

## 转兔防御素基因小球藻异养培养的培养基优化研究

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

(1 生物反应器工程国家重点实验室, 华东理工大学海洋生化工程研究所, 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:** 在氮源种类筛选的基础上, 采用 Plackett-Burman 实验设计并结合单因素实验对转兔防御素基因小球藻异养培养的培养基进行了优化。实验结果表明, 采用优化后的 Knop 异养培养基在 250mL 摇瓶中进行异养培养, 藻细胞密度从优化前的 1.5g/L 提高到优化后的 5.11g/L; 摇瓶和 5L 生物反应器异养培养表明, Knop 异养培养基中藻细胞浓度分别为优化前培养基的 3.39 倍和 3.17 倍, 而兔防御素(NP-1)表达能力基本不变。

**关键词:** 转基因小球藻; 兔防御素; 异养培养; 培养基优化

**中图分类号:** Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2006)05-0547-06

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, 通过化学合成法和直接提取法可获得防御素, 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 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<sup>[4]</sup>; 徐志南等通过融合蛋白途径在大肠杆菌中表达  $\beta$ -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<sup>[5]</sup>。Chen 等用电激法将兔防御素基因成功地导入小球藻细胞中, 体外离体抑菌实验证明兔防御素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<sup>[6]</sup>, 因此利用转兔防御素基因小球藻有望规模制备 NP-1。

转兔防御素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, 影响微生物发酵的因素很多, 在菌种稳定的情况下, 发酵培养基是一个很重要的影响因素。转兔防御素基因小球

藻的构建单位利用 Knop 混合营养培养基在摇瓶中进行混合营养培养, 但细胞量低, 因此该培养基不适合转基因小球藻的异养生长, 对 Knop 混合营养培养基进行优化势在必行。目前, 有关转兔防御素基因小球藻培养基优化的研究未见报道。本文通过摇瓶培养, 以 Knop 混合营养培养基为初始培养基, 采用异养培养的方式利用 Plackett-Burman 实验设计和单因素实验对转兔防御素基因小球藻培养基进行优化, 为生物反应器中转兔防御素基因小球藻的高密度异养培养奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 转兔防御素基因小球藻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], 兔防御素基因是由 Ubiquitin 启动子控制, 无需外界条件诱导。

**1.2 培养方法** 摇瓶培养于 250mL 摇瓶中进行, 接种量为 5%, 装液量为 100mL, 培养基中添加的 G418 浓度为 15mg/L, 培养温度 28℃, 摇床转速 140r/min。反应器培养于 5L 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 3L, 培养温度 28℃, 转速 200r/min, 通气量 3L/min。

**1.3 培养基** 共两种培养基, 具体成分见表 1。

收稿日期: 2005-08-03; 修订日期: 2006-01-20

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, 从事海洋生化工程研究

表 1 培养基组成  
Tab 1 Composition of medium

成分(g/L)	Knop 混合营养培养基	Knop 异养培养基
葡萄糖	3	15
酵母粉	3	9
KNO <sub>3</sub>	0	0.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.025	0.1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.1	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.025	0.05
KCl	0.012	0.06
FeCl <sub>3</sub>	0.001	0.01
微量元素		
溶液(mL/L)	0	1

表中的微量元素溶液配方为: H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0.061g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.287g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.169g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01235g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.00249g, 水 1000mL。

1.4 生物量的测定 在一定范围内,藻细胞浓度(C<sub>X</sub>)与 OD 值呈线性关系,根据波长 540nm 的光密度(OD<sub>540</sub>),由标准曲线计算: C<sub>X</sub>(g/L)=0.431OD<sub>540</sub>—0.02(R<sup>2</sup>=0.988)。

1.5 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 次后,根据藻体湿重加入 3 倍体积的水进行超声破碎,每次破碎液的藻细胞浓度相同。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 13mm),加入 100μL 超声破碎后的藻液,在 37℃培养箱中培养 12h,测量抑菌圈的大小。

2 结果与讨论

2.1 氮源种类对转基因藻生长的影响

小球藻能够利用多种形式的氮源,包括硝酸盐、铵盐、尿素、氨基酸、酵母粉等无机和有机氮源<sup>[7]</sup>,不同的藻种其最适的氮源也不同。因此首先考察了氮源种类对转基因小球藻生长的影响。

