

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12P 21/00  
C12N 15/81



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03127139.1

[43] 公开日 2004 年 4 月 28 日

[11] 公开号 CN 1492050A

[22] 申请日 2003.9.9 [21] 申请号 03127139.1

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所  
地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 孙立伟 张晓宇 赵大庆

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 提高用毕赤酵母分泌表达成纤维细胞生长因子表达量的方法

### [57] 摘要

本发明属于一种提高用毕赤酵母分泌表达成纤维细胞生长因子表达量的方法。使用的毕赤酵母工程菌为 GS115 或 KM71，其分泌型表达载体为 pPICZ $\alpha$  - A，pHIL - S1，pPIC9，或 pPIC9K。先将毕赤酵母工程菌在 BMGY 培养基中培养，再将菌体重悬于复合诱导培养基 (BMMAY) 开始诱导表达蛋白，BMMAY 培养基的组成：甲醇终浓度为 0.5 - 1.5% BMMY 培养基，终浓度为 0.05 - 0.1% 疏水性氨基酸丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr) 或蛋氨酸 (Met)；诱导温度为：30 - 31℃；诱导时间：72 - 144 小时；每隔 24 小时补加诱导剂甲醇及氨基酸，达到诱导时间后离心收获上清液进行分离纯化。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种提高用毕赤酵母分泌表达成纤维细胞生长因子表达量的方法，首先将分泌型表达载体为 pPICZ  $\alpha$ -A, pHIL-S1, pPIC9, 或 pPIC9K 的毕赤酵母工程菌 GS115 或 KM71, 在 BMGY 培养基中, 温度为 28-31°C, 摇床转数为 250-300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=5.0-9.0$ , 培养时间为 24-32 小时, 然后在室温 3000-5000rpm 离心 5-10min, 再将菌体重悬于复合诱导培养基开始诱导表达蛋白, 复合诱导培养基的组成: 甲醇、复合诱导培养基、疏水性氨基酸丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸或蛋氨酸; 诱导温度为: 30-31°C; 摇床转数: 200-300rpm; 诱导时间: 72-144 小时; 每隔 24 小时补加诱导剂甲醇及氨基酸, 使甲醇终浓度为 0.5-1.5%, 氨基酸终浓度为 0.05-0.1%; 达到诱导时间后 10000-12000 rpm 离心收获上清液进行分离纯化。

## 提高用毕赤酵母分泌表达成纤维细胞生长因子表达量的方法

### 技术领域

本发明属于一种提高用毕赤酵母分泌表达成纤维细胞生长因子表达量的方法。

### 背景技术

成纤维细胞生长因子 (FGF) 是由多种多肽因子组成的一个大家族, 除了主要的酸性 FGF (aFGF) 和碱性 FGF (bFGF, FGF2), 至少还包括以下成员: hst/ks3、int-2、FGF-5、FGF-6 及角质细胞生长因子 (KGF, FGF-7)。它们分布于多种组织并具有广泛的生物学作用, 可诱导大多数来自中胚层和神经外胚层细胞的有丝分裂, 如间充质细胞 (血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞), 内分泌细胞 (卵泡颗粒层细胞、肾上腺皮质细胞等), 神经细胞 (星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经元等); 及毛细血管内皮细胞的增生和细胞的分化。FGF 在胚胎形成、分化、血管形成及心脏损伤修复、创伤愈合等方面起着重要作用, 在神经系统的生长发育、损伤与疾病中, 尤其是脑与脊髓损伤、Alzheimer's 病、Parkinson's 病、糖尿病性神经病变等方面都有广阔的应用。

毕赤酵母表达系统是近年发展起来的一种以甲醇为唯一碳源的新型表达体系, 它兼有原核细胞良好的分子生物学可操作性和真核系

统的后加工作用。它能利用很强的启动子,具有极快的细胞生长速度,而且该系统的载体能和核基因进行整合,所以构建的菌株较稳定,此外通过分泌信号肽的引导,外源蛋白可以在内质网和高尔基体中经修饰加工后分泌到胞外,从而免除了纯化时繁琐的细胞破碎及提取工作。但是令人遗憾的现象是很多外源蛋白的分泌表达效率低下,尤其是相对于胞内表达来说。

中国专利 CN 1345927A 中公开了李效坤等题为“重组碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)基因工程酵母菌及生产方法”,该方法用毕赤酵母表达系统构建了一种能够在胞内或胞外表达 bFGF 的酵母工程菌,表达量约为 20-100 mg/L。姜颖等在中国免疫学杂志 2001 年第 17 卷 517-521 页题为“重组人 aFGF 的克隆、表达及活性测定”一文中报道其使用毕赤酵母分泌型酵母表达系统表达了重组人 aFGF,表达量为 12 mg/L。这为我们进一步提高用毕赤酵母表达体系表达 FGF 产量奠定了基础。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种提高用毕赤酵母分泌表达成纤维细胞生长因子表达量的方法。

