

关于重组DNA技术与 基因工程

6 外源基因在酵母中的表达

A 酵母作为表达外源基因受体的特征

酵母的分类学特征

酵母（Yeast）是一群以芽殖或裂殖方式进行无性繁殖的单细胞真核生物，分属于子囊菌纲（子囊酵母）、担子菌纲（担子酵母）、半知菌类（半知酵母），共由56个属、500多个种组成。如果说大肠杆菌是外源基因最成熟的原核生物表达系统，则酵母菌是最成熟的真核生物表达系统。

6 外源基因在酵母中的表达

A 酵母作为表达外源基因受体的特征

酵母表达外源基因的优势

- 全基因组测序，基因表达调控机理比较清楚，遗传操作简便
- 具有原核细菌无法比拟的真核蛋白翻译后加工系统
- 大规模发酵历史悠久、技术成熟、工艺简单、成本低廉
- 能将外源基因表达产物分泌至培养基中
- 不含有特异性的病毒、不产内毒素，美国FDA认定为安全的基因工程受体系统（Generally Recognized As Safe）
- 酵母菌是最简单的真核模式生物

6 外源基因在酵母中的表达

B 酵母的宿主系统

- 广泛用于外源基因表达的酵母宿主
- 提高重组蛋白表达产率的突变宿主
- 抑制超糖基化作用的突变宿主
- 减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变宿主

广泛用于外源基因表达的酵母宿主

目前已广泛用于外源基因表达和研究的酵母包括：

酵母属 如**酿酒酵母** (*Saccharomyces cerevisiae*)

克鲁维酵母属 如**乳酸克鲁维酵母** (*Kluyveromyces lactis*)

毕赤酵母属 如**巴斯德毕赤酵母** (*Pichia pastoris*)

裂殖酵母属 如**非洲酒裂殖酵母** (*Schizosaccharomyces pombe*)

汉逊酵母属 如**多态汉逊酵母** (*Hansenula polymorpha*)

其中酿酒酵母的遗传学和分子生物学研究最为详尽，但巴斯德毕赤酵母表达外源基因最理想。

提高重组蛋白表达产率的突变宿主

能导致酿酒酵母中重组蛋白产量提高或质量改善的突变类型：

突变类型	生物效应	作用位点
<i>ssc1</i>	改善重组蛋白分泌	钙离子依赖型的ATP酶
<i>ssc2</i>	提高重组蛋白表达	转录后加工
<i>rgr1</i>	提高重组蛋白表达	转录水平
<i>ose1</i>	提高重组蛋白表达	转录水平
<i>ssc11</i>	改善重组蛋白分泌	羧肽酶Y
<i>rho⁻</i>	提高重组蛋白表达	转录水平

