

# $\alpha$ -1,6-甘露糖转移酶基因敲除的毕赤酵母菌株构建及其用于融合蛋白 HSA/GM-CSF 表达的研究

## A *Pichia pastoris* with $\alpha$ -1,6-mannosyltransferases Deletion and its Use in Expression of HSA/GM-CSF Chimera

王越<sup>1,2</sup> 巩新<sup>1</sup> 唱韶红<sup>1</sup> 刘波<sup>1</sup> 宋森<sup>1,2</sup>, 黄海华<sup>2</sup> 吴军<sup>1\*</sup>

WANG Yue<sup>1,2</sup>, GONG Xin<sup>1</sup>, CHANG Shao-Hong<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>, SONG Miao<sup>1,2</sup>, HUANG Hai-Hua<sup>2</sup> and WU Jun<sup>1\*</sup>

1 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 沈阳药科大学, 沈阳 110016

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Shenyang Pharmaceutical University, shenyang 110016, China

**摘要** 酵母对蛋白的糖基化修饰过程不同于哺乳动物,其特点为产生高甘露糖型糖基且易发生过度糖基化。本研究通过两步基因重组敲除目标基因的方法成功敲除了毕赤酵母中的  $\alpha$ -1,6-甘露糖转移酶(*och1p*)基因,获得了 *och1* 敲除的菌株。以此为基础,构建了高效表达人血清白蛋白与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子融合蛋白(HSA/GM-CSF)的工程酵母,与野生型毕赤酵母表达的过度糖基化 HSA/GM-CSF 不同,*och1* 敲除菌表达的该融合蛋白糖基化程度明显降低,这为该融合蛋白的开发提供了重要基础。*och1* 敲除菌株的构建不仅提供了一个对糖蛋白进行低糖基化修饰的毕赤酵母表达系统,而且为进一步的酵母糖基工程改造提供了基础。

**关键词**  $\alpha$ -1,6-甘露糖转移酶,基因敲除,N-糖基化,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,人血清白蛋白,毕赤酵母

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0907-08

**Abstract** Yeast is a widely used host for recombinant protein expression. However, glycoproteins derived from yeast contain N-glycan of high mannose type and are usually hyperglycosylated.  $\alpha$ -1,6-mannosyltransferases gene (*och1*) encodes the enzyme that initiates the first step of out-chain elongation of high mannose type N-glycan in yeast, which is different from that in human. So, a high efficient method to knockout target gene by two-step recombination was established and was used to delete *och1*. In the first recombinant, a plasmid with *och1*:ADE1 and *ura3* gene was linearized in the downstream of *och1* and inserted to the *och1* site of *P. pastoris* genome, where the upstream and downstream of *och1* were duplicated. In the second recombinant, the duplicated fragments of *och1* were exchanged and the *och1* deletion strains were selected on the plates containing 5-FOA, but no adenine. Then the *och1* deletion strain was applied to express an human serum albumin (HSA) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) chimera. Different with the hyperglycosylated HSA/GM-CSF chimera expressed in wild type *P. pastoris*, the chimera expressed in the *och1* deletion strain, contained smaller N-glycan. The results suggested that the *och1*

mutant yeast may be more suitable for production of recombinant glycoproteins. And the *och1* deletion strain could be used for further re-engineering to produce complex human glycoproteins.

**Key words**  $\alpha$ -1,6-mannosyltransferases, gene knockout, *N*-glycosylation, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, human serum albumin, *Pichia pastoris*

糖蛋白是蛋白质和糖类的共价复合物,其中的糖基少则一个,多则数百个。糖蛋白中糖基和蛋白质的连接方式可分为两大类,即 *O*-连接和 *N*-连接。糖蛋白的糖基与蛋白功能及蛋白稳定性有密切关系<sup>[1]</sup>。多数有临床应用价值的蛋白(如抗体、疫苗、细胞因子、酶等)都是糖蛋白。而目前这些糖蛋白重组产品生产主要是基于培养成本高、表达水平低的哺乳动物细胞。

酵母细胞生产重组蛋白药物已日益受到人们的青睐,巴斯德毕赤酵母就是其中一个重要的代表。它属于甲基营养型酵母,作为第二代酵母表达系统的代表,它具有像原核细胞系统生长速度快、便于基因操作和可工业化大规模培养等优点,同时又具有真核细胞大部分的翻译后加工修饰功能,因而广泛用于各种蛋白的表达<sup>[2]</sup>。但是要将毕赤酵母表达系统用于大部分重组糖蛋白药物的生产还存在一些问题,其中最关键的是毕赤酵母对蛋白的过度糖基化修饰和产生不同于哺乳动物细胞的高甘露糖型糖基<sup>[3]</sup>。对一些蛋白过度的糖基化修饰会造成产物的分子量不均一以及一些活性位点的遮蔽;而高甘露糖型糖基使得糖蛋白在人体中容易被清除、半衰期变短、免疫原性提高<sup>[4]</sup>。这些缺点都限制了毕赤酵母在大部分糖蛋白类药物生产方面的应用。

