

一种快速构建巴斯德毕赤酵母外源基因表达载体的新方法

许岚¹, 余明华², 钟星^{1*}

1. 湖北京大学知行学院生物与化学工程学院, 湖北 武汉 430011

2. 国药集团扬州威克生物工程有限公司, 江苏 扬州 225200

DOI: 10.61369/SSSD.2025150037

摘要 : 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是目前工业发酵大规模生产重组蛋白最具吸引力的真核表达系统之一。本研究利用两步 PCR 方法快速构建了毕赤酵母线性表达载体, 并以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 葡萄糖氧化酶 AGOX 为例, 成功构建了 AGOX 毕赤酵母线性表达载体, 实现了其在 *Pichia pastoris* GS115 中的高效表达。该方法较传统酶切 - 连接克隆方法简单、快速, 为本实验室所首次报导, 该技术为高通量大规模毕赤酵母表达重组蛋白奠定了基础。

关键词 : 毕赤酵母; 重叠 PCR; 重组蛋白药物; 载体

A New Method for Rapid Construction of Heterologous Gene Expression Vectors in *Pichia Pastoris*

Xu Lan¹, Yu Minghua², Zhong Xing^{1*}

1. College of Biological and Chemical Engineering, Zhixing College, Hubei University, Wuhan, Hubei 430011

2. Sinopharm Yangzhou Weike Bioengineering Co., Ltd., Yangzhou, Jiangsu 225200

Abstract : *Pichia pastoris* expression system is one of the most attractive eukaryotic expression systems for the industrial fermentation production of recombinant at present. In this study, a linear expression vector of *Pichia pastoris* was rapidly constructed by a two-step PCR method, and AGOX of *Aspergillus niger* was taken as an example. The AGOX *Pichia pastoris* linear expression vector was successfully constructed and its efficient expression in *Pichia pastoris* GS115 achieved. The method was simple and rapid compared with the traditional enzyme cutting and connecting cloning method, which was reported for the first time in our laboratory, and the technique laid a for high-throughput and large-scale expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*.

Keywords : *pichia pastoris*; overlap PCR; recombinant protein drug; vector

目前主流应用的重组蛋白表达系统有大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、昆虫杆状病毒表达系统和哺乳动物细胞表达系统^[1-4]。大肠杆菌表达系统由于缺乏糖基化修饰, 易形成包涵体而备受诟病; 昆虫杆状病毒表达系统和哺乳动物细胞表达系统生产蛋白多以活性形式分泌, 并且糖基化修饰系统完善, 因此该系统在医药领域应用较广泛, 但其生产成本较高。以巴斯德毕赤酵母表达系统为代表的酵母表达系统则兼具大肠杆菌表达系统和昆虫杆状病毒表达系统和哺乳动物细胞表达系统的优点, 巴斯德毕赤酵母是单细胞真核生物, 具有细胞生长迅速、培养基原料简单、可分泌表达重组蛋白、糖基化修饰适中等优点^[5], 因而被广泛应用于医药、工业领域用于生成重组蛋白。

巴斯德毕赤酵母表达系统是目前最常用的真核蛋白表达系统之一, 广泛应用于工业规模的蛋白质制备。目前已有上千种蛋白在毕赤酵母系统中得到成功地表达。在医药蛋白领域, 已有干扰素 (INF)、肿瘤致死因子 (TNF)、胰岛素 (insulin)、乙肝表面抗原 (HBsAg)、人血清白蛋白 (HSA)、表皮生长因子 (EGF) 等多种蛋白使用毕赤酵母表达实现商品化生产^[6]。在工业酶制剂领域, 也有许多酶制剂包括植酸酶 (phyA)、脂肪酶 (lipA)、甘露聚糖酶 (manA)、木聚糖酶^[7]等利用毕赤酵母实现了产业化规模的生产。

巴斯德毕赤酵母表达外源基因依赖于特定的载体将外源基因表达盒式结构转移到宿主菌中进行表达。常用的载体有 pPIC 系列 (包括 pPIC9K、pPIC3K、pPIC3.5K), pPICZ α 系列 (pPICZ α 、pPICZ α -A) 和 pA0815 及 pGAPZ α 等, 该载体均为 life technologies 公司商品化所有。在使用这些商品化载体的时候一般需要通过抽提载体、酶切载体、连接外源基因、转化大肠杆菌、筛选重组子、再抽提重组表达载体、线性化表达载体、转化巴斯德毕赤酵母等步骤, 一般获得重组基因工程菌需要 2-3 周时间, 限制了其在通量化表达外源基因方面的应用。

