

# 毕赤酵母优化表达外源蛋白策略

余占桥 马青山 赵龙妹 张日俊\*

(中国农业大学饲料生物技术实验室 动物营养学国家重点实验室 北京 100094)

**摘要:** 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是一种异源蛋白表达的理想系统,但目前并非所有的外源蛋白都能在毕赤酵母中成功高效表达,不同的蛋白表现为不同表达水平、生物活性及稳定性。从遗传因素和表达条件综述了外源蛋白在毕赤酵母中的优化表达策略。

**关键词:** 毕赤酵母, 外源蛋白, 优化表达

## Strategies for Optimization Expression of Heterologous Protein in *Pichia pastoris*

YU Zhan-Qiao MA Qing-Shan ZHAO Long-Mei ZHANG Ri-Jun\*

(Laboratory of Feed Biotechnology, State Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** *Pichia pastoris* is easy to genetically manipulate and can be grown to high cell densities, at the same time, *P. pastoris* is a eukaryote, and thereby has the potential for producing soluble, correctly folded recombinant protein with high yield, so the *P. pastoris* expression system is an ideal choice for the production of various heterologous proteins. However, at present not all the heterologous proteins can be successfully and efficiently expressed in *P. pastoris*, as a result, different proteins present different yield levels, bioactivity and stability. Here strategies for reducing proteolytic degradation and improving production of the expressed heterologous proteins are briefly summarized in terms of genetically factors and cultivation level.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, Heterologous protein, Optimization expression

随着分子生物学的快速发展,外源蛋白已经成功在大肠杆菌、昆虫细胞、哺乳类细胞中表达,但这些表达系统同毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统相比存在着许多缺点和不足。由于毕赤酵母生长期短,遗传操作方便,具备真核细胞蛋白合成通路,能够进行真核修饰(糖基化、二硫键的形成、蛋白加工等),同时,毕赤酵母能够以简单培养基进行高密度生长,即使在大规模发酵中,重组元件遗传稳定,

目的蛋白易纯化。因此,近年来毕赤酵母已成为外源蛋白表达的优选系统。

但目前并非所有外源蛋白都能在毕赤酵母中成功高效表达。因为毕赤酵母自身的遗传背景会影响外源基因的转录、翻译、分泌通路等,酵母自身分泌的胞外酶、细胞结合酶以及细胞裂解后释放的胞内酶等都可能致外源蛋白降解,最终,不同的蛋白表现为不同表达水平、生物活性和稳定性。不过,

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A208); 国家自然科学基金项目(No. 30972124)

\* 通讯作者: Tel: 86-10-62731208; E-mail: zhangrj621@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-01-14; 接受日期: 2010-03-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

许多研究表明通过基因、蛋白、细胞、培养水平的调节可以减少甚至消除目标蛋白降解,提高蛋白表达产量。本文结合自身的研究体会对毕赤酵母优化表达异源蛋白的策略从遗传因素和外源表达条件两个方面进行了系统总结。

## 1 遗传因素

外源蛋白在毕赤酵母中表达时,密码子优化与 AT 比例调整、启动子及菌株表型选择、信号序列设计、多拷贝筛选、野生菌基因突变等遗传操作是提高蛋白产量的有效措施。

### 1.1 序列组成与密码子优化

不同物种对遗传密码子具有一定的偏好性,当酵母表达非自身基因时,某些稀有密码子的出现可能限制细胞中氨酰 tRNA 对氨基酸的正常运转而导致翻译的提前终止,此外,不恰当的 AT 比例及分布也会明显降低表达水平<sup>[1]</sup>。在毕赤酵母中表达 HIV-1 包被蛋白时,相应的 mRNA 被提前终止,终止位点与酵母保守序列相似,通过终止位点序列调整及提高 GC 含量与密码子优化后,获得了全长 mRNA。表达抗 ErbB2 单链抗体时,通过保持 GC 比例及密码子优化产量提高了 3–5 倍<sup>[2]</sup>。利用毕赤酵母表达抗 T 细胞免疫毒素时,由于未经优化的 cDNA 序列富含 AT 碱基而导致了转录的提前终止,最终通过密码子优化成功表达出目的蛋白<sup>[3]</sup>。大量研究表明以酵母为宿主异源表达蛋白时,密码子优化可显著提高蛋白产量<sup>[4–5]</sup>,但也并非绝对有效<sup>[6]</sup>。Xu 等用毕赤酵母表达重组的木聚糖酶时发现,通过采用酵母所偏爱的密码子可显著提高表达量,并且酶的活性同未经过重组的木聚糖酶相比没有差异<sup>[7]</sup>。因此,在表达外源蛋白时,通过使用毕赤酵母偏爱的 19–25 个密码子、合理控制 A + T 的含量及分布将可能明显提高目的蛋白产量。

