

毕赤酵母 X-33 *OCH1* 基因敲除菌株的构建及其表达低糖基化蛋白 GM-CSF

张大成¹, 许永利², 辛鑫², 朱瑞宇², 金坚^{2*}

江南大学,¹ 生物工程学院,² 医药学院, 无锡 214122

摘要:【目的】酵母表达外源糖蛋白时会对蛋白进行过度 *N*-糖基化修饰, 产生高甘露糖型糖链, 影响蛋白的活性, 其中 α -1,6-甘露糖转移酶(*och1p*)在这一过程中起着关键作用。通过敲除毕赤酵母 X-33 的 α -1,6 甘露糖转移酶(*och1p*)基因, 获得一个对糖蛋白进行低糖基化修饰的毕赤酵母表达系统。【方法】采用双交换同源重组敲除目的基因的方法, 首先敲除毕赤酵母 X-33 的 *URA3* 基因, 获得一个尿嘧啶营养缺陷型的 X-33 (*ura3⁻*) 菌株; 然后用 *URA3* 基因作为选择标记, 敲除 X-33 (*ura3⁻*) 的 α -1,6 甘露糖转移酶(*och1p*)基因, 获得 *OCH1* 基因敲除的 X-33 (*och1⁻*) 菌株。用 X-33 (*och1⁻*) 菌表达糖蛋白 GM-CSF, 分析 GM-CSF 蛋白糖链的变化。【结果】首次成功敲除了 X-33 的 *URA3* 和 *OCH1* 基因, 与野生型相比, X-33 (*och1⁻*) 菌表达的 GM-CSF 蛋白过度糖基化修饰程度明显降低。【结论】X-33 (*och1⁻*) 菌株的构建提供了一个对蛋白低 *N*-糖基化修饰的毕赤酵母表达系统, 也为进一步的糖基化改造提供了良好的基础。

关键词: *N*-糖基化, 毕赤酵母 X-33, 基因敲除, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0622-08

糖蛋白药物(如抗体、细胞因子、疫苗等)已成为近年来发展最快的药物之一, 需求迅速增长^[1]。目前这些糖蛋白的生产主要是用哺乳动物细胞, 然而哺乳动物细胞生产药用蛋白存在诸多缺点, 如细胞培养复杂、蛋白表达量低、生产成本高等。

毕赤酵母表达系统具有像原核生物生长速度快、便于基因操作、成本低廉、便于大规模培养和高密度发酵等特性, 同时又具有真核细胞的大部分翻译后加工修饰功能(如糖基化过程等), 已广泛用于各种蛋白的表达^[2-3], 因而用毕赤酵母细胞生产药用蛋白日益引起人们的青睐。但毕赤酵母对蛋白的糖基化修饰产生的是高甘露糖型糖链^[4], 不同于哺乳动物细胞的复杂型糖链, 由此导致糖蛋白的免疫

原性增强、半衰期缩短、活性降低等一系列不良影响^[5-6], 这是毕赤酵母不能用于大部分糖蛋白药物制备的主要原因。

酵母和哺乳动物细胞的 *N*-糖基化都起始于内质网。在内质网, *N*-糖基化的共同脂多糖前体 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-dol-p-p}$ 上的多糖链被转移到新生肽链 Asn-X-Thr/Ser (X 为除 Pro 外的任意氨基酸) 保守序列中的 Asn 上, 接着在葡萄糖苷酶 I 和 II 等糖苷酶的作用下形成 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 结构^[7], 该寡糖链的形成过程从酵母到哺乳动物细胞都是高度保守的。随后该中间体被转运至高尔基体中, 酵母和哺乳动物细胞的糖链加工和修饰途径明显不同了。哺乳动物细胞中, 在一系列糖苷酶和糖基转移酶的作

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918219; E-mail: Jinjian31@163.com

作者简介: 张大成(1983-), 男, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事酵母糖基化研究。E-mail: zhangdachenghb@163.com

收稿日期: 2010-11-20; 修回日期: 2011-01-09

用下,形成各种复杂型 *N*-聚糖结构^[7-8];而毕赤酵母中,首先通过 α -1,6-甘露糖转移酶(och1p)的作用,在 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖链上添加一个 α -1,6 甘露糖形成 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 糖链结构,然后一系列甘露糖转移酶和磷酸甘露糖转移酶以此为底物继续添加甘露糖,最终形成高甘露糖型糖链结构^[4-7]。由此可见, α -1,6-甘露糖基转移酶(och1p)是形成高甘露糖基化的第一步也是最为关键的酶,要阻断毕赤酵母的高甘露糖化修饰途径,必须先敲除其 *OCH1* 基因^[8-11,18]。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)由127个氨基酸组成,它有两个 *N*-糖基化位点(Asn27、Asn37),天然 GM-CSF 有34%的糖基化,在野生型毕赤酵母中表达时会产生过度且不均一的糖基化修饰^[12-13]。

