

巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展*

欧阳立明¹⁾ 张惠展 张嗣良

(华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

刘志敏

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 巴斯德毕赤酵母是一种近年来广泛使用的基因表达系统, 它具有表达率高、遗传稳定、产物可分泌、发酵工艺成熟等许多优点. 综述了该系统在载体类型、载体元件 (包括启动子、选择标记和信号肽序列)、受体类型、以及提高整合拷贝数等方面的进展.

关键词 巴斯德毕赤酵母, 基因表达, 系统

学科分类号 Q78

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是一种甲醇酵母, 它可以在以甲醇为唯一碳源和能源的培养基中生长. 这是因为其细胞的过氧化物酶体中含有甲醇代谢途径的必需酶, 如醇氧化酶 (alcohol oxidase, AOX)、二羟丙酮合成酶和过氧化氢酶等. 其中醇氧化酶是甲醇利用途径中的第一个酶, 它催化甲醇被氧化为甲醛和过氧化氢^[1]. 当细胞以葡萄糖、甘油、乙醇为碳源生长时, 不能检测到 AOX 的活性, 而在甲醇培养的细胞中, 该酶可占细胞总蛋白的 30% 以上^[2]. AOX₁ 启动子的强诱导性使它下游的外源基因易于调控, 并具有很高的表达率. 作为真核生物, 巴斯德毕赤酵母能使外源真核基因正确翻译和翻译后加工, 并能对许多蛋白质产物进行分泌, 使产物易于提纯. 另外, 与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 相比, 二者均对蛋白质产物进行 N-乙酰糖基化, 主要结构为高甘露糖型, 但前者糖链平均为 8~14 个甘露糖基, 而后者为 50~150 个, 所以巴斯德毕赤酵母对蛋白质产物的糖基化方式更接近高等生物, 因而临床应用中更安全. 同时, 自 20 世纪 70 年代起建立的以巴斯德毕赤酵母作为单细胞蛋白生产菌的高密度发酵方法已经成熟, 干细胞产量可高达 100 g/L. 种种优势使这种微生物成为近年来极受青睐的基因表达系统宿主. 用该系统成功表达的外源基因有三十多种, 其中大部分为医药制品, 如人白介素-2、人血清白蛋白、肿瘤坏死因子、乙肝表面抗原、人巨细胞病毒 (cytomegalovirus) 抗原、抗凝血因子水蛭素衍生物 (hirudin variants)、血管紧张肽-I 转换酶等, 有些即将进入市场^[3,4]. 大量的研究工作使巴斯德毕赤酵母基因表达系统出现了许多新进展.

1 载体类型的发展

由于巴斯德毕赤酵母没有稳定的附加体质粒, 所以一般用整合型质粒作为外源基因的表达载体. 载体通常含有 AOX₁ 启动子 (5'-AOX₁)、多克隆位点、AOX₁ 转录终止子 (AOXt)、组氨酸脱氢酶基因 HIS4、3'-AOX₁ 以及来自大肠杆菌质粒 pBR322 的 Ap^r 和 ColE1ori 序列, 如 pHIL-D1. 整合位点一般位于 HIS4 区或 AOX₁ 区. AOX₁ 区的整合包括同源双交换引起的基因置换和位点特异性单交换引起的基因插入. 前者使宿主的 AOX₁ 结构基因被外源基因表达盒所替换, 因而使宿主失去大部分甲醇利用能力, 称 Mut^s (methanol utilization slow); 后者则并未破坏宿主的 AOX₁ 结构基因, 称 Mut⁺. Mut^s 在甲醇培养基中生长缓慢, 但有时在摇瓶培养条件下表达量更高^[3], 不过由于其达到表达高峰的时间过于漫长 (150~200 h), 并不推荐用于工业生产. HIS4 区的整合方式为位点特异性单交换引起的基因插入, 整合后使组氨酸缺陷型宿主 (his4) 恢复野生型. HIS4 区或 AOX₁ 区位点的整合都使转化子具有 HIS4 基因, 因而可利用表型差异进行筛选.

对于载体的改进包括建立可在体外插入多个目的基因拷贝的载体, 如 pAO815 系列. pAO815 中提供了位于 5'-AOX₁ 和 AOXt 之间的 EcoRI 位点以插入外源基因. 在插入第一个外源基因拷贝后,

* 国家自然科学基金资助项目 (29976013).

¹⁾ 通讯联系人. 北京市丰台区东大街 20 号 8 所 2 室 (100071).

Tel: (010) 66948825, E-mail: oylm@163.net

收稿日期: 1999-03-10, 修回日期: 1999-07-10

还可以将 5'-AOX₁-GENE-AOX₁ 片段以 *Bgl* II-*Bam* HI 双酶切切下, 再次插入已含一份拷贝的载体中, 使两个外源基因表达盒串联起来^[5]. 但这种载体可插入的外源基因拷贝数很有限, 并且整合后不稳定^[6].

