

# 一种具有应用价值的基因工程表达系统\*

罗玉萍 李思光 徐华顺

(南昌大学生物科学工程系 南昌 330047)

关键词: 解脂耶氏酵母, 基因工程, 表达系统

中图分类号: Q344 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05-0368-03

基因工程技术的目的是使外源基因在受体细胞内按人们期望的方式进行表达, 表达系统是基因工程的关键。原核生物表达系统已为人们所深入了解并被广泛应用。真核生物表达系统一度发展缓慢, 随着人们对真核生物如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 遗传表达机制的深入了解以及实验手段的不断提高, 其基因工程表达系统也建立起来了。但是, 人们发现酿酒酵母作为一种基因工程表达系统存在一些局限性<sup>[1]</sup>, 因为酿酒酵母是以发酵为主的酵母, 在采用常规的通气发酵条件下其所能达到的生长速度和密度并不高, 所以表达外源基因很难达到很高的水平。此外, 它缺乏调节型的强启动子和有效的分泌系统。酿酒酵母的这些不足促使人们从广泛存在的非常规酵母中建立新的载体-宿主系统。其中解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 具有很强的蛋白质分泌能力, 近年来已引起人们的强烈兴趣, 本文对该系统作一简要评述。

## 1 解脂耶氏酵母的研究概况

解脂耶氏酵母是一种重要的工业菌株, 早在 1942 年人们注意到它能利用含脂或蛋白质的物质作为碳源。70 年代初, 随着单细胞蛋白研究的兴起, 解脂耶氏酵母曾相继用于工业化规模生产单细胞蛋白、柠檬酸、异丙基苹果酸、赤藓糖醇、甘露醇等, 由此人们对它的赖氨酸代谢、三羧酸循环、胞外酶的分泌、烷烃利用、接合和产孢、线粒体基因、病毒相关颗粒、核糖体基因等

方面进行了研究。到 80 年代中期对解脂耶氏酵母掀起了第二次研究热潮。高效准确的整合转化系统的获得<sup>[2]</sup>; 对胞外蛋白酶分泌过程的分析<sup>[3]</sup>; 类似于高等真核生物的信号识别颗粒的发现<sup>[4]</sup>; 以上这些使解脂耶氏酵母成为研究蛋白质分泌的模式菌株。那时, 虽然在解脂耶氏酵母中未能构建复制载体, 但着丝粒自主复制序列的分离解决了这一问题。由于强有力的基因扩增系统的发展<sup>[5]</sup>, 逆转录转座子的发现<sup>[6]</sup>, 调控型和组成型的强启动子的鉴定<sup>[7]</sup>, 目前, 解脂耶氏酵母已成为研究外源基因表达和蛋白质分泌的微生物。

## 2 载体-宿主系统

### 2.1 载体

在解脂耶氏酵母中未发现稳定的附加体质粒, 其所有载体都是以 pBR322 为骨架, 表达载体采用整合载体是解脂耶氏酵母导入外源基因的主要方式。整合载体按其介导整合的方式不同, 可以分为单拷贝整合载体和多拷贝整合载体。解脂耶氏酵母的整合载体上的 *URA3* 或 *LEU2* 基因可以和染色体上的相应区段发生单交换, 从而可把整个载体整合进染色体, 得到稳定的转

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.39860037)

Project Granted by chinese National Natural Science Fund(No.39860037)

