

发酵罐高密度培养盘基网柄菌

陈祥仁¹, 黄霄红², 徐宝多³, 卢英华^{3*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 厦门大学医学院药理学系, 3. 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用 SH 合成培养基, 在 7 L 发酵罐培养盘基网柄菌. 培养 147 h 后, 细胞密度达到 $4.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 为在复杂培养基上所能达到的细胞密度的 2~4 倍. 培养过程中葡萄糖的消耗量为 6.7 g/L , 产氨浓度达 0.88 g/L . 对培养基中的氨基酸分析表明, 赖氨酸、色氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸消耗较快, 显示 SH 培养基的氨基酸成分还可进一步优化. 采用基于 Monod 生长动力学的半经验模型可很好模拟细胞生长和底物消耗, 并估计出动力学参数 $\mu_{\max} = 0.115 \text{ h}^{-1}$, $N_{\max} = 6.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. 本研究为进一步优化合成培养基和为利用这一新型真核表达系统大规模生产重组异源蛋白奠定了基础.

关键词: 盘基网柄菌; 合成培养基; 发酵罐; 培养

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0032-05

盘基网柄菌 (*Dicystelium discoideum*) 属于真菌界的粘菌亚界的聚粘霉纲. 在自然界中盘基网柄菌通过吞噬土壤表面的细菌摄取营养和繁殖. 它的(无性)生命周期可分为两个不同的阶段, 即营养生长阶段和发育阶段. 在生长阶段, 盘基网柄菌为单细胞的阿米巴变形虫, 通过吞噬细菌或在无菌培养基中通过胞饮作用摄取营养. 盘基网柄菌的阿米巴通过简单的细胞分裂增殖. 当营养物质耗尽时, 形成一个从非分化的阿米巴到分化的、多细胞阶段的无性发展周期, 最后形成孢子. 在适宜的环境条件下, 孢子可发芽生成阿米巴, 从而开始新的生命周期^[1].

盘基网柄菌已成为一个广泛用作研究分子生物学和细胞生物学中关键问题的真核模型生物, 如研究细胞的信息传导、趋化性、细胞粘附、细胞分裂、细胞聚集、细胞变异、细胞骨架、胞质分裂、形态发生等^[2], 并与酿酒酵母 *S. cerevisiae* 一起, 于 2000 年被 NIH 选为标准微生物模型系统 (<http://www.nih.gov/science/>). 2005 年 2 月, Nature 发表了盘基网柄菌的全基因组序列, 结果显示其单倍体基因组大小为 $3.4 \times 10^7 \text{ bp}$ (A+T) 含量高达 77.57%, 编码了约 12 500 种蛋白质. 测序结果同时还证明了盘基网柄菌与真菌以及后生动物之间具有更近的同源性.

上世纪 90 年代, 在利用盘基网柄菌表达异源蛋白质的研究工作获得了进展. 例如, 盘基网柄菌成功地表达了迄今为止重组表达的最大蛋白质之一、分子量高达 380 ku 的肌球蛋白^[3]. 盘基网柄菌拥有多种蛋白质

翻译后修饰加工机制, 包括磷酸化、酰基化、GPI(糖基磷脂酰肌醇)锚点等, 以盘基网柄菌作为载体异源表达的糖蛋白具有与高等生物类似的糖基化修饰结构, 这对于研究开发很多依赖于蛋白表面糖基化的糖蛋白药物具有重要意义, 因此盘基网柄菌逐渐成为前景广阔的又一新型真核表达系统^[4]. 在盘基网柄菌中表达的蛋白还包括寄生生物糖蛋白抗原、病毒蛋白质和人类蛋白质, 包括人类抗凝血酶 III (rhAT III)、轮状病毒 SA11 毒株 VP7 蛋白、恶性疟疾孢子病毒蛋白抗原、人毒蕈碱性胆碱能受体 M2 α -1 抗胰蛋白酶、人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、人类可溶性 Fas 配体 (shFasL) 等^[5].

然而, 盘基网柄菌在无菌复杂培养基(如 HL-5C 培养基)上的最大细胞密度只能达到 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 难以进一步提高^[6]. 目前, 高密度培养的困难成为制约盘基网柄菌作为通用表达系统的最主要问题^[7]. 通常认为盘基网柄菌的两个自分泌因子, PSF (Prestarvation Factor) 和 CMF (Conditioned Medium Factor) 限制了细胞密度^[8,9]. 因此有必要在改善盘基网柄菌的培养方面进行深入研究, 以提高表达效率和使利用这一表达系统大规模生产复杂的药物蛋白成为可能.

