

人重组白蛋白基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达*

崔蕴霞 明文玉 银巍 任哲 汪健 顾军**

(中山大学分子医院研究中心 广州 510089)

关键词: 人重组白蛋白, 酵母菌, 高效表达

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 02-0244-04

白蛋白是由人血浆提取的一类血液制剂, 主要用于临床纠正因大手术、创伤、器官移植等引起的急性血容量减少及各种原因引起的水、电解质和胶体平衡失调, 以防止和控制休克。还用于急性胃肠出血、肾透析、以及严重的慢性疾患, 如消化吸收不良、肝硬变、肾病综合症、脑血管意外或脑局部缺血等内科疾病, 特别是合并水肿的病例。其唯一的原料来源是人血, 由于肝炎、爱滋病献血、献浆员中的交叉感染, 导致原料短缺和生产成本大大提高。

九十年代以来, 采用基因工程技术将人白蛋白基因, 与适合酵母菌转化载体重组, 转化于酵母菌中, 获得转基因菌株, 可提高白蛋白生产水平^[1], 并能较为有效而温和地分离白蛋白, 避免了使用人血浆生产白蛋白所带来的盲目性和危害性。本研究采用巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*, Pp) 作为表达宿主, 其 AOX (醇氧化酶基因) 启动子, 可通过甲醇严格地调控表达。在廉价的非选择培养基上高密度连续培养可获得较高的蛋白产量, 分泌的外源蛋白质占有分泌蛋白的 80% 以上, 利于工业规模的分离和下游加工。这一生产技术的研究将会产生巨大的社会效益和经济效益。

1 材料和方法

1.1 菌株

表达人重组白蛋白的巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 菌株由汪健先生惠赠。

1.2 培养基

BMGY 培养基: 生物素 2g、甘油 10g、酵母提纯物 6.7g 定容至 1L; BMMY 培养基: 生物素 2g、甲醇 10mL、酵母提纯物 6.7g 定容至 1L; YPD (酵母琼脂糖培养基): 酵母提取物 1g, 蛋白胨 2g, 葡萄糖 2g, 琼脂 1.5g 定容 100mL。培养基试剂均为进口分析纯。

1.3 菌株筛选及鉴定^[2]

pPIC9K 质粒含有一个卡那霉素的抗性基因, 其转染的宿主菌能够耐受 G418, 当转入的外源基因的拷贝数增多时, 宿主菌耐受 G418 的量就越高, 其蛋白表达量可能也会增加, 我们用含不同浓度 G418 的 YPD 板来逐级筛选含高拷贝数质粒的酵母菌落, 能耐受最高浓度 G418 的酵母菌落被选出, 并挑取其中一个单菌落被用于蛋白表达 (按 Invitrogen 公司提供的方法)。

1.4 人重组白蛋白的诱导表达^[3]

采用甲醇诱导法引入转变期诱导, 发酵表达白蛋白, 两种诱导方法分别为: (1) 在达到生长极限时使

* 国家新药博士创新基金资助项目

** 通讯作者: 北京大学生命科学学院

作者简介: 崔蕴霞 (1964-), 女, 河南郑州人, 中山医科大学分子医学研究中心博士后研究人员, 副研究员。现在暨南大学生命科学院遗传教研室, 主要从事分子生物学与免疫学。

收稿日期: 2000-04-12, 修回日期: 2000-11-06

用甲醇培养基并加入甲醇诱导;(2)在转变期加入甘油,并随甘油同时加入甲醇诱导。甘油和甲醇混合补料,可使菌株代谢和合成的速率比仅用甲醇诱导时明显提高。

诱导表达过程分别为:种子培养,增菌(BMGY 培养基),BMMY 培养基甲醇诱导表达和 BMGY 培养基甲醇诱导表达,SDS-PAGE 分离,Western blot 鉴定产物。

1.5 产物特异性鉴定

采用 Western blot 鉴定酵母表达人重组白蛋白的特异性。其方法为:用 SDS-PAGE 分离出来产物条带进行电转化显色后分析。

2 结果和讨论

2.1 菌株稳定性鉴定

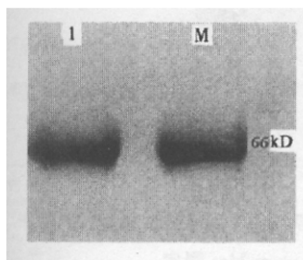


图 1 G418 为 4mg/mL 时挑选出的酵母菌株经甲醇诱导表达产物

将构建好的菌株经 G418 抑制法进行筛选鉴定。结果表明,在含有 4mg/mL G418 的 YPD 平板上,长出了酵母菌落,选出其中一个菌落,经 YPD 培养基多次传代培养后,用于外源蛋白诱导表达,表达产物如图 1。该表达菌株经过 40 多代培养后,仍可分泌特异性蛋白。这表明菌株有较好的稳定性。

