

酵母表达原理

本文主要讲述了毕赤酵母蛋白表达的原理，毕赤酵母表达能够高效表达的机制。

巴斯德毕赤酵母（以下简称毕赤酵母）能够高效表达外源基因，是因为其有更强的强启动子，即醇氧化酶启动子 PAOX。甲醇营养型酵母能将甲醇分解为甲醛和过氧化氢，在此反应中参与的酶是醇氧化酶（AOX1 和 AOX2）。其中，AOX2 的表达量比 AOX1 低得多，以甲醇为唯一碳源时，AOX1 增至细胞总蛋白的 40%。PAOX1 受甲醇诱导和葡萄糖或甘油的抑制。因此，AOX1 的表达受到甲醇的严格控制。

巴斯德毕赤酵母所表达的外源基因位于酵母染色体上，这是通过把携带外源基因的表达质粒线性化，以同源重组的方式整合到强启动子 PAOX1 的下游，目的基因一般插入到 5' AOX1 启动子和转录终止子之间的单克隆位点。

毕赤酵母蛋白表达系统

1. 酵母表达宿主菌

Mut⁺和 Mut^s

在毕赤酵母表达系统中，乙醇氧化酶有两种基因编码，即 AOX1 和 AOX2。细胞中绝大多数乙醇氧化酶活力有 AOX1 提供，菌株利用甲醇的速度主要由 AOX1 基因表达的 AOX1 蛋白提供。当 AOX1 缺失，只存在 AOX2 时，大部分的乙醇氧化酶活力丧失，这种细胞利用甲醇能力低，在甲醇培养基上生长缓慢的菌株表现型为 Mut^s。存在 AOX1，细胞利用甲醇正常生长，在甲醇培养基上生长较快，这种菌株表现型为 Mut⁺，这就是甲醇营养型毕赤酵母表达两种 Mut^s 和 Mut⁺产生的原理。

• 酵母表达系统常用宿主菌

GS115、KM71、SMD1168 是常用的表达宿主菌，均为甲醇诱导型。他们都是组氨酸缺陷型，如果表达载体上带有组氨酸基因，可以补偿宿主菌的组氨酸缺陷，所以可以在不含组氨酸的培养基上筛选重组转化子。在以葡萄糖或者甘油等为碳源的培养基上生长时，AOX1 基因的表达受到抑制，而在以甲醇为唯一碳源时，宿主菌的 AOX1 基因被强烈诱导，使目的基因大量表达。

• 有无甲醇诱导产生的 Mut⁺和 Mut^s表现型

毕赤酵母的最适生长温度为 28-30°C，诱导期间超过 32°C，不利于蛋白表达，并可能导致细胞死亡。Mut^s 和 Mut⁺ 菌株在没有甲醇存在的情况下生长速率一样，存在甲醇的情况下，AOX1 启动子被强烈诱导，Mut⁺较 Mut^s 生长更快（4-5 倍）。

1. 酵母蛋白表达载体

- 酵母蛋白表达载体的选择

酵母表达产物有胞内表达和分泌到胞外表达两种方式，这取决于表达载体的选择和构建是否带有信号肽，可根据基因表达的定位及目的选择合适的酵母蛋白表达载体。

① 胞内表达载体：主要包括 pPIC3、pPICZ、pPSC3K、pHIL-D2 等。该类载体将目的基因表达在胞内，可避免酵母的糖基化，适合于通常在胞浆表达或不含-S-S-的非糖基化蛋白，较胞外分泌表达水平高但纯化相对复杂。

② 分泌到胞外表达的载体：pPIC9、pHIL-S1、pYAM75P 等。酵母本身分泌的外源蛋白很少，将外源蛋白分泌到胞外，有利于目的蛋白的纯化和积累。常用的分泌信号序列由 89 个氨基酸组成 α 交配因子的引导。

③ 多拷贝插入表达载体：pPIC9K、pPIC3.5K。某些情况下，重组基因的多拷贝整合能够增加蛋白的表达量。

- 表达重组蛋白使其具有天然 N 端

想实现表达重组蛋白使其具有天然 N 端，将目的基因直接连接在 Kex2 蛋白酶切位点之后。Kex2 蛋白酶切位点在信号肽序列中谷氨酸和精氨酸连接处：Glu-Lys-Arg*Glu-Ala-Glu-Ala *位置为 Kex2 蛋白酶的酶切位点

毕赤酵母表达系统机制/原理

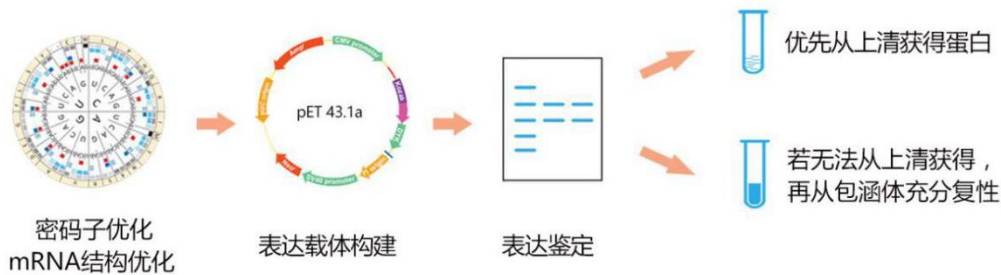
毕赤酵母能够高效的表达外源基因，是因为其具有强启动子乙醇氧化酶启动子(AOX1 和 AOX2)。AOX1 和 AOX2 及其产生的 Mut^s 和 Mut⁺表现型前文已经叙述过。AOX1 受甲醇的诱导和葡萄糖或甘油的抑制。毕赤酵母表达的外源基因位于酵母染色体上，通过把构建的质粒/载体线性化（主要采用酶切），通过同源重组的方式整合到启动子 AOX 的下游，一般是插入到 5' AOX 启动子和转录终止子信号之间的单克隆位点。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

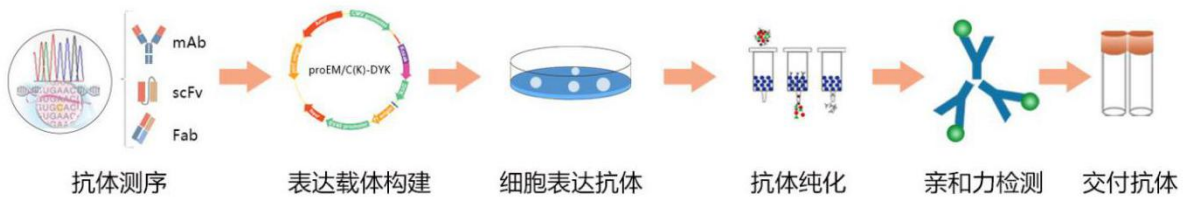
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

