

# 酵母表面展示 T 载体构建及目的蛋白的表面展示

梁秀怡<sup>a</sup>, 梁志成<sup>b</sup>, 朱 筱<sup>a</sup>, 刘诗雨<sup>a</sup>, 张 智<sup>b</sup>, 田生礼<sup>a\*</sup>

(深圳大学 生命科学学院 a. 深圳市微生物基因工程重点实验室; b. 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 中国广东 深圳 518060)

**摘 要:** 构建一种能对 PCR 产物进行直接克隆并展示于酵母表面的新型 T 载体。根据酵母表面展示载体 pYD1 多克隆位点序列设计出利用两端带有 *Xcm* I 内切酶酶切位点的含有黄色荧光蛋白基因的 *Xcm* I 酶切盒, 通过 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点插入到 pYD1 载体上形成质粒 pYD-YFP, 并对其酶切鉴定和 DNA 测序分析, 再经 *Xcm* I 酶切后形成两端带有 dT 的表面展示 T 载体。利用 PCR 扩增两个含有荧光蛋白的融合蛋白 PCAD-CFP 和 PSR-DsRed 的基因并直接克隆到所构建的 T 载体中, 检测其表达功能。酶切鉴定和 DNA 测序结果显示 PCAD-CFP 和 PSR-DsRed 正确插入载体上, 分别转化至酿酒酵母 EBY100 中, 激光共聚焦显微镜下观察到相应的荧光的酵母, 表明克隆有融合蛋白基因片段的载体成功在酵母细胞中进行表面展示, 证明了所构建的酵母表面展示 T 载体具有直接克隆和表面展示目的蛋白的功能。

**关键词:** T 载体; 酵母表面展示; 真核表达; *Xcm* I 酶切盒

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2014)06-0477-06

## Construction of a Yeast Surface T-vector and Display of Interested Proteins on Yeast Cell Surface

LIANG Xiu-yi<sup>a</sup>, LIANG Zhi-cheng<sup>b</sup>, ZHU Xiao<sup>a</sup>, LIU Shi-yu<sup>a</sup>,  
ZHANG Zhi<sup>b</sup>, TIAN Sheng-li<sup>a\*</sup>

(a. Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering; b. Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China)

**Abstract:** We have constructed a T-vector to directly clone PCR product and display the protein expressed on the yeast surface. Based on the yeast surface display vector pYD1, a fragment of YFP was amplified by PCR with primers with *Xcm* I named the endonuclease digestive cassette. The fragment was digested and cloned between *Nhe* I and *Xho* I sites on the expression vector pYD1 generating recombinant plasmid of pYD-YFP which were identified by endonuclease digestion and DNA sequencing. The plasmid pYD-YFP was digested with *Xcm* I generating T-vector pYD1-T with dT overhang. The T vector pYD1-T with dT overhang was recollected after agarose gel electrophoresis. In order to check the T-vector's function, the genes of PCAD-CFP and PSR-DsRed were directly cloned into the T-vectors respectively and transformed into the EBY100 yeast competent cells and assayed by Confocal Laser Scanning Microscopy. The results showed that PCAD-CFP and PSR-DsRed were displayed on the surface of the *Saccharomyces cerevisiae* E-BY100 cells, it was concluded that the T-vector for yeast surface display we constructed was able to directly clone PCR product and display interested proteins on the yeast cell surface effectively.

**Key words:** T vector; yeast surface display; eukaryotic expression; *Xcm* I cassette

(*Life Science Research*, 2014, 18(6): 477-482)

收稿日期: 2014-06-20; 修回日期: 2014-07-20

基金项目: 深圳市科创委基金项目(JC201005280549A)

作者简介: 梁秀怡(1988-), 女, 广东深圳人, 硕士研究生, 从事基因表达与调控研究, E-mail: liangxiuyi32@foxmail.com; \* 通讯作者: 田生礼(1960-), 男, 辽宁东沟人, 深圳大学教授, 博士, 主要从事基因表达与调控研究, Tel: 0755-26534149; E-mail: sltian@szu.edu.cn.

