

# 一种值得注意的基因表达系统 ——巴斯德毕赤氏酵母

戴 秀 玉

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

正当我们热衷于利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等传统表达系统来研究各种基因表达时,国外一些新型表达系统正在悄然兴起。这些系统有着独特的优点,潜力很大,可能对今后基因工程产品的开发和生物技术的发展产生重要作用。其中巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)特别值得引起我们的注意。本文对该系统作一简要评述。

## 1 毕赤氏酵母的生物学特性

人们对这类微生物发生兴趣始于七十年代初。由于它能利用甲醇作为唯一碳源大量合成蛋白质,曾一度用于工业规模的单细胞蛋白的生产,因此也对它作了大量的研究,总结起来它们有以下几个特性<sup>[1]</sup>: (1)能以甲醇为唯一碳源快速生长,在无机盐培养基中细胞量可达 100g/L,其中代谢甲醇的关键酶—醇氧化酶可达细胞可溶性蛋白的 30%。(2)生活史与酿酒酵母十分相似,在营养生长期以单细胞为主,但子细胞可进行同宗交配,营养不良时可诱导相对交配型细胞交配产生二倍体,该二倍体能在以后的生长中得以保持。营养不良时也可诱导产生孢子,形成含有四个孢子的子囊,这些子囊孢子可用作四分子分析或随机分析。(3)细胞学研究表明毕赤氏酵母存在着一种称为微体(Microbody)的细胞器,由于该细胞器中大量合成过氧化物酶,所以微体也称过氧化物酶体。它是一种由外膜包围着的结构简单的细胞器,其蛋白由核基因编码,但本身不含 DNA,经诱导产生并随细胞生长而分裂。微体是一种合成储存蛋白质的地方,该特点对外源基因蛋白的表达十分有利,可使它们免受蛋白酶的降解且不对细胞产生毒害。

## 2 利用毕赤氏酵母表达外源蛋白的优点

由于上述生物学特性,使毕赤氏酵母对表达外源蛋白十分有利,归结为以下三点<sup>[2]</sup>: (1)高表达。由于表达载体利用醇氧化酶基因启动子很强,细胞生长速度很快,所以该表达系统表达的外源蛋白产量很高。表 1 是一些例子,其中破伤风毒素蛋白的产量达 12g/L,而目前常用的表达系统一般在毫克级。所以其表达量比其它系统高 10 倍甚至 100 倍<sup>[3]</sup>,这在表达量方面是一大突破。(2)高稳定。由于该系统的表达载体不是以自主复制的质粒形式存在,而是整合在染色体上,所以构建的菌株十分稳定。(3)高分泌。酿酒酵母中一些分泌信号和先导序列(如 $\alpha$ 因子)的分子生物学特性已经研究得十分清楚,可用于该表达系统,加之它自身的生物学特性,其分泌表达可达 10g/L,这在已知的分泌表达系统中是十分罕见的。

## 3 表达系统

经过近几年一些实验室的努力,毕赤氏酵母表达系统日趋成熟。美国 Invitrogen 公司已有该表达系统的试剂盒出售,因此要表达一个外源基因十分方便,现在美国一些生物技术公司已以此作为常规表达

系统。下面将有关载体,受体等情况作一简要介绍。

表1 在巴斯德毕赤氏酵母中表达的外源蛋白

蛋白	基因产物位置	产量(g/L)	蛋白	基因产物位置	产量(g/L)
肿瘤坏死因子	胞内	8.0	破伤风毒素蛋白	胞内	12.0
乙肝病毒表面抗原	胞内	0.3	人血清白蛋白	分泌	10.0
超氧化物歧化酶	胞内	0.75	鼠表皮生长因子	分泌	0.45
白细胞介素-2	胞内	4.0	类胰岛素因子	分泌	0.50

3.1 载体

由于毕赤氏酵母没有稳定的附加体质粒,所以其表达载体采用整合型质粒,图1是一个代表性的表达载体。该载体包含带有启动子的醇氧化酶-1基因(5' AOX1)、多个克隆位点(MCS)、AOX1的终止子(AOX1t)、His4选择标记、3' AOX1区和大肠杆菌的氨苄青霉素抗性基因。当整合型载体转化受体时,它的5' AOX1与3' AOX1能与染色体上的同源基因重组,从而使整个载体连同外源基因被插入到受体染色体上,外源基因在AOX1启动子控制下表达。表2为毕赤氏酵母的一些常用表达载体。

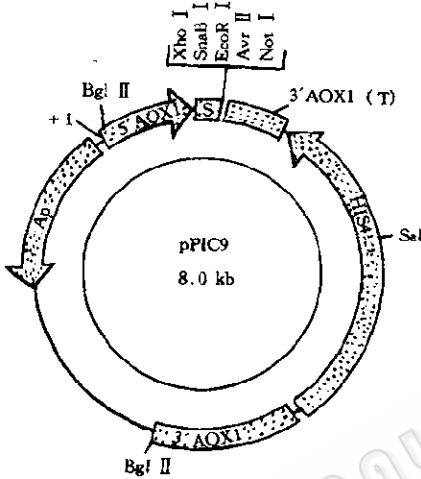


图1 一种常用的毕赤氏酵母表达载体

3.2 受体菌株

该系统最常用的受体菌是GS115,为组氨酸缺陷型,可用作选择标记。用一般的酵母原生质体法即可转化该菌,转化率一般在 $10^7$ 转化子/ $\mu\text{g}$  DNA。转化