因此,我们利用双交换同源重组敲除目的基因的方法,首先敲除毕赤酵母 X-33 的基因 *URA3* (编码乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)作为选择标记,然后敲除 X-33 的 *OCH1* 基因。用 X-33 (*och1*⁻) 菌株表达糖蛋白 GM-CSF,分析 *OCH1* 基因敲除对蛋白糖基化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:pPICZ α A 毕赤酵母表达载体购

自 Invitrogen 公司;pUC19/GM-CSF 质粒(含 GM-CSF 基因序列)由上海青兰生物科技有限公司合成;酿酒酵母表达载体 pYES2, *Pichia pastoris* X-33(野生型), *E. coli* JM109(均为本室保存)。

1.1.2 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶、5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)购自上海生物工程技术服务有限公司;Zymolyase 酶购自美国 Sigmag 公司;N-糖苷酶 F (PNGaseF) 购自美国 New England Biolabs 公司;蛋白胨、酵母提取物、无氨基酸酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acids, YNB) 购自加拿大 BIO BASIC INC 公司。PTC100 型 PCR 仪购自美国 MJ Research 公司;核酸电泳仪、蛋白电泳仪、凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;AKTA 纯化系统购自美国 GE 公司。

1.1.3 引物:根据 GenBank (AF321098) 中报道的毕赤酵母 *URA3* (orotidine-5'-Phosphate decarboxylase) 基因序列,设计两对同源臂片段扩增引物 URA5F、URA5R 和 URA3F、URA3R;根据酿酒酵母表达载体 pYES2 的序列,设计引物 pYES2F 和 pYES2R;根据 GenBank (E12456) 中报道的毕赤酵母 *OCH1* 基因序列,设计两对同源臂片段扩增引物 OCH5F、OCH5R 和 OCH3F、OCH3R, 和内部鉴定引物(in)5F、(in)3R;通用引物 5'AOX1、3'AOX1 序列参考文献[14],引物序列及引入的酶切位点,如表1所示。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表1 本实验所用引物

Table 1 Primer used in this research

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
URA5F	CTGCAGAAATGGGGAGATAACCACC	25	
URA5R	CAATTGATCCCTGTACATACTTGTAATTA GGTATCTATCCCTTTGATCAGGTT	54	
URA3F	AACCTGATCAAAGGGATAGATACCTAATTA CAAGTATGTACAGGGGATCAATTG	54	
URA3R	ACTAGTGGTTTCTGCGGGTATTGCTG	28	
pYES2F	TAGAGTTCGACATCGATAAGCTAGCTTTTCAATTCAATTC	39	<i>Sal</i> I
pYES2R	TAGAGTTCGACGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGC	31	<i>Sal</i> I
OCH5F	CTTCCCATTGACACTTTCGGAACGCGTCGAG AGAACTCTGGATTAGCAGTC	51	<i>Mlu</i> I
OCH5R	TAGAGTTCGACCTGATGATATTTGCTACGAACTAGT	35	<i>Sal</i> I
OCH3F	TAGAGTTCGCGTTGGAAGGACTAAAGAAAGCTAGAG	36	<i>Nhe</i> I
OCH3R	GACTGCTAATCCAGAGTTCTCTCGACGCGTTCCGAAAGTGTCAATGGGAAG	51	<i>Mlu</i> I
(in)5F	CAGCCTTAAAGAGCCCGCTAAA	22	
(in)3R	GGTGGAAAGCTTCCAAGACTTCTGG	25	
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21	
3'AOX1	GGCAAATGGCATTCTGACAT	20	

1.2 酵母细胞培养,基因组提取和 PCR

参考文献[14-15]进行操作。

1.3 目的基因同源置换 DNA 片段和敲除质粒的构建

1.3.1 URA3 基因的同源置换 DNA 片段的构建:以 X-33 菌株基因组为模板,用引物 URA5F、URA5R 和 URA3F、URA3R,分别 PCR 扩增 URA3 基因两端同源臂片段 URA5'和 URA3',各700 bp、600 bp左右。然后以 URA5'和 URA3'为模板,URA5F 和 URA3R 为引物,用重叠 PCR 扩增 URA3 基因同源置换 DNA 片段 URA5-3,约1300 bp。

1.3.2 质粒 pYXZ 的构建:以质粒 pYES2 为模板,用引物 pYES2F、pYES2R PCR 扩增其含 URA3 基因序列的部分,将产物回收纯化,用 Sal I 酶切后进行连接反应,自连形成质粒 pYXZ,转化大肠杆菌 JM109,用含氨苄青霉素的 LB 平板挑选阳性克隆。