1 材料和方法

1.1 试剂

氨基酸纯品大部分来自日本 AJNOMOTO 公司, 其余均为国产药用级. 各种维生素购自 Fluka 或 Sigma 公司, 二氢链霉素硫酸盐由 Sigma 提供, 遗传霉素 (G-418) 从 Serva 获得, 其余试剂均为市售分析纯.

收稿日期: 2006-01-23

基金项目: 国家自然科学基金(20306025)资助

作者简介: 陈祥仁(1969-), 男, 实验师.

* 通讯作者: ylu@xmu.edu.cn

1.2 菌种

本实验所用的菌种为重组盘基网柄菌 AX2-pAC6-D150^[10], 可表达源于疟原虫细胞 *Plasmodium falciparum* 的表面抗原 CS 融合蛋白 (*Circum sporozoite protein*). 表达是在启动子 actin 6 的控制下, 即可以控制盘基网柄菌在无菌培养基中组成型表达目标蛋白^[11]. 另外, 此重组菌株拥有氨苄霉素和遗传菌素 (G418) 抗性.

1.3 培养基

本实验所用的培养基为 SH 合成培养基^[12]. SH 培养基是在 Franke 和 Kessin 提出的 FM 培养基配方^[13]的基础上发展起来的, 只对氨基酸的组成作了改动. SH 培养基可导致更高的细胞密度^[12]. FM 或 SH 均是由 16 种氨基酸 (L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-缬氨酸)、维生素 (生物素、维生素 B₁₂、叶酸、硫辛酸、核黄素、盐酸硫胺)、无机盐 (NH₄Cl、CaCl₂、FeCl₃、MgCl₂)、微量元素 (Na₂EDTA、ZnSO₄、H₃BO₃、MnCl₂、CoCl₂、CuSO₄、(NH₄)₆Mo₇O₂₄) 以及葡萄糖、磷酸盐、链霉素硫酸盐组成. 氨基酸、维生素、无机盐、微量元素事先配成浓缩溶液, 在 -20 °C 下保存, 临用前置于室温使其融化. SH 培养基中由于含有温度敏感物质, 故通过 0.2 μm 微过滤器 (Sartobran-300 Kapsel 德国 Sartorius 公司) 过滤除菌.

1.4 实验方法

(1) 盘基网柄菌的种子摇瓶培养

在 250 mL 摇瓶中加入 30 mL SH 合成培养基, 接种处于对数生长期的细胞, 并使初始细胞密度为 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 22~23 °C, 170 r/min 摇床振荡培养至细胞密度 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. 培养过程中加入 10 μg/mL 遗传菌素 G418 (下同), 以维持重组质粒的稳定性.

(2) 盘基网柄菌的发酵罐间歇培养

盘基网柄菌的间歇培养在 7 L 发酵罐系统 (瑞士 MBR BD Reactor AG 公司) 中进行. 发酵罐内径为 150 mm, 高径比为 3:1, 带有 6 个桨叶, 桨叶直径为 70 mm. 此系统可在线检测和控制溶氧和 pH 等参数. 先将发酵罐灭菌, 然后通过灭菌的 Sartobran-300 Kapsel 微过滤器将 5 L 培养基过滤到发酵罐中. 接种对数生长期的盘基网柄菌细胞, 使初始细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. 培养温度为 23 °C, 罐内压力为 0.01 MPa, pH 通过自动滴加 2 mol/L NaOH 或 10% H₃PO₄ 始终维持在 6.5

开始时通气量为 3 L/min, 转速为 200 r/min. 当发酵罐培养基中溶氧降至 20% 时, 调节通气量为 5 L/min, 转速为 300 r/min.

1.5 分析方法

细胞密度 (N): 通过显微镜下用 Neubauer chamber 血球板计数获得.

细胞干质量: 离心收集细胞, 在 60 °C 真空干燥箱中干燥 6 h, 称质量测定.

葡萄糖浓度: 使用 Signa 公司 Glucose-(HK) 葡萄糖测定试剂依据说明书酶法测定.