酵母表达系统具有培养成本低廉、便于大规模培养和培养周期短等特性,同时又具有真核生物的蛋白翻译后修饰功能,近年来逐渐用于药用和食用蛋白的生产<sup>[1-3]</sup>。酵母表面展示技术(yeast surface display system)在20世纪90年代初开始兴起,是一种将外源蛋白质进行固定化表达的真核展示系统,广泛应用于蛋白质的相互作用、抗体研制、蛋白分子定向等领域,特别在生物乙醇生产过程中起到关键作用,包括淀粉酶、纤维素酶等酶蛋白均已进行表面展示<sup>[4,5]</sup>。a凝集素和 $\alpha$ 凝集素是锚定在细胞壁上的甘露糖蛋白,介导单倍体交配型(MATa)和(MAT $\alpha$ )的识别和粘附。最常见酵母表达系统为a凝集素展示系统和 $\alpha$ 凝集素展示系统,a凝集素由两个亚单位Aga1p和Aga2p组成,由于Aga1p亚基通过与细胞壁上的 $\beta$ 葡聚糖的共价连接而锚定在细胞壁,Aga2p和Aga1p两个亚基通过两对二硫键相连,因此a展示系统是将a凝集素的Aga2p亚基与目的蛋白进行融合,在信号肽的引导下实现酵母的表面展示<sup>[6-8]</sup>。 $\alpha$ 凝集素展示系统则将目的蛋白与 $\alpha$ 凝集素融合,从而将其展示于酵母细胞表面。其中酵母表面展示主要采用的宿主菌是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),已被FDA列为GRAS(Generally regarded as safe)原材料,酿酒酵母表面展示能够把目的蛋白与凝集素功能结构域融合,将目的蛋白表达并定位于酵母细胞膜的表面,不但易于纯化鉴定,并且酵母具有真核生物的翻译后修饰体系,能表达具有一定活性的真核生物的蛋白<sup>[9]</sup>。相比细胞内表达的酶,酵母表面展示可多次生产展示于细胞表面的蛋白,并且在廉价的培养基中培养可达到很高的细胞密度,适应工业生产需求,省去酶的纯化和固定化等繁琐步骤<sup>[1,10]</sup>。

构建酵母表面展示载体是蛋白质进行酵母表面展示的基础<sup>[11]</sup>,PCR产物克隆需耗费大量的时间与精力在表达载体的构建、质粒的提取和重组子的鉴定上,而利用T载体可对PCR产物进行快速

有效的克隆<sup>[12]</sup>,因此有必要构建一个可直接对PCR产物进行克隆和表达的酵母表面展示T载体,特别是进行大量的PCR产物克隆时,可以极大减少实验操作的步骤。

本文克服了常规构建表达载体操作繁琐的缺点,以酵母表面展示载体pYD1为基础,通过向载体pYD1插入含有黄色荧光蛋白基因的Xcm I酶切盒,再切除黄色荧光蛋白基因来构建酵母表面展示T载体,并利用荧光蛋白基因检测该表面展示载体的克隆和表达功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株和载体

克隆载体pMD-18T购自日本Takara公司;pDsRed1-N1、pEYFP-C1、pECFP-C1、pYD-1载体购自美国Invitrogen公司,大肠杆菌JM107和酿酒酵母EBY100由本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

Taq DNA聚合酶、T<sub>4</sub> DNA连接酶购于日本Takara公司;限制性核酸内切酶Nhe I、Nde I、Xho I、BamH I、Xcm I为美国NEB(北京)公司产品;所有PCR反应的引物(表1)及测序均在北京华大基因公司合成。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 Xcm I酶切盒的合成

以含有黄色荧光蛋白基因的质粒pEYFP-C1为模板,使用的引物pYDT1和pYDT2(表1),进行PCR扩增,扩增含有黄色荧光蛋白基因位点的Xcm I酶切盒,长度约760 bp,扩增程序为:预变性94℃,5 min;94℃ 30 s,55℃ 50 s,72℃ 10 min,进行30个循环,72℃延伸7 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收后,通过T<sub>4</sub> DNA连接酶连接至pMD-18T载体,重组载体命名为pMD-YFP,并送往华大基因公司进行序列测定,分析克隆基因序列组成及其阅读框架的正确性。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Sequences	Restriction enzyme site
pYDT1	5'-GCTAGCGGATCCACCAAAATTCTATGCTGAGCAAGGGCG-3'	Nhe I, BamH I, Xcm I
pYDT2	5'-CTCGAGCATATGACCACTATTACTATGCTTACTTGTACAGCTCG-3'	Xho I, Nde I, Xcm I
pSR-TP1	5'-ATGTATTCACGTTGTATCGC-3'	
pSR-DsRedP2	5'-CGTTCCTGGAGGAGCGCACCATGTCTGAATCCGAATCTCTTGAGGC-3'	
DsRedP3	5'-GGATCCCTACAGGAACAGGTGG-3'	BamH I
TCADP1	5'-ATGAAAGTACAAGCGGCGG-3'	
CAD-CFPP2	5'-GGCTGTGAGACCAGTAATCCTTTTGATATGCTGAGCAAGGGCG-3'	
CFPP3	5'-GGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'	BamH I

