

# 毕赤酵母重组菌株直接基因缺失方法的研究

倪振华 周祥山\* 张元兴

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘要** 毕赤酵母重组菌在表达外源蛋白时往往存在比较严重的蛋白降解现象,一种可供选择的解决办法就是将其起作用的某种蛋白酶基因缺失,但目前国内外研究主要集中于非重组毕赤酵母的基因缺失,直接对重组菌进行基因缺失的研究较少。以现有的毕赤酵母基因重组菌(CS115Hir)为宿主菌,分别采用有标记的插入替换方法和无标记的 Pop-In/Pop-Out 方法直接缺失其 *PRC1* 蛋白酶基因和 *KEX1* 蛋白酶基因。缺失菌株经测序分析,结果显示发生了理论的基因缺失。在此基础上本文比较了这两种方法的各自优缺点,探讨了它们的不同用途,为直接在毕赤酵母重组菌中进行基因缺失提供了有益的参考。

**关键词** 毕赤酵母重组菌,基因缺失

中图分类号:Q81 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1198-04

## Application of Direct Gene Disruption Method in Recombinant *Pichia pastoris*

NI Zhen-Hua ZHOU Xiang-Shan\* ZHANG Yuan-Xing

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**Abstract** Proteolytic degradation has been a severe problem when *Pichia pastoris* is employed to express recombinant proteins. One alternative method to circumvent this problem is to construct protease gene disruptant. However, the main study of gene disruption is focused on nonrecombinant *Pichia pastoris* rather than recombinant strain. In our study, we established two different methods to directly disrupt *PRC1* and *KEX1* gene in recombinant *Pichia pastoris*. On the basis of this, we further discussed and compared the application and advantages of both methods.

**Key words** Recombinant *Pichia pastoris*, Gene deletion

毕赤酵母表达系统是近十几年迅速发展起来的表达体系,迄今为止,已有上百种<sup>[1]</sup>外源蛋白在此体系中成功表达。虽然毕赤酵母表达的外源蛋白产量较高,但是易受到蛋白酶的降解<sup>[2]</sup>。本实验室在毕赤酵母中表达水蛭素时也发现,表达的水蛭素会被蛋白酶降解成多个组分<sup>[3]</sup>。除了改变发酵条件(如降低培养基的 pH 值和培养温度,向培养基中添加酵母提取物等<sup>[4]</sup>)来减少降解外,缺失(或者敲除)降解相关的蛋白酶基因也是一个很好的解决办法。

在毕赤酵母中常用的基因缺失策略是先缺失原始宿主菌株中的蛋白酶基因,然后再将含有外源蛋白的质粒整合进去,Thomas Boehm 等在毕赤酵母中表达 Endostatin 时就采用此策略成功解决了 Endostatin 降解的问题<sup>[5]</sup>。另外,将抗凝抗转移蛋白表达质粒转移到蛋白酶基因缺失的毕赤酵母中后,

其降解也得到了一定的改善<sup>[6]</sup>。然而对于一株已经高产的毕赤酵母外源蛋白表达菌株来说,上述策略可能并不是最合适的。在毕赤酵母中外源蛋白的表达量与质粒的拷贝数、整合位点等密切相关<sup>[7]</sup>,由于表达质粒在毕赤酵母中的整合是一个非常随机的过程,因此筛选到新高产菌株的工作量会非常大,而且在新筛选到的蛋白酶基因缺失菌株中外源蛋白的表达量也有可能没有原始菌株高。因此如果能直接在毕赤酵母工程生产菌中进行基因缺失,将有助于减少筛选高产菌株的风险和工作量。但目前国内外研究主要集中于非重组毕赤酵母的基因缺失<sup>[8-9]</sup>,直接对工程生产菌进行基因缺失的研究较少。

因此本实验研究了两种不同的直接基因缺失方法,采用上述方法直接在表达水蛭素的基因工程毕赤酵母菌中缺失 *PRC1* 蛋白酶基因和 *KEX1* 蛋白酶

\* 通讯作者 Tel: 021-64253065, E-mail: xszhou@ecust.edu.cn

收稿日期:2007-04-18, 修回日期:2007-06-01

基因,在此基础上比较了这两种方法的各自优缺点,探讨了它们的不同用途。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 菌株 *E. coli* Top10, 产水蛭素的毕赤酵母 GS115Hir 均由本实验室保存。质粒 pPICZA, pMD18-T, pPOPble 均由本实验室保存。