酵母和哺乳动物具有相同的 *N*-糖基化起始步骤及内质网中的修饰加工过程,糖蛋白在内质网腔的 *N*-糖基化过程与翻译同步,*N*-糖基化的共同前体寡糖  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  在合成新生肽链的同时被连接到肽链  $\text{Asn-X-Thr/Ser}$ (*X* 为除 *Pro* 外的任意氨基酸)序列中的  $\text{Asn}$  残基上,在葡萄糖苷酶 I 和 II 等糖苷酶的作用下蛋白的糖基最终被加工成具有  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  结构的糖基后转运入高尔基体。然而,在高尔基体内的修饰加工过程酵母和哺乳动物则有很大不同,在哺乳动物高尔基体内,蛋白的糖基在一系列甘露糖苷酶和其他糖基转移酶的作用下逐步合成具有  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  结构的高甘露糖型、杂合型和复杂型糖基;在毕赤酵母高尔基体中,蛋白的糖基在  $\alpha$ -1,6-甘露糖转移酶(*Och1p*)的作用下接受一个  $\alpha$ -1,6-甘露糖,然后在各种甘露糖转移酶的作用

下继续加上甘露糖,有些蛋白的糖基可以被加至数十至上百个甘露糖,产生过度糖基化<sup>[5]</sup>。由此可见,*Och1p* 是酵母糖基合成区别于哺乳动物的第一个关键酶,它的存在是导致高甘露糖结构生成的关键,因此对该酶的基因敲除有望阻断毕赤酵母对糖蛋白的过度且不均一的甘露糖化修饰。而且,*och1* 敲除后的菌株还可以作为毕赤酵母糖基人源化改造的起始菌株,通过在该工程菌高尔基体内表达各种甘露糖苷酶和糖基转移酶,最终可望获得具有与哺乳动物类似的可表达复杂型糖基糖蛋白的工程酵母<sup>[6-8]</sup>。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, *GM-CSF*)是一种调节造血细胞功能的重要细胞因子,目前已广泛应用于临床,它可以刺激造血细胞增殖并分化为粒细胞、单核-巨噬细胞和嗜酸粒细胞,对成熟的粒细胞、巨噬细胞有延长其生存期、促进其吞噬功能和活性物质释放的作用。因此对治疗癌症放疗、骨髓移植、AIDS 等多种原因引起的白细胞减少症、提高患者抗感染能力有显著疗效。但目前临床应用的 *GM-CSF* 体内半衰期短,严重影响了其药效的发挥。为了获得长效的 *GM-CSF*,国内外许多学者做了有益的探索<sup>[9,10]</sup>,其中与人血清白蛋白(*human serum albumin*, *HSA*)融合是一种有效延长多肽类药物体内半衰期的方法,一些与 *HSA* 融合的蛋白药物体内半衰期可以延长数 10 倍<sup>[11]</sup>。为了获得长效的 *GM-CSF*,我们构建了 *HSA* 与 *GM-CSF* 的融合蛋白 *HSA-GM-CSF*,但该融合蛋白在野生型毕赤酵母中表达时与 *GM-CSF* 相似,也会产生过度且不均一的糖基化修饰<sup>[12]</sup>,这严重影响了该药物的研制。

为了改善毕赤酵母对蛋白的糖基化修饰,解决 *HSA/GM-CSF* 融合蛋白过度糖基化的问题,本研究对毕赤酵母 *och1* 基因进行了敲除,并考察了 *och1* 基因的敲除对蛋白糖基化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 *pYES2* 载体, *pHIL-D2* 毕赤酵母表达载体, *Pichia pastoris* GS115 均购自 Invitrogen 公司, *coli* DH5 为本室保存, *P. pastoris* JCG308(*ura3* *cn*)

*ade1*, *arg4*, *his4*) 由 Cregg 惠赠<sup>[13]</sup>。

**1.1.2 培养基和试剂** 酵母抽提物、蛋白胨为 Oxoid 公司产品,无氨基酸酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acids, YNB)为 Difco 公司产品,5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)购自上海力明工贸有限公司,所用限制性内切酶、T4 连接酶和去磷酸化酶(CIAP)均购自宝生物工程有限公司,兔抗人 HSA 抗体购自 Clontech 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体,购自华美生物过程公司,ECL 免疫印迹检测试剂盒,购自 Amersham Biosciences 公司,细胞培养基 RPMI1640 购自 GIBCO 公司,胎牛血清为 Hyclone 公司产品,特尔立(GM-CSF 参考品,75 $\mu$ g/瓶)购自厦门特宝生物工程股份有限公司。Bradford 蛋白定量试剂盒购自天根公司。

## 1.2 敲除质粒的构建

**1.2.1 质粒 pGE1201 的构建**:以质粒 pYES2 为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 反应,将产物回收纯化后用限制性内切酶 *Bgl* I 消化后进行连接反应,酶切产物自连生成质粒 pGE1201,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  用含氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆。引物序列(下划线标注为限制性酶切位点)分别为:  
P1 5'-atagatctagaacatgtgagcaaaaggc-3';  
P2 5'-acagatctggcccgataggccatccggggcgcggccggtaccctagctttcaattcaattcatca-3'。

**1.2.2 *och1* 基因的同源臂及酵母选择性标记基因的克隆**:根据 GenBank (E12456)中报道的毕赤酵母 *och1* 基因序列设计两对寡核苷酸引物 P3、P4 和 P5、P6,以 JC308 菌株基因组为模板,利用 PCR 分别克隆 *och1* 基因两侧各为 900bp 左右的同源臂序列,两侧同源臂间缺失 1000bp 左右的 *och1* 阅读框序列,引物序列分别为:

P3 5'-acgcggccgagatcctaagaggccaaggaattggagctgct-3';  
P4 5'-agggtacctgggaagagatgtctttgtgcac-3';  
P5 5'-acggatccccggaaaaccgagagaactct-3';  
P6 5'-acgcggccgcagagcgatagagaatgttcagg-3'。

