

# 转兔防御素基因小球藻培养的营养模式研究

韩兴梅<sup>1</sup>, 李元广<sup>1</sup>, 魏晓东<sup>1</sup>, 李兴武<sup>1</sup>, 孙勇如<sup>2</sup>, 王义琴<sup>2</sup>

(1. 华东理工大学 海洋生化工程研究所生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

**摘要:** 在 250 mL 摇瓶中研究了光自养、异养、混合营养 3 种营养模式对转兔防御素基因 (NP-1) 小球藻(*Chlorella*)的生长、NP-1 表达量、总蛋白质含量、pH、葡萄糖消耗以及光衰减等几个方面的影响。结果表明,异养培养为转 NP-1 基因小球藻的最适营养模式。在此基础上,采用 5, 15, 30 L 生物反应器补料分批异养培养转 NP-1 基因小球藻,细胞质量浓度分别达到 3.67, 4.87, 6.39 g/L。

**关键词:** 转基因小球藻; 兔防御素; 营养模式; 表达

**中图分类号:** Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3039 (2006) 07-0048-05

防御素是广泛分布于动植物及昆虫体内的一类抗菌肽,含量极少,却执行着机体重要的防御功能<sup>[1]</sup>。目前,从生物界分离到的防御素已达 30 多种,其中以兔防御素 (NP-1) 的抗菌谱最广,它对多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、被膜病毒和鼠肿瘤细胞,尤其是对幽门螺杆菌和爱滋病病毒有显著的毒杀作用<sup>[2]</sup>。因此, NP-1 在医药方面具有重要的应用价值。

目前,可通过化学合成法和直接提取法获得防御素,但由于工艺路线复杂,成本极高,不具有应用价值<sup>[3]</sup>。因此,通过基因工程方法生产防御素成为该领域的研究热点。Piers<sup>[4]</sup>通过融合蛋白途径试图在细菌中表达人的防御素 HNP-1,但得到的 HNP-1 没有生物学活性;徐志南等<sup>[5]</sup>通过融合蛋白途径在大肠杆菌中表达 人防御素,但表达量很低且尚不知所表达的产物是否有活性。Chen 等<sup>[6]</sup>用电激法将 NP-1 基因成功地导入小球藻细胞中,体外离体抑菌实验证明 NP-1 基因已稳定整合到小球藻基因组中,并进行了正确转录和表达,因此利用转 NP-1 基因小球藻有望规模制备 NP-1。

转 NP-1 基因小球藻高密度高表达培养是规模制备 NP-1 的关键技术之一。众所周知,小球藻可以采

用光自养、异养、混合营养 3 种营养模式进行培养,但光自养培养具有生长速率慢、易被微生物污染、很难保持纯培养等缺点<sup>[7,8]</sup>。小球藻是少数几个能进行异养培养的藻种之一,异养的生长速率比光自养快得多<sup>[9,10]</sup>。混合营养培养也是获得高密度微藻的另一有效途径,但因其需要光照,在高密度培养时受光衰减影响。上游构建单位中国科学院遗传与发育生物学研究所采用混合营养培养转 NP-1 基因小球藻,但效率不高,因此,选择一种合适的营养模式是转 NP-1 基因小球藻实现高密度高表达培养的首要解决问题。作者主要考察了光自养、异养、混合营养 3 种营养模式对转基因小球藻生长和 NP-1 表达的影响,为优化转基因藻的培养条件及 NP-1 表达条件打下了基础。

收稿日期: 2004-08-26; 修回日期: 2005-08-20

基金项目: 国家 863 计划海洋生物技术主题资助项目 (2002AA629110)

作者简介: 韩兴梅(1978-), 女, 黑龙江鸡西人, 硕士研究生, 从事海洋生化工程研究; 李元广, 通讯联系人, E-mail: ygli@ecust.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

藻种：转 NP-1 基因小球藻 (*Chlorella*) 由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供, 具体构建方法参见文献[6], NP-1 基因是由 Ubiquitin 启动子控制, 无需外界条件诱导表达。

