

酿酒酵母表达系统

唐香山, 张学文

(湖南农业大学 生物技术系, 中国湖南 长沙 410128)

摘要: 酿酒酵母是单细胞真核微生物, 人们以酿酒酵母为宿主菌, 用载体表达外源基因的过程中, 积累了丰富的经验, 掌握了酿酒酵母表达的许多优缺点, 如它繁殖速度快, 可以大规模发酵生产, 但在发酵过程中会产生乙醇, 而乙醇在培养基中积累会影响酵母的生长代谢和基因产物的表达, 尤其是进行高密度发酵时该效应更明显; 针对这些缺点, 可以采取积极的应对措施. 主要就酿酒酵母表达系统的组成、优缺点及高效表达的策略等作一综述.

关键词: 酿酒酵母; 表达; 载体; 蛋白质

中图分类号: Q815, TQ926

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S0-0106-04

Saccharomyces Serevisiae Expression System

TANG Xiang-shan, ZHANG Xue-wen

(Department of Bio-technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract: *Saccharomyces serevisiae* is unicellular eukaryotic biology. People accumulate many experiences and grasp many advantages or disadvantages of yeast expression in the course of exogenous gene expression with vector in *saccharomyces serevisiae*, such as yeast grows speedily, and can be processed with massive fermentation. But it will also produce alcohol in the process of fermentation, and the accumulation of alcohol in the culture medium will affect yeast's growth metabolism and gene expression, this effect is especially obvious in the high density fermentation. Contraposing those defects, positive steps can be adopted. The composition, advantages and disadvantages, the strategies of effective expression of *Saccharomyces serevisiae* expression system are reviewed.

Key words: *Saccharomyces serevisiae*; expression; vector; protein

(*Life Science Research*, 2004, 8(2): 106 ~ 109)

酿酒酵母 (*Saccharomyces serevisiae*) 又名面包酵母, 它是单细胞真核微生物, 一直以来酿酒酵母被称为真核生物中的“大肠杆菌”^[1]. 它是最早应用于酵母基因克隆和表达的宿主菌. 自 1981

年 Hitzemom 等用酿酒酵母表达人干扰素获得成功^[2], 人们还用酿酒酵母表达了多种原核和真核蛋白^[3]. 目前科学家对酿酒酵母表达系统的研究已非常深入.

收稿日期: 2003-12-03, 修回日期: 2004-05-17

基金项目: 湖南省优秀中青年基金项目(01JZY2099)

作者简介: 唐香山 (1979-), 男, 湖南祁阳人, 湖南农业大学细胞生物学硕士研究生, 主要从事基因的克隆和表达研究. Tel: +86-0731-4617017, E-mail: txsh2333@163.com 或 tangxiangshan@hunau.net

1 酿酒酵母表达系统组成

1.1 用于酵母基因表达的两类载体

1.1.1 YIp(yeast integration plasmid)型载体

这是一种整合型载体,如 Yip5. 它不含酵母的 DNA 复制起始区,不能在酵母中进行自主复制,含有整合介导区,此载体整合到染色体上,稳定性高,缺点为拷贝数低,但采取一些措施可以初步解决这个限制问题. 第 1 个策略:用酵母转座子以产生多个插入拷贝;第 2 个策略:将 re-DNA 插入到核糖体 DNA(rDNA)簇中,在宿主的 X II 号染色体上以 150 串联重复序列存在. 用特殊的质粒如 pMIRY2 转化可产生上百个整合拷贝,整合的 pMIRY2 在无选择压力下分裂时保持稳定^[3].

1.1.2 YEpl(yeast episomal plasmid)型载体

这是一种附加型载体,如 Yep13. 它含有酿酒酵母 2 μ 质粒 DNA 复制有关的部分或全部序列. 该载体常以 30 或更多拷贝存在,但不稳定. 它能独立于酵母染色体之外复制,为穿梭质粒(*E. coli* 和 *S. cerevisiae*). 为了克服这些载体的不稳定性,以脆弱的 *srbl-1* 突变的宿主株为基础建立自然选择系统. 这个菌株要求渗透压稳定,否则会裂解,转化后带野生型 SRB 的自主复制 YEpl 型质粒与此菌株进行互补,可在培养基上保持选择性^[4-6].

1.2 用于基因表达的宿主菌—酿酒酵母

在遗传学方面,人们对酿酒酵母进行了广泛的研究,酿酒酵母基因组序列(约 1.2×10^7 bp)早在 1996 年就完成,它有 16 条染色体,约 6 000 个 ORF,仅 4% 的酵母基因有内含子^[7]. 由于人们对酿酒酵母的遗传背景十分清楚,因此酿酒酵母是很理想的真核表达宿主菌.