1.3.3 OCH1 基因同源臂的克隆:以 X-33 菌株基因组为模板,用引物 OCH5F、OCH5R 和 OCH3F、OCH3R, PCR 扩增 OCH1 基因两端同源臂 OCH5' 和 OCH3'及其融合片段 OCH3-5,方法同 1.3.1,大小分别为1000 bp、700 bp和1700 bp左右。

1.3.4 敲除质粒 pYXZ-OCH1 的构建:将 OCH1 两端同源臂融合片段 OCH3-5 以 Sal I 和 Nhe I 酶切,克隆到用 Sal I 和 Nhe I 酶切的质粒 pYXZ 上,形成敲除质粒 pYXZ-OCH1。

1.4 敲除毕赤酵母 X-33 的 URA3 和 OCH1 基因

1.4.1 敲除毕赤酵母 X-33 的 URA3 基因,构建营养缺陷型选择标记:将 URA3 基因两端同源臂融合片段 URA5-3 电击转入 X-33 感受态细胞,涂布含有 5-FOA 和尿嘧啶的 MD 培养基(YNB 1.34%,葡萄糖 2%,琼脂粉 1.5%,尿嘧啶 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,5-FOA 1 mg/mL)上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d。挑选上述培养基上长出的单菌落,用牙签分别点种于 MD 培养基(YNB 1.34%,葡萄糖 2%,琼脂粉 1.5%)和 MDU 培养基(YNB 1.34%,葡萄糖 2%,琼脂粉 1.5%,尿嘧啶 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d,然后选择在 MDU 培养基上生长良好而在 MD 培养基上不能生长的菌株,反复筛选三轮至性状稳定,提取基因组用 URA3 基因两端引物 URA5F、URA3R 进行 PCR 鉴定,筛选出 X-33(*ura3*⁻)菌株。

1.4.2 毕赤酵母 X-33 中 OCH1 基因的敲除:将敲除质粒 pYXZ-OCH1 于两同源臂间的 Mlu I 酶切位

点线性化,电击转入 X-33(*ura3*⁻)感受态细胞,涂布 MD 培养基上,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养约一周。将 MD 培养基上长出的单菌落,用牙签对应点种于两块 YPD 培养基(蛋白胨 2%,酵母提取物 1%,葡萄糖 2%,琼脂粉 1.5%)上,分别在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养几天,然后挑选在 37 $^{\circ}\text{C}$ 不能生长而 25 $^{\circ}\text{C}$ 生长良好的单菌落提基因组,分别用 OCH1 基因外部引物 OCH5F、OCH3R 和内部引物(in)5F、(in)3R 进行 PCR 鉴定。

1.5 GM-CSF 表达载体的构建及表达

1.5.1 表达载体的构建:将本室保存的质粒 pUC19/GM-CSF 以 EcoR I、Not I 双酶切,回收 GM-CSF 基因片段(其末端引入 6xHis 标签序列),克隆到用相同酶切的毕赤酵母表达载体 pPICZ α A 上,形成表达载体 pPICZ α A/GM-CSF,筛选阳性克隆,酶切鉴定并测序。

1.5.2 GM-CSF 在毕赤酵母 X-33 和 X-33(*och1*⁻)中的表达和分析:将表达载体 pPICZ α A/GM-CSF 以限制性内切酶 Sac I 线性化后分别电击转入 X-33 和 X-33(*och1*⁻)感受态细胞中,取电击后的菌液涂布 YPDZ (分别含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Zeocin)培养基上,X-33 转化子于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d,X-33(*och1*⁻)转化子于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养约一周,然后挑选生长良好的单菌落提基因组用通用引物 5'AOX、3'AOX1 进行 PCR 鉴定,筛选阳性转化子。将鉴定的阳性 X-33/pPICZ α A/GM-CSF 菌接种到 2 mL 的 YPD(蛋白胨 2%,酵母提取物 1%,葡萄糖 2%)培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,以 5%的接种量接种到 10 mL 的 BMGY(蛋白胨 2%,酵母提取物 1%,YNB 1.34%,甘油 2%,100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液,PH 6.0)培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h,离心去上清并重悬于 3 mL 的 BMMY(酵母提取物 1%,YNB 1.34%,蛋白胨 2%,100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液,PH 6.0)培养基中,同时加 2%的甲醇开始诱导表达;X-33(*och1*⁻)/pPICZ α A/GM-CSF 阳性菌于 YPD 培养基中 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,BMGY 培养基中 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达,其它条件同 X-33,每 24 h 补加一次甲醇,诱导 72 h 结束后离心取上清,用于蛋白的表达分析。

