

## 一种增加重组毕赤酵母拷贝数提高胰岛素前体产量的策略

龚香艺<sup>2,3</sup>, 丁重阳<sup>2,3</sup>, 刘立明<sup>2,3</sup>, 吴静<sup>1,3\*</sup>

江南大学,<sup>1</sup> 无锡医学院,<sup>2</sup> 食品科学与技术国家重点实验室,<sup>3</sup> 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:** 【目的】为了进一步提高毕赤酵母表达生产人胰岛素前体的产量, 【方法】将构建的表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 电转至毕赤酵母 X-33 中, 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zeocin 的 YPDS 抗性平板筛选获得过量表达人源胰岛素前体 (IP) 的重组菌株 B4 和 S6。在此基础上, 以过量表达胰岛素前体的 B4 和 S6 为出发菌株, 以 *SacI* 线性化的表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 进行重复电转化, 并在 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zeocin 的 YPDS 平板上筛选获得一株拷贝数为 7 的重组毕赤酵母 2B4。【结果】该菌株在 5 L 规模发酵罐上, 人源胰岛素前体产量是低拷贝数菌株 B7 的 2.7 倍, 且菌体并未因拷贝数高而表现出生长不良的现象。实时定量 PCR 检测后, 发现 2B4 菌株胰岛素前体基因的转录水平是 B7 的 2 倍。【结论】综上所述表明, 采用抗性筛选和重复电转相结合的高拷贝重组毕赤酵母构建策略, 能有效促进目的基因的转录水平, 最终显著提高目标蛋白的产量。

**关键词:** 多拷贝重组毕赤酵母, 胰岛素前体产量, 重复电转, pPICZ $\alpha$

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 06-0545-08

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 因具有生长快速、易于培养、培养基廉价、实验过程简单、强力启动子、外源蛋白加工折叠和翻译后修饰等优点, 而成为理想的蛋白表达系统, 被国内外广泛应用于生产 500 多种外源蛋白<sup>[1-2]</sup>。为了进一步提高毕赤酵母生产异源蛋白的产量, 通常采用的策略包括: (1) 提高目的基因转录水平: 采用强启动子或双启动子<sup>[3]</sup> 或增加目的基因拷贝数<sup>[4-5]</sup>, 提高目的基因在毕赤酵母中的转录水平; (2) 提高翻译水平: 通过使用毕赤酵母偏爱密码子或调整目的基因 GC 含量<sup>[6]</sup>, 提高目的基因的翻译水平; (3) 增强分泌水平: 信号肽的选择与改造<sup>[7]</sup> 或共表达与折叠相关的分子伴侣 (BiP、PDI 等)<sup>[8]</sup>, 增加目标蛋白的分泌水平; (4) 融合表达: 通过与高表达序列 (如人血清白蛋白序列) 进行

融合表达, 为目标蛋白提供良好的表达信号<sup>[9]</sup>; (5) 减少目标蛋白的降解: 通过使用蛋白酶缺陷型宿主菌 (如 SMD1163、SMD1165、SMD1168) 或调整 pH、温度, 使用蛋白胨、酵母粉、酪蛋白水解物等蛋白酶竞争剂等措施减少蛋白酶对目标蛋白的降解, 实现目标蛋白的大量积累<sup>[10]</sup>。

在上述提高目标蛋白产量的策略中, 增加目的基因拷贝数能显著提高目标蛋白的产量<sup>[4-5]</sup>。通常采用两种方法增加目的基因拷贝数: (1) 表达载体一次性电转化毕赤酵母宿主菌后, 利用抗性平板直接筛选获得多拷贝重组毕赤酵母; (2) 体外定向构建多拷贝表达载体后利用抗性平板筛选获得多拷贝重组毕赤酵母。后者因具有高定向性、易于低浓度抗性平板筛选而广泛应用于多拷贝重组毕赤酵母的

**基金项目:** 中组部首批青年拔尖人才支持计划; 江苏省杰出青年基金 (BK2012002); 教育部创新团队发展计划 (IRT1249); 国家自然科学基金 (31101229)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