2 酿酒酵母基因表达系统研究现状及其优缺点

酿酒酵母在酿酒业和面包业使用有数千年的历史,被认为是 GRAS 生物 (generally recognized as safe)^[8]. 酿酒酵母是迄今了解最完全的真核生物,上千个基因已被分析,完整的基因组测序也于 1996 年完成^[7]. 用酿酒酵母表达外源基因始于 1981 年,目前利用酿酒酵母为宿主系统表达了多种外源基因产物,如乙型肝炎疫苗、人胰岛素、人粒细胞集落刺激因子、人血管抑制素等^[3,9].

酿酒酵母表达系统表达外源基因的优点有很多:酿酒酵母培养条件普通,生长繁殖迅速,用于

表达基因工程产品时,工艺简单,能够耐受较高的流体静压,可以大规模生产,有效降低生产成本. 已广泛应用于酿酒和食品工业,它不会产生毒素,安全可靠,酿酒酵母表达外源基因具有一定的翻译后加工能力,收获的外源蛋白质具有一定程度上的折叠加工和糖基化修饰,特别适合于表达真核生物基因,这有利于保持生物产品的活性和稳定性^[10-13]. 外源基因可在酿酒酵母中分泌表达,通常为将重组蛋白的成熟蛋白形式与结合信息素的 pre-pro 序列融合,Pro 序列可用 Kex2 酶的蛋白水解作用切去,这个步骤是广泛存在于真核生物中的,表达产物分泌至胞外不仅有利于纯化^[14],而且避免了产物在胞内大量蓄积对细胞的不利影响. 酿酒酵母的遗传背景清楚,容易进行遗传操作,所以,毫不奇怪,第一个商品化的重组疫苗来自酿酒酵母^[2].

但应用酿酒酵母表达系统生产外源基因的蛋白质产物时也有不足之处,如产物蛋白质的不均一、信号肽加工不完全、内部降解、多聚体形成等,造成表达蛋白质在结构上的不一致,酿酒酵母大规模发酵过程中会产生乙醇,难以进行高密度培养,分泌效率低,一般不能高效分泌分子质量大于 30 kD 的外源蛋白质(在酵母双杂交系统中酵母可低水平分泌 α -半乳糖苷酶,它的分子质量约 51 kD),也不能使所表达的外源蛋白质正确糖基化,而且表达蛋白质的 C 端往往被截短,这些缺点限制了酿酒酵母在表达重组蛋白中的应用^[15]. 整合型载体不含自主复制序列(ARS),被整合到酵母宿主菌的染色体上后,它的稳定性好,但它的拷贝数很低;附加体型载体,由于含有来自酵母天然质粒 2 μ 复制起点序列,能够独立于酵母染色体外自主复制,拷贝数通常可达 30 拷贝以上,但在非选择条件下多不稳定,发酵生产过程中质粒易丢失仍是个问题^[12,16,17]. 这些缺点对于外源基因的表达是很大的障碍.

3 酿酒酵母表达系统高效表达外源基因的策略

外源基因在酿酒酵母中的表达受到很多因素的影响,如转录水平、表达载体在细胞中的拷贝数和稳定性,胞内表达产物的加工和修饰,分泌表达产物的加工和修饰等等.

表达外源基因在酵母中的表达水平与所选择的启动子有关,不同的表达载体具有不同的特异

性启动子和终止子,要使外源基因在酿酒酵母中得到高效表达必须高效启动转录^[21],一般在构建表达载体时引入强启动子,如酵母磷酸甘油酯激酶(PGK)基因启动子,乙醇脱氢酶(ADH)基因启动子等^[6,18]。但有时强启动子启动外源基因转录会造成细胞中表达产物含量过高,而对细胞造成伤害。

由于外源基因在细胞中的拷贝数会影响相应 mRNA 的拷贝数,所以对于非整合质粒来说,增加表达载体在细胞中的拷贝数能提高外源基因转录的 mRNA 总量^[19]。以多拷贝酵母内源性质粒为基础构建稳定的多拷贝表达载体是提高表达载体在酵母中拷贝数的一个途径。由于大量表达外源蛋白的过程不可能在选择培养基中进行,因而表达载体在没有选择压力的情况下能否稳定保持拷贝数是很重要的^[6,20]。将外源基因整合到染色体上可维持外源基因在细胞中的稳定性,然而在多数情况下会因为细胞中的拷贝数较低而影响其表达。也可适当增加目的基因整合到酵母染色体上的拷贝数(即基因剂量)是提高外源基因表达量的基本策略,但是,整合过多的外源基因拷贝数将导致重组 DNA 的不稳定^[21,22]。

