

不同碳源下毕赤酵母 GS115 蛋白组学分析

田小梅* 任建洪 房 聪

(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州普泰生物技术有限公司 苏州 215123)

摘要 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)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问题;并能够对目的蛋白进行类似于高等真核生物的信号肽剪切、二硫键形成、糖基化等蛋白翻译后加工。但是不论是胞内表达或是分泌表达,大多数外源蛋白均面临着被降解的问题,这也是影响目的蛋白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。目的:研究毕赤酵母 GS115 在不同碳源培养过程中胞内外蛋白质组学的差异,指导毕赤酵母表达系统的优化。方法:利用 LC-ESI- MS/MS 方法分析了不同碳源的四种培养基中毕赤酵母 GS115 的胞内和胞外蛋白种类,利用 Griffin 等的计算方法计算各个蛋白的含量。结果:利用 LC-ESI- MS/MS 结合 Griffin 等的归一化非标定量法 SI_N 得到 GS115 胞内胞外详尽的蛋白质种类及准确百分比含量。结论:分析不同培养基之间蛋白质组成的差异,从而为以后构建新的毕赤酵母表达体系,为外源蛋白表达系统的优化提供一定的指导意义。

关键词 毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 不同碳源培养基 LC-ESI-MS/MS 蛋白质组 表达优化

中图分类号 Q786

酵母作为一种表达外源基因的宿主菌,既有原核生物操作简单,生长快的特点,同时还具有真核细胞的翻译后修饰功能。酵母表达系统一般有酿酒酵母系统,甲基营养型酵母表达系统和裂殖酵母表达系统。甲基营养型巴斯德毕赤酵母表达系统最为常用,并以 GS115 和 KM71 酵母最为典型,因其自身分泌的背景蛋白很少,糖基化程度低,对营养要求低,可采用廉价的培养基,易于高密度发酵,也越来越受到研究者的关注。

利用毕赤酵母表达外源蛋白相对于原核表达系统有很多优势,特别是能够分泌到胞外的外源蛋白更是简化了随后的纯化工作,但毕赤酵母自身胞内外存在的大量蛋白,为纯化过程增加了难度。本文分析了毕赤酵母 GS115 胞内外丰度较高的蛋白。详尽列出了含量较高的前 20 种蛋白的种类、含量及其特性,对于优化表达系统,简便纯化步骤具有重要意义。如对酵母

本身作用不大但与所要表达纯化的目的蛋白性质类似的一些蛋白可以通过基因敲除的技术去掉,免去了纯化过程中要考虑如何将这两种性质类似的蛋白分开从而得到目的蛋白的麻烦。

但目前并非所有外源蛋白都能在毕赤酵母中成功高效表达。因为毕赤酵母本身的遗传背景会影响外源基因的转录、翻译、分泌通路等,酵母自身分泌的胞外酶、细胞结合酶以及细胞裂解后释放的胞内酶等都可能引起外源蛋白降解,最终导致不同的蛋白质出现表达水平、生物活性和稳定性的差异。目的蛋白的降解问题备受关注,酵母液泡是降解蛋白的重要场所,酵母液泡中的各种蛋白酶随着发酵过程营养条件的改变发生变化,如发酵过程中的饥饿胁迫、碳源改变、温度和 pH 变化及有毒有害产物的形成等。在毕赤酵母生长和表达外源蛋白过程中,碳源从葡萄糖或甘油到甲醇的改变,使得甲醇代谢酶系(AOX, FAD, DHAS 等)和过氧化氢体逐步积累,导致相应的蛋白酶产生^[1]。Sinha 等^[2]研究发现,毕赤酵母从甘油生长阶段转为以甲醇

收稿日期:2011-10-26 修回日期:2011-11-07

* 电子信箱:casablancatxm@163.com

为碳源诱导表达阶段时,培养基中的各种蛋白酶量明显增加,并随着诱导时间的延长所积累的蛋白酶越来越多,远高于一直以甘油作为碳源的实验对照组。近年来,人们对于 *Saccharomyces cerevisiae* 中的几种蛋白酶已有所了解^[3],但有关毕赤酵母中蛋白酶的研究还相对甚少,仅有几篇关于重组蛋白在毕赤酵母中被降解的报导^[4-7]。本实验中以常用毕赤酵母 GS115 为研究对象,研究不同碳源下其胞内外蛋白质组的区别,以及在未加甲醇诱导前自身有无蛋白酶的存在,对以毕赤酵母 GS115 为宿主的蛋白表达系统的优化有重要意义。

毕赤酵母表达系统的另一种优化方法是选择合适的启动子,启动子是基因表达调控的重要顺式元件,也是基因工程表达载体的一个重要元件。因此找到一个合适的启动子对于目的蛋白高效表达的研究具有重要意义。醇氧化酶 1 (AOX1) 启动子、依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶启动子 P_{FLDI} 均属于诱导型强启动子, AOX1 是毕赤酵母中常用的以甲醇作为诱导碳源的启动子^[8], P_{FLDI} (依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶启动子)^[9] 是一种能以甲醇为单一碳源或以甲胺为单一氮源被强烈诱导的启动子,但在某些情况下使用会受到限制,因为甲醇运输储存存在危险,甲醇原料中污染物可能进入蛋白产品,碳源转换时间点难以选择,甲醇监控困难。三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP) 启动子是最近在巴斯德毕赤酵母中克隆到的一个组成型强启动子^[10],该启动子在发酵时不需要甲醇诱导,更换碳源,操作简便。因此近几年研究者更偏好使用 GAP 启动子,也有研究同时使用两种启动子提高目的蛋白表达产量的^[11],吕中原等^[12]在表达 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (S-adenosylmethionine synthetase, SAMS) 时,同时采用 GAP 和 AOX 两种启动子,有效地提高了目的蛋白的表达产量。但对于利用 GAP 启动子进行外源蛋白表达如何选择最佳碳源鲜有研究,因此本文中分别列出了四种培养基中三磷酸甘油醛脱氢酶的胞内胞外表达量,得出 GAP 启动子分别在以葡萄糖和甘油为碳源时的强度,据此可以为利用 GAP 启动子表达外源蛋白选择合适的碳源。