根据 GenBank (AF321098)中报道的毕赤酵母 URA3(urotidine-5'-phosphatodecarboxylase)基因设计寡核苷酸引物 pURA3-5 和 pURA3-3,并在两端加上 *Kpn* I 和 *Pst* I 酶切位点,以 JC308 菌株基因组为模板,PCR 扩增 2.2kb 左右的片段。引物序列分别为:  
pURA3-5 5'-aaccaactgcagtgaggagataaccacctttgac-3';  
pURA3-3 5'-ttcggtagcttgcgtactccttgagtctg-3'。

根据 Genbank (NC\_001133)中报道的酿酒酵母 ADE1(PR-aminoimidazolesuccinocar Boxamide)基因设计

寡核苷酸引物 pADE-5 和 pADE-3,并在两端加上 *Not* I 酶切位点,以酿酒酵母基因组为模板,PCR 扩增 1.5kb 左右的片段。引物序列分别为:

pADE-5 5'-atttgcggccgctattcagcagtcagctgactct-3';  
pADE-3 5'-atttgcggccgcaatcctcctcagaagcaagctattg-3'。

**1.2.3 敲除质粒 pGE1203-ADE-URA3 的构建**:将 *och1* 5'端同源臂以 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切,克隆到用 *Bam*H I/*Not* I 酶切的 pGE1201 质粒上,形成 pGE1202,再将 3'端同源臂以 *Not* I 和 *Kpn* I 酶切,克隆到用 *Not* I/*Kpn* I 酶切的 pGE1202 上,形成 pGE1203,再将 URA3 基因以 *Pst* I 和 *Kpn* I 酶切,克隆到同样用 *Pst* I/*Kpn* I 酶切的 pGE1203 上,形成 pGE1203-URA3,将 pGE1203-URA3 以 *Not* I 酶切,再用 CIAP 去磷酸化,与同样用 *Not* I 酶切的 ADE 基因连接,形成敲除质粒 pGE1203-ADE-URA3。

## 1.3 毕赤酵母中 *och1* 基因的敲除

**1.3.1 一次重组敲入质粒 pGE1203-ADE-URA3**:将敲除质粒 pGE1203-ADE-URA3 以 3'同源臂上的 *Bgl* II 酶切位点线性化,电击转入制备好的 JC308 感受态细胞中,涂布于含有精氨酸和组氨酸的 MD 培养基(YNB 1.34%,生物素(4 $\times$ 10<sup>-5</sup>)%,葡萄糖 2%,琼脂 1.5%,精氨酸 100 $\mu$ g/mL,组氨酸 100 $\mu$ g/mL)上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5d,挑取培养基上长出的 *ura3*<sup>+</sup> *ade1*<sup>+</sup> 菌提取基因组,根据 ADE 基因 5'端序列和 *och1* 基因外侧序列设计引物 pADE 和 p1108,PCR 鉴定是否发生一次重组。引物序列分别为:

pADE 5'-tattcagcagtcagctgactct-3'  
p1108 5'-tctgtcaattcggaaagtgtc-3'

**1.3.2 二次重组敲除 *och1* 基因**:挑取一次重组后获得的克隆接种于 YPD 培养基(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖)中,25 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 12h 后,将菌液涂布于腺嘌呤缺陷的 5-FOA 培养基(YNB 1.34%,生物素(4 $\times$ 10<sup>-5</sup>)%,葡萄糖 2%,琼脂 1.5%,精氨酸 100 $\mu$ g/mL,组氨酸 100 $\mu$ g/mL,尿嘧啶 100 $\mu$ g/mL,5-FOA 0.1%)上,置于 25 $^{\circ}$ C 培养。

**1.3.3 *och1* 基因敲除菌的 PCR 鉴定**:将上述培养基上长出的 *ura3*<sup>-</sup> *ade1*<sup>+</sup> 菌提取基因组进行 PCR 鉴定。

利用内部引物的鉴定:以 *och1* 基因 5'端引物 p1105 和对应于 *och1* 缺失序列的引物 *poch*,分别用原始菌 JC308 和 *ura3*<sup>-</sup> *ade1*<sup>+</sup> 菌的基因组为模板进行 PCR。

利用外侧引物的鉴定:以染色体上 *och1* 基因同源臂外的序列设计引物 p1107 和 p1108,分别用起始

菌 JC308 和  $ura3^- ade1^+$  菌的基因组为模板进行 PCR 鉴定。各引物序列如下:

p1105 5'-acggatccccggaaaaccgagagaactct-3';  
 poch 5'-ggtggaaagcttcaagacttctgg-5';  
 p1107 5'-gcctgacagccttaaagagcc-3';  
 p1108 5'-tcttgcaattcggaagtgtc-3'.

#### 1.4 HSA/GM-CSF 表达载体的构建及表达

**1.4.1 GM-CSF 基因的克隆**:设计并合成了 GM-CSF 基因的上下游引物 pGM1 和 pGM2,引物两端分别加上了酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I,以便克隆至表达载体上;提取人淋巴细胞的总 RNA 进行 RT-PCR 反应,以获得的 cDNA 为模板进行 PCR,反应条件为:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,52℃ 退火 30s,72℃ 延伸 45s,共 30 个循环,72℃ 延伸 10min。引物序列如下:

pGM1:5'-atggatccgcaccgccctcgtcgtcctcca-3';  
 pGM2:5'-atgaatttactcctggactggtctccagc-3'.

