

# 毕赤酵母表达硒代重组人血清白蛋白

陈思任 锐 陈劲春\*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘要:** 将能够成功表达重组人血清白蛋白(rHSA)的巴斯德毕赤酵母培养至诱导期后,流加亚硒酸钠,同时设空白对照发酵液(不加入亚硒酸钠),通过对比相同菌株在两组培养基中表达的rHSA的含硒量,判断硒能否以硒代氨基酸的形式存在于重组蛋白质中。发酵液经热处理、超滤、离子交换和丙酮沉淀等步骤后,进行Tricine-SDS-PAGE凝胶电泳、X射线能量色散谱(EDX)和原子吸收分析。结果表明,加硒发酵液样品中硒元素的质量分数比对照多23.2%,硒与蛋白质的质量比为0.0069,高于对照发酵液近35倍,初步证明无机硒可以被毕赤酵母同化,转化为硒代氨基酸,并形成硒代重组蛋白质。

**关键词:** 亚硒酸钠; 重组人血清白蛋白; 毕赤酵母

**中图分类号:** Q939.9

## 引言

人体的营养元素硒具有延缓衰老,修复机体组织和抑制癌症等作用<sup>[1]</sup>。目前,硒的补充主要通过无机硒化合物、人工合成有机硒化合物以及富硒酵母来实现。但是硒的无机化合物多具有毒性,易引起不良反应,而注射给药途径限制了有机硒化合物的应用<sup>[2]</sup>。本试验是根据加入亚硒酸钠后酵母便可以产生硒代氨基酸的思路<sup>[3]</sup>,把转基因毕赤酵母在含硒基质中培养,以期硒在酵母细胞内以硒氨基酸(SeMet, SeCys)的形式参与重组蛋白质的合成,从而得到营养价值高、毒性极小、利于吸收利用的硒代重组蛋白质。人血清白蛋白(HSA)有很高的药用价值<sup>[4]</sup>,硒代人血清白蛋白即可作为白蛋白补充剂又可以作为有机硒抑制癌症,提高免疫力,增强组织修复能力,具有很大的市场潜力。硒代人血清白蛋白作为单纯的营养保健品投放市场,与现有的硒营养品相比,其成分更加明确,安全性、有机纯度和营养价值更高。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

*Pichia pastoris* GS115/rHSA Mut<sup>s</sup> 为本实验室

构建。

### 1.2 培养基

种子培养基 YPG:酵母提取物 1.0%,大豆蛋白胨 2.0%,甘油 2.0%;基础盐培养基 BSM:硫酸钙 0.93 g/L,硫酸钾 18.2 g/L,七水硫酸镁 14.9 g/L,柠檬酸钠 1.47 g/L,微量元素 2 mL/L,甘油 40 g/L,硫酸铵 10 g/L,磷酸钾缓冲液(pH 6.0) 0.1 mol/L。微量元素主要成分:五水硫酸铜 6.0 g/L,碘化钾 0.08 g/L,一水硫酸锰 3.0 g/L,二水钼酸钠 0.2 g/L,硼酸 0.02 g/L,硫酸钙 0.5 g/L,氯化钴 0.5 g/L,氯化锌 20.0 g/L,七水硫酸亚铁 65.0 g/L,硫酸 5.0 mL/L,生物素 0.2 g/L。试剂均为国产生化试剂纯或分析纯。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 发酵** 将50 $\mu$ L种子液接种于5 mL的YPG培养基中,30 $^{\circ}$ C振荡培养18-22 h,转接到装有100 mL基础盐培养基的500 mL带挡板的摇瓶中。转速180 r/min,温度30 $^{\circ}$ C培养,每8小时用浓氨水调节发酵液pH值至6.0。约48 h时,取样检测甘油浓度,待甘油耗尽后加入甲醇开始诱导。诱导期培养温度为28 $^{\circ}$ C,pH值调节至7.0<sup>[5-6]</sup>,每12 h补加体积分数0.5%的纯甲醇和10 mg/L的亚硒酸钠,对照发酵液不添加亚硒酸钠。诱导96 h后停止发酵。