**作者简介:** 龚香艺 (1987-), 女, 黑龙江鸡西人, 硕士研究生, 主要从事毕赤酵母表达异源蛋白的研究。E-mail: gong.xiangyi@163.com

收稿日期: 2013-01-03; 修回日期: 2013-03-07

构建。对于 pPICZ、pPICZ $\alpha$ 、pPIC6 和 pPIC6 $\alpha$  等载体,由于较小,能有效地减轻重组酵母代谢负担,显著提高其高密度培养时的细胞浓度,广泛应用于重组蛋白的生产中。但由于这类载体的线性化位点位于 AOX1 启动子上,在多拷贝表达载体构建过程中,线性化将切断所构建的多拷贝表达载体,限制了外源蛋白的产量。为解决这一问题,Liang 等扩增 pPIC9K 载体 Kan-His4 片段并将其插入 pPICZ $\alpha$  载体<sup>[11]</sup>,然而在 HIS4 位置进行整合时,则可能会发生缺失 lacZ 基因表达盒的现象<sup>[12]</sup>,而本文以毕赤酵母过量表达人胰岛素前体为研究模型,发展了抗性筛选和重复电转相结合的更高拷贝重组毕赤酵母构建策略,为实现外源蛋白高效生产提供了新的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与载体:** pMD19-T-simple, TaKaRa; pPICZ $\alpha$  载体,大肠杆菌 JM109,毕赤酵母 X-33,本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶 *Sac*I、*Bam*HI、*Bgl*II, DNA Marker DL10000,购自大连宝生物工程公司;蛋白质浓度测定试剂盒,LYTICASE, UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,引物合成,上海生物工程公司;酵母基因组试剂盒,天根公司; iScript cDNA Synthesis Kit, iTaq Universal SYBR Green Supermix, 购自 Bio-rad 公司。PCR、QPCR 扩增仪、全自动凝胶成像系统、电穿孔仪 Gene Pulser, Bio-rad; 质谱仪 ultrafleXtreme, Bruker; Diode Array Bio Photometer U-0080D 核酸浓度测定仪, HITACHI 公司; 5 L 发酵罐,上海宝兴。

**1.1.3 培养基:** 低盐 LB、YPD、YPDS、BMGY、BMMY、BSM 基础盐培养基、PTM1 微量元素液的组成与配置参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

### 1.2 表达载体的构建

将含胰岛素前体基因 IP 的质粒 pUC57-IP 经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切连接至相同双酶切的 pPICZ $\alpha$  质粒上,转化 DH5 $\alpha$  后,进行菌落 PCR 验证<sup>[13]</sup>。

### 1.3 重组毕赤酵母的构建

用 *Sac*I 线性化的表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 电转化入毕赤酵母 X-33 后,涂布到 100  $\mu$ g/mL zeocin 的

YPDS 平板上<sup>[13]</sup>,将生长的菌落重新划线于相同浓度 zeocin 的 YPD 平板上,以纯化与再次验证菌株。然后将筛选的菌株分别接入 YPD, 30 $^{\circ}$ C 培养至对数期,提取酵母基因组,以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物, PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C, 4 min, 30 个循环 (95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 72 $^{\circ}$ C, 5 min, 检测表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 是否整合进酵母基因组中。

### 1.4 重组毕赤酵母表达产物的检测与物质鉴定

将选定的重组毕赤酵母先经 BMGY 菌体培养 24 h 后转入 BMMY 诱导培养,每隔 24 h 补加甲醇至 1% (V/V) 浓度进行诱导,诱导 96 h 后, 12000  $\times$  g, 10 min, 以相同总蛋白浓度为上样量归一化因素,将上清进行 Tricine-SDS-PAGE 蛋白电泳<sup>[14]</sup>,观察有无目标条带,初步判断 IP 有无表达。然后基于 Tricine-SDS-PAGE 蛋白凝胶分离的目标条带,利用二级质谱 (MALDI-TOF-TOF) 搜索数据库,进行目标蛋白的物质鉴定,其中一级质谱 MS 采用 RP 700 - 3500 处理方法,二级质谱 MS-MS 采用 LIFT 处理方法。

### 1.5 重复电转化制备多拷贝重组毕赤酵母

在 1.3 和 1.4 方法的基础上,选择目标蛋白表达量较高的菌株作为重复电转化的出发菌,进行下一轮电转化:以选出的出发菌制作酵母感受态细胞,利用 *Sac*I 线性化的 pPICZ $\alpha$ -IP 对其再次电转化,将转化的菌液涂布到高浓度 (1000  $\mu$ g/mL) zeocin 的 YPDS 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 - 5 d, 将长出的菌落再次划线于含相同浓度 zeocin 的 YPD 平板上,并以出发菌做对照,以再次验证并纯化制备的多拷贝重组毕赤酵母。

### 1.6 定量 PCR 确定 IP 基因拷贝数

待测酵母于 YPD, 30 $^{\circ}$ C 培养至对数期,收集约  $1 \times 10^7$  个细胞,先用 Lyticase 进行破壁处理 30 min, 再按照酵母基因组提取试剂盒说明进行操作。使用 Beacon Designer 软件设计定量 PCR 引物 (表 1)。反应体系: 10  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 正向与反向引物, 2  $\mu$ L 质粒 (制作标准曲线) 或待测重组毕赤酵母基因组为模板, 6  $\mu$ L 水; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s), 荧光信号在每个循环延伸结束时采集, 扩增后, 融解曲线按仪器默认程序进行, 即 65 $^{\circ}$ C - 95 $^{\circ}$ C, 0.5 $^{\circ}$ C/s, 测定待测重组毕赤酵母 IP 基因的拷贝数<sup>[15]</sup>。