图 1 给出了分别采用硝酸钾、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、尿素、甘氨酸、酵母粉为氮源(浓度均为 3g/L)转免防御素基因小球藻异养生长情况(图 1A)及 pH 变化曲线(图 1B)。由图 1A 可见,在所选用的 7 种氮源中,转免防御素基因小球藻的生长差别很大。以氯化铵、硝酸铵、硫酸铵、甘氨酸为唯一氮源

时,转基因藻几乎不能生长;以硝酸钾和尿素为氮源时,转基因小球藻生长缓慢,培养 70h,细胞密度仅从接种时的 0.05g/L 增加到 0.25g/L 左右,平均生长速率不足 3mg/L/h。而以酵母粉为唯一氮源的转基因藻生长最快,培养到 70h 时,细胞密度已达 1.12g/L,是硝酸钾和尿素的 4.48 倍。由此可见,当采用单一氮源异养培养转免防御素基因小球藻时,酵母粉是最佳氮源。

从图 1B 可以看出,在转免防御素基因小球藻异养培养过程中,培养液的 pH 会发生不同程度的变化,从而影响藻细胞的生长。硝酸钾被转基因小球藻利用后,培养液的 pH 逐渐上升;尿素被转基因小球藻利用后,培养液的 pH 逐渐下降;利用甘氨酸和酵母粉培养时的 pH 变化趋势基本一致,接种后 pH 略微下降,之后缓慢上升;氯化铵、硝酸铵、硫酸铵被转基因小球藻利用后, pH 均呈下降趋势。这是因为铵盐是一种生理酸性盐,小球藻细胞吸收 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 后,会释放出 H<sup>+</sup>,导致培养液 pH 迅速下降(pH<4),直至超过小球藻所能耐受的范围,从而抑制自身的生长。在各种氮源中,小球藻吸收铵盐所需能量最少,对铵盐的利用最快,但铵盐高温灭菌容易分解,铵盐的利用会导致 pH 急剧下降,其指数生长期短,细胞密度低,故很少利用铵盐作为小球藻生长的氮源<sup>[7]</sup>。

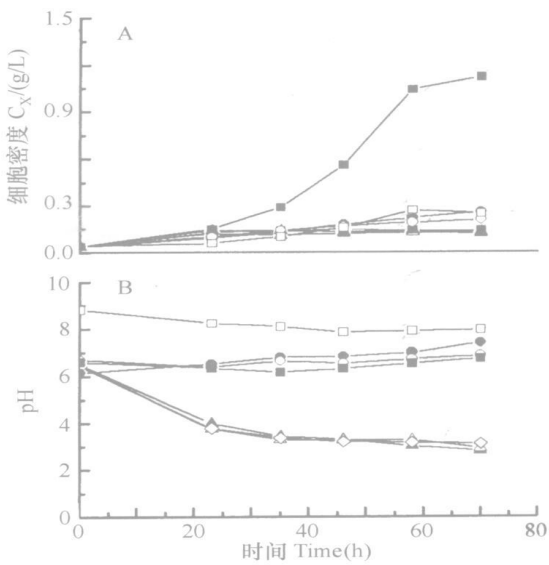


图 1 不同氮源对转免防御素基因小球藻异养培养过程的影响

Fig.1 Effects of different nitrogen sources on the heterotrophic cultivation of transgenic *Chlorella*  
■ 酵母粉 □ CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> △ NH<sub>4</sub>Cl ▲ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
○ 甘氨酸 ● KNO<sub>3</sub> ◇ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

2.2 Plackett-Burman 实验设计

Plackett-Burman 实验设计是一种二水平的部分因子设计方法, 通过  $n$  次实验就可以对  $n-1$  个变量进行考察。与全因子实验相比, Plackett-Burman 实验设计在不丢掉主要信息的前提下, 能大大减少实验次数<sup>[8]</sup>。实验设计中, 通过 8 次实验考察了 7 个独立变量(表 2 和表 3), 所有的实验重复 3 次, 培养时间为 87h。

