

酿酒酵母细胞表面工程应用研究新进展

肖朝庭 傅 衍* 田 勇

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

摘 要 酿酒酵母表面展示工程是一个新兴的蛋白表达系统,由于它能进行蛋白翻译后修饰,能方便地对表达的蛋白产物进行检测和筛选,近年来应用研究发展迅猛。它在构建全细胞催化剂、抗原/抗体库、生物吸附剂、生物传感器、组合蛋白文库、免疫检测及亲和纯化中取得了很多新的应用,在蛋白质分子的功能研究与应用中发挥了更加重要的作用。

关键词 细胞表面工程 酿酒酵母

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0812-05

细胞表面工程是一种利用细胞内蛋白转运到膜表面的机制和原理,把异源蛋白展示在细胞表面的生物工程技术。它首先是在丝状噬菌体中创立的^[1],然后发展了 λ 噬菌体、T4噬菌体、T7噬菌体、杆状病毒、酵母等多种表面展示系统。在这些展示系统中,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)以其能进行对表达蛋白翻译后修饰加工、易于培养和可进行较方便的遗传操作的优势,近3年来在细胞催化剂、环境治理、蛋白质文库筛选、高亲和抗体、生物传感器、抗原/抗体库构建、癌症诊断等领域得到了迅猛发展。本文就此做一简要评述。

1 酿酒酵母细胞表面工程两种系统

根据外源目的蛋白与酿酒酵母细胞壁蛋白的融合部位,目前已报道的酵母表面工程的应用研究分为两种展示系统:凝集素系统(Agglutinin system)和絮凝素系统(Flocculin system)。

1.1 凝集素系统

交配型 a 和 α 酵母细胞分别表达 a 凝集素和 α 凝集素。 α 凝集素由 *AG α 1* 基因编码,与 a 型细胞的凝集素复合物的结合亚基相互作用,a 凝集素由两对二硫键连接的 *AGA1* 基因编码的核心亚基(725 个氨基酸残基)和 *AGA2* 基因编码的小结合亚基(69 氨基酸残基)组成^[2]。这两个亚基都是糖蛋白。 α 凝集素和 a 凝集素的核心亚基是由分泌信号区、活性区、富含 Ser/Thr 的支撑区和糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白附着信号区组成,并主要以 O-糖基化的形式存在。 α 凝集素在加工前具有 650 个氨基酸。

根据 α 凝集素和 a 凝集素分子水平上的信息,目的蛋白可插入细胞壁最外面的糖蛋白层中。 α 凝集素展示系统的必需的基因结构见图 1-A。 α 凝集素 C 端(320 氨基酸残基)含有 GPI 锚的信号序列,被作为与目的蛋白结合的融合蛋白,即目的蛋白作为 N 端与 α 凝集素 C 端部分融合。而 a 凝集

素的分泌蛋白 Aga2p 则通过两对二硫键与核心蛋白 Aga1p 连接^[3,4]。目的蛋白与结合亚基 Aga2p 的 C 末端融合(图 1-B)。*Aga2p* 融合蛋白和 *Aga1p* 在分泌途径中结合,并被转运到细胞表面后与细胞壁共价结合。

1.2 絮凝素系统

絮凝素 Flo1p 是一种新兴的展示系统,它是酿酒酵母细胞表面类似凝集素的细胞壁蛋白,由 *FLO1* 基因编码。它富含 N-和 O-糖苷连接而形成杆状构象,在细胞表面的絮凝反应中起着主要作用。它中部含有 1200 氨基酸的重复区域,折叠成长达 300nm 的跨细胞壁的结构^[5],据此设计不同长度的锚定蛋白。Flo1p 由几个不同的结构域组成:N 端分泌信号区、絮凝功能结构域、C 端 GPI 锚附着信号区和膜锚定结构域。Flo1p 絮凝功能结构域靠近 N 端,识别细胞壁中的 α 甘露聚糖组分并与之非共价结合,引起细胞聚集成可逆性絮状物(flocs)^[6]。