1.6 GM-CSF 蛋白的纯化和 N-糖苷酶 F (PNGaseF) 酶切分析

1.6.1 GM-CSF 蛋白的纯化和 N-糖苷酶切分析:将 X-33 菌和 X-33(*och1*⁻)菌的培养上清用镍亲和层

析 (Ni-affinity chromatography) 纯化, 再用 Sephadex G-25 凝胶过滤层析进行脱盐。纯化的 GM-CSF 在 0.5% SDS 和 0.04 mol/L DTT 变性缓冲液中 100°C 变性 10 min, 然后在 0.05 mol/L 磷酸钠 (pH 7.2), 1% NP-40, N-糖苷酶 F 体系中 37°C 酶切 1 h 以上, 将酶切产物进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 同源置换 DNA 片段和敲除质粒的构建

2.1.1 *URA3* 基因的克隆及其同源置换 DNA 片段的构建: 从毕赤酵母 X-33 基因组 PCR 扩增的 *URA3* 基因两端同源臂片段 *URA5'*、*URA3'* 和融合同源臂片段分别为 0.7 kb、0.6 kb 和 1.3 kb。测序结果表明各序列、及融合顺序均正确。

2.2.2 敲除质粒 pYXZ-OCH1 的构建: 从 pYES2 质粒 PCR 扩增的 2.8 kb 片段带有 *URA3* 标记基因, 自连形成质粒 pYXZ。从酵母基因组 PCR 扩增的 *OCH1* 基因两端同源臂 *OCH5'*、*OCH3'* 和融合片分别为 1 kb、0.7 kb 和 1.7 kb, 敲除质粒 pYXZ-OCH1 (图 1) 和各序列及融合顺序, 测序分析均正确。

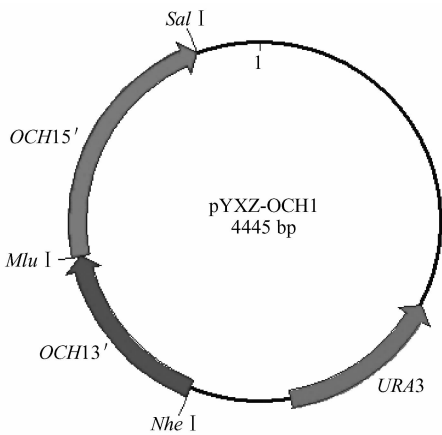


图 1 敲除质粒 pYXZ-OCH1

Fig. 1 The map of pYXZ-OCH1.

2.2 敲除毕赤酵母 X-33 的 *URA3* 和 *OCH1* 基因

2.2.1 *URA3* 基因的敲除和鉴定: 融合同源臂片段电击转入酵母后, 与基因组中的 *URA3* 基因发生双交换同源重组, 置换掉 *URA3* 基因编码框中约 700 bp 的序列。未发生同源重组的菌株由于携带 *URA3* 基因而不能在含有 5-FOA^[16] 的培养基上生长, 因此可以在含 5-FOA 和尿嘧啶的 MD 培养基上筛选出 *ura3*⁻ 菌株。挑选经过表型鉴定且性状稳定

的菌株, 用两端引物 *URA5F* 和 *URA3R* 进行基因组 PCR 鉴定, 野生型 X-33 菌的 *URA3* 基因大小为 2043 bp, 扩增产物为 2000 bp 左右; *ura3*⁻ 菌的 *URA3* 基因编码框中约 700 bp 的序列被置换掉, 扩增产物应为 1300 bp 左右, 电泳结果与预期一致 (图 2-A), 说明筛选的为 *ura3*⁻ 菌。

2.2.2 *OCH1* 基因的敲除和鉴定: 敲除质粒 pYXZ-OCH1 线性化转入 X-33 (*ura3*⁻) 酵母细胞后, 与 *OCH1* 基因发生双交换同源重组。敲除质粒含有 *URA3* 标记基因, 因此能在 MD 培养基上生长的是发生同源重组的菌株; 同时 *och1*⁻ 菌在 25°C 生长良好而 37°C 不能生长^[10-11], 挑选符合上述两种性状的菌株, 进行基因组 PCR 鉴定。由于 *OCH1* 基因读码框中约 1100 bp 的序列被 2800 bp 的选择标记序列取代, 用外部引物 *OCH5F*、*OCH3R* 鉴定, X-33 菌 PCR 扩增产物为 2.8 kb、X-33 (*och1*⁻) 菌为 4.4 kb; 内部引物 (in)5F、(in)3R 中的 (in)3R 位于被置换的读码框序列中, 因此 X-33 菌株可扩增出 1.5 kb 的片段, 而 X-33 (*och1*⁻) 菌扩增不到片段, 电泳结果 (图 2-B) 表明 *OCH1* 基因被敲除, 筛选的为 X-33 (*och1*⁻) 菌。