表 2 Plackett-Burman 实验设计中各营养成分的浓度(单位:mg/L)  
Tab.2 The level of nutrients in PB design(Unit: mg/L)

Variable	Symbol	- level	+ level
酵母粉	A	1500	9000
葡萄糖	B	1500	15000
FeCl <sub>3</sub>	C	1	10
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	D	50	200
MgSO <sub>4</sub>	E	12.5	50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	F	12.5	100
KCl	G	6	60

表 3 Plackett-Burman 实验设计及其结果  
Tab.3 Plackett-Burman experiment design and results

Num	Factor							C <sub>x</sub> (g/L)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	-	-	-	+	+	+	-	0.612
2	+	-	-	-	-	+	+	0.748
3	-	+	-	-	+	-	+	0.638
4	+	+	-	+	-	-	-	1.956
5	-	-	+	+	-	-	+	0.747
6	+	-	+	-	+	-	-	0.839
7	-	+	+	-	-	+	-	0.617
8	+	+	+	+	+	+	+	2.759

从表 3 可以看出转免防御素基因小球藻采用 8 号培养基培养 87h 的细胞密度为 2.76g/L。从图 1 可以看出, 采用 Knop 混合营养培养基培养的转基因小球藻的细胞密度为 1.12g/L。由此可见, 8 号培养基有利于藻细胞的生长。因此培养基的进一步优化工作将以 8 号培养基为基础。

2.3 混合氮源对转免防御素基因小球藻生长的影响

目前, 在小球藻的异养培养中, 硝酸钾被认为是一种较常用的氮源<sup>[9-11]</sup>, 但同时采用硝酸钾和有机氮源异养培养小球藻的研究未见报道。因此, 在 8

号培养基中添加不同浓度的硝酸钾, 研究硝酸钾和酵母粉这两种混合氮源对转基因小球藻生长和 NP-1 表达的影响。硝酸钾的添加浓度为 3—9g/L, 对照不含硝酸钾。

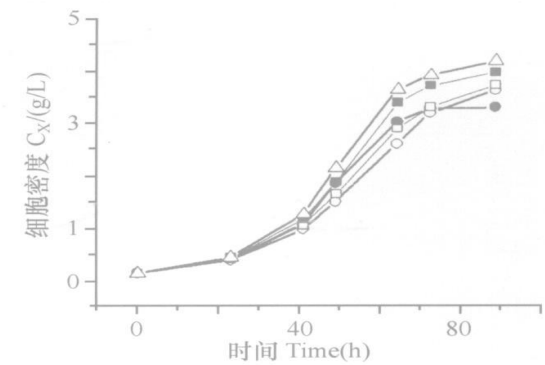


图 2 添加不同浓度的 KNO<sub>3</sub> 对转免防御素基因小球藻生长的影响  
Fig.2 Effects of different initial KNO<sub>3</sub> concentrations on the growth of transgenic *Chlorella*  
△3g/L ▲5g/L ◇7g/L ●9g/L 对照

从图 2 可以看出, 添加硝酸钾有利于转免防御素基因小球藻的生长, 而且在实验范围内 (3—9g/L), 低浓度的硝酸钾有利于转基因小球藻的生长。培养到 88h, 按照硝酸钾浓度由低到高的顺序, 对应的藻细胞密度分别是 4.19g/L、4.17g/L、3.95g/L、3.72 g/L、3.61g/L。由此可见, 使用混合氮源的效果均不同程度的要好于单一氮源。小球藻不能直接利用 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 中的氮, 而是首先在硝酸盐还原酶的作用下将其还原为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 再由亚硝酸根还原酶将其彻底还原为 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 才能被小球藻吸收利用, 这一过程需耗用一定的能量。小球藻在吸收硝酸盐过程中伴随质子共转运 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> Symport) 使得培养基中的质子浓度降低, 培养液的 pH 值上升, 这有利于小球藻的生长<sup>[11]</sup>。从图 1B 中看出, 转 NP-1 基因小球藻利用硝酸钾后, 培养液的 pH 值逐渐上升。