**1.1.2 工具酶和试剂** :Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒均为天根生物公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化及常规的 DNA 克隆操作** 见参考文献 [10], 毕赤酵母感受态细胞的制备和转化见参考文献 [11]。

**1.2.2 引物设计及 PCR 条件** :PCR 引物(表 1)为上海生工公司合成。PCR 条件皆为 95℃, 1min; 50℃, 1min; 72℃, 2min, 30 个循环。

表 1 实验中使用的引物

Name	Sequence
K1	5-CCGTGCTCTAGAAACACAAGACCTT-3
K2	5-CTTATCGTCGACAAGGCACCATCCATAGA-3
K3	5-TGCCCTTGTGCAGGATAAGAAGGACAATAG-3
K4	5-CCGGAATTGCTAGATTGGCTGTTCG-3
B1	5-GAAAGTACTTGGTATTTCCCACTCC-3
B2	5-GAAGATCTTACTCTGTCCGGTTT-3
V1	5-AGATTCTGAGTGGAACTTTTGGTGA-3
V2	5-TTACTCCGTCAGCAAAAACGCTAG-3
P1	5-CGAACAAATGGTATCAGCCTCCTCC-3
P2	5-GCATCAACCCACGGCAAGACATCAG-3
P3	5-CTAATCTTCCGCCCATTTTGTGTG-3
P4	5-AAATTCATAATCAGTCTCATGGTC-3

## 2 结果

### 2.1 *PRC1* 蛋白酶基因有标记缺失(插入替换)菌株的构建

本实验中以 *sh ble* 抗性基因作为筛选标记,采用插入替换的方法构建 *PRC1* 基因缺失菌株(图 1)。

以毕赤酵母 GS115Hir 的基因组 DNA 为模板,用引物 P1 和 P2 扩增出 2870bp 的 *PRC1* 基因。连接于 pMD18-T 载体的多克隆位点上,得质粒 pPRC1。设计引物 B1 和 B2,从 pPICZA 上扩增出 *sh ble* 基因,它能使酵母对 Zeocin 产生抗性。用 *Bam*HI 和 *Sna*BI 酶切去除 pPRC1 载体上 *PRC1* 基因内部约

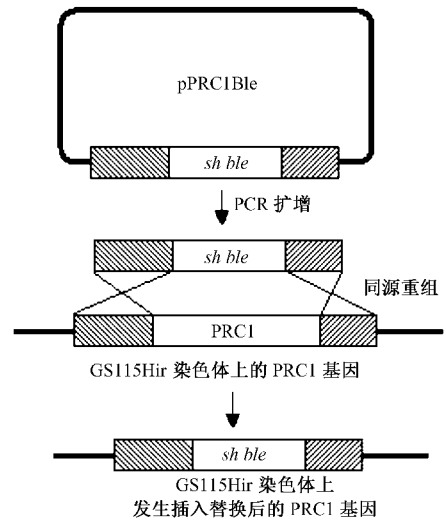


图 1 有标记基因缺失(插入替换)方法。右斜线代表 *PRC1* 基因的 5'序列,左斜线代表 *PRC1* 基因的 3'端序列

2139bp 的片段,回收约 3.4kb 的酶切大片段与经 *Sca*I 和 *Bgl*III 双酶切的 *sh ble* 基因相连得 *PRC1* 基因缺失载体 pPRC1ble。然后再用引物 P1 和 P2 扩增出载体 pPRC1ble 上插入替换的 *PRC1* 基因,用所得的扩增片段电转宿主菌 GS115Hir。此片段的 *PRC1* 基因中间被 *sh ble* 抗性基因片断替换,而左右两端仍旧为原 *PRC1* 基因的 5'和 3'端序列,左右两端的同源序列会和毕赤酵母 GS115Hir 染色体上完整的 *PRC1* 基因发生同源重组,使插入 *sh ble* 的 *PRC1* 基因替换 GS115Hir 染色体上的完整 *PRC1* 基因。