### 1.2 毕赤酵母表达载体选择

毕赤酵母自身体内没有稳定附加质粒,因此通常利用“穿梭”整合型质粒做为表达载体。常见的胞内表达载体有 pPIC3、pPICZA、pPSC3k、pHIL-D2、pAO815 等,分泌型表达载体有 pPIC9、pPIC9K、pHIL-S1p、pACO815、YAM7SP6、pPICZ $\alpha$ 、pGAPZ $\alpha$  系列等。此类质粒一般包含易于在大肠杆菌中扩增的原核启动子,同时含有 5'AOX1 启动子、3'AOX1

终止子、多克隆位点、抗性筛选标计、线性化酶切位点、C 末端聚组氨酸标签,以便于外源基因通过质粒整合到酵母基因组并进行筛选、表达,也有利于外源蛋白的检测和纯化<sup>[8]</sup>。

总体来讲,表达载体的选择首先应该考虑异源蛋白需要胞内表达还是胞外表达,如果需要胞内表达则可选用 pPIC3、pPICZA、pPSC3k、pGAPZ 等胞内表达载体,如果需要胞外表达可选择 pHIL-S1p、pACO815、YAM7SP6、pPICZ $\alpha$ 、pGAPZ $\alpha$  等分泌型表达载体,其次根据启动子是否需要诱导可选择诱导型质粒如 pPCZ、pPIC9k、pPIC6 等或组成型表达质粒如 pGAPZ、pAOS1 等,但特定蛋白更适合哪种质粒尚无定论,需试验证明。最后,由于第一代质粒(pHIL-D2、pPIC-9 等)碱基数较多,不便于遗传操作及转化子的稳定性,且传统的 his4 基因不利于高拷贝筛选,而随着 Zeocin 抗性的 Shble 基因使用,具有 Zeocin 抗性系列质粒如: pPICZ、pGAPZ 等不仅碱基数大大减少(3.3–3.6 kb),且易于根据 Zeocin 浓度进行高拷贝筛选,所以 Zeocin 抗性系列质粒在科研中应用越来越广泛。

### 1.3 不同启动子的选择及其特点

目前,常见的启动子有 AOX1、AOX2、GAP、FLDI、ICLI 等,其中 AOX1 与 GAP 是研究中使用最多的启动子。

现在还不能很好地比较 AOX1 与 GAP 在目标蛋白产量方面哪个更有优势<sup>[9–10]</sup>,以 AOX1 为启动子表达细胞毒性蛋白具有明显优势,这可能也是目前未见以 GAP 启动子进行胞外表达抗菌肽报道的原因。因为蛋白表达时可先培养得到高密度细胞,再进行诱导,大大减少了细胞生长的抑制作用,提高目的蛋白产量。Kim 等研究发现,用毕赤酵母表达灰盖鬼伞过氧化物酶时,AOX1 启动子表达目的蛋白的活性是 GAP 启动子的 5 倍<sup>[11]</sup>。但使用 AOX1 启动子也有许多不利因素,因为甲醇运输储存存在危险,甲醇原料中污染物可能进入蛋白产品,碳源转换时间点难以选择,甲醇监控困难,因此,使用组成型启动子 GAP 可很好的避免这些问题<sup>[12]</sup>。

某些研究者曾经认为 GAP 作为组成型启动子,外源蛋白的产生会对细胞产生毒性,但后来在研究中发现根本不存在此类毒效应,而且 GAP 启动子在蛋白表达中不需诱导,操作更加方便,产量通常与

AOX1 相当,甚至更高,Döring 等分别用启动子 AOX1 与 GAP 来生产兔肾肽转运蛋白(rPEPT1)和人的小肠肽转运蛋白(hPEPT2),结果前者得到的两种蛋白均比后者高 5 倍<sup>[13]</sup>,因此,近几年研究者更偏好使用 GAP 启动子<sup>[8]</sup>。也有研究同时使用两种启动子,结果发现目标蛋白产量能够提高一倍<sup>[14]</sup>。

近些年又开发了一些新的启动子如 ICLI、PFLD1 等。ICLI 是最近开发的一个替代性启动子,但其实用性还有待考证<sup>[15]</sup>。另外,PFLD1(依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶启动子)是以甲醇或甲胺为单一碳源的诱导型启动子,也是一种高水平表达的启动子<sup>[16]</sup>。总之,合理选择与设计启动子是提高蛋白产量的有效途径,表达对细胞没有毒性的蛋白选择 GAP 启动子比较有优势,因为 GAP 启动子在发酵时不需要甲醇诱导、更换碳源,工艺简单。表达对细胞有毒性的蛋白,如抗菌肽等,则更适合使用 AOX1 作为启动子。