**1.4.2 表达载体的构建**:将本实验室以前构建的 HSA 融合表达载体 pHIL-D2-HSA/IFN<sup>[11]</sup>以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切,将同样酶切的 GM-CSF 基因片段克隆至该载体上,形成质粒 pHIL-D2/HSA/GM-CSF,筛选阳性克隆并测序。

**1.4.3 HSA/GM-CSF 在毕赤酵母 GS115 中的表达**:制备野生菌 GS115 的电转化感受态,将 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 以限制性内切酶 *Not*I 线性化后电转入感受态细胞中,将电击后的菌液涂布于 MD 培养基(YNB 1.34%,生物素( $4 \times 10^{-5}$ )%,葡萄糖 2%,琼脂 1.5%)上。3~5d 后,将长出的 His<sup>+</sup> 菌接种到 2mL YPD 培养基中,30℃ 培养 24h 后,以 5% 的接种量接种到 BMGY 培养基(1% 酵母提取物,2% 蛋白胨,YNB 1.34%,生物素( $4 \times 10^{-5}$ )%,100mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.0,2% 甘油)中,24h 后加入 0.5% 甲醇进行诱导表达,每 12h 补加一次甲醇,诱导 72h 后离心取上清,用于融合蛋白的表达分析。

**1.4.4 表达产物的检测**:取转化 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 后的 GS115 和对照菌(只带有 pHIL-D2 空载体的 GS115)的培养上清进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色。

#### 1.5 *och1* 敲除菌对 HSA/GM-CSF 的表达和鉴定

**1.5.1 HSA/GM-CSF 在 *och1* 敲除菌中的表达**:制备 *och1* 敲除菌的电转化感受态,将 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 以限制性内切酶 *Not*I 线性化后电转入 *och1* 敲除菌感受态细胞中,将电击后的菌液涂布于含有尿嘧啶和精氨酸的 MD 培养基(YNB 1.34%,生物素

( $4 \times 10^{-5}$ )%,葡萄糖 2%,琼脂 1.5%,精氨酸 100  $\mu$ g/mL,尿嘧啶 100 $\mu$ g/mL)上。5~8d 后,将长出的 His<sup>+</sup> 菌接种到 2mL YPD 培养基中,25℃ 培养 48h 后,以 5% 的接种量接种到 BMGY 培养基中,24h 后加入 0.5% 甲醇进行诱导表达,每 12h 补加一次甲醇,诱导 72h 后离心取上清,用于融合蛋白的表达分析。

**1.5.2 表达产物的检测**:表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测:取转化 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 后的 *och1* 敲除菌和野生菌 GS115 的培养上清,进行 SDS-PAGE(两块电泳胶以相同的样品顺序和电泳条件平行电泳)。其中一块电泳胶用于考马斯亮蓝染色,另一块胶进行 SDS-PAGE 后转移到 NC 膜上,封闭后与兔抗人血清白蛋白抗体(1:5 000)反应,室温振荡结合 2h,再与辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体(1:10 000)反应 1h,最后用 ECL 检测试剂盒显色。

糖苷酶 F 对表达产物的酶切鉴定:取转化后的 *och1* 敲除菌和 GS115 菌株培养上清经 TCA 沉淀后,用糖苷酶 K(PNGaseF)进行酶切处理,将酶切产物进行 SDS-PAGE 分析。

#### 1.6 融合蛋白 HSA/GM-CSF 的纯化

将 *och1* 敲除菌和野生菌 GS115 的培养上清各取 500mL,经饱和度为 80% 的硫酸沉淀后,用 2mL Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L,pH7.0)溶解,用流动相(20mmol/L Tris-HCl,50mmol/L NaCl,pH 7.0)平衡后的凝胶柱(Supdex200( $\Phi$ 1.6cm  $\times$  100cm))对其进行分离纯化,收集洗脱峰,SDS-PAGE 电泳分析。将纯化产物用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后用于效价测定。

#### 1.7 HSA/GM-CSF 的活性分析

采用 TF-1 依赖细胞株/MTT 比色法:TF-1 细胞用含 10% FBS、80IU/mL rhGM-CSF 的 RPMI1640 培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 水汽饱和培养箱培养,控制细胞浓度为(2.0~7.0)  $\times 10^5$ /mL,传代后 24~36h 用于 GM-CSF 效价测定。rhGM-CSF 标准品用基础培养基稀释至 20IU/mL,待测样品第一孔用基础培养基以 1:100 倍稀释,在 96 孔板中以二倍稀释度做梯度,12 个稀释度,各两个复孔。每孔加入 50 $\mu$ L 细胞悬液,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 48h 后,每孔加 20 $\mu$ L MTT,5h 后加每孔加入裂解液 80 $\mu$ L,混匀后在酶标仪上比色,测定波长为 570nm。

## 2 结果

### 2.1 *och1* 基因敲除的毕赤酵母菌株构建

**2.1.1 敲除质粒 pGE1203-*ADE*-*URA3* 的构建**:在质

粒 pYes2 的基础上 构建了带有 *och1* 基因上下游各 900bp 的同源臂、毕赤酵母来源的 *URA3* 基因、酿酒酵母来源的 *ADE1* 基因以及若干限制性内切酶位点的敲除质粒 pGE1203-ADE-URA3。各基因的克隆、插入载体后的鉴定以及测序分析都表明敲除质粒构建正确。