电转化以后的菌液涂布 Zeocin 抗性板,30℃ 培养 2d~3d,挑选 24 个长出的转化子,以每 4 个菌为一组分成 A-F 六组,用引物 P1 和 P2 做验证。发生基因缺失的菌能扩增出 2031bp 的条带,而未发生基因缺失的菌则扩增出 2870bp 的条带。结果显示 A 和 B 组能扩增出缺失的基因(图 2B),然后再用引物 P3 和 P4 鉴定 A 组中的 4 个菌,结果在 4 个菌中有 1 个菌发生了基因缺失(图 2C),将这个菌的进行测序分析,结果显示确实发生了 *PRC1* 基因缺失。

### 2.2 *KEX1* 蛋白酶基因无标记缺失菌株的构建

本实验采用的无标记基因缺失方法是基于 Soderholm 提出 Pop-In/Pop-Out 方法<sup>[12]</sup>(图 3),即使用营养缺陷型正向筛选标记和致死型 *T-urf3* 反向筛选标记构建无标记基因缺失菌株。由于在毕赤酵母 GS115Hir 宿主菌中没有合适的营养缺陷型标记可用,因此本实验对该方法作了修正,即采用抗性基因 *sh ble* 作为正向筛选标记。

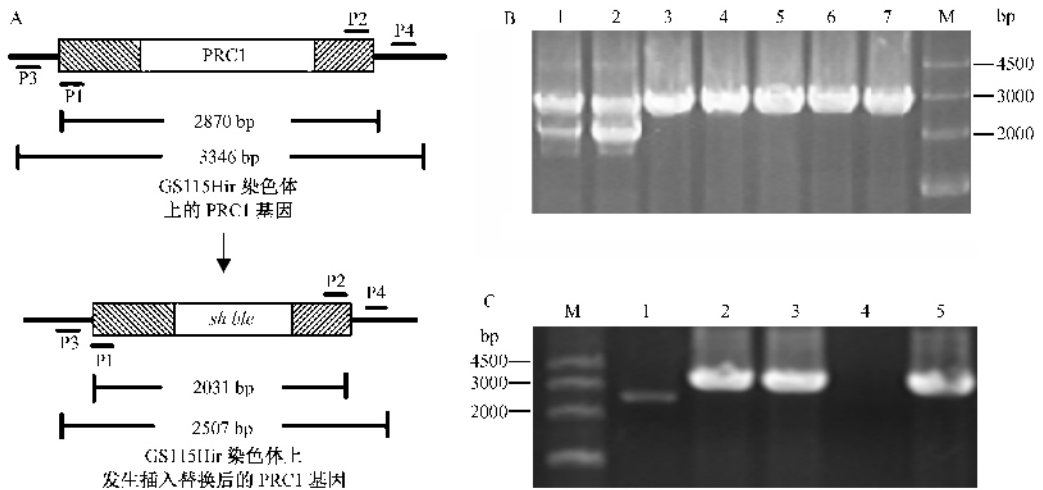


图2 Zeocin 抗性克隆的 PCR 验证

图 2B, M :DNA marker ;1-6 :Group A-F ;7 :GS115Hir ;图 2C, M :DNA marker ;1-4 :1-4<sup>#</sup> clones ;5 :GS115Hir

首先以 GS115Hir 的基因组 DNA 为模板,采用 overlap PCR 的方法体外构建 *KEX1* 缺失片段 ( $\Delta kex1$ )。将构建的  $\Delta kex1$  片段连到经 *Sma*I 酶切的 pPOPble 载体上,得到最终的 *KEX1* 基因缺失载体 pPOPble $\Delta kex1$ 。用 *Th*111I 线性化 pPOPble $\Delta kex1$  载体,取线性化的载体 0.5 $\mu$ g 电转 GS115Hir,涂布 Zeocin 抗性板,这时 pPOPble $\Delta kex1$  载体上的  $\Delta kex1$  片段会和 GS115Hir 染色体上完整的 *KEX1* 基因发生单交换同源重组,即 pop-in,使线性化的 pPOPble $\Delta kex1$  载体插入到 GS115Hir 菌株的染色体上。

