

毕赤酵母表达系统研究进展

齐连权 陈 薇 来大志 于长明 王海涛

(军事医学科学院微生物学流行病学研究所 北京 100071)

摘要 毕赤酵母表达系统是目前最为成功的外源蛋白表达系统之一。该表达系统不存在原核表达系统的内毒素难以除去的问题,也不存在哺乳动物细胞表达系统的病毒和支原体污染等问题;并能够对目的蛋白进行类似高等真核生物的信号肽剪切、二硫键形成、糖基化等过程的翻译后蛋白加工。至今已有多种外源蛋白在该表达系统中成功表达。下面对毕赤酵母表达系统的特点及研究进展作一简要综述。

关键词 毕赤酵母 表达系统

毕赤酵母表达系统已成为极为成功的外源蛋白表达系统之一。该系统有许多优点:(1)利用受甲醇诱导的醇氧化酶(alcohol oxidase I, AOX1)启动子,可严格控制外源基因的表达;(2)毕赤酵母生长快速培养条件简单,适合高密度培养,发酵后每升培养液中细胞湿重可达 450 克,有利于提高目的蛋白产量;(3)毕赤酵母作为一种真核细胞生物,可以进行翻译后的蛋白加工,以使外源蛋白得到正确的折叠和修饰;(4)该系统已有 20 多年的研究开发历史,有多种受体菌和表达载体可供选择,可以进行胞内表达或分泌表达。至今已有 300 多种外源蛋白在该表达系统中成功表达^[1],已报道的最高表达量分别为 22 g/L(胞内)^[2]和 14.8 g/L(分泌)^[3]。

1 受体菌

巴斯德毕赤酵母是一种甲醇利用型酵母菌。在醇氧化酶的作用下,毕赤酵母可以将甲醇氧化成甲醛和过氧化氢。AOX 氧化酶是同源八聚体结构,同氧的结合力很低,因此毕赤酵母在代谢甲醇的过程中需合成大量 AOX 氧化酶。在毕赤酵母中有两个基因编码 AOX 氧化酶,即 AOX1 和 AOX2,但 AOX1 的甲醇代谢能力远高于 AOX2。AOX1 基因的表达受甲醇的严密调控。当以葡萄糖、甘油等作为碳源时,在毕赤酵母中检测不到 AOX1 基因的表达;当以甲醇作为唯一碳源时, AOX1 基因大量表达, AOX 氧化酶可占细胞总蛋

白的 30% 以上。大多数受体菌都带有合成氨基酸缺陷的遗传标记(如组氨酸脱氢酶基因突变, *HIS4⁻*)以便于阳性克隆的筛选。这些受体菌只能在完全培养基或添加了相应成分(如组氨酸)的基础培养基中生长,在携带有相应的野生型基因的重组质粒转化该菌后,重组菌株即可由于在基础培养基中生长而被筛选出来。根据受体菌中 AOX 基因的不同情况,有三种受体菌可供选择:GS115 的 AOX1 基因和 AOX2 基因均为野生型,其甲醇利用效率最高(*Mut⁺*);KM71 是 AOX1 基因缺陷的菌株,因此其甲醇利用缓慢(*Mut^s*);MC100-3 的两个 AOX 基因均发生突变,不能利用甲醇作为碳源^[4]。GS115 和 KM71 被广泛用于多种外源蛋白的表达^[5],有报道表明 KM71 表达外源蛋白更为出色^[6],同时,由于 KM71 为 *Mut^s*,其甲醇的消耗量远低于 GS115。

2 表达载体

多数的毕赤酵母表达载体是通过同源重组整合到酵母染色体来实现稳定表达的。整合位点一般是在 AOX1 基因或 *HIS4* 基因处,因此,载体上带有 *HIS4* 基因和 AOX1 基因的部分序列;载体上还包括多克隆位点及在大肠杆菌中复制所必需的元件,如复制起始位点,氨苄抗性基因等;用于分泌表达的载体上还包括有信号肽序列,其中最常用的是酿酒酵母的交配因子(MF)信号肽;某些载体上带有一些抗性基因用于快速

筛选或高拷贝转化子的筛选,如 ZEOCIN 和 NEOMYCIN 基因,其中 NEOMYCIN 基因赋予大肠杆菌卡那霉素抗性而赋予酵母 C418 抗性,可用于高拷贝转化子的筛选。Invitrogen 公司^[7]开发出了若干系列的表达载体可供选择。