抑制超糖基化作用的突变宿主

许多真核生物的蛋白质在其天门冬酰胺侧链上接有寡糖基团，它们常常影响蛋白质的生物活性。整个糖单位由**糖基核心**和**外侧糖链**两部分组成。

酵母菌普遍拥有蛋白质的糖基化系统，但野生型酿酒酵母对异源蛋白的糖基化反应很难控制，呈超糖基化倾向，因此超糖基化缺陷株非常重要。

能抑制超糖基化的突变类型

突变类型

生物效应

mnn

甘露糖生物合成缺陷型

alg

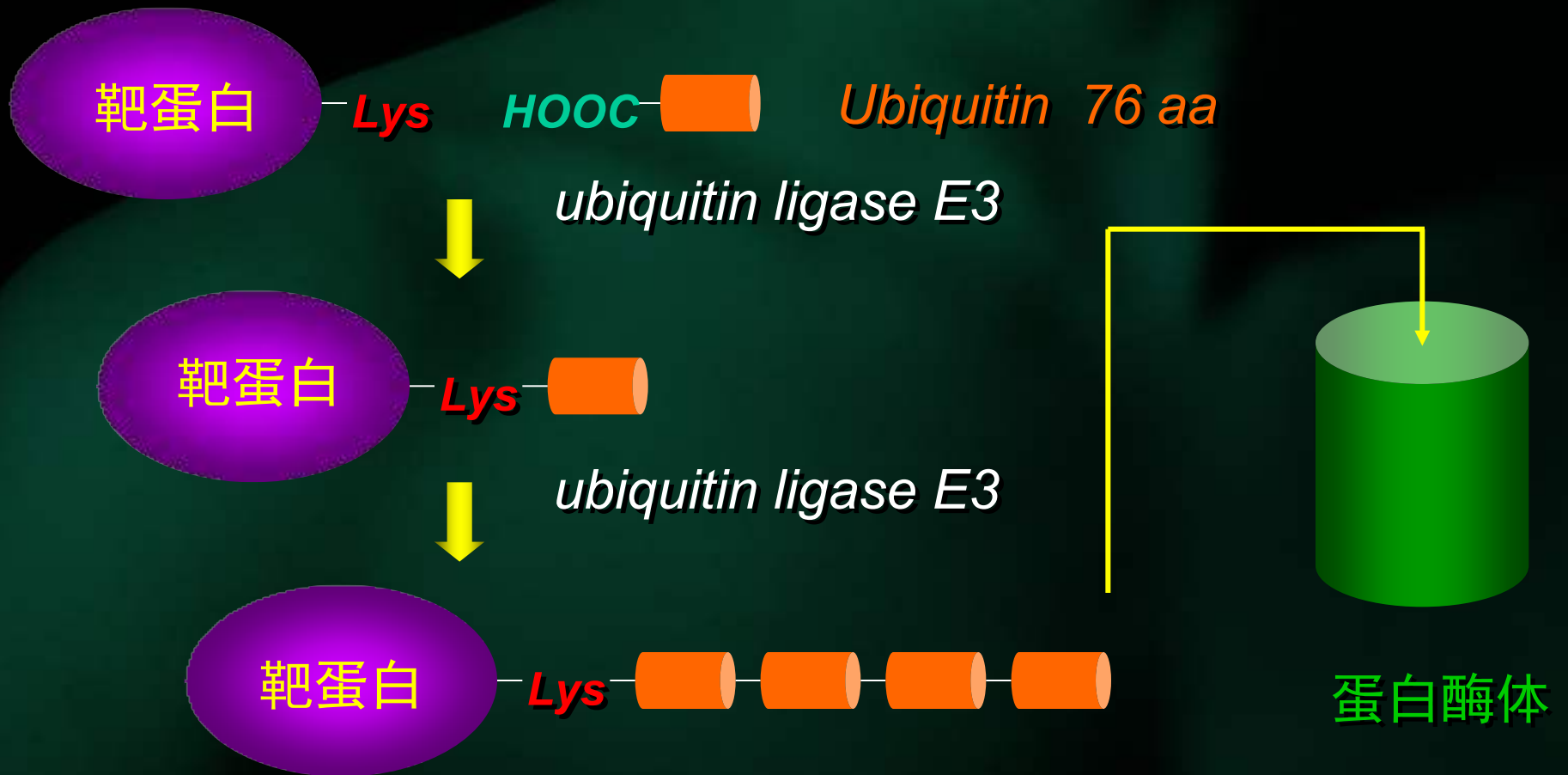
天门冬酰胺侧链糖基化缺陷型

och

外侧糖链添加缺陷型

减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变宿主

泛素介导的蛋白质降解作用



减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变宿主

酵母菌泛素依赖型蛋白降解系统的编码基因

酵母菌共有四个泛素编码基因：

<i>UBI 1</i>	编码泛素-羧基延伸蛋白52 (CEP52)	对数生长期表达	稳定期关闭
<i>UBI 2</i>	编码泛素-羧基延伸蛋白52 (CEP52)	对数生长期表达	稳定期关闭
<i>UBI 3</i>	编码泛素-羧基延伸蛋白76 (CEP76)	对数生长期表达	稳定期关闭
<i>UBI 4</i>	编码泛素五聚体	对数生长期关闭	稳定期表达