目前已经形成了两种类型的絮凝素展示系统(图 1-C, D)。一是 GPI 系统(图 1-C),包括 6 种由 Flo1p 的 C 端构建的细胞表面展示系统,它们都含有 GPI 锚附着信号区,长度分别是 42,102,146,318,428,和 1326 个氨基酸残基,其中 428 和 1326 氨基酸残基长度的系统展示的酶活性最好^[5]。根据目的蛋白的特性和实验目的确定截去 Flo1p 肽段的长度,然后,目的蛋白的 C 端融合到锚定序列上。相反,第二个系统是利用 Flo1p 的絮凝结构域的黏附能力创建一个表面展示系统。它包括 Flo1p 的絮凝结构域(图 1-D),即 FS 和 FL 蛋白,它们分别由 Flo1p 的 1~1099 和 1~1447 氨基酸组成,含有一个分泌信号区和目的蛋白插入位点^[6]。目的蛋白的 N 端与 Flo1p 的絮凝功能域融合,融合蛋白通过它的絮凝功能结构域与细胞壁的甘露聚糖链的非共价相互作用而诱导细胞粘着。

* 通讯作者。Tel 86-571-87951020 ;E-mail fuyan@sun.zju.edu.cn

作者简介:肖朝庭(1974-)男,湖南邵阳人,博士研究生,研究方向为分子遗传学。E-mail xiaocht@126.com

收稿日期 2005-01-04,修回日期 2005-06-06

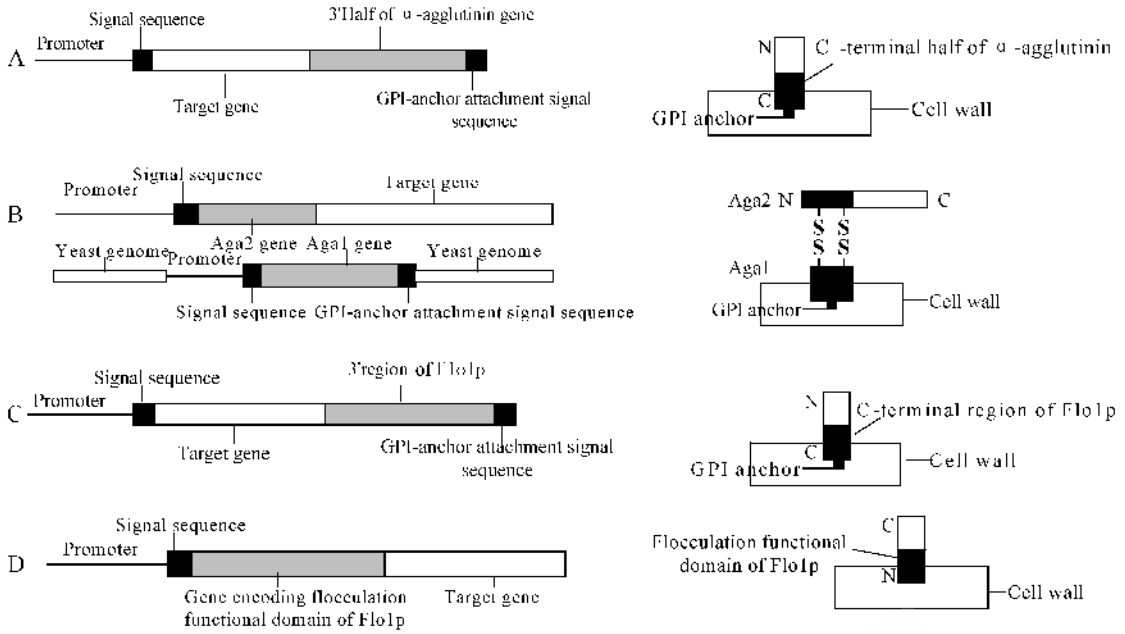


图 1 4种不同的酵母表面展示系统原理示意图

Fig.1 Schematic illustration for four yeast cell surface display systems

A α -agglutinin ;B β -agglutinin ;C C-terminus region of Flo1p ;D N-terminus flocculation function domain of Flo1p.

