

毕赤酵母基因操作技术的改进及其在水蛭素表达中的应用

蔡传奇 方荣祥*

(中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室 北京 100080)

摘 要 毕赤酵母是日益受到重视的基因工程受体菌,但是目前尚没有一种简便、高效的转化方法,也没有一种稳定、可靠的菌落 PCR 方法。本文通过在通常筛选重组子的 MD 培养基中增添 1mol/L 山梨糖醇使毕赤酵母电穿孔转化效率提高 10 倍以上。并比较系统地分析了其他影响电穿孔转化效率的因素,如毕赤酵母生长状况即 OD_{600} ,不同的整合位点(*Bgl* II、*Sac* I、*Sal* I、*Stu* I),及不同的毕赤酵母受体菌(GS115 和 KM71)等。本文描述的转化方法所能达到的转化效率比目前大多数文献报道的效率要高,可使每微克质粒 DNA 产生的整合到受体菌染色体上的转化子达 2800 个;另外,我们经过一种冷热处理毕赤酵母菌落的方法使其细胞壁裂解,并改变通常 PCR 缓冲液的组成成分后,毕赤酵母菌落 PCR 方法几乎和大肠杆菌的操作一样简便可靠。借助本文所描述的电穿孔转化方法和菌落 PCR 方法,成功实现了水蛭素在毕赤酵母中的分泌表达,表达量为每毫升培养上清 20 μ g,其生物活性达每毫升培养上清 82 个国际单位。

关键词 毕赤酵母 *Pichia pastoris*, 电穿孔转化, 菌落 PCR, 水蛭素

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0155-06

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是一种甲醇酵母,它为一类简单的真核生物。同动植物系统相比,它具有操作简单的优点;另外,和原核生物大肠杆菌等不一样,毕赤酵母能对要表达的多肽和蛋白质进行翻译后加工处理,如毕赤酵母对外源蛋白的糖基化等更接近于哺乳动物细胞,而目前较为广泛使用的酿酒酵母则往往出现过度糖基化,这些是毕赤酵母日益受到重视的主要原因。另外,这种甲醇酵母能够实现高密度发酵,而且其转化子能够非常稳定地表达外源蛋白质,因此更适应工业化生产^[1]。但是有关毕赤酵母的基因操作技术相对比较落后。本文为毕赤酵母在生物工程上的应用提供了一种高效的转化方法和一种稳定的菌落 PCR 方法。同时利用这两种实验方法成功地实现了水蛭素基因在毕赤酵母中的分泌表达,分泌水蛭素的生物活性达每毫升培养上清 82 个抗凝血酶单位。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

毕赤酵母 GS115(*His*4⁻ *Mut*⁺)和 KM71(*arg*4 *his*4 *aox*1::ARG4)为 Invitrogen 公司产品,含水蛭

素基因(Hr)的质粒 pSK-Hr 由本实验室构建,pPIC9 为 Invitrogen 公司产品,pPIC3K 由英国 Michael A. Romanos 提供。

1.2 重组质粒的构建

为了用 PCR 方法把水蛭素结构基因克隆到毕赤酵母的表达载体上,我们设计上下游引物分别如下:

Hr1 5' AAA CTCGAG AAAAGA GTT GTC-TATACTGATTGTACCGAATCTGG3'

Hr2 :5' A GAAATTC TCATTA TTG TAAG-TATTCCCTCCGGG3'

其中框起来的顺序分别为 *Xho* I 和 *Eco*R I 限制酶位点,阴影顺序分别为水蛭素的第一个氨基酸 Val 的密码子和最后一个氨基酸 Gln 的反密码子,箭头表示酵母 α -因子信号肽的切割位点。PCR 反应模板为 pSK-Hr 质粒,耐热聚合酶为 Vent[®] DNA Polymerase(NEB, USA),反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 变性 1min,60 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 16s,30 个循环。

将上述 PCR 方法扩增到的水蛭素基因经 *Xho* I 和 *Eco*R I 内切酶消化后与同样内切酶处理的 pPIC9 连接形成 pPIC9-Hr。为了筛选到多拷贝

的克隆,再把 pPIC9-Hr 经 *Sac* I 和 *Sal* I 处理,回收的长 3.2kb 片段和经相同内切酶处理质粒 pPIC3.5K 并回收的长 6.3kb 含卡那霉素基因的片段连接形成重组质粒 pPIC9K-Hr(图 1)。同时我们分别用 P1 和 P2 引物(见 1.3)对 pPIC9K-Hr 进行正向和反向测序分析。