本发明使用的毕赤酵母工程菌为 GS115 或 KM71,其分泌型表达载体为 pPICZ  $\alpha$ -A, pHIL-S1, pPIC9, 或 pPIC9K。这类表达体系具有很强的启动子,同时其载体能和酵母核基因整合,因此非常稳定。毕赤酵母的生物学特性和一般的酿酒酵母很相似,这就节省了购置发酵设备和探索发酵技术所需的巨额花费,使其进行大规模的商品化生产

非常有利。本发明通过添加氨基酸组分增加了在表达过程中的营养物质，使酵母细胞具有较强的生产力；另外这种方法避免了在使用甲醇+甘油混合培养恢复细胞生产力时，醇氧脱氢酶（AOX）启动子受甘油的抑制的问题；同时由于细胞生物量的提高也增加了对甲醇的利用，从而使这种通过 AOX 启动子严紧诱导表达的产量随着甲醇利用率的提高而提高。

本发明首先将分泌型表达载体为 pPICZ  $\alpha$ -A, pHIL-S1, pPIC9, 或 pPIC9K 的毕赤酵母工程菌 GS115 或 KM71, 在 BMGY 培养基中, 温度为 28-31 °C, 摇床转数为 250-300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=5.0-9.0$ , 培养时间为 24-32 小时, 这保证了进入诱导表达前所需要的生物量; 然后在室温 3000-5000rpm 离心 5-10min, 再将菌体重悬于复合诱导培养基 (BMMAY) 开始诱导表达蛋白, BMMAY 培养基的组成: 甲醇、BMMY 培养基、疏水性氨基酸丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr)、或蛋氨酸 (Met); 诱导温度为: 30-31 °C; 摇床转数: 200-300rpm; 诱导时间: 72-144 小时; 每隔 24 小时补加诱导剂甲醇及氨基酸, 使甲醇终浓度为 0.5-1.5%, 氨基酸终浓度为 0.05-0.1%; 达到诱导时间后 10000-12000 rpm 离心收获上清液进行分离纯化; 上清液直接用肝素琼脂糖 (Heparin Sepharose) CL-6B 亲和层析柱纯化, 分别用含 0.5 和 3.0 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液进行洗脱, 收集第二洗脱峰, 将洗脱峰蛋白用 10mmol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液透析除盐, 冻干保存。所得蛋白冻干粉经 SDS-PAGE 电泳鉴定为单一

电泳纯，同时鉴定了其促 3T3 细胞增殖的生物学活性，并用 Folin 酚法测定其蛋白浓度，计算出每升发酵液所得 FGF 产量 80-200 mg。这一方法使 FGF 在摇瓶发酵培养的条件下的表达量提高 4-16 倍。

本发明的优点在于工艺简单易行、生产产量大幅度提高，从而使生产成本降低，利润提高。这使 FGF 家族做为基因工程药物进行大规模产业化生产具有决定性意义；同时对于指导其它以毕赤酵母表达体系分泌表达的外源蛋白的表达量提高具有重要意义。

为了更清楚的说明本发明，列举以下实施例。

具体实施方式

实施例 1:

含 aFGF 基因的毕赤酵母 GS115，其分泌型表达载体为 pPIC9 的分泌表达

本方案添加的氨基酸为 Ala。

挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中，在 28℃，300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=6.0$ ，培养时间为 26h；室温 3000 rpm 离心 6min 收获菌体，菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中，此培养基含 0.5% 甲醇，0.05% Ala，于 30℃，300rpm 培养；每隔 24h 补加甲醇：终浓度为 0.5%，Ala:终浓度为 0.05%，于 30℃，300rpm 继续培养；120h 后 10000 rpm 4℃离心 30 分钟，弃掉沉淀，将上清 4℃保存；上清液直接过 Heparin Sepharose CL-6B 亲和层析柱纯化，分别用含 0.5 和 3.0 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液进行洗脱，收集第二洗脱峰；将洗脱的蛋白用 10mmol/L pH7.0 的磷酸盐

缓冲液透析除盐，冻干保存；冻干粉用 SDS-PAGE 电泳鉴定纯度，用 Folin 酚法测定蛋白浓度，确定其产量。

此种方案获得的 aFGF 为  $0.10 \pm 0.005$  g/L。

#### 实施例 2:

含 aFGF 基因的毕赤酵母 GS115，其分泌型表达载体为 pPICZ  $\alpha$ -A 的分泌表达。

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 phe。

挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中，在 30℃，250rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=5.0$ ，培养时间为 24h；室温 4000 rpm 离心 5min 收获菌体，菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中。此培养基含 0.5% 甲醇，0.08% Phe，于 31℃，250rpm 培养；每隔 24h 补加甲醇：终浓度为 0.5%，Phe：终浓度为 0.08%，于 31℃，250rpm 继续培养；120h 后 12000 rpm 4℃ 离心 30 分钟，弃掉沉淀，将上清 4℃ 保存，其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 aFGF 约为  $80 \pm 5$  mg/L。

#### 实施例 3:

含 aFGF 基因的毕赤酵母 GS115，其分泌型表达载体为 pPIC9 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Tyr。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中，在 30℃，280rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=7.0$ ，培养时间约为 28h；室温 5000 rpm 离心 10min 收获菌体，菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中。此培养基含 1.0% 甲醇，0.1% Tyr，于 31℃，