Zeocin 抗性平板 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d 后,挑选 6 个长出的转化子,用 PCR 验证发生正确整合的 pop-in 克隆。结果在这 6 个转化子中,只有一个转化子发生了正确的 pop-in 整合。将这株发生正确 pop-in 整合的克隆,摇瓶培养过夜,稀释到一定的浓度,涂布于含有 10mmol/L methomyl 的 YPD 平板上,载体上的 *T-urf13* 反向筛选标记使菌株在 methomyl 平板上致死。在这种致死压力下,宿主为了存活下来,迫使插入载体在内部发生双交换同源重组,去除插入载体,即 pop-out。只有去除了插入载体的重组菌才能在 methomyl 平板上存活。

Methomyl 平板在 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d 后,挑选 7 个长出单菌落,用引物 V1 和 V2 验证是否发生基因缺失。发生基因缺失的菌能扩增出 1415bp 的条带,而未发生基因缺失的菌则扩增出 2835bp 的条带(图 4)。结果在挑选的 7 个菌落中,有 4 个菌发生了载体的去除。挑选其中一个菌的进行测序分析,结果显示确实发生了 *KEX1* 基因缺失。

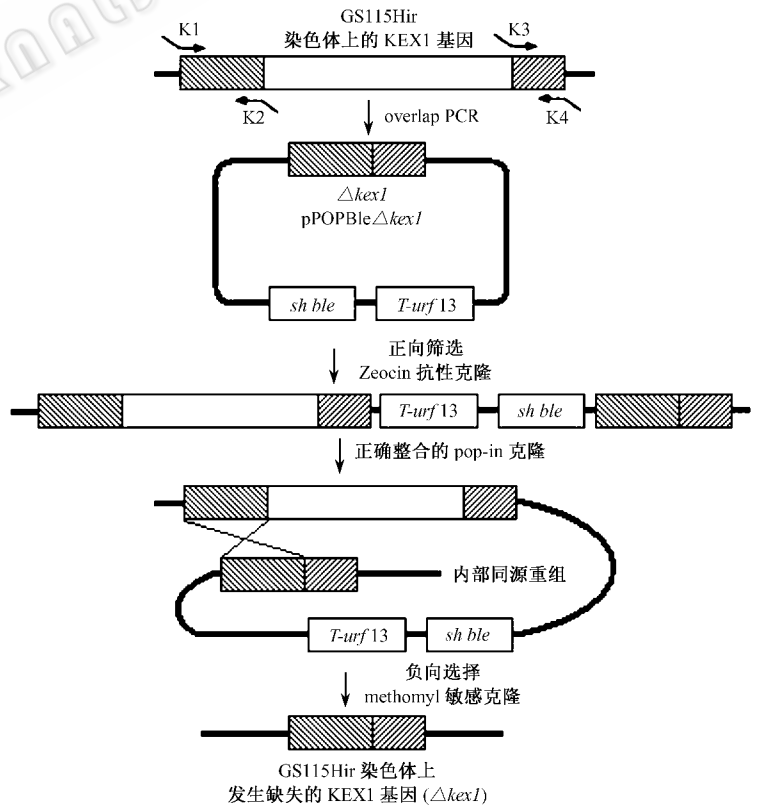


图3 Pop-In/Pop-Out 基因缺失方法

右斜线代表 *KEX1* 基因的 5' 序列,左斜线代表 *KEX1* 基因的 3' 端序列  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

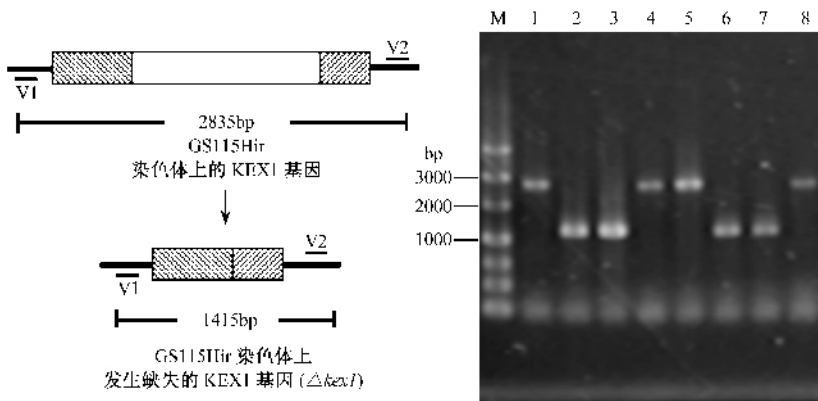


图4 Methomyl敏感克隆的PCR验证

M :DNA marker ,1 :GS115Hir primers V1 and V2 2-8 :1-7<sup>#</sup> clone with primers V1 and V2