实际在某些外源蛋白表达过程中,在强启动子的驱动下,表达水平过高超过了宿主细胞翻译后处理加工的能力而导致蛋白的错折叠、不加工或错定位^[13-14],因此也设计出了一些比较温和的启动子,如过氧化物酶体基质蛋白启动子 (P_{PEX8})^[15], GTP 酶启动子

(P_{YPT1})^[16]。根据本文表格中所列蛋白含量的高低以及各自表达位置结合表达的目的蛋白的特性设计并选择合适的启动子,对于提高目的蛋白的表达,优化毕赤酵母表达系统提供辅助作用。

1 材料与方法

1.1 菌株

毕赤酵母 GS115 购自 Ivitrogen 公司。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨,酵母提取物购自 Boston Bioproducts 公司; YNB (Yeast Nitrogen Base) 购自 BD 公司;三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA), 十二烷基硫酸钠 (SDS), 碘乙酰胺, 乙腈, 玻璃砂等购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶购自 Promega 公司; 聚丙烯酰胺, N, N'-甲叉双丙烯酰胺, 甘氨酸等购自上海生工生物有限公司; 葡萄糖, 甘油, 甲醇, 丙酮, 甲酸, 碳酸氢铵等购自国药化学试剂集团; 三刺摇瓶购自上海上博玻璃仪器有限公司; 立式双层振荡培养箱购自太仓华利达实验室设备公司; 蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; LC-ESI-MS/MS [Agilent 1100 HPLC, 内径 75 mm 的反相 C18 色谱柱, HPLC 在线与 LCQ DECXP PLUS (Thermo Fisher, US) 质谱偶联]。

1.3 各种溶液及培养基的配制

饱和 TCA 溶液: 500 g TCA 溶于 350 ml 的 ddH₂O 中制成 TCA 饱和溶液, 室温存放; 10 × YNB: 含有硫酸铵、无氨基酸的 13.4% 酵母基础氮源培养基, 34 g 酵母基础氮源培养基 (无硫酸铵) + 100 g 硫酸铵, 溶于 1 000 ml 水中, 过滤除菌, 4℃ 保存; 1 000 × Biotin: 0.04% 生物素, 40 mg 的生物素溶于 100 ml 水中, 过滤除菌, 4℃ 保存; 10 × D-葡萄糖: 200 g 葡萄糖溶于 1 000 ml 水中, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 15 min 或过滤除菌; 10 × 甘油: 将 100 ml 甘油和 900 ml 水混匀后, 1 × 10⁵ Pa 灭菌或过滤除菌; 1 mol/L PB: 1 mol/L 的 K₂HPO₄ 溶液 132 ml 与 1 mol/L 的 KH₂PO₄ 溶液 868 ml 混匀, 其 pH 为 6.0, 如需调节 pH, 则使用磷酸和氢氧化钾调节 pH; YPD: 蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%, D-葡萄糖 2%; YPG: 蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%, 甘油 2%; SCD: YNB (without ammonium sulfate and amino acids) 0.67%, D-葡萄糖 2%; SCG: YNB (without ammonium sulfate and amino acids) 0.67%, 甘油 2%; BMMY: 蛋白胨 2%, 酵母提取物 1%, 1.34% YNB, 4 × 10⁻⁵ 生物素, 1% 甲醇, 0.1 mol/L PB (pH 6.0); 25 mmol/L 的碳酸氢

铵:0.1 g 碳酸氢铵 + 50 ml 水, pH 7.8;胰蛋白酶溶液:20 μ g 胰酶 + 1 ml 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液配成 0.02 g/ μ l 的胰酶溶液;50 mmol/L 碘乙酰胺:0.924 8 g 的碘乙酰胺溶于 100 ml 水;10 mmol/L DTT:0.015 4 g 的 DTT 溶于 10 ml 水中,一般现配现用;25 mmol/L 碳酸氢铵/50% 乙腈:25 ml 乙腈 + 0.1 g 碳酸氢铵 + 25 ml 水;60% 乙腈/5% 甲酸:30 ml 乙腈 + 2.5 ml 甲酸 + 17.5 ml 水;0.1% 的甲酸:10 μ l 甲酸 + 10 ml 的水。