氨及铵离子浓度: 利用 Buentmeyer H 和 Stenner A 提出的一种荧光分析新方法测定^[14]. 此方法的原理是在巯基乙酸 (硫代乙醇酸) 存在下, 包括氨在内的伯胺与邻苯二甲醛在碱性条件下反应生成一种不稳定的产物—可发出荧光的异构吡啶的衍生物. 荧光可在激发波长和发射波长分别为 415 nm 和 485 nm 处检测. 在这两个波长氨基酸衍生物的荧光强度可忽略不计.

氨基酸浓度的测定: 采用柱前衍生-反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 方法进行氨基酸浓度的测定, 其原理是: 衍生化氨基酸在反相高效色谱柱上有效分离, 在荧光或紫外吸收检测器上定量测定. 选用邻苯二甲醛 (OPA) / 3-巯基丙酸 (3-MPA) 作为衍生化试剂, 因为 OPA 衍生步骤简单, 反应速度快, 剩余试剂不干扰测定, 衍生物可用紫外、荧光或电化学检测器检测^[15]. 使用的仪器为高效液相色谱仪 (安捷伦公司, 配有高压四元泵、紫外-可见分光检测器、梯度洗脱控制器). 色谱仪工作条件: 色谱柱为 Hypersil ODS (4.0 mm × 250 mm), 粒径 5 μm, 流动相 A 为 10 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.2 缓冲溶液 (PB), 含 0.3% 四氢呋喃 (THF); 流动相 B 为 PB+ 甲醇+乙腈 (50+35+15). 线性梯度: 在 0~40 min 内, 流动相 B 以线性从 0% 上升至 100%. 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 检测波长为 340 nm.

1.6 间歇培养过程的模拟

间歇培养过程中细胞的生长情况可采用基于 Monod 生长动力学的一个半经验模型来模拟.

基于 Monod 生长动力学, 细胞密度 (N) 的微分平衡方程可表示为:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} N \quad (1)$$

其中 μ 是细胞生长速率, μ_{\max} 是最大比生长速率, S 是限制性底物浓度, K_s 是表现 Monod 常数. 假定细胞收率系数 $Y_{N/S}$ 为一常数, 则

$$Y_{N/S} = \frac{dN}{dS} = \frac{N - N_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

其中 N_0 是接种时的细胞密度, S_0 是初始限制性底物浓度.

底物浓度与细胞密度的关系可表示为:

$$S = S_0 - \frac{N - N_0}{Y_{N/S}} \quad (3)$$

或
$$S = \frac{N_{max} - N}{Y_{N/S}} \quad (4)$$

其中 $N_{max} = N_0 + Y_{N/S} S_0 \quad (5)$

将底物浓度 (S) 代入式 (1) 并将细胞密度转换成无因次量, 可得到

$$\frac{d\phi}{dt} = \mu_{max} \frac{(1 - \phi)\phi}{\phi_s + 1 - \phi} \quad (6)$$

与
$$\mu = \mu_{max} \frac{1 - \phi}{\phi_s + 1 - \phi} \quad (7)$$

其中 $\phi = \frac{N}{N_{max}}, \phi_s = \frac{K_S Y_{N/S}}{N_{max}} \quad (8, 9)$

对式 (6) 积分, 可得:

$$\mu_{max} t = \ln \frac{\phi}{\phi_0} + \phi_s \ln \frac{\phi(1 - \phi_0)}{\phi_0(1 - \phi)} \quad (10)$$

底物浓度可由下式给出:

$$\frac{S}{S_0} = \frac{N_{max} - N}{N_{max} - N_0} \quad \text{或} \quad f = \frac{S}{S_0} = \frac{1 - \phi}{1 - \phi_0} \quad (11)$$

其中 ϕ 是相对细胞密度, ϕ_0 为初始相对细胞密度, N_{max} 是最大细胞密度, f 为底物剩余分率.

式 (10) 可通过 Gauss-Newton 插值方法求解. 参数 ($\phi_0, \phi_s, \mu_{max}, N_{max}$) 代入实验数据求得. 目标函数定义为变量 N 的实验值与模拟值之差的平方和.