## 1.4 信号肽设计

**1.4.1 信号肽的设计原则:**信号肽能够引导目的蛋白分泌到胞外,更加方便蛋白的分离纯化。当蛋白分泌到胞外时,目的蛋白可占胞外蛋白的 10%–30%,而胞内表达时,目的蛋白通常只占细胞蛋白的 1%<sup>[17]</sup>。但对于一种蛋白,最终应以胞外形式表达还是胞内形式表达,主要决定于目的蛋白在天然细胞中的存在方式,因为胞内外环境差异较大,若异源蛋白是以胞外形式存在,则应设计分泌表达,若以胞内形式存在,则应设计胞内表达。

**1.4.2 信号肽的设计方法:**分泌表达中通常使用外源蛋白自身的信号肽或酵母的  $\alpha$  因子前导肽序列,一般情况下,应用酵母特有的分泌信号表达外源基因获得成功的可能性较大<sup>[2]</sup>。Raemaekers 用  $\alpha$  因子前导肽序列表达植物血细胞凝集素,成功获得分泌型蛋白,并且具有正确的高级结构<sup>[18]</sup>。毕赤酵母细胞膜上有一种 KEX2 样蛋白水解酶,能专一性水解  $\alpha$  因子前体中羧基端的肽键,即连续两个碱性氨基酸(如 LysArg、LysLys、ArgArg、LysArg),在 pGAPZ  $\alpha$  系列中,KEX2 识别和水解的序列是  $\alpha$  因子的 Glu-Lys-Arg/Glu-Ala-Glu-Ala(/表示水解位点),与此同时,STE13 识别和水解的是  $\alpha$  因子的 Glu-Ala 重复序列,从而保证了蛋白加工过程中的信号肽的切除<sup>[19]</sup>。不过是否设计 STE13 位点应慎重选择<sup>[20]</sup>,

一方面 STE13 位点的存在能够提高 KEX2 的效率,不含该位点可能导致目的蛋白信号肽不能被正确剪切,尤其当 N 端含有脯氨酸等某些特异结构氨基酸时,不含 STE13 位点 KEX2 很可能被抑制,目的蛋白无法分泌到胞外;但另一方面,STE13 位点氨基酸可能发生不完全酶切,导致 Glu-Ala 重复序列的残留,从而使目的蛋白也没有天然 N 端。由此可见,无论是否包含 STE13 位点都可能导致目的蛋白没有天然 N 端,使用毕赤酵母表达核酸酶 Onconase 时发现,若不含 STE13 位点,则 a-MF-pro 肽不能被 KEX2 剪切,导致分泌产物为高糖基化未加工前体;而若保留 STE13 位点,则 Onconase 的 N 端存在 Glu-Ala 重复延伸序列,目的蛋白同样没有生物活性,最终,研究者以 a-MF-pre 为分泌信号,获得了具有天然 N 端的生物活性产物<sup>[21]</sup>。

## 1.5 毕赤酵母宿主菌株选择

**1.5.1 目前常用毕赤酵母宿主菌株的类型:**目前,已有大量不同基因型的毕赤酵母可用做表达宿主,常用于外源基因表达的 *Pichia pastoris* 菌株有 SMD1168 (H)、SMD1165、SMD1163、GS115、X-33、MP-36、MC100-3、KM71 (H)等,菌株的选择应根据具体需求而定。根据利用甲醇的能力,酵母菌株可分为 3 种表型:(1) 甲醇快利用型( $Mut^+$ ),包括 X-33、SMD1168 与 GS115 等大部分菌株,此类菌株同时含有编码醇氧化酶 AOX1 和 AOX2 基因,有研究发现,在异源表达木质素过氧化物酶 H2 时,利用 X-33 菌株的表达量明显高于使用 SMD1168 菌株,这可能是由于 SMD1168 菌株中 *pep4* 基因对异源表达木质素过氧化物酶 H2 有负面影响<sup>[22]</sup>;(2) 甲醇慢利用型( $Mut^s$ ),如 KM71 菌株,其中只含 AOX2 基因,只能依赖 AOX2 产生 AOX;(3) 甲醇不利用型( $Mut^-$ ),如 MC100-3,其 AOX1 及 AOX2 基因均被敲除。

**1.5.2 表达宿主菌的选择原则及改造:**从研究结果来看,蛋白胞内表达时,可优先考虑用  $Mut^s$  表型,对于分泌表达, $Mut^+$ 和  $Mut^s$  都可使用<sup>[23]</sup>。Kim 等研究发现,用毕赤酵母表达胞内灰盖鬼伞过氧化物酶, $Mut^+$ 表达目的蛋白活性是  $Mut^s$  的 3 倍<sup>[11]</sup>。另外,SMD1168、GS115、KM-71 等大部分酵母菌株也是组氨酸脱氢酶缺陷型(*his4*),可据此利用不含组氨酸的培养基筛选重组子。而 SMD1163、SMD1165 和

