

外源基因在酵母中表达

马礼金¹ 姚汝华¹ 黄自然²

(1 华南理工大学轻工食品学院, 广州, 510641; 2 华南农业大学蚕桑系)

摘要 阐述了酵母高效表达外源基因的载体系统、转化、转录和翻译、翻译后的蛋白质加工和分泌, 对表达外源基因中出现的一些问题及其解决方法作了探讨。

关键词 酵母; 外源基因; 基因表达

中图分类号 Q 936

随着重组 DNA 技术、基因表达及酵母分子遗传学研究的进展, 越来越多的外源基因在酵母中获得高效表达, 人们希望用酵母来生产医用和商用的高效蛋白质。啤酒酵母 *Saacharomyces cerevisiae* 具有的许多特性适用于外源基因的表达。啤酒酵母对人无毒, 不产生脂多糖 A (内毒素)。酵母能进行蛋白质的翻译后加工, 并且将表达产物分泌到细胞外的培养基中, 简化了表达产物的回收和纯化, 而且有助于表达的蛋白质获得正确的折叠和 N-末端加工, 从而生产出“天然”的蛋白质用于医疗。这是一个相当大的优势, 因为外源基因的表达产物的天然性是宿主菌选择的一个重要因素。

外源基因在酵母中表达一般采用酵母基因的启动子。高等真核生物基因含有酵母不能加工的插入序列 (内含子), 故表达一般采用其 cDNA。转录终止子是基因高效表达必须的。因为长的转录产物是不稳定的, 会导致外源基因的 mRNA 降解。图 1 所示为典型的酵母表达载体 (Hinchliffe et al, 1993), 为穿梭型表达载体, 能在大肠杆菌和酵母中遗传复制。

为了使外源基因的表达产物向细胞外分泌, 在外源基因的 5' 一端和启动子的 3' 一端之间插入分泌作用的信号肽序列。信号肽引导表达产物向酵母细胞外分泌并被切除, 将成熟的蛋白质分泌到细胞外。

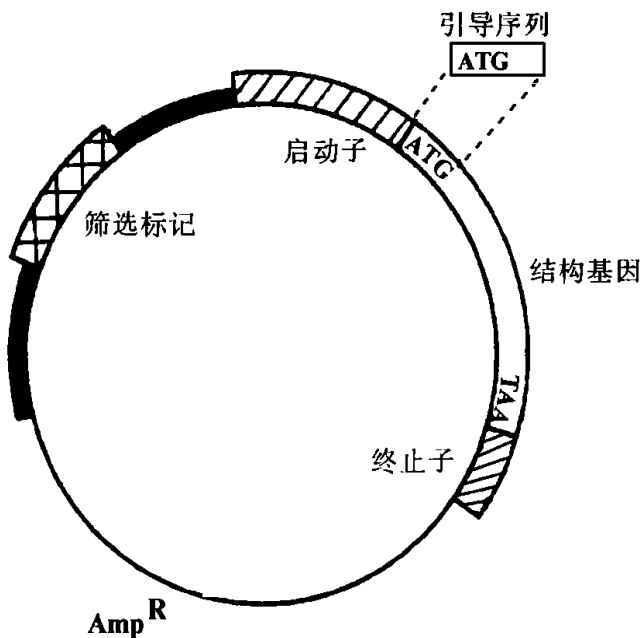
1 转化

有两种方法可以使酵母细胞摄取外源 DNA, 即原生质体转化和完整细胞转化。目前采用较多的是完整细胞转化的方法, 该方法是 1983 年发展起来的 (Ito et al, 1983)。这种方法虽然要用 Li^+ 离子处理细胞, 但和原生质体转化方法相比, 则比较简单, 在筛选转化子时, 不必进行细胞壁再生, 而且用 Li^+ 处理完整酵母细胞的转化率比原生质体的高。但必须用聚乙二醇处理转化细胞, 否则转化率会大幅度下降。

1.1 筛选标记

筛选标记的选择主要是依转化的宿主菌株的遗传特性而定。经常采用的是必需的生物合成酶的基因, 并且与宿主的隐性缺失互补, 如 *Leu2*, *His4*, *Trp1*。很明显, 宿主菌染

染色体必须有标记基因的缺失突变, 而转化的质粒载体含有该基因, 而且只限于转化特定的突变菌株。显性筛选标记可用啤酒酵母本身的基因(如 CUP 1)、或采用非酵母的基因(如 G 418^R)。