2 酿酒酵母细胞表面工程的新应用

基于上述两种展示系统,近3年来已研究出一些功能更强大的酵母展示株系,开发出很多前景诱人的应用领域。

2.1 展示淀粉分解酶、纤维素分解酶及其结合域

2.1.1 淀粉分解酶:已经构建的展示葡糖淀粉酶的絮状酵母(flocculent yeast) *S. cerevisiae* 株系 YF207(原 YF207 株系属色氨酸营养缺陷型,不能分泌葡糖淀粉酶,细胞表面未展示葡糖淀粉酶时,不能利用可溶性淀粉碳源),用于以可溶性淀粉为原料生产乙醇,具有很高的生产率,并且在乙醇发酵过程中保持絮凝(flocculation)的能力。但是,由于缺乏 α 淀粉酶,在补料分批发酵的过程中不溶淀粉的组分就会聚集。因此,构建两种能共表达葡糖淀粉酶和 α 淀粉酶的新的重组酵母株系,首先分别构建能进行细胞表面表达和分泌表达嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的 α 淀粉酶的质粒,然后把这两种质粒分别转入絮状酵母株 YF207(该株系细胞里已构建有能表面表达米根霉(*Rhizopus oryzae*)葡糖淀粉酶的质粒)。结果表明,这两种展示表达或分泌表达 α 淀粉酶的酵母株系均能高效地提高以淀粉为原料生产乙醇的生产率^[7]。进一步构建葡糖淀粉酶淀粉结合结构域(SBD)突变子的酵母展示株系,实验得出含有氨基酸残基 D、E、Q、N 组合的突变 SBD 的葡糖淀粉酶的降解能力是野生型的 1.4 倍^[8]。

2.1.2 纤维素分解酶:酵母不能直接利用纤维素物质。基于 α 凝集素的 C 端,先构建了共展示内切葡聚糖酶 II (Endoglucanase, EG II) 和 β 葡糖苷酶 I (β -glucosidase BGLI) 的酵母株系,这种酵母能在以 β 葡聚糖作为单一碳源的合成培养基上生长, β 葡聚糖在酵母细胞表面被水解为葡萄糖,并很快被胞内酶转化为乙醇。以克衡量每克碳水化合物生产乙醇的最终产量是 0.48g,相当理论产值的 93.3%^[9]。而后构建的共展示 BGLI、EG II 和纤维二糖水解酶 (Cellulohydrolases, CBH) 的展示酵母能直接降解无定形纤维

素,每克碳水化合物乙醇产量为 0.45g,相当于理论值的 88.5%^[10]。开发应用这种集纤维素水解和发酵于一身的酶展示酵母株系,将对发酵工业的发展无异于一场革命。

2.1.3 展示纤维素结合蛋白:在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 细胞表面分别表达一种木霉 (*Trichoderma reesei*) 的两种编码纤维二糖水解酶 CBHI 和 CBH II 的纤维素结合结构域 (CBD) 基因,同时也构建了两个串联排列的 CBD1 和 CBD2 融合基因,在细胞表面表达两种 CBDs。表达 CBD1 和 CBD2 的两种酵母展示细胞的 CBD 具有相似的结合纤维素的能力,而表达 CBD1 和 CBD2 融合蛋白的酵母细胞比单表达 CBD 的酵母细胞具有更强的纤维素的结合力^[11]。

展示酵母细胞的结合率主要依赖于展示在细胞表面的 CBD 分子多少。有 CBD 和突变 CBD 酵母展示细胞可用于分析 CBD 与纤维素的结合机制。而构建共展示 CBD 和靶酶的酵母细胞,将可以实现在纤维素滤器上构建连续的或多步酶反应的生物反应器系统。

2.2 展示脂酶

脂酶(例如:三酰甘油酯基水解酶 EC 3.1.1.3)具有广谱催化活性,能在底物与水或非水有机溶液中完成酯键水解、转酯和合成酯键等功能,广泛用于食品、化学、医药和洗涤剂生产等的工业加工中。这种脂酶活性被认为是于含六氨基酸残基 (FRSAIT) 的盖子结构有关^[12]已经发展了分别利用凝集素和絮凝素系统的酵母脂酶展示株系。