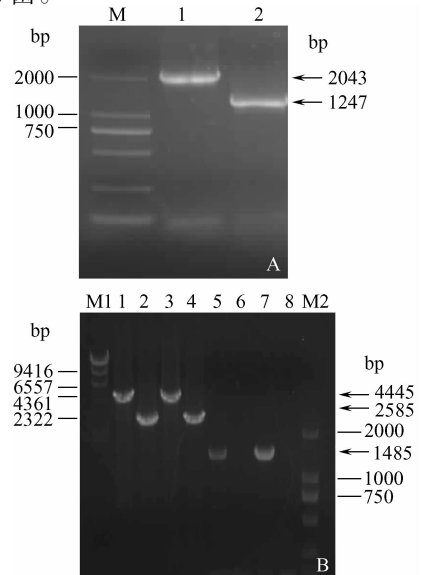


图 2 X-33 (*ura3*⁻) 菌和 X-33 (*och1*⁻) 菌的鉴定

Fig. 2 Identification of *ura3* and *och1* mutant *Pichia pastoris* X-33. A: PCR with primer *URA5F* and *URA3R*; M: DNA Marker D; 1: X-33 (wild type); 2: X-33 (*ura3*⁻); B: PCR with primer *OCH5F* and *OCH3R*; M1: λ DNA/*Hind* III Marker; 1, 3: X-33 (*och1*⁻); 2, 4: X-33 (wild type); PCR with primer (in) 5F and (in) 3R; 5, 7: X-33 (wild type); 6, 8: X-33 (*och1*⁻); M2: DNA Marker D.

2.3 GM-CSF 表达载体的构建及表达

2.3.1 表达载体的构建:将从质粒 pUC19/GM-CSF 上酶切回收约 425 bp 的 GM-CSF 片段连接到质粒 pPICZ α A 上,构建成表达载体 pPICZ α A/GM-CSF(图 3-A),酶切鉴定(图 3-B)和测序结果表明表达载体构建正确。

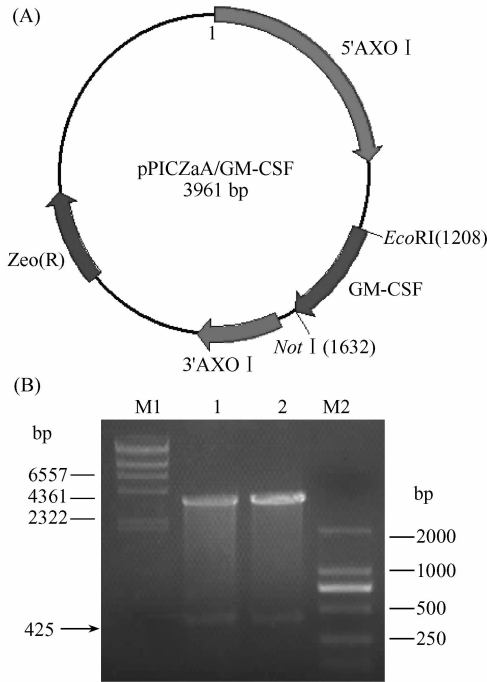


图 3 pPICZ α A/GM-CSF 的构建和酶切鉴定

Fig. 3 Construction of pPICZ α A/GM-CSF and identified by restriction enzyme digestion. A: The map of pPICZ α A/GM-CSF; B: M1; λ DNA/Hind III Marker; 1, 2: pPICZ α A/GM-CSF was digested by EcoRI and Not I; M2: DNA Marker D.

2.3.2 GM-CSF 在野生型 X-33 菌中的表达和分析:将基因组鉴定的阳性 X-33/GM-CSF 表达菌摇瓶发酵培养后,取培养上清进行 SDS-PAGE 分析(图 4),X-33/GM-CSF 表达菌可以高效表达 GM-CSF 蛋白,但表达的蛋白分子量主要分布在 25 - 45 kDa 之间,明显大于其理论分子量 15 kDa,且表达条带发生了明显的拖尾。说明 GM-CSF 在野生菌 X-33 中的表达产物被过度糖基化修饰,且糖基化存在严重的不均一性。

2.3.3 GM-CSF 在 X-33 (*och1*⁻) 菌中的表达和 OCH1 基因敲除对蛋白糖基化的影响:将基因组鉴定的阳性 X-33 (*och1*⁻)/GM-CSF 表达菌摇瓶发酵培养后,取培养上清进行 SDS-PAGE 分析(图 5),同样 GM-CSF 可以在 X-33 (*och1*⁻) 菌株中高效表达,

