



非常规酵母基因工程表达系统

刘 峰 霍克克 李育阳

(复旦大学遗传所 上海 200433)

摘 要 非常规酵母系指除了酿酒酵母与粟裂殖酵母之外的酵母菌。非常规酵母可利用其自主复制序列构建载体,但整合载体是进行外源基因导入的主要方式,非常规酵母的转化有一定的宿主范围,可采用与酿酒酵母相同的方法,最常用的仍为化学法。高效表达元件可利用酿酒酵母的强启动子,也可以根据非常规酵母菌的代谢特点寻找强启动子。本文综述了近年来应用非常规酵母基因表达系统表达外源基因的一些实例。

关键词 非常规酵母, 基因工程, 表达系统

酵母菌是一类低等真核生物,它既具有类似原核生物的生长特性,又具有一般真核生物的分子和细胞生物学特性。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是大家最熟悉的酵母菌,这主要是因为酿酒酵母和人类生活极其密切,很早就被应用于食品和饮料工业。经过长期的研究,有关它的生物学特性已经积累了大量资料。与酿酒酵母相并列,另有一种粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*),虽然人们对其研究远不及酿酒酵母,但是由于粟酒裂殖酵母在分子细胞生物学方面更加接近高等真核生物,而且它的染色体组成比较简单,其单倍体细胞仅有 3 条染色体。因此,近年来人们对这种酵母也做了许多工作。酵母菌是真核微生物中很大一个群体,至少包括 80 个属,600 个种,10 000 多独立菌株。和酿酒酵母以及粟酒裂殖酵母相比,人们对其它酵母的了解较少,有人把除了酿酒酵母与粟酒裂殖酵母之外的酵母菌统称为非常规酵母 (Nonconventional yeast)。非常规酵母作为一类生物资源,近年来已引起人们的强烈兴趣。这部分是由它们的致病特性引起的,例如对 *Candida albicans* 的研究。但主要是由于它们在生物工程方面的应用前景。

70 年代初国际上首先在大肠杆菌打通了基因工程技术的全部难关。到 70 年代末由于酿酒酵母 2 μ 质粒的发现和酵母转化技术的突破,酿酒酵母基因工程表达系统也建立起来了。酿酒酵母基因工程表达系统的建立,除了对其基础研究起了很大作用外,也为基因工程药物和疫苗的产业化作出巨大的贡献。但是,人们也发现酿酒酵母作为一种基因工程表达系统存在一些局限性。其中最主要的一点是:因为酿酒酵母是一种以发酵为主的酵母,在采用常规的通气发酵条件下酿酒酵母所能达到的生长速度和密度并不高。因此用酿酒酵母基因工程系统表达外源基因很难达到很高的水平。其次,酿酒酵母对外源基因表达产物的分泌也不够理想⁽¹⁾。此外,在翻译后加工方面也与高等真核生物有所不同⁽²⁾。酿酒酵母的这些不足,促使人们从广泛存在的非常规酵母中建立新的载体-宿主系

本文于 1995 年 7 月 15 日收到。

统,以便扩大酵母菌在基因工程中的应用。本文着重综合有关非常规酵母表达系统的建立和其在生物工程中的应用。

1 载体-宿主系统

1.1 载体

酿酒酵母系统中已建立 4 种不同类型的载体,即整合型载体 YIP、自主复制型载体 YRP、附加体型载体 YEP、携带着丝粒结构的载体 YCP。其中 YEP 型载体最重要,这类载体以自主复制内源质粒 2μ 为基础,带有 2μ 质粒的 ARS 顺序。但在非常规酵母中只有少数菌株具有这类质粒。已被鉴定的非常规酵母质粒见表 1。

表 1 非常规酵母质粒
Table 1 Plasmid of nancoventional yeasts

Source	Name	Size of plasmid/bp
<i>Zygosaccharomyces rouzii</i>	pSR1	6251
<i>Zygosaccharomyces rouzii</i>	pSR3	6615
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	pSB2	5415
<i>Zygosaccharomyces fermentatis</i>	pSM1	5416
<i>Kluyveromyces drosophilarium</i>	pKD1	4757
<i>Kluyveromyces waltii</i>	pKW1	5619

质粒 pKD1 已被用来构建非常稳定的载体。但是由于这个载体只有很窄的宿主范围,只能用于其中少数克鲁氏酵母,应用受到一定限制。此外我们在对假丝酵母属的 414 株酵母进行内源质粒筛选时未发现 2μ 类质粒,只发现少数线形质粒。