2.2.1 凝集素系统:已经构建的展示在酵母细胞壁上的腐质霉属 (*Humicola*) 脂酶和镰孢霉属 (*Fusarium*) 角质素分解酶表现出一定的分解对硝基苯丁酸的酶活性,但是不能分解橄榄油^[13]。这是由于结合在酶分子上的脂肪分子阻断了酶的活性。对根霉属 (*Rhizopus*) 脂酶的 3D 结构分析表明酶活性部位在近 C 端区。米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 的脂酶 (ROL) 活性是由间隔肽调节的。间隔肽是由大量的含 Ser/Gly 重复序列的肽段构成,具有亲水性和构象的易变性,处在 ROI 和

α 凝集素的C端间。插入间隔肽增加酶活性,并且间隔肽越长水解甘油三油酸酯的活性就越大。由于ROL的脂肪酸结合位点定位在 α 凝集素的C端附近,间隔肽的插入有利于ROL/ α 凝集素融合蛋白为底物的进入提供一个空间^[14]。

2.2.2 絮凝素系统:为进一步提高酶的靠近絮凝素C端的活性部位活性,发展了一种基于Flo1p絮凝功能结构域的新系统^[6]。FS和FL蛋白与前ROL(ProROL)蛋白的N端融合。由于它与细胞壁是非共价结合的,这两种表面展示的融合蛋白FSPROROL和FLPROROL都能被SDS抽提。这个新的展示系统,展示的脂酶活性比GPI展示系统高很多。ProROL酵母展示系统还被证明在有机溶液能有效的完成对映体选择性转酯基作用(Enantioselective transesterification)^[5]。

2.3 展示金属结合蛋白

细胞对金属离子的耐受性或敏感性是影响金属污染治理最重要的因素。融合编码6个组氨酸残基和编码 α 凝集素C末端的基因,新的酵母株系展示的蛋白能螯合二价的 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等。它的铜离子吸附能力提高了3~8倍。用EDTA处理,可以回收大约一半的铜离子,并且不需裂解细胞。进一步构建的能同时展示金属硫蛋白和六组氨酸的串联融合蛋白酵母展示株系,它的 Ca^{2+} 表面吸附能力和用EDTA螯合 Ca^{2+} 的回收率比单纯展示六组氨酸酵母细胞更强,而且也大大优于大肠杆菌^[16]。

但是,为获得这种实用的酵母细胞,通常需要离心。构建一种共表达GTSK(编码锌指转录因子的基因)和6组氨酸寡肽基因的表面展示酵母株系。这种株系具有铜离子诱导启动子,而且只要环境中存在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 铜离子就能诱导细胞聚集,并且不影响铜离子的吸附功能。所以具有吸附铜离子和自我聚集的双重功能^[17],既提高了吸收效率,又简化了回收过程。

2.4 生物传感器

融合报告蛋白基因和启动子基因,构建一种能感知细胞内外环境条件的新型自我感知酵母细胞。热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的启动子UPR-ICL(Isocitrate lyase gene upstream region)在酵母细胞中也具有功能,蓝色荧光蛋白(BFP)是一种报告基因,它是绿色荧光蛋白(GFP)的变体。同时构建具有3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)启动子和UPR-ICL启动子的酵母,前者与GFP的基因融合,后者与BFP的基因融合。结果得出,高浓度葡萄糖的培养基中表达绿色荧光蛋白(GFP),而葡萄糖被消耗时,则表达蓝色荧光蛋白(BFP),依荧光的不同就能检测细胞内外葡萄糖的耗尽程度^[18]。