本研究通过两步法组装 PCR 技术将巴斯德毕赤酵母表达盒式结构左臂、目的基因和表达盒式结构右臂进行扩增, 来实现快速组装毕赤酵母线性表达载体, 以减少离体耗时的多步酶切、连接、转化步骤, 利用该技术可以高通量克隆外源基因, 实现巴斯德毕赤酵母流水线化表达异源基因。

作者简介: 许岚, 湖北京大学知行学院生物与化学工程学院中级实验师; 余明华, 国药集团扬州威克生物工程有限公司。

通信作者: 钟星, 湖北鄂州人, 湖北京大学知行学院生物与化学工程学院副教授, 本研究受省部共建色催化与酶工程国家重点实验开放课题 (SKLBEE2019019) 资助。

一、材料与方法

(一) 菌株和质粒

载体 pHBM905A 来自湖北大学生命科学院馈赠^[8]; 葡萄糖氧化酶基因 AGOX 分离自黑曲霉 Aspergillus niger; Pichia pastoris GS115 购自 life technologies (USA) 公司。

(二) 试剂

蛋白质分子量标准购于 Thermo, USA; BCA 蛋白质定量试剂盒购自上海碧云天公司。质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司，引物均在上海桑尼生物科技有限公司合成。

(三) 方法

1. PCR 扩增巴斯德毕赤酵母表达盒左臂 (FL) 、右臂 (FR) 和葡萄糖氧化酶基因 AGOX

根据 pHBM905A 的载体序列设计两对引物 His4F1 和 CpoIF、CpoIR 和 His4R1，分别对巴斯德毕赤酵母表达盒左臂 (FL) His4L-5'AOX1-S 序列和右臂 (FR) 3'AOX1 (TT) -His4R 序列进行扩增，产物胶回收，定量到终浓度 100ug/ml。根据 NCBI 数据库核苷酸序列查询，以黑曲霉 Aspergillus niger AGOX (GenBankID: DQ836361.1) 为例设计一对引物 pichaGOXAF 和 pichaGOXAR，以黑曲霉 Aspergillus niger 总 DNA 为模板，扩增葡萄糖氧化酶基因 AGOX，产物胶回收，定量到终浓度约为 100ug/ml。

2. 重叠 PCR 扩增组装巴斯德毕赤酵母线性表达载体

取毕赤酵母表达盒左臂 (FL) His4L-5'AOX1-S DNA 片段和毕赤酵母表达盒右臂 (FR) 3'AOX1 (TT) -His4R DNA 片段和 AGOX DNA 片段各 100ng 作为 DNA 模板，以引物对 His4F1 和 His4R1 进行 PCR 扩增，PCR 产物浓缩定量到终浓度约为 300ug/ml，待用。

3. 毕赤酵母转化

取 300ng 线性化 DNA 片段与 10ul 电转化 Pichia pastoris GS115 感受态细胞冰上混匀，转移到 2mm 电转化杯，电击转化，转化条件如下：电场强度 7,000 V/cm，电容设定 25uF。电转细胞迅速用无菌去离子水收集，涂布 MD 平板，28°C 培养 48 小时，菌落 PCR 鉴定转化子。

4. 平板酶活检测

将鉴定正确的转化子以无菌牙签转移到 BMGY 固体培养基，每日补加 1% 甲醇顶盖诱导，28°C 培养 2 天，制备顶层底物显色软琼脂（邻联茴香胺 0.2mg/ml、葡萄糖 3%、辣根过氧化物酶 3U/ml、琼脂粉 1%），28°C 温育 2 小时显色观察。

二、结果

(一) PCR 两步法构建毕赤酵母线性化载体的原理

传统方法基于质粒载体构建毕赤酵母载体，需要多步的抽提质粒、酶切、连接、转化、筛选、线性化载体；本研究利用 PCR 方法直接扩增待表达基因和毕赤酵母表达、整合元件，通过 PCR