2.4 微量元素对转免防御素基因小球藻生长的影响

研究发现, 藻类需要的营养液在组分上同高等植物的营养液没有多大的差别<sup>[12]</sup>。唯一特殊的是藻类对钙的需要量非常微小。绿藻生长的必需无机元素是: 磷、钾、镁、钙、硫、铁、铜、锰、锌。除此之外, 氯对绿藻的自养生长是必需的; 钼在硝酸盐的还原过程中也起着重要作用, 因此, 它也常常被包括在藻类的微量元素配方之中。由此可见, 微量元素是小球藻生长不可缺少的元素之一。

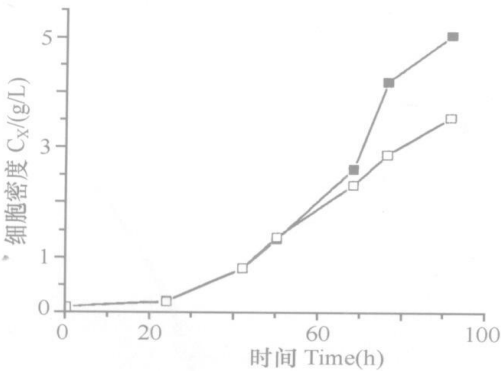


图3 微量元素对转兔防御素基因小球藻生长的影响

Fig.3 Effects of trace element on the growth of transgenic *Chlorella*

□不添加微量元素 ■添加微量元素

从图3可以看出,当细胞密度较低时,培养基中添加微量元素与否不影响转基因小球藻的生长,68h后微量元素逐渐表现出对转NP-1基因小球藻生长的促进作用。培养到91h,藻细胞密度达到5.05g/L,而对照的细胞密度仅为3.55g/L。由此可见,添加微量元素有利于转基因小球藻的生长。

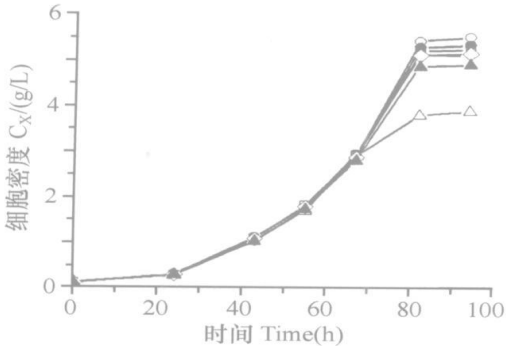


图4 不同初始硝酸钾浓度对转基因小球藻生长的影响

Fig.4 Effects of different initial  $\text{KNO}_3$  concentration on the growth of transgenic *Chlorella*

△0.1g/L ▲0.5g/L ◇0.9g/L ●1.3g/L  
○1.7g/L □2.1g/L

2.5 降低硝酸钾浓度对生长和NP-1表达量的影响

由图2可以看出,培养基中硝酸钾的添加量在3—9g/L时,低浓度的硝酸钾有利于转基因小球藻的生长。因此有必要考察更低浓度范围的初始硝酸钾对转兔防御素基因小球藻异养生长的影响。硝酸钾的添加浓度为0.1—2.1g/L。

从图4可以看出,当细胞密度较低时,不同浓度的硝酸钾对转兔防御素基因小球藻的生长影响不大。培养到70h后,转基因小球藻的细胞密度表现

出一定的差别。浓度为0.1g/L的硝酸钾的细胞密度最低,细胞密度仅为3.78g/L,其次是0.5g/L的硝酸钾,细胞密度为4.86g/L;其他的细胞量分别为5.11g/L、5.28g/L、5.41g/L、5.21g/L。由此可见初始硝酸钾的浓度在0.9—2.1g/L时,更适合转兔防御素基因小球藻的生长。

表4 添加不同浓度的硝酸钾对转基因小球藻中NP-1表达量的影响

Tab.4 Effects of different initial $\text{KNO}_3$ concentration on NP-1 expression in transgenic <i>Chlorella</i>						
$\text{KNO}_3(\text{g/L})$	0.1	0.5	0.9	1.3	1.7	2.1
抑菌圈(mm)	22	22	21	17	18	18

由表4可见,当硝酸钾浓度在0.1—0.9g/L时,抑菌圈直径变化较小,当硝酸钾浓度超过0.9g/L时,抑菌圈直径从21mm下降到17mm左右。因此从转基因小球藻的细胞密度和NP-1表达量来看,硝酸钾的添加浓度以0.9g/L为宜。

