

巴斯德毕赤酵母表达系统优化策略

李洪钊 李亮助 孙强明 江宏映*

(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明 650118)

Strategies for Optimizing *Pichia pastoris* Expression System

Li Hongzhao Li Liangzhu Sun Qiangming Gang Hongying*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China)

关键词:巴斯德毕赤酵母,表达,优化策略

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)02-0288-05

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris* Pp)表达系统是目前分子生物学领域中用于表达重组蛋白的标准工具之一。Pp的如下优点是促成此表达系统在近十几年里迅速发展和被广泛应用的重要原因:Pp为单细胞真核生物,生长快,易于分子遗传学操作;Pp的醇氧化酶1(Alcohol Oxidase 1, AOX1)基因的启动子具有强诱导性和强启动性,适于外源基因的高水平诱导表达;Pp具有强烈的好氧生长偏爱性,可进行细胞高密度培养,利于大规模工业化生产;Pp可高水平分泌表达外源蛋白,纯化方便;Pp具有真核细胞的翻译后修饰功能。

迄今已有200多种外源蛋白在Pp中获得表达。但也有许多蛋白表达不理想,甚至不能表达。要实现目的蛋白在Pp中的成功表达并兼顾其实用性和安全性,必须充分考虑影响表达和应用的各种因素并采取有效的优化策略。

1 目的基因的特性

目的基因的特性是决定表达成败的首要因素。许多高A+T含量的基因由于成熟前终止而不能有效转录。特定的A+T富含区可作为多腺苷酸或转录终止信号,导致仅产生低水平或截短的mRNA^[1]。某些稀有密码子,尤其是稀有密码子密集区往往成为制约翻译速率的因素。目的基因特性对表达的影响被认为是一种具有种属特异性的现象^[2]。在某些情况下,可通过定点突变去除成熟前终止结构域^[3]和替换稀有密码子^[4]。但在更极端的情况下,即基因中存在大量A+T富含区和稀有密码子密集区时,往往需要进行全基因合成,使编码序列符合Pp偏爱性密码子用法和具有更高的G+C含量^[5]。

2 启动子选择

最广泛应用的启动子P_{AOX1}(醇氧化酶1启动子)^[6]是由甲醇诱导的强启动子。在某些情况下P_{AOX1}的使用受到限制,例如:甲醇不适用于食品工业生产,也是一种火灾隐患。故其它不用甲醇诱导的启动

* 通讯作者。E-mail: ganghongying@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: ganghongying@hotmail.com

作者简介:李洪钊(1972-)男,天津人,中国医学科学院医学生物学研究所在读硕士研究生,1995年毕业于南开大学生命科学院生物化学与分子生物学系,现主要从事基因工程药物方面的研究。E-mail: hongzhaoli@hotmail.com

收稿日期:2002-04-05,修回日期:2002-09-17

子也引人注目。

P_{GAP} (三磷酸甘油醛脱氢酶启动子)^[7]是一种组成型强启动子。使用 P_{GAP} 在发酵时不需甲醇诱导,不必更换碳源,工艺简单。但 P_{GAP} 不宜用于表达对 P_p 有毒的蛋白。 P_{FLDI} (依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶启动子)^[8]在以甲醇为单一碳源或以甲胺为单一氮源时,被强烈诱导。使用 P_{FLDI} 可选择以甲醇或甲胺(一种廉价的无毒氮源)诱导高水平表达,为选择符合实际应用要求的启动子提供了灵活性,也扩大了 P_p 的应用范围。

在 P_{AOX1} 、 P_{GAP} 和 P_{FLDI} 这些强启动子的驱动下,某些外源蛋白的表达水平过高,超过了宿主细胞翻译后处理加工能力所能承担的最大负荷,引起蛋白的错折叠、不加工或错定位^[9,10]。此时或在其他一些应用情况下,需要选择较温和的启动子,如 P_{PENS} (一种过氧化物酶体基质蛋白启动子)^[11]和 P_{YPTI} (一种 GTP 酶启动子)^[12]。

3 mRNA 的非翻译区(UTR)