280rpm 培养；每隔 24h 补加甲醇至终浓度为 1.0%，Tyr 终浓度为 0.1%，于 30.5℃，280rpm 继续培养；144h 后 12000 rpm 4℃离心 30 分钟，弃掉沉淀，将上清 4℃保存，其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 aFGF 约为  $150 \pm 10$  mg/L。

#### 实施例 4:

含 aFGF 基因的毕赤酵母 GS115，其分泌型表达载体为 pHIL-S1 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Val。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中，在 30℃，300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=6.0$ ，培养时间为 24h；室温 4000 rpm 离心收获菌体，菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中，此培养基含 0.8% 甲醇，0.08% Val，于 30℃，300rpm 培养；每隔 24h 补加甲醇：终浓度为 0.8%；Val：终浓度为 0.08%，于 30℃，300rpm 继续培养；120h 后 12000 rpm 4℃离心 30 分钟，弃掉沉淀，将上清 4℃保存，其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 aFGF 约为  $100 \pm 5$  mg/L。

#### 实施例 5

含 bFGF 基因的毕赤酵母 KM71，其分泌型表达载体为 pPIC9K 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Leu。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中，在 30℃，300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=9.0$ ，培养时间为 32h；室温 5000 rpm 离心收获菌体，菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中，此培养基含 1.0% 甲醇，0.1% Leu，于 30℃，300rpm 培养；



每隔 24h 补加甲醇:终浓度为 1.0%; Val:终浓度为 0.1%, 于 30℃, 300rpm 继续培养; 144h 后 12000 rpm 4℃离心 30 分钟, 弃掉沉淀, 将上清 4℃保存, 其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 bFGF 约为  $0.15 \pm 0.01$ g/L。

#### 实施例 6

含 bFGF 基因的毕赤酵母 KM71, 其分泌型表达载体为 pPIC9 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Ala。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中, 在 30℃, 300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=6.0$ , 培养时间为 26h; 室温 4000 rpm 离心 8min 收获菌体, 菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中, 此培养基含 1.0% 甲醇, 0.1% Ala, 于 30℃, 300rpm 培养; 每隔 24h 补加甲醇:终浓度为 1.0%; Ala:终浓度为 0.1%, 于 30℃, 300rpm 继续培养; 144h 后 11000 rpm 4℃离心 30 分钟, 弃掉沉淀, 将上清 4℃保存, 其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 bFGF 约为  $0.20 \pm 0.01$ g/L。

#### 实施例 7

含 bFGF 基因的毕赤酵母 GS115, 其分泌型表达载体为 pHIL-S1 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Tyr。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中, 在 30℃, 300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=8.0$ , 培养时间约为 30h;

室温 4000 rpm 离心收获菌体, 菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中, 此培

培养基含 1.2% 甲醇, 0.1% Tyr, 于 30℃, 300rpm 培养; 每隔 24h 补加甲醇: 终浓度为 1.2%; Tyr: 终浓度为 0.1%, 于 30℃, 300rpm 继续培养; 144h 后 12000 rpm 4℃ 离心 30 分钟, 弃掉沉淀, 将上清 4℃ 保存, 其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 bFGF 约为  $0.18 \pm 0.01$ g/L

#### 实施例 8

含 bFGF 基因的毕赤酵母 GS115, 其分泌型表达载体为 pPIC9K 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Met。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中, 在 30℃, 300rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=7.0$ , 培养时间约为 26h; 室温 4000 rpm 离心收获菌体, 菌体重悬于 1L BMMAY 培养基中, 此培养基含 0.8% 甲醇, 0.1% Val, 于 30℃, 300rpm 培养; 每隔 24h 补加甲醇: 终浓度为 0.8%; Val: 终浓度为 0.1%, 于 30℃, 300rpm 继续培养; 120h 后 12000 rpm 4℃ 离心 30 分钟, 弃掉沉淀, 将上清 4℃ 保存, 其它步骤同实施例 1。

此种方案获得的 bFGF 约为  $0.15 \pm 0.01$ g/L

#### 实施例 9:

含 KGF 基因的毕赤酵母 GS115, 其分泌型表达载体为 pHIL-S1 的分泌表达

本方案 BMMAY 中添加的氨基酸为 Ala。挑取工程菌的一个单菌落接种于 1L BMGY 培养基中, 在 30℃, 280rpm 培养至菌体密度为  $OD_{600}=6.0$ , 培养时间为 24h。室温 4000 rpm 离心收获菌体, 菌体重悬于 1L BMMAY

培养基中, 此培养基含 1.0% 甲醇, 0.1% Ala, 于 30℃, 300rpm 培养;  
每隔 24h 补加甲醇: 终浓度为 1.0%; Ala: 终浓度为 0.1%, 于 30℃,  
300rpm 继续培养; 120h 后 12000 rpm 4℃ 离心 30 分钟, 弃掉沉淀,  
将上清 4℃ 保存,

此种方案获得的 KGF 约为  $90 \pm 5$  mg/L。