1.4 实验方法

1.4.1 GS115 上清蛋白和菌体蛋白样品的准备 用灭菌的小木棒从 GS115 平板上挑取单克隆分别接种至装有 30 ml 培养基的 250 ml 的锥形瓶中,30 $^{\circ}$ C,200 r/min 培养至菌体饱和。(1)上清蛋白的获得:14 000 r/min 离心 10 min,取上清 800 μ l 于 1.5 ml 离心管中,加入 1/4 上清体积的饱和三氯乙酸(TCA)溶液,摇匀,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中静置 10 min,14 000 r/min 离心 10 min,去上清,留沉淀。用 200 μ l 20 $^{\circ}$ C 预冷丙酮冲洗沉淀,14 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复三次;将离心管放入微量恒温仪 95 $^{\circ}$ C 蒸发掉残留丙酮,加入 40 μ l 的 1 \times Loading Buffer,95 $^{\circ}$ C 热浴 5 min,取 20 μ l 上样;(2)菌体蛋白的获得:500 μ l 的 0.1 mol/L pH 6.0 的 PB 重悬菌体,加入适量的 glass beads,振荡 30 s,冰上放置 30 s,重复 6~8 次,14 000 r/min 离心 10 min,取上清进行 TCA 沉淀,后续步骤类似上清蛋白,预冷丙酮洗涤三次,蒸发掉残留丙酮后加入 40 μ l 的 1 \times Loading Buffer,取 20 μ l 上样。

1.4.2 蛋白样品的 SDS-PAGE 及割胶 取上述样品各 20 μ l 进行凝胶电泳,80 v,待样品刚跑过浓缩胶,关闭电源,用无水乙醇超声清洗过的刀片将目的条带割下,置于 1.5 ml 的预先用 50% 的乙醇漂洗过的 1.5 ml 离心管中,同时在凝胶的空白处割下一小块作为空白对照。

1.4.3 进行 LC-ESI-MS/MS 分析前样品的处理 脱色:加入 0.5 ml 的 25 mmol/L 的 NH_4HCO_3 ,振荡涡旋 1 h 后去上清,加入适量的 25 mmol/L NH_4HCO_3 /50% 乙腈的溶液(量足以浸没胶带),涡旋振荡 10 min,去上清,重复此步骤 2 次,若重复洗过 2 次后,胶带颜色仍未脱去,可再重复上述步骤一次。加入足以浸没胶带量的 100% 的乙腈,涡旋振荡 10 min,去上清,此时胶带完全被脱色成白色不透明状。脱水:将胶带置于真空离心蒸发浓缩器(SpeedVac)10~30 min,脱水风干。加入足量的 10 mmol/L 的 DTT 溶液浸没胶带,56 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,待降至室温后,去 DTT,用与 DTT 同等体积的 50

mmol/L 的碘乙酰胺溶液黑暗中室温孵育 45 min,每过一段时间将其振荡均匀使其充分反应。消化:加入的预冷的胰蛋白酶溶液,体积由胶带的体积决定(如 2 mm \times 8 mm \times 1 mm = 16 mm³ = 16 μ l),冰上孵育 30 min,若还有残留胰酶溶液,用移液枪吸去。稍微离心后于摇床 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜(6~20 hs)。稍稍振荡后离心,加入两倍胶带体积的 ddH₂O,涡旋振荡 10 min,离心,超声 5 min。用移液枪吸出消化后的溶液转移到装有 5 μ l 的 60% 乙腈/5% 甲酸溶液的新的离心管中,标记 A;残留的沉淀胶带中加入适量的 60% 乙腈/5% 甲酸溶液,足以浸没胶带,涡旋振荡 10 min,离心,超声 5 min,将上清吸出一并归入到离心管 A 中,重复此步骤 2 次。涡旋振荡离心管 A 中所得到的消化产物,离心,在真空离心浓缩蒸发器(SpeedVac)中蒸发至体积 5~10 μ l,并使乙腈浓度降至 5% 以下。加入 20 μ l 的 0.1% 的甲酸溶液于离心管 A 中,涡旋振荡,离心,超声 5 min,样品于 -80 $^{\circ}$ C 保存待 LC-ESI-MS/MS 分析。

1.4.4 归一化非标定量方法确定蛋白丰度 定量蛋白质组学是对组织或细胞表达的蛋白质进行精确定量和鉴定的一门学科,研究方法主要包括双向凝胶电泳结合串联质谱技术和稳定同位素标记(SILAC)技术。双向电泳(2-D electrophoresis)与质谱(MS)联用,通过蛋白半点染色深浅的比较来对蛋白质表达水平进行定性、定量分析。但双向凝胶电泳对相对分子质量极高或极低、等电点极酸或极碱、低丰度蛋白及膜蛋白等的分离和检测能力有限,用于定量比较蛋白质组学研究有很大局限。Ong 等^[17-18]发展了一种以氨基酸形式掺入的同位素代谢标记法(SILAC),该方法具有较高的重现性且弥补了质谱在定量分析方面的局限,与生化处理过程有很好的兼容性,但其只用于活体培养的细胞,对于生物医学研究中常用的组织、体液等样品难以处理;同时对于动物模型的标记成本太高。因此本文中对 GS115 的全蛋白质组进行定量分析,采用了 Griffin 等^[19]人提出的归一化非标定量法,归一化非标定量方法计算得出归一化谱指数(Spectra Index, SI_N),此指数结合了三种质谱丰度特征:肽段数,质谱分析次数以及片段离子强度。利用 SI_N 方法大大减少了多次质谱检测之间的差异,允许定量再现,对相同和不同样品利用多次质谱法检测的成千上万种蛋白的很精确的量化。