2.6 培养基优化前后的对比

通过氮源种类筛选、Plackett-Buman实验以及单因素优化得到了Knop异养培养基(表1)。为进一步确证通过上述研究所得到的Knop异养培养基较Knop混合营养培养基是否更适合于转兔防御素基因小球藻的异养培养,有必要在摇瓶和生物反应器中对这两种培养基的培养结果加以比较。

2.6.1 摇瓶对比 由图5可见,不同的培养基对转兔防御素基因小球藻的生长影响很大。从12h开始,转基因小球藻在Knop异养培养基中的生长速率要明显高于Knop混合营养培养基。培养到92h,转基因小球藻在Knop异养培养基中的细胞密度已达5.09g/L,为Knop混合营养培养基中细胞密度1.5g/L的3.39倍。由此可见,Knop异养培养基明显有利于转兔防御素基因小球藻的生长。

Knop异养培养基和Knop混合营养培养基对转兔防御素基因小球藻的产物表达影响不大。整个培养过程中抑菌圈的直径变化也不大,基本维持在21mm左右。

由此可见,与Knop混合营养培养基相比,采用Knop异养培养基培养转基因小球藻,在产物NP-1表达量基本不变的情况下,大大提高了细胞密度,达到了培养基优化的目的。

2.6.2 反应器对比 转兔防御素基因小球藻高密度大规模培养必须在生物反应器中进行。因此,有必要在生物反应器中进一步比较Knop异养培养基

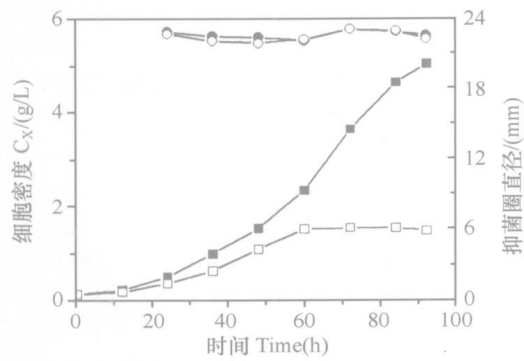


图5 培养基优化前后对转兔防御素基因小球藻生长的影响

Fig.5 Effects of different culture medium on the growth of transgenic *Chlorella*

□ ■ 细胞密度 ○ ● 抑菌圈

和 Knop 混合营养培养基的优劣。

由图 6 可见, 转基因小球藻在 Knop 异养培养基中培养 84h 的细胞密度和平均生长速率分别为 5.01g/L 和 0.0596g/L/h, 而转基因小球藻在 Knop 混合营养培养基中培养 60h 的细胞密度和平均生长速率分别为 1.58g/L 和 0.0263g/L/h, 前者的细胞密度和平均生长速率分别为后者的 3.17 倍和 2.27 倍。由图 6 中的抑菌圈直径变化曲线可以看出, 转基因小球藻在这两种培养基中培养时的 NP-1 表达量基本不变。

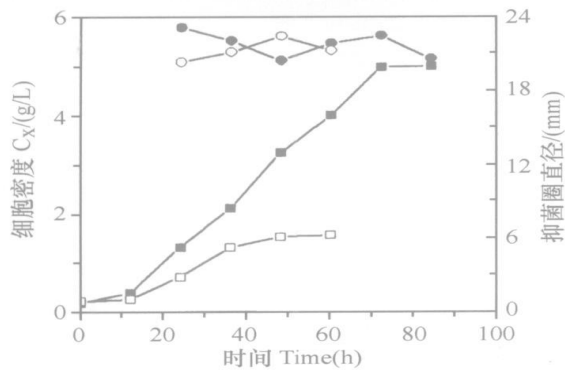


图6 5L 生物反应器中转基因小球藻培养在优化前后培养基中生长与 NP-1 表达能力的变化(□ ○: Knop 混合营养培养基; ■ ●: Knop 异养培养基)

Fig.6 Time profiles of cell growth and NP-1 expression capability of transgenic *Chlorella* with mixotrophic Knop medium (open symbols) and optimized medium (solid symbols) in 5L reactor