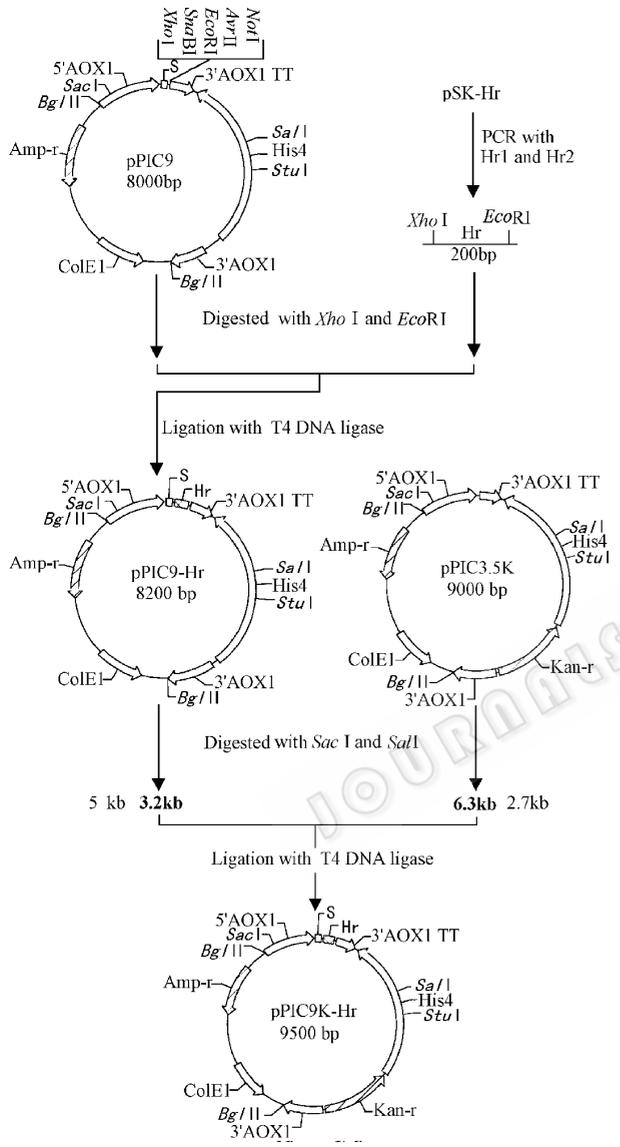


图 1 重组质粒 pPIC9K-Hr 的构建
Fig. 1 Construction of pPIC9K-Hr

1.3 电穿孔转化及菌落 PCR 方法筛选重组子

重组质粒 pPIC9K-Hr 的转化和筛选方法均按本文所建立的方法进行(见结果部分),其中的菌落 PCR 筛选方法所用的引物除了 Hr1 和 Hr2 以外,还合成了 P1 和 P2 这对引物,即 P1 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC3' P2 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC3' 这两对引物在质粒或染色体上的位置及所产生的

PCR 产物的大小见图 2。甲醇利用(Methanol Utilization, Mut)表型按 *Pichia* Expression Kit(Invitrogen, USA)所述方法进行,并用本文所建立的菌落 PCR 方法作进一步证实。

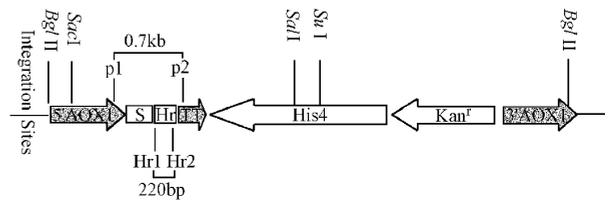


图 2 重组质粒 pPIC9K-Hr 部分结构

Fig. 2 A partial map of construct pPIC9K-Hr
S, *S. cerevisiae* α -factor secretion signal
Hr, Hirudin gene, fused in frame with S
TT, transcription termination fragment of AXO1

本文所建立的毕赤酵母菌落 PCR 方法用 Dot blot 杂交方法验证,见文献 1。从 PCR 方法扩增到的水蛭素基因作模板,按 T7 Quick Prime Kit (Pharmacia Biotech)操作制作探针。多拷贝克隆的筛选按文献 2 所述的方法操作。