### 1.2.2 酵母表面展示 T 载体 pYD-T 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nhe* I 酶切 pMD-YFP 后进行电泳, 切胶回收切出的小片段, 连接到经由同样的限制性内切酶酶切 pYD1 质粒上, 获得的重组质粒命名为 pYD-YFP, 质粒及多克隆位点序列图谱见图 1。将 pYD-YFP 转入大肠杆菌 JM107 感受态细胞中, 涂布于含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素抗性的 LB 平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜后挑取单菌落提取质粒, 对酶切鉴定正确的质粒再进行 DNA 测序分析。将 DNA 测序正确的 pYD-YFP 转化至酵母 EBY100 感受态细胞, 铺于 SD/Trp<sup>-</sup>平板上培养, 挑取直径为 2~3 mm 的酵母 EBY100 单菌落于 10 mL 酵母 SD/Trp<sup>-</sup>液体培养基 (含 2% 乳糖) 中进行诱导表达, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 条件下培养 48~72 h。取诱导后的酵母菌液 300  $\mu\text{L}$ , 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 用 1 mL 无菌水洗涤并重悬菌体, 由于原载体 pYD-PYD1 是酿酒酵母表面展示载体。改造后的载体上插入带有 *YFP* 基因的酶切盒片段, *YFP* 蛋白通过锚定蛋白展示到酵母细胞壁上, 因此在 505 nm 激发光下通过激光共聚焦显微镜可直接观察到相应的荧光, 证明了载体 pYD-YFP 的正确性。质粒 pYD-YFP 经 *Xcm* I 酶切后, 回收载体部获得酵母表面展示 T 载体。

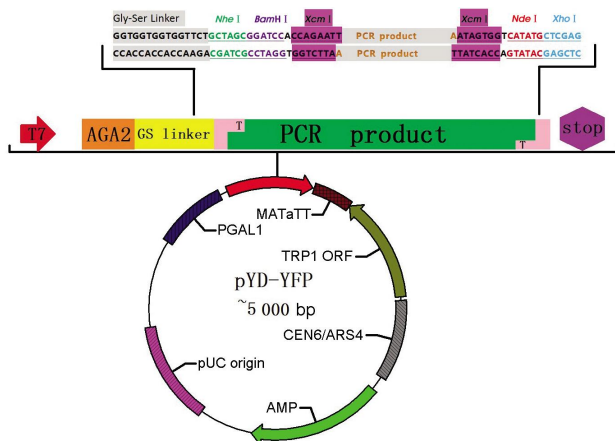


图 1 pYD-YFP 载体图谱及部分关键序列

Fig.1 Partial key sequences of T-vector pYD-YFP

### 1.2.3 酵母表面展示 T 载体 pYD-T 克隆目的基因

本文利用多头绒泡菌 (*Physarum polycephalum*) 的两个蛋白肉桂醇脱氢酶 PCAD (GenBank 登陆号: KF861979.1) 和 PSR 蛋白 (GenBank 登陆号: FJ917746) 对 pYD-T 的功能进行验证。使用引物 TCADP1、CAD-CFPP2 和 CFPP3 通过重叠 PCR 将 *PCAD* 与青色荧光蛋白 eCFP 的两个基因连接构成融合基因 *PCAD-CFP*。另外使用引物

pSR-TP1、pSR-DsRedP2 和 DsRedP3 通过重叠 PCR 将 *PSR* 和红色荧光蛋白 *DsRed* 两个基因连接构成融合基因 *PSR-DsRed*, 以上两个融合基因基因片段 3'端均引入一个 *Bam*H I 酶切位点。