### 3 讨论

通过采用不同的基因缺失方法,我们发现采用有标记的插入替换基因缺失方法很容易筛选到基因缺失菌株,一般筛选24个单菌落即可。我们采用同样的方法在另外一株毕赤酵母宿主菌中缺失 *PRC1* 基因时,同样筛选24个单菌落也得到了想要的基因缺失菌株。相比较而言采用无标记的 Pop-In/Pop-Out 方法就显得较复杂,特别是在第一步筛选发生正确整合的 pop-in 克隆时,我们发现许多长出的 Zeocin 抗性克隆并没有发生正确的整合,往往都是只整合了 *sh ble* 抗性基因,而没有整合反向选择标记 *T-urf13* 基因,结果大大增加了筛选的工作量。在筛选到发生正确整合的 pop-in 克隆后,通过反向选择去除载体序列显得比较容易,而且筛选到基因缺失菌株的概率较高,这说明表达 *T-urf13* 基因的毕赤酵母对 methomyl 是很敏感的。因此成功采用 Pop-In/Pop-Out 基因缺失方法的关键在于筛选到正确整合的 pop-in 克隆。

虽然采用无标记的 Pop-In/Pop-Out 基因缺失方法比较费时费力,但是在基因缺失后,宿主菌的染色体上不会留下任何外源片段,也就是说一套筛选标记可以反复利用,进行多基因多次敲除,因此无标记基因缺失方法特别适合多基因缺失或是改造基因工程生产菌株,因为有报道说,残留在宿主染色体上的外源载体片段会影响宿主菌的发酵能力<sup>[13]</sup>。另外由于无标记缺失不会在宿主染色体上留下任何外源

片段,因此在基因安全方面也具有更好的优势。而有标记的插入替换基因缺失方法每进行一次基因缺失就会向染色体上引入一个筛选标记,进行多基因缺失时就会引入多个筛选标记。由于目前在毕赤酵母中可用的筛选标记数量有限,因此有标记的插入替换方法在进行多基因缺失时具有一定的局限性,反而更适合用于单个基因的功能研究,因为其较易快速筛选到基因缺失菌株。

### 参考文献

- [1] 周祥山,范卫民,张元兴. 生物工程学报, 2003, **19**(5): 618 ~ 622.
- [2] Sinha J, Plantz B A, Zhang W, et al. Biotechnol Prog, 2003, **19**: 794 ~ 802.
- [3] 杨继忠,周祥山,解锡军. 微生物学通报, 2004, **31**(5): 24 ~ 27.
- [4] 章如安,杨晟,邱荣德. 微生物学通报, 2000, **27**(5): 371 ~ 373.
- [5] Boehm T, Shepherd S P, Trinh L B, et al. Yeast, 1999, **15**: 563 ~ 572.
- [6] Brankamp R G, Sreekrishna K, Smith P L, et al. Protein Expr Purif, 2004, **6**: 813 ~ 820.
- [7] Vassileva A, Chugh D A, Swaminathan S, et al. J Biotechnol, 2001, **83**: 21 ~ 35.
- [8] Juergen H N, Nikolai H, Sebastian R, et al. Yeast, 2005, **22**: 295 ~ 304.
- [9] Juergen H N, Tillman U G. Yeast, 2003, **20**: 1279 ~ 1290.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- [11] Cregg J M, Russell K A. Methods in Molecular Biology, Humana Press, 1998, pp. 103.
- [12] Soderholm J, Bevis B J, Glick B S. BioTechniques, 2001, **31**: 306 ~ 312.
- [13] Aritomi K, Hirotsawa I, Hoshida H, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, **68**: 206 ~ 214.