在非常规酵母中也可以利用自主复制序列(ARS)来构建载体。从 *Candida albicans* 和 *Kluyveromyces lactis* 的染色体 DNA 都筛选到 ARS,用带有 *C. albicans* ARS 的载体进行酵母转化时,每 μ gDNA 可以得到 10^3 个转化子。但这类载体极不稳定,在非选择性培养基上生长 15 代,只有 19.2% 细胞仍然保留质粒。因此这样的载体很难被用来表达外源基因生产有用的产品。

整合载体是非常规酵母进行外源基因导入的主要方式。整合载体按其介导整合的方式不同,可以分为单拷贝整合载体和多拷贝整合载体。*C. albicans* 的整合载体上的 URA3 基因可以和染色体上的相应区段发生单交换,从而可把整个载体整合进染色体,获得稳定的转化子。*Pichia pastoris* 整合载体上有其醇脱氢酶基因的 5' 和 3' 非编码区,可以和染色体上相应区段进行双交换,整合进染色体。当然,这样的整合频率会低一些,但是可以避免整合载体中无关序列的整合,而且得到的整合子也非常稳定^[3]。如果整合载体上介导整合的序列为基因组中的重复序列,例如 rDNA 序列,那么这样的载体就可以获得多拷贝的转化子。我们在进行 *Kluyveromyces lactis* 的多拷贝整合时,一些转化子整合载体的拷贝数可以高达数百。这类转化子在传代过程中并不都是稳定的,但是可以筛到稳定的转化子(待发表)。

1.2 宿主和转化

由于非常规酵母内源质粒的宿主都相当专一，所以以内源质粒为基础的载体也只能导入很有限的宿主，以 pKD1 质粒为基础的质粒可以高效地转化 *Kluyveromyces lactis* 等几个菌株。至于以 ARS 为基础的载体以及整合载体也有一定的宿主范围，这主要决定于不同酵母菌的 ARS 核心序列及整合介导序列的同源程度。非常规酵母的转化几乎可以采用与常规酵母一样的方法，其中最常用的仍为化学法。但也有人用电转化法取得很好的结果。例如，Iborra, F 建立 *K. fragilis* 的电转化法，转化效率达到 10^5 转化子/ $\mu\text{gDNA}^{(4)}$ 。此外，有效的筛选方法也是转化的关键。根据我们对 275 株假丝酵母的试验，94% 以上菌株对 G418 是敏感的，因此利用决定 G418 抗性的 *aphi* 基因作为选择性标记有很广泛的应用前景，对于单倍体酵母菌很容易通过诱变然后在 5FOA 平板上筛选得到 *ura3* 突变株⁽⁵⁾，再加上酿酒酵母的 *URA3* 基因一般能在多种酵母菌中通用，所以非常规酵母也可广泛地采用 *URA3* 作为选择性标记。

1.3 高效表达元件

表达载体需要强的转录启动子和终止子，可以利用酿酒酵母的强启动子，例如 *PGK1*、*PH05* 等启动子可以在一些非常规酵母中起作用。根据所研究菌株的不同，可以从每菌的代谢特点出发寻找强的启动子。*Pichia pastoris* 可以利用甲醇，有很强的醇氧化酶基因，这个基因的启动子不仅表达水平高，而且明显地具有调控功能。*Kluyveromyces lactis* 能利用乳糖，因为它有很强的 β -半乳糖苷酶活性，编码这个酶的基因 *LAC4* 已经被克隆，它的启动子证明是调控型强启动子。我们对于 382 株假丝酵母进行了分泌蛋白组分及数量的分析，发现一些菌株不但分泌蛋白量多，而且只有简单几个组分。我们正在克隆相应于这些蛋白的基因，这些基因的启动子、终止子以及和蛋白质分泌有关的信号序列均有希望成为指导外源基因表达的强表达元件。

