

源于 GAP 启动子的毕赤酵母组成型 表达系统的研究进展

曹东艳, 柳倩, 贺晓云, 梅晓宏*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 巴斯德毕赤酵母表达系统是目前应用非常广泛的外源基因真核表达系统。与源于醇氧化酶启动子(pAOX1)的诱导型表达系统相比, 源于三磷酸甘油醛脱氢酶启动子(pGAP)的毕赤酵母组成型表达系统在表达外源蛋白时不需使用甲醇, 表达时间短, 并且在高密度发酵时采用连续发酵模式, 因此成为近年研究的热点。本文分别从 pGAP 表达载体的构建、碳源、基因拷贝数、信号序列、高密度发酵等方面对该表达系统进行了综述, 以期为其在蛋白生产中的深入研究和应用提供参考。

关键词: 巴斯德毕赤酵母; 表达系统; GAP 启动子; 外源蛋白; 组成型表达

Progress in GAP promoter derived constitutive expression system of *Pichia pastoris*

CAO Dong-Yan, LIU Qian, HE Xiao-Yun, MEI Xiao-Hong*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: The *Pichia pastoris* expression system, which is one of the eukaryotic expression systems for heterologous gene expression, is widely used at present. Compared with the alcohol oxidase I promoter (pAOX1) derived inductive expression system, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter(pGAP) derived constitutive expression system of *Pichia pastoris* avoids the use of methanol, needs shorter period, and adopts continuous fermentation mode, thus it becomes a hot point in recent researches. The construction of pGAP expression vectors, carbon sources, gene copy number, signal sequence, and high-density cell culture of this expression system were summarized in this paper to provide references for further study and application of this expression system in protein expression fields.

KEY WORDS: *Pichia pastoris*; expression system; GAP promoter; heterologous proteins; constitutive expression

巴斯德毕赤酵母表达系统是20世纪80年代初期发展起来的一种新型的外源蛋白真核表达系统。由于它既具有原核表达系统操作简单、易于培养、生长速度快、表达量高、成本低等优点, 还具有原核表达系统所不具有的对外源蛋白翻译后修饰等特点, 如糖

基化、蛋白磷酸化等; 同时它还避免了酿酒酵母分泌效率差、表达菌株不够稳定、表达质粒易丢失等缺陷, 所以该表达系统很快成为目前应用最为广泛的外源基因表达系统之一^[1]。截止到2005年, 已有500多个基因在巴斯德毕赤酵母中成功表达^[2]。pAOX1 是一

*通讯作者: 梅晓宏, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术及转基因食品的安全性。E-mail: xhmei0719@hotmail.com

*Corresponding author: MEI Xiao-Hong, Associate Professor, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, No.17, Qinghua East Road, Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: xhmei0719@hotmail.com

种诱导型启动子^[3],其构成的毕赤酵母诱导型表达系统只有以甲醇作为唯一碳源时,才能表达和分泌外源蛋白^[4]。但是甲醇是一种有毒的物质,并且易燃、易爆,在大规模生产过程中很不安全。另外,在高密度发酵过程中,把碳源从甘油更换到甲醇也很不方便。最近十几年来,科学家们一直在寻找新的组成型启动子来替代 pAOX1。1997年,Waterham等^[5]首次分离了 pGAP。自此以后,揭开了用组成型表达系统来表达外源蛋白的新篇章。pGAP 衍生的巴斯德毕赤酵母组成型表达系统不需要把碳源从甘油更换到甲醇,因此避免了储藏和运输甲醇的花费和危害,更适合大规模生产外源蛋白。除此之外,该表达系统相对于诱导型表达系统大大缩短了发酵周期,提高了生产率。本文主要从 pGAP 表达载体的构建、碳源、基因拷贝数、信号序列、高密度发酵等方面综述了 pGAP 组成型表达系统近年来的研究进展,以期为该表达系统的进一步发展提供参考。