**2.1.2 *och1* 基因的敲除** 将敲除质粒以 *och1* 3' 同源臂上的 *Bgl* II 酶切位点线性化后电转化入宿主菌 JC308, 敲除质粒被整合到宿主染色体中目标基因的位置上, 即发生了第一次同源重组, 重组导致了部分目标基因在染色体上的重复, 用含有精氨酸和组氨酸的 MD 培养基筛选 *ura3<sup>+</sup> ade1<sup>+</sup>* 克隆, 通过 PCR 鉴定表明 *ura3<sup>+</sup> ade1<sup>+</sup>* 克隆全部为阳性克隆, 即发生了一次重组的菌株。

将该一次重组菌在丰富培养基中培养扩增, 其中一些菌体由于染色体中重复的两个拷贝之间发生同源交换, 导致染色体上包括 *URA3* 基因在内的敲除质粒骨架序列的切除以及重复区段中两个拷贝之一的丢失, 即发生了第二次重组。用腺嘌呤缺陷的 5-FOA 培养基筛选 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 克隆, 通过 PCR 鉴定表明 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 克隆全部为 *och1* 敲除菌。由于同源重组的准确定位, 发生了二次重组的菌株要么为野生型, 要么为 *och1* 敲除菌株, 未发生二次重组的菌株由于带有 *URA3* 基因而不能在含有 5-FOA 的培养基上生长, 而在发生了二次重组的菌体中, 野生型菌株由于缺少 *ADE* 基因而不能在腺嘌呤营养缺陷的培养基上生长, 只有 *och1::ADE1* 的菌株能够在腺嘌呤营养缺陷的 5-FOA 培养基上生长(见图 1)。

**2.1.3 *och1* 敲除菌的 PCR 鉴定** 将筛选到的 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 菌提取基因组, 分别设计内部和外侧两对引物进行 *och1* 基因敲除的 PCR 鉴定(图 2a)。

以 *och1* 内部引物 p1105/*och* 为鉴定引物时, 在

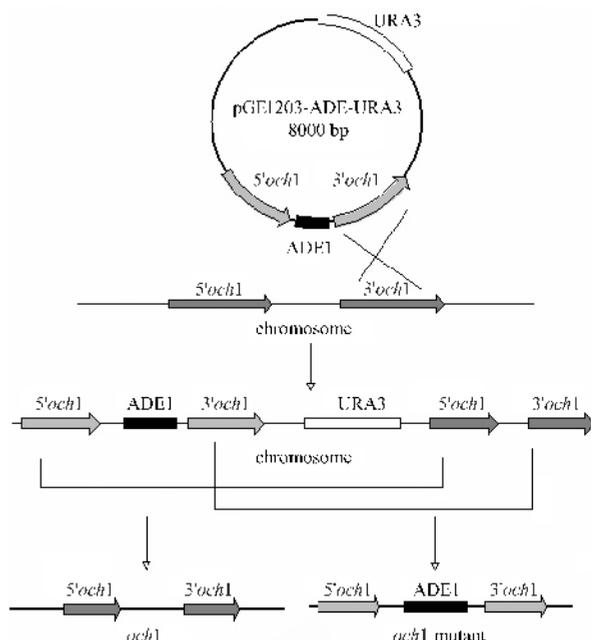


图 1 两步基因重组法

Fig. 1 The method of two-step recombination

原始菌 JC308 中可以扩增到 1.5kb 左右的片段, 在 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 菌中扩增不到片段(图 2b)。这表明在 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 菌中, 野生型 *och1* 基因部分序列已被外源基因所替代, 即 *och1* 基因已被敲除。

以 *och1* 上游和下游外侧引物 p1107/p1108 为正向反向引物进行 PCR 鉴定, 在原始菌 JC308 中可以扩增到 2.8kb 左右的片段, 在 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 菌中扩增到了 4.8kb 左右的片段(图 2c)。这表明在 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 菌中, 野生型 *och1* 基因已被 *och1::ADE1* 所取代, 即 *ura3<sup>-</sup> ade1<sup>+</sup>* 菌为 *och1* 敲除的菌株。

**2.2 HSA/GM-CSF 表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达**

**2.2.1 GM-CSF 基因的克隆** 通过 RT-PCR 从淋巴细胞总 RNA 中获得 cDNA, 琼脂糖电泳如图 3 所示, 在

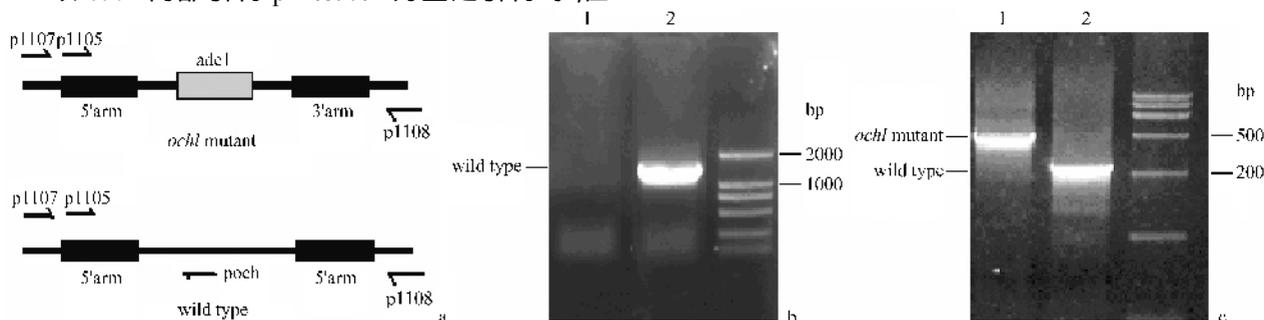


图 2 *och1* 敲除菌的鉴定

Fig. 2 Identification of *och1* mutant *Pichia pastoris*

a: The position of primer in genome. b: PCR by inside primer 1105/*och*. 1: *och1* mutant 2: wild type. c: PCR by outer primer 1107/1108. 1: *och1* mutant; 2: wild type.