将 pYD-T 载体用限制性内切酶 *Xcm* I 酶切处理, 经琼脂糖凝胶电泳后回收载体部分, 得到两端带有突出 T 的线性化 T 载体, 分别连接 *PCAD-CFP* 和 *PSR-DsRed*, 获得的重组载体分别命名为 pYD-PSR-DsRed 和 pYD-PCAD-CFP, 融合蛋白表面展示示意图见图 2。将连接好的重组载体转入大肠杆菌 JM107 感受态细胞中, 涂板 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。挑取长势良好的单菌落接种于 LB 液体培养基中培养, 提取质粒 DNA 进行酶切鉴定。

### 1.2.4 酵母表面展示 T 载体 pYD-T 表达功能验证

将 pYD-PSR-DsRed 和 pYD-PCAD-CFP 重组载体分别转化至酿酒酵母感受态细胞中, 操作过程参见文献<sup>[3]</sup>, 将菌液铺于 SD/Trp<sup>-</sup>培养板, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d, 通过菌液 PCR 筛选阳性转化子。将阳性转化子接种于酵母 SD/Trp<sup>-</sup>液体培养基 (含 2% 乳糖) 中, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 培养 48~72 h。取适量的菌液在激光共聚焦显微镜下观察拍照。

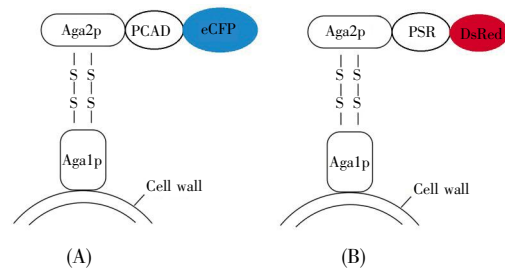


图 2 融合蛋白 PCAD-CFP 和 PSR-DsRed 表面展示示意图  
Fig.2 Schematic illustration of fusion protein PCAD-CFP and PSR-DsRed surface display

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母表面展示 T 载体 pYD-T 载体的构建

将 *Xcm* I 酶切盒片段克隆到 pMD-18T 载体中形成重组载体 pMD-YFP, 用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切鉴定, 结果见图 3 泳道 1、2、3, 酶切出的片段与 *Xcm* I 酶切盒长度相近, 约为 760 bp。 *Xcm* I 酶切盒片段通过 *Nhe* I 和 *Xho* I 位点插入酵母表面展示表达载体 pYD-1 中, 得到载体 pYD-YFP 重组, 酶切鉴定结果见图 3 泳道 4、5; 图 3 泳道 6 为重组载体 pYD-YFP 经过 *Xcm* I 酶切出 *YFP* 基因后, 回收载体部分获得酵母表面展示 T 载体 pYD-T。DNA 测序结果表明所构建的真核表达载体含有完整的黄色荧光蛋白位点及酶

切盒,证明 pYD-YFP 载体构建成功。pYD-YFP 质粒转化至酿酒酵母 EBY 100 后经 SD 诱导培养基诱导 72 h 后,在激光共聚焦显微镜下拍摄到的细胞表面展示的 YFP 蛋白,图 4 中均能清晰看到酵母表面展示呈现为绿光,这是因为带有黄色荧光蛋白基因的酵母在青光的激发下呈现两种光的合成光,即为绿色,部分酵母表面的绿色呈光圈状,这说明 *Xcm* I 酶切盒中黄色荧光蛋白 YFP 已经在酵母细胞膜上展示。

## 2.2 酵母表面展示 T 载体 pYD-T 克隆功能的鉴定

目标基因片段用 PCR 扩增方法在 5' 或 3' 端引入一个与 T 载体的 3' 或 5' 端所对应相同的限制性内切酶位点 (该限制性内切酶位点务必确保

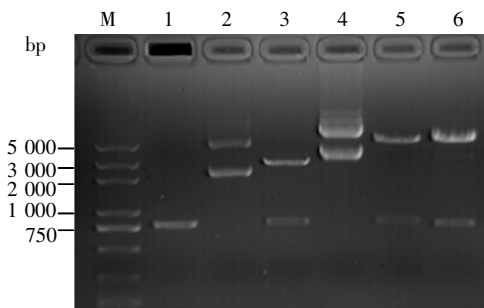


图 3 表面展示载体 pYD-YFP 酶切鉴定

M: 5 000 bp DNA Marker; 1: *Xcm* I 酶切盒; 2: pMD-YFP 质粒; 3: pMD-YFP 质粒 *Nhe* I + *Xho* I 双酶切; 4: pYD-YFP 质粒; 5: pYD-YFP 质粒 *Nhe* I + *Xho* I 双酶切; 6: pYD-YFP 质粒 *Xcm* I 酶切。