2 结果与讨论

发酵罐培养是异源蛋白放大生产的重要步骤. 图 1 为在 7 L MBR 发酵罐中培养重组盘基网柄菌 AX2-pAC6-D150 的细胞密度变化和一些重要的在线数据变化曲线. 初始的通气量为 3 L/min, 由于盘基网柄菌的阿米巴变形虫没有细胞壁, 对剪切力较敏感, 初始转速设为较低的 200 r/min. 培养 120 h 后, 溶氧量 pO_2 降至 19%, 此时增大通气量至 5 L/min, 转速至 300 r/min. 在实验中未发现在此转速下细胞损伤.

图 1 的生长曲线为典型的通过简单分裂增殖的单细胞生长曲线. 由于接种的是对数生长期的细胞, 因此几乎看不到迟滞期, 细胞以 13~14 d 的世代时间增长, 直到 147 h 达到了最大细胞密度 $4.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. 这个细胞密度约为通常在复杂培养基中所能达到的细胞密度 ($1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) 的 2~4 倍.

培养过程中葡萄糖的消耗和氨的生成曲线见图 2. 葡萄糖的消耗主要在对数生长期的后期以及稳定期. 共有 6.7 g/L 葡萄糖, 即初始葡萄糖总量的 69% 被

消耗. 培养过程中细胞持续放出氨, 稳定期后氨浓度大量增加, 最后氨浓度达到 0.88 g/L. 通常认为氨的生成对细胞生长不利.

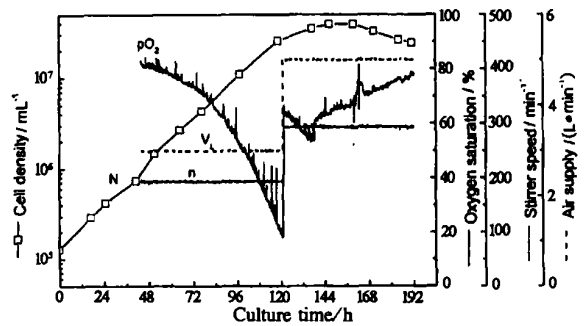


图 1 7 L 发酵罐 SH 培养基培养盘基网柄菌 AX2-pAC6-D150 细胞生长、溶氧、通气量以及转速变化曲线

Fig 1 Cultivation of *D. discoideum* AX2-pAC6-D150 on SH medium in 7 L bioreactor. Profiles of cell growth and some important on-line data

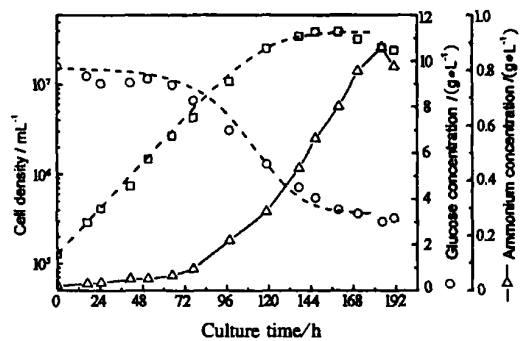


图 2 7 L 发酵罐 SH 培养基培养盘基网柄菌 AX2-pAC6-D150 细胞生长、葡萄糖消耗及氨生成关系曲线. 虚线 (---) 为依据方程 (10) 和 (11) 的模拟曲线

Fig 2 Profiles of cell density, glucose consumption and ammonium production during the cultivation of *D. discoideum* AX2-pAC6-D150 on SH medium in 7 L bioreactor. The dash lines (---) show the simulation of cell growth and the glucose consumption

根据式 (10) 和 (11) 对细胞生长和葡萄糖消耗的模拟见图 2 中的虚线. 可见, 基于 Monod 生长动力学的半经验模型可很好地拟合实验数据. 估计的参数值如下: $\mu_{max} = 0.115 \text{ h}^{-1}, N_{max} = 6.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}, \phi_0 = 3.17 \times 10^{-3}, \phi_s = 1.301$.

比生长速率随细胞密度的变化见图 3. 实线为根据式 (7) 代入参数值后的模拟结果. 计算出的培养初期的比生长速率 $\mu_0 = 0.051 \text{ h}^{-1}$, 相当于世代时间为 13.6 h.

细胞干质量与细胞密度的关联见图 4. 可见两者的关联性很好, 一个细胞的干质量约为 $1.48 \times 10^{-10} \text{ g}$.