### 1.2 培养基

异养和混合营养培养时培养基采用 Knop 混合营养培养基, 具体成分: 葡萄糖 3 g/L, 酵母粉 3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.025 g/L,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.025 g/L,  $\text{KCl}$  0.012 g/L,  $\text{FeCl}_3$  0.001 g/L; 光自养培养时采用的培养基中不含葡萄糖和酵母粉, 其它成分与上述 Knop 混合营养培养基相同。

### 1.3 培养方法

摇瓶培养于 250 mL 摇瓶中进行, 接种量为 0.05 g/L, G418 的质量浓度为 15 mg/L, 装液量为 100 mL, 培养温度 28 °C, 摇床转速 140 r/min, 光自养和混合营养培养的光照强度为 3 000 lx。

反应器培养分别于 5、15、30 L 生物反应器(上海保兴生物设备工程有限公司制造)中进行, 装液量为 3、10、20 L, 培养温度 28 °C, 转速 200~400 r/min, 通气量分别为 3、10、20 L/min。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 生物量的测定

在一定范围内, 藻细胞质量浓度 ( $C_x$ ) 与光密度值 ( $A$ ) 呈线性关系, 根据波长 540 nm 的光密度 ( $A_{540}$ ), 由标准曲线计算:

$$C_x(\text{g/L}) = 0.431 A_{540} - 0.02 \quad (R^2 = 0.988)$$

#### 1.4.2 NP-1 的测定<sup>[2]</sup>

外源蛋白 NP-1 为胞内产物, 其含量采用抑菌圈法间接测定。将一定细胞浓度的藻液离心, 藻体用去离子水清洗 3 遍后, 根据藻体湿质量加入 3 倍的水进行超声破碎, 使每次破碎液中藻细胞浓度相同。将培养过夜的大肠杆菌均匀涂布于 LB 固体培养基上, 待表面液体消失后, 用无菌打孔器在培养基上做点样孔(孔径 13 mm), 加入 100  $\mu\text{L}$  超声破碎后的藻液, 在 37 °C 培养箱中培养 12 h, 测量抑菌圈的大小。

#### 1.4.3 葡萄糖的测定

采用葡萄糖试剂盒(卫生部上海生物制品所)。

#### 1.4.4 pH 的测定

采用离线的精密 pH 计测定(奥力龙 Model 828)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 营养模式对生长和表达量的影响

利用 Knop 混合营养培养基在摇瓶中分别进行转 NP-1 基因小球藻光自养、异养及混合营养培养。光自养培养和混合营养培养的入射光强均为 3 000 lx。

从图 1A 可以看出, 营养模式对转 NP-1 基因小球藻的生长影响很大。光自养培养时的生长速率较慢, 培养 47 h 的细胞质量浓度仅有 0.6 g/L。随着细胞量的增加, 光在藻液中的衰减加剧, 从而导致藻细胞获得的光能减少, 当光强低于饱和点时, 光合作用

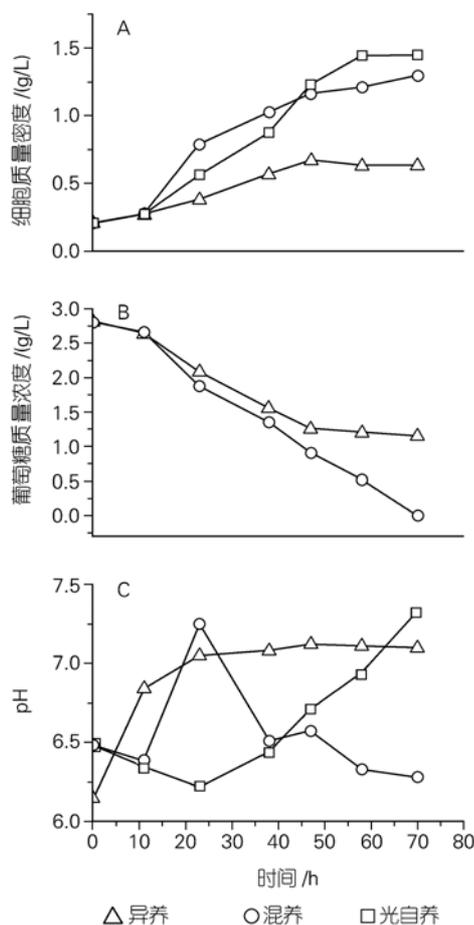


图 1 不同营养模式对转 NP-1 基因小球藻培养过程的影响

Fig.1 Effects of different culture modes on the cultivation of transgenic *Chlorella*