### Fig.3 Identification of pYD-YFP by endonuclease digestion

M: 5 000 bp DNA Marker; 1: *Xcm* I endonuclease digestive cassette; 2: Plasmid pMD-YFP; 3: Plasmid pMD-YFP digested by *Nhe* I + *Xho* I; 4: Plasmid pYD-YFP; 5: Plasmid pYD-YFP digested by *Nhe* I + *Xho* I; 6: pYD-YFP digested by *Xcm* I.

在 PCR 片段中或者在 T 载体有且仅有一个), 本文在 *PCAD-CFP* 和 *PSR-DsRed* 基因片段 3' 端引入一个 *Bam*H I 酶切位点,与载体 5' 端的 *Bam*H I 酶切位点相对应,连接目的基因的 PCR 产物与 T 载体构成重组载体,利用所设的限制性内切酶进行单酶切鉴定。本研究使用 *Bam*H I 进行单酶切,如果能切出与目标基因长度大小相近的片段,即可鉴定为正向连接,若没有切出相应大小的 DNA 片段,则是反向连接,因为实际上反向连接时应该切出约为 20 bp 左右的片段,由于片段太小电泳后无法直接观察到,图 5、6 显示 *Bam*H I 酶切后得到与重叠 PCR 产物大小相近的条带,表明 *CAD-CFP* 和 *PSR-DsRed* 均载体 pYD-T 正向连接, DNA 测序结果同样证明了重组载体 pYD-CAD-CFP 和 pYD-PSR-DsRed 构建正确。

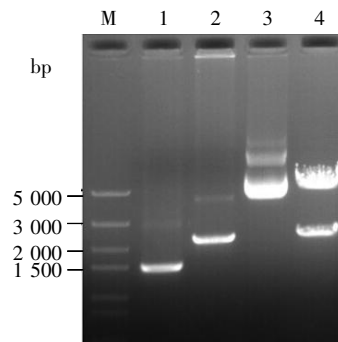


图 5 pYD-PSR-DsRed 酵母表面展示载体的克隆及酶切鉴定电泳图

M: 5 000 bp DNA Marker; 1: *PSR* 的 PCR 产物; 2: *PSR-DsRed* 重叠 PCR 产物; 3: 重组质粒 pYD-PSR-DsRed; 4: pYD-PSR-DsRed 质粒 *Bam*H I 单酶切。

### Fig.5 Identification of pYD-PSR-DsRed by endonuclease digestion

M: 5 000 bp DNA Marker; 1: *PSR* PCR products; 2: *PSR-DsRed* overlap PCR products; 3: plasmid pYD-PSR-DsRed; 4: plasmid pYD-PSR-DsRed digested by *Bam*H I.