**1.3.2 发酵液的浓缩和脱盐** 将发酵液于7200 r/min离心5 min,收集上清液;上清液60 $^{\circ}$ C热处理3 h使蛋白酶失活,10000 r/min离心10 min得到热处理上清液;热处理上清液用截留分子量为30 k的

收稿日期: 2005-11-15

第一作者: 女,1982年生,硕士生

\*通讯联系人

E-mail: jingchunchen@hotmail.com

空纤维超滤膜进行脱盐浓缩并除去小分子杂蛋白。

**1.3.3 离子交换层析** 经过脱盐的上清液流入 DEAE Sepharose FF 阴离子交换树脂柱,用紫外检测仪于 280 nm 在线检测,收集洗脱峰。上样条件为 0.005 mol/L 的磷酸钠缓冲液, pH 值 6.4;洗脱液为含有 0.20 mol/L NaCl 的磷酸钠缓冲液, pH 值 8.0<sup>[7]</sup>。

**1.3.4 蛋白质的沉淀收集** 采用丙酮沉淀法<sup>[8]</sup>沉淀 10 mL 经离子交换后的洗脱液。上清液蒸除丙酮后电泳检测;沉淀用 1.5 mL 去离子水重新溶解后, 10000 r/min 离心 10 min 得上清液进行电泳和原子吸收分析硒含量。

#### 1.4 分析方法

测定所取发酵液中的细胞干质量<sup>[9]</sup>,再除以所取发酵液体积即得细胞质量浓度;高碘酸钠氧化法<sup>[10]</sup>测定甘油浓度;考马斯亮兰染色法<sup>[11]</sup>测定总蛋白质量浓度;Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳测定蛋白质分子量;X 射线能量色散谱分析(EDX)及原子吸收光谱法测定硒含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 亚硒酸钠对毕赤酵母的影响

在代谢过程中,酵母同化亚硒酸钠的能力有限,过量的亚硒酸钠会被酵母还原为单质硒,使硒酵母呈红色<sup>[12]</sup>。本实验从诱导期开始每 12 h 加入 10 mg/L 的亚硒酸钠,对照发酵液不加入亚硒酸钠。两组发酵液中酵母的颜色均为黄色或淡黄色,加硒发酵液中的细胞质量浓度稍小于对照发酵液。两者在诱导期细胞质量浓度的比较见表 1。在诱导初期细胞量仍有增加,这是毕赤酵母利用甲醇作为碳源

表 1 加硒发酵液和对照发酵液诱导期细胞质量浓度的比较

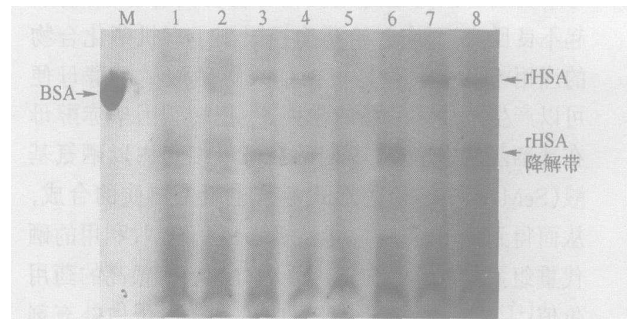
Table 1 Concentration by weight of cells in the samples containing selenium and control

诱导时间/h	细胞质量浓度/g·mL <sup>-1</sup>	
	加硒发酵液	对照发酵液
0	0.104	0.102
12	0.112	0.120
24	0.118	0.136
48	0.116	0.132
72	0.098	0.126
96	0.080	0.110

继续生长,随后其体内的甲醇氧化酶发生作用,生长逐渐停滞,转为利用甲醇诱导表达蛋白,诱导 24 h 左右后细胞量不再明显增加;诱导 48 h 后,细胞质量浓度的下降说明菌体逐渐衰退死亡。在诱导不同时期的两组发酵液细胞质量浓度的对比可以看出,亚硒酸钠对菌体的生长有一定的抑制作用,进而可能会影响外源蛋白的表达。