酵母菌共有七个泛素连接酶基因：

UBC 1、*UBC 2*、*UBC 3*、*UBC 4*、*UBC 5*、*UBC 6*、*UBC 7*

减少泛素依赖型蛋白降解作用的突变宿主

泛素降解途径衰减的酿酒酵母

*UBI 4*缺陷型:

在酿酒酵母菌中，泛素主要由*UBI 4*基因表达，*UBI 4*突变株能正常生长，但细胞内游离泛素分子的浓度比野生株要低得多，因此*UBI 4*缺陷突变株是外源基因表达理想的受体。

*UBA 1*缺陷型:

*UBA1*编码泛素激活酶E1，*UBA1*突变株是致死性的，但其等位基因缺陷是非致死性的，而且也能削弱泛素介导的蛋白降解。

Ubc4 - ubc5 双突变型:

七个泛素连接酶基因的突变对衰减蛋白降解作用同样有效。

6 外源基因在酵母中的表达

C 酵母的载体系统

- 酵母中的野生型质粒
- 酵母克隆表达质粒的构建

酵母中的野生型质粒

酿酒酵母中的 2μ 环状质粒

几乎所有的酿酒酵母中都含有 2μ 双链状质粒，拷贝数达50至100个。

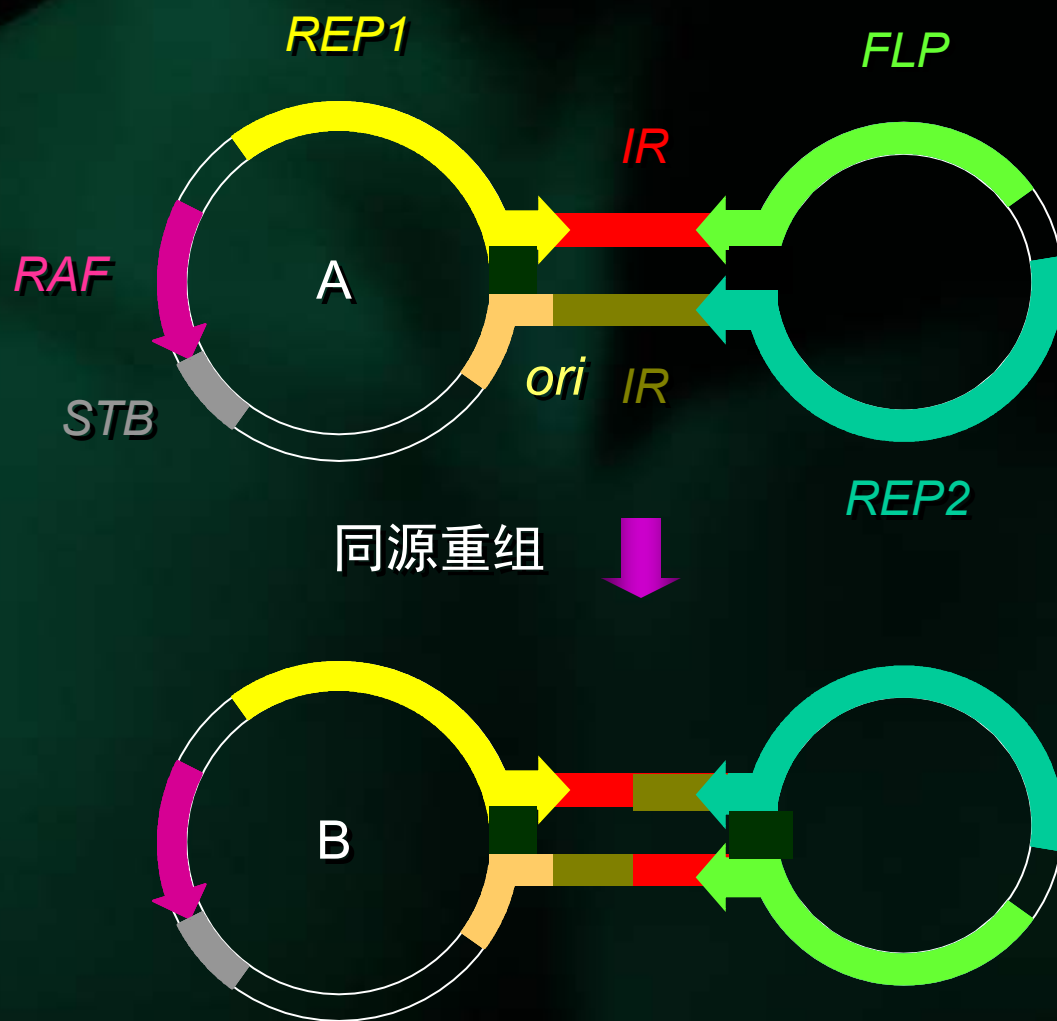
IRs 反向重复序列，600 bp，重组

FLP 编码产物驱动*IRs*的同源重组

REP 编码产物控制质粒的稳定性

STB *REP*的结合位点

接合酵母属中的pSR1和pSB1，以及克鲁维酵母属中的pKD1等均与 2μ 质粒类似。



酵母克隆表达质粒的构建

含有ARS的YRp质粒的构建

ARS为酵母菌中的自主复制序列，0.8-1.5kb，染色体上每30-40kb就有一个ARS元件。酵母菌自主复制型质粒的构建组成包括复制子、标记基因、提供克隆位点的大肠杆菌质粒DNA。

以ARS为复制子的质粒称为**YRp**

以2 μ 质粒上的复制元件为复制子的质粒称为**YE μ**

上述两类质粒在酿酒酵母中的拷贝数最高可达200个，但培养几代后，质粒的丢失率高达50%-70%，主要是由于分配不均匀所致。