表 1. 定量 PCR 引物序列

Table 1. Primer sequence for quantitative PCR

Gene	Accession No.	Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon size/bp
IP	Synthetic gene	IP-F	CATTTGGTTGAGGCTTGTATCTG	139
		IP-R	CGCTTAGTTGCAGTAGTTCTC	
GAP	U62648	GAP-F	ATGACCGCCACTCAAAAGAC	98
		GAP-R	GCACCAGTGAAGATGGAAT	
ACT	AF216956	ACT-F	AGTGTTCCTCCATCGGTCGTAG	181
		ACT-R	GGTGTGTGCCAGATCTTT	

## 1.7 目的基因相对转录水平的测定

取约  $1 \times 10^7$  个酵母细胞于研钵中, 然后按照上海生工 Trizol 提取总 RNA 的说明进行毕赤酵母总 RNA 的提取。归一化各样本总 RNA 量后进行反转录, 按 iScript cDNA Synthesis Kit 推荐体系进行, 即:  $5 \times$  iScript reaction mix  $4 \mu\text{L}$ , iScript reverse transcriptase  $1 \mu\text{L}$ , RNA 模板根据其浓度决定体积量, 以 nuclease-free water 补至  $20 \mu\text{L}$ ; 反应条件为:  $25^\circ\text{C}$  5 min,  $42^\circ\text{C}$  30 min,  $85^\circ\text{C}$  5 min。

以 ACT-F、ACT-R 和 IP-F、IP-R 为引物 (表 1) 进行 QPCR, 反应按照 *iTaq* Universal SYBR Green Supermix 推荐体系进行, 即  $20 \mu\text{L}$  体系包括:  $10 \mu\text{L}$   $2 \times$  SYBR Premix Ex *Taq*,  $1 \mu\text{L}$   $10 \mu\text{mol/L}$  正向与反向引物,  $2 \mu\text{L}$  cDNA 模板,  $6 \mu\text{L}$  水; 反应条件同 1.6。每种 cDNA 模板样本 3 个平行。使用  $2^{\Delta\text{Ct}}$  (归一各样本总 RNA 的量) 和  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (选择 ACT 作为内参基因) 进行综合分析。

## 1.8 重组毕赤酵母的高密度发酵

接  $1 \text{ mL}$  甘油菌液于  $100 \text{ mL}$  YPD/ $500 \text{ mL}$  三角瓶中,  $220 \text{ r/min}$ ,  $30^\circ\text{C}$  培养  $24 \text{ h}$ , 然后以  $10\%$  接种量接入到  $2 \text{ L}$  BSM 培养基/ $5 \text{ L}$  罐中进行发酵, 用  $30\%$  氨水维持  $\text{pH}$  5.5, 当甘油耗尽后, 溶氧陡然上升, 开始流加甘油 (控制溶氧大于  $10\%$ ),  $6 \text{ h}$  后停止, 待甘油再次耗尽并饥饿菌体  $2 \text{ h}$  后, 开始流加甲醇, 并通过调节其流速维持培养基中的甲醇浓度在  $2 \text{ g/L}$ 。

胰岛素前体浓度的测定: 发酵液于  $12000 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清用  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后, 利用液相进行分析。使用 Thermo UltiMate 3000 system, 色谱柱为 Vydac Grace  $\text{C}_{18}$  ( $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ) 色谱柱, 柱温  $30^\circ\text{C}$ , 检测波长  $214 \text{ nm}$ , 进样量  $20 \mu\text{L}$ , 采用梯度洗脱进行分析, 流动相 A 为  $0.1\%$  TFA 水, B 为  $0.1\%$  TFA 乙腈, 梯度为  $20\% - 35\%$  B ( $0 - 30 \text{ min}$ ),  $35\% - 70\%$  B ( $30 - 35 \text{ min}$ ),  $70\% - 20\%$  B ( $35 - 36 \text{ min}$ ),  $20\% - 20\%$  B ( $36 - 46 \text{ min}$ )。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组毕赤酵母的构建

随机挑选低盐 LB 平板长出的菌落, 以  $5'$ AOX1 和  $3'$ AOX1 为引物进行菌落 PCR, 结果显示阳性克隆扩增出  $800 \text{ bp}$  片段, 而以空载体 pPICZ $\alpha$  作为对照则扩增出  $588 \text{ bp}$  片段 (图 1-A), 与理论值相一致, 表明目的基因已连接到 pPICZ $\alpha$  载体上, 经测序验证表达载体的阅读框正确。