UTR 对蛋白表达的影响主要表现在 mRNA 的翻译水平上。 $AOX1$ mRNA 的 5'UTR 长 114nt,富含 A + U。目的蛋白 mRNA 应尽可能具有与 $AOX1$ mRNA 相近,最好是相同的 5'UTR。一般地,目的基因编码序列的第一个 ATG 应尽可能接近,最好处于 $AOX1$ ATG 的位置,此位置对应于大多数载体多克隆位点的第一个限制酶切点处。Sreekrishna 等通过调整人血清白蛋白 mRNA 与 $AOX1$ mRNA 的 5'UTR 相同后表达水平提高 50 倍以上^[13]。

4 起始密码子 AUG 的旁侧序列

起始密码子不可处于其周围序列形成的 RNA 二级结构中。通过 RNA 折叠分析可找到可能阻碍翻译正常起始的二级结构,利用替代密码子重新设计和调整翻译起始区及旁侧序列^[11]。另外,必要的 Kozak 共有序列也有助于翻译的正确起始。

5 表达菌株的甲醇利用表型与表达盒的染色体整合位点和方式

通过一种或两种 AOX 基因的删除,根据利用甲醇的能力, P_p 宿主菌可划分为 3 种表型^[6]。最广泛使用的菌株 GS115($his4$)含有野生型 $AOX1$ 和 $AOX2$ 基因,利用甲醇的表型为 Mut^+ (Methanol Utilization Plus)。KM71($his4$ $arg4$ $aox1 \Delta::ARG4$)菌株的 $AOX1$ 基因大部分被删除和取代,它必须依赖表达很弱的 $AOX2$ 基因,故利用甲醇表型为 Mut^s (Methanol Utilization Slow)。MC-100-3($his4$ $arg4$ $aox1 \Delta::SARG4$ $aox2 \Delta::Phis4$)的两种 AOX 基因均被删除,表型为 Mut^- (Methanol Utilization Minus)。这 3 种宿主菌都保留了利用来自载体的 $AOX1$ 启动子诱导表达外源基因的能力。

在 P_p 中一般使用整合型表达质粒,通过同源重组稳定整合于染色体的 $AOX1$ 区或 $HIS4$ 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。前者使染色体 $AOX1$ 基因被外源基因表达盒替换, Mut^+ 表型菌株会转变为 Mut^s 或 Mut^- ,而 Mut^s 和 Mut^- 菌株表型不变,后者不改变宿主原有的 $AOX1$ 基因,故各种菌株的 Mut 表型不变。 $HIS4$ 区的整合方式为位点特异性单交换。表达载体向 $HIS4$ 区或 $AOX1$ 区的整合赋予宿主菌野生型组氨酸脱氢酶基因,使其表型由 HIS^- 变为 HIS^+ ,可以此筛选转化子。

带有变异 AOX 基因的菌株有时可获得比野生型(Mut^+)菌株更高的外源基因,而且缓慢表达更有利于蛋白的正确折叠^[6]。这些菌株诱导表达时需要的甲醇量要低的多,这对于大规模发酵罐生产降低火灾隐患很有意义。

很难预见某种外源蛋白在何种 Mut 表型的菌株中表达水平更高,故建议考察各种 Mut 表型菌株中的表达情况,经验性地选择适于特定外源蛋白表达的株型。原则上,对于胞内表达应尽量选用非 Mut^+ 菌株,使蛋白产物中 AOX 蛋白量较少,而目的蛋白相对较多,这样更有利于简化下游的纯化。但这些菌株利用甲醇能力低,生长缓慢,可添加其他碳源(如甘油、山梨醇、丙氨酸等)来加快细胞的生长和代谢,提高目的蛋白产率^[11]。