酵母克隆表达质粒的构建

含有CEN的YCp质粒的构建

CEN为酵母菌染色体DNA上与染色体均匀分配有关的序列

将CEN DNA插入含ARS的质粒中，获得的新载体称为**YCp**

YCp质粒具有较高的有丝分裂稳定性，但拷贝数只有1 - 5个

含有TEL的YAC质粒的构建

酵母克隆表达质粒的构建

含有酵母菌染色体DNA同源序列的Yip质粒的构建

在大肠杆菌质粒上组装酵母菌染色体DNA特定序列和标记基因，构建出来的质粒称为Yip。目的基因表达盒通常插在染色体DNA特定序列中，这样目的基因就能高效整合入酵母菌特定的染色体DNA区域。

6 外源基因在酵母中的表达

D 酵母的转化系统

- 酵母菌的转化程序
- 转化质粒在酵母细胞中的命运
- 用于转化子筛选的标记基因

酵母的转化程序

酵母原生质体转化法

早期酵母菌的转化都采用在等渗缓冲液中稳定的原生质体转化法。在 Ca^{2+} 和PEG的存在下，转化细胞可达原生质体总数的1-2%。但该程序操作周期长，而且转化效率受到原生质再生率的严重制约。

原生质体转化法的一个显著特点是，一个受体细胞可同时接纳多个质粒分子，而且这种共转化的原生质体占转化子总数的25-33%。

酵母的转化程序

碱金属离子介导的酵母完整细胞的转化

酿酒酵母的完整细胞经碱金属离子（如Li⁺等）、PEG、热休克处理后，也可高效吸收质粒DNA，而且具有下列特性：

- 吸收线型DNA的能力明显大于环状DNA，两者相差80倍
- 共转化现象极为罕见

酵母的转化程序

酵母电击转化法

酵母菌原生质体和完整细胞均可在电击条件下吸收质粒DNA，但在此过程中应避免使用PEG，它对受电击的细胞具有较很大的负作用。电击转化的优点是不依赖于受体细胞的遗传特征及培养条件适用范围广，而且转化率可高达 $10^5 / \mu\text{g DNA}$ 。

