 正交试验方差分析表
Table 3 Variance analysis of orthogonal tests

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
超声功率	8144.222	2	0.176	5.140	
超声时间	105257.556	2	2.275	5.140	*
超声时间间隔	25394.889	2	0.549	5.140	
误差	138796.67	6			

2.5 PMSF对外源蛋白活性的影响

PMSF是一种广泛使用的蛋白酶抑制剂,可以有效抑制蛋白水解酶和巯基蛋白酶活性,从而减少外源蛋白的降解和损伤。将获得的菌体重悬于15mL预冷的裂解液中,冰浴20min,然后加入PMSF使之终浓度达到1mmol/L。空白组与实验组均在破碎功率450W、时间间隔10:10(s/s)的条件下超声破碎25min。结果如图4所示,PMSF添加组与空白组的细胞破碎率并无显著差异,分别为 $(67.1 \pm 2.5)\%$ 和 $(67.8 \pm 2.1)\%$ 。然而,PMSF添加组的外源蛋白活性却明显高于空白组。这说明在细胞超声破碎过程中,PMSF仅仅具有蛋白酶抑制剂的作用,其可以对外源蛋白起到较好的保护,但对细胞破碎率却无辅助功效。

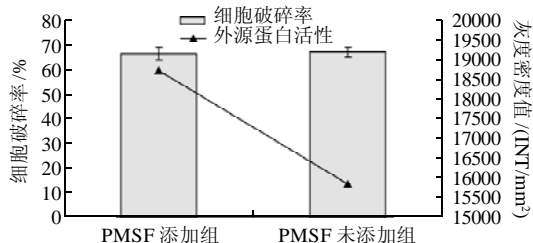


图4 PMSF对破碎率及外源蛋白活性的影响

Fig.4 Effect of PMSF addition on breaking rate of cell walls and protein activity

2.6 超声破碎法与玻璃珠法和酶裂解法的对比

用优化后的超声破碎法与玻璃珠法^[13]和酶裂解法^[16]分别处理酵母细胞,将细胞破碎率进行对比,结果见表4。从表4可以看出,超声破碎法和玻璃珠法的破碎率近似,均优于酶裂解法。

表4 不同破碎方法所得的细胞破碎率

Table 4 Breaking rate of cell walls by using different methods

破碎方法	玻璃珠法	酶裂解法	超声破碎法	
			添加 PMSF	未添加 PMSF
破碎率/%	68.7 ± 3.8	61.2 ± 1.9	67.1 ± 2.5	67.8 ± 2.1

3 结 论

超声破碎法技术成熟,已广泛应用于破碎各种细胞。以往的研究大多着重于追求高破碎率以获得尽可能多的外源蛋白,却忽略了外源蛋白活性的高低。本实验将外源蛋白活性作为首要指标,探寻在外源蛋白活性最高时的超声破碎条件。由毕赤酵母GS115细胞的超声破碎结果可以得出,在破碎功率450W、时间间隔10:10(s/s)条件下破碎25min时,外源人脂联素蛋白所受损伤最小,活性最高。

在裂解液中添加适量的PMSF(1mmol/L)可以有效地提高外源蛋白质活性,但对细胞破碎率几乎无影响,PMSF添加与未添加组的细胞破碎率分别为 $(67.1 \pm 2.5)\%$ 和 $(67.8 \pm 2.1)\%$ 。

优化得到的超声破碎法与传统的玻璃珠法和酶裂解法相比,操作简便、成本低廉。在推广使用中,只需在本实验结果的基础上进行少许调整和改进,便可广泛应用于破碎其他酵母细胞或提取不同种类的外源蛋白。

参考文献:

- [1] 梁恒宇,程建军,马莺.中国传统大豆发酵食品中微生物的分布[J].食品科学,2004,25(11):401-404.
- [2] 程玉来,赵爽.传统面食发酵中的酵母菌的发酵性能分析[J].食品工业,2011(3):78-80.
- [3] 包怡红,梁雪,李锐达,等.产胞外多糖酵母菌株的筛选鉴定及发酵产糖[J].微生物学报,2010,50(2):278-283.
- [4] 姚晓红,吴逸飞.酵母培养基对奶牛生产性能的影响[J].中国饲料,2009(2):22-23;26.
- [5] CEREHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45-66.
- [6] 卢鑫,张会彦,亢春雨,等.马克思克鲁维酵母DNA提取方法的比较[J].食品科技,2009,34(4):31-37.
- [7] BOWMAN S M, FREES J. The structure and synthesis of the fungal cell wall[J]. Bioassays, 2006, 28(8): 799-808.
- [8] 李宏君,尹际彤,杨启东.细胞破碎方法简述[J].黑龙江医药,2002,15(2):124.
- [9] 曾敏,谢为天,潘丽娟,等.鼠李糖乳杆菌细胞破碎方法的比较及其肽聚糖含量的测定[J].饲料工业,2010,31(8):31-33.
- [10] 吴蕾,雷鸣,洪建辉,等.超声破碎重组大肠杆菌释放包含体的过程研究[J].化学工业与工程,2002,19(6):422-425.
- [11] 李永霞,曾海英,秦礼康.酵母细胞破碎条件优化及高肽酶菌株筛选[J].食品科学,2010,31(17):302-306.
- [12] 张变玲,张儒,姬婧媛,等.重叠延伸PCR法克隆人脂联素基因及其在毕赤酵母中表达[J].生物工程学报,2008,24(8):1480-1484.
- [13] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] CASTENSEN E L. Mechanisms for biological effects of ultrasound[C]/Proceedings 16th ICA 98. Seattle, 1998: 1437-1438.
- [15] LIU Y, UNO H, TAKATSUKI H, et al. Interrelation between HeLa-S3 cell transfection and hemolysis in red blood cell suspension using pulsed ultrasound of various duty cycles[J]. Eur Biophys J, 2005, 34(2): 163-169.
- [16] 王萍,厉荣玉,董群.白假丝酵母菌DNA提取方法的研究[J].热带医学杂志,2008,8(12):1222-1224.