SMD1168 等为蛋白酶缺陷型,因此可有效降低外源目的蛋白的酶解<sup>[24]</sup>。但 Cregg 等认为, *pep4* 缺陷菌株不如野生菌株生命力强, *pep4* 缺陷菌株在培养基中生长更慢,在平板保存时死亡更快,转化效率也不如野生菌株,而且, *pep4* 缺陷菌株难以与其他非 *pep4* 菌株配对<sup>[25]</sup>。另外,在菌株遗传改造方面,人工失活毕赤酵母的某些蛋白酶基因,获得稳定的突变体也可有效减少外源蛋白的降解,如毕赤酵母 YPS1 基因的失活可明显减少人血清白蛋白-睫状神经营养因子突变体融合蛋白的降解<sup>[26]</sup>。Junjie Yang 等最近报道,非标记遗传修饰对菌株改造具有重要意义,这种方法是在载体 AOX1 后引入 *mazF* 基因,形成 *mazF-ZeoR* 表达框,同时两侧包含 CYC1 TT 同向重复重组位点和多克隆位点,这样可以 Zeocin 抗性为正筛选标记,以 *mazF* 基因为反筛选标记。菌株遗传修饰时,首先通过 Zeocin 筛选出基因改造的菌株,再进行甲醇诱导表达 *mazF*,实现遗传标记的再利用,这样既可以完成菌株的遗传改造,又不会引入非必要遗传标记。使用此方法,研究者成功进行了毕赤酵母 ARG1 和 MET2 基因敲除和绿色荧光蛋白基因的敲入及 ARG1 基因的定点突变,最终均未引起非必要遗传标记的保留<sup>[27]</sup>。

## 1.6 外源基因拷贝数

**1.6.1 外源基因拷贝数与目的蛋白表达量的相关性:** 外源基因的拷贝数是影响其能否在毕赤酵母中高效表达的重要因素之一。表达的大部分情况下,外源基因多拷贝能使多个相同基因同时得到转录与翻译,从而可明显提高蛋白产量<sup>[28-29]</sup>,但少部分研究也表明,单拷贝与多拷贝间并无明显差异,甚至多拷贝产量更低<sup>[30]</sup>。这可能是由于外源 mRNA 翻译效率降低,也可能是因为蛋白质通过内质网不能正确折叠或者折叠效率低造成的<sup>[31]</sup>。Zhu 等用含 0、1、3、6、12、18、29、52 个拷贝的甲醇诱导型毕赤酵母表达猪胰岛素前体,发现表达量并非随拷贝数增加而增加,相反在 12 个拷贝时,表达量最高,并且当拷贝数大于 12 个时毕赤酵母的生长率明显下降<sup>[32]</sup>。Marx 等总结认为,当外源蛋白进行胞外表达时,由于某些限制因素存在,蛋白产量只在一定拷贝数范围内与基因拷贝数相关,达到一定极限后,基因丰度的增加并不能提高蛋白产量;而在胞内表达时,产物在胞质中的积累不受相关限制因素影响,

因此表达量与基因拷贝数紧密相关<sup>[33]</sup>。

**1.6.2 多拷贝转化子的构建:** 多拷贝转化子可通过菌落杂交、高抗性筛选或多拷贝基因构建等获得。Cregg 等认为,通过直接构建多拷贝基因质粒,便于知道准确拷贝数和通过测序直接验证。而如果直接根据 Kan<sup>R</sup>、Zeo<sup>R</sup> 以及 Bsd<sup>R</sup> 等抗性基因进行筛选,虽然增加拷贝数能提高重组菌株抗性,但筛选出的菌株拷贝数差异较大。即使筛选得到的菌株具有高耐药性,大部分也仅含单载体拷贝,高拷贝的发生率只有 1%–5%,因此,为了得到高拷贝,需要对高耐药性的 50–100 个转化子进行拷贝数和表达水平分析。然而通常情况下难以得到如此多的高拷贝子,因为从低浓度药物平板转到高浓度药物平板后,一般只有 0.1%–1%的转化子能够存活。不过最近发展出了一种筛选高拷贝高表达菌株的迭代法筛选过程,命名为转化后载体扩增 (PTVA, Posttransformational vector amplification),即通过逐步提高药物浓度进行分析筛选<sup>[25]</sup>。有分析表明,PTVA 选择出的克隆 40%载体拷贝数增加了 3–5 倍,虽然该过程的分子机理尚不清楚,但观察发现重组菌株基因组整合载体的位置确实发生了头尾相接形式的载体插入<sup>[34]</sup>。