2.2 不同诱导方法对菌株高效表达的影响

分别采用甲醇诱导法和甘油补料甲醇诱导法发酵表达白蛋白。结果如图 2、图 3 和图 4。试验对两种方法进行了比较,相同培养时间两种诱导方法所表达的产物产量相差较大(图 2、图 3 所示),而且,两种诱导方法表达产物的产量达到最高产量所需的培养时间也不同。甲醇诱导法所表达的产物培养 24h 即开始有明显的蛋白分泌,在培养 48h 以后便没有明显的增长梯度(图 2 所示),而甘油补料甲醇诱导法培养 24h 开始有一定量的蛋白分泌,以后随培养时间的增加而呈梯度增加,培养至 150h,蛋白含量可达最大值(如图 3)。

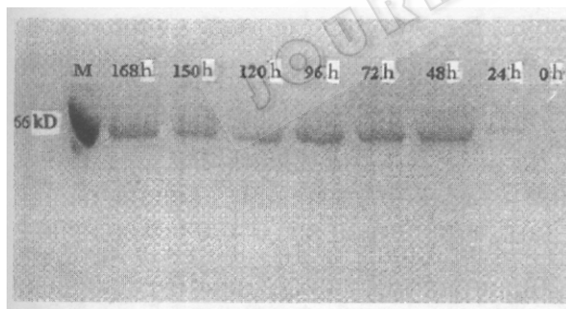


图 2 甲醇诱导法不同诱导时间的蛋白产量

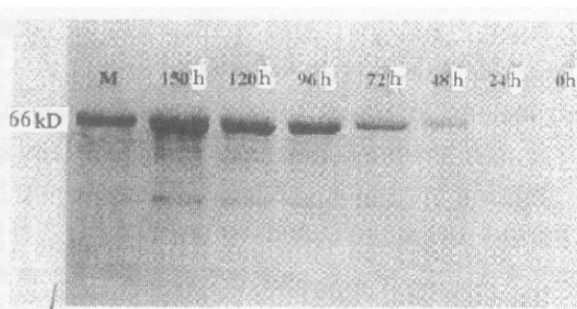


图 3 甘油补料甲醇诱导法不同诱导时间的蛋白产量

2.3 免疫沉淀结果

取上述两种诱导方法所表达的产物,采用 Western blot 法,进行电转化显色,其结果如图 5。两种方法所表达的产物对抗人白蛋白抗体均有良好的亲合性,这表明两种诱导方法所分泌表达的蛋白产物均为特异性白蛋白。

3 讨论

巴斯德毕赤酵母是最近迅速发展的一种表达宿主,含有特有的醇氧化酶基因(Alcohol Oxidase, AOX)启动子。研究表明,AOX 的表达是在转录水平调控的,其启动子能非常有效地控制外源基因的表达^[4,5]。目前,已在 *P. pastoris* 染色体中鉴定了两个 AOX 基因(AOX1 和 AOX2),并已被分离和克

隆^[6-8]。两者所编码的蛋白质有 97% 的同源性和几乎相同的特异催化活性,不同的是 AOX1 基因的启动子(P_{AOX1})受甲醇强烈诱导, P_{AOX2} 则很弱,而且, AOX1 的表达遵从抑制/诱导规律,在以葡萄糖、甘油或乙醇为碳源时不表达,用甲醇诱导时表达率可占总细胞蛋白的 80% 以上。以甲醇诱导强启动子 AOX 起始基因转录这一特性对于利用 *P. pastoris* 生产外源基因蛋白是十分重要的。pPIC9K 载体构建的表达质粒转化到 *P. pastoris* 菌株内时,常整合到宿主基因组中,使其稳定表达外源蛋白的表达质粒中含有一些与宿主基因组相同序列,有利于表达质粒与基因同源重组,将外源基因的表达单位整合到基因组染色体的特定位置上。所以它是不因酵母传代而丢失的表达质粒,从而稳定表达目的产物。