400bp 左右有明显的扩增片段产物,与 GM-CSF 的 cDNA 大小一致。

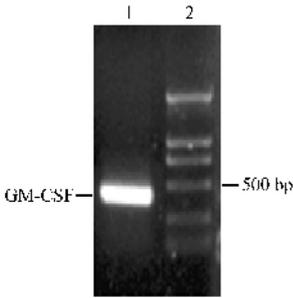


图3 GM-CSF 基因的克隆

Fig. 3 Cloning of GM-CSF gene by RT-PCR

2.2.2 表达载体的构建:将扩增到的 GM-CSF 的 cDNA 片段连接到质粒 pHIL-D2-HSA/IFN 中,构建了表达质粒 pHIL-D2/HSA/GM-CSF(图4),酶切鉴定和测序分析都表明表达载体构建正确。

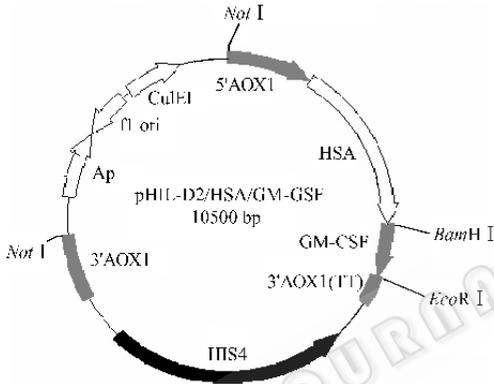


图4 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 的构建

Fig. 4 Construction of pHIL-D2/HSA/GM-CSF

2.2.3 HSA/GM-CSF 在毕赤酵母中的表达:将表达质粒 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 转入后的 His<sup>+</sup> 菌摇瓶发酵培养后,取培养上清进行 SDS-PAGE(图5),转化了 HSA/GM-CSF 的 GS115 菌株可以高效表达该融合蛋白,表达量大于 50mg/L,表达的融合蛋白主带分子量大于 97kD,明显大于其理论分子量 82kD,且表达带发生了明显的拖尾,说明 HSA/GM-CSF 在毕赤酵母中有较高水平的表达,但表达产物被过度糖基化修饰,且糖基化存在严重的不均一性。

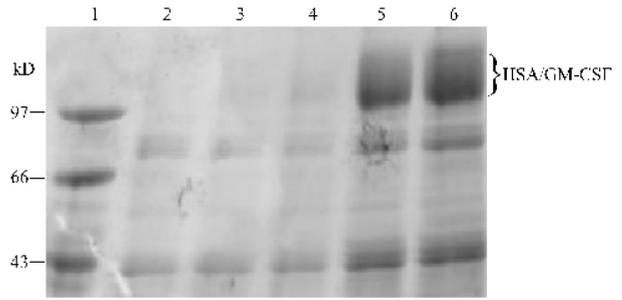


图5 HSA/GM-CSF 在 P. pastoris GS115 中的表达

Fig. 5 Expression of HSA/GM-CSF in P. pastoris GS115 1:molecular weight marker; 2:control(GS115 transfected with pHIL-D2 vector); 3-6:negative transformation; 5,6:positive transformation.

### 2.3 och1 基因的敲除对 HSA/GM-CSF 糖基化的影响

2.3.1 表达产物的检测:将 pHIL-D2/HSA/GM-CSF 转入后的 GS115 和 och1 敲除菌的培养上清进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测(图6)。SDS-PAGE 电泳结果表明 HSA/GM-CSF 在 och1 敲除菌中也有较高水平的表达,但不同于野生菌表达的 HSA/GM-CSF,och1 敲除菌表达的该融合蛋白分子量仅为 85kD,且表达带清晰,没有拖尾,说明 och1 敲除菌表达的为低糖基化融合蛋白 HSA/GM-CSF;用抗 HSA 的抗体通过 Western blot 检测的结果与 SDS-PAGE 结果一致,进一步证明了 SDS-PAGE 电泳中大于 97kD 的拖尾条带和 85kD 左右的条带为 HSA/GM-CSF 的表达带。

2.3.2 经 PNGaseF 酶切后表达产物的 SDS-PAGE 检测:将这两种菌的培养上清经 PNGase F 处理后进行 SDS-PAGE 检测(图7),经 PNGase F 酶切后,两种菌表达的融合蛋白 HSA/GM-CSF 分子量均减小为 82kD 左右,与该融合蛋白的理论分子量相似。说明上述两种菌表达的该融合蛋白均为 N-糖基化的蛋白,其中野生菌表达的为过度糖基化的融合蛋白,而 och1 敲除菌表达的为低糖基化的融合蛋白。

2.3.3 活性分析:och1 敲除菌和野生菌 GS115 所表达的 HSA/GM-CSF 均可以刺激 GM-CSF 依赖细胞 TF-1 的生长,二者比活性近似,分别为  $1.7 \times 10^7$