## 1.7 糖基化修饰

相对于酿酒酵母,毕赤酵母一般能产生 8–14 个较为均一而更短的甘露糖型寡糖链,使产物更加稳定,这有助于某些蛋白折叠和抗蛋白酶降解。Zhao 等利用毕赤酵母表达抗肿瘤核糖核酸酶时,通过高细胞密度发酵其糖基化和非糖基化产物浓度分别为 300 和 150 mg/L,经过阳离子交换色谱法及分子筛层析色谱法纯化,产率分别为 56%、67%,体外活性分析发现,糖基化提升了抗肿瘤核糖核酸酶的 RNA 酶活性和细胞毒素活性,这可能是由于糖基化过程增加了其稳定性<sup>[21]</sup>。但毕赤酵母的这种修饰功能也可能导致某些非糖基化蛋白发生糖基化,或使源于哺乳动物的糖蛋白糖基化位点或类型不一致,最终导致非均一蛋白产生,目的蛋白生物活性丧失,做为药物时在机体内产生免疫反应或毒副作用。针对这种不恰当的糖基化修饰可考虑从以下几方面解决: (1) 将分泌表达的蛋白进行胞内表达,这样,蛋白不经过分泌通路,避免蛋白被修饰; (2) 在表达目的蛋白之前,分析氨基酸序列中可能存在的糖基化

位点,通过基因改造替换或去除糖基化位点氨基酸,但前提是该蛋白自身是非糖基化修饰蛋白或去除糖基化后该蛋白的功能等不受影响,以满足试验需求;Yurugi-Kobayashi 等在进行 G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)生物结构研究时发现,通过替换 N 端糖基化位点氨基酸消除 N 端糖基化后,使用毕赤酵母能成功表达 N 端非糖基化功能 GPCR,所得产物具有更高结晶能力,有利于形成高质量晶体<sup>[35]</sup>; (3) 对于哺乳动物源的复合型 N-糖基化,可考虑对毕赤酵母菌株进行相关糖基化酶基因改造,从而实现与天然蛋白一致的糖基化。Jacobs 等对糖基化通路改造进行了深入研究,他们首先打断内源糖基转移酶基因(OCH1),然后转化载体逐步引入异源糖苷或糖基转移酶,并将糖基化酶与已知定位的毕赤酵母蛋白融合表达,使糖基化酶定位到内质网或高尔基体的特定部位,实现外源蛋白的连续修饰,结果表明这种改造能够表达出复合型 N 端糖蛋白。不过,由于酵母中完全 O-糖基化关闭的致死作用,目前还未能实现 O-糖基化改造<sup>[36]</sup>。

## 2 表达条件优化及放大发酵

毕赤酵母表达外源蛋白时,温度、pH、碳源、溶氧等培养条件对目标蛋白的完整性及产量影响较大,优化培养条件可有效提高外源蛋白的表达量。一般对碳源、氮源以及 pH 的优化主要通过响应面法。Vellanki 等用毕赤酵母表达重组链激酶,通过响应面法优化营养需要种类、数量以及 pH 等,发现与未优化相比,增加了 95%的表达量<sup>[37]</sup>。

合理的碳源选择与组合有利于目标蛋白的产生,在表达蛋氨酸腺苷转移酶(MAT)时,Hu 等发现,甘油添加能够有效提高发酵液中氧饱和度,从而提高氧输送率和消耗率,促进细胞增殖与产物积累<sup>[38]</sup>。与甲醇单一碳源比较,甘油与甲醇组合能加快醇氧化酶的诱导及细胞代谢的适应<sup>[39]</sup>,而山梨醇与甲醇做为混合碳源能够有效提高米根霉脂肪酶的产量<sup>[40]</sup>。

甲醇利用型毕赤酵母表达异源蛋白时可分为两个阶段,首先在没有甲醇的培养基中扩大生物量,而后通过甲醇诱导,实现大量表达。甲醇的浓度对异源蛋白表达量有一定影响,Katakura 等用毕赤酵母表达人  $\beta$ -2-糖蛋白 I,将诱导时甲醇的浓度从