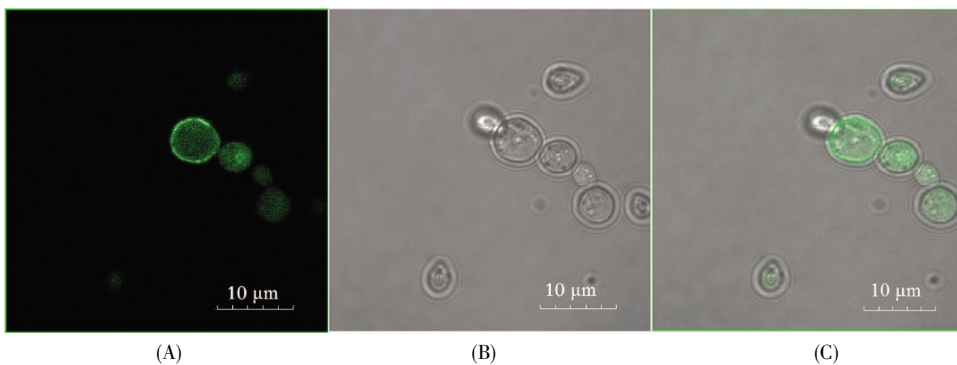


图 4 显微镜下酵母展示荧光蛋白 YFP 观测图

(A) 488 nm 激发光下酵母观察图; (B) 可见光条件下酵母观察图; (C) 可见光与激发光条件下酵母重叠观察图。

### Fig.4 Microscopic photographs of yeast displaying YFP under light and fluorescence

(A) The microphotographs were taken at 488 nm fluorescent excitation light; (B) The microphotographs were taken visible light; (C) Microphotographs under visible light and excitation conditions were overlapped.

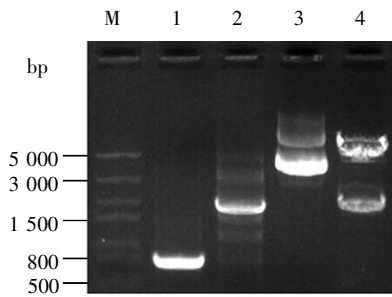


图 6 PYD-PCAD-CFP 酵母表面展示载体的克隆及酶切鉴定电泳图

M: 5 000 bp DNA Marker; 1: CFP 的 PCR 产物; 2: PCAD-CFP 重叠 PCR 产物; 3: 重组质粒 pYD-PCAD-CFP; 4: 重组质粒 pYD-PCAD-CFP *Bam*H I 单酶切。

**Fig.6 Identification of PYD-PCAD-CFP by endonuclease digestion**

M: 5 000 bp DNA Marker; 1: CFP PCR products; 2: PCAD-CFP overlap PCR products; 3: Plasmid pYD-PCAD-CFP; 4: Plasmid pYD-PCAD-CFP digested by *Bam*H I .

**2.3 酵母表面展示 T 载体 pYD-T 的展示功能验证**

将重组载体 pYD-CAD-CFP 和 pYD-PSR-DsRed 转化至酿酒酵母 EBY100 感受态细胞中,

挑取单菌落后接种至在 SD/Trp<sup>-</sup>液体培养基 (含 2%乳糖) 中, 30 °C 中震荡培养 3 d 后在激光共聚焦显微镜下的观察展示结果, 分别用 558 nm 和 405 nm 激发光检测, 可以看到酵母的表面发出明亮的红光、青光, 见图 7、8。结果显示目标蛋白主要分布在酵母细胞的表面, 形成明显的青色或红色光圈, 证明 CAD-CFP、PSR-DsRed 融合蛋白已经成功在酵母表面展示。

**3 讨论**

近 10 年来, 酵母表面工程技术在生物技术领域得到迅速发展, 酵母表面展示系统不仅能展示单个亚单位蛋白, 而且能展示异源寡聚体多亚单位蛋白, 在展示高等哺乳动物蛋白天然构象方面具有其独特的优越性<sup>[14-16]</sup>。T 载体广泛应用于 PCR 产物克隆, 目前商品化的 T 载体主要是克隆型 T 载体<sup>[17]</sup>, 只能用于基因的克隆与保存, 不能用于基因的表达<sup>[18]</sup>。若要进行目的基因的表达, 需另外将目的基因克隆至表达载体, 过程中涉及转化子的大量测序和鉴定操作<sup>[19,20]</sup>。本研究利用可变内切酶

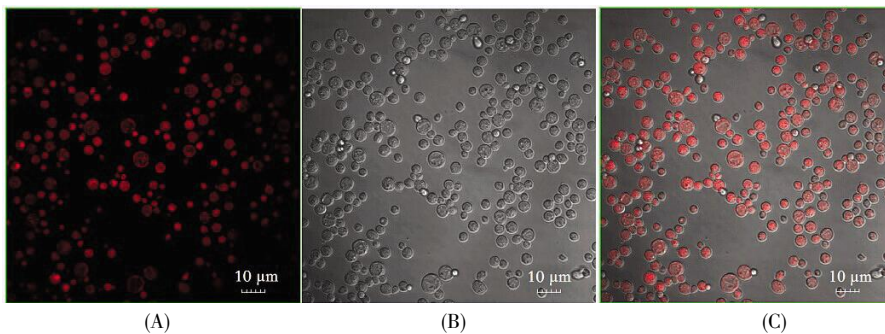


图 7 显微镜下酵母展示融合蛋白 PSR-DsRed 观测图

(A) 558 nm 激发光下酵母观察图; (B) 可见光条件下酵母观察图; (C) 可见光与激发光条件下酵母重叠观察图。

**Fig.7 Microscopic photographs of yeast displaying PSR-DsRed under light and fluorescence**

(A) The microphotographs were taken at 558 nm fluorescent excitation light; (B) The microphotographs were taken visible light; (C) Microphotographs under visible light and excitation conditions were overlapped.