$$SI_N = \left[\sum_{k=1}^{pn} \left(\sum_{j=1}^{sc} i_j \right)_k \right] / \left[\sum_{j=1}^n SI_j \right] / L \quad (1)$$

sc:肽段 K 的谱数量;i:肽段 K 的离子片段强度;

pn:蛋白的肽段数;n:能识别的蛋白总数;L:相应蛋白的氨基酸数量。

相对蛋白质丰度是根据每个蛋白的 SI_N 在同一样品中所有蛋白 SI_N 加和的比例得出。

2 结果与讨论

2.1 LC-ESI-MS/MS 分析结果

2.1.1 YPD, YPG, SCD, SCG 四种不同培养基中含量最高的前 20 种胞内蛋白的差异 分析表 1,3-磷酸甘油脱氢酶同功酶 3 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3) 和线粒体苹果酸脱氢酶 (Mitochondrial malate dehydrogenase), 无论使用何种培养基其在胞内含量都较高,但 GS115 胞内酶的种类随着培养基种类的不同有着明显差异。YPG、SCD 和 SCG 胞内中均有较高含量的巯基特异性过氧化物酶 (Thiol-specific peroxiredoxin), 此酶用以减少过氧化氢类物质对细胞的损伤,由此可见 YPD 较其他三种培养基更适合培养 GS115 酵母。比较 YPD、YPG 和 SCD、SCG 发现,在 YPD、YPG 中与细胞有氧呼吸和三羧酸循环相关的酶含量较高,如:烯醇化酶 (Enolase I), 细胞色素 C 氧化酶的亚基, 磷酸丙糖异构酶 (Triose phosphate isomerase) 等;而在 SCD、SCG 中含量较高的是与核糖体大小亚基或与 rRNA 处理相关的蛋白组分。由此可见 YPD、YPG 相对于合成培养基对于 GS115 酵母的增殖培养更为合适。比较 YPD、SCD 和 YPG、SCG, 发现

YPG、SCG 相对于以葡萄糖为碳源的培养基含有较多类似葡糖聚酶的细胞壁蛋白 (Cell wall protein with similarity to glucanases), 由此可推测,以葡萄糖作为碳源更有利于维持酵母细胞的稳定性。胞内蛋白也因培养基的不同含有各自特殊的一些酶类,如 YPD 中含量较高的一种双功能酶同时具有乙醇脱氢酶功能和依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶功能 (Bifunctional enzyme with alcohol dehydrogenase and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase)、丙酮酸脱羧酶 (Major of three pyruvate decarboxylase isozymes)、翻译延伸因子 EF-1 α (Translational elongation factor EF-1 alpha)、Obg 蛋白家族的 GTP 酶 (Putative GTPase, member of the Obg family) 和四聚体磷酸甘油酸变位酶 (Tetrameric phosphoglycerate mutase); YPG 中含量较高的 60S 酸性核糖体蛋白 P2-A (60S acidic ribosomal protein), ATP 酶的亚基蛋白组分以及细胞质肽基辅氨酸顺反异构酶 (Cyclophilin); 而 SCD 中含量较高的为 NAC 复合物亚基组分 [β 1 subunit of the nascent polypeptide-associated complex (NAC)] 及核糖体大亚基 60S 中与 N 端乙酰化相关的核糖体蛋白 L37; SCG 与 SCD 有相似之处如含有类似的 NAC 复合物的亚基组分 [α subunit of the heteromeric nascent polypeptide-associated complex (NAC)], 也有不同之处,其含有较高含量的细胞质硫氧还蛋白同工酶 (Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme of the thioredoxin system)。

表 1 YPD, YPG, SCD, SCG 四种不同培养基中含量最高的前 20 种胞内蛋白

Table 1 The most abundant intracellular proteins in different carbon source medias

序号 (No.)	开放阅读框 (<i>P. pastoris</i> ORF)	蛋白名称 (Protein)	百分含量 (Relative abundance)			
			A	B	C	D
1	gil254568470	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3	7.2%	4.8%	3.2%	4.2%
2	gil254570667	ATPase involved in protein folding and the response to stress	2.3%	1.6%	1.9%	/
3	gil254568036	Mitochondrial malate dehydrogenase	3.7%	3.5%	3.9%	1.7%
4	gil254568606	Thiol-specific peroxiredoxin	/	3.3%	3.7%	2.5%
5	gil254568302	Subunit IV of cytochrome c oxidase	/	4.8%	3.2%	2.0%
6	gil254568544	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III	4.4%	2.8%	/	/
7	gil254570367	Enolase I, a phosphopyruvate hydratase	4.5%	2.1%	/	/
8	gil254566601	3-phosphoglycerate kinase	4.4%	1.8%	/	/
9	gil254569858	Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	2.7%	4.7%	/	/
10	gil254571893	Subunit VI of cytochrome c oxidase	1.5%	1.8%	/	/
11	gil254572163	Triose phosphate isomerase, abundant glycolytic enzyme	1.9%	2.3%	/	/
12	gil254572359	Translation initiation factor eIF-5A, promotes formation of the first peptide bond	/	/	2.9%	21.6%
13	gil254569212	Ribosomal protein 51 (rp51) of the small (40s) subunit	/	/	4.8%	1.8%
14	gil254574310	Primary rRNA-binding ribosomal protein component of the large (60S) ribosomal subunit	/	/	2.7%	2.2%
15	gil254568562	Ribosomal protein 59 of small subunit, required for ribosome assembly and 20S pre-rRNA processing	/	/	6.0%	4.5%