0.15%提高到 1.0%,发现显著提高了目的蛋白的表达量<sup>[41]</sup>。但是,也有研究表明,过高的甲醇浓度可能对毕赤酵母的生长造成不利影响,反而降低异源蛋白的表达量<sup>[42-43]</sup>。因此,最适的甲醇浓度需要根据不同的异源蛋白而进行确定。要想探讨出甲醇诱导的最佳方案,有赖于甲醇残留量的实时监控及甲醇流加技术的发展和甲醇利用分子机理的深入研究。Damasceno 等在表达 A33scFv 时,采取闭环甲醇控制方式,通过对甲醇进行实时监控和添加,能够较好的维持体系中的甲醇浓度,从而实现蛋白的恒定高效表达,这种监控方式对于甲醇诱导型毕赤酵母高水平表达具有重要意义<sup>[44]</sup>。最近,Yano 等阐明了毕赤酵母中转录子 Yap1 调控的谷胱甘肽氧化还原系统在甲醇代谢中消除甲醛和活性氧的分子机理。当毕赤酵母在以甲醇为碳源的培养基中生长时,醇氧化酶(AOX)将甲醇氧化为甲醛和过氧化氢,在氧化应激下,转录子 Yap1 从胞质迅速转移到胞内,上调谷胱甘肽还原酶 1 (Glr1)的表达,Glr1 将氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原为还原型谷胱甘肽(GSH),GSH 与相关酶共同作用最终实现甲醛和过氧化氢解毒功能,使毕赤酵母正常生长<sup>[45]</sup>。通过该机理的了解及相关研究的深入,可以考虑检测甲醇诱导的不同时间和浓度下转录子对 Glr1 的上调程度及 GSH/GSSG 的变化,进一步分析细胞的解毒能力与目的蛋白产量之间的关系,以实现从分子水平上获得甲醇诱导调控的最佳方案。

巴斯德毕赤酵母可忍耐较宽的 pH 范围(pH 3.0-7.0),因此调节溶液 pH 值可抑制蛋白水解酶活性,防止目的蛋白降解,提高产量<sup>[46]</sup>。不同蛋白表达需要不同的最适 pH,表达鼠免疫因子与人血清白蛋白的最适 pH 为 6.0<sup>[47]</sup>,而 ILGF-I 最适 pH 为 3.0<sup>[48]</sup>。因此,外源蛋白表达最适 pH 需根据蛋白性质由试验结果确定。

许多研究表明,低温也可有效提高目的蛋白产量及活性,因为在更高温度条件下,重组蛋白可能稳定性较差,细胞也更易死亡和释放蛋白酶导致外源蛋白降解。Li 等在毕赤酵母中表达鲱鱼的抗冻蛋白时将温度从 30°C 降低到 23°C,产量从 5.3 mg/L 提高到了 18.0 mg/L,并且减少了错误折叠的积累<sup>[49]</sup>。而在毕赤酵母中表达乙酰胆碱酯酶时,当培养温度从 30°C 降到 15°C 时,活性蛋白产量增加了

32.8 倍<sup>[50]</sup>。

某些蛋白表达中,在培养基中加入特定的酶抑制剂或特定的生长因子也可提高表达量。加入适量的富含氨基酸的补充物(如酵母提取物和蛋白胨),可能起到替代或竞争蛋白酶底物的作用,从而提高蛋白稳定性,另外在培养基中加入铵离子,在某种程度上可以降低蛋白质的水解作用,从而提高蛋白表达水平。总之,通过调节一种或综合调节多种表达条件有助于得到高产生物活性蛋白。条件优化可通过简单的单因素试验或响应面分析等进行。此外,目的蛋白在进行发酵罐生产时表达水平往往高于摇瓶试验,如 Yao 等研究发现,毕赤酵母表达重组猪胰岛素前体时,使用 15 L 发酵罐生产时,表达产量达到 1.69 g/L,是摇瓶试验的 17 倍之多<sup>[51]</sup>,可能是因为发酵灌通气更理想,有利于菌体的高密度生长及表达。

### 3 重组菌株及目的蛋白的检测分析

虽然部分蛋白在毕赤酵母中产量能够达到克级,但这些蛋白分子量通常较大,大部分低分子量蛋白在毕赤酵母中表达量通常为毫克级,因此在最初的表达检测试验中,某些蛋白很难在 SDS-PAGE 胶上显现出对应条带,此时,应该根据目的蛋白作用条件和自身特性使用某些灵敏度更高的检测手段,如根据目的蛋白酶活性、自身抗原特性、抗原标签及抗菌活性等特性进行检测。目前,最便捷的方法是直接在平板上进行外源蛋白活性检测。通过菌落影印或其他手段将转化子转移到检测平板上,可一次性粗略检测 100–1000 个转化子。平板活性试验显示,在进行植酸酶分泌表达时,琼脂板上转化子表达的植酸酶能分解植酸盐,导致相应转化子附近形成了大小不同的清晰区域,而在胞内表达细菌  $\beta$ -内酰胺酶时,可明显观察到典型的黄色菌落从粉红色变成了紫色,紫色强度可以大致反应产生的酶量。根据目的蛋白的抗原标签或自身抗原特性,选择高质量的单克隆或多克隆抗体,可进行酵母菌落印记(Yeastern blot)检测目的蛋白。