### 2.2 蛋白质分子量分析

Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳分析蛋白质分子量,凝胶浓度 10%。重组人血清白蛋白理论分子量为 66500,标准参比 M 为牛血清白蛋白(BSA),分子量为 66200,rHSA 降解带分子量为 45000,如图 1。无论是加硒样品还是对照样品,在发酵液中目标蛋白浓度很低,基本没有谱带;经过中空纤维超滤膜和离子交换层析后,发酵液浓缩了 10 倍左右,可以看到模糊的谱带,说明发酵液中含有目标蛋白且分子量正确;进行丙酮沉淀后,发酵液又浓缩了 6 倍左右,目标蛋白谱带清晰可见。对照样品中的蛋白量略微高于加硒样品;从图 1 中的泳带 5 和 6 来看,发酵液经过丙酮沉淀后的上清液中已经几乎没有目标蛋白,可以认为丙酮能够沉淀全部目标蛋白。



1,3,5,7 为加硒样品;2,4,6,8 为对照样品;1,2 为热处理上清液;3,4 为离子交换后上清液;5,6 为丙酮沉淀后上清液;7,8 为丙酮沉淀后重新溶解上清液

图 1 rHSA Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳分析图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern on Tricine-SDS-PAGE

### 2.3 EDX 能谱分析

将图 1 中的泳带 7 和 8 中 rHSA 对应的位置切下,经处理后进行 EDX 能谱分析,得到样品中元素在 K 能层的质量分数和原子分数,见表 2 和表 3。结果表明,对照样品中元素 C、O 的质量分数和原子分数均高于加硒样品,说明对照样品中的蛋白质的含量高于加硒样品,进一步证明了亚硒酸钠会抑制毕赤酵母表达外源蛋白。而加硒的样品中元素硒的质量分数为 1.21%,对照样品中为 0.99%,前者比

后者多 23.2%。加硒样品中含硒量虽然多,但不足以证明硒元素在 rHSA 中参与形成了硒代氨基酸,因此有必要进行表达的目标蛋白中硒含量的检测。

表 2 加硒样品中元素的质量分数和原子分数

Table 2 Chemical composition of the samples containing selenium

元素	质量分数/ %	原子分数/ %
C	59.25	67.74
O	16.76	14.38
Se	6.99	1.21

表 3 对照样品中元素的质量分数和原子分数

Table 3 Chemical composition of the control

元素	质量分数/ %	原子分数/ %
C	71.90	80.34
O	22.25	18.67
Se	5.85	0.99

## 2.4 原子吸收测定蛋白中的硒含量

委托北京谱尼理化分析测试中心进行硒含量分析,仪器为 SB-31 原子荧光光谱仪 AFS-9130, Jitian (China)。结果见表 4,其中  $1$  为丙酮沉淀重新溶解上清液中的硒的质量浓度,  $2$  为换算为原离子交换后发酵液中硒的质量浓度,  $3$  为原离子交换后发酵液中蛋白质的质量浓度。得到加硒样品中硒与蛋白质的质量比为 0.0069,对照样品中仅为 0.0002,进一步证明无机硒可以被毕赤酵母同化为有机硒,并参与重组蛋白质的合成。

表 4 样品中硒质量浓度的比较

Table 4 Comparison of selenium concentration of the samples

样品	$1/ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$2/ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$3/ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	硒与蛋白质的质量比
加硒	0.46	0.069	10	0.0069
对照	0.023	0.0035	18	0.0002

## 3 结论

毕赤酵母发酵过程中亚硒酸钠的加入对细胞生长和外源蛋白的表达都有一定的抑制作用,而毕赤酵母可以将无机硒同化为硒代氨基酸,并形成硒代重组蛋白质。加硒样品中元素硒的质量分数高于对

照样品 23.2%,硒与蛋白质的质量比达 0.0069,高于对照近 35 倍。实验结果初步证明了利用毕赤酵母生产硒代重组人血清白蛋白的可行性,对进一步研究和工业化生产都有一定的参考价值。