表2 毕赤氏酵母的常用表达载体

载体名称	克隆位点	选择标记	特点
pPIC3	BamH I, Nco I, SnaB I	His4	多克隆位点载体
	EcoR I		
	Avr III, Not I		
pPSC3K	BamH I, Nco I, SnaB I	His4, Kan	多克隆位点载体,并可用G418选择多拷贝克隆
	EcoR I		
	Avr III, Not I		
pHIL-D1	EcoR I	His4	原始构建的载体
pA0815	EcoR I	His	用于体外构建多拷贝表达载体
pPIC9	Xho I, SnaB I	His4, Not I	分泌表达
	EcoR I, Avr II		
pPIC9K	Xho I, SnaB I	His4, Kan	分泌表达和可用G418选择多拷贝表达克隆
	EcoR I, Avr II		
	Not I		

时载体 DNA 必须切成线状,这样才能与染色体进行同源重组,并以此将整个载体连同外源基因整入宿主染色体。表达载体整入染色体时有两种方式,这取决于转化前切开 DNA 的方式。如在 3' AOX1 邻近的 Bgl II 或 Not I 内切酶位点切开,则整合在染色体的 AOX1 座位,所产生的转化子表型为 His<sup>+</sup> Mut<sup>-</sup> (不能利用甲醇);如在 His4 基因的 Sal I 内切酶位点上切开,则整合在染色体的 His4 位置,所产生的转化子表型为 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> (能利用甲醇)。

### 3.3 分泌表达

毕赤氏酵母本身不分泌内源蛋白,但在外源蛋白表达时可利用酿酒酵母的分泌信号,如 $\alpha$ 交配因子的分泌和先导序列,现在这方面已有不少成功的例子。例如利用啤酒酵母的 $\alpha$ 因子分泌序列可使毕赤氏酵母分泌人血清白蛋白达 10g/L 的水平,而且由于是无机盐培养基以及无其它蛋白分泌,产物的纯度可达 80%~90%,这对提取纯化十分方便。因此这一系统正吸引着许多科学家在这方面进行新的尝试和探索。

### 4 实现高表达的几个有关问题

虽然毕赤氏酵母有许多优点,但真正实现高表达还必须根据它的特点进行周密的设计和精心的试验才能达到,实现外源基因在毕赤氏酵母中的高表达,还应考虑以下一些问题:(1)拷贝数。整合型表达载体的表达与自主复制的质粒型表达载体不同,前者的转化子中表达载体的拷贝数变化较大,后者的比较稳定,所以实现整合型表达载体的高表达,拷贝数是一个重要因素,野生型巴斯德毕赤氏酵母,在甲醇诱导下,醇氧化酶蛋白含量可达总细胞蛋白的 30%,所以一般认为只要有一个拷贝的 AOX1 基因剂量即可达到 mRNA 的最高水平,但事实并非如此。在 HIV-1 的 Env 基因表达中,随着整入的表达载体拷贝数的增加,mRNA 的水平可增加 2~3 倍<sup>[4]</sup>,所以在研究一个基因表达时,要充分考虑到表达载体的拷贝数。(2)蛋白酶分解。在分泌表达中,由于宿主蛋白酶的存在,经常使表达产物不稳定,降低了表达量。在实际工作中一般采用下列方法防止产物降解:采用蛋白酶缺陷的宿主菌;降低发酵培养基的 pH 值,抑制蛋白酶活性;在培养基中补加氨基酸或多肽以阻遏蛋白酶降解。(3)发酵。在毕赤氏酵母外源基因表达的发酵中,往往摇瓶与发酵罐的结果差别很大。这是由于诱导条件对表达影响较大,而摇瓶的诱导条件又难以控制,所以有人建议在筛选高表达菌种时,经初筛后的菌株应立即用发酵罐进行发酵条件研究。

随着对毕赤氏酵母表达系统的不断改进和完善,这一系统在表达具有商业价值的外源蛋白方面将越来越显示出其重要作用。

## 参 考 文 献

- [1] Faber K N, Harder W, Ab G *et al.* *Yeast*, 1995, 11: 1331~1344.
- [2] Romanos M. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6: 527~533.
- [3] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. *Biotechnology*, 1993, 11: 905~910.
- [4] Scorer C A, Clare J J, McCombie W R *et al.* *Biotechnology*, 1994, 12: 181~184.

## YEAST *PICHA PASTORIS*—A NOTABLE HETEROLOGOUS GENE EXPRESSION SYSTEM

Dai Xiuyu

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)