3 外源蛋白的表达

重组载体转化受体菌后,即整合到酵母染色体上,即使没有选择压力,这种整合也非常稳定。研究表明,线性化的重组载体有更高的转化效率。毕赤酵母非常适合表达对细胞有毒害作用的蛋白,外源蛋白的表达受甲醇诱导表达,可以在短时间内表达大量蛋白,同时还可以通过定位信号将外源蛋白定位在过氧化物酶体中表达或分泌至胞外。由于酵母本身仅分泌少量蛋白至培养基中,而且在酵母培养中也无须外加蛋白,因此外源蛋白占培养基中总蛋白的绝大部分,这为进一步纯化外源蛋白提供了极大的方便,同时也省却了对酵母菌进行破壁等繁琐的步骤。在发酵结束后,必须首先分离发酵上清和菌体以进行下一步纯化,但是利用传统的离心或过滤方法去除发酵后大量的菌体效率很低。利用安玛西亚公司的扩张床吸附技术,Trinh L^[8]等直接从发酵液中成功地分离纯化出了内皮抑素,并且缩短了纯化时间,提高了产物的比活性。外源蛋白的表达需要大量的氧气供应和稳定的温度及 pH 值,以甲醇为碳源的毕赤酵母在生长过程中会产生大量的热和酸,发酵罐可以为酵母提供比较稳定的生长条件和外源蛋白的诱导表达条件,因此在发酵罐中表达外源蛋白可以获得比摇瓶中高 5 到 10 倍的表达量。

4 外源蛋白的加工折叠

作为真核生物,毕赤酵母可以进行类似哺乳动物细胞的蛋白翻译后修饰,如信号肽加工,蛋白折叠,二硫键形成和糖基化修饰,磷酸化修饰等^[9~11]。因此大部分利用毕赤酵母表达的重组蛋白具有同天然蛋白相似的生物学功能^[12~15]。在分泌表达外源蛋白的过程中,信号肽的加工对外源蛋白的 N 端均一化至关重要。酿酒酵母的交配因子 (MF) 是应用最为广泛的信号肽,但是应用外源蛋白自身的信号肽,一些蛋白也得到

了很好的表达,并且得到了均一的 N 端氨基酸顺序^[16]。但毕赤酵母的糖基化同哺乳动物的糖基化仍存在着一些差异,这也是限制该类蛋白作为治疗性药物的一个因素。在哺乳动物中,O-糖基链成分非常复杂,包括 N-乙酰半乳糖胺,半乳糖和唾液酸等,而在毕赤酵母中,则全部由甘露糖组成;而且,O-糖基化位点在二者中也不完全一致。二者在 N-糖基化方式上较为接近,N-糖基化位点为 Asn-X-Ser/Thr 的 Asn 处,X 代表任何氨基酸,二者糖基化的核心均为 Man₈GlcNAc₂,但是,哺乳动物细胞和毕赤酵母从糖核上延伸出的侧链则不尽相同^[17]。通过 X 射线和质谱分析毕赤酵母表达的和从人血清中分离得到的转铁蛋白发现,蛋白的折叠基本一致,但毕赤酵母表达的转铁蛋白的第三十二位丝氨酸发生了 O-糖基化,这一糖基化并不存在于从人血清中分离得到的转铁蛋白中^[18]。Callewaert N^[19]等将甘露糖苷酶和外源蛋白共表达,得到了更类似于哺乳动物的糖基化方式。Boado RJ^[20]等在表达抗鼠转铁蛋白受体的单链抗体的过程中发现,一部分单链抗体发生了过糖基化,导致其结合力下降,通过改变培养基的成分和 pH 值消除了这种情况。

5 外源蛋白的降解

在毕赤酵母的胞内和胞外,均有一定量的蛋白酶的表达,因此,不论是胞内表达亦或是分泌表达,外源蛋白均面临着被降解的问题,这也是影响表达量的一个重要因素,同时,还增加了纯化目的蛋白的难度。目前已有一些办法解决这一问题。一是在培养基中添加蛋白脲或酪蛋白水解物等物质作为蛋白酶的底物;二是改变培养基的 pH 值,以降低蛋白酶的活性;三是使用蛋白酶缺陷株来表达外源蛋白,如 SMD1163, SMD1165 和 SMD1168 等;四是点突变外源蛋白基因的个别位点,改变其蛋白序列中蛋白酶的作用部位使其免受蛋白酶的破坏^[21]。