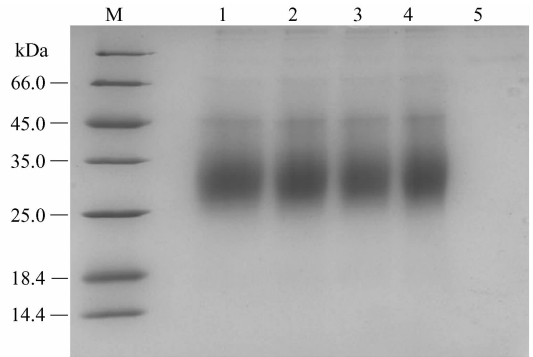


图 4 GM-CSF 在野生型 X-33 中的表达

Fig. 4 Expression of GM-CSF in X-33 (wild type). M: Protein molecular weights markers; 1-4: Positive transformant; 5: Control (X-33 transfected with pPICZ α A vector).

表达蛋白的主带在 25 kDa 以下。与 X-33 菌表达的该蛋白相比,GM-CSF 的分子量明显降低,说明 X-33 (*och1*⁻) 菌株表达的是低糖基化的 GM-CSF。

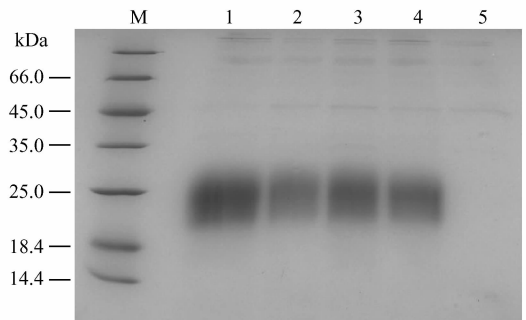


图 5 GM-CSF 在 X-33 (*och1*⁻) 菌中的表达

Fig. 5 Expression of GM-CSF in X-33 (*och1*⁻). 1: M: Protein molecular weights markers; 1-4: Positive transformant; 5: Control (X-33 (*och1*⁻) transfected with pPICZ α A vector).

2.4 GM-CSF 蛋白的纯化和 N-糖苷酶 F (PNGaseF) 酶切分析

2.4.1 GM-CSF 蛋白的 N-糖苷酶 F (PNGaseF) 酶切分析:将 X-33 和 X-33 (*och1*⁻) 菌表达的 GM-CSF 蛋白用镍亲和层析柱纯化后脱盐,然后将样品经 PNGaseF 处理后进行 SDS-PAGE 分析(图 6)。PNGaseF 酶切后,二者表达的 GM-CSF 分子量均降至 20 kDa 以下,说明上述两种菌表达的目的蛋白均发生不同程度的 N-糖基化,其中野生型 X-33 菌表达的为过度糖基化的蛋白,而 X-33 (*och1*⁻) 菌表达的为低糖基化的蛋白。但 X-33 和 X-33 (*och1*⁻) 菌表达的 GM-CSF 酶切后的分子量均大于其理论分子量 15 kDa,无糖基化的 GM-CSF 分子量为 14.6 kDa

(图6), GM-CSF 有 3 个 *O*-糖基化位点, 这可能是 *O*-糖基化引起的^[12-13]。

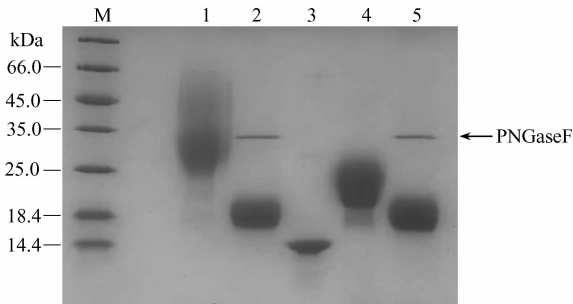


图6 糖苷酶 F (PNGaseF) 酶切后的 GM-CSF

Fig. 6 Purified GM-CSF was digested with PNGaseF. M: Protein molecular weights markers; 1: Hyperglycosylated GM-CSF expressed by X-33; 2: GM-CSF in lane 1 digested with PNGaseF; 3: GM-CSF without glycosylated (Recombinant Human GM-CSF expression by *E. coli*); 4: Lowerglycosylated GM-CSF expressed by X-33 (*och1*⁻); 5: GM-CSF in lane 4 digested with PNGaseF.