1.2 表达载体

目前可采用的载体有多种, 不过, 采用较多的是整合型表达载体和 $2\mu\text{m}$ 质粒载体, 因为这两种表达载体分别具有高度遗传稳定性和高基因剂量, 这两种特性是基因高效表达所必需的 (Volker et al, 1987)。

整合型表达载体 (Hincliffe E, 1993) 主要由 $P^{\text{BR}322}$ 质粒构成, 带有酵母基因 (如 URA3)。这种载体不含有复制起点, 转化基因必须经整合而融入酵母基因组中, 所以这类载体的转化率不高, 一般每 mg DNA 产生 1~10 个转化子。但在转化之前将载体线性化, 能明显地提高转化率 (5~3 000 倍)。外源基因高水平表达一般需要较多的拷贝数, 整合型载体由于要在特定的位点整合而限制了目的基因的拷贝数, 在这方面还有待进一步的研究。

酵母的 $2\mu\text{m}$ 质粒所有的真核生物染色体外遗传因子中研究最多、最深入的。 $2\mu\text{m}$ 质粒表达载体是目前用于外源基因表达的酵母载体中用得最多的。该质粒最大的优点是其高度的遗传稳定性, 而且其拷贝数也较多 (50~100 个拷贝)。目前主要有两类 $2\mu\text{m}$ 质粒表达载体: 一类载体仅含有顺式作用位点, ORI 和 STB, 需要有反式作用的蛋白来维持其稳定性。另一类质粒载体含有顺式和反式作用位点 (以整个 $2\mu\text{m}$ 质粒为基础构建的质粒载体)。第一类载体应用最广泛, 其宿主菌一般只限于含有内源 $2\mu\text{m}$ 质粒的菌株, 后一类载体用来转化 $2\mu\text{m}$ 质粒缺失型菌株。不过由于第一类载体只含有顺式作

用位点,其遗传稳定性比第二类差些,但选择适当的宿主菌和培养基可提高遗传稳定性(Hoekama et al, 1987)。

2 转录

2.1 启动子的结构

RNA 聚合酶 II (RPase II)识别的启动子有两个功能区:上游调控区和 TATA 盒。上游调控区可分为上游激活序列(UAS)和上游抑制序列(URS)。这些序列介导正或负的反式作用的调控蛋白结合,从而促进或抑制 RPase II 的高效结合及结构基因的转录。

TATA 盒在几乎所有的高等真核生物的转录位点上游存在,并在决定转录起始中起重要作用。对酵母而言,TATA 盒在转录起始中起的作用没有高等真核生物的那么明显。首先,有几个酵母基因有多个转录产物,并在基因的 5'不翻译区的不同位点起始转录;其次,在转录起始点和 TATA 盒之间的距离并不确定;最后一点是在酵母的一些结构基因的上游常可发现多个 TATA 盒相似的片段。对转录起点附近的序列的研究(Hahn et al, 1985)表明,有两个重要的保守区:TC(G/A)A 和 RRYRR(R 和 Y 分别为嘌呤和嘧啶残基),而且这些保守区被优先利用。对 PGK(磷酸甘油酸激酶)启动子,好象并不需要有功能的 TATA 盒,不过在转录起点上游有两个片段和 TATA 盒相似,但这两个片段缺失不影响转录起始和转录的整体水平。

Struhl 研究表明在 TATA 盒的上游的 dA^odT 丰富序列为上游激活序列,是转录必需的,一般在 mRNA 转录起始点上游 100 bp 处,去掉这些序列会导致转录水平降低,转录水平还与 dA^odT 的丰富程度有关,一些正的调控蛋白与其结合而激活转录。这些上游激活序列与 mRNA 起始位点的距离很远,并且这个距离是可变的,这种变化使酵母基因的调节方式有所不同,在酵母细胞里,某些基因可能含有一系列作用迭加而又相对独立的 UAS 序列,增加调节的变化幅度。目前 UAS_{GAL}的结构已被确定,由 4 个相连的 17 bp 序列构成,每个序列内有二重对称性,但只有一个序列是 GAL4 结合必需的,并用激活转录(Giniger et al, 1985)。有几种酵母基因是负调控系统控制的,研究较清楚的是编码精氨酸酶的 CAR1 基因,CAR1 启动子有 URS(上游抑制序列),为约 13 bp 的序列。而且 URS 所起的作用与其所处的位置无关,抑制转录活性。另外在 PGK 基因中发现下游激活序列 DAS(Mellor et al, 1987)。