实验中还分析了各种氨基酸的浓度, 列于图 5. 可

以发现, 培养 160 h 后 (稳定期后期) 赖氨酸 (Lys)、色氨酸 (Try)、甲硫氨酸 (Met) 和苯丙氨酸 (Phe) 几乎消耗殆尽。可以推测, 进一步优化氨基酸的浓度, 还可达到更高的细胞密度。

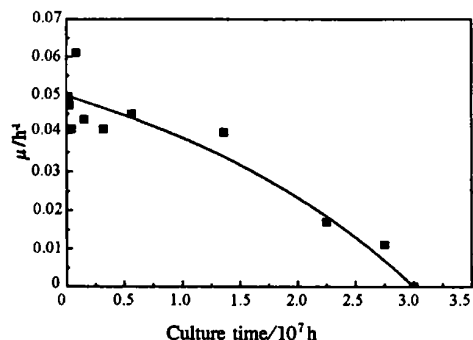


图 3 盘基网柄菌培养过程中的比生长速率与细胞密度的关系。实线为根据方程 (7) 的模拟值

Fig 3 Growth kinetics of *Dictyostelium discoideum* in the cultivation process presented in Fig 1. The curve was generated by subm itting the estimated parameter in equation (7)

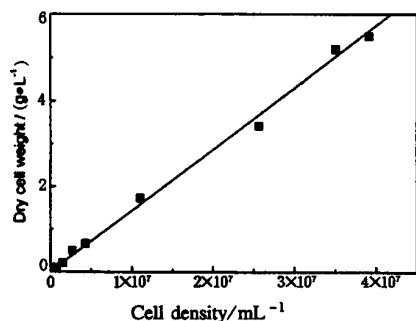


图 4 细胞密度与细胞干质量的关联曲线

Fig 4 Correlation of the cell density and the dry cell weight

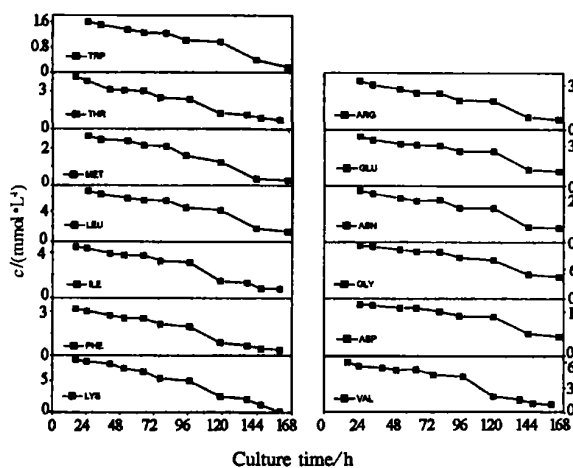


图 5 培养过程中 SH 培养基各种氨基酸浓度的变化曲线

Fig 5 Profiles of amino acid consumption during batch cultivation of *D. discoideum* on SH medium in a 7 L-bioreactor

3 结论

盘基网柄菌作为表达系统的主要优点在于它可对

重组蛋白进行各种翻译后修饰, 如磷酸化、酰基化、形成糖基磷脂酰肌醇锚点 (GPI), 特别是氮连接或氧连接的简单和复杂的糖基化, 而且其糖基化机制与高等生物非常相似^[16]。此外, 可在盘基网柄菌中应用随机突变方法产生成千上万个克隆子, 从而避免了在昂贵而难处理的哺乳动物细胞系进行分析^[17]。重组蛋白在盘基网柄菌中是由染色体外质粒表达复制, 而不是由整合到染色体上的 DNA 表达复制, 这样可一步得到重组蛋白以用于后续分析, 并且质粒的高拷贝数可使蛋白质在可调节的启动子的严格控制下以胞内、膜结合或以胞外分泌的形式大量表达。单细胞的阿米巴变形虫能够在简单、廉价培养基上较快速生长并能在发酵罐中以较高的密度悬浮培养, 利于重组蛋白的大量生产。