以 *SacI* 线性化的表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 电转化毕赤酵母 X-33, 在含有  $100 \mu\text{g/mL}$  zeocin 的 YPD 抗性平板上生长出 16 个菌落。将这些菌落重新划线于相同浓度的抗性平板上, 进一步复筛到 14 个菌株, 其中 8 株菌 (S1、S3、S5、S6、B3、B4、B6、B7) 长势较好 (图 1-B)。对 8 株菌的基因组 PCR 验证 (图 1-C), 发现菌株 S3、S5、S6 和 B4、B6、B7 均扩增出  $2.2 \text{ kb}$  (醇氧化酶基因) 和  $800 \text{ bp}$  (表达载体上目的片段) 的片段, 而对照菌株扩增出  $2.2 \text{ kb}$  和  $588 \text{ bp}$  (空载体上的目的片段), 这一结果表明以上 6 株菌是构建成功的重组毕赤酵母。

将 6 株重组毕赤酵母经摇瓶诱导培养  $96 \text{ h}$  后, 将含等量总蛋白浓度的上清液进行 Tricine-SDS-PAGE 蛋白电泳, 发现 6 株菌在  $7 \text{ kDa}$  附近均出现目标条带, 而对照 X-33 和 S0 均未出现目标条带 (图 2-A), 初步认为 IP 获得表达。在此基础上, 对目标条带进行一级质谱检测 (图 2-B), 选取信号强度较好的 2601.571 和 3442.072 两个肽段进行二级质谱后搜索 Mascot 数据库, 分析结果显示 2601.571 肽段与人胰岛素 B 链的 FVNQHLGSHLVEALYLVCGER 肽段匹配 (图 2-C), Mascot 搜索结果见 [http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20120703/FtGmlfEtE.dat](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20120703/FtGmlfEtE.dat), 说明目标条带是人胰岛素前体, 从而证明 IP 在毕赤酵母中成功实现表达。

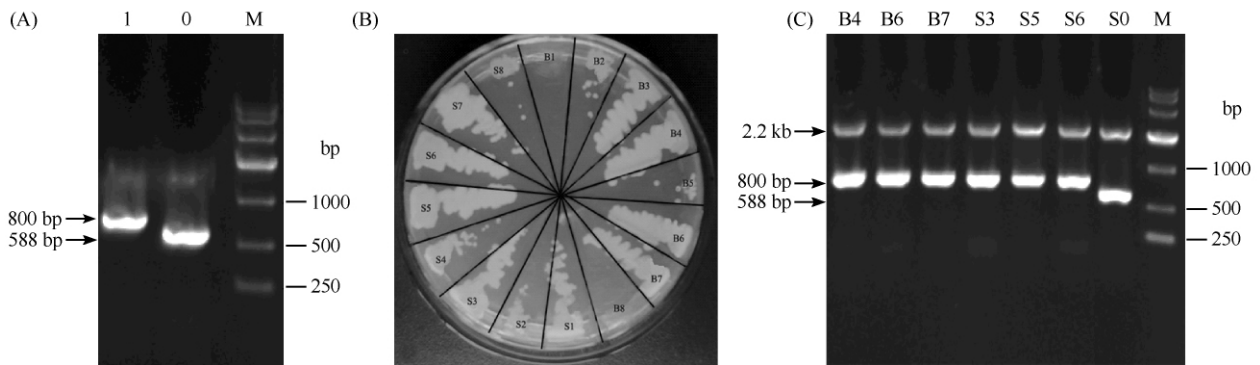


图 1. 重组毕赤酵母的构建

Figure 1. Construction of recombinant yeast. A: Identification of expression vector by colony PCR using 5'AOX1 and 3'AOX1 primers, lane 0 is PCR product from DH5 $\alpha$  colony transformed with pPICZ $\alpha$ , as a control; lane 1 is a selected clone randomly from low-salt LB plate; M, DNA Marker DL10000; B: The selection of transformants on YPD plate containing 100  $\mu$ g/mL zeocin. C: Confirmation of recombinant yeast; M, DNA DL10000 marker; S0 is X-33 integrated with pPICZ $\alpha$ , as a control, others are selected transformants.

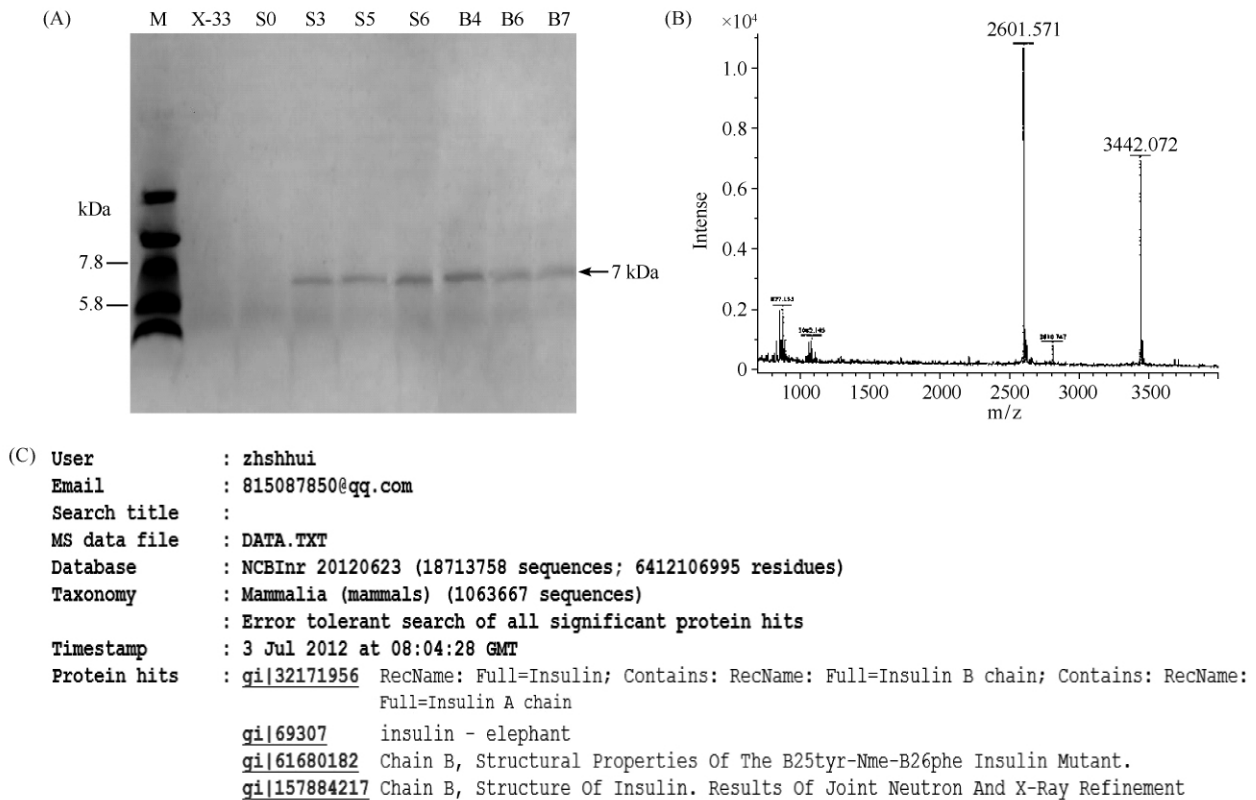


图 2. 重组毕赤酵母表达产物的检测与物质鉴定

Figure 2. Test and identification of recombinant protein. A: Tricine-SDS-PAGE analysis of recombinant yeast culture supernatant at 82 h; M, protein marker; X-33 is original yeast and S0 is X-33 integrated with pPICZ $\alpha$ , both as controls; others are induced positive transformants. B: MS spectrogram analysis of target band. C: Refine result by searching NCBI data base after MS-MS spectrogram.

## 2.2 多拷贝重组毕赤酵母的制备与筛选

从 6 株菌中选取目的蛋白表达量最高的 B4 和 S6 作为出发菌,以 *SacI* 线性化的表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 对其进行重复电转化,涂布到终浓度为

1000  $\mu$ g/mL zeocin 的 YPDS 平板上培养后获得 11 个菌落,经再次验证后,获得 9 株生长具有明显优势的菌株(图 3),从而构建具有多拷贝的重组毕赤酵母。

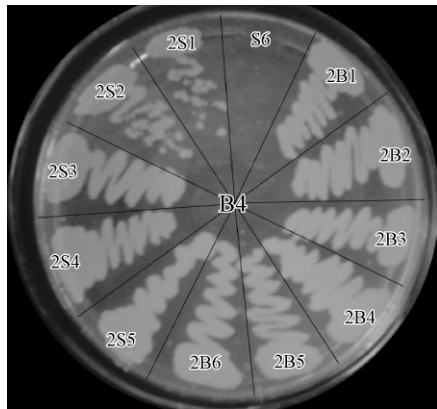


图 3. 1000 µg/mL zeocin YPDS 平板筛选结果

Figure 3. The selection of transformants on 1000 µg/mL zeocin YPDS plate, start strain S6 and B4 are controls, others are screened recombinant strains.

2.3 重组毕赤酵母 IP 基因拷贝数的测定

GAP (3'-磷酸甘油醛脱氢酶基因) 在酵母基因组中拷贝数为 1, 通过计算待测重组毕赤酵母基因组中目的基因总拷贝数与 GAP 总拷贝数的比值, 确定出目的基因的拷贝数<sup>[16]</sup>。通过对 pMD19-GAP 和表达载体 pPICZα-IP 进行系列稀释, 从而获得目的基因 IP 和内参基因 GAP 的标准曲线 ( $R^2 = 0.9996$ ), 如图 4 所示。对从 100 µg/mL 和 1000 µg/mL zeocin 抗性平板上筛选的 16 株菌进行拷贝数的测定, 结果表明重组毕赤酵母中拷贝数与 zeocin 抗性浓度相关, zeocin 抗性浓度越高, 重组毕赤酵母中目的基因的拷贝数越高 (表 2)。在此基础

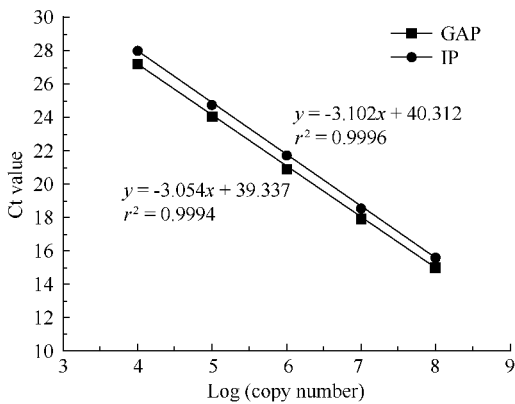


图 4. 目的基因 IP 和内参基因 GAP 的标准曲线

Figure 4. Standard curves for target gene IP and internal reference gene GAP, each standard dilution was amplified by quantitative PCR, using IP and GAP primer pairs in triplicate. For each gene, Ct value was plotted against the logarithm of their initial copy numbers. The standard curve was then generated by linear regression through these points.

上, 以 B4 和 S6 为出发菌进行重复电转, 筛选获得的重组毕赤酵母的目的基因拷贝数比出发菌都有大幅度提高。

表 2. 不同浓度 zeocin 平板上菌株拷贝数汇总

Table 2. Copy number summary of each strain on different concentration zeocin plate

100 µg/mL zeocin		1000 µg/mL zeocin			
Strain	Copy	Strain	Copy	Strain	Copy
B4	3.2	2B1	5.8	2S1	4.4
B6	1.6	2B2	6.1	2S2	4.2
B7	1.4	2B3	5.7	2S3	6.1
S3	2.1	2B4	7.2	2S4	5.3
S5	2.3	2B5	5.5	2S5	6.4
S6	3.6				

2.4 拷贝数对重组毕赤酵母过量表达胰岛素前体的影响

选取重组毕赤酵母 B7 (拷贝数 1.4) 和 2B4 (拷贝数 7.2) 在 5 L 发酵罐上以甘油为碳源进行分批补料发酵, 24 h 甘油耗尽, 继续流加甘油 6 h, 4 h 后溶氧陡然升高再饥饿菌体 2 h 后, 流加甲醇开始诱导培养, 并维持培养液中甲醇浓度为 2 g/L, 共诱导 96 h。结果如图 5 所示, 相关发酵参数计算并总结于表 3。结果表明: (1) 在甘油生长阶段 (0-36 h), 菌株 B7 和 2B4 表现出相同的细胞生长速度和菌体浓度; (2) 进入甲醇诱导阶段后, 菌株 2B4 适应甲醇较慢, 表现细胞生长较慢, 但 24 h 后细胞生长加速, 当诱导 96 h (发酵 132 h) 时, 与菌株 B7 的菌体浓度相当; (3) 菌株 2B4 的 IP 产量是菌株 B7 的 2.7 倍, IP 生产强度较菌株 B7 提高了 171.35%, IP 对甲醇产

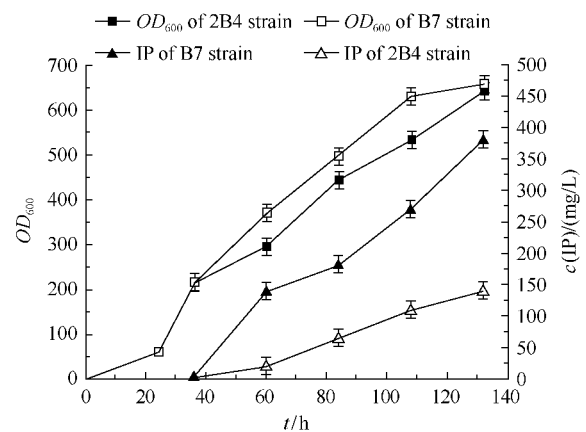


图 5. 高低拷贝重组毕赤酵母的高密度发酵

Figure 5. High cell-density fermentation of low and high copy recombinant yeast. B7 transformant (low copy recombinant yeast). 2B4 transformant (high copy recombinant yeast).

率比菌株 B7 提高了 57.56%，而菌体量对甲醇的得率比菌株 B7 降低了 44.85%。上述结果表明，高拷贝的 2B4 与低拷贝的 B7 相比，甲醇消耗增加的部分是用来合成更多的 IP，非细胞的生长，而从整个

发酵过程看，细胞的生长情况并未受到较大的影响，说明提高重组毕赤酵母目的基因的拷贝数，能有效地改善诱导阶段重组酵母利用甲醇生产目标产物的能力。

表 3. 甲醇诱导阶段重组毕赤酵母细胞生长和 IP 的合成情况

Table 3. Comparison of cell growth and insulin precursor formation of two recombinant strains

Parameters	Strain		Change (%) (B/A-1) × 100
	B7 (A)	2B4 (B)	
Initial DCW (g/L)	42	43.8	4.28
Average methanol concentration (g/L)	2	2	-
Final DCW (g/L)	130.8	128.2	-1.99
Maximum insulin precursor (mg/L)	140	380	171.43
Total consumed methanol (g/L)	203.4	350.7	72.42
Yield of DCW on methanol (g/g)	0.437	0.241	-44.85
Yield of insulin precursor on methanol (mg/g)	0.688	1.084	57.56
Insulin precursor productivity (mg/L/h)	1.061	2.879	171.35
Culture time (h)	132	132	-

## 2.5 目的基因转录水平的横向比较

横向分析时，分别以 B7 菌株甲醇诱导 48、72 和 96 h 的转录水平为对照，对应分析 2B4 菌株诱导 48、72 和 96 h 的相对转录水平，其中 X-33-pPICZ $\alpha$  是电转化了空载体 pPICZ $\alpha$  的重组毕赤酵母，因不含胰岛素前体基因，故相对转录水平为零。通过  $2^{\Delta Ct}$  和  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  两种方法的综合分析，从图 6 可以看出：整个检测阶段（诱导 48→96 h），2B4 的转录水平均为 B7 的 2 倍，与高密度发酵中 2B4 的最高产量是 B7 的 2.7 倍一致，表明增加目的基因拷贝数实现了转录水平的增加，最终增加了目标产物的产量，可以得出结论：目标蛋白的产量提高，主要原因是增加目的基因拷贝数可以提高其转录水平。

## 3 讨论

根据文献报道，增加目的基因拷贝数是有效提高目标蛋白表达量的策略之一<sup>[16-17]</sup>。但为了减轻重组酵母的代谢负担以提高重组酵母的菌体浓度，通常采用较小的表达载体 pPICZ $\alpha$ 。然而，使用这一类较小表达载体在体外构建多拷贝重组毕赤酵母时，难以在电转前进行线性化。为了解决这一减轻代谢负担和多拷贝之间的矛盾，本文以在 100  $\mu$ g/mL zeocin 的 YPDS 抗性平板筛选的、且过量表达 IP 的重组菌株 B4 和 S6 为出发菌株，利用 *SacI* 线性化的表达载体 pPICZ $\alpha$ -IP 对其重复电转化，并

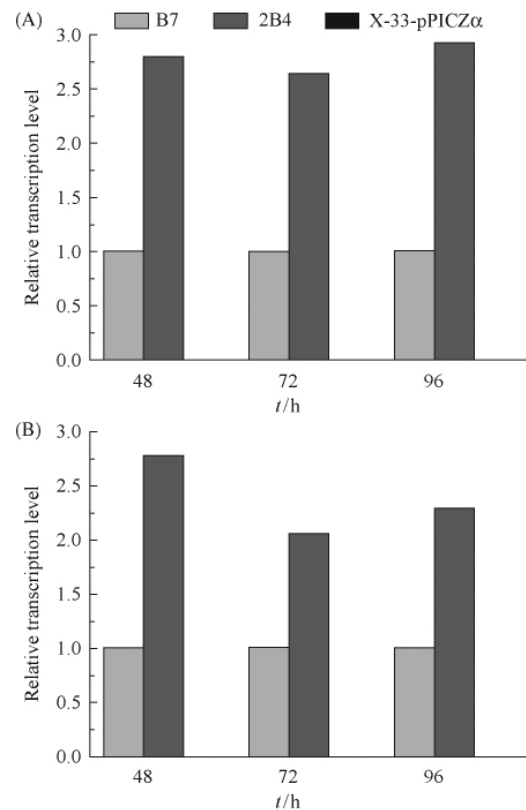


图 6. 高低拷贝重组毕赤酵母的转录水平比较

Figure 6. Transcription level comparison of B7, 2B4 and X-33-pPICZ $\alpha$  strains. A: Transcription analysis by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method; B: Transcription analysis by  $2^{\Delta Ct}$  method.

在 1000  $\mu$ g/mL zeocin 的 YPDS 平板上筛选获得拷贝数为 7.2 的重组毕赤酵母 2B4，该菌株在 5 L 发酵罐

上胰岛素前体产量是拷贝数为 1.4 的菌株 B7 的 2.7 倍,生产强度提高了 171.35%,而且菌株生长良好,实时定量 PCR 检测结果发现,2B4 菌株目的基因的转录水平较 B7 增加了 1 倍。综述结果表明,采用抗性筛选和重复电转相结合的策略能有效地提高目的基因的拷贝数,进而增加目的基因的转录水平,最终提高目标蛋白的产量。在以前的研究中,获得多拷贝重组毕赤酵母的策略是表达载体一次性转化毕赤酵母后采用抗性平板进行筛选<sup>[17]</sup>,但这一操作策略的多拷贝重组毕赤酵母出现的概率仅为 1% - 10%。为获得高拷贝的重组菌株,通常需要挑选尽可能多的菌落后采用摇瓶实验进行验证,导致工作量繁琐、效率低。本文提出的抗性筛选和重复电转相结合的策略与经典筛选法相比,能显著提高获得高拷贝重组毕赤酵母的效率,尤其适合构建 pPICZ 和 pPICZ $\alpha$ 、pPIC6 和 pPIC6 $\alpha$  等小型载体的多拷贝重组毕赤酵母,由于这些载体含 c-myc 抗原表位和 C 末端 polyhistidine 标签,具有重组菌株细胞密度大、重组蛋白检测快速和后续纯化工艺简便等优点。本文提出研究策略将进一步扩大相关载体在表达重组蛋白的应用范围。

## 参考文献

- [1] Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischnewski H, Wildt S, Gerngross TU. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*, 2003, 301 (5637): 1244-1246.
- [2] Pakkanen O, Hämäläinen ER, Kivirikko KI, Myllyharju J. Assembly of stable human type I and III collagen molecules from hydroxylated recombinant chains in the yeast *Pichia pastoris*: Effect of an engineered C-terminal oligomerization domain foldon. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (34): 32478-32483.
- [3] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186 (1): 37-44.
- [4] Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA. Production of mouse epidermal growth factor in yeast high level secretion using *Pichia-pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991, 105 (2): 205-212.
- [5] Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2001, 21 (1): 71-80.
- [6] Tull D, Gottschalk TE, Svendsen I, Kramhøft B, Phillipson BA, Bisgård-Frantzen H, Olsen O, Svensson B. Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic *Bacillus alpha*-amylase produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2001, 21 (1): 13-23.
- [7] Kjeldsen T, Pettersson AF, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 9 (Pt 1): 79-86.
- [8] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74 (2): 381-389.
- [9] Reitinger S, Boroviak T, Laschober GT, Fehrer C, Müllegger J, Lindner H, Lepperdinger G. High-yield recombinant expression of the extremophile enzyme, bee hyaluronidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2008, 57 (2): 226-233.
- [10] Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 142 (2): 105-124.
- [11] Liang W, Zhang C, Yang X. Construction of a multi-copy *Pichia* expression vector and expression of human brain-derived neurotrophic factor in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (1): 34-38. (in Chinese)  
梁伟锋, 张朝春, 杨希才. 一种多拷贝毕赤酵母表达载体的构建及人脑源性神经营养因子的表达. 微生物学报, 2005, 45 (1): 34-38.
- [12] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, 190 (1): 55-62.
- [13] Gurrakonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, Swaminathan S, Khanna N, Tisminetzky S, Rinas U. Application of simple fed-batch technique to

- high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 31.
- [14] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 2006, 1 (1): 16-22.
- [15] Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123 (3): 273-280.
- [16] Zhu T, Guo M, Tang Z, Zhang M, Zhuang Y, Chu J, Zhang S. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107 (3): 954-963.
- [17] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio-Technology (New York)*, 1994, 12 (2): 181-184.

## Enhancement of human insulin precursor production by increasing the copy number in *Pichia pastoris*

Xiangyi Gong<sup>2,3</sup>, Chongyang Ding<sup>2,3</sup>, Liming Liu<sup>2,3</sup>, Jing Wu<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Wuxi Medical School; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology; <sup>3</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to further increase the yield of insulin precursor by *Pichia pastoris*. [Methods] For this, we transformed the expression vector pPICZ $\alpha$ -IP into *P. pastoris* X-33 using electroporation and screened two mutant strains B4 and S6 on the YPD plate containing 100  $\mu$ g/mL zeocin. Both could overexpress human insulin precursor. Taking B4 and S6 as start strains, we repeatedly transformed *SacI* linearizing pPICZ $\alpha$ -IP into *P. pastoris* X-33 by electroporation, then screened a new mutant strain 2B4 (with 7 copies) on the 1000  $\mu$ g/mL zeocin YPD plate. [Results] After cultivation, the human insulin precursor yield of 2B4 strain was 2.7 fold higher than that of B7. Meanwhile, the cell growth was not inhibited. The target gene transcription level of 2B4 was 2 fold higher than that of B7 by real-time quantification PCR. [Conclusion] The strategy of combining resistance screening and repeated electroporation was efficient to increase the copy number of target gene, so as to facilitate higher transcription level and enhance objective recombinant protein yield.

**Keywords:** Multi-copy recombinant *Pichia pastoris*, insulin precursor, repeatedly electroporation, pPICZ $\alpha$  vector

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Program for Young Talents in China by the Provincial Outstanding Youth Foundation of Jiangsu Province (BK2012002), by the Program for Innovative Research Team in University (IRT1249) and by the National Natural Science Foundation of China (31101229)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 3 January 2013/Revised: 7 March 2013