2.2 调控型或组成型基因表达

基因启动子的选择较大地影响基因表达。早期表达外源基因主要是利用糖酵解基因启动子,如 ADHI(乙醇脱氢酶)启动子,PGK 启动子。这些糖酵解启动子的一个共性是具有相对较高水平的组成型转录活性,所以,这类启动子用来介导组成型外源基因高水平的表达。但外源基因的表达水平与其天然条件下相比,其表达水平较低。如果外源基因的产物对宿主菌有害,则组成型高水平表达会在选择性生长条件下降低宿主菌的生长,在非选择性条件下会导致外源基因丢失。高度调控型启动子在外源基因不转录的情况下促进宿主菌生长并大量积累,所以,可以将生长和基因表达暂时性地分开,使宿主菌充分生长之后再诱导外源基因表达,PHO5 启动子调控外源基因表达时,培养基中低浓度的无机磷

酸盐存在会诱导该启动子(Kramer et al, 1984)。

3 翻译

3.1 影响翻译的因素

对翻译起始密码子附近的 mRNA 序列分析表明这一区域不是任意的, 有一保守区: A/C A A/C A A/C A A U A U C U。而且在高水平表达的基因中, 在 AUG 起始密码子前的 7 个位点里缺少鸟苷残基, 而在 -3 和 -1 位点腺苷残基较普遍。这一特性至少在两个外源基因中得到证实。将人的溶菌酶基因的一 3 位点的鸟苷残基(G)去掉, 在起始密码的 5' 添加 3 个腺苷残基(A), 该基因的表达水平提高 6 倍。将人的血清白蛋白基因(HSA)的起始密码区修改更接近酵母的保守区, 其表达水平显著提高(Hinchliffe et al, 1993)。另外, 克隆的 cDNA 序列的 3' 非翻译区也会影响蛋白质的表达水平。

3.2 密码子偏爱性

高水平和低水平表达的基因在密码子使用的频率上有明显的不同。这种偏爱性和起作用的 tRNA 的丰富程度有关。高水平表达的基因有不正常比例的同义密码子与丰富的 tRNA 相应。如 PGK 基因就有密码子偏爱性, 如果将 40% 左右的常用密码子换成使用较少的同义密码子, 其表达水平降低 10 倍, 这可能和翻译水平降低有关, 因为和野生型 PGK 基因相比, 其 mRNA 水平仅降低 3 倍(陈士怡, 1989)。

4 翻译后的加工

4.1 细胞内蛋白

大肠杆菌表达的产物常在细胞内形成不溶的聚合物, 需要经过变性、复性才能恢复其功能。酵母表达的一些蛋白质虽然在细胞内聚结, 但可溶并具有生物活性。现在人们逐步清楚: 具有较多的半胱氨酸残基、形成分子内及分子间二硫键倾向性强的蛋白质的表达水平低些。蛋白质的可溶性及构型对其表达水平的影响程度还不清楚(Skaja et al, 1994)。

4.2 分泌

在外源蛋白质的 N-末端加上适当的信号肽可引导表达产物分泌, 并且成熟的蛋白质能获得正确的构型。现在对信号肽的功能作了广泛的研究, 从结构上确定了 3 个明确的区域: N-末端、中间的疏水区和信号肽的切割位点。其中疏水区的长度、疏水性对分泌重要, 位于疏水区的脯氨酸残基位于 -4、-5 或 -6 位点作用明显, 在其他位点作用不明显。分泌途径为: 从多聚核糖体到内质网腔, 再到高尔基体, 然后通过高度专一性载体运到细胞外。信号肽在分泌过程中被内源性蛋白水解酶切除, 而翻译产物成为成熟的蛋白质并向细胞外分泌。很明显, 要获得高水平分泌, 要选择适当的宿主菌株, 考虑到蛋白质的特性及其它因素。糖基化的方式会影响到蛋白质的分泌, 甚至使分泌途径受阻。另外, 信号肽是加在表达产物的 N-末端, 表达产物分泌时, 信号肽必须保证蛋白质被正确地切下来(Wang, et al, 1996)。

