

巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展

章如安 杨 晟 邱荣德 袁中一*

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

关键词: 巴斯德毕赤酵母, 表达体系, 外源蛋白

中图分类号: Q93 **文献标识码:** C **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0371-03

毕赤酵母表达体系是近十年发展起来的真核表达体系。作为一种成功的表达体系,有好几种因素促进了它的快速推广。主要包括如下几方面:

毕赤酵母醇氧化酶(Alcohol oxidase, AOX1)基因的强启动子特别适合于外源基因的调控表达;毕赤酵母基因操作技术和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 非常相似,后者是现代分子生物学中研究得透彻和应用很广的酵母表达体系;毕赤酵母对需氧生长有强的偏好,这一生理学特性使得它既能高密度发酵生长,亦有利于工业放大生产;毕赤酵母自身分泌到培养基中的蛋白很少,高分泌的外源蛋白易从无蛋白培养基质中分离;外源基因通过质粒整合毕赤酵母基因组后,结构稳定,不易丢失;外源基因能通过体内或体外方法以不同拷贝数装入毕赤酵母基因组 DNA 中,以利于筛选到合适基因剂量的高表达菌株;毕赤酵母表达体系除含有真核表达体系均有的翻译后修饰功能等优点外,同时也具有原核表达体系的方便、简单和成本低等优点。

1 毕赤酵母表达宿主菌

毕赤酵母表达宿主菌于 80 年代初开发获得,大多应用宿主菌是通过野生型石油酵母 Y11430 进行突变改造而来。在组氨酸脱氢酶基因(*HIS4*)处有一突变,用于转化后筛选重组菌株。其它的一些营养缺陷宿主菌或生物合成基因也可作为筛选标记。

目前主要有 3 种表达宿主菌^[1],它们间区别在于 AOX 一个或二个基因的缺失而造成对甲醇利用能力高低的变化。最常用的宿主菌为 GS115(*his4*),它含 AOX1 和 AOX2 基因,在含甲醇的培养基上以野生型速率生长。KM71(*his4 arg4 aox1::ARG4*)宿主菌的 AOX1 已

被 *S. cerevisiae* 的 ARG4 所代替,因此,此宿主菌只有依赖 AOX2 基因合成 AOX,在甲醇中低速度生长。第 3 种宿主菌 MC100-3(*his4 arg4aox1::SARG4AOX2::Phis4*)的两个 AOX 基因都被去除,不能在含甲醇的培养基上生长。上述宿主菌的进一步改造,还可得到其它衍生的宿主菌,目前已达不同基因型十几种。SMD1163(*his4pep4prb1*), SMD1165(*his4prb1*)和 SMD1168(*his4pep4*)是最近开发的一类蛋白酶缺失的宿主菌,它们为表达外源蛋白提供了一个减少降解的环境,有广泛的应用价值。

2 毕赤酵母表达载体

毕赤酵母载体包括自我复制的游离载体和整合型载体,现在一般都用整合型载体。通用的整合载体大多含 AOX1 启动子,具有多种共同特性。一般都有一个外源基因表达框和 AOX1 启动子,多克隆位点(MCS)和一个从 AOX1 基因上拷贝下来的终止序列(TT);同时,大多数载体包含作为筛选标记的 *HIS4* 基因和细菌中进行拷贝增殖而存在的序列(如 ColEI 复制起始点和抗氨苄基因);同时也含有 AOX1 3' 的非编码区序列,使外源基因能以替代或插入方式整合到染色体的 AOX1 部位。

各种质粒按实际需要可构建具备不同功能。如为了分泌外源蛋白,载体上 AOX1 启动子后可加入一个编码信号肽的序列。常用的为 *S. cerevisiae* 的 α 性成熟因子(α -MF)信号序列。直接用外源基因的天然信号肽进

* 联系人:袁中一, Fax: 021-64338357, Tel: 021-64374430-289, E-Mail: zhongyi@sunm.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-08-03, 修回日期: 1999-10-27

行分泌,也有成功的报道,如 Nathalie^[2]等发现 AchE 用其本身的信号肽在毕赤酵母中获得了最大的表达量。其它一些带有药物筛选标记的载体能用于筛选转化后的多拷贝菌株。如 pPIK3K 和 pPIC9K, 含有卡那霉素基因, 用高浓度药物 G418 可筛选含多拷贝载体的转化菌株。载体 pPICZ 等则含有印度斯坦链异壁菌 (*Streptoalloteichus hindustanus*) 来源的基因 *shble*, 这个基因较小 (375bp), 能在 *E. coli*、酵母和其它真核生物中表达, 对 Zeocin 药物有抗性。同时此载体的 c-myc 抗原决定簇可方便地检测外源蛋白。C 末端的多聚组氨酸 (6xHis) 则能用树脂方便地纯化外源蛋白。pAO815、pPICZ 等载体则适合于构建形成多个串联的表达框。