1 pGAP 表达载体的构建

1997年,Waterham等^[5]首次分离了 GAP 基因和 pGAP,并用 pGAP 置换了表达载体 pHIL-A1 中的 pAOX1 构建了组成型表达载体 pHWO10。为了检验 pGAP 的功能,Waterham 等把 β -半乳糖苷酶作为报告基因插入到 pHWO10 的多克隆位点上,并整合到毕赤酵母中,成功表达了 β -半乳糖苷酶。Sears 等^[6]也报道了 pGAP 表达载体的构建,他们以 pUC19 为原始载体,利用酶切的方法从载体 pHWO10 上得到 pGAP 基因片段,然后亚克隆到载体 pIB1 上得到 pIB2,并以 β -葡萄糖醛酸酶为报告基因插入到 pIB2,经转化在毕赤酵母中成功组成型的表达了 β -葡萄糖醛酸酶。张平涛^[7]在毕赤酵母中组成型表达了羧肽酶 B(CPB),他是用质粒 pIB2 为模板扩增了 pGAP 基因片段,并以其取代了诱导型质粒 pPIC9K-proCPB 上的 pAOX1 构建了组成型表达质粒 pGAP9K-proCPB。

另外,美国 Invitrogen 公司的 pGAPZ 系列的组成型表达载体,包括胞内表达载体(pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C)和胞外表达载体(pGAPZ α A, pGAPZ α B and pGAPZ α C),已经上市,并被广泛应用。例如,Tang 等^[8]把植酸酶基因连接到胞外表达载体 pGAPZ α 上,利用生物柴油生产中的粗甘油作为

唯一碳源在毕赤酵母中组成型分泌表达了植酸酶。Delroisse 等^[9]把羧酸酯酶基因分别插入到胞内表达载体 pGAPZ B 和胞外表达载体 pGAPZ α A 上,转化到巴斯德毕赤酵母后,成功表达了羧酸酯酶。但是根据 Invitrogen 公司的操作手册,这些组成型表达载体只能用电转化的方法整合到毕赤酵母基因组中。然而,用 pGAP 替代毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上的 pAOX1 构建的表达载体 pGAP9K,不仅可以用电转化的方法,而且可以用原生质体转化的方法整合到毕赤酵母基因组中^[10]。

2 毕赤酵母 pGAP 表达系统的碳源

毕赤酵母表达系统中的大部分启动子在表达外源蛋白时都受到碳源的控制,尤其是诱导型启动子,需要特定的碳源。如 pAOX1,只有以甲醇作为唯一碳源时,才能诱导外源蛋白的表达和分泌^[4]。但是,补加混合碳源也可提高外源蛋白的表达。Jungo 等^[11]发现用山梨醇(57%)和甲醇(43%)混合流加代替甲醇作为单一碳源流加,可以使抗生物素蛋白的表达水平提高 1.3 倍。Xie 等^[12]用不同的碳源与甲醇混合流加来表达血管抑素,结果发现乳酸与甲醇混合流加时表达量最高(191 mg/L),其次为山梨醇与甲醇混合流加(141 mg/L),甘油与甲醇混合流加时表达量为 108 mg/L,而乳酸盐与甲醇混合流加时表达量最低(52 mg/L)。

与诱导型启动子相比,组成型启动子可以利用更多的碳源在毕赤酵母中表达外源蛋白。已报道,pGAP 表达系统可以利用葡萄糖、甘油、油酸及甲醇作为唯一的碳源^[5]。尽管哪一个是最好的碳源存在争议,但已有研究表明,当以甲醇作为唯一碳源时,外源蛋白的表达量最低^[5,13]。虽然葡萄糖和甘油常被用作毕赤酵母 pGAP 表达系统的碳源,但通常在摇瓶水平时用葡萄糖^[14-16],而在高密度发酵水平用甘油^[17,18]作为唯一碳源。

pAOX1 诱导型表达系统在重组毕赤酵母生长阶段一般用甘油作为碳源,而在诱导阶段只有把非甲醇碳源更换为甲醇才能表达和分泌目的蛋白。然而,pGAP 组成型表达系统可以用非甲醇碳源作为唯一碳源,同时进行细胞生长和目的蛋白表达,从而避免了储藏和运输甲醇的花费和危害,同时也简化了操作过程。

3 毕赤酵母 pGAP 表达系统的基因拷贝数

外源基因的拷贝数是影响其能否在 *Pichia pastoris* 中高效表达的一个重要因素。有研究表明含单拷贝外源基因表达框的宿主菌有时足以获得最佳产量,例如含单拷贝乙肝表面抗原基因的表达株可获得 0.4 g/L 的产量^[19],但是在大多数情况下,蛋白表达水平与毕赤酵母基因组中的基因拷贝数成正相关,基因拷贝数越多,蛋白表达水平越高^[20]。

对于 pGAP 表达系统, Vassileva 等^[21]利用 Zeocin 筛选了具有不同基因拷贝数的转化株,结果表明基因剂量与乙肝表面抗原的表达水平直接相关,基因拷贝数为 4 的转化株的表达量约是单拷贝转化株的 4 倍。而 Hohenblum 等^[14]发现基因拷贝数不影响胰蛋白酶原在毕赤酵母 pGAP 表达系统中的表达量。但是更多的数据表明,基因拷贝数越多,蛋白表达量越高。Daly 等^[22]发现,基因拷贝数为 8 的转化株的乙肝表面抗原的表达量约是单拷贝转化株的 11.5 倍。罗会颖等^[23]用高拷贝菌株在毕赤酵母中生产植酸酶,其表达量是单拷贝菌株的 1.6 倍。

目前筛选多拷贝转化子大多采用抗生素的方法,利用基因剂量效应,分别依靠 G418 或 zeocin 的抗性水平来快速筛选出高拷贝的整合转化子,通过 Southern blot 或 real-time PCR 来分析外源基因拷贝数^[24]。不过个别情况下拷贝数增加对产量也会产生负效应^[25],原因可能在于 mRNA 翻译、蛋白折叠效率的限制,而对于分泌效率低的蛋白,过高表达会对分泌途径产生负反馈抑制。因此,高表达菌株的筛选应以表达的蛋白量为唯一标准。

4 毕赤酵母 pGAP 表达系统的信号序列

毕赤酵母表达外源蛋白有胞内和分泌两种方式。由于毕赤酵母分泌的自身蛋白很少,而分泌的外源蛋白较多,因此非常有利于外源蛋白的纯化,故分泌表达为优先选择的方式。可供毕赤酵母选择的信号肽分为两类:即外源蛋白自身的信号肽和来源于酵母的信号肽。巴斯德毕赤酵母 pAOX1 表达系统通常用酿酒酵母的 α -因子信号序列作为信号肽来引导外源蛋白的分泌。Zhou 等^[26]用含有 α -因子分泌信号的 pPICZ α B 载体在毕赤酵母中胞外表达了登革热病毒全长的非结构糖蛋白 NS1。Yu 等^[27]用含有 α -因子分泌信号的 pPIC9K 载体分泌表达了内切几丁质酶,表

达量为 365 mg/L。

对于 pGAP 表达系统,虽然酿酒酵母的 α -因子信号序列是否适合引导外源蛋白的分泌存在争议,但是 α -因子信号序列可引导大部分蛋白的分泌表达。Zhang 等^[13]把人血管抑素基因插入到 pGAP9 K 中的 α -因子信号序列的下游,并转化到酵母 GS115 中,其分泌量达到了 176 mg/L。Wang 等^[28]指出在毕赤酵母中利用猪乳铁蛋白自身的分泌信号和 α -因子信号序列都能促进猪乳铁蛋白的分泌,但是利用 α -因子信号序列的分泌表达量更高。然而, Olezdzka 等^[29]报道说热稳定性蛋白 aqualysin I 利用 α -因子信号序列的分泌表达量低于其自身分泌信号的表达量。而 Ding 等^[30]通过比较毕赤酵母利用卵黄蛋白原自身的分泌信号和 α -因子信号序列分泌卵黄蛋白原的分泌能力,却发现这两个分泌信号都不能促进卵黄蛋白原的分泌。

各种信号肽在不同情况下使用的效果大不相同。不适合的信号肽可致信号肽加工不完全,或者蛋白分泌水平低,甚至不能分泌,所以在分泌表达外源蛋白时应尝试不同的信号肽,以期达到外源蛋白的最高表达。

5 毕赤酵母 pGAP 表达系统的高密度发酵

高密度发酵就是利用发酵罐来培养重组菌,这样可以提高生物量,生产更多的目的蛋白。利用发酵罐来表达外源蛋白一般较摇瓶培养表达量更高,这是因为在发酵罐中溶氧水平、通气量、pH 值、搅拌速率、营养补给等方面更容易得到控制。巴斯德毕赤酵母是好氧型微生物,适合扩大培养,在发酵罐中可以生长到很高的细胞密度(40%~50% w/v),并可在基础培养基中分泌重组蛋白^[31]。巴斯德毕赤酵母诱导型表达系统通常采用分批发酵模式,先使细胞达到一定的生物量,再用甲醇进行诱导^[32]。而 pGAP 衍生的巴斯德毕赤酵母组成型表达系统通常采用连续发酵模式,即在含有葡萄糖或甘油的培养基中,同时进行生物量增加和蛋白生产,这就避免了使用甲醇及更换碳源,进而消除了储藏和运输大量体积甲醇的成本和危害。

Zhao 等^[33]通过优化小试(5 L)和中试(800 L)的发酵条件,利用高密度发酵在毕赤酵母中组成型表达了假丝酵母脂肪酶。小试时采用指数流加补料和 pH

恒定的策略,而在中试时采用了两步发酵策略,即在48 h后微调培养温度和pH,这样可以使得细胞生长和蛋白表达之间达到平衡。这种有效、方便的策略可以为工业化生产脂肪酶提供技术支持。Khasa等^[34]在2 L的发酵罐中利用pGAP衍生的巴斯德毕赤酵母表达系统组成型表达了人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,并发现产物体积浓度在最大培养基浓度(4×)和稀释速率0.2 h⁻¹时最高,为82 mg/L,是最低培养基浓度(1×)和稀释速率0.025 h⁻¹的4倍,这表明产物表达水平与稀释速率密切相关。Goodrick等^[35]利用高密度发酵组成型表达了人几丁质酶,发现采用分批发酵策略表达时酶容易降解,而用连续发酵策略表达时没有观察到酶的降解。这说明pGAP组成型表达系统更适合采用连续发酵策略来大规模生产目的产物。

6 结 论

通过上面的探讨可以明显发现pGAP毕赤酵母表达系统是一种重要的组成型表达外源蛋白的系统。与pAOX1毕赤酵母表达系统相比,这个表达系统可以在细胞生长的同时表达对于细胞没有毒的外源蛋白,表达所需周期短,可显著提高生产效率。并且它在发酵过程中还不需要更换非甲醇碳源,从而避免了储藏和运输大量甲醇的成本和危险。另外,GAP启动子衍生的巴斯德毕赤酵母组成型表达系统可以采用连续发酵的模式,避免了pAOX1诱导型表达系统分批发酵的不便,更适合大规模生产外源蛋白。

尽管如此,源于pGAP的毕赤酵母组成型表达系统也存在着一些问题,如对于某些蛋白的分泌并不能达到理想的效果,蛋白产物降解,只能表达对细胞没有毒害的外源蛋白等,这都在一定程度上限制了毕赤酵母组成型表达系统的应用。但是我们相信,随着发酵工艺的不断完善和对巴斯德毕赤酵母组成型表达系统的深入研究,源于pGAP的巴斯德毕赤酵母组成型表达系统必将不负众望,展现更美好的未来。

参考文献

- [1] 罗竟红,游自立. 巴斯德毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007, 3: 75-79.
Luo JH, You ZL. Study on expression of heterologous gene in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Bull, 2007, 3: 75-79.
- [2] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270.
- [3] Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, et al. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris* [J]. Mol Cell Biol, 1985, 5(5): 1111-1121.
- [4] Porro D, Sauer M, Branduardi P, et al. Recombinant protein production in yeast [J]. Mol Biotechnol, 2005, 31(3): 245-259.
- [5] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter [J]. Gene, 1997, 186: 37-44.
- [6] Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1998, 14: 783-790.
- [7] 张平涛. 鼠羧肽酶原B和蛇毒金属蛋白酶Alfimeprase两种蛋白在毕赤酵母中表达研究[D]. 厦门大学, 2008.
Zhang PT. Expression of proCarboxypeptidase B and a Snake Venom Metalloproteinase Alfimeprase in *Pichia pastoris* [D]. Xiamen University, 2008.
- [8] Tang SQ, Boehme L, Lam H, et al. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source [J]. Biochem Eng J, 2009, 43(2): 157-162.
- [9] Delroisse JM, Dannau M, Gilsoul JJ, et al. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2005, 42: 286-294.
- [10] Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, et al. Constitutive expression of human angiotensin in *Pichia pastoris* using the GAP promoter [J]. Acta Genetica Sin, 2004, 31(6): 552-557.
- [11] Jungo C, Schenk J, Pasquier M, et al. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris* [J]. J Biotechnol, 2007, 131(1): 57-66.
- [12] Xie JL, Zhou QW, Du P, et al. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiotensin production [J]. Enzyme Microb Technol, 2005, 36: 210-216.
- [13] Zhang AL, Zhang TY, Luo JX, et al. Constitutive expression of human angiotensin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2007, 34: 117-122.
- [14] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 85: 367-375.
- [15] Roman K, Christoph G, Christian P, et al. Constitutive expression of *Botrytis aclada* laccase in *Pichia pastoris* [J]. Bioengineered, 2012, 3(4): 232-235.
- [16] Jiang XP, Chen P, Yin ML, et al. Constitutive expression, purification and characterization of pectin methylase from *Asper-*

- gillus niger* in *Pichia pastoris* for potential application in the fruit juice industry [J]. *J Sci Food Agr*, 2013, 93: 375–381.
- [17] Liu ZW, Yin HX, Yi XP, *et al.* Constitutive expression of barley α -amylase in *Pichia pastoris* by high-density cell culture [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 5805–5810.
- [18] Menéndez C, Martínez D, Trujillo LE, *et al.* Constitutive high-level expression of a codon-optimized β -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 1201–1212.
- [19] Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, *et al.* High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylophilic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology*, 1987, 5: 479–485.
- [20] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, *et al.* Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression [J]. *Nat Biotechnol*, 1994, 12(2): 181–184.
- [21] Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, *et al.* Expression of hepatitis B surface antigen in the methylophilic yeast *P. pastoris* using the GAP promoter [J]. *J Biotechnol*, 2001, 88: 21–35.
- [22] Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119–138.
- [23] 罗会颖, 黄火清, 柏映国, 等. 增加植酸酶基因 appA-m 的拷贝提高其在巴斯德毕赤酵母的表达量[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 528–533.
- Luo HY, Huang HQ, Bai YG, *et al.* (2006) Improving phytase expression by increasing the gene copy number of appA-m in *Pichia pastoris* [J]. *Chin J Biotechnol*, 2006, 22(4): 528–533.
- [24] 娄瑞娟, 罗利龙, 张霞, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统的研究进展和前景展望[J]. *生物学杂志*, 2010, 27(5): 73–76.
- Lou RJ, Luo LL, Zhang X. Research progress and prospects on *Pichia pastoris* [J]. *J Biol*, 2010, 27(5): 73–76.
- [25] Higgins DR, Cregg JM. Introduction to *Pichia pastoris* [M]. *Pichia Protocols*: Humana Press, 1998.
- [26] Zhou JM, Tang YX, Fang DY, *et al.* Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris* [J]. *Virus Genes*, 2006, 33(1): 27–32.
- [27] Yu P, Tang YP. Construction of the highly secreted endochitinase *Pichia pastoris* strain and the optimization of chitin-degrading conditions [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(1): 41–45.
- [28] Wang SH, Yang TS, Lin SM, *et al.* Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2002, 25(1): 41–49.
- [29] Olezdzka G, Dazbrowski S, Kur J. High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 29: 223–229.
- [30] Ding JL, Lim EH, Li HF, *et al.* Expression of recombinant vitellogenin in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85: 330–339.
- [31] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylophilic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1997, 190: 55–62.
- [32] Li X, He XY, Li ZL, *et al.* Combined strategies for improving the production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* [J]. *BioResources*, 2013, 8(2): 2867–2880.
- [33] Zhao W, Wang J, Deng R, *et al.* Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(3): 189–195.
- [34] Khasa YP, Khushoo A, Srivastava L, *et al.* Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(12): 1903–1908.
- [35] Goodrick JC, Xu M, Finnegan R, *et al.* High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74: 492–497.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



曹东艳, 硕士研究生, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: caody2012@126.com



梅晓宏, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术及转基因食品的安全性。
E-mail: xhmei0719@hotmail.com