所提供的能量不足以维持藻细胞的生长,细胞密度不再增加<sup>[11]</sup>。38 h 之前,混合营养的生长速率大于异养培养。从 38 h 开始,异养培养的生长速率逐渐超过混合营养。到 47 h,混合营养的细胞质量浓度达到 1.17 g/L,继续培养至 70 h,转 NP-1 基因小球藻细胞质量浓度仅增加到 1.29 g/L。异养培养在 58 h 细胞质量浓度达到最大,为 1.52 g/L,生物量在随后的 12 h 内基本不变。由此可见,在 3 种不同的营养模式中,采用异养培养的转 NP-1 基因小球藻细胞质量浓度最高。

表 1 给出了光自养、混合营养和异养这 3 种营养模式下转 NP-1 基因小球藻培养过程中 NP-1 表达量的变化情况。由于采用光自养培养的转 NP-1 基因小球藻质量分数较低,无法测定培养过程中 NP-1 的表达量,因此只测定了培养 70 h 的 NP-1 表达量,此时抑菌圈直径只有 17.4 mm。与异养和混合营养相比,光自养培养的转基因小球藻不但细胞质量分数低,而且 NP-1 表达量也相对较低。从异养和混合营养培养过程中 NP-1 表达量来看,光照并没有明显增加 NP-1 的表达量。这可能是由于外源基因 NP-1 表达的蛋白是一种组成型蛋白,它的合成无需外界条件的诱导。采用凯氏定氮法测定藻体的蛋白质含量,光自养、异养、混合营养三者的蛋白质质量分数分别为 37.61%、33.07%、35.75%。异养培养的转基因藻的蛋白质含量与光自养和混合营养的相差不多,这可能是由于 Knop 混合营养培养基中有机氮源比较充足所致。

表 1 不同营养模式对转基因小球藻 NP-1 表达量的影响

Tab. 1 Effects of different culture modes on NP-1 expression of transgenic *Chlorella*

| 培养时间<br>(h) | 抑菌圈直径(mm) |      |      |
|-------------|-----------|------|------|
|             | 混合营养      | 异养   | 光自养  |
| 23          | 21.8      | 20.8 |      |
| 38          | 21.6      | 19.6 |      |
| 47          | 21.6      | 20.1 |      |
| 58          | 21.2      | 19.4 |      |
| 70          | 20.1      | 21.3 | 17.4 |

## 2.2 营养模式对葡萄糖消耗和 pH 变化的影响

图 1B 给出了转 NP-1 基因小球藻分别采用异养和混合营养培养过程中葡萄糖浓度的变化情况。由图

1B 可见,混合营养的转基因小球藻从 47 h 开始就基本不再消耗葡萄糖,最终培养液中的葡萄糖质量约 1.2 g/L。在整个培养过程中,异养培养的转基因小球藻对葡萄糖的消耗速率基本保持一致,70 h 时培养液中已不含葡萄糖。转 NP-1 基因小球藻在混合营养和异养两种营养模式下对葡萄糖的消耗表现出不同趋势,其原因可能是在混合营养中小球藻对葡萄糖的利用受到入射光强的限制。Haass 等<sup>[12]</sup>的研究表明小球藻某些藻种对葡萄糖的利用受到光的调控。低于 5W/m<sup>2</sup> 的辐照度会在翻译水平上抑制葡萄糖转运子的合成,引起葡萄糖转运子在细胞膜上迅速降解。混合营养培养过程中随着细胞密度的增加,培养液内部的光强迅速降低,光的这种调控机制使得转基因小球藻在较低的光强下只能进行光自养生长。

图 1C 给出了 3 种营养模式下转 NP-1 基因小球藻培养过程中 pH 的变化情况。由图 1C 可见,光自养的 pH 在接种之后迅速上升,到 23 h 达到最高,之后的培养过程中 pH 维持在 7.1 左右。这是因为藻细胞利用溶解在培养基中的 CO<sub>2</sub>,从而导致 pH 的上升。采用异养培养的转基因小球藻在 0~23 h 内 pH 缓慢下降;23 h 后随着细胞生长速率的加快,pH 开始上升,这是因为藻细胞利用葡萄糖进行异养代谢,所产生的生理酸性物质的量少于其在培养液中产生的碱性物质所致。采用混合营养培养的转基因小球藻接种后 pH 也有缓慢的下降,12 h 后随着藻细胞生长速率的加快,pH 迅速上升,23 h 达到最大 7.25;之后随着藻细胞生长速率的降低,pH 开始下降,这说明混合营养培养液的 pH 与藻细胞的生长速率密切相关。

## 2.3 光在藻液中的衰减规律

前述研究表明,混合营养和异养均可作为转 NP-1 基因小球藻培养时的营养模式,但混合营养由于在培养过程中涉及光照的问题且光照对转基因小球藻的生长和葡萄糖的利用有着重要影响,因此研究光在混合营养培养液中的衰减规律对于确定转 NP-1 基因小球藻最适的营养模式是十分必要的。

由于光衰减与入射光强大小无关<sup>[13]</sup>,因此研究光在藻液中的衰减情况可以在固定入射光强下进行。在入射光强为 36 000 lx 条件下,测定了光在混合营养培养的不同质量浓度的藻液(0.59~4.36 g/L)中的衰减情况(图 2 中的散点)。曲线拟合结果表明光在转基因小球藻混合营养培养液中的衰减过程可用双曲线模型<sup>[14]</sup>描述,见下式和图 2 中的曲线。

$$A_x = \frac{A_{\max} X}{B + X}$$

式中  $A_x$  表示光衰减系数,  $X$  表示细胞质量浓度, 参数  $A_{\max} = 11.87 \times 10^2 \text{ m}^{-1}$ ,  $B = 10.22 \text{ kg/m}^3$ 。

从图 2 可见, 随着藻细胞质量浓度的增加, 同一光程处的光强迅速减小; 在相同的藻细胞质量浓度下, 随着光程的增加, 光强呈指数衰减。因此, 光在培养液中的迅速衰减使得采用混合营养培养转 NP-1 基因小球藻的放大难以实现。

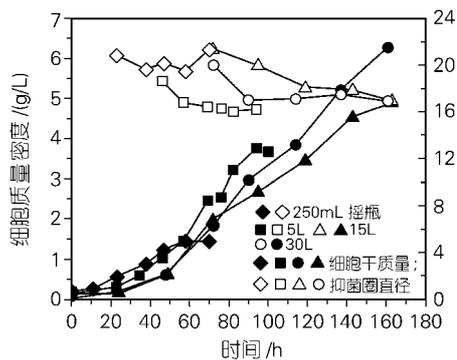


图 2 不同质量浓度转基因小球藻混合营养培养液中的白光衰减 (散点为实测值, 实线为计算值)

Fig.2 Daylight attenuation inside transgenic *Chlorella* suspensions with different concentrations mixotrophic cell concentrations (Symbol: experimental result; Solid line: calculated result)

## 2.4 生物反应器异养培养

图 3 给出了转 NP-1 基因小球藻在 250 mL 摇瓶、5、15、30L 生物反应器上利用 Knop 混合营养培养基进行异养培养的逐级放大实验结果(摇瓶培养过程未补料, 生物反应器培养过程进行了全培养基的补加)。

由图 3 可见, 转 NP-1 基因小球藻在 250 mL 摇瓶, 5、15、30L 生物反应器中异养培养的细胞质量浓度分别为 1.52, 3.67, 4.87, 6.39g/L。这说明转 NP-1 基因小球藻异养培养过程易于放大, 采用异养技术在无光照限制的条件下通过补料工艺可以使转 NP-1 基因小球藻的质量浓度大幅度提高, 从而为该转基因藻的大规模培养奠定了基础。