其它近来发展的载体如 pGAPz 等则含有 3'-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP) 的启动子或 YPT1 启动子。与 AOX1 启动子的诱导表达不同, GAP 启动子具有很强的组成型表达能力, YPT1 则相对为中等的组成型表达。值得注意的是, 近来 Shiang^[3]等报道毕赤酵母中克隆到的甲醛脱氢酶 (FLD1) 基因启动子具有 AOX1 启动子相同的强度或更高强度, 能在甲醇唯一碳源或以甲胺为唯一氮源 (葡萄糖、甘油等为碳源) 情况下表达。用甲胺代替甲醇为诱导剂, 扩大了毕赤酵母的应用范围。例如甲胺不易挥发, 更适用于摇瓶研究。因此毕赤酵母中 FLD1 启动子将有很好的推广前景。

3 外源蛋白在毕赤酵母中的表达

外源蛋白在毕赤酵母中的表达影响因素很多^[4], 它不仅受基因剂量、整合位点、mRNA 5' 和 3' 非翻译区 (UTR)、cDNA 的 AT 含量、翻译起始区和信号肽等上游的影响, 也受宿主菌、Mut 表型、蛋白酶、蛋白加工、酶切和糖基化及培养基的影响。

关于基因剂量对表达的影响, 目前的看法是, 合适的拷贝数是需要的, 但拷贝数的增加对其表达影响可能不大。Clare^[5]研究破伤风毒素片段 C 在毕赤酵母中的表达指出, 重组蛋白的产量高低与外源基因片段整合的位点和表型无关, 影响产量的关键因素是存在多拷贝的表达单元。最近 Zhu 等^[6]也报道 24 拷贝的 M-CPTI 的表达量为单拷贝的十倍。因此从理论上说, 表达量会随着基因拷贝数的增加而上升, 但也有例外, 如小牛溶菌酶的表达随着拷贝数从 1~3 的上升反而减少^[7]。高拷贝数不能达到高表达的可能原因是外源 mRNA 的翻译效率或蛋白通过内质网中不能正确折叠

造成的。

5' 和 3' 非翻译区 (UTR) 对蛋白表达影响主要表现在 RNA 的翻译水平上。Sreekrishnay 等^[4]认为 UTR 的长度最好和 AOX1 基因中的一致。cDNA 的 AT 含量影响蛋白的表达最好的例子是 HIV-1 外壳蛋白的表达^[8]。其 cDNA 的 AT 含量过高, 从而使转录提前终止。通过人工合成具较高 GC 含量的基因才能转录出全长的 mRNA。

载体整合位点包括 AOX1 和 HIS4, 也即涉及到 Mut 表型问题。Mut⁺ 菌株已经成功地表达了很多蛋白 (如表皮生长因子、胰岛素样生长因子等)。Mut^s 菌株虽然在诱导阶段生长缓慢, 但有时外源蛋白的表达反而更高, 更有利于蛋白的正确折叠。如 PepT1 的表达在 Mut^s 菌株中较高^[9]。应该说, Mut⁺ 和 Mut^s 表型的菌株各有优缺点, 关键由外源蛋白而定。

蛋白分泌信号肽可以来自重组蛋白自身。Stefama 等^[10]在表达一种脂肪酶时发现天然信号肽能使外源基因在毕赤酵母中表达, 但表达效率比酵母 Mα 信号肽低。Markus 等^[11]用 PHO1、Mα 和天然外源基因信号肽表达小鼠 5-HT_{5A} 5-羟色胺受体, 发现用天然信号肽的表达量比 PHO1 信号肽高。S. cerevisiae 的研究经验也表明, 信号肽结构的改造 (如突变、不同信号肽融合等) 可能会提高分泌效率。Antonio 等^[12]发现改造了的信号肽大大提高了外源蛋白表达量。用经过修饰的人血清白蛋白 (HSA) 天然信号肽也可使 HSA 在毕赤酵母中的分泌提高几倍^[13], 因此要达到外源蛋白的最高表达, 应尝试不同的信号肽。

分泌蛋白在培养基中的不稳定问题主要由毕赤酵母分泌出的几种蛋白酶引起。在发酵罐中, 此现象更为严重。主要有三种策略来对付蛋白的降解^[2]。第一种即在培养基中加入富含氨基酸和多肽的蛋白胨或酪蛋白水解物等, 通过增加蛋白酶作用的底物以缓和蛋白酶的水解作用。第二种则是改变培养基的 pH 值。毕赤酵母可在 pH3.0~8.0 的范围内生存。当调 pH 为酸性时, 可有效抑制中性蛋白酶的活性。最后, 用缺乏蛋白酶的宿主菌, 也能很好解决此问题。