鉴于许多人把提高整合的拷贝数作为提高外源基因产量的重要手段, 人们又发展了可以快速筛选高拷贝整合转化子的载体, 如 pPIC9K. 该载体含有来自转座子 Tn903 的 Kan^r 基因, 可依靠基因剂量效应, 以对 G418 的抗性水平快速筛选出高拷贝整合的转化子^[7].

2 载体元件的发展

载体是由许多元件构成的, 包括启动子、终止子、选择标记、报告基因、复制起点等等, 对分泌型载体还需要信号肽序列. 近年来, 这些元件也变得更为丰富和有效.

2.1 启动子

最常用的启动子是 AOX₁ 启动子 (AOX₁ promoter, P_{AOX1}), 它的甲醇诱导性很强, 使在它控制下的外源基因能得到较高的表达. 也有人曾经用过 P_{AOX2}^[8] 和 P_{DAS}^[9]. AOX₂ 功能与 AOX₁ 相同, 产物的氨基酸序列也有 97% 同源, 但其启动子的强度大大低于 AOX₁^[10]. P_{DAS} 是二羟丙酮合成酶基因启动子.

P_{GAP} (三磷酸甘油醛脱氢酶启动子) 是最近在巴斯德毕赤酵母中克隆到的一个组成型启动子, 在它控制下的 β -LacZ 基因表达率比甲醇诱导下的以 P_{AOX1} 启动的产量更高^[11]. 由于该组成型启动子不需甲醇诱导, 发酵工艺应该更为简单, 而同时其产量很高, 所以成为代替 P_{AOX1} 的最有潜力的启动子.

2.2 选择标记

选择标记一般为对应于营养缺陷型受体的野生型基因, 常用 HIS4. 由于巴斯德毕赤酵母不能利用蔗糖, 所以也可用来源于酿酒酵母的蔗糖酶基因 SUC2 作为标记^[12]. 新的选择标记有前文提到的 G418^r 和 Zeocin^r (Invitrogen, Sandiego, CA). Zeocin^r 在细菌和酵母宿主中都可表达, 因此缩短了穿梭载体的长度. 但 Zeocin 是一种强诱变剂, 可能导致转化子产生不可预料的突变.

2.3 信号肽序列

分泌表达是一种理想的蛋白质生产方式. 一般不分泌的蛋白质很难使其分泌, 而像人血清白蛋白、转化酶、小牛溶菌酶等分泌蛋白, 用自身的信

号肽序列即可在巴斯德毕赤酵母中成功表达. 如果自身信号肽序列效果不佳, 则可尝试来自酿酒酵母 α -交配因子 (AMF) 的信号肽序列. pre-proAMF 很有用, 尤其是对于小分子物质, 如抑肽酶 (aprotinin)、表皮生长因子、凝血因子 XII 等^[6]. 在巴斯德毕赤酵母载体中还使用过蔗糖酶基因 SUC2 (来自酿酒酵母) 的信号肽序列、酸性磷酸酶基因 PHO1 的信号肽序列、以及间质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) / 间质金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP) 信号肽序列^[6].

泛肽 (ubiquitin) 的过度表达可增加在酿酒酵母中整合的人白细胞蛋白酶抑制剂的分泌产量. 而巴斯德毕赤酵母中的分泌产物之一泛肽, 据推测也应可增加巴斯德毕赤酵母中外源蛋白的分泌. 天然的泛肽高分泌巴斯德毕赤酵母菌株目前还未发现, 但人们正试图通过基因工程构建能高分泌泛肽的巴斯德毕赤酵母菌株, 以验证上述推测^[6].

在巴斯德毕赤酵母的基因表达系统中, 如果外源基因产物不能分泌到胞外, 则可将产物连上一个定向肽 (peroxisome targeting signal, PTS), 使其定向输送到过氧化物酶体, 以免产物积累对宿主细胞产生毒害, 同时产物本身的稳定性也会大大加强. 这在用多型汉逊酵母表达类胰岛素生长因子 II 中已得到应用^[13]. Waterham 等^[11] 也利用定向肽在巴斯德毕赤酵母中成功地将 P_{GAP} 启动下的 β -半乳糖苷酶定向输送到过氧化物酶体.

3 受体菌

使用最广泛的巴斯德毕赤酵母受体是由 Cregg^[14] 1985 年建立的 GS115, 它具有组氨酸脱氢酶缺陷型基因 his4, 可接受含 HIS4 的载体而具有 HIS⁺ 表型以筛选转化子.