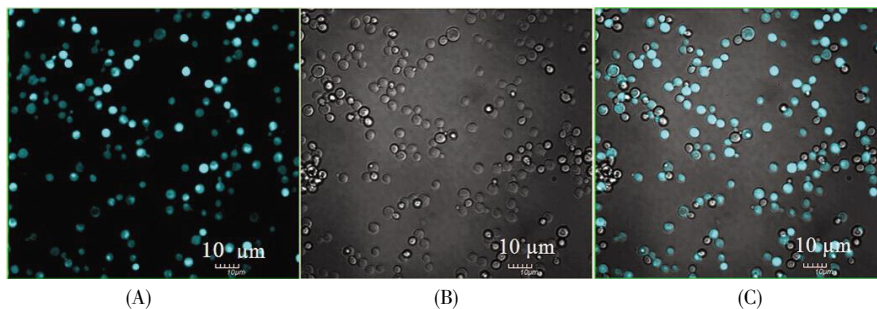


图 8 显微镜下酵母展示融合蛋白 PCAD-CFP 观测图

(A) 405 nm 激发光下酵母观察图; (B) 可见光条件下酵母观察图; (C) 可见光与激发光条件下酵母重叠观察图。

**Fig.8 Microscopic photographs of yeast displaying PCAD-CFP under light and fluorescence**

(A) The microphotographs were taken at 405 nm fluorescent excitation light; (B) The microphotographs were taken visible light; (C) Microphotographs under visible light and excitation conditions were overlapped.

*Xcm* I<sup>[21,22]</sup>, 识别的序列为 CCA (N5/N4) TGG, 将识别序列第 8 位设为 T, 酶切盒上包含两个反向的 *Xcm* I 酶切位点, 经 *Xcm* I 酶切后可产生 3' 带有一个突出 dT 的 T 载体。两个 *Xcm* I 位点之间包含黄色荧光蛋白基因, 目的在于通过转化测定菌体的荧光来检测 *Xcm* I 的酶切效率, 从而提高所制备 T 载体的质量。PCR 产物可以无需酶切、纯化, 减少筛选有效重组子的过程, 通过 TA 克隆, 直接连接到 pYD-T 载体构成重组载体, 无需另外将目的基因重组至表达载体, 直接进行蛋白在酿酒酵母表面展示(图 7、8), 节省宝贵的研究时间和经费, 通过克隆和表达功能的鉴定后证明此方法新颖可行。

目的基因在构建表达载体时, 一般通过双酶切法将目的基因克隆到表达载体, 因此需要考虑目的基因上是否含有载体多克隆位点的酶切识别位点。通过酶切位点插入到载体上的过程中应避免使用目的基因上已有的酶切识别位点。本文在研究融合蛋白 PCAD-CFP 和 PSR-DsRed 在酵母表面的展示过程中, 发现载体上的多克隆位点均出现目的基因上, 难以通过传统双酶切法克隆至表面展示载体 pYD1 上, 文中通过对 pYD1 载体进行改造后制备出 T 载体, 除了内切酶 *Xcm* I 外, 无需考虑载体与目的基因上的其他酶切位点, 重组的过程不需要考虑使用何种相应的限制性内切酶, 极大降低目的基因序列中含有与载体多克隆位点所用限制性内切酶冲突的可能。通过 TA 可以连接, 成功将目的基因克隆到载体 pYD-T 上, 一步构建表达载体。若使用高保真 Taq 酶扩增, PCR 产物不具有 dA 粘性末端, 可再使用 Taq 酶进行扩增, 使得 PCR 产物 3' 端带有 dA, 这样既可减少 PCR 过程中的错配率, 也可提高 PCR 产物与载体的连接效率。