2 非常规酵母外源基因表达的应用和展望

至今虽然只有 *Pichia*⁽⁶⁾、*Kluyveromyces*⁽⁷⁾、*Yarrowia*⁽⁸⁾、*Candida*⁽⁹⁾ 和 *Hansenula*⁽¹⁰⁾ 等属酵母的一些菌株建成了基因表达系统，但是，这些新的酵母表达系统已引起人们极大的兴趣。其中尤以 *Pichia pastoris* 和 *Kluyveromyces* 更为人们所注意。从 70 年代起 *Pichia pastoris* 被用来生产单细胞蛋白，有很好的发酵基础，菌体（干重）密度可高达 100g/L。利用这种酵母的强调控启动子 *AOX1*，已经高表达了十多种外源基因。其中人肿瘤坏死因子、人白介素-2、破伤风毒素 C 片段、蔗糖酶、人血清白蛋白、蛋白酶抑制剂等基因的表达产物都超过 1g/L 发酵液，破伤风毒素 C 片段最高可达到 12g/L⁽¹¹⁾。而 *Kluyveromyces* 属中有一些菌株有很强的乳糖酶活性，在工业上有很强的应用价值。Chen 等人⁽¹²⁾ 在 *K. drosophilium* 中发现了环状质粒 pKD1，并建成了稳定的载体-宿主系统。Fleer 等⁽¹³⁾ 利用了这个系统表达了人白细胞介素 1β ，分泌水平达 400mg/L 以上。Fleer 等⁽¹⁴⁾ 在表达人血清白蛋白基因时，分泌表达水平高达每升数克。由于外源基因表达水平能达到每升数克，必将大大降低表达这些产物的成本。重组多肽药物及疫苗就变得很容易推广。一些人血液中的蛋白质，如人血清白蛋白，载脂蛋白等，由于血液中含量高，所以原来成本就比较低。常规基因工程方法制备这些蛋白无法和传统方法相匹敌。但

是如果表达水平能达到每升数克,用工程菌来生产这类蛋白就变得有利可图。更何况血液制品存在污染病毒的可能性,而用基因工程方法生产这类血液蛋白就不存在这种危险。因此更高水平的表达系统将使基因工程的应用范围进一步扩大。此外, Sakai 等^[15]在研究博伊丁假丝酵母 *C. boidinii* 生产 ATP 时,利用这种酵母的强调控启动子 AOD1,指导合成 ATP 的关键酶腺苷激酶 (ADK) 的表达,结果使 ATP 的合成水平有很大提高。

综上所述,非常规酵母不仅可以用来表达重组蛋白质,而且可以提高由酵母产生的次生代谢物的产量。可以预见在不久的将来,非常规酵母表达系统一定会展现出它的优点,从而为基础工程的推广发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Singh A, Lugorog J M, Kohr J W *et al.* Nucleic Acids Res, 1984, 12: 8927~8932.
- [2] Ernst J F, Mermod J J, Ddlamarter J *Fet al.* Bio/Technology, 1987, 5: 831~834.
- [3] Cregg J F, Tschopp J F, Stillman C *et al.* Bio/Technology, 1987, 5: 479~485.
- [4] Iborra F. Curr Genet, 1993, 24: 181~183.
- [5] Boeke J D, Lacroul F, Fink G R. Mol Genet Biol, 1984, 197: 345~346
- [6] Cregg J M, Barringer K J, Hessler A A *et al.* Mol Cell Biol, 1985, 12: 3376~3385.
- [7] Bianchi M M, Falcone C, Chen X J *et al.* Curr Genet, 1987, 12: 185~192.
- [8] Puthalakath V H, Chattoo B B *et al.* Gene, 1994, 143: 165~170.
- [9] Kurta M B, Cortelgou M M, Kirsch D R. Mol Cell Biol, 1986, 6: 142~149.
- [10] Tikhomirova L P, Ikonomova R N, Kuznetsova E N. Curr Genet, 1986, 10: 741~747.
- [11] Cregg J M, Vediveck T S, Rasschke W C. Bio/Technology, 1993, 11: 905~909.
- [12] Chen X J, Wesolowski-Louvel M, Tangut-Roug *et al.* J Basic Microbiol, 1988, 28: 211~220.
- [13] Flier R, Chen X J, Amellal N *et al.* Gene, 1991, 107: 285~295.
- [14] Flier R, Yeh P, Amellal N *et al.* Bio/Technology, 1991, 9: 968~975.
- [15] Yasuyoshi S. Bio/Technology, 1994, 12: 291~293.

Expression System of Nonconventional Yeasts for Genetic Engineering

Lui Feng, Huo Keke, Li Yuyuang

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Nonconventional yeasts refer to the yeast species except *Saccharomyces cerevisiae* and *Schzosaccharomyces cerevisiae*. Their ARS can be used to construce vectors, while integrating vectors are the main source to direct heterogeneous gene integration. Transformation to the nonconventional yeasts is limited by host range and the chemical method is the most frequently used. as that used in *s. cerevisiae*. The strong promoters of *s. cerevisiae* can be used as high expression elements, as well as the alternative ones out of nonconventional yeasts according th their metabolism features. This articale concludes some practical examples of expressing heterogeous genes with the gene expression systems of the nonconventional yeasts.

Key words Nonconventional yeasts, gene engineering, expression system