收稿日期: 1998-07-20, 修回日期: 1999-10-26

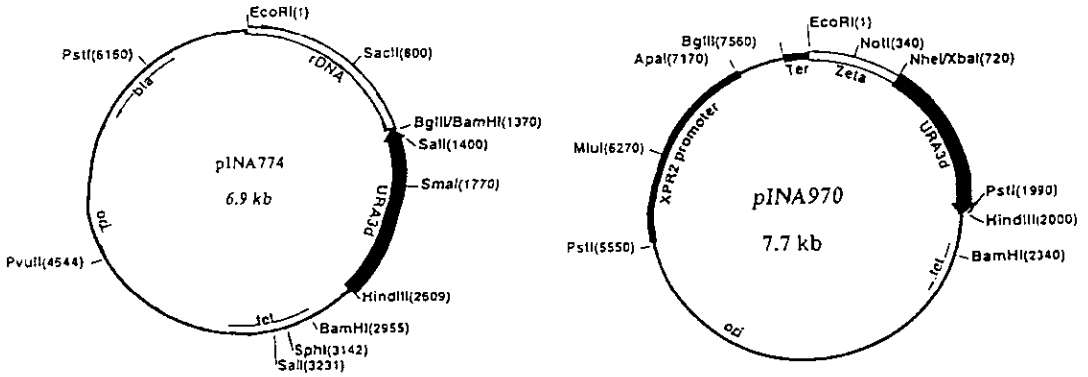


图 1 多拷贝整合载体

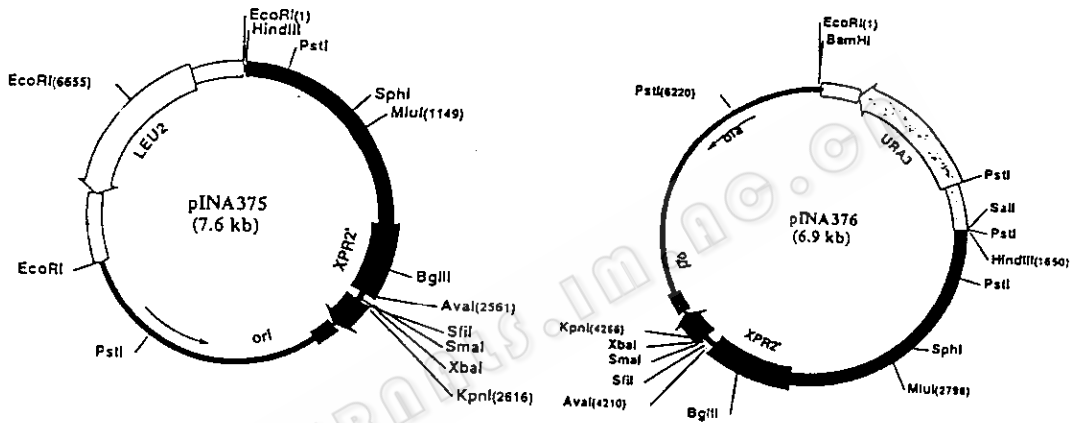


图 2 分泌蛋白质表达载体

化子。如果整合载体上介导整合的序列为基因组中的重复序列,这样的载体就可以获得多拷贝的转化子。图 1 是多拷贝整合载体,它们带有缺陷的 *URA3* 标记和一段重复 DNA [来自 *rDNA* 序列(左)或来自 *ylt* 转座子(右)]。用 pINA774 转化,拷贝数为 40~60/细胞,用 pINA970 转化,拷贝数为 5~15/细胞。

在正常生理条件下,解脂耶氏酵母野生型菌株能分泌 2g/L 胞外碱性磷酸酶 AEP 至培养基中,表明其具有很强的内在分泌能力。编码 AEP 的基因 *XPR2* 已被克隆,它具有调控型强启动子。*XPR2* 启动子和信号顺序已用于表达和分泌外源蛋白。图 2 是解脂耶氏酵母表达分泌蛋白的载体,它含有 *XPR2* 启动子和末端序列,编码 AEP, *prepro* 序列,选择标记为 *LEU2* 或 *URA3*,外源编码序列可插在 *SmaI* 和 *XbaI* 或 *KpnI* 位点之间。*XPR2* 是受 pH、碳和氮源调节的强启动子,它的 *prepro*