同样来自酵母的PHO5启动子和MEP2启动子来监测营养物质浓度。前者是分泌性酸性磷酸酶PHO5基因的上游序列,它的转录活性受胞外无机磷酸浓度的调控,即在高磷培养基中被抑制,低磷浓度培养基中去抑制。后者是一种铵离子转运蛋白基因(MEP2)的上游序列。在谷氨酸、天冬氨酸、铵等氮源存在时,这3种MEP的基因受到抑制,在贫氮时,MEP2表达量较MEP1和MEP3表达量大得多。绿色荧光蛋白的变体ECFP(Enhanced cyan blue fluorescent protein)和EYFP(Enhanced yellow fluorescent protein)也被用做报告蛋白。流式细胞仪分析表明,展示在酵母细胞表面的ECFP和EYFP的荧光强度反映了磷离子或铵离子的浓度^[19]。

这种应用不同启动子构建的新的非损伤性鉴定环境变化的细胞表面工程系统,可以在不破坏细胞的前提下,构建能独立感知胞外环境条件和胞内物质浓度的智能细胞,通过测量发出荧光的强度,能在单个细胞水平进行检测,可以实

现不同生物处理系统的计算机智能控制。

2.5 在免疫学中的应用

在免疫学中,在原来报道的展示乙肝病毒表面抗原开发口服疫苗、T细胞受体(TCR)的配体和单链T细胞受体(TCR)的应用研究后,最近又报道了展示抗体Fab片段和单链抗体可变区片段(scFv)的工程酵母。

2.5.1 抗体Fab片段:把编码Fab片段的轻链基因串联在 α 凝集素的C端表达,而Fab重链的Fd片段基因编码的蛋白则以分泌蛋白表达。在酵母表面Fab片段的轻链和重链通过二硫键在相互结合,它在抗体催化反应中表现出的很高的稳定性和反应活性^[20]。在此之上,已成功地把Fab的轻链和重链基因分别转入两个载体中,在两个酵母株系中分别表达,然后通过这两种酵母的结合,重新组合成Fab^[21]。这种方式极大地简化了构建大的抗体库的过程。这种方法结合易错PCR可获得的人Fab酵母展示文库多达 5×10^9 克隆^[22],并且大大提高了Fab的多样性。

2.5.2 单链抗体可变区片段(scFv):在抗体治疗中,关键是能快速低成本地获得高特异性和高亲和力的抗体。单链抗体可变区片段(scFv)选择性地与T细胞表面的CD3 ϵ 、CD28和CD152(CTLA-4)结合,能调节T细胞的活性^[23]。酵母细胞表面展示系统在展示scFv和提高抗体的亲和力与稳定性方面是很有效的^[24],在筛选大组合scFv文库有许多优点,与荧光激活细胞分类技术(FACS)结合运用可快速定量地分离具有目的特性的稀少克隆。另外,固相捕获方法,如磁分离,也能方便高效地从大表面展示细胞库中分离靶细胞^[25]。

进一步研究发现,通过酵母展示scFv的结合反应,发现Huntingtin蛋白的氨基端只与scFv的可变轻链结构域结合,以此开发出抗Huntingtin蛋白的人单可变轻链结构域细胞内抗体^[26],为治疗亨特氏综合症发展了一种新的途径,并且也为开发研究细胞内靶蛋白的胞内抗体提供新的方法。

2.5.3 其他:胞外蛋白的单个结构域在配体/受体反应和抗体结合识别中具有重要功能,通过酵母表面展示表皮生长因子受体(EGFR)片段,可以在结构域水平描绘出抗体的抗原决定簇的分布^[27]。这个方法克服了以往分析过程需要表达和提纯可溶性蛋白的繁杂。结合随机突变,找到EGFR中与单克隆抗体(mAb)结合中关键氨基酸,可从氨基酸残基水平确定不连续和热变性单克隆抗体结合抗原决定簇^[28],从而更精确地确定抗体的抗原决定簇的分布。

主要组织相容性复合体(MHC)结构复杂,不同种类稳定性变化很大,为深入研究带来难度。把单链形式MHC与Aga-2融合在酵母表面表达,表达的蛋白复合物能被相应的T细胞受体和抗体识别,并能直接刺激幼稚T细胞产生CD69^[29]。这为MHC复合蛋白的直接进化和细胞免疫研究提供了方法。

