

毕赤氏酵母 P_{AOX2} 突变体序列分析

戴秀玉 王韞恂 周坚

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

李绍极

(上海海济医药生物工程有限公司 上海 200031)

关键词 AOX2 基因启动子, 自发突变, 序列分析

分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)06-0559-02

近年来巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)已被广泛用于商业化生产外源蛋白的基因工程菌^[1]。与常用的酿酒酵母表达系统相比,该系统具有以下优点:1. 有强有力的、受甲醇严格诱导调控的启动子;2. 表达蛋白高分泌;3. 表达菌株稳定;4. 适合于高密度培养。但目前使用的系统也有其不足之处,当利用该系统的载体将外源基因通过双交换整合到染色体中 AOX1 基因位置时, AOX1 基因被破坏^[2]。已知醇氧化酶是细胞利用甲醇的关键酶,该酶分别由 AOX1 基因和 AOX2 基因编码合成^[3]。虽然 AOX2 与 AOX1 的序列同源性达 92%,但 AOX2 基因的表达产物在正常细胞中仅占总酶量的 5%^[4],这样使细胞利用甲醇的能力大大降低,从而延长了细胞培养发酵的时间。为克服这一不足,本文通过分离选择恢复利用甲醇能力的自发突变体,并对突变体的 AOX2 基因上游区域经 PCR 扩增后进行序列测定,结果发现其阻遏蛋白结合区域有两个点突变,确定为 P_{AOX2} 突变体。该工作为提高 AOX2 基因活性、实现外源基因的高表达提供了有效的转化受体。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

P. pastoris GS115/HSA(AOX1 缺陷菌株,插入外源人血清白蛋白基因 HSA),购自 Invitrogen 公司,*E. coli* JM109, pBluescriptM13 为本实验室保存。

1.2 培养基

YPD 培养基和 LB 培养基^[5]分别用于 *P. pastoris* 和 *E. coli* 菌种的保存和培养,补加氨苄青霉素(Amp 50 μ g/mL)和 X-gal 的 LB 平皿用于筛选带有 PCR 克隆片段的转化子。

1.3 分子生物学试剂

内切酶购自 Boehringer mannheim 公司,PCR 试剂盒为上海 Sangon 公司产品。

1.4 PCR 扩增

PCR 引物:P1 5'GCTTAAAGGACTCCATTTC3'

P2 5'CCATGGTTCTCAGTTGATTTGTTTG3'由中国科学院微生物研究所技术中心合成。

PCR 扩增条件:PCR 在 TC-96AE 扩增仪(中国科学院遗传研究所制造)上进行,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 90s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 90s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.5 DNA 提取、连接、转化等操作均按文献[5]进行,略作修改。

1.6 测序

在 Applied Biosystems Prism 377 型荧光自动测序仪上进行。

2 结果

2.1 P_{AOX2} 启动子片段的 PCR 扩增

GS115/HSA 菌株染色体整合了外源人血清白蛋白基因。在整合过程中,由于载体与染色体基因的双交换破坏了 $AOX1$ 基因功能($AOX1$ 基因缺陷株),表现为甲醇利用缓慢(Mut^s),从该菌株中分离筛选了 5 株表现为 Mut^+ 的自发突变株,并提取其中一株的染色体 DNA 作为 PCR 扩增的模板。突变株接入 YPD 培养液,30℃ 振荡培养过夜,离心收集菌体,用无菌水洗涤 3 次后,重悬于 2mL SED 溶液(1mol/L 山梨醇,10mmol/L 柠檬酸钠,10mmol/L EDTA,10mmol/L DTT, pH7.5),加入 β -巯基乙醇至终浓度为 2%,室温振荡 15min,离心后重悬于 SED 溶液,加入蜗牛酶至 2~4mg/mL,37℃ 保温 3h 使细胞溶壁。镜检出现大量原生质体后加入 SDS 至终浓度为 2%,混匀,使溶液澄清。然后按文献 [5] 方法,抽提染色体 DNA 并溶于 TE(pH7.4)缓冲液,取 1 μ L 电泳检查样品的纯度和浓度。按材料和方法所述条件在 50 μ L 体积内进行 PCR 扩增,取 1 μ L 反应液进行琼脂糖凝胶电泳,从图 1 照片看出 PCR 产物的电泳条带约为 1kb,与所设计的 $AOX2$ 启动子区域长度相符,证明获得 P_{AOX2} 的 DNA 片段。