16	gi 254569976	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	/	/	1.8%	1.7%
17	gi 254564747	Hypothetical protein	/	/	1.5%	1.8%
18	gi 254566861	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, has similarity to rat L38	/	/	2.7%	2.1%
19	gi 254566933	Delta subunit of the central stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase	/	5.3%	/	1.4%
20	gi 254564921	Cell wall protein with similarity to glucanases	/	1.7%	/	7.0%
21	gi 254566769	Hypothetical protein	1.8%	/	/	2.9%
22	gi 254569372	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel), outer membrane protein	/	2.1%	7.0%	/
23	gi 254567507	Translational elongation factor EF-1 alpha	2.3%	/	/	/
24	gi 254570575	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes	3.6%	/	/	/
25	gi 254572628	Cytochrome c, isoform 1	1.4%	/	/	/
26	gi 254568196	Bifunctional enzyme with alcohol dehydrogenase and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	5.4%	/	/	/
27	gi 254573010	Major ADP/ATP carrier of the mitochondrial inner membrane	1.3%	/	/	/
28	gi 254571899	Tetrameric phosphoglycerate mutase	1.7%	/	/	/
29	gi 254565307	Hypothetical protein	1.9%	/	/	/
30	gi 254568334	Putative GTPase, member of the Obg family	1.7%	/	/	/
31	gi 254571387	Alpha subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	2.0%	/	/	/
32	gi 254568616	Hypothetical protein	1.7%	/	/	/
33	gi 254571157	Subunit b of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase	/	1.7%	/	/
34	gi 254571407	Hypothetical protein	/	2.5%	/	/
35	gi 254567027	60S acidic ribosomal protein P2-A	/	3.1%	/	/
36	gi 254565455	Subunit 5 of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase	/	3.4%	/	/
37	gi 254564995	Cytoplasmic peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin)	/	1.8%	/	/
38	gi 254566769	Hypothetical protein	/	2.2%	/	/
39	gi 254565519	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, identical to Rpl2Bp	/	/	2.3%	/
40	gi 254564809	Subunit beta of the nascent polypeptide-associated complex(NAC)	/	/	1.8%	/
41	gi 254573464	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl13Bp	/	/	2.2%	/
42	gi 254567471	60S ribosomal protein L36	/	/	2.1%	/
43	gi 254569654	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	/	/	3.2%	/
44	gi 254566559	N-terminally acetylated ribosomal protein L37 of the large (60S) ribosomal subunit	/	/	1.6%	/
45	gi 254573142	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit,	/	/	1.6%	/
46	gi 254571131	Putative dihydrokaempferol 4-reductase	/	/	/	1.4%
47	gi 254569156	α subunit of the heteromeric nascent polypeptide-associated complex (NAC)	/	/	/	2.2%
48	gi 254574464	Mitochondrial ATP synthase	/	/	/	2.3%
49	gi 254573180	Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme of the thioredoxin system	/	/	/	3.6%
50	gi 254565451	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl12Ap	/	/	/	2.6%
51	gi 254567231	Hypothetical protein	/	/	/	3.3%

Note: (A) YPD (B) YPG (C) SCD (D) SCG

2.1.2 YPD, YPG, SCD, SCG 四种不同培养基中含量最高的前 20 种胞外蛋白的差异 分析表 2, 发现四种培养基中共同含有的胞外蛋白主要是与细胞壁组装及维持细胞壁稳定有关的酶类, 且在 YPD 胞外上清中有些含量超过总蛋白含量的 50%。比较四种培养基的胞外上清蛋白种类, YPG、SCD 的胞外上清中含有细胞膜定位蛋白用于保护细胞过度失水 (Plasma membrane localized protein that protects membranes from desiccation), 且检测到仅在 YPD 胞内检测到的翻译延伸因子 EF-1 α (Translational elongation factor EF-1 alpha), 而 YPD、SCG 的前 20 种上清蛋白中未检测到; 同时发现仅在 SCG 胞内中检测到的细胞质硫氧还蛋白同工酶 (Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme of the

thioredoxin system) 在 SCG 的胞外上清中未检测到而其他三种培养基 YPD、YPG 和 SCD 的胞外上清中均有检测到含量分别为 1.4%、9.5% 和 9.3%; 有些蛋白本属于胞内蛋白的烯醇化酶 (Enolase I) 在 YPG 的胞外中大量检测到而在 SCD 中也有 1.9% 的含量, 可能原因是这些蛋白与酵母自身的分泌蛋白被包装到分泌小泡中一起被分泌到细胞外, 类似的在 YPD 胞外上清中检测到的胞内酶蛋白二硫异构酶 (Protein disulphide isomerase); 有些蛋白仅存在于某一种培养基的上清中, YPD 中的与 DNA 复制相关的 SUN 家族蛋白 (Protein of the SUN family that may participate in DNA replication)、甲壳素糖苷转移酶 (Putative chitin transglycosidase) 和 O-糖基化蛋白 (O-glycosylated protein) 等, YPG 中的 3-