此外, 为增加分泌蛋白的稳定性, 避免被宿主蛋白降解, 可使用蛋白酶缺陷型菌株, 如 SMD1168 (his4, pep4), SMD1165 (his4, prb1) 和 SMD1163 (his4, pep4, prb1). pep4 和 prb1 分别表示编码蛋白酶 A 和蛋白酶 B 的基因有缺陷^[6].

4 整合拷贝数

巴斯德毕赤酵母载体在宿主染色体上大多为单拷贝整合, 但由于 P_{AOX1} 在甲醇诱导下的强启动性, 以及整合后常常稳定, 所以即使单拷贝也能获得较高的产量. 如乙肝表面抗原在巴斯德毕赤酵母

中的单拷贝产率可达 0.4 g/L, 而酿酒酵母至少需 50 拷贝才能达到这个水平^[15]。但在另一些例子中, 提高拷贝 (10 个以上) 可大大增加表达, 如人肿瘤坏死因子 (TNF)、破伤风毒素片段 C 和鼠表皮生长因子 (EGF) 等^[6]。目前许多研究者把提高整合拷贝数作为提高表达的重要方面。

提高整合拷贝数的方法主要有:

a. 不同的转化方法导致产生天然高拷贝转化子。巴斯德毕赤酵母的转化方法有原生质法、电激法、氯化锂法等, 其中以原生质法转化使细胞群中产生的多拷贝转化子频率相对较高, 但若使用 G418 检测拷贝数, 则配合电激法转化的效果较好^[7]。

b. 体外在载体上多次插入目的基因片段, 如前述的 pAO815 系列。但这种多拷贝整合不太稳定, 且拷贝数有限。

c. 将载体中目的基因两端连上来自宿主 rDNA 或其他非必需高重复的基因片段, 通过同源重组而达到高拷贝整合的目的。由于 rDNA 在酵母基因组中有 100~200 个重复单元, 所以这是一种提高拷贝数的理想方式。该策略已在酿酒酵母^[16, 17]、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)^[18] 和产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)^[19] 中得到成功应用, 而在巴斯德毕赤酵母中尚未见实验报道。

如何高效快速地筛选高拷贝整合转化子是伴随着提高拷贝数而产生的重要技术问题。传统的方法有通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫杂交检测蛋白产物水平来间接检测外源基因的拷贝数, 或用 DNA 探针杂交直接检测拷贝数。这些方法相对较为费时, 目前人们发展了 PCR 法检测外源 DNA 含量的方法, 更为方便快捷^[20]。另外, 用前文提到过的含 G418^r 基因的载体转化巴斯德毕赤酵母, 可通过转化子对 G418 的抗性水平快速筛选高拷贝转化子。

巴斯德毕赤酵母基因表达系统的诸多优势使近年来其应用范围大大加宽, 表达产物除了人畜药用制品外, 还包括来自植物、动物和细菌的各种酶、膜受体蛋白、含辅基的蛋白质以及可用于研究晶体结构的蛋白质等, 它还可以同时表达酶组分比例适当的一个酶系而以全细胞作为生物催化剂^[4]。这些尝试为促进人们认识分子生物学领域的许多问题以及巴斯德毕赤酵母自身的背景奠定了实验基础, 也必将使这一表达系统更加完善。我们相信, 在不断的尝试和改进中, 巴斯德毕赤酵母在分子生物学

的理论和应用领域会发挥出越来越重要的作用。

参 考 文 献

- 1 van der Klei I J, Harder W, Veenhuis M. Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeast: a review. *Yeast*, 1991, 7 (3): 195~209
- 2 Couderc R, Baratti J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: Purification and properties of alcohol oxidase. *Agric Biol Chem*, 1980, 44: 2279~2289
- 3 Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent Advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1993, 11 (8): 905~910
- 4 Hollenberg C P, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8 (5): 554~560
- 5 Vedvick T, Buckholz R G, Engel M, et al. High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*. *J Ind Microbial*, 1991, 7 (3): 197~201
- 6 Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190 (1): 55~62
- 7 Scorer C A, Clare J J, McCombie W R, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio/Technology*, 1994, 12 (2): 181~184
- 8 Ohi H, Miura M, Hiramatsu R, et al. The positive and negative cis-acting factors for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol Gen Genet*, 1994, 243 (5): 489~499
- 9 Tschopp J F, Brust P F, Cregg J M, et al. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acid Res*, 1987, 15 (9): 3859~3876
- 10 Cregg J M, Madden K R, Barringer K J, et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*, 1989, 9 (3): 1316~1323
- 11 Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde 3-phosphate and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186 (1): 37~44
- 12 Sreekrishna K, Tschopp J F, Fuck M. Invertase gene (SUC2) of *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant marker for transformation of *Pichia pastoris*. *Gene*, 1987, 59 (1): 115~125
- 13 Faber K N, Westra S, Waterham H R, et al. Foreign gene expression in *Hansenula polymorpha*: A system for small functional peptides. *Appl Microbial Biotechnol*, 1996, 45 (1~2): 72~79
- 14 Cregg J M, Barringer K J, Hessler A Y, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*, 1985, 5 (12): 3376~3385
- 15 Murook Y, Imanaka T. Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Application. New York: Marcek dekker Inc, 1994. 134
- 16 Lopes T S, Klootwijk J, Veenstra A E, et al. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1989, 79 (2): 199~206
- 17 Lopes T S, Hakkaart G-T A J, Koerts B L, et al. Mechanisms of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1991, 105 (1): 83~90
- 18 唐南筠, 霍克克, 李育阳. 乳酸克鲁维酵母高拷贝整合载体的构建和应用. *生物化学与生物物理学报*, 1996, 28 (5): 540~545
- 19 Tang N J, Huo K K, Li Y Y. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1996, 28 (5): 540~545