2.2 构建测序质粒

将 PCR 获得的 1kb DNA 片段,与经 *Sma*I 酶切的 pBluescripM13⁻ 载体连接,转化 *E. coli* JM109 菌株,在含有 Amp 和 X-gal 的 LB 平皿上通过蓝白斑筛选挑取有插入的转化子。快速法抽提质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测,图 2 结果表明转化子带有 1kb 左右的外源插入片段。选取其中 1 个转化子进行测序。

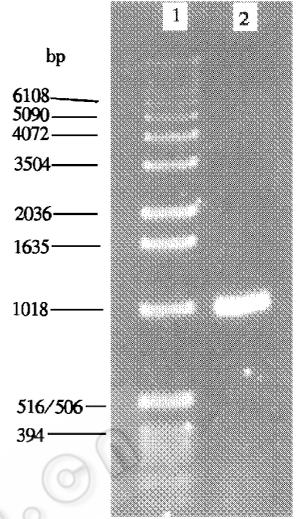


图 1 PCR 扩增的 P_{AOX2} DNA 片段
1. 分子量标记 2. PCR DNA.

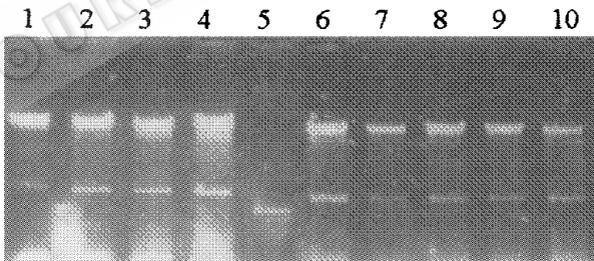


图 2 转化子琼脂糖凝胶电泳

1~4. pBluescripM13 P_{AOX2} 5. pBLUESCRIPm13;
6~10. pBluescripM13 P_{AOX2} .

2.3 序列分析

以上述设计的 PCR 引物为正、反向引物,用 ABI 自动测序仪进行序列测定,全长为 1022bp。通过计算机对测定序列与 Gene Bank 中 $AOX2$ 启动子序列进行比较分析,结果如图 3。

结果表明 $AOX2$ 基因启动子上游调控区有两个位置的碱基发生了改变。-255 位置的 T→C, -529 位置的 C→T, 确定我们筛选获得的是 P_{AOX2} 自发突变体。已知 -255 至 -215 是 $AOX2$ 基因上游阻遏顺序 URS2 区域,这一位置的碱基改变影响了阻遏蛋白与该顺序的结合,使转录水平提高。根据 Ohi 等^[6] 构建的缺失了 $AOX2$ 启动子 -645 至 -341 区域的突变体,其 $AOX2$ 基因的转录大大增加,因此 -529 位置的碱基改变同样增加了 $AOX2$ 基因转录水平。可以认为这两个碱基的改变,是 P_{AOX2} 自发突变体对甲醇的利用从 Mut^s 转变为 Mut^+ 表型的分子基础。

```

                                -529
Mutant.....TTTCCCCAATGACCTTTTGGGAAAGAAAGC.....TACAGAAG
Original....TTTCCCCAATGACCTTTTGGGAAAGAAAGC.....TACAGAAG
                                -255                -205
CGTCCTACCCCTCACC GGTTGA.....GATTATTGGTATAAAAGAA
CGTCCTACCCCTCACC GGTTGA.....GATTATTGGTATAAAAGAA
                                -1
.....CATGGGGG.....
.....CATGGGGG.....

```

图 3 序列比较结果

3 讨论

基因的转录调控是通过激活蛋白和阻遏蛋白特异地与启动子的正调节顺序或负调节顺序结合而实现的。已知在 *S. cerevisiae* 中,其调节元件由 TATA box、正调节因子和负调节因子组成。Ohi 等人^[6]通过对 *P. pastoris* AOX2 基因调控研究发现, AOX2 基因启动子区域也存在上述调控元件,并且鉴定了一个上游激活序列(UAS)和两个上游阻遏序列(URS1)和(URS2)。UAS 正调节作用能使转录水平增加,URS1 和 URS2 的负调节作用则阻遏转录的活性。我们从 AOX1 基因缺陷菌株中分离的 Mut⁺ 自发突变体,其 AOX2 基因上游区域经 PCR 扩增后进行全序列测定,确定该突变体在 -255 和 -529 两个位置的碱基发生改变。这两个位置是阻遏蛋白结合区域,根据顺式作用调控机理,该区域发生点突变后,阻遏蛋白不能与之很好结合,这种去阻遏作用使得转录效率增强。