3 讨论

本研究通过双交换同源重组敲除目的基因的方法, 首次成功敲除野生型毕赤酵母 X-33 的 *URA3* 基因并且没有引入外源标记基因, 构建了一个尿嘧啶营养缺陷的 X-33 (*ura3*⁻) 菌种; 然后用 X-33 (*ura3*⁻) 菌的 *URA3* 选择标记, 敲除了 X-33 的 α -1, 6-甘露糖转移酶 (*och1p*) 基因, 并在 X-33 (*och1*⁻) 菌中高效表达了糖蛋白 GM-CSF, 与野生型 X-33 菌表达的为过度糖基化的蛋白相比, X-33 (*och1*⁻) 菌表达的该蛋白过度糖基化程度明显降低。

酵母具有培养成本低、表达水平高、遗传操作简单、不产生内毒素、便于大规模工业化生产等优点, 又具有真核细胞的大部分翻译后修饰功能如 *N*-糖基化, 广泛用于各种外源重组蛋白的表达^[2-3]。但酵母对蛋白糖基化修饰后形成高甘露糖型糖链, 不同于哺乳动物细胞产生的复杂型糖链, 因此酵母表达的蛋白尤其是药用糖蛋白用作治疗用时, 会产生很多问题, 如活性降低、易被清除、产生免疫反应等^[5-6], 限制了酵母在生产药用蛋白中的应用。酵母对蛋白的 *N*-糖基化修饰起始于内质网, 在内质网中, 首先形成 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖链结构^[7], 这一寡糖链的形成过程从酵母到哺乳动物细胞中是高度保守的。随后具有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖链结构的蛋白被转运至高尔基体继续加工, 酵母和哺乳动物细胞对糖基的

加工和修饰途径便明显不同了。酵母高尔基中, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖链首先在 α -1, 6-甘露糖转移酶 (*och1p*) 和 α -1, 3-甘露糖转移酶 (*mnn1p*) 的作用下, 添加 α -1, 6 甘露糖和 α -1, 3 甘露糖, 接着在一系列甘露糖转移酶和磷酸甘露糖转移酶的共同作用下, 最终形成高甘露糖型糖链^[8]。

与酿酒酵母等相比, 毕赤酵母过度糖基化修饰程度较低, 而且不含有 α -1, 3-甘露糖转移酶 (*mnn1p*)^[8], 只需敲除毕赤酵母形成过度糖基化过程中的一个关键酶- α -1, 6-甘露糖转移酶 (*och1p*) 的基因就可能达到阻断过度糖基化合成的起始, 因此我们选用毕赤酵母 X-33 作为改造菌株。

鉴于 α -1, 6-甘露糖转移酶 (*och1p*) 在毕赤酵母过度糖基化过程中起的重要作用, 这个基因的敲除可能会对酵母的生长和代谢产生影响, 使得 *OCH1* 基因的敲除工作十分困难。Choi 等^[10] 采用双交换同源重组方法, 筛选了 1000 多个阳性克隆, 才获得了一个 *OCH1* 基因敲除菌株; 而 Vervecken 等^[11] 同样用双交换同源重组方法, 尝试了各种条件均未能成功, 最后他们采用在目的基因阅读框中插入一段序列来灭活该基因的方法, 才获得 *OCH1* 基因敲除菌株, 但该方法会造成敲除基因中序列重复, 从而产生回复突变; 国内研究小组^[17] 通过两步同源重组的方法, 实现了敲除 *K. lactis* 和 *P. pastoris* 的 *OCH1* 基因。

我们通过 PCR 扩增敲除基因阅读框两端 1 kb 以上的同源臂序列, 采用常规的双交换同源重组法, 成功且高效筛选到毕赤酵母 X-33 的 *URA3* 和 *OCH1* 基因敲除菌株。以上的几种敲除毕赤酵母 *OCH1* 基因的情况, 可能是所选用的菌种和筛选条件不同。

在研究中还发现, 与野生型 X-33 菌相比, X-33 (*och1*⁻) 菌生长较慢, 37°C 条件下呈现温度敏感, 摇瓶培养过程中出现絮凝现象, 这些情况与相关报道相似^[10-11], 改善培养条件后这些情况可以得到改善。与野生型 X-33 菌相比, X-33 (*och1*⁻) 菌表达的糖蛋白 GM-CSF 分子量明显降低, 说明过度糖基化修饰程度进一步降低; 而且 X-33 (*och1*⁻) 菌的蛋白表达量没有明显的变化, 说明 *OCH1* 基因的敲除没有对其蛋白的表达产生不良影响。

同时 X-33 (*och1*⁻) 菌还可以用于进一步的人源 *N*-糖基化改造, 通过引入一系列合成复杂型糖链蛋白所需要的酶到酵母中, 从而获得更适合生产药

用糖蛋白的酵母工程菌。国外在这方面开展了广泛的研究并取得了良好的进展,从2003年起, Gerngross 研究小组用 *OCH1* 基因敲除的毕赤酵母为起始改造菌种,通过一系列的人源 *N*-糖基化改造,获得了能合成各种复杂型糖链和末端唾液酸的基因工程酵母^[19],用 *N*-糖基工程改造后的毕赤酵母中成功表达了带有复杂糖链的人用治疗性抗体-人源化 anti-CD20 单抗,显示了比哺乳动物细胞表达的该抗体更高的活性^[20],同时扩大到工业化培养规模也显示了表达水平高,糖基结构均一的优点^[1];目前,国内刚起始这方面的研究。