磷酸甘油酸激酶(3-phosphoglycerate kinase)、二氢4-萘酚还原酶(Putative dihydrokaempferol 4-reductase),SCD和SCG的胞外上清类似于胞内,含量较高的蛋白大多数是与核糖体大小亚基相关的蛋白组分,但也有差异,SCD中检测到的RNA聚合酶的亚基和线粒体内膜上半胱氨酸序列的蛋白(Mitochondrial intermembrane

space cysteine motif protein),SCG中线粒体乙醇脱氢酶,线粒体苹果酸脱氢酶及细胞色素C氧化酶的亚基;此外还有一些含量较高的功能未知有待进一步研究的蛋白(Hypothetical Protein),有的在YPD中含量高达6.0%,YPG中4.0%,SCD中9.2%,SCG中2.9%。

表2 YPD,YPG,SCD,SCG四种不同培养基中含量最高的前20种胞外蛋白

Table2 The most abundant supernatant proteins in different carbon source medias

序号 (No.)	开放阅读框 (<i>P. pastoris</i> ORF)	蛋白名称(Protein)	百分含量 (Relative abundance)			
			A	B	C	D
1	gi 254564921	Cell wall protein with similarity to glucanases	51.6%	9.1%	9.7%	29.6%
2	gi 254568502	Major exo-1,3-beta-glucanase of the cell wall, involved in cell wall beta-glucan assembly	17.5%	5.6%	5.2%	9.2%
3	gi 254566893	Endo-beta-1,3-glucanase, major protein of the cell wall, involved in cell wall maintenance	13.2%	5.3%	6.6%	1.4%
4	gi 254568470	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3	1.6%	7.1%	9.3%	4.7%
5	gi 254569190	Hypothetical protein	1.1%	3.0%	2.0%	1.8%
6	gi 254564915	Beta-1,3-glucanotransferase, required for cell wall assembly	0.9%	1.9%	2.3%	/
7	gi 254573180	Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme of the thioredoxin system	1.4%	9.5%	9.3%	/
8	gi 238034210	Hypothetical protein	1.8%	/	2.5%	6.2%
9	gi 254572676	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	/	2.4%	2.9%	1.4%
10	gi 254567645	Cell wall protein with similarity to glucanases	0.8%	/	/	1.2%
11	gi 254572688	Mitochondrial outer membrane and cell wall localized SUN family member	0.4%	/	/	1.4%
12	gi 254570367	Enolase I, a phosphopyruvate hydratase	/	6.2%	1.9%	/
13	gi 254573914	Plasma membrane localized protein that protects membranes from desiccation	/	3.4%	1.7%	/
14	gi 254566861	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, has similarity to rat L38 ribosomal protein	/	1.4%	6.3%	/
15	gi 116293731	Translational elongation factor EF-1 alpha	/	2.4%	1.5%	/
16	gi 254569858	Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	/	1.1%	/	2.3%
17	gi 254568606	Thiol-specific peroxiredoxin, reduces hydroperoxides to protect against oxidative damage	/	3.6%	/	2.4%
18	gi 254574310	Primary rRNA-binding ribosomal protein component of the large (60S) ribosomal subunit	/	1.3%	/	3.3%
19	gi 254569372	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel), outer membrane protein	/	/	1.5%	2.9%
20	gi 254570259	Hypothetical protein	6.0%	/	/	/
21	gi 13235614	Protein disulphide isomerase	0.5%	/	/	/
22	gi 254569662	Hypothetical protein	0.2%	/	/	/
23	gi 254570078	Protein of the SUN family (Sim1p, Uth1p, Nca3p, Sun4p) that may participate in DNA replication	0.7%	/	/	/
24	gi 254568654	Protein that associates with ribosomes	0.2%	/	/	/
25	gi 254573778	Putative chitin transglycosidase, cell wall protein	0.2%	/	/	/
26	gi 254573228	O-glycosylated protein required for cell wall stability	0.9%	/	/	/
27	gi 254572181	Glycoprotein involved in cell wall beta-glucan assembly	0.1%	/	/	/
28	gi 254568684	Hypothetical protein	0.3%	/	/	/
29	gi 254568654	Protein that associates with ribosomes	0.2%	/	/	/
30	gi 52783170	3-phosphoglycerate kinase	/	2.4%	/	/
31	gi 254566769	Hypothetical protein	/	4.0%	/	/
32	gi 254568442	One of two nearly identical (see HTB1) histone H2B subtypes	/	2.0%	/	/
33	gi 254569758	Hypothetical protein	/	1.2%	/	/
34	gi 254571131	Putative dihydrokaempferol 4-reductase	/	1.2%	/	/
35	gi 254570889	Hypothetical protein	/	/	9.2%	/
36	gi 254567996	Hypothetical protein	/	/	1.8%	/
37	gi 254571425	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	/	/	1.8%	/

38	gi 254567471	60S ribosomal protein L36	/	/	2.4%	/
39	gi 254565403	RNA polymerase subunit, found in RNA polymerase complexes I, II, and III	/	/	2.5%	/
40	gi 254571859	Mitochondrial intermembrane space cysteine motif protein	/	/	1.4%	/
41	gi 254568544	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III	/	/	/	1.2%
42	gi 254570259	Hypothetical protein	/	/	/	2.9%
43	gi 254568036	Mitochondrial malate dehydrogenase	/	/	/	2.9%
44	gi 254568562	Ribosomal protein 59 of small subunit, required for ribosome assembly and 20S pre-rRNA processing	/	/	/	1.4%
45	gi 254569654	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	/	/	/	1.3%
46	gi 254568302	Subunit IV of cytochrome c oxidase	/	/	/	1.7%