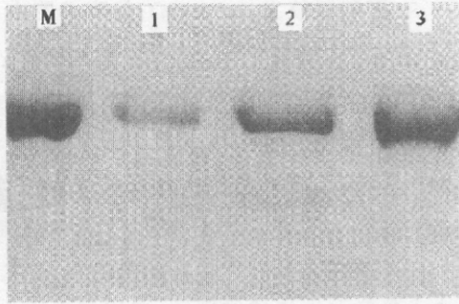


图 4 两种诱导方法在诱导 120h 蛋白产量
M:标准 BSA;1,2:甲醇诱导法分别 48、120h 蛋白产量;
3:甘油补料甲醇诱导法 120h 蛋白产量。

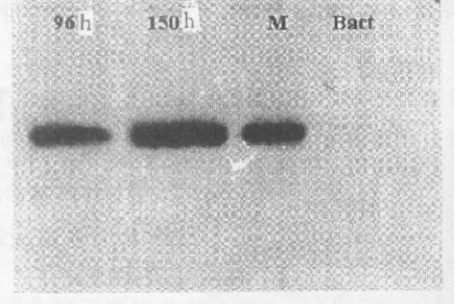


图 5 甘油补料甲醇诱导法分别诱导 96、150h 蛋白产物的 Western blot 测定

由于一些重组蛋白对细胞有毒性作用,在大容量、高密度培养过程中,需要将细胞扩增阶段和表达阶段分开。其它表达系统需极高浓度的抑制物来阻遏表达,诱导前必需将之去除。对于 *P. Pastoris* 在生物量扩增阶段,只要少量的抑制物,通常为甘油,即可以满足细胞有效的生长并有效地抑制外源基因的表达;在表达阶段,只需要让细胞耗尽剩余的甘油,再加入甲醇诱导即可。这样高密度的连续培养可以使表达产量提高。试验结果表明,先以甘油为碳源,以获得最大的菌密度($OD \approx 6.0$),在其生长末期,甘油几乎完全耗尽后,加入 1.5% (v/v) 的甲醇诱导 24h 后,可监测到强烈的表达,48h 以后达到最大产量,此后便稳定表达,但其最大产量与甘油补料法却相差很大(如图 2、图 3)。这是因为甘油补料甲醇诱导法,是在菌株转变期再加入甘油,由于 AOX1 的表达遵从抑制/诱导规律,这种方法使得某些菌株在代谢和合成中的速率比仅用甲醇时明显提高,只是达到峰值的时间要长一些,往往要 150h 左右。但此方法诱导分泌的蛋白产物可占总蛋白的 80%,产量为 10g/L,有利于工业规模的分离和下游加工。该蛋白具有良好的亲合活性,具有较好的工业化生产前景。

参 考 文 献

- [1] Fleer R, Yeh P, Amellal N, et al. *Biotechnology*. 1991, 9:968~975.
- [2] Scorer C A, Clare J J, McCombie W R, et al. *Bio/Technology*, 1994, 12:181~184.
- [3] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J, et al. *Gene*, 1993, 136:111~11.
- [4] Brierley R A. *Biochem Eng*, 1990, 1589:350~362.
- [5] Gregg J M. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12):3376~3385.
- [6] Cregg J M, Madden K R, Bamhagger K J, et al. *Mol Cell Biol*, 1989, 9(3):1316~11323.
- [7] Cregg J M. *Biotechnology* (NY), 1993, 11(8):905~910.
- [8] Veehuis M, Harder W. *The yeasts*, Vol 4, 2nd. London: Academic Press Limited, 1991.

HIGH LEVEL EXPRESSION OF HUMAN RECOMBINANT ALBUMIN GENE IN THE YEAST *PICHIA PASTORIS*

Cui Yunxia Ming Wenyu Yin Wei Ren Ze Wang Jian Gu Jun

(The Research Center of Molecular Medicine, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: The yeast *Pichia pastoris* was transformed by the multi-copy *Pichia* expression vector that can express secreted human albumin. The high level expression of cell line was selected after screening. The expression of human recombinant albumin in *Pichia pastoris* induced by different methods were compared. The ratio of secreted human albumin is 80% in total secreted proteins and the expression level reaches as high as is 10g/L.

Key words: Human recombination albumin, © Yeast *Pichia pastoris*, High level expression. cn