1.4 水蛭素基因的诱导表达

经过对毕赤酵母电穿孔转化,菌落 PCR 方法筛选,及外源基因多拷贝克隆的筛选,我们共获得 7 个克隆。随机挑选其中的重组克隆 C4(*His*⁺ *Mut*^s)作诱导表达,具体操作按 *Pichia* Expression Kit(Invitrogen, USA)进行。Tricine-SDS PAGE 见文献 3。

水蛭素生物活性测定按文献 4, 5 进行,其中 Thrombin 和 Chromozym® TH 均为 Roche 公司产品。

2 结果

2.1 毕赤酵母高效电穿孔转化方法

感受态细胞的制作方法如下:用 GS115 或 KM71 单菌落接种 5mL YPD(Yeast Extract 1%, Peptone 2%, Dextrose 2%)液体培养基,28℃~30℃过夜培养,取 1mL 转接到 200mL YPD 培养基中继续培养,当其 *OD*₆₀₀ 在 1.1~1.3 之间时,停止培养,离心(5000r/min)收集菌体,然后分别用去离子水和 1mol/L 山梨糖醇(D-Sorbitol, Sigma)各洗涤 2 次,最后加入 1mL 预冷的 1mol/L 山梨糖醇,按每管 100 μ L 分装成备用的毕赤酵母感受态细胞,保存于 -70℃。

电穿孔操作方法如下:把 pPIC9K-Hr 分别用 *Bgl* II、*Sac* I、*Sal* I 或 *Stu* I 作线性化处理,取线性 DNA 0.3 μ g 与 100 μ L 感受态细胞混合后,注入预冷的 0.2cm 电击杯(ElectroCup)中,轻敲电击杯,使

混合物落入电击杯底部,在电击仪(BioRad)上设定电压为 1.5kV,电容为 25 μ F,电阻为 400 Ω ,进行电穿孔操作。

电穿孔后,立即加入 0.9mL 预冷的 1mol/L 山梨糖醇于电击杯中,混匀后从中吸出 200 μ L,立即涂布 MDS 转化培养基 [1.34% YNB (4×10^{-5})% Biotin, 1% Dextrose, 1mol/L D-Sorbitol],然后倒置平板于 28 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C,培养 2d 后转化子开始出现,约 1 周后计数并计算转化效率。

毕赤酵母电穿孔转化方法首先要求严格控制菌体的生长情况。我们发现 OD_{600} 值过低或过高都明显影响转化效率, OD_{600} 值 1.1~1.3 时转化效率最好。我们还发现在通常的 MD 转化培养基 [1.34% YNB (4×10^{-5})% Biotin, 1% Dextrose] 中加 1mol/L 山梨糖醇后转化效率可提高 10 倍以上(见表 1)。

表 1 影响毕赤酵母电穿孔转化效率的因素

Table 1 Factors on transformation frequency of *Pichia pastoris* by electroporation

Part A Media composition and the plate-spreading manner

| Media composition and the manner of spreading on a media plate | Frequency |
|--|---------------|
| Immediately spreading on an MD plate lacking D-sorbitol | 140 \pm 4.4 |
| Immediately spreading on an MD plate containing D-sorbitol (MDS) | 1600 \pm 52 |
| 5-minute delay in spreading on an MD plate lacking D-sorbitol | 72 \pm 2.9 |
| 5-minute delay in spreading on an MD plate containing D-sorbitol (MDS) | 830 \pm 9.1 |

Part B Storage time

| Storage time | Frequency |
|--------------|-----------------|
| 0 | 1615 \pm 28.7 |
| One week | 1700 \pm 42.6 |
| Two weeks | 1605 \pm 26.7 |
| Three weeks | 1600 \pm 24.5 |
| Four months | 250 \pm 9.1 |

Part C Integration site/host strain

| Integration site | Host strain | |
|------------------|-----------------|-----------------|
| | GS115 | KM71 |
| <i>Bgl</i> II | 696 \pm 13.1 | 1500 \pm 18.3 |
| <i>Sac</i> I | 1600 \pm 42.6 | 2800 \pm 37 |
| <i>Sal</i> I | 1400 \pm 37.6 | 2697 \pm 23 |
| <i>Stu</i> I | 1202 \pm 17.1 | 2802 \pm 45 |

Frequency = transformants/ μ g DNA

Part A was completed with strain GS115 transformed by *Sac* I -digested pPIC9K-Hr