Note: (A) YPD (B) YPG (C) SCD (D) SCG

综观表 1 和表 2,四种培养基中无论胞外还是胞内均具有较高含量的 3-磷酸甘油醛脱氢酶,同功酶 3 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3),其在胞内 YPD 培养基中含量最高,胞外 SCD 培养基中含量最高,因此我们可以根据所需要表达蛋白的位置选择合适的碳源培养以 GAP 作为启动子的酵母宿主菌。其他检测到的蛋白大致可分为以下几类:(1)酵母维持自身基本生存以及适应外界环境所需要的酶。如:与 TCA 循环相关的线粒体苹果酸脱氢酶 (Mitochondrial malate dehydrogenase)、丙糖磷酸异构酶 (Triose phosphate isomerase) 和丙酮酸脱羧酶 (Pyruvate decarboxylase isozyme);维持细胞供能进行有氧呼吸作用有关的线粒体 ATP 合酶的各亚基蛋白组分以及细胞色素 C 氧化酶的各亚基组分;参与微生物糖酵解过程的线粒体乙醇脱氢酶 (Mitochondrial alcohol dehydrogenase);以及一些防止过氧化氢类物质对细胞氧化损伤的酶如:巯基特异性过氧化物酶 (Thiol-specific peroxidase)。(2)主要存在于胞外上清中,与细胞壁的生成,组装及维持其稳定性相关的蛋白。如:类似葡聚糖酶的细胞壁蛋白 (Cell wall protein with similarity to glucanases)在四种培养基的胞外上清中含量都较高,在 YPD 和 SCG 培养基中含量分别高达 51.6% 和 29.6%。(3)大小核糖体亚基的蛋白组分。(4)有关蛋白质翻译以及辅助蛋白折叠的一些分子伴侣。如:翻译起始因子 eIF-5A (Translation initiation factor eIF-5A);翻译延伸因子 EF-1 α (Translational elongation factor EF-1 α);细胞质肽基辅氨酸顺反异构酶 (Cyclophilin)。(5)一些功能未知的蛋白 (Hypothetical protein)。

2.2 讨 论

总结以上差异分析结果可知:YPD 中胞内胞外有关蛋白表达的蛋白含量均较少(特别是胞外出了细胞壁相关蛋白,其余杂蛋白的含量都较低),因此,其适用

于以扩增细胞数目为目的的大规模发酵前的种子的扩增阶段,以提高细胞对葡萄糖的利用效率。SCD 和 SCG 培养基属于合成培养基,有些蛋白本属于胞内蛋白(如线粒体内膜上的含半胱氨酸序列的蛋白、线粒体苹果酸脱氢酶)出现在 SCD 和 SCG 的上清中,可能原因是这些蛋白与酵母自身的分泌蛋白被包装到分泌小泡中一起被分泌到细胞外,或者一部分细胞裂解后胞内的酶被释放到上清中,由胞内胞外蛋白种类分析,其不适用于正常情况下培养酵母,用于外源蛋白表达。但可以利用它们加入合适的营养素进行筛选培养某些有缺陷基因的酵母菌株。

对于不同碳源下 GS115 自身蛋白酶的表达分析:实验在培养基 SCD 的上清和胞内中分别检测到有 0.2% 的天冬氨酸蛋白酶 (Aspartic protease) 和 0.3% 的丝氨酸蛋白酶家族的液泡蛋白酶 B (Vacuolar proteinase B);且在 YPG 的上清中也检测到有 0.3% 的天冬氨酸蛋白酶 (Aspartic protease);而 YPD 无论是在上清或者是胞内都未有检测到蛋白酶的存在,相反,在 YPD 的胞内检测到有 0.1% 的羧肽酶 Y 抑制蛋白 (Carboxypeptidase Y inhibitor) 以及 0.3% 的辅助蛋白准确折叠的四聚体线粒体分子伴侣 (Tetradecameric mitochondrial chaperonin);由此可推断 YPD 用于培养 GS115 较为稳定且营养较为均衡。且了解不同碳源下具体蛋白酶的表达特性,对于选择合适的培养条件(如温度,pH)或添加特异性蛋白酶抑制剂具有指导意义,对构建某些特定蛋白酶缺失或者能产生蛋白酶抑制剂的菌株具有参考价值。

实验对 GS115 蛋白质组学的分析在新启动子的设计、信号肽和筛选标志的选择等方面有指导作用,通过分析本实验中分泌到上清中的蛋白种类及其含量可以利用它们的分泌信号结合融合蛋白技术来优化目的蛋白的表达;其次根据所含蛋白种类及各自含量结合所要表达的目的蛋白的特性对毕赤酵母进行密码子优

化,敲除对蛋白本身不重要的蛋白基因优化表达系统获得高表达,Marx 等^[20]发现去掉 GAS1 基因后提高了重组蛋白的表达。Mattanovich 等^[21]发现 *P. pastoris* DSMZ70382 以葡萄糖为碳源研究其分泌蛋白,分析收集的上清中主要的 20 种蛋白,大部分属于酸性蛋白,得出结论选择以葡萄糖为碳源的培养基,将会降低目的蛋白中混有的宿主杂蛋白量。因此通过分析实验中各个蛋白的特性如相对分子质量,等电点(PI),疏水亲水性结合所要表达的目的蛋白的特点选择合适的培养基对提高表达量简化纯化步骤具有重要价值。