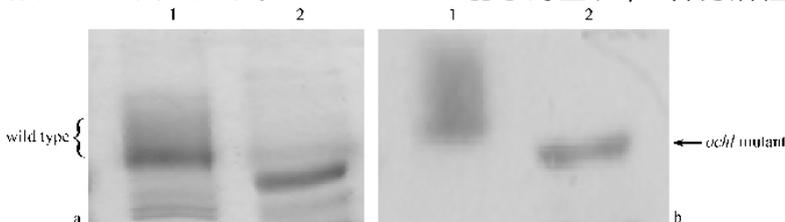


图6 HSA/GM-CSF 在 och1 敲除菌和野生菌中的表达

Fig. 6 Expression of HSA/GM-CSF in och1 mutant and wild type

a:SDS-PAGE b:Western blot lane1:wild type lane2:och1 mutant

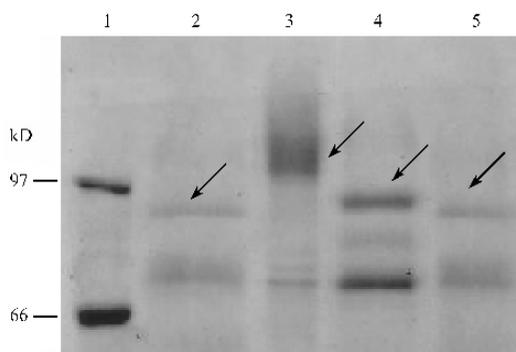


图7 糖苷酶 F 酶切后的培养上清

Fig.7 Production expressed by *och1* mutant and wild type was digested with PNGase F

1 :molecular weight marker 2 :deglycosylated production expressed by wild type ; 3 :hyperglycosylated production expressed by wild type ; 4 : lowglycosylated production expressed by *och1* mutant ; 5 :deglycosylated production expressed by *och1* mutant.

IU/mL和  $2.6 \times 10^7$  IU/mL. 但它们在体内的活性和药代动力学特性还有待于进一步的研究。

### 3 讨论

本研究在毕赤酵母中建立了一种两步基因重组敲除目标基因的方法,并利用该方法成功敲除了毕赤酵母中的  $\alpha$ -1,6-甘露糖转移酶(*och1p*)基因。并在 *och1* 敲除菌中高效表达了融合蛋白 HSA/GM-CSF,与野生菌表达的该融合蛋白相比,*och1* 敲除菌表达的该蛋白过度糖基化程度明显降低。

基因敲除是酵母研究中最有效和最重要的技术之一。对于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的基因敲除技术发展得比较成熟,酿酒酵母的基因敲除只需几十至几百个碱基的同源臂序列,且敲除效率较高,而对于毕赤酵母而言,基因敲除需要几百乃至上千个碱基的同源臂序列,且敲除效率远低于酿酒酵母,尤其是对于一些影响菌体生长、代谢的基因,其敲除效率很低,往往难以获得正确敲除的菌株。

而我们选择毕赤酵母而不是酿酒酵母进行工程菌的改造主要是由于酿酒酵母对外源蛋白的表达水平低,产物不易分泌到胞外,而且外源基因以游离的质粒形式存在,培养过程中易发生丢失<sup>[14]</sup>,而毕赤酵母可以实现外源蛋白的高效和分泌表达,已经广泛应用于重组蛋白的制备,而且毕赤酵母高尔基体内没有  $\alpha$ -1,3-甘露糖转移酶的存在<sup>[5]</sup>,只需敲除 *och1* 基因就可能阻断高甘露型糖基合成的起始。

因此,由于  $\alpha$ -1,6-甘露糖转移酶在毕赤酵母蛋白糖基化过程中所起的重要作用,它的敲除可能会对菌体的生长和代谢产生影响,这使得敲除工作非常困难。Choi 等在敲除 *och1* 基因时采用了双交换

同源重组的策略,构建的敲除等位基因的同源臂长度在 2kb 左右,他们在 1000 个克隆中筛选到了一个敲除突变株<sup>[15]</sup>,而 Contreras 等也采用了双交换同源重组的策略,构建了同源臂长度达到为 3kb 的敲除等位基因,但始终筛选不到阳性克隆,随后他们又采用了单交换同源重组的策略,即在目标基因阅读框内插入一段序列以中止目标基因的表达,从而获得了 *och1* 基因缺失的菌株<sup>[16]</sup>。但通过单交换使得靶基因插入失活后,菌株在传代的过程中较不稳定,易发生回复突变,需要不断施加筛选压力,限制了其在后续研究和生产等方面的应用。

本研究建立的两步基因置换法是一种高效敲除酵母菌中目标基因的方法。我们在敲除 *och1* 基因的过程中,采用了双筛选标记(URA3 和 ADE1),在发生一次重组时,两个筛选标记全部整合到酵母基因组上,当发生二次重组时,在产生野生型菌株的过程中,这两个筛选标记基因全部被切除,而在产生 *och1* 敲除菌的过程中,只有 URA3 这个筛选标记基因被切除,而 ADE 基因则被保留,因此在腺嘌呤营养缺陷的 5-FOA 培养基上长出的克隆绝大部分是 *och1* 敲除菌,这就大大降低了筛选的工作量,提高了筛选突变株的效率。在本方法中,URA3 是一个不可替代的关键性筛选标记,作为一种正负筛选标记被使用。URA3 基因所编码的酶是尿嘧啶合成的关键酶,该酶能把 5-FOA 转化成对细胞有毒的物质,使得带有 URA3 基因的菌株不能在含有 5-FOA 的培养基上生长,而缺失 URA3 基因的酵母则不能在尿嘧啶缺陷的培养基上生长。在两步置换敲除目标基因的过程中,URA3 这个筛选标记在第一次重组时被敲入宿主菌,使得发生重组的菌株可以在尿嘧啶缺陷的培养基中生长,在发生二次重组时 URA3 基因又被敲出宿主,使得发生二次重组的菌株可以在含有 5-FOA 培养基中生长。同时,URA3 基因在二次重组后被敲出宿主也使得 URA3 这个筛选标记可以被重复使用,这使得在以后的工作中我们还可以利用这个筛选标记敲除其它的目标基因。另外,在本方法所使用的 ADE1 这个筛选标记可以根据宿主菌的特点可以被其他筛选所取代,在插入 ADE1 基因的位置上也可以不引入筛选标记基因而引入其他的外源基因,只利用 URA3 一个筛选标记利用两步置换的方法在敲除目标基因的同时又将其他基因敲入宿主染色体中,而且不需要占用其他的筛选标记,只是这种方法在筛选突变株时会增加筛选的工作量。