转化质粒在酵母细胞中的命运

- 单双链DNA均可转化酵母菌，但单链的转化率是双链的10-30倍；
- 含有复制子的单链质粒进入细胞后，能准确地转化为双链并复制；
- 不含复制子的单链质粒进入细胞后，能高效地同源整合入染色体
这对于体内定点突变酵母基因组极为有利；
- 克隆在YIp整合型质粒上的外源基因，如果含有受体细胞的染色体DNA的同源序列，会发生高频同源整合，整合子占转化子总数的50-80%。

用于转化子筛选的标记基因

营养缺陷型的互补基因

用于酵母菌转化子筛选的标记基因主要有**营养缺陷型**互补基因和**显性基因**两大类：

营养缺陷型互补基因主要有氨基酸和核苷酸生物合成基因，如：

LEU、*TRP*、*HIS*、*LYS*、*URA*、*ADE*

但对于多倍体酵母来说，筛选营养缺陷型的受体非常困难。

用于转化子筛选的标记基因 显性标记基因

显性标记基因的编码产物大都是毒性物质的抗性蛋白

标记基因	编码产物	遗传表型
<i>aph</i>	氨基糖苷转移酶	抗G418
<i>cat</i>	氯霉素乙酰转移酶	抗氯霉素
<i>dhfr</i>	二氢叶酸还原酶	抗氨甲喋呤和磺胺
<i>cup1</i>	铜离子螯合物	耐受铜离子
<i>suc2</i>	蔗糖转化酶	耐受高浓度蔗糖
<i>ilv2</i>	乙酰乳糖合成酶	抗硫酰脲除草剂