区是分泌 AEP 的必需成分。

## 2.2 宿主和转化

到目前为止,所有的野生型解脂耶氏酵母菌株均为 *Suc*,不能利用蔗糖,可用作选择标记。人们以工业菌株 W29 ATCC24060 为基础,用 *SUC2* 基因作选择标记,使它与 *XPR2* 启动子和分泌信号融合,转化后可在蔗糖培养基上直接选择转化子。在此基础上,人们构建了受体菌 POla(MatA Ura 3.302 Leu 2.270) 和 POld(MatA Ura3.302 Leu2.270, Xpr2.322) 这些菌株成为表达系统常用的受体菌,它们不仅生长能力强且产异源蛋白的量很高,转化采用醋酸锂方法,转化时载体 DNA 必须切成线状,这样才能与染色体进行同源重组,并将整个载体连同外源基因整合入宿主染色体,转化率一般在  $1.6 \times 10^7$  转化子/ $\mu$ gDNA。与未切割的载体相比,转化率提高 100 至 1000 倍。如采用多拷贝整合载体,则

可获得多拷贝的转化子。

### 3 表达元件及应用

解脂耶氏酵母表达系统已引起人们广泛的兴趣。表达载体需要强的转录启动子和终止子。XPR2具有调控型强启动子。Ogrydziak等<sup>[8]</sup>研究了碳源、氮源、无机盐对该启动子的诱导和阻遏作用,在高诱导条件下碱性磷酸酶的产量是低诱导条件下的800倍。XPR2启动子和分泌信号已用于直接分泌异源蛋白,诸如干扰素<sup>[9]</sup>,人凝血因子XIIIa<sup>[10]</sup>,牛凝乳酶原,人组织纤溶酶原激活物<sup>[11]</sup>,乙肝病毒表面抗原<sup>[12]</sup>, $\alpha$ -淀粉酶<sup>[13]</sup>。Bauer等<sup>[14]</sup>构建了含LEU2启动子的表达载体。该启动子已用于直接表达博莱霉素抗性基因,大肠杆菌*lacZ*和牛凝乳酶原。

解脂耶氏酵母具有很大潜力从克隆基因中分泌大量的蛋白质,尤其是大分子量蛋白质。因此,人们尽力从分子水平上最大限度地提高特异蛋白的表达量。相信随着对解脂耶氏酵母研究的不断深入,这一系统在表达具有商业价值的外源蛋白方面将越发显示其重要作用。

### 参 考 文 献

[1] Singh A, Lugo J M, Kohr J W *et al.* Nucleic Acids Res, 1984, 12:8927~8932.

- [2] Gaillardin C, Ribet A M, Heslot H. *Curr Genet*, 1985, 10:49~58.
- [3] Matoba S, Fukuyama J, Wing R A *et al.* *Mol Cell Biol*, 1988, 8:4904~4916.
- [4] Poritz M A, Siegel V, Hansen W *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:4315~4319.
- [5] Le Dall M T, Nicaud J M, Gaillardin C. *Curr Genet*, 1994, 26:38~44.
- [6] Schmid-Berger N, Schmid B, Barth G. *J Bacteriol*, 1994, 176:2477~2482.
- [7] Blanchin-Roland S, Cordero Otero R, Gaillardin C. *Mol Cell Biol*, 1994, 14:327~338.
- [8] Ogrydziak D M, Demain A I, Tannenbaum S R. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 497:525~538.
- [9] Nicaud J M, Fournier P, La Bonnardiere C *et al.* *J Biotechnol*, 1991, 19:259~270.
- [10] Tharaud C, Ribet A M, Costes C *et al.* *Gene*, 1992, 121:111~119.
- [11] Buckholz R G, Gleeson M A G. *Bio/technology*, 1991, 9:1067~1072.
- [12] Hamsa P H, Chatto B B. *Gene*, 1994, 143:165~170.
- [13] Ching-Chuan Chang. Thesis of Doctor in University of California, 1997, 12.
- [14] Bauer R, Paltauf F, Kohlwein S D. *yeast*, 1993, 9: 71~75.