相比于复合培养基, 盘基网柄菌在合成培养基上往往能达到更高的细胞密度。本文研究表明, 采用新型合成培养基 SH 培养重组盘基网柄菌, 并通过逐步提高转速和通气量, 保持发酵液中溶氧量在 20% 以上, 可以实现盘基网柄菌的高密度生长, 进而实现在盘基网柄菌中目标蛋白的高通量合成。在合成培养基 SH 中, 7L 发酵罐培养重组菌 AX2-pAC6-D150 的最大细胞密度达到 $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 以上, 从而为利用这一新型真核表达系统大规模生产重组异源蛋白奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gerisch G, Albrecht R, Heizer C, et al. Chemotactant controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein coronin fusion protein [J]. *Curr Biol*, 1995, 5: 1280-1285.
- [2] Kessin R H. *Dictyostelium: evolution, cell biology and the development of multicellularity* [M]. New York: Cambridge University Press, 2001.
- [3] Williams K L, Emshier K R, Slade M B. Recombinant glycoprotein production in the slime mould *Dictyostelium discoideum* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6 (5): 538-542.
- [4] Rai M, Padh H. Expression systems for the production of heterologous proteins [J]. *Curr Sci*, 2001, 80 (9): 1121-1128.
- [5] Lu Yinghua, Wu Xiaoxia, Xu Zhinan, et al. Advances in *Dictyostelium discoideum* as an expression system [J]. *Chemical Journal on Internet*, 2004, 6 (9): 58.
- [6] Stephan M, Beshay U, Friehs K, et al. Influence of medium composition on growth behaviour of *Dictyostelium discoideum* for cultivation on axenic media [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 39: 333-343.
- [7] Beshay U. Continuous cultivation with immobilized *Dictyos-*

- telium discoideum* [D]. Germany University of Bielefeld 1999.
- [8] Clark M, Yang J, Kayman S C. Analysis of the prestarvation response in growing cells of *Dictyostelium discoideum* [J]. *Dev Gen*, 1988, 9: 315–326.
- [9] Clark M, Gomer R H. PSF and CSF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium* [J]. *Experientia*, 1995, 51: 1124–1134.
- [10] Fasel N, Begdad R, Raïs C, Bernard M, et al. *Dictyostelium discoideum* as an expression host for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* [J]. *Gene*, 1992, 111: 157–163.
- [11] Emslie K R, Slade M B, Williams K L. From virus to vaccine: developments using the simple eukaryote *Dictyostelium discoideum* [J]. *Trends Microbiol*, 1995, 3: 476–479.
- [12] Han S I, Frihs K, Fäschel E. Improvement of a synthetic medium for *Dictyostelium discoideum* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39 (8): 925–930.
- [13] Frank J, Kessin R. A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(5): 2157–2161.
- [14] Lu Y. Technische Maßnahmen zur Verbesserung der Züchtung von *Dictyostelium discoideum* [D]. Germany University of Bielefeld 2002.
- [15] 牟德海, 李建生, 林展江, 等. 邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定人和小鼠血浆中的游离氨基酸 [J]. *分析测试学报*, 1998, 17(4): 18–21.
- [16] Jung E, William K L. Review: the production of the recombinant glycoproteins with special reference to the simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, 25: 3–8.
- [17] Linskens M H K, Grootenhu is P D J, Blaauw M, et al. Random mutagenesis and screening of complex glycoproteins: expression of human gonadotropins in *Dictyostelium discoideum* [J]. *FASEB J*, 1999, 13: 639–645.

High Cell Density Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in Conventional Bioreactor

CHEN Xiang-ren¹, HUANG Xiao-hong², XU Bao-duo³, LU Ying-hua^{3*}

(1. School of Life Science, Xiamen Univ., 2. Department of Pharmaceutics, School of Medicine, Xiamen Univ., 3. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract *Dictyostelium discoideum* was cultivated on a novel synthetic SH medium in 7 L bioreactor. After 147 h cultivation, cell density was reached up to $4.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. It was about 2–4 times higher than that could be obtained in axenic complex medium. Up to 6.7 g/L glucose was consumed and 0.88 g/L ammonium was produced during the cultivation, respectively. Analysis of samples with respect to amino acids indicated that lysine, tryptophan, methionine and phenylalanine were consumed completely after a cultivation time of 160 h. This results showed that the composition with respect to the amino acids might still be further optimized. The cell growth activity and glucose consumption could be modeled with semi-empirical balance equations based on Monod kinetics. The estimated parameters were $\mu_{\max} = 0.115 \text{ h}^{-1}$, $N_{\max} = 6.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. This study provided basic data for large scale production of heterologous proteins with *Dictyostelium discoideum*.

Key words *Dictyostelium discoideum*; synthetic medium; bioreactor cultivation