方法快速组装成为线性表达载体，该线性载体可直接用于毕赤酵母转化。其原理图如图 -1 所示。

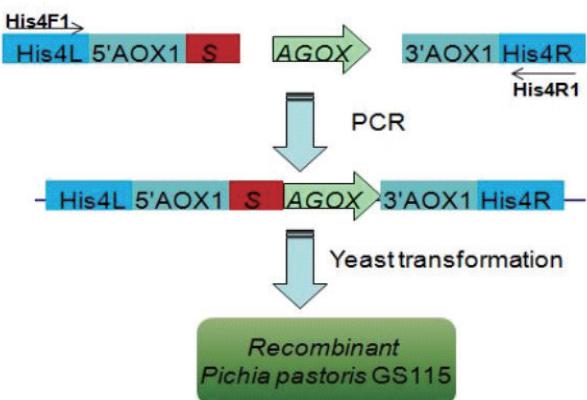


图 -1 PCR 两步法构建毕赤酵母线性化表达载体策略图

(二) 巴斯德毕赤酵母线性表达载体的构建

以质粒 DNA pHBM905A 为模板，引物 His4F1/CpoIF、CpoIR/His4R1 分别扩增巴斯德毕赤酵母表达盒左臂 (FL) His4L-5'AOX1-S 序列和表达盒右臂 (FR) 3'AOX1 (TT)-His4R 序列，经检测其大小分别为 1.9kb 和 3.5kb (图 -2 A)，与预期的理论值一致。为了验证本方法的有效性，本研究以 Aspergillus niger AGOX 为表达模式基因，以引物 pichaGOXAF 和 pichaGOXAR，对黑曲霉 Aspergillus niger 总 DNA 模板进行扩增获得葡萄糖氧化酶基因 AGOX，其大小约为 1.8kb (图 -2 B)。

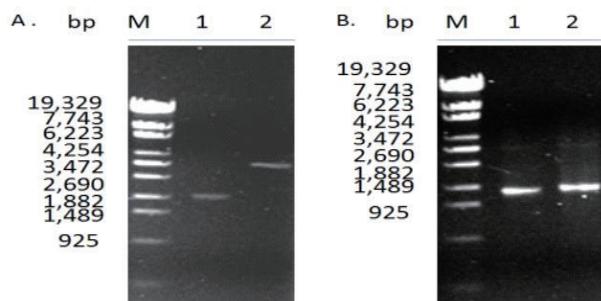


图 -2 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增的巴斯德毕赤酵母表达盒左臂 (FL)、右臂 (FR) 和 AGOX 基因

将上述片段经琼脂糖凝胶 DNA 回收后作为模板，以引物 His4F1/His4R1 扩增得到巴斯德毕赤酵母线性表达载体，经琼脂糖凝胶电泳检测其大小约为 7.2kb (图 -3)，表明 His4L-5'AOX1-S-AGOX-3'AOX1 (TT)-His4R 表达盒式结构构建成功。

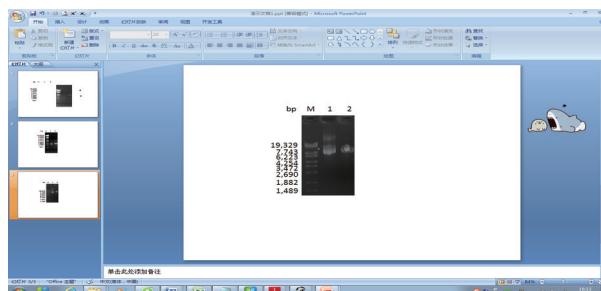


图 -3 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增的巴斯德毕赤酵母线性表达载体

(三) AGOX 线性表达载体转化巴斯德毕赤酵母及其平板酶活检测

本研究通过两步 PCR 法成功的构建了 manA, phyA, AGOX, PGOX 等5个基因的巴斯德毕赤酵母线性表达载体，为了验证其功能，以 AGOX 基因为例，将构建载体，电转化 *Pichia pastoris* GS115 获取转化子。通过底物平板筛选阳性转化子，由结果（图 -4 A）可知 AGOX 基因已经成功在巴斯德毕赤酵母中表达。色淀圈大小可能与 AGOX 的整合拷贝数相关。随机挑选四个阳性菌落进行菌落 PCR 鉴定，琼脂糖凝胶电泳分析显示，以 His4F1/His4R1 可以扩增得到阳性条带，其大小约为 1.8kb（图 -4 B），其大小与 AGOX 基因大小相符，表明 AGOX 已经成功转化到巴斯德毕赤酵母中，通过平板酶活检测和酵母菌落 PCR 鉴定表明 AGOX 线性表达载体构建成功。

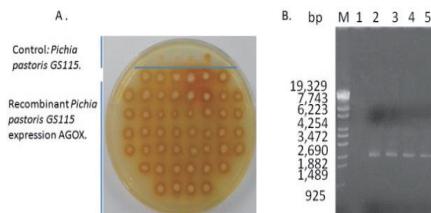


图 -4 重组毕赤酵母酶活检测和菌落 PCR 鉴定

(四) 葡萄糖氧化酶 AGOX 在巴斯德毕赤酵母中的表达

本研究利用 PCR 方法成功地构建了 AGOX 巴斯德毕赤酵母线性表达载体，并成功的构建了重组基因工程菌。从底物平板上随机挑选3个独立的克隆，进行培养，甲醇诱导蛋白质表达后，经 SDS-PAGE 分析如图 -5 所示，3个独立克隆经诱导后产物在理论大小（约 64kD）处均有蛋白条带变粗，表明有目标蛋白

质表达。蛋白表达量通过 BCA 法定量为 1.38g/L，粗酶液酶活为 2,130U/ml，较目前已有文献报道高^[9]。

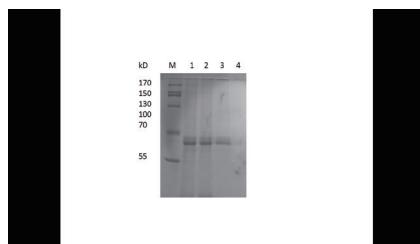


图 -5 SDS-PAGE 检测重组 AGOX 在巴斯德毕赤酵母 GS115 中的表达

三、讨论

传统的质粒系统构建重组巴斯德毕赤酵母时间周期一般需要 2-3 周时间。本研究的两步 PCR 方法可以省去了常规大肠杆菌重组操作和酶切操作，可以将时间周期缩短至 3 天；该方法可以实现高度自动化和通量化基因表达生产重组蛋白，可降低重组蛋白的生产成本；并且由于 PCR 可通量化引入基因库元件和突变体库元件，因此该方法也适用于毕赤酵母细胞构建表达文库、随机突变体文库和定向突变体文库^[10]。本论文研究通过两步 PCR 方法快速构建了葡萄糖氧化酶的巴斯德毕赤酵母线性表达载体及其重组巴斯德毕赤酵母基因工程菌，实现了其高活性表达，证明了该方法的可行性和高效性，该研究为高通量大规模毕赤酵母表达重组蛋白，研究基因的结构、功能和功能蛋白的产业化推广应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E.coli*: Roadblocks and reinforcements[J]. Int J Biol Macromol. 2017, 8130(17): 32382–32386.
- [2] Mattanovich D. Recombinant protein production in yeasts[J]. Methods Mol Biol. 2012, 824:329–358.
- [3] Osz-Papai J. Insect cells–baculovirus system for the production of difficult to express proteins[J]. Methods Mol Biol. 2015, 1258:181–205.
- [4] Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production [J]. Biotechnol Adv. 2012, 30(5):1158–1170.
- [5] Mokdad-Gargouri R. Yeasts as a tool for heterologous gene expression[J]. Methods Mol Biol. 2012, 824(9):359–370.
- [6] Ahmad M. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Appl Microbiol Biotechnol. 2014, 98(12):5301–5317.
- [7] Rabert C. Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system [J]. Braz J Microbiol. 2013, 44(2):351–356.
- [8] Wang Fei. Expression and Characterization of the RKOD DNA Polymerase in *Pichia pastoris*[J]. PLoS One. 2015, 10(7): 1–12.
- [9] Andreas K Gombert. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Microb Cell Fact, 2010, 9(4): 1–12.
- [10] Eisenberg D. Protein function in the post-genomic era[J]. Nature, 2000, 405(6788): 823–826.