6 展望

经过多年的研究开发,毕赤酵母表达系统已相当成熟,并已成功用于多种外源蛋白的表达,我们实验室也已利用该表达系统成功地表达了人血小板源生长因子 (PDGF-BB) 和人干扰素

(IFN) 等细胞因子,并且通过对表达载体的改构使目的蛋白获得了正确的氨基端序列。毕赤酵母表达系统不存在原核表达系统的内毒素难以除去的问题,也不存在哺乳动物表达系统的病毒和支原体污染等问题。基于毕赤酵母表达系统以上的优点,相信毕赤酵母表达系统会成为表达外源蛋白的有力工具。

参考文献

- [1] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, 16(1): 23 ~ 52
- [2] Werten M W, van den Bosch T J, Wind R D, et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1999, 15: 1087 ~ 1096
- [3] Hasslacher M, Schall M, Hayn M, et al. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif*, 1997, 11: 61 ~ 71
- [4] Chirulova V, Cregg J M, Meagher M M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 21: 277 ~ 283
- [5] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 45 ~ 66
- [6] Barr KA, Hopkins S A, Sreekrishna K. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm Eng*, 1992, 12: 48 ~ 51
- [7] www.invitrogen.com
- [8] Trinh L, Noronha S B, Fannon M, et al. Recovery of mouse endostatin produced by *Pichia pastoris* using expanded bed adsorption. *Bioseparation*, 2000, 9(4): 223 ~ 230
- [9] Kjeldsen T, Pettersson A F, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29 (Pt 1): 79 ~ 86
- [10] Borgheresi R A, Palma M S, Ducancel F, et al. Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris*. *Toxicon*, 2001, 39(8): 1211 ~ 1218
- [11] Choi B K, Jimenez-Flores R. Expression and purification of glycosylated bovine beta-casein (L70S/P71S) in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(4): 1761 ~ 1766
- [12] Hilario E, Latao R C, Alegria M C, et al. High-level production of functional muscle alpha-tropomyosin in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(4): 955 ~ 60
- [13] Zani M, Brillard-Bourdet M, Lazure C, et al. Purification and characterization of active recombinant rat kallikrein rK9. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1547(2): 387 ~ 396
- [14] Guo R T, Chou L J, Chen Y C, et al. Expression in *Pichia pastoris* and characterization by circular dichroism and NMR of rhodostomin. *Proteins*, 2001, 43(4): 499 ~ 508
- [15] Rydberg E H, Sidhu G, Vo H C, et al. Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Sci*, 1999, 8(3): 635 ~ 643
- [16] Briand L, Perez V, Huet J C, et al. Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1999, 15(3): 362 ~ 369
- [17] Kalidas C, Joshi L, Batt C. Characterization of glycosylated variants of beta-lactoglobulin expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng*, 2001, 14(3): 201 ~ 207
- [18] Bewley M C, Tam B M, Grewal J, et al. X-ray crystallography and mass spectroscopy reveal that the N-lobe of human transferrin expressed in *Pichia pastoris* is folded correctly but is glycosylated on serine-32. *Biochemistry*, 1999, 38(8): 2535 ~ 2541
- [19] Callewaert N, Laroy W, Cadirgi H, et al. Use of HDL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1, 2-alpha-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*, 2001, 503(2-3): 173 ~ 178
- [20] Boado R J, Ji A, Pardridge W M. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a genetically engineered single chain antibody against the rat transferrin receptor. *J Drug Target*, 2000, 8(6): 403 ~ 412
- [21] Takahashi K, Takai T, Yasuhara T, et al. Effects of site-directed mutagenesis in the cysteine residues and the N-glycosylation motif in recombinant Der f 1 on secretion and protease activity. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 124(4): 454 ~ 460

Advances in *Pichia* Expression System

Qi Lianquan Chen Wei Lai Dazhi Yu Changming Wang Haitao

(Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Sciences Beijing 100071)

Abstract *Pichia expression* system is one of the most successful foreign protein expression system until now. It does not have the endotoxin problem associated with bacteria nor the viral contamination problem of proteins produced in animal cell culture; *Pichia pastoris* has the potential to perform many of the posttranslational modifications typically associated with higher eukaryotes. These include processing of signal sequence processing, disulfide bridge formation and glycosylation. To date Many heterologous proteins have been expressed in *Pichia pastoris* successfully. In this review, the recent advances of the system are described and discussed.

Key words *Pichia pastoris* Expression system