

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。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

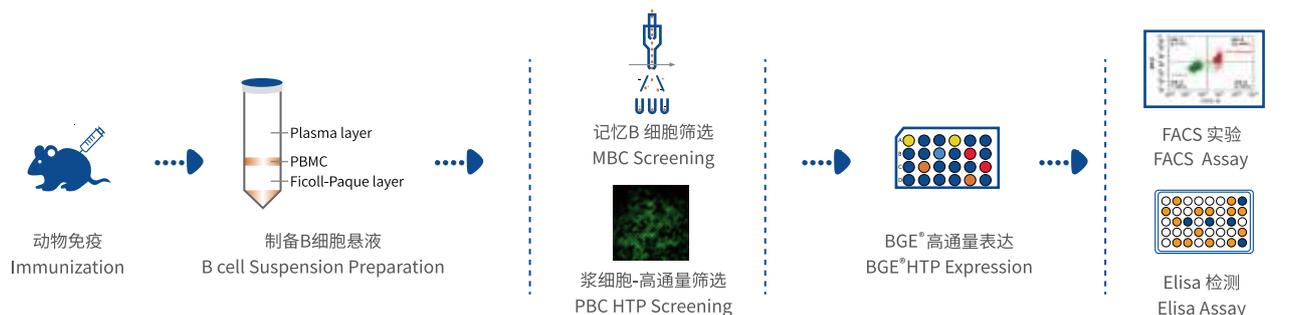
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

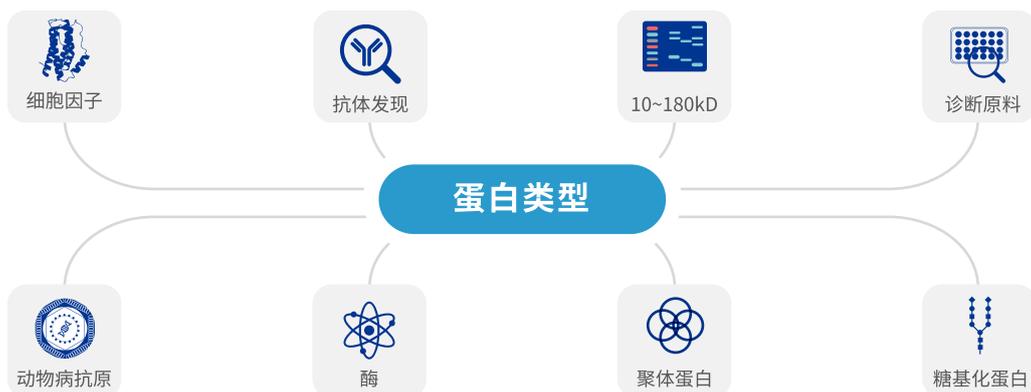


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

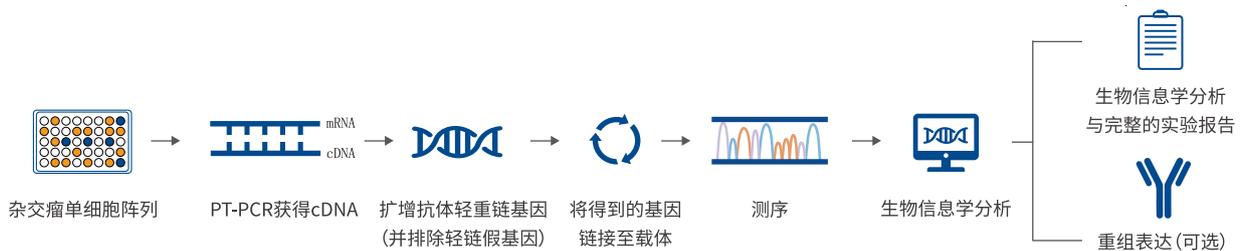
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



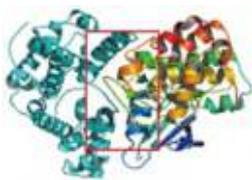
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

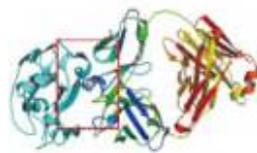
检测范围



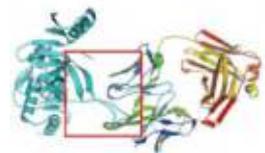
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



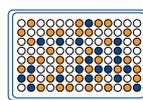
基因合成&质粒抽提



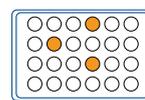
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L