6 基因剂量

蛋白表达的优化往往涉及多拷贝表达株的筛选。含多拷贝整合表达盒的菌株常比单拷贝者表达量高,但情况并非总是如此。 P_p 表达载体在染色体上大多为单拷贝整合,但基于整合的稳定和 *AOX1* 启动子的强启动性,一般单拷贝也可能获得较高的表达水平。如含单拷贝乙肝表面抗原(HBsAg)基因的表达株可获得 0.4 g/L 的产量^[14]。多拷贝整合则有利于充分发挥 P_p 的表达潜力。最近的研究显示,在 1~8 整合拷贝数范围内,HBsAg 表达量随基因剂量的增加而成比例升高^[15]。理论上表达量会随基因拷贝数的增加而上升,但也有少数例外,即拷贝数增加对表达产生负效应^[9]。高拷贝低表达的原因可能在于 mRNA 翻译、蛋白折叠效率的限制,而对于分泌效率低的蛋白,过高表达会对分泌途径产生负反馈抑制。

表达载体整合入染色体的两种方式产生多拷贝重组子的概率不同。位点特异性单交换引起的多拷贝基因插入比在两个独立单位点发生双交换产生多拷贝基因的概率高,大约为 1%~10%^[16]。所以选择单交换整合方式更有利于筛选多拷贝重组子。

获得多拷贝重组子的方法主要有 (1) 在体外利用同尾酶向载体中多次插入首尾相连的表达盒^[10]。此法的优点是一次整合,即可有多个表达盒插入染色体。但体外基因操作较繁琐。(2) 利用含 P_p *HIS4* 基因和细菌 *Tn903 kan^r* 基因的表达载体,根据 G418 抗性水平与 *kan^r* 拷贝数的正相关性,筛选到高拷贝重组子^[17]。(3) 利用含细菌 *Sh ble* 基因的表达载体,根据 zeocin 抗性水平与 *ble* 基因拷贝数的正相关性,筛选到高拷贝重组子^[18]。*ble* 基因很小(375bp),可兼作 *E. coli* 和 P_p 的筛选标志,故载体很小(仅 3kb),易操作。利用抗药性水平获得高拷贝重组子的方法简单快速。但相当大的一部分高抗性转化子不含多拷贝基因。故在此法基础上,需进一步筛选确定真正的高拷贝高表达重组子。另外 zeocin 是一种诱变剂,有引起转化子突变的可能。(4) 利用 DNA 分析方法检测外源 DNA 含量^[19],此法更为直接快捷,但应辅以前述方法以降低工作量,提高筛选效率。(5) 将目的基因两端连上宿主 rDNA 的非必需片段,通过同源重组整合于大量的 rDNA 重复单元中,以获得高拷贝。此方法见于酿酒酵母表达系统^[20],具有在 P_p 中成功应用的可行性。

基因剂量与表达水平的关系取决于特定的外源蛋白。所以在获得多拷贝重组子的基础上,要进一步筛选确定因具有合适拷贝数而显示最佳表达水平的菌株,亦即高表达菌株的筛选应以表达的蛋白量为最终标准。可利用 SDS-PAGE^[15]、菌落免疫印迹^[7]和活性分析^[21]等方法检测目的蛋白的表达水平。

7 分泌表达

P_p 中外源蛋白的表达有胞内和分泌两种方式。因 P_p 只分泌很低水平的内源蛋白,分泌表达的外源蛋白纯化非常方便,故分泌表达为优先选择的方式。但基于蛋白稳定性和折叠的需要,分泌表达方式通常限于天然宿主的分泌蛋白,而天然非分泌蛋白往往难于分泌表达。同样,天然分泌蛋白如血清白蛋白、生长激素等也难以在胞内表达为可溶性蛋白^[11]。所以表达方式的选择往往受限于目的蛋白本身的特性。

用于引导目的蛋白在 P_p 中分泌表达的信号肽包括某些外源蛋白自身的天然信号肽、酿酒酵母 α 交配因子(α -MF)前原肽和 P_p 酸性磷酸酯(Pho1)信号肽等^[22],其中 α -MF 信号肽应用最广。各种信号肽在不同情况下使用的效果大不相同^[22-23]。不适合的信号肽可致信号肽加工不完全,或者蛋白分泌水平低,甚至不能分泌。尝试不同的信号肽、对信号肽进行突变改造或人工全合成信号肽等策略可用于实现信号肽正确加工和提高分泌水平^[24-26]。