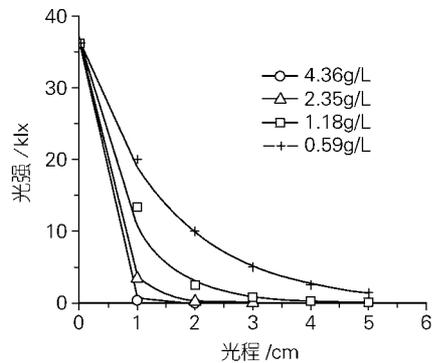


图 3 转 NP-1 基因小球藻异养培养过程放大结果

Fig.3 Heterotrophic culture results of transgenic *Chlorella*

## 3 结论

综合考虑转 NP-1 基因小球藻光自养、异养、混合营养培养过程的细胞生长、NP-1 表达量、蛋白质含量、葡萄糖消耗以及过程放大的难易等方面的因素, 确定了异养是实现转 NP-1 基因小球藻高密度培养的最佳营养模式。本研究结果为优化转 NP-1 基因小球藻的培养工艺奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 陈颖, 葛毅强, 张利明. 哺乳动物防御素的研究进展及其应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(1): 17-21.
- [2] 王义琴, 陈颖, 白琴华, 等. 以小球藻为载体生产兔防御素的研究[J]. 高技术通讯, 2001, 11(9): 1-5.
- [3] Hancock R W, Robert L. Cationic peptides: a new source of antibiotics[J]. *Tibtech*, 1998, 16:82-88.
- [4] Piers K L, Brown M H, Hancock R E W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria [J]. *Gene*, 1993, 134: 7-13.
- [5] 徐志南, 彭力, 方向明, 等. -人防御素-2 在大肠杆菌中的重组表达及优化[J]. 精细与专用化学品, 2002 (增刊): 39-42.
- [6] Chen Y, Wang Y Q, Sun Y R. *et al.* Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells[J]. *Curr Genet*, 2001, 39: 365-370.
- [7] Shi X M, Liu H J, Zhang X W, *et al.* Production of biomass

- and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures[J]. **Process Biochemistry**, 1999, 34: 341-347.
- [8] Liang S Z, Zhu M J, Meng H H, *et al.* Heterotrophic mass Cultures of *Chlorella vulgaris* with glucose feeding in fermenters[J]. 华南理工大学学报, 2000, 12(28): 66-70.
- [9] Liu S M, Chen F, Liang S Z. Research on the heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*[J]. 华南理工大学学报, 1999, 27(4): 111-115.
- [10] Chen F, Michael R J. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1991, 3: 203-209.
- [11] Michael A B, Lesley J B. Micro-algal biotechnology [M]. London: **Cambridge University Press**, 1986. 347.
- [12] Haass D, Tanner W. Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*[J]. **Plant Physiol**, 1974, 53: 14-20.
- [13] Pirt S J. The photosynthetic efficiency of *Chlorella* biomass growth with reference to solar energy utilization[J]. **J Chem Tech and Biotechnol**, 1980, 30: 25-34.
- [14] Fernandez F G A, Camacho F G, Perez J A S, *et al.* A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1997, 55: 701-714.

## Effect of culture modes on the growth of transgenic *Chlorella* and rabbit defensin expression

HAN Xing-mei<sup>1</sup>, LI Yuan-guang<sup>1</sup>, WEI Xiao-dong<sup>1</sup>, LI Xing-wu<sup>1</sup>, SUN Yong-ru<sup>2</sup>, WANG Yi-qin<sup>2</sup>

(1.Institute of Marine Bioprocess Engineering, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237,China; 2.Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101,China)

Received: Aug., 26, 2004

**Key word** : Transgenic *Chlorella*; rabbit defensin; culture modes; expression

**Abstract** : The influences of culture modes including autotrophy, heterotrophy, mixotrophy on process characteristics of transgenic *Chlorella* with rabbit defensin (NP-1) gene in the 250mL flasks were investigated including cell growth, NP-1 expression, protein contents, pH, glucose consumption and light attenuation. The results showed that heterotrophy was the optimal culture mode for the transgenic *Chlorella* with NP-1 gene. Based on these results, transgenic *Chlorella* was cultured in bioreactors of 5, 15, 30L and the corresponding cell densities were 3.67, 4.87, 6.39g/L, respectively.

(本文编辑: 张培新)