HCV非结构蛋白3(NS3)编码丝氨酸蛋白酶,参与病毒多聚蛋白翻译后加工,为病毒复制所必需。为将来筛选NS3区抗原表位,构建了HCVNS3基因片段酵母展示文库,并用FACS检测到有20%的细胞表面表达了融合蛋白^[30]。在研究人衰变加速因子(DAF)时,得出酵母细胞表面展示的DAF可正确折叠,并表现出DAF分子的补体抑制活性^[31]。在研制4价登革疫苗时,利用酵母细胞表面表达登革2型病毒43株(D2-43)的E基因,间接免疫荧光法和FACS检测发现,展示E蛋白的酵母细胞百分数达到22.07%^[32],为获得高效价登革4价疫苗提供了新的平台。

2.6 构建组合蛋白库

由于蛋白结构与功能之间缺乏定量的和数值上的联系,用诱变手段改变蛋白分子特性的潜力是有限的。已经越来越多地采取构建随机突变组合库,然后从中筛选出目的蛋白的方法。随机酵母表面组合蛋白库可由易错 PCR、构建酵母多拷贝盒式载体(cassette vector)等手段构建而成。这种方法产生一些不同于天然氨基酸组成的“异常片段”或“异常蛋白质”^[33]。例如,已经从展示这种组合文库的转化体中筛选出耐 *n*-壬烷的酵母株系,它在涂有壬烷的培养基中能非常好地生长。这种耐受性被证实是与展示在酵母细胞表面的随机蛋白相关的。遗传分析表明有一个 274bp 的片段符合读框地(in-frame)插入了多拷贝盒式载体。插入的蛋白片段是亲水的,使这种克隆具有与耐异辛烷突变体具有相似的表面特征。这表明酵母细胞的有机溶剂耐受性可能与细胞表面的结构和功能有密切的关系。另外,通过易错 PCR 构建脂酶展示文库,能简便地筛选出功能脂酶^[34]。总之,构建酵母展示组合蛋白文库,为筛选新的表型和功能蛋白的研究提供了一种模式。

2.7 免疫检测和亲和纯化

2.7.1 癌症检测

目前癌症血清学分析常用的噬菌体展示、Western blot 和 ELISA 等方法不能在蛋白质天然状态下进行检测。酵母表面展示的抗原(Recombinant antigen expression on yeast surface RAYS)蛋白能进行接近天然状况下的折叠,在与结肠癌病人的血清反应比较得出,在检测 NY-ESO-1 的抗体时,RAYS 显示出至少与 Western blot 和 ELISA 同等的特异性和灵敏度,而在检测 SSX2 的抗体时,RAYS 较 ELISA 或噬菌体展示具有更高的检出率^[35]。这种方法将会鉴定出能进行翻译后修饰或形成构象表位后才产生免疫应答的肿瘤抗原。这是对传统的 SEREX(Serological analysis of antigens by recombinant expression cloning)检测方法的突破。

2.7.2 检测和提纯 IgG 利用 α 凝集素的 C 末端 构建新的展示来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) SPA 结构的酵母株系。利用展示 ZZ 蛋白的酶联免疫吸附测定(ELISA)和夹心式酶联免疫吸附测定(sandwich ELISA)技术能检测出 1~10ng/mL 的 IgG 和抗原(例如人血清清蛋白)。这些检测系统具有很宽的检测范围,并且可通过调节细胞数与底物(辣根过氧化物酶)的反应时间来改变检测范围,已经成功的用于从血清里亲合提纯 IgG^[36]。

这些结果表明,展示 ZZ 蛋白的酵母细胞可能会为免疫测定和亲合纯化提供一个具有遗传再生的全细胞免疫吸附剂。

另外,在研究内分泌作用机制时,有人构建了展示一种鼠雌激素受体的酵母株系,可用于筛选或去除环境中与雌激素受体的天然配体类似化学分子^[37]。这种分析方法为内分泌研究提供了新的思路。