8 翻译后修饰

P_p 可对分泌蛋白进行 O-和 N-连接糖基化修饰^[27-28]。与酿酒酵母相比, P_p 表达产物的糖链短且不含 α -1,3 连接的甘露糖残基,故抗原性相对较弱。但 P_p 糖蛋白因与哺乳动物糖蛋白糖链结构的差异而具有的潜在抗原性,使其在医药工业上的应用受到一定的制约。它们在哺乳动物体内可被免疫系统清除而失去效能,而且有引起超敏反应的危险性。

解决这一问题的策略有:尝试胞内表达,避免目的蛋白的糖基化;对非活性中心的糖基化位点进行突变改造,消除糖基化^[29];共表达糖链加工酶,去除抗原性强的糖链结构,使糖链结构更接近哺乳动物。

从而降低抗原性^[30]。

9 产物稳定性

提高目的蛋白稳定性,使之免受蛋白酶降解的常用的3种策略^[1]如下:一是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,增加蛋白酶的底物以减少目的蛋白降解。二是因 P_p 可在较宽的pH范围内生存,调节培养基pH值抑制蛋白酶活性。三是使用蛋白酶缺陷菌株,如SMD1163、SMD1165和SMD1168。但这些菌株活性差,生长慢且难转化,所以只有在其他方法不能奏效时才推荐使用。

此外,可通过共表达蛋白酶抑制物来抑制蛋白酶活性,减少目的蛋白降解^[1],可将目的蛋白与一种在 P_p 中稳定的蛋白伴侣融合表达,通过改变目的蛋白的性质来提高稳定性^[31],也可尝试将目的蛋白连上一个过氧化物酶体靶向信号(peroxisomal targeting signal, PTS),使其被分选转运入过氧化物酶体贮存起来,免受蛋白酶降解,还可减少对宿主细胞的毒害作用^[32]。

10 发酵条件

P_p 具有强烈的好氧生长偏爱性,可在极高的培养密度下维持高水平表达,因而利于大规模工业化生产。表达菌株很易从摇瓶培养过渡到大批量高密度发酵。通常先以摇瓶小规模表达,筛选高表达菌株并初步确定培养条件。在发酵罐中,可有效监控pH、通气量和碳源浓度并及时排出代谢产物,控制维持产物稳定性的因素,所以可达到最优化发酵条件,从而充分发挥大规模高密度发酵的优势,往往使菌体干重达100 g/L级水平,蛋白产量在每升克级以上水平。在高细胞密度发酵技术方面的大量研究基础上,已建立较成熟的补料分批培养和连续灌注培养方法^[33]。

结束语

基于已有的资料,在 P_p 中表达外源蛋白大约有50%~75%的可能性可获得较好的表达水平。最大的障碍就是首先要获得第一步的成功,即可获得一定水平的表达。取得这一阶段的成功后,通过调整已明确的各种参数来优化表达,常可获得诱人的表达水平^[6]。

随着对 P_p 表达系统的利用和探索的拓展和深入,必将不断获得新的优化表达策略,从而可充分发掘 P_p 表达系统在生物技术领域尤其是基因工程产品产业化方面的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] 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: 55~62.
- [2] Clare J J, Scorer C A, Buckholz R G, et al. Expression of EGF and HIV envelope glycoprotein. *Methods Mol Biol*, 1998, 103: 209.
- [3] Scorer C A, Buckholz R G, Clare J J, et al. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1993, 136: 111~119.
- [4] Zhang Y J, Jin N Y, Jiang W Z, et al. Cloning and expression of the external-glycoprotein gene mutant from HIV-2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and identification of the glycoprotein. *Biotechnol Appl Biochem*, 2001, 34: 1~4.
- [5] Withers-Martinez C, Carpenter E P, Hackett F, et al. PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A+T-rich malaria genome. *Protein Eng*, 1999, 12: 1113~1120.
- [6] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J Y, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, 16: 23~52.
- [7] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186: 37~44.
- [8] Shen S, Sultar G, Jeffries T W, et al. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1998, 216: 93~102.
- [9] Thill G P, Dark G R, Stillman G R, et al. Proceedings of the Sixth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. 1990: 477~490.
- [10] Brierley R A. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Mol Biol*, 1998, 103: 149~177.