重组蛋白的表达除了与上述因素有关外, 还与特定宿主菌、培养条件和蛋白本身有关。即使同一种宿主菌的重组子, 表达量也往往有所差别, 因此筛选高表达菌株是非常必要的。Jeffrey 等^[14]已发展了在平板上用

ELISA 快速筛选高表达菌株的方法,值得推广。此外还有通过培养条件的优化提高蛋白质的表达等。

4 重组蛋白的翻译后修饰

毕赤酵母含有典型高等真核生物的许多翻译后修饰功能^[2]。这些功能包括信号肽的加工、蛋白质折叠、二硫键的形成和 O-及 N-型糖基化等。和 *S. cerevisiae* 比较,毕赤酵母来源的重组蛋白糖基化程度不高,糖链更短。另一点不同的是,毕赤酵母分泌的糖蛋白大多不含末端 α -1,3-甘露糖,而酿酒酵母分泌的糖蛋白则含大量的 α -1,3 连接的甘露糖残基,这一缺陷使酿酒酵母不适合生产医药用重组蛋白。

虽然毕赤酵母分泌的外源蛋白糖基化相对较少,但在某些情况下,毕赤酵母也会分泌高糖基化的外源蛋白。本实验室在毕赤酵母中分泌的辣根过氧化物酶 (HRP) 就以非糖基化和高糖基化两种形式存在,非糖基化产物极不稳定,而高糖基化产物则能稳定存在于发酵液中^[15]。

5 总结和展望

近来,毕赤酵母表达体系有了更为广泛的应用范围,表达的蛋白质包括酶、膜蛋白、抗原和抗体、调节蛋白等各种类型。和其它体系比较,它在表达真核蛋白方面有很好的应用。国内虽然起步较晚,但用此体系分别成功地表达出胰岛素、乙肝表面抗原、降钙素、人血清白蛋白等。

当然,毕赤酵母表达体系和其它体系一样,不是万灵药,低表达或表达失败的例子也在增多。如上文提到的蛋白水解问题,很多蛋白在毕赤酵母中只表达出蛋白片段或几条带共存,通过 Western 杂交表明是水解的结果;另外对一些复合蛋白的分泌还不有效。尽管有许多表达量达克/升的报道,胞外表达比胞内表达更难;最后,一些天然外源基因并不导致可检测的蛋白分泌,这常起因于酵母转录终止子把 mRNA 截短。

因此,毕赤酵母的更广泛应用,还有待于对此体系

进行进一步的优化。在营养缺陷性突变株、选择标记、比 G418、Zeocin 更有效的筛选药物、能同时表达两种蛋白的载体和其它启动子等方面都需探索和更新。此方面的突破,将使毕赤酵母表达体系有更好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] David R, Higgins, James M. Cregg. *Methods in Molecular Biology*, 1998, 103:1~15.
- [2] Nathalie Morel, Jean Massoulie. *Biochem. J*, 1997, 328:121~129.
- [3] Shigang Shen, Greitje Sulter, Thomas W, *et al.* *Gene*, 1998, 216:93~102.
- [4] Sreekrishna K, Robert G. Brankamp, Keith E. *et al.* *Gene*, 1997, 190:55~62.
- [5] Clare J J, Rayment f B, Ballantine S P, *et al.* *BIO / TECHNOLOGY*, 1991, 9:455~459.
- [6] Zhu Hongfa, Jianying, James M. *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 1997, 239:498~502.
- [7] Thill G P, Davis G R, Stillman C, *et al.* In *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganism*. 1990, 2:477~490.
- [8] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J, *et al.* *Gene*, 1997, 187:193~200.
- [9] Frank D, Stephan T, Hannelore Daniel. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 1997, 232:656~662.
- [10] Stefama B, Claudia S. *Design. Protein Science*, 1998, 7:1415~1422.
- [11] Markus H W, Winfried H, Hartmut Michel, *et al.* *FEBS Letters*, 1995, 377:451~456.
- [12] Antonio M, Alvaro M. *Protein expression and Purification*, 1998, 12:315~322.
- [13] Hayasuke N, Nakagawa Y, Ishida Y, *et al.* *United States Patent*, (Patent number:5503993), 1996, 4~2.
- [14] Jeffrey T M, Danleiske, Brad Dell, *et al.* *Gene*, 1997, 187:193~200.
- [15] 蒋太交,吉鑫松,章如安等. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26(6):584~587.