参考文献

- [1] Yasuyoshi S, Antonius K, Linda K, et al. Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates. The Journal of Cell Biology, 1998, 141(3):625-636.
- [2] Sinha J, Plantz B A, Inan M, et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. Biotechnol Bioeng, 2005, 89(1):102-112.
- [3] Van Den Hazel H B, Kiellandbrandt M C, Winther J R. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases: review. Yeast, 1996, 12:1-16.
- [4] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. Bioscience and Bioengineering, 2000, 89:55-61.
- [5] Sinha J, Plantz B A, Zhang W, et al. Improved production of recombinant ovine interferon-H by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. Biotechnology Progress, John Wiley & Sons, 2003, 19:794-802.
- [6] Zhou X S, Zhang Y X. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. Biotechnological Letters, 2002, 24:1449-1453.
- [7] 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.
- [8] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J Y, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol, 2000, 16:23-52.
- [9] Shen S, Suhar G, Jeffries T W, et al. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. Gene, 1998, 216:93-102.
- [10] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene, 1997, 186:37-44.
- [11] Wu J M, Lin J C, Chieng L L, et al. Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage to colony-stimulating factor in *Pichia Pastoris*. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(4):453-459.
- [12] 吕中原, 钱江潮, 储炬, 等. 同时利用 AOX1 和 GAP 启动子表达 SAM 合成酶促进重组毕赤酵母中 S-腺苷甲硫氨酸积累. 工业微生物, 2008, 38(4):24-30.
- Lv Z Y, Qian J C, Chu J, et al. Combined use of AOX1 and GAP promoter to express SAM synthetase and enhance S-adenosylmethionine accumulation in *Pichia pastoris*. Industrial Microbiology, 2008, 38(4):24-30.
- [13] Thill G P, Dark G R, Stillman G R, et al. Proceedings of the sixth international symposium on genetics of industrial microorganisms. Strasburg: Societe francaise de microbiologie, 1990. 477-490.
- [14] Brierley R A. Secretion of recombinant human insulin like growth factor I(IGF-I). Methods in Molecular Biology, 1998, 103:149-177.
- [15] Liu H, Tan X, Russell K A, et al. PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. Biological Chemistry, 1995, 270(18):10940-10951.
- [16] Sears I B, O'Connor J, Rossanese O W, et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. Yeast, 1998, 14(8):783-790.
- [17] Ong S E, Blagoer B, Kratchmarov I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Mol Cell Proteomics, 2002, 1(5):376-386.
- [18] Ong S E, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomic. Methods in Molecular Biology, 2007, 359:37-52.
- [19] Griffin N M, Yu J Y, Long F, et al. Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. Nature Biotechnology, 2010, 28(1):83-89.
- [20] Marx H, Sauer M, Resina D, et al. Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Letters, 2006, 264(1):40-47.
- [21] Mattanovich D, Callewaert N, Rouze P, Lin YC, et al. Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1):53.

Proteomic Analysis of *Pichia pastoris* GS115 Cultured in Different Carbon Source Mediums

TIAN Xiao-mei REN Jian-hong FANG Cong

(Radiology and Public Health School of Soochow University, Suzhou ProtTech Biotechnology Company Limited, Suzhou 215123, China)

Abstract *Pichia Pastoris* is one of the most successful heterologous protein expression systems until now. It doesn't have the endotoxic problem which always existed in the prokaryotic expression system nor the viral contamination of recombinant proteins produced in mammalian cells culture. Furthermore, unlike bacteria, yeasts can carry out the similar post-translational protein processing as higher eukaryotes, such as signal peptide cleavage, disulfide bonds formation and the glycosylation. However, it is not clear which protease may present in the culture media and degrade heterologous protein which leads poor yield of protein of interest. Objective: Comparing the GS115 proteomics differences cultured in different carbon source media to optimize the heterologous protein expression system. Methods: By using LC-ESI- MS/MS combined with Griffin's new calculation method, intracellular and supernatant protein profiling and protein abundance of GS115 in 4 different carbon source media were identified and compared. Results: Intracellular and supernatant protein profiling and related protein abundance of GS115 in 4 different carbon source media were obtained with LC-ESI-MS/MS analysis and Label-free normalized quantification method. Conclusions: The findings will be helpful to develop novel strains which may optimize the *Pichia pastoris* heterologous protein expression system.

Key words *Pichia pastoris* GS115 Carbon source mediums LC-ESI-MS/MS Proteomics Expression optimization

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按姓氏笔划排列):

马亚兵 毛建平 王友信 王金星 王静云 邓 宁 卢文玉 史兆兴 石继红 刘玉琴
刘建国 刘彦君 刘维一 刘德虎 孙宗修 孙 敏 权春善 江 宁 许文涛 邢建民
宋锡瑾 张传森 张兆山 张博润 张靖溥 张 毅 李用芳 李佳慧 李桂源 李 寅
杜卫华 杜志强 杨培龙 沈亚领 沈秉谦 花宝光 邱德有 陈金春 孟延发 姜 韬
胡尚连 赵肃清 钞亚鹏 唐松山 徐 郁 钱世钧 高 明 高海燕 曹泽虹 梁前进
韩文玲 解志红 蔡海波 裴雪涛 谭焕然 潘 杰 潘武宾 潘 皎 颜 山