- [11] Liu H , Tan X , Russell K A , *et al.* PER3 , a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris* , encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J Biol Chem* ,1995 , 270 :10940 ~ 10951.
- [12] Sears I B , O 'Connor J , Rossanese O W , *et al.* A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* . *Yeast* ,1998 ,14 :783 ~ 790.
- [13] Sreekrishna K , Barr K A , Hoard S A , *et al.* Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris* . *Yeast* ,1990 ,6 (special issue) :S447.
- [14] Gregg J M , Tschopp J F , Stillman C , *et al.* High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast , *Pichia pastoris* . *Biotechnology* , 1987 , 5 :479 ~ 485.
- [15] Vassileva A , Chugh D A , Swaminathan S , *et al.* Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *Protein Expr Purif* ,2001 , 21 :71 ~ 80.
- [16] Clare J J , Rayment F B , Ballantine S P , *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* , 1991 , 9 :455 ~ 460.
- [17] 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. *Biotechnology* , 1994 , 12 :181 ~ 184.
- [18] Higgins D R , Busser K , Comiskey J , *et al.* Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multi-copy selection. *Methods Mol Biol* , 1998 , 103 :41 ~ 53.
- [19] Linder S , Schliwa M , Kube-Granderath E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques* ,1996 20 :980 ~ 982.
- [20] Lopes T S , Hakkaart G-T A J , Koerts B L , *et al.* Mechanism of High-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* . *Gene* , 1991 , 105 :83 ~ 90.
- [21] Clare J J , Romanos M A , Rayment F B , *et al.* Production of mouse epidermal growth factor in yeast :high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* ,1991 , 105 :205 ~ 212.
- [22] Weiss H M , Haase W , Michel H , *et al.* Expression of functional mouse 5-HT_{1A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* : pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett* ,1995 , 377 :451 ~ 456.
- [23] Brocca S , Schmidt-Dannert C , Lotti M , *et al.* Design , total synthesis , and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci* , 1998 , 7 :1415 ~ 1422.
- [24] Raemaekers R J M , de Muro L , Gatehouse J A , *et al.* Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur J Biochem* , 1999 , 65 :394 ~ 403.
- [25] Martinez-Ruiz A , Martinez del Pozo A , Lacadena J , *et al.* Secretion of recombinant pro- and mature fungal alpha-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* : the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr Purif* , 1998 , 12 :315 ~ 322.
- [26] Kjeldsen T , Pettersson A F , Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* . *Biotechnol Appl Biochem* , 1999 , 29 :79 ~ 86.
- [27] Duman J G , Miele R G , Liang H , *et al.* O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol Appl Biochem* , 1998 , 28 :39 ~ 45.
- [28] Montesino R , Garcia R , Quintero O , *et al.* Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *Protein Expr Purif* , 1998 , 14 :197 ~ 207.
- [29] Urbatsch I L , Wilke-Mounts S , Gimi K , *et al.* Purification and characterization of N-glycosylation mutant mouse and human P-glycoproteins expressed in *Pichia pastoris* cells. *Arch Biochem Biophys* ,2001 , 388 :171 ~ 177.
- [30] Callewaert N , Larey W , Cadirgi H , *et al.* Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1 β -alpha-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris* . *FEBS Lett* ,2001 , 503 :173 ~ 178.
- [31] Bisht H , Chugh D A , Swaminathan S , *et al.* Expression and purification of Dengue virus type 2 envelope protein as a hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris* . *Protein Expr Purif* , 2001 , 23 :84 ~ 96.
- [32] Poirier Y , Erard N , MacDonald-Comber Petetot J. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris* . *FEMS Microbiol Lett* ,2002 207 97 ~ 102.
- [33] Higgins D R , Gregg J M. *Pichia* protocols , introduction to *Pichia pastoris* . *Methods Mol Biol* , 1998 ,103 :1 ~ 15.