## 参 考 文 献

- [1] Wanger P D. Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis[J]. J Trace Elem Electrolytes Health Dis, 1992, 6: 209 - 225.
- [2] 李爱芬,刘振乾,徐宁,等. 微量元素硒载体酵母发酵的研究[J]. 暨南大学学报:自然科学版, 2004, 25(5): 626 - 631.
- [3] Suhajda A, Hegoeziq J, Janzso B, et al. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Trace Elem Med Bio, 2000, 14(1): 43 - 47.
- [4] 郭美锦,储炬,杭海峰,等. 重组人血清白蛋白表达研究进展[J]. 生物工程进展, 2000, 20(5): 39 - 42.
- [5] Kaoru K, Shnobu K, Tomoshi O. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylo-trophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation [J]. J Biosci Bioeng, 2000, 89(1): 45 - 61.
- [6] 孙战胜,陈劲春. 重组人血清白蛋白在毕赤酵母表达中的降解控制[J]. 北京化工大学学报:自然科学版, 2004, 31(4): 9 - 11.
- [7] 朱家文,武斌,陈葵,等. 离子交换层析分离纯化重组人血清白蛋白[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(4): 341 - 345.
- [8] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 61 - 62.
- [9] 吴康华,郭美锦,庄英萍,等. 基因工程菌 *Pichia pastoris* 连续培养的生长及抑制动力学[J]. 华东理工大学学报, 2001, 27(6): 605 - 609.
- [10] 王剑锋,修志龙,范圣第. 甘油转化生产 1,3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定[J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 33 - 35.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 J. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 880 - 887.
- [12] 郝素娥,滕冰,韩喜江. 硒酵母培养过程中亚硒酸钠添加量对硒酵母中硒含量分布的影响[J]. 精细化工, 1997, 14(1): 27 - 29.

(下转第 29 页)

- [7] 孙彦. 生物分离工程[M]. 北京:化学工业出版社, 1998: 16 - 22.
- [8] 马永征, 宋宏新, 李敏康. 氯化血红素提取中超声波细胞破碎条件的研究[J]. 陕西科技大学学报, 2005, 23(2): 41 - 44.
- [9] 王霜, 吴振强, 余若黔, 等. 谷氨酸菌体破碎条件的优化研究[J]. 生物技术, 1997, 7(5): 26 - 30.
- [10] 焦瑞身, 李载平, 于俊棠. 生物工程概论[M]. 化学工业出版社, 1991: 164 - 165.
- [11] 周顺华, 刘宝林, 焦岩. 一种新的低温玻璃化破碎技术[J]. 低温工程, 2005 (5): 19 - 23.

## Study on optimum conditions of cell disruption of the *Agrobacterium tumefaciens* strain with antioxidant

LUAN Mei-li YUAN Qi-peng

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** In this paper, the effects of milling, disruption with organic solvent and ultrasonic on disruption of *Agrobacterium tumefaciens* KY-3085 (ATCC 4452) Strain were compared. The results showed that the yield of CoQ<sub>10</sub> was 5.703 mg/L when mixing time was 3.5 h, on the condition of disruption with organic solvent. The orthogonal experiment by ultrasonic cell disruption indicated the optimum conditions were 40 mg/mL concentration, 12 min, 250 W. Compared with above, milling with quartz and acetone was the best when the antioxidant BHT(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) was added. In this method, the yield of CoQ<sub>10</sub> was 8.012 mg/L, increased of 38 percent. The optimized addition of antioxidant BHT was 20%.

**Key words:** coenzyme Q<sub>10</sub>; *Agrobacterium tumefaciens* KY-3085; antioxidant BHT

(上接第 25 页)

## Selenium incorporation into recombinant human serum albumin in *Pichia pastoris*

CHEN Si REN Rui CHEN Jin-chun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** The transgenic yeast *Pichia pastoris* cultured for high level expression of rHSA was fed with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> during the induction phase in order to investigate incorporation of selenium into rHSA. After fermentation, the supernatant was processed by heat treatment, ultrafiltration, ion exchange chromatography and acetone precipitation and the molecular weight determined by Tricine-SDS-PAGE. Energy dispersive X-ray analysis (EDX) and atomic absorption spectroscopy (AAS) were then used to determine the selenium concentration. The results indicated that Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> directly affects cell growth and rHSA yield. Furthermore, the experimental sample is found to contain 23.2% more selenium than the control (no addition of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) and the ratio of selenium to rHSA is 0.0069, which is about 35 times higher than the control.

**Key words:** Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; recombinant human serum albumin; *Pichia pastoris*