本文所构建的酵母表面展示 T 载体具有操作简便, 快捷高效的特点, 使具有药用和工业应用价值的蛋白能够更简捷地进行酵母表面展示, 为促进更多蛋白在酵母细胞表面的展示和酶的固定化研究建立了表达平台。

#### 参考文献(References):

- [1] INABA C, HIGUCHI S, MORISAKA H, *et al.* Synthesis of functional dipeptide carnosine from nonprotected amino acids using carnosinase-displaying yeast cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6): 1895-1902.
- [2] SCHAFFRATH R, BREUNIG K D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2000, 30(3): 173-190.
- [3] 唐香山, 张学文. 酿酒酵母表达系统[J]. 生命科学研究(TANG Xiang-shan, ZHANG Xue-wen. *Saccharomyces cerevisiae* expression system[J]. Life Science Research), 2004, 8(4): 106-109.
- [4] GERA N, HUSSAIN M, RAO B M. Protein selection using yeast surface display[J]. Methods, 2013, 60(1): 15-26.
- [5] BODER E T, RAEESZADEH-SARMAZDEH M, PRICE J V. Engineering antibodies by yeast display[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012, 526(2): 99-106.
- [6] GAI S A, WITTRUP K D. Yeast surface display for protein engineering and characterization[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17(4): 467-473.
- [7] TILLOTSON B J, CHO Y K, SHUSTA E V. Cells and cell lysates: a direct approach for engineering antibodies against membrane proteins using yeast surface display[J]. Methods, 2013, 60(1): 27-37.
- [8] TANAKA T, YAMADA R, OGINO C, *et al.* Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(3): 577-591.
- [9] LEE H W, LEE S H, PARK K J, *et al.* Construction and characterization of a pseudo-immune human antibody library using yeast surface display[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 346(3): 896-903.
- [10] 杨非, 曹萌, 金怡, 等. 酿酒酵母细胞表面展示技术在燃料乙醇生产中的应用及研究进展[J]. 生物工程学报(YANG Fei, CAO Meng, JIN Yi, *et al.* Development and application of *Saccharomyces cerevisiae* cell-surface display for bioethanol production[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2012, 28(8): 901-911.
- [11] BULANI S I, MOLELEKI L, ALBERTYN J, *et al.* Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*[J]. AMB Express, 2012, 2(1): 27-35.
- [12] ARANISHI F, OKIMOTO T. Engineered *Xcm* I cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses[J]. Journal of Genetics, 2004, 83(1): 33-34.
- [13] AOKI W, YOSHINO Y, MORISAKA H, *et al.* High-throughput screening of improved protease inhibitors using a yeast cell surface display system and a yeast cell chip[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(1): 16-18.
- [14] SHIBASAKI S, MAEDA H, UEDA M. Molecular display technology using yeast-arming technology[J]. Analytical Sciences, 2009, 25(1): 41-49.
- [15] LEE G Y, JUNG J H, SEO D H, *et al.* Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter sp.* FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9179-9184.
- [16] KONDO A, UEDA M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(1): 28-40.
- [17] 林陈水, 武胜伟, 杨丹燕. T 载体研究进展[J]. 浙江工业大学学报(LIN Chen-shui, WU Sheng-wei, YANG Dan-yan. Development of T-vectors[J]. Journal of Zhejiang University of Technology), 2009, 37(6): 623-628.
- [18] 钟星, 翟超, 陈亮, 等. 构建定向 T 载体用于基因克隆和表达[J]. 生物工程学报(ZHONG Xin, ZHAI Chao, CHEN Liang, *et al.* Construction of directional T vector for gene cloning and expression[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2013, 29(4): 510-519.
- [19] ITO Y, SUZUKI M, HUSIMI Y. A T-extended vector using a green fluorescent protein as an indicator[J]. Gene, 2000, 245(1): 59-63.
- [20] LIU X, LIU X, ZHOU Y, *et al.* T vector bearing KillerRed protein marker for red/white cloning screening[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 405(2): 272-274.
- [21] PARK H K, ZENG C. Construction of an *Xcm* I-generated T vector bearing green fluorescent protein marker for direct cloning of PCR products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 360(1): 144-145.
- [22] ARANISHI F, OKIMOTO T. Engineered *Xcm* I cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses[J]. Journal of Genetics, 2004, 83(1): 33-34.