3 问题和展望

噬菌体和细菌展示系统具有较高的转化率,但它表达片段长度有限,且不能完成真核细胞中蛋白翻译后加工过程。虽然酵母细胞中载体数量和转化率相对较低,但可克隆较大外源蛋白,能对表达的外源真核生物蛋白质进行有效的折叠、糖基化和形成二硫键,而且所展示的蛋白是与细胞壁上的葡聚糖共价结合的(Flo1pN 端絮凝功能结构域展示系统除外),可以耐 SDS 抽提。同时,酵母生产快,容易培养,展示蛋白在细胞表面是稳定的,只要它的基因存在于细胞里,就能

稳定地在子代细胞中表达。而且,表达的蛋白可用荧光激活细胞分选仪(FACS)进行灵敏而方便地检测和筛选。酿酒酵母也符合食品和医药的生产和加工的安全要求。因此,近年来酵母表面工程的应用得到了迅猛发展。

但目前这个系统还存在一些问题,例如酵母蛋白的分泌成熟过程和其他真核细胞存在一定的差异,一些表达的蛋白还不能达到天然活性,表达量也不够,而且在生产过程中产生的酒精往往会抑制酵母的持续生长等,但相信随着这项技术的发展和完善,在开发新的展示蛋白的酵母株系的同时,会进一步提高现有的展示蛋白的特异性、稳定性、表达量和活性,克服生产过程中的难题,这项技术也将在蛋白质分子研究方面发挥更加重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, **249**: 386-390.
- [2] Cappellaro C, Hauser K, Mirsa V, et al. *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J*, 1991, **10**: 4081-4088.
- [3] Boder E T, Witttrup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 553-557.
- [4] Keike M C, Shusta E V, Boder E T, et al. Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 5651-5656.
- [5] Sato N, Matsumoto T, Ueda M, et al. Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 469-474.
- [6] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, et al. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 4517-4522.
- [7] Kondo A, Shigechi H, Abe M, et al. High level production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell surface glucoamylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**: 291-296.
- [8] Shiraga S, Kawakami M, Ueda M. Construction of combinatorial library of starch-binding domain of *Rhizopus oryzae* glucoamylase and screening of clones with enhanced activity by yeast display method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **28**: 229-234.
- [9] Fujita Y, Takahashi S, Ueda M, et al. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 5136-5141.
- [10] Fujita Y, Ito J, Ueda M, et al. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environmental Microbiol*, 2004, **70**: 1207-1212.
- [11] Nam J, Fujita Y, Arai T, et al. Construction of engineered yeast with the ability of binding to cellulose. *J Mol Catalys*, 2002, **17**: 197-202.
- [12] Shiraga S, Ueda M, Takahashi S, et al. Construction of the combinatorial library of *Rhizopus oryzae* lipase mutated in the lid domain by displaying on yeast cell surface. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17**: 167-173.
- [13] Schreuder M P, Mooren A T, Toshka H Y, et al. Immobilizing proteins on the yeast cells. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**: 115-120.
- [14] Washida M, Takahashi S, Ueda M, et al. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 681-686.