我们在研究过程中还发现, *och1* 敲除菌的生长速度与野生菌相比较缓慢,且摇床振荡培养过程中菌液会发生絮凝现象,这可能是由于菌体自身膜蛋白的糖基外链改变而引起的,在合适的生长与发酵条件下,该工程菌对 HSA/GM-CSF 的表达并没有明显的影响。国外学者也有类似的报道<sup>[14,17]</sup>,在毕赤酵母和酿酒酵母中都有这种现象产生,酿酒酵母的生长缓慢和絮凝情况尤为严重,而毕赤酵母在引入 1,2- $\alpha$ -D-甘露糖苷酶(1,2- $\alpha$ -D-mannosidase, MnsI)和  $\beta$ -1,2-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I ( $\beta$ -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I, GnTI)后,这些情况都得到了改善。

GM-CSF 由 127 个氨基酸构成,它具有两个 N-糖基化位点(Asn27, Asn37),天然 GM-CSF 有 34% 的糖基化<sup>[18]</sup>。本研究表明,融合蛋白 HSA/GM-CSF 以毕赤酵母作为表达宿主时,产生了过度且不均一的糖基化修饰,这不利于对蛋白分离纯化、活性测定等方面的研究,也可能对该蛋白在体内的活性、免疫原性等方面产生影响,不利于其药效的发挥。而利用 *och1* 缺失的毕赤酵母菌株表达该融合蛋白,可以明显改善其过度糖基化的问题,获得了低糖基化的 GM-CSF,有望避免其过度糖基化带来的不利影响。

同时,对 *och1* 缺失的毕赤酵母菌株还可以进一步进行糖基的人源化改造,将酵母中缺少的合成复杂型糖蛋白的酶引入工程酵母中,以获得更加有利于制备药用重组糖蛋白的新型酵母菌株。国外学者已经进行了相关的探索并取得了一定进展,Gerngross 的研究小组已经在实验室规模实现了利用糖基人源化改造后的工程酵母表达具有复杂型糖基的促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)和抗 CD20 单抗<sup>[6,7]</sup>,这预示着用糖基人源化改造后的酵母表达各种复杂型糖蛋白是可行的。由于酵母具有表达水平高、培养成本低、易于大规模培养等优点,可以满足糖蛋白类药物,尤其是抗体类药物需求的快速增长对其制备能力的要求。因而糖基人源化改造的酵母有望成为一种优良的糖蛋白类药物生产平台。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Helenius A, Aebi M. Intracellular function of N-linked glycans. *Science*, 2001, **291**(5512): 2364 – 2369.
- [ 2 ] Cregg JM, Cereghino JI, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, **16**(1): 23 – 52.
- [ 3 ] Hubbard SC, Ivatt RJ. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 1981, **50**(7): 555 – 583.
- [ 4 ] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nature Biotechnol*, 2003, **21**(8): 865 – 870.
- [ 5 ] Wildt S, Gerngross TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Microbiology*, 2005, **3**(2): 119 – 128.
- [ 6 ] Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature biotechnology*, 2006, **24**(2): 210 – 215.
- [ 7 ] Hamilton SR, Davidson R, Sethuraman N, et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 2006, **313**(8): 1441 – 1443.
- [ 8 ] Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, et al. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology*, 2004, **14**(9): 757 – 766.
- [ 9 ] Batova A, Kamps A, Gillies SD, et al. The Ch14.18-GM-CSF fusion protein is effective at mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity *in vitro*. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(12): 4259 – 4263.
- [ 10 ] Sainathan SK, Tu L, Bishupuri KS, et al. PEGylated murine Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: production, purification, and characterization. *Protein Expr Purif*, 2005, **44**(2): 94 – 103.
- [ 11 ] Chang SH(唱韶红), Gong X(巩新), Yang ZX(杨志愉), et al. Expression in *Pichia pastoris* and properties of human serum albumin-interferon  $\alpha$ 2b chimera. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)* 2006, **22**(2): 173 – 179.
- [ 12 ] Pal Y, Khushoo A, Mukherjee KJ. Process optimization of constitutive human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**(6): 650 – 657.
- [ 13 ] Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Sunga AJ. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*, 2001, **263**(1–2): 159 – 169.
- [ 14 ] Srien F, Campbell JL, Bailey JE. Flow cytometry analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* population. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **7**(2): 132 – 141.
- [ 15 ] Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(9): 5022 – 5027.
- [ 16 ] Verveken W, Kaigorodov V, Callewaert N, et al. *In vivo* synthesis of mammalian-link, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(5): 2639 – 2649.
- [ 17 ] Ballou L, Cohen RE, Ballou CE. *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer chain. *J Biol Chem*, 1980, **255**(25): 5986 – 5991.
- [ 18 ] Dorr RT. Clinical properties of yeast-derived versus *Escherichia coli*-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin*