

酵母蛋白表达系统

本文详细讲述了酵母表达表现型 Mut⁺和 Mut^s，酵母表达同源重组方式整合分析，酵母表达载体选择及其与大肠杆菌表达系统的区别，酵母表达原理及酵母蛋白表达实验 SOP。

酵母蛋白表达系统

酵母表达系统是真核表达蛋白的常用系统之一，具有真核表达系统的许多优点：如蛋白加工折叠、翻译后修饰等。且酵母蛋白表达的操作较哺乳动物来说相对简单。同为酵母表达系统，毕赤酵母表达系统比酿酒酵母表达系统表达水平更高且可进行细胞的高密度培养。巴斯德毕赤酵母是近几年发展起来的较为完善，被广泛用来表达外源蛋白的甲醇营养型酵母表达系统。（下文所提到的酵母蛋白表达均为巴斯德毕赤酵母）

酵母蛋白表达与大肠杆菌表达的区别

酵母蛋白表达与大肠杆菌表达部分不同，大肠杆菌表达只需将质粒/载体转入到宿主菌体内，其载体携带复制原点随着宿主染色体的复制而复制，可以稳定存在。而酵母表达相对复杂，设计的质粒/载体均不带有酵母自身复制原点，因此如果直接导入到宿主菌中，不能稳定存在。所以必须将质粒/载体线性化，以同源重组的方式与宿主菌的染色体进行整合，这样外源基因才能够稳定存在，而且同源重组一旦形成会很稳定，在通过后期的筛选排除没有整合成功的质粒/载体和宿主菌，挑选整合成功并能够高表达的重组转化子，某种程度上与哺乳动物稳定细胞系构建原理类似。

毕赤酵母蛋白表达系统构成

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。

1. 毕赤酵母同源重组的方式

质粒/载体和酵母表达基因图谱

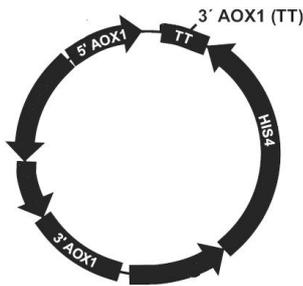


图 1：载体图谱：5' AOX1 启动子位点，转录终止子 TT，3' AOX1 位点



图 2：酵母宿主菌基因

- 质粒载体上的 PAOX 位点（PAOX 启动子）或 PAOX 转录终止子 TT 或下游 3' AOX1 三个位点与酵母宿主菌基因发生同源重组

在酵母宿主菌基因组的下游或者上游插入一个或多个质粒载体基因。如插入的质粒载体不破坏酵母宿主菌基因本身的 AOX1，因此重组转化子的表现型不变为 Mut+，反之为 Muts。



图 3：重组质粒插入 3' AOX1

- 质粒/载体基因替换酵母宿主菌的 AOX1 位点

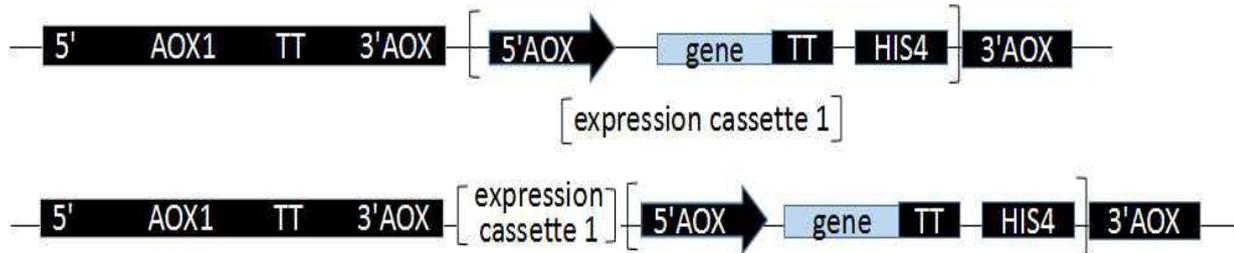
酵母宿主菌的 AOX1 启动子位点被质粒/载体基因完全替代，原有的酵母 AOX1 启动子被破坏，表现型为 Muts,取代其的是质粒/载体基因组上的 PAOX，目的基因，HIS4 表达序列。取代事件发生的不如基因插入事件发生的多。



图 4：AOX1 位点被替换

- 多拷贝插入

简单来说就是质粒/载体基因的多次插入（插入到酵母宿主菌基因组上），自发概率很低



酵母表达转化方法比较

培养好的酵母宿主菌和构建好的质粒进行同源重组的转化方法有以下几种，都是基于线性化质粒/载体之后，线性化是转化的第一步，用限制酶酶切。

转化方法	转化效率	是否会多拷贝整合	操作
原生质体法	10^5	是	操作复杂
电穿孔法（电击）	10^5	是	操作方便
PEG 诱导转化	10^3	否	操作方便

毕赤酵母表达系统主要优点

- 具体醇氧化酶（AOX）基因的启动子，可严格调控，实现高水平表达
- 强烈的好养生长偏爱性，可进行细胞高密度培养，发酵罐可达 120g/L
- 具有真核细胞翻译后修饰的功能，蛋白更具生物活性
- 高水平分泌表达外源蛋白，有利于纯化
- 可实现胞内表达和胞外分泌表达两种形式

酵母蛋白表达影响因素

1. 启动子的选择

酵母表达系统常用的是醇氧化酶基因启动子 PAOX，具有强诱导性和强启动性。PGAP 启动子是毕赤酵母中克隆到的一个组成型启动子，在 PGAP 控制下，LabZ 基因表达比甲醇诱导下 PAOX 表达量更高，且不需要甲醇诱导，放大工艺更加简便。

2. 目的基因的优化

目的基因决定表达成败的首要因素。由于密码子的简并性，不同的表达系统都有其特定的偏爱密码子。所以在基因合成时便要进行密码子的优化(可见[密码子优化](#)详解)，换掉稀有密码子并进行 mRNA 结构优化，提高蛋白表达量，防止蛋白不表达或表达量低。

3. 影响蛋白分泌的因素

如果蛋白本身不易分泌，即不适分泌表达，可尝试在用酿酒酵母的 α -AMF（交配因子）信号肽序列，对胰岛素、凝血因子等小分子有用，在 α -AMF 和目的基因之间插入间隔肽能够提高目的蛋白的表达水平。信号肽会影响蛋白分泌表达的水平。此外，其他影响因素还包括重组转化子的筛选，遗传背景影响，蛋白的稳定性影响等。

酵母蛋白表达实验操作（SOP）

感受态细胞的制备

对质粒进行不同方式的转化需要制备不同的感受态细胞状态。且酵母表达的感受态细胞最好现做现用，感受态对转化效率有很大影响。在酵母表达 SOP 中包括电转，PEG1000 和原生质法三种转化的感受态细胞制备方法。