- [15] Matsumoto T, Ito M, Fukuda H, *et al.* Enantioselective transesterification using lipase-displaying yeast whole-cell biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 481 – 485.
- [16] Kuroda K, Shibasaki S, Ueda M, *et al.* Cell surface-engineered yeast displaying histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 697 – 701.
- [17] Kuroda K, Ueda M, Shibasaki S, *et al.* Cell-surface-engineered yeast with ability to bind, and self-segregate in response to, copper ion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 259 – 264.
- [18] Shibasaki S, Ueda M, Ye K, *et al.* Creation of cell surface-engineered yeast which can emit different fluorescence in response to the glucose concentration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 528 – 533.
- [19] Shibasaki S, Ninomiya Y, Ueda M, *et al.* Intelligent yeast strain with the ability of self-monitoring of the concentrations of intra- and extracellular phosphate or ammonium ion by emission of fluorescence from the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 702 – 707.
- [20] Lin Y, Tsumuraya T, Wakabayashi T, *et al.* Display of functional heterooligomeric catalytic antibody on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**: 226 – 232.
- [21] Weaver-Feldhaus J M, Lou J, Colemana J R, *et al.* Yeast mating for combinatorial Fab library generation and surface display. *FEBS Letters*, 2004, **564**: 24 – 34.
- [22] Blaise L, Wehnert A, Steukers M P G, *et al.* Construction and diversification of yeast cell surface displayed by yeast mating: application to the affinity maturation Fab antibody fragments. *Gene*, 2004, **342**: 211 – 218.
- [23] Griffin M D, Holman P O, Tang Q, *et al.* Development and applications of surface-linked single chain antibodies against T-cell antigens. *Journal of Immunol Methods*, 2001, **248**: 77 – 90.
- [24] Feldhaus M J, Siegel R W, Opreko L K, *et al.* Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 163 – 170.
- [25] Furukawa H, Shimojo R, Ohnishi N, *et al.* Affinity selection of target cells from cell surface display libraries: a novel procedure using thermo-responsive magnetic nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**: 478 – 483.
- [26] Colby D W, Garg P, Holden T, *et al.* Development of a human light chain variable domain (VL) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. *J Mol Biol*, 2004, **342**: 901 – 912.
- [27] Cochran J R, Kim Yong-Sung, Olsen M J, *et al.* Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *Journal of Immunol Methods*, 2004, **287**: 147 – 158.
- [28] Chao G, Cochran J R, Wittrup K D. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *J Mol Biol*, 2004, **342**: 539 – 550.
- [29] Brophy S E, Holler P D, Kranz D M. A yeast display system for engineering functional peptide-MHC complexes. *Journal of Immunol Methods*, 2003, **272**: 235 – 246.
- [30] 贾帅争, 孙红瑛, 刘晓达, 等. HCV NS3 基因片段酵母展示文库的构建和鉴定. *中国生物化学和分子生物学报*, 2001, **17** (1): 56 – 60.
- [31] 郭波, 郑萍, 谢佩蓉, 等. 酵母细胞表面展示的 hDAF 对补体在酵母细胞表面沉积的抑制作用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, **20** (3): 269 – 271.
- [32] 陈水平, 范宝昌, 姜涛, 等. DA-43 病毒 E 蛋白在酵母细胞表面的展示. *军事医学科学院院刊*, 2004, **28**: 1 – 3.
- [33] Zou W, Ueda M, Tanaka A. Screening of a molecule endowing *Saccharomyces cerevisiae* with n-nonane-tolerance from a combinatorial random protein library. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**: 806 – 812.
- [34] Shibamoto H, Matsumoto T, Fukuda H, *et al.* Molecular engineering of *Rhizopus oryzae* lipase using a combinatorial protein library constructed on the yeast cell surface. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **28**: 235 – 239.
- [35] Mischo A, Wadle A, Wätzig K, *et al.* Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immunity*, 2003, **3**: 5 – 11.
- [36] Nakamura Y, Shibasaki S, Ueda M, *et al.* Development of novel whole-cell immunoabsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 500 – 505.
- [37] Yasui M, Shibasaki S, Kuroda K, *et al.* An arming yeast with the ability to entrap fluorescent 17 β -estradiol on the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 329 – 331.

Newly progress in applications of *Saccharomyces cerevisiae* cell-surface engineering

XIAO Chao-ting FU Yan* TIAN Yong

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* cell-surface engineering is a newly genetic expressing system for fusion heterologous gene. With its ability of post-translational modification, and the convenience to identify and screen the expressed products, it is undergoing a marvelous progress in its newly applications, which include using as whole-cell biocatalyst, antigen/antibody library, bioadsorbent, biosensor, combinatory protein library, immunoassays and affinity purification. It performs a more and more important role in exploring the function and application of protein molecules.

Key words: Cell surface engineering, *Saccharomyces cerevisiae*

* Corresponding author. Tel 86-571-87951020, E-mail: fuyan@sun.zju.edu.cn

Received date: 01-04-2005