### 4 展望

在进行外源蛋白表达时,毕赤酵母因兼具大肠杆菌与真核细胞优点,受到许多研究者青睐,但不

同蛋白表达结果差异较大。为提高目的蛋白产量及活性,需进行目标基因、载体及菌株等遗传设计与改造,同时需对温度、pH、培养基组成等表达条件进行优化。

从长远来看,在毕赤酵母工程菌研究方面,作者认为以下两方面的研究工作具有重要意义:使用现在的成熟分子生物学技术高效表达具有广泛应用价值的目的蛋白,最终使该蛋白的使用成本大幅度降低,促进该蛋白的广泛应用,有效解决生物制药、食品工业、畜牧业中的技术和成本问题;另外,利用最新的生物学技术对毕赤酵母及其表达载体进行遗传改造,缺失、改造、增加某些基因功能,并加深遗传机制了解或研究,使毕赤酵母成功表达复杂结构的活性蛋白,这将极大地促进蛋白的结构、功能研究。比如怎样在毕赤酵母中表达具有正确结构和功能的疏水膜蛋白,许多问题还有待进一步探索和研究。基因整合过程也有待进一步明确,因为在与相关研究者交流时发现即使已验证目的基因整合到酵母基因组中,但仍然只有部分菌株才能实现表达,本实验室在设计表达分泌细菌素时,目的基因虽已被验证整合至基因组,但在胞外胞内均未检测到目的活性蛋白,其原因正在进行研究。对于甲醇诱导型表达,有些研究者发现需要 8 d 甚至更长时间才能检测到目的蛋白,为何需较长时间诱导,其机理也值得探索,发酵液中甲醇含量监测及添加速度也需进一步优化和完善。

### 参考文献

- [1] Boettner M, Steffens C, von Mering C, *et al.* Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*-A comparative view on 79 human genes. *Journal of Biotechnology*, 2007, **130**(1): 1–10.
- [2] Hu S, Li L, Qiao J, *et al.* Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2006, **47**(1): 249–257.
- [3] Woo JH, Liu YY, Mathias A, *et al.* Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002, **25**(2): 270–282.
- [4] Micheelsen PO, Østergaard PR, Lange L, *et al.* High-level expression of the native barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2008,

- 133(4): 424–432.
- [5] Li Z, Hong G, Wu Z, *et al.* Optimization of the expression of hepatitis B virus e gene in *Pichia pastoris* and immunological characterization of the product. *Journal of Biotechnology*, 2008, **138**(1/2): 1–8.
- [6] Li Y, Zhang B, Chen X, *et al.* Improvement of *Aspergillus sulphureus* endo- $\beta$ -1,4-xylanase expression in *Pichia pastoris* by codon optimization and analysis of the enzymic characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009: 1–11.
- [7] Xu Y, Sun J, Xu Z. Modification of a gene encoding hybrid xylanase and its expression in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, **25**(8): 1453–1460.
- [8] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 2005, **18**(2): 119–138.
- [9] Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, *et al.* Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 2009, **36**(6): 1611–1619.
- [10] Ragon M, Neugnot-Roux V, Chemardin P, *et al.* Molecular gene cloning and overexpression of the phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. *Protein Expression and Purification*, 2008, **58**(2): 275–283.
- [11] Kim SJ, Lee JA, Kim YH, *et al.* Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, **19**(9): 966–971.
- [12] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**(4): 249–270.
- [13] Döring F, Klapper M, Theis S, *et al.* Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, **250**(2): 531–535.
- [14] Wu JM, Lin JC, Chieng LL, *et al.* Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33**(4): 453–459.
- [15] Menendez J, Valdes I, Cabrera N. The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, 2003, **20**(13): 1097–1108.
- [16] Shen S, Sulter G, Jeffries TW, *et al.* A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1998, **216**(1): 93–102.
- [17] Raemaekers RJM. Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (G-NA) expressed in *Pichia pastoris*: Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **265**(1): 394–403.
- [18] Rees GS, Gee CK, Ward HL, *et al.* Rat tumour necrosis factor- $\alpha$ : Expression in recombinant *Pichia pastoris*, purification, characterization and development of a novel ELISA. *European Cytokine Network*, 1999, **10**(3): 383–392.
- [19] Davey J, Davis K, Hughes M, *et al.* The processing of yeast pheromones. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1998, **9**(1): 19–30.
- [20] Ghosalkar A, Sahai V, Srivastava A. Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant *Pichia pastoris* using three different secretion signals. *Protein Expression and Purification*, 2008, **60**(2): 103–109.
- [21] Zhao HL, He Q, Xue C, *et al.* Secretory expression of glycosylated and aglycosylated mutein of onconase from *Pichia pastoris* using different secretion signals and their purification and characterization. *FEMS Yeast Research*, 2009, **9**(4): 591–599.
- [22] Wang W, Wen X. Heterologous expression of a synthetic gene encoding lignin peroxidase H2 in *Pichia pastoris*. *Huanjing Kexue Xuebao/Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, **29**(9): 1793–1799.
- [23] Jin FL, Xu XX, Yu XQ, *et al.* High-level expression of active recombinant ubiquitin carb oxyl-terminal hydrolase of *Drosophila melanogaster* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2009, **65**(2): 115–121.
- [24] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology-Part B Molecular Biotechnology*, 2000, **16**(1): 23–52.
- [25] Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, *et al.* Chapter 13 Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology*, 2009, **463**(C): 169–189.
- [26] Yao XQ, Zhao HL, Xue C, *et al.* Degradation of HSA-AX15 (R13K) when expressed in *Pichia pastoris* can be reduced via the disruption of YPS1 gene in this yeast. *Journal of Biotechnology*, 2009, **139**(2): 131–136.
- [27] Yang J, Jiang W, Yang S. MazF as a counter-selectable marker for unmarked genetic modification of *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 2009, **9**(4): 600–609.
- [28] Mansur M, Cabello C, Hernández L, *et al.* Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2005, **27**(5): 339–345.
- [29] Abdelmoula-Souissi S, Rekik L, Gargouri A, *et al.* High-level expression of human tumour suppressor P53 in the methylotrophic yeast: *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2007, **54**(2): 283–288.
- [30] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, *et al.* Effects of gene



- dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **85**(4): 367–375.
- [31] Mehmet I, Dinesh A, Jayanta S, *et al.* Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, **93**(4): 771–778.
- [32] Zhu T, Guo M, Tang Z, *et al.* Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, **107**(3): 954–963.
- [33] Marx H, Mecklenbräuker A, Gasser B, *et al.* Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*, 2009, **9**(8): 1260–1270.
- [34] Sunga A, Tolstourkov I, Cregg J. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 2008, **8**(6): 870–876.
- [35] Yurugi-Kobayashi T, Asada H, Shiroishi M, *et al.* Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, **380**(2): 271–276.
- [36] Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, *et al.* Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nature Protocols*, 2009, **4**(1): 58–70.
- [37] Vellanki RN, Potumarthi R, Mangamoori LN. Constitutive expression and optimization of nutrients for streptokinase production by *Pichia pastoris* using statistical methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, **158**(1): 25–40.
- [38] Hu XQ, Chu J, Zhang Z, *et al.* Effects of different glycerol feeding strategies on S-ade nosyl-lmethionine biosynthesis by PGAP-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase. *Journal of Biotechnology*, 2008, **137**(1/4): 44–49.
- [39] Jungo C, Marison, U von Stockar. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: a quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 2007, **128**(4): 824–837.
- [40] Ramón R, Ferrer P, Valero F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2007, **130**(1): 39–46.
- [41] Katakura Y, Zhang WH, Zhuang GQ, *et al.* Effect of methanol concentration on the production of human bet-a(2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J Ferment Bioengng*, 1998(86): 482–487.
- [42] Sarramegna V, Demange P, Milon A, *et al.* Optimizing functional versus total expression of the human  $\mu$ -opioid receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002, **24**(2): 212–220.
- [43] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**(5): 527–533.
- [44] Damasceno LM, Lee F, Ritter G, *et al.* High-level expression of a phage display-derived scFv in *Pichia pastoris*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2009(562): 225–236.
- [45] Yano T, Takigami E, Yurimoto H, *et al.* Yap1-regulated glutathione redox system curtails accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris*. *Eukaryotic Cell*, 2009, **8**(4): 540–549.
- [46] Pais-Chanfrau JM, García Y, Licor L, *et al.* Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(16): 1269–1272.
- [47] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, *et al.* High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, **89**(1): 55–61.
- [48] Koganesawa N, Aizawa T, Shimojo H, *et al.* Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm *Pseudaletia separata* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002, **25**(3): 416–425.
- [49] Li Z, Xiong F, Lin Q, *et al.* Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2001, **21**(3): 438–445.
- [50] Sato R, Matsumoto T, Hidaka N, *et al.* Cloning and expression of carp acetylcholinesterase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification*, 2009, **64**(2): 205–212.
- [51] Yao YS, Chu J, Hang HF, *et al.* Culture conditions affecting high level expression of porcine insulin precursor (PIP) by recombinant *Pichia pastoris* in high cell density fermentation. *Huadong Ligong Daxue Xuebao/Journal of East China University of Science and Technology*, 2006, **32**(4): 397–401.