酵母的转化

包括三个转化方法操作步骤：原生质法转化，电转化，PEG1000。

阳性转化子的筛选与蛋白表达

对转化后的酵母宿主菌进行筛选，筛选出成功实现同源重组的转化子，进行诱导表达。

详细的酵母蛋白表达标准操作流程见蛋白表达专题总页酵母蛋白表达 SOP。

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。

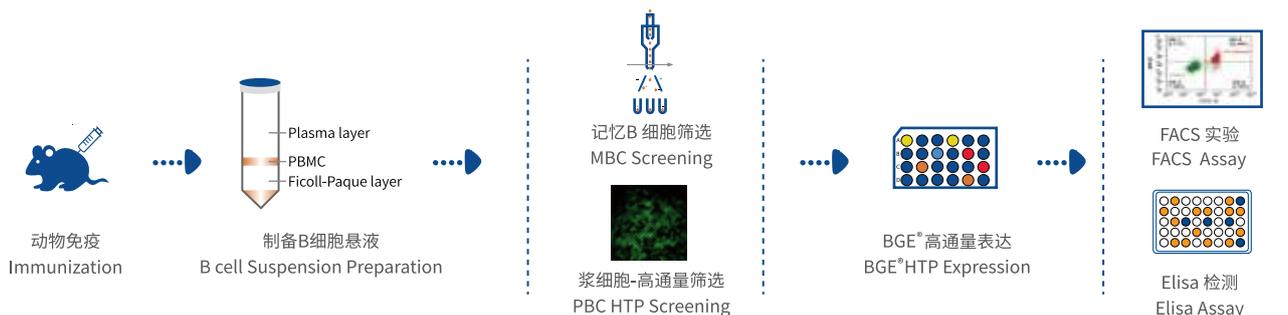
平台优势

- 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

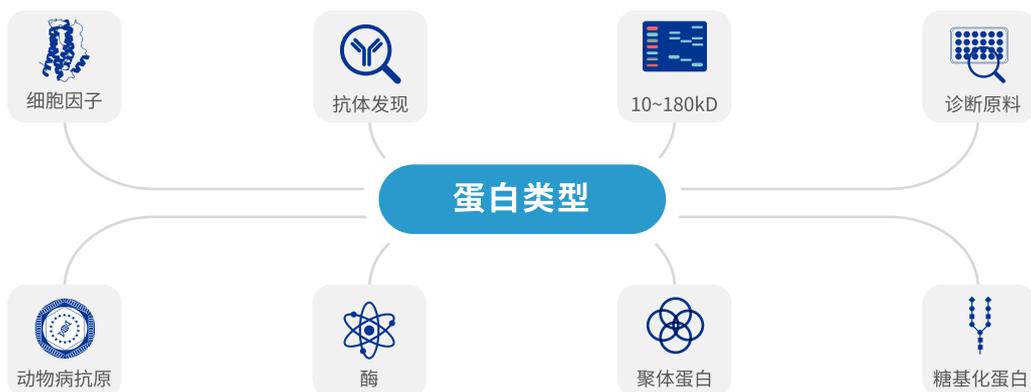


Recombinant Protein Expression Service

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。

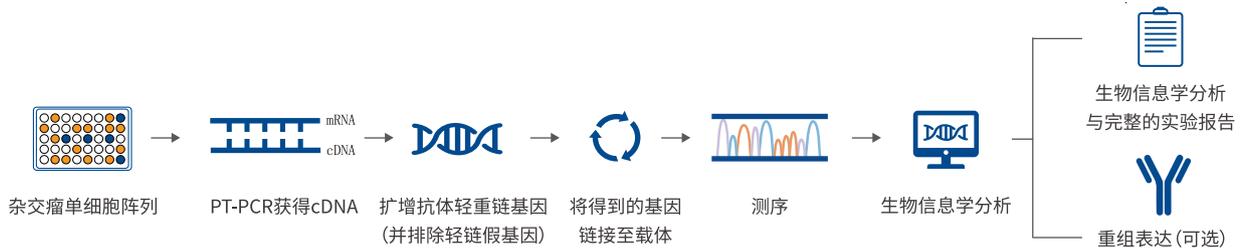
应用场景

- 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



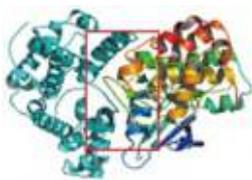
5

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。

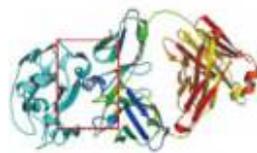
检测范围



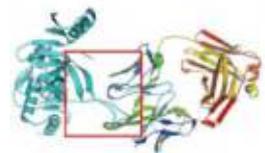
蛋白和蛋白



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

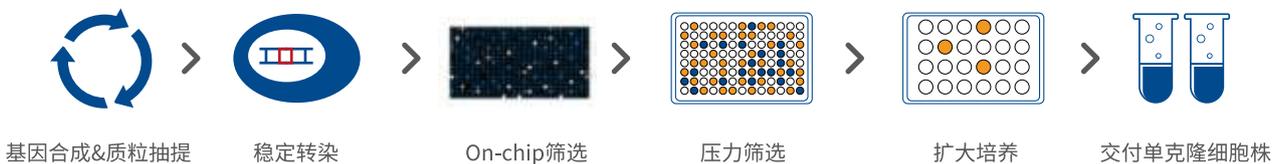
生产型稳转细胞株构建

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



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