4.3 蛋白质糖基化

酵母能将分泌的蛋白质糖基化。通过天冬酰胺的氨基(N-)或丝氨酸-苏氨酸的羟基(O-), 糖类配体加到蛋白质上。酵母的 N-寡聚糖的装配和其他真核生物的相似, 而 O-糖基化过程却有所不同。酵母的糖基化蛋白质中糖类物质多为甘露糖。很多外源基因在酵母中表达并分泌的产物为糖基化蛋白质, 而蛋白质的糖基化程度不同, 但酵母表达的大多数糖基化蛋白质有生物活性, 而其糖类物质的结构与天然蛋白质所具有的不同。

5 展望

很明显, 酵母是相当好的基因表达的宿主, 可以用来生产细胞内和细胞外蛋白质。其表达水平可通过选择适当的基因表达信号、载体和宿主菌来提高。近几年来, 对酵母作为外源基因表达的宿主的一些限制性问题的研究取得了进展, 可以预料用酵母来生产理想的高效蛋白质, 而且酵母表达的外源基因产物已在市场上出售(如酵母表达的乙肝疫苗), 将来会有更多的酵母表达产物出现在市场。

参 考 文 献

- 陈士怡. 1989. 酵母遗传学. 北京: 科学出版社, 62~88
- Giniger E, Varnum S. 1985. The structure of transposable yeast mating type Loci. *Cell*, 40: 767
- Hahn S, Hoar E. 1985. Yeast recombination; the association between doublestrand gap repair and crossing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7410
- Hinchilffe E, Kenny E. 1993. Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes. *The Yeasts* 5: 327~357
- Hoekama A, Kastelein R. 1987. High frequency transformation of yeast; autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Molecular and Cellular Biology*, 7: 2914
- Ito I, Fukuda Y. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkaline cations. *J Bacteriol*, 153: 163~168
- Kramer R, Dechiara T. 1984. Yeast Transformation; a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 367
- Mellor J, Dobson M. 1987. A rapid chromosomemapping method for cloned fragments of yeast DNA. *Nucleic Acids Research*, 15: 6243
- Skaja A, Hines V. 1994. Protein disulfide isomerase overexpression increases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology and Technology*, 12(4): 381~384
- Volkert F, Broach R. 1987. *Biological Research on Industrial Yeasts*; Vol. 2. Boca Raton, CRC Press 145~170
- Wang X, Wang Z. 1996. G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 45~51

EXPRESSION OF HETEROLOGIOUS GENES IN YEAST

Ma Lijin¹ Yao Ruhua¹ Huang Ziran²

(1 Dept. of Food, South China Univ. of Technol., Guangzhou, 510641;

2 Dept. of Sericulture, South China Agr. Univ.)

Abstract

The essential features of vectors, regulation systems, transformation, transcription, translation and secretion to achieve a high level of heterologous-gene expression in yeast are reviewed, and some problems of heterologous-gene expression are proposed.

Key words yeast; heterologous gene; gene expression

简 讯

发挥科技优势 振兴农村经济

——华南农业大学开展系列科技下乡活动

新年伊始, 中宣部、国家科委、农业部等十部委组织和倡导在全国开展文化、科技、卫生“三下乡”活动, 华南农业大学积极响应农业部的号召, 组织有关专家教授先后到广州市天河区、东莞市石排镇、河源市龙川县、云浮市新兴县、清远市阳山县开展送科技下乡活动, 校党委副书记梁深洪副研究员、副校长罗富和教授亲自带队, 共派出教师 65 人次, 为当地解决了一批技术难题, 给农民送去了适时实用的新技术、新产品, 我校的蔬菜高效低毒农药、新兽药、系列水稻优良品种倍受群众欢迎。1997 年 2 月的科技下乡活动, 形式多样、效果明显, 主要特点有: ①专家教授在村边设点咨询, 到田头现场进行技术指导; ②学校科研处组织专家组与当地政府或公司的领导和科技人员一起, 共同研讨、论证“三高”农业开发项目; ③积极参与地方政府的经济建设, 将学校的科技优势、地方的资源优势、港商的经济优势有机地结合起来, 探讨、规划建立龙川县国际综合示范农场; ④积极争取并得到了广东省高教厅科研处、省科委农村科技处、省计委科技处、省农委科技处等上级主管部门的支持, 特别是在省高教厅科研处的组织下, 与兄弟院校一起在阳山县建立科教兴农基地; ⑤组织专家教授深入山区举办大型的科技成果展示和科技咨询活动, 并赠送我校研制的科研产品、作物优良种子或种苗。(华南农业大学科研处 吕建秋供稿)