Part B was completed with strain GS115 transformed by *Sal* I -digested pPIC9K-Hr

分钟后涂布相比,有大约 2 倍的差异(见表 1)。根据我们的经验 1 次制作的感受态细胞至少可以保存 3 周而不明显改变其转化效率(见表 1)。

Invitrogen 公司为毕赤酵母表达系统而设计的载体都不含酵母复制子,本文所涉及的转化效率均指外源基因整合到染色体上的转化效率。质粒与染色体的整合方式包括插入或置换(见图 2)。质粒在与酵母染色体整合前一般要经过线性化处理,*Bgl* II 酶切后一般导致外源基因置换染色体的 *AXO1* 基因(醇氧化酶基因),而 *Sac* I, *Sal* I 或 *Stu* I 酶切后则容易以插入的方式分别把外源基因插入到染色体的 *AOX1* 和 *His* 基因位点内。本文总结了不同整合位点对转化效率的影响,我们认为通过 *Sac* I 和 *Sal* I 位点以插入方式整合到染色体上比通过 *Bgl* II 位点以置换方式整合到染色体上明显更容易发生得多(见表 1)。毕赤酵母表达系统两种常见的受体菌株 GS115 和 KM71,其转化效率有明显差异,如在 *Stu* I 和 *Bgl* II 酶切的情况下, KM71 菌株比 GS115 可以高 2 倍以上(见表 1)。

2.2 毕赤酵母菌落 PCR 方法

从 MDS 转化培养基平板上任意挑出单菌落 50 个,每个菌落用牙签挑取其大小的 1/4 到 1/2 后置入 0.5mL 离心管中,离心管中或含有 20 μ L 的蜗牛酶(百泰生化,北京)溶液(1mg/mL),或 25 单位的 *Lyticase*(Sigma)或 20 μ L 的无菌水,然后放在冰上冷处理 15min,接着转入 37 $^{\circ}$ C 15min,最后用 95 $^{\circ}$ C 热处理 10min。经过这种酶或冷热处理后的样品再按以下 PCR 方法进行操作:在总体积为 50 μ L PCR 反应中含有 30mmol/L Tricine(pH8.3), 3mmol/L MgCl₂, 3mmol/L β -mercaptoethanol, 0.01% Gelatin, 200 μ mol/L 4 种 dNTP, 1 μ mol/L 2 种引物 Hr1 和 Hr2, 2 个单位 Taq 聚合酶。PCR 反应参数如下:第一步 94 $^{\circ}$ C 变性 4min, 第二步 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 30s, 重复 30 个循环, 第三步 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应完毕后取 10 μ L 上样电泳,紫外检测结果为 50 个单菌落中有 24 个产生大小约 220bp 的条带(结果未显示)。这 24 个阳性克隆和 1 个阴性克隆用 Dot blot 杂交方法证实完全符合(见图 3),说明我们报道的毕赤酵母菌落 PCR 方法完全可靠。

我们用受体菌 GS115(*His*4⁻ *Mut*⁺)以及重组克隆 C4(*His*4⁻ *Mut*^s)和 D5(*His*4⁻ *Mut*⁺)对不同的 PCR 方法进行了比较。由于遗传结构的不同,用 P1 和 P2 引物对 GS115, C4 和 D5 作 PCR 分析时所

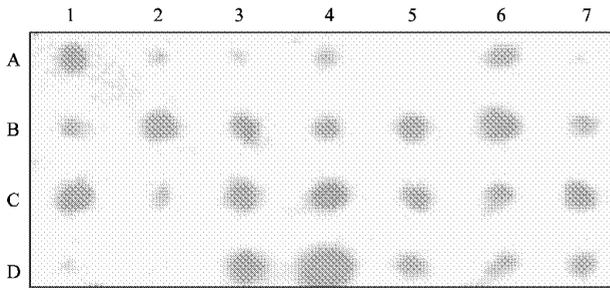


图 3 毕赤酵母菌落 PCR 方法的 Dot blot 杂交验证
 Fig.3 Verification of PCR results by Dot blot hybridization
 A3 and A4. pPIC9K-Hr DNA ; A5. GS115 colony ;
 D2. A PCR-negative clone ; All others are PCR-positive clones

产生的产物也就不同(用 P1 和 P2 引物作 PCR 分析与上述用 Hr1 和 Hr2 引物作 PCR 分析时的反应条件略有不同,即改为 50℃ 退火 1min,72℃ 延伸反应 2min,其他条件一样)。因为没有外源基因的整合,GS115 的 AOX1 基因保持完整,PCR 时 GS115 菌落应该产生 2.2kb 大小的片段,该片段大小对应于原 AOX1 基因 P1 和 P2 之间的长度;但在重组克隆 C4 的染色体上,P1 和 P2 之间的 AOX1 基因顺序已被重组质粒 pPIC9K-Hr 中相应的顺序所置换,C4 的 PCR 产物为 0.7kb;由于 D5 是通过插入方式而形成的克隆,即 AOX1 基因保持完整同时重组质粒 pPIC9K-Hr 中相应的顺序整合到染色体上,所以 D5 的 PCR 产物应该为 2.2kb 和 0.7kb(见图 2)。但是我们在实验过程中发现不同的 PCR 方法,其结果不完全一样。本文所报道的 PCR 方法是通过冷热处理菌落,使细胞壁裂解,并更改通常 PCR 缓冲液成

分⁶(10mmol/L Tris·HCl pH8.3,50mmol/L KCl,1.5mmol/L MgCl,0.01% Gelatin)而得以实现的。而且这种冷热处理足以裂解细胞壁,可以不加蜗牛酶或其他酵母细胞壁裂解酶,如 Lyticase(Sigma), Zymolyas(Invitrogen) (见图 4B)。另外这种方法并不要求新鲜的菌落,于 4℃ 冰箱放置 2 个月的平板菌落同样能用该方法进行 PCR 分析(见图 4)。我们在实验过程中还发现通常 PCR 缓冲液有时会抑制长链 DNA 的扩增,而我们所建立的毕赤酵母菌 PCR 方法能解决这一问题(见图 4B)。

2.3 水蛭素基因在毕赤酵母中有分泌表达

在质粒 pSK-Hr 上,编码酵母 α -因子信号肽切割位点的顺序与水蛭素基因之间多了 12 个碱基即 4 个氨基酸。如果我们不删除,当信号肽被切割后,这 4 个氨基酸将位于水蛭素的 N 端。这种水蛭素不仅不符合临床要求,而且其生物活性将受到影响,所以我们用 PCR 方法把这段顺序删除。用 P1 引物测序重组质粒 pPIC9K-Hr,测序结果表明水蛭素基因已正确插入,并且 5'-端多余的 12 个碱基已被成功删除(见图 5)。该测序结果还用 P2 引物反向测序进一步得到证实(结果未显示)。另外,尽管这 4 个氨基酸原被认为是构成切割位点下游的必须顺序即 EKRV(EAEA),但已有报道认为对切割位点下游顺序的要求不是那么严格,如芳香簇氨基酸或分子量较小的氨基酸等都可以位于 X 位置即 EKRVX,而不影响其正确切割^{7,8}。本文中水蛭素分泌到培养液中也进一步证明了这一观点。

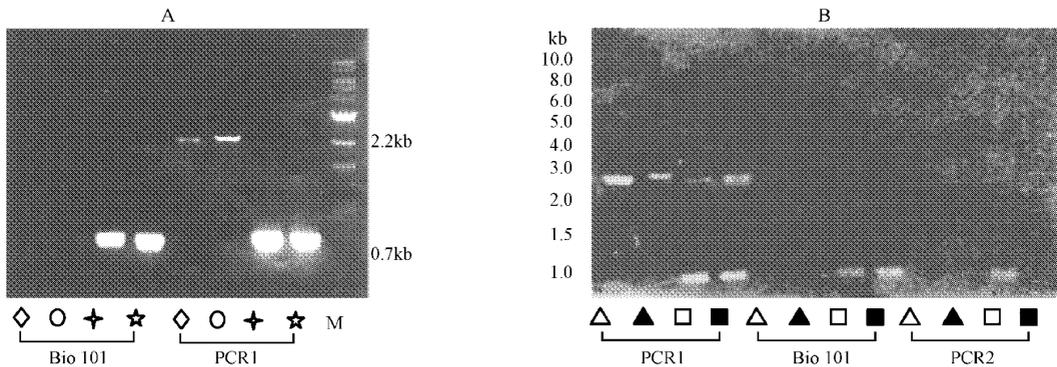


图 4 不同 PCR 方法结果的比较

Fig.4 Results of different PCR methods

M. 1 kb DNA Ladde(NEB ,USA); Bio 101. Whole Yeast Cell PCR Ki(Bio 101 ,USA);
 PCR1. The PCR method reported by this article. PCR2 , PCR with the common PCR Buffer.
 In A : ◇ two-month old GS115 colony ; ○ fresh GS115 colony ; ◆ two-month old C4 colony ; ☆ fresh C4 colony ;
 In B : △ GS115 without Lyticase treatment ; ▲ GS115 treated with Lyticase ;
 □ D5 without Lyticase treatment ; ■ D5 treated with Lyticase



图5 重组质粒 pPIC9K-Hr 接头处顺序

Fig. 5 The junction sequence between signal cleavage site and 5'-end of hirudin gene in pPIC9K-Hr. The upper part depicts the hirudin gene in pSK-Hr. Arrow denotes the signal sequence cleavage site of *S. cerevisiae* α -factor. The first amino acid of hirudin, Val is shadowed and the 12 bases to be deleted are boxed. Below is the sequencing result of pPIC9K-Hr

重组质粒 pPIC9K-Hr (见图 1 及图 2) 按本文上述所建立的方法进行电穿孔转化和菌落 PCR 筛选后,并用 G418 进行多拷贝克隆筛选,在 G418 浓度为 2.0mg/mL 平板上共挑选到 7 个克隆(水蛭素基因在染色体上的具体拷贝数在确定中)随机选择其中的 C4 克隆进行甲醇利用表型分析。经 MM 和 MD 培养基生长比较,并用我们所建立的菌落 PCR 方法作进一步证实(见图 4),C4 克隆的甲醇利用表型为 Mut^s 。C4 ($His^+ Mut^s$) 经 5d 的诱导,培养物离心后用上清进行 SDS-PAGE,并检测上清中水蛭素的生物活性。C4 克隆的分泌表达量约为每毫升培养上清 20 μ g,活性为每毫升培养上清 82 个抗凝血酶单位。电泳和生物活性结果均表明水蛭素已被毕赤酵母分泌到培养液中(见图 6)。

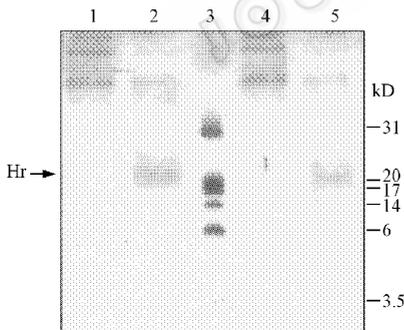


图6 分泌的水蛭素 Tricine-SDS PAGE 电泳

Fig. 6 Tricine-SDS PAGE of secreted hirudin

Lane 1 and 4 are supernatant from GS115, lane 2 and 5 are that from clone C4 ($His^+ Mut^s$), and lane 3 is the protein markers (Promega, USA). After 5-day induction, the culture was centrifuged and 50 μ L supernatant of each sample was concentrated by 5 times and then mixed with 2X loading buffer. Protein bands were visualized by Coomassie blue R-250 staining

3 讨论

一种简便、快速、有效的把外源基因引入毕赤酵母细胞内的方法是有关其生物工程研究与开发的第

一步。对于毕赤酵母的转化目前有 4 种方法:1. 锂盐法,2. PEG 法,3. 原生质球法,4. 电穿孔法。锂盐法和 PEG 法的效率很低,一般每微克 DNA 只有几十个转化子或更低;原生质球法的缺点是特别费时和繁琐;本文报道的电穿孔法不仅简便、快速,而且这种方法产生了比较高的转化效率,如通过 *Sac* I 和 *Stu* I 位点整合到受体菌 KM71 染色体上的转化效率达到 2800 转化子/ μ g DNA。目前国内外许多实验室都在使用毕赤酵母,文献报道的转化效率均较低,一般每微克 DNA 不超过几百个转化子,在英国 Michael Romanos 实验室转化效率达到每微克 DNA 400 个转化子^[2],这是我们能从文献报道了解的较高效率。按本文方法制作的毕赤酵母感受态细胞可以 -70 $^{\circ}$ C 保存 3 周而不影响转化效率。对电压、电阻及电容等参数优化后还可能进一步提高转化效率。

许多学者认为对于酵母转化子很难像分析大肠杆菌那样直接进行 PCR 分析^[9],因此多年来在酵母生物工程领域,也一直是先提取质粒或染色体 DNA,然后用所抽提的 DNA 作 PCR 反应来分析哪些转化子是我们所需要的克隆。显然这种方法不仅费时、繁琐,而且在很大程度上也限制了转化子筛选的范围。自 90 年代开始,国外有些实验室开始探索酵母菌落 PCR 方法,而且也有这方面的试剂盒(见图 4)。但这些方法的共同缺点就是结果不稳定。有的要求根据菌落情况调整酵母细胞壁裂解酶(如 Lyticase 或 Zymolyase)的用量或作用时间^[9];有的要求用新鲜菌落(Whole yeast cell PCR Kit, Bio101)。我们还发现有的方法会抑制长链 PCR 结果的出现(见图 4);有的方法实验设计不够合理,如要在加完石蜡油后再给每个 0.5mL 离心管中加入 Taq 聚合酶^[10],等等。另外,虽然通常的 PCR 缓冲液也抑制长链片段的扩增,但是我们发现通常的

PCR 缓冲液不适合毕赤酵母菌落 PCR, 这除了 Tris 缓冲液随温度增高其 pH 值降低而影响扩增反应外, 可能还有其他原因, 值得进一步探索。

我们借助电穿孔转化方法成功地把水蛭素基因通过毕赤酵母的表达载体多拷贝地整合到毕赤酵母的染色体上, 并实现了水蛭素基因在毕赤酵母中的分泌表达, 但分泌的水蛭素在 Tricine-SDS PAGE 电泳所表现的带型和分子量大小与预料中的情况不一致, 却和另一种甲醇酵母 *Hansenula polymorpha* 的表达情况比较相似^[11]。我们所分析一个重组克隆 C4 的分泌表达量约为每毫升培养上清 20 μ g, 表达量的绝对值不高, 这可能与我们的挑选的克隆数量不多有关。但水蛭素在培养上清中占有 15% 以上的比例, 且其生物活性达每毫升培养上清 82 个国际单位。这为进一步开发利用基因工程水蛭素奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment c in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene, *Bio/technology*, 1991 **9** :455~460
- [2] Scorer C A, Clare J J, Mc Combie W R *et al.* Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression, *Bio/technology*, 1994 **12** :181~184
- [3] Schagger H, Jagow G V. Tricine-SDS dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD, *Analytical Biochemistry*, 1987 **166** :368~379
- [4] Stone S R, Maraganore J M. Hirudin and Hirudin-based peptides, *Meth Enzymol*, 1993 **223** :312~336
- [5] Parmenter D L, Boothe J G, Van Rooijen *et al.* Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning, *Plant Mol Biol*, 1995 **29** :1167~1180
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Edition(分子克隆实验指南), Beijing: Sciences press, 1992 p. 681
- [7] Brake A J, Merryweather J P, Coit D J *et al.* α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984 **81** :4642~4646
- [8] Rosenfeld S T, Nadeau D, Tirado J *et al.* Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification*, 1996 **8** :476~482
- [9] Ward A C. Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR, *Bio Techniques*, 1992 **13** (3) :350
- [10] Linder S, Schliwa M, Kube-Grandenath E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones, *Bio Techniques*, 1996 **20** (6) :980~982
- [11] Weydemann U, Keup P, Piontek M *et al.* High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995 **44** :377~385

Technical Improvements in Genetic Manipulation of *Pichia pastoris* and Their Application in Hirudin Expression

CAI Chuan-Qi FANG Rong-Xiang*

(Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract *Pichia pastoris* has become an increasingly popular host for heterologous protein production. However, there is neither a high-efficient transformation method nor a fast colony-PCR assay for the yeast yet. In this paper, we report a transformation procedure by electroporation, which reaches the value of up to 2800 transformants/ μ g DNA. By using a cold and heat treatment and a modified PCR buffer, we established a simple and reliable colony-PCR protocol to detect recombinant *P. pastoris* clones, which is comparable to the conventional assay for *E. coli* colonies. With these two novel techniques, we have successfully achieved the expression of hirudin, an antithrombin agent, in *Pichia pastoris*. The secreted hirudin maintains a biological activity of 82 antithrombin units per milliliter supernatant from the media.

Key words *Pichia pastoris*, transformation by electroporation, colony-PCR, hirudin

Received: July 19, 2000

* Corresponding author. Tel: 86-10-62548243; Fax: 86-10-62560912; E-mail: fangrx@sun.im.ac.cn