另外酵母表达外源蛋白质可以是胞内的,也可以是分泌到胞外的,分泌到胞外对外源蛋白质本身而言更稳定,产量也较胞内形式更高,因此人们多选择具有信号肽的分泌型表达菌株,但是信号肽具有选择性,所以选择合适的信号肽对于提高某种重组蛋白质的表达量是非常重要的,常用的信号肽有 α -MF, PHO5, SUC2 等^[23-26]。影响外源基因在酵母菌中表达的因素还有很多,如整合位点、mRNA 5' 和 3' 非翻译区(UTR)、宿主菌的 Mut 表型、蛋白酶、表达蛋白质自身的特点、培养基及培养的环境条件等,有效控制各种影响表达的因素,对于外源基因的高效表达都是必不可少的^[5,27]。

4 酿酒酵母表达系统的应用及前景

利用酿酒酵母表达系统生产制备外源基因的表达产物已有 20 余年的历史,尽管人们利用酿酒酵母表达系统制备外源蛋白质取得了成功,但是实践中仍然发现有很多的外源基因不能在酵母表达系统中表达,具体原因目前还没有明确。另外,还没有彻底克服酵母表达系统制备外源蛋白质时发生的不均一现象。随着酿酒酵母基因组测序的

完成及后基因组的发展,人们对酵母的基因表达调控机制和对表达产物的加工修饰及分泌能力将更加清楚,相信不久的将来,这些问题都将得到解决^[5,6,28]。

酿酒酵母表达系统除了可以安全高效地表达真核生物中的目的基因外,还可用来进行人类基因的功能分析。现有的资料表明有相当一部分人类疾病基因和酿酒酵母基因有较高的同源性,基于上述事实,人们可以根据酵母执行核心功能的重要基因来筛选取得相应的人类基因,并在酵母表达系统中初步确认其功能,或者,一个功能未知的人类基因,如果它执行核心的生物学功能,那么,我们有可能在酵母基因组中找到它的同源物,并有可能通过在酵母表达系统中的功能互补试验,为这个基因的功能研究提供某些线索^[6,29,30]。

酿酒酵母也是药物开发中常用的一种真核生物模型。Cellzome AG 在 2002 年第一次描述了酵母蛋白质组的功能图谱,这幅图谱绘制了酿酒酵母中蛋白质的完整网络及其相互作用,这个蛋白质的相互作用网络是影响细胞在不同环境下的活性的基础。这幅图谱将能让研究人员更加全面的评价一个蛋白质在生物学上的功能,并且为药物开发选择靶点提供了一个更全面的方法。通过了解靶点所处的分子环境,研究人员能够更好的预测候选药物在安全性和有效性方面的效果,蛋白质相互作用的图谱建立了一个基础,人们可以在上面添加从文献或者其他实验中所获得的数据,将这些信息结合起来,将能够提高药物开发的效率。它的应用前景有:根据不同实验条件下从体内条件下分离出的分子集合,以让药物开发领域找到新的切入点,提供一个平台,人们可以通过向其中增加其他数据和信息而利用生物信息学手段更好的设计实验,根据蛋白质复合物组装的差异,预测候选药物的安全性和效果,并对先导化合物进行优化选择,根据复合物的组成,医学上的用途以及筛选和鉴定先导化合物的方法建立一套全面的知识产权体系;通过预测未知蛋白质和已知蛋白质之间的相互作用,发现新的蛋白质及其功能^[30,31]。这些对于人类蛋白质相互作用网络图谱分析具有重要意义。

参考文献(References):

- [1] FREDERICK M, AUSUBEL *et al.* Short protocols in molecular biology[M]. USA: John Wiley & Sons, 1995. 495-507.