- 19 Kondo K, Miura Y, Sone H, *et al.* High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida Utilis*. *Nature Biotechnology*, 1997, **15** (5): 453~457
- 20 Linder S, Schliwa M, Kube-Granderath E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques*, 1996, **20** (6): 980~982

Advances in the Studies of *Pichia pastoris* as a Heterologous Gene Expression System. OUYANG Li Ming, ZHANG HuifZhan, ZHANG SiLiang (*College of Bioengineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200037, China*); LIU ZhiMin (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*

100071, China).

Abstract *Pichia pastoris* has been utilized widely as a heterologous gene expression system recently. There are several advantages such as high productivity, stable inherity, secretable product, and mature fermentation techniques. The advances of vector types, vector elements (including promoter, selection marker and signal sequence), host strains, and the strategy for increasing integration copy number were reviewed.

Key words *Pichia pastoris*, gene expression, system

光合生物色素-蛋白质复合物的多样性

李爱芬¹⁾ 陈 敏

(烟台大学生物化学系, 烟台 264005)

周百成

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 通过对近年来放氧型光合生物有关研究结果的概括分析, 提出放氧型光合生物光系统 I、光系统 II 及捕光色素-蛋白质复合物具有多样性, 并根据其 PS I 复合物的 77 K 荧光发射特点, 指出放氧型光合生物光合系统中的能量传递方式也可能存在多样性。

关键词 光合生物, 色素-蛋白质复合物, 多样性

学科分类号 Q946

光合生物在地球上已经有三十几亿年的历史。在光合生物的进化问题上, 曾呈奎和周百成^[1]根据光合色素、光合器和光系统的变化, 将光合生物的进化分为光合细菌、红蓝植物、杂色植物和绿色植物的产生和发展四个阶段。主要进化途径有两条, 一条是有细菌叶绿素和光系统 I 的光合细菌, 另一条是有叶绿素 (Chl) a 和两个光系统的放氧型光合生物。放氧型光合生物在从藻类到高等植物的进化过程中, 光系统 II 的捕光色素-蛋白质复合物的多样性最突出。按曾呈奎等^[1]的观点, 放氧型光合生物红蓝植物、杂色植物和绿色植物的 LHC 分别是藻胆体、Chl a/c 蛋白质复合物和 Chl a/b 蛋白质复合物。

1 绿色植物的色素-蛋白质复合物

1.1 绿色植物的 PS I 复合物

高等植物的 PS I 复合物在 77 K 条件下有 730 nm 长波荧光峰^[2]。大多数绿藻 PS I 复合物的

光谱特性与高等植物不完全相同, 如松藻 (*Codium sp*) 的 PS I 复合物在 77 K 条件下的荧光峰位于 717 nm^[3], 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的 PS I 复合物的 77 K 荧光峰位于 714~718 nm 之间。刺松藻 (*Codium fragile*) 和假根羽藻 (*Bryopsis corticulans*) 的 PS I 复合物在 710~715 nm 处有一个肩峰^[4]。

绿色植物的 PS I 复合物都是由核心复合物 (CCI) 和 LHCI 组成的。在 77 K 条件下 CCI 的荧光峰位于 720 nm^[5], LHCI 的位于 730 nm。在温和条件下, LHCI 可分解为含有色素的 LHCI a 和 LHCI b 两部分。在玉米中, LHCI a 的 77 K 荧光峰位于 680~690 nm, LHCI b 的荧光峰位于 730 nm^[6]。除 LHCI a 和 LHCI b 之外, 在大麦^[7]和玉米^[8]中还含有另外两种含色素的组分, 称作 LHCI c 和 LHCI d。

¹⁾ 通讯联系人: 烟台大学生物化学系, 烟台 264005。

Tel: (0535) 6888995-2116, E-mail: glbio@ytu.edu.cn

收稿日期: 1999-03-11, 修回日期: 1999-10-10