□ ■ 细胞密度 ○ ● 抑菌圈

上述结果说明, 与 Knop 混合营养培养基相比, Knop 异养培养基不仅适合于转兔防御素基因小球藻在摇瓶中的异养培养, 同时也适合于在生物反应器中的异养培养。

参考文献:

[ 1 ] Chen Y, Ge Y Q, Zhang L M. Advances in the research and application of mammal defensin[ J]. *Prog. Biochem. Biophys.* 2001, 28(1): 17—21 [ 陈颖, 葛毅强, 张利明. 哺乳动物防御素的研究进展及其应用. 生物化学与生物物理进展 2001, 28(1): 17—21]

[ 2 ] Wang Y Q, Chen Y, Bai Q H, et al. Using transgenic *Chlorella el-lipsoidea* as bioreactor to produce rabbit defensin[ J]. *High Technology Letters*, 2001, 11(9): 1—5 [ 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. 高技术通讯, 2001, 11(9): 1—5]

[ 3 ] Hancock R W, Robert L. Cationic peptides: a new source of anti-biotics[ J]. *Tibtech*, 1998, 16: 82—88

[ 4 ] Pies K L, Brown M H, Robert E. W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria[ J]. *Gene*, 1993, 134: 7—13

[ 5 ] Xu Z N, Peng L, Fang X M, et al. Recombinant expression and optimization of  $\beta$ -Human defensin in *E. coli*[ R]. Hangzhou: The Tenth Conference of the National Biochemistry and Bioengineering, 39—42 [ 徐志南, 彭力, 方向明, 等.  $\beta$ -人防御素 2 在大肠杆菌中的重组表达及优化. 杭州: 全国第十届生物化工会议, 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 ] Chen F, Jiang Y. Microalgae biotechnology[ M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999, 61—62 [ 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 61—62]

[ 8 ] Haaland P D. Experimental design in biotechnology[ M]. New York and Basel: Marcel Dekker, INC, 1989

[ 9 ] Liu S M, Meng H H, Liang S Z, et al. High density heterotrophic culture of *Chlorella Vulgaris* in bioreactor[ J]. *Journal of South China University of Technology*, 2000, 28(2): 21—27 [ 刘世名, 孟海华, 梁世中, 等. 生物反应器高密度异养培养小球藻. 华南理工大学学报, 2000, 28(2): 21—27]

[ 10 ] Liu X M, Wang J F, Yu R Q, et al. The variety of heterotrophic *Chlorella* biomass and chlorophyll content in the different nitrogen level [ J]. *Plant Physiology Communication*, 1999, 35(3): 198—201 [ 刘学铭, 王菊芳, 余若黔, 等. 不同氮水平下异养小球藻生物量和叶绿素含量的变化. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 198—201]

[ 11 ] McAuley P. Nitrogen limitation and amino-acid metabolism of *Chlorella* symbiotic with green hydra[ J]. *Planta*, 1987, 171: 532—538

[ 12 ] Gerloff G C. The comparative nutrition of several green and blue algae [ J]. *Physiologia Plantarum*, 1968, 21: 369—377

OPTIMIZATION OF HETEROTROPHIC MEDIUM FOR CULTURING TRANSGENIC  
*CHLORELLA* WITH RABBIT DEFENSIN GENE

HAN Xing-Mei<sup>1</sup>, LI Yuan-Guang<sup>1</sup>, WEI Xiao-Dong<sup>1</sup>, SUN Yong-Ru<sup>2</sup> and WANG Yi-Qin<sup>2</sup>

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

**Abstract:** Based on the experiment of screening nitrogen sources, mixotrophic Knop medium was optimized by using of Plackett-Buman experimental design and the one-at-a-time strategy and the cell density of transgenic *Chlorella* was improved from 1.12g/L to 5.11g/L in 250mL flasks. Using the optimized medium, the cell density of the transgenic *Chlorella* in 250 mL flasks and 5L bioreactor were 3.39 and 3.17 fold respectively what can be obtained in the mixotrophic Knop medium while the expression capabilities of NP-1 were kept unchanged.

**Key words:** Transgenic *Chlorella*; Rabbit defensin; Cell density; Expression