6 外源基因在酵母中的表达

E 酵母的表达系统

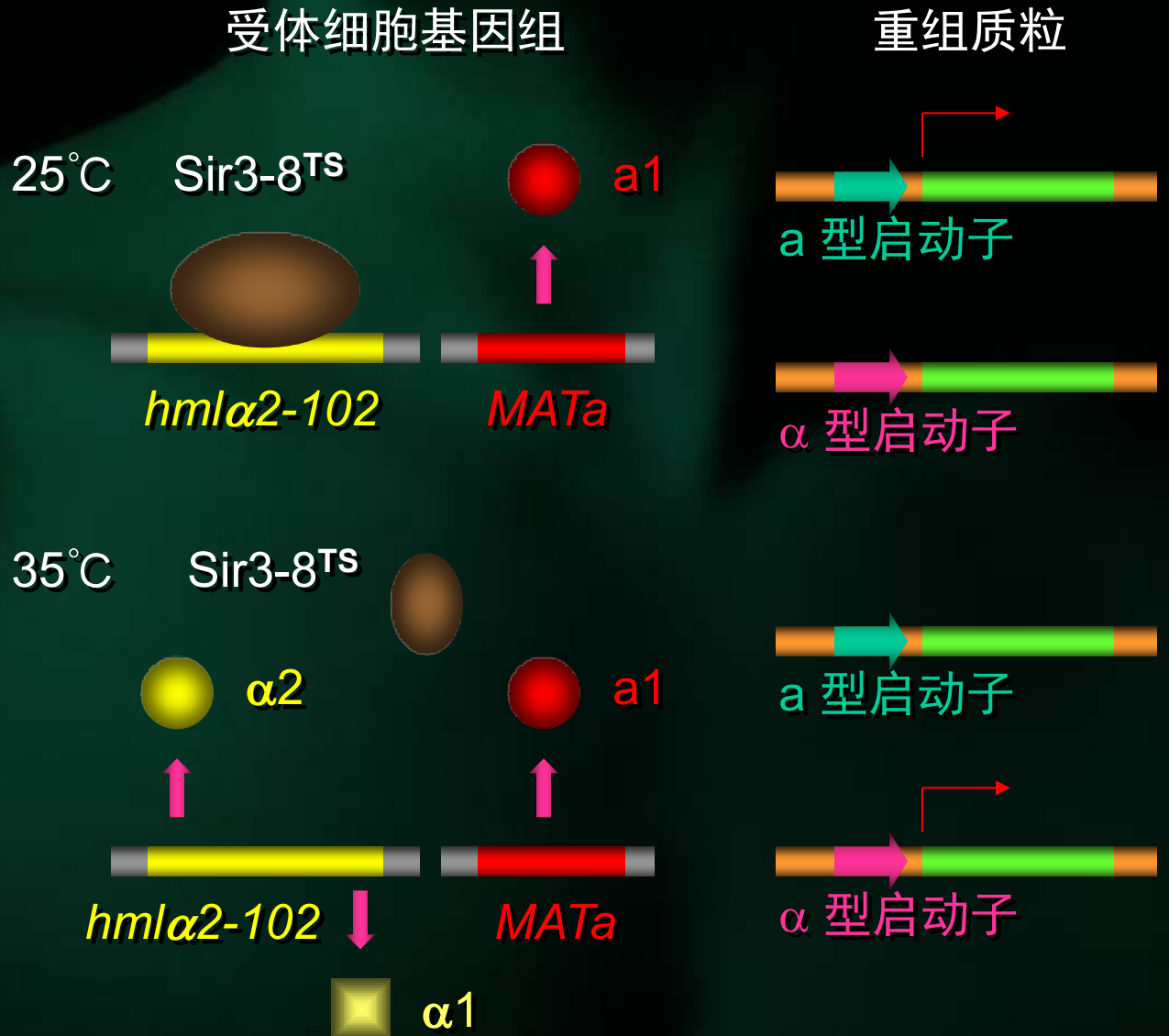
- 酵母菌启动子的可控性
- 外源基因在酵母菌中表达的限制因素
- 酵母菌表达系统的选择

酵母启动子的可控性 温度控制型启动子

a - α 型启动子:

酿酒酵母有a和 α 两种单倍体，分别由MATa和MAT α 两个等位基因决定。

α 1因子决定 α 细胞特征表达
 α 2因子阻遏a细胞特征表达
a1-a2阻遏 α 细胞特征表达
编码 α 2因子的基因突变型
*hml α 2-102*能产生 α 2变体，
它能灭活a1，同时阻遏a型