外源基因在毕赤氏酵母系统的高表达一般应考虑:1. 启动子强弱;2. 外源基因整合的拷贝数;3. 寄主菌的蛋白酶降解;4. 发酵条件。我们在不改变该系统遗传背景的前提下从甲醇利用为 Mut⁺ 菌中筛选了 Mut⁺ 自发突变体, P_{AOX2} 突变增强了 AOX2 基因的转录。以上研究结果说明我们可以通过改变 AOX2 基因的上游调控区域来改善 AOX1 基因缺陷功能,提高细胞的甲醇利用能力,进而完善该系统,使其在基因工程药物表达及产业化方面发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 905~910.
- [2] Grane D I and Gould S J. *Curr Genet*, 1994, **26**: 443~450.
- [3] Cregg J M, Madden K R, Barringer K J *et al.* *Mol Cell Biol*, 1989, **9**: 1316~1323.
- [4] Koutz P, Davis G R, Stillman C *et al.* *yeast*, 1989, **5**: 167~177.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (金冬雁等译). 分子克隆实验指南(第二版)北京:科学出版社, 1992.
- [6] Ohi H, Miura M, Hiramatsu R *et al.* *Mol Gen Genet*, 1994, **243**: 489~499.

SEQUENCE ANALYSIS OF THE MUTATED AOX2 PROMOTER REGION IN THE *PICHTA PASTORIS*

Dai Xiuyu Wang Yunxun Zhou Jian

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

Li Shaoji

(Shanghai Hygene Pharmaceutical Bioengineering Ltd Co ,Shanghai 200031)

Abstract Spontaneous revertants of the AOX1-defective *P. pastoris* strain have been isolated , which were identified as phenotypically utilize methanol to grow as the wild type. The promoter region of the AOX2 gene from the revertant has been obtained by PCR amplification ,and the DNA fragment is 1022 base pair in size. By the analysis of sequencing result and compared with the AOX2 gene sequences recorded in Gene Bank ,two point mutations which at positions of -529 and -255(relative to the translation initiation codon)respectively ,have been found. Since the positions are located in the AOX2 upstream repression sequences ,the mutations may act interfere the repressor to combine with the functional sequences ,and increase transcriptional activity. The above result implicated that the *P. pastoris* ' ability to utilize methanol could be increased through modification the upper stream transcriptional regulation region in the AOX2 gene.

Key words AOX2 gene promoter ,Spontaneous mutation ,Sequencing

《生物工程进展》

欢迎订阅 欢迎刊登广告

国际标准刊号 ISSN1003-3505 国内统一刊号 CN11-2855/Q 邮发代号 82-673

《生物工程进展》双月刊 ,是中国生物工程领域全国性学术团体、国家一级学会——中国生物工程学会会刊。《生物工程进展》设有生物技术研究进展、研究报告、专题论述、技术与方法、评论、动态报道、知识产权研究、市场与商情、中国生物工程学会报道、会议消息等栏目 ,还以《生物工程进展》专集、增刊等的形式出版生物工程专著。

《生物工程进展》创刊于 1976 年 ,是我国第一家中央级综合性生物工程专业刊物 ,发行面覆盖全国除西藏自治区的三十个省、自治区、直辖市 ,我国的香港、台湾及海外的有关大学、研究机构、图书馆均有订阅 ,和海外建立有广泛的刊物交换联系。

《生物工程进展》设有广告专版和新技术新产品信息发布专栏 ,欢迎刊载生物工程产品、技术和服务等广告。

《生物工程进展》以中国生物工程学会强大的信息与专家网络为依托 ,为生物工程项目、技术提供投资咨询、论证和产品推荐服务。

《生物工程进展》每期订价 10 元 ,全年订阅费 60 元 ,邮发代号 82-673 ,全国各地邮局发行 ,也可直接与编辑部联系订阅。

本刊地址 北京市海淀区科学院南路 8 号(100080)

主编 张树庸 编辑部主任 张宏翔 电话/传真 62562548 汉字寻呼 68368800—266