- [2] HITZEMAN R A, HAGUE F E, LEVINE, *et al.* Expression of human gene for interferon in yeast[J]. *Nature*, 1981, 293: 717-722.
- [3] 楼士林, 扬盛昌, 龙敏南, 等. 基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 374-378
- [4] WINZELER E A K, SHOEMAKER D D, ASTROMOFF A, *et al.* Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis[J]. *Science*, 1999, 285: 901-906.
- [5] ADAMS A, GOTTSCHLING D E, KAISER C A, *et al.* Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual[M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 45-47.
- [6] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 77-91.
- [7] 吴丽娟, 蒋建新, 朱佩芳, 等. 酵母表达系统及其应用研究[J]. *生命的化学*, 2003, 23(1): 46-49.
- [8] JAYARAM M, LI Y, BROACH J R. The yeast plasmid 2 μ encodes components required for its high copy propagation[J]. *Cell*, 1983, 34: 95-104.
- [9] 赵颖怡, 梁世中, 黄鲲, 等. 一种新型酿酒酵母附加型分泌表达载体的构建[J]. *微生物学报*, 2002, 42(4): 431-435.
- [10] 王冬梅. 应用酵母进行基因表达的研究进展[J]. *生物技术通报*, 1999, 34(7): 12-14.
- [11] BUSSINEAR C M, SHUSTER J A. Genetic stability for protein expression systems in yeast[J]. *Dev Bio Stand*, 1994, 83: 13-19.
- [12] 赵颖怡, 梁世中, 黄日波. 一种新的食品酵母表达系统——产朊假丝酵母[J]. *生物技术通讯*, 2002, 13(6): 457-458.
- [13] 张明生, 吴耕, 钟晓力, 等. 酵母表达体系及其在抗体工程中的应用[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(1): 15-18.
- [14] 刘文, 胡巍, 王洪海. 酵母表达基因工程产物特性分析[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(2): 74-76.
- [15] 郑敏, 张飞雄, 刘丽. 酵母表达系统表达外源基因的研究进展[J]. *首都师范大学学报*, 1999, 20(4): 73-78.
- [16] KLEIN R D, GU G, GODDARD A, *et al.* Selection for gene encoding secreted proteins and receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 7108-7113.
- [17] 卢文菊, 罗进贤, 张晓实, 等. 人血管抑制素在酿酒酵母中的分泌表达和活性鉴定[J]. *中国生物化学和分子生物学报*, 2002, 18(2): 156-160.
- [18] KERRY-WILLIAMS S M, GILBERT S C, EVANS L R, *et al.* Disruption of the *saccharomyces cerevisiae* YAP3 gene reduces the proteolytic degradation of secreted recombinant human albumin[J]. *Yeast*, 1998, 14: 161-169.
- [19] ALBERGHINA L L, PORRO D, MARTEGANI E. Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1991, 14(1): 82-92.
- [20] GEOFFREY P, CEEREGHINO L, CREGG J M. Applications of yeast in biotechnology: production and genetic analysis[J]. *Curr Opin in Biotechnology*, 1999, 10: 422-427.
- [21] IBBA M, KUHLA J, SMITH A, *et al.* Stable continuous constitutive expression of a heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* without selection pressure[J]. *Appl Microbiol Biochnol*, 1993, 39(4-5): 526-531.
- [22] LOPES T S, De WIJS I J, STEENHAUER S I, *et al.* Factor affecting the mitotic stability of high-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1996, 12: 467-477.
- [23] EMST J F. Improved secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of promoter substitution in alpha-factor fusions[J]. *DNA*, 1986, 5(6): 483-491.
- [24] 张平武, 李育阳. 新型酵母表达系统的研究[J]. *生物技术通讯*, 1991, 10(4): 306-309.
- [25] KJELDSEN T, BRANDT J, ANDERSEN A S, *et al.* A removable spacer peptide in an a-factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1996, 170: 107-112.
- [26] CRABE T, WEIR N, WALTON E F, *et al.* The secretion of active recombinant human gastric lipase by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Protein Expr Purif*, 1996, 7: 229-236.
- [27] SAKAI A, OZAWA F, HIGASHIZAKI T. Enhanced secretion of human nerve growth factor from *Saccharomyces cerevisiae* using an advanced delta-integration system[J]. *Biotechnology*, 1991, 9(12): 1382-1385.
- [28] SEKLER I, KOPITO R, CASEY I R. High level expression, partial purification, and functional reconstitution of the human AE1 anion exchanger in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Bio Chem*, 1995, 270: 21028-21034.
- [29] WALHOUT A J, VIDAL M A. Genetic strategy to eliminate self-activator baits prior to high-throughput yeast two-hybrid screens[J]. *Genome Res*, 1999, 9(11): 1128-1134.
- [30] SAMBROOK Joseph, RUSSELL David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1428-1431.
- [31] GAVIN Anne-Claude, BOCHE Markus, KRAUSE Roland, *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes[J]. *Nature*, 2002, 415(10): 141-147.