因此,我们首次成功构建的 X-33 (*och1*⁻) 菌提供了一个对蛋白低糖基化修饰的毕赤酵母表达系统,还可用作进一步 *N*-糖基化改造的工程酵母,为需求日益增长的糖蛋白类药物提供一个优良的生产平台。

参考文献

- [1] Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang YW, Li F, Lynaugh H, Malle M, McKelvey TW, Mitchell T, Nysten A, Rittenhour A, Stadheim TA, Zha DX, Anjou M. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2008, 12(015): 1-8.
- [2] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, 16 (1): 23-52.
- [3] Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 329-332.
- [4] Dean N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1426(2): 309-322.
- [5] Guo M, Hang HF, Zhu TC, Zhuang YP, Chu J, Zhang SL. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 42(4): 340-345.
- [6] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(8): 865-870.
- [7] Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 2001, 291(5512): 2364-2369.
- [8] Wildt S, Gerngross TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(2): 119-128.
- [9] Callewaert N, Laroy W, Cadirgi H, Geysens S, Saelens X, Jou WM, Contreras R. Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1,2-alpha-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 2001, 503:173-178.
- [10] Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2003, 100(9): 5022-5027.
- [11] Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, Vusser KD, Contreras R. In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 2639-2646.
- [12] Dorr RT. Clinical properties of yeast-derived versus *Escherichia coli*-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clinical Therapeutics*, 1993, 15(1): 19-29.
- [13] Pal Y, Khushoo A, Mukherjee KJ. Process optimization of constitutive human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 650-657.
- [14] Higgins DR, Cregg JM. *Methods in Molecular Biology: Pichia protocols*, volume 103, Totowa, NJ: Humana Press, 1998: 1-73,95-107.
- [15] Joseph S, David WR. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 上册,26-137, 350-396,611-666.
- [16] Boeke JD, LaCroute F, Fink GR. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet*, 1984, 197: 345-346.
- [17] Liu B, Gong X, Chang SH, Yang YL, Song M, Duan DM, Wang LN, Ma QJ, Wu J. Disruption of the *OCH1* and *MNN1* genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Biotechnology*, 2009, 143: 95-102.
- [18] Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, Callewaert N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nature Protocol*, 2009, 4: 58-70.

- [19] Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang YW, Rios S, Bobrowicz P, Stadheim TA, Li HJ, Choi BK, Hopkins D, Wischnewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S, Gerngross TU. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 2006, 313 (5792): 1441-1443.
- [20] Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Zha D, Prinz B, Ballew N, Bobrowicz P, Choi BK, Cook WJ, Cukan M, Houston-Cummings NR, Davidson R, Gong B, Hamilton SR, Hoopes JP, Jiang Y, Kim N, Mansfield R, Nett JH, Rios S, Strawbridge R, Wildt S, Gerngross TU. Optimization of humanized IgGs in glycolengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(2): 210-215.

Pichia pastoris X-33 with *OCH1* gene deletion and its expression of glycoprotein GM-CSF

Dacheng Zhang¹, Yongli Xu², Xin Xin², Ruiyu Zhu², Jian Jin^{2*}

¹School of Biotechnology, ²School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [**Objective**] Glycoproteins derived from yeast expression systems are usually hyperglycosylated and contain non human *N*-glycans of the high mannose type. α -1, 6-mannosyltransferase (*och1p*) plays a key role in modifying glycoproteins with high mannose-type *N*-glycans. Therefore, we engineered a *P. pastoris* X-33 strain with *OCH1* gene deletion. This strain was further used as a host for production of glycoproteins with smaller *N*-glycans. [**Methods**] First, we knockout the *URA3* gene of *P. pastoris* X-33 which encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase by double homologous recombination. Then, we knockout *OCH1* gene using *URA3* gene as a selecting marker, and obtained X-33 (*och1*⁻) strain. After that, this mutant strain was used to expression the glycoprotein granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). [**Results**] Different from hyperglycosylated GM-CSF expressed in wild type *P. pastoris* X-33, the glycoprotein expressed in X-33 (*och1*⁻), containing smaller *N*-glycan. [**Conclusion**] The results suggested that X-33 (*och1*⁻) strain can be used as an expression host for production of glycoproteins lacking the outer-chain hypermannoses, and a host could be used for further *N*-glycosylation engineering.

Keywords: *N*-glycosylation, *Pichia pastoris* X-33, Gene knockout, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918219; E-mail: Jinjian31@163.com

Received: 20 November 2010/Revised: 9 January 2011