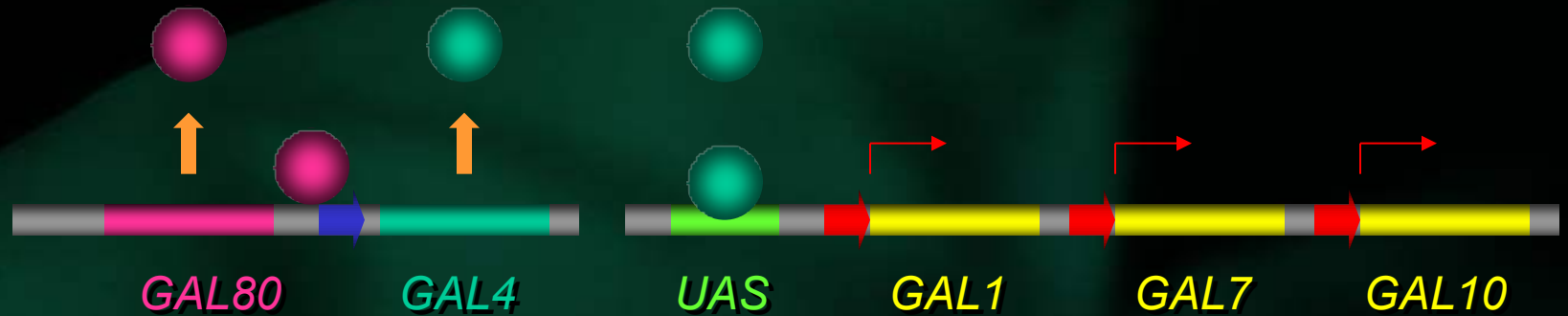


酵母启动子的可控性

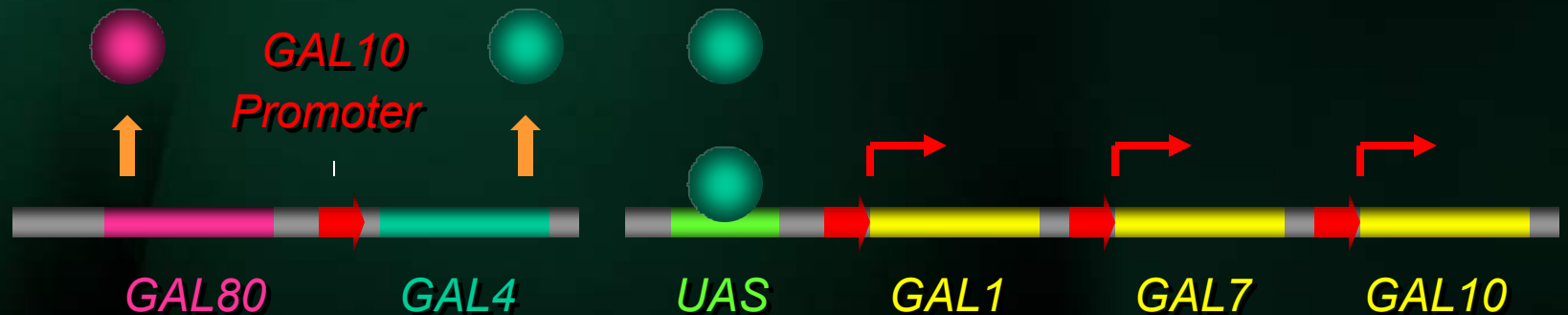
超诱导型启动子

酿酒酵母
的半乳糖
利用酶系
由 *GAL1*
*GAL7*和
GAL10
基因编码

半乳糖诱导效果不明显，基因基底水平表达



半乳糖诱导时，*GAL4*高效表达，*GAL1*、*GAL7*、*GAL10*超高效表达



外源基因在酵母中表达的限制因素

- 外源基因稳态mRNA的浓度
- 外源基因mRNA的翻译活性
- 酵母菌对密码子的偏爱性

在酿酒酵母中，高丰度的蛋白质（如甘油醛-3-磷酸脱氢酶 **GAPDH**、磷酸甘油激酶**PKG**、乙醇脱氢酶**ADH**）中**96%**以上的氨基酸是由**25**个密码子编码的。

酵母表达系统的选择

酿酒酵母表达系统

酿酒酵母的基因表达系统最为成熟，包括转录活性较高的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 *GAPDH*、磷酸甘油激酶基因 *PKG*、乙醇脱氢酶基因 *ADH* 所属的启动子，多种重组外源蛋白获得成功表达。

酿酒酵母表达系统的最大问题在于其超糖基化能力，往往使得有些重组蛋白（如人血清白蛋白等）与受体细胞紧密结合，而不能大量分泌。这一缺陷可用非酿酒酵母型的表达系统来弥补。

酵母表达系统的选择

乳酸克鲁维酵母表达系统

乳酸克鲁维酵母的双链环状质粒pKD1已被广泛用作重组异源蛋白生产的高效表达稳定性载体，即便在无选择压力的条件下，也能稳定遗传40代以上。

乳酸克鲁维酵母表达分泌型和非分泌型的重组蛋白，性能均优于酿酒酵母表达系统。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：
<https://d.book118.com/248024100131006053>