

甲醇酵母表达系统 pMIRH 型载体研究^{*}

李黄金¹⁾ 龙霖新¹⁾ 邱保立²⁾ 涂桂洪²⁾ 王旬章¹⁾

(1) 中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275; 2) 广州华生基因工程有限公司)

摘 要 在为甲醇酵母 (*Hansenula polymorpha*) 表达系统成功构建高拷贝整合型表达载体 pMIRH-1 的基础上, 构建了更能满足外源基因表达需要的、大小仅为 7 300 bp 的高拷贝整合型表达载体 pMIRH-2. 有关转化、筛选及传代稳定性试验结果表明, pMIRH-2 亦具有与 pMIRH-1 相似的转化和筛选特性及高拷贝整合能力, 且二者均可在非选择条件下稳定传代 60 代以上.

关键词 甲醇酵母, 表达载体, 高拷贝整合, 传代稳定性

分类号 Q 78

作为新一代酵母系统的甲醇酵母 (*Hansenula polymorpha*) 表达系统因利用了甲醇氧化酶 (methanol oxidase, MOX; 或 alcohol oxidase, AOX) 基因的强启动子和宿主的高密度发酵性能而拥有较高的高效表达潜力, 因而, 该类系统在外源蛋白的工业化生产方面具有广泛应用前景^[1]. 由于缺乏稳定的自主复制型载体, 甲醇酵母系统一般采用单拷贝整合型 (YIp 型) 表达载体, 然而, 高拷贝数和高的传代稳定性是对工业用途表达载体的基本要求, 亦是甲醇酵母系统高效表达外源基因的前提^[2]. 文献 [3] 曾为甲醇酵母 *Hansenula polymorpha* 系统成功构建了一个能以高拷贝数 (大于 40 拷贝) 整合于宿主基因组 rDNA 位点的 pMIRH (multiple integration into ribosomal DNA of *H. polymorpha*) 型载体 (pMIRH-1, 10 300 bp). 由 pMIRH-1 转化宿主可产生高拷贝整合子, 并可通过高浓度的氨基酸苷类抗生素 G418 抗性筛选轻易获得这些高拷贝整合子. 考虑到 pMIRH-1 虽可引起高拷贝整合, 但由于其过大的相对分子质量会限制载体的装载容量, 且还可能会影响传代稳定性, 因此, 本文在 pMIRH-1 的基础上构建了另外 1 个更小的 pMIRH 型载体, 并对 2 个载体的转化和筛选特性及传代稳定性进行了比较研究. 现将研究结果报道如下.

1 材料与方法

(1) 菌株与质粒. 酵母宿主 *H. polymorpha* A16(*leu2*⁻) 由 Sudbery 教授惠赠, R-pUC18 和 pMIRH-1 由本课题组构建^[3], 克隆宿主 *E. coli* DH5 α 和质粒 Bluescript M13 由本室保存, pCI-neo 为 promega 公司产品.

(2) 主要试剂. 所有 DNA 限制性内切酶和连接酶均为 Promega 公司产品, 地高辛试剂

* 广州华生基因工程有限公司资助项目

收稿日期: 1998-03-02 李黄金, 男, 34 岁, 博士

盒为 Boehringer Mannheim 公司产品.

(3) 酵母转化. 参照 Faber 等^[4]方法进行.

(4) 高拷贝整合子的 G418 抗性筛选. 参照李黄金等^[3]方法进行.

(5) G418 抗性最低敏感浓度分析. 参照李黄金等^[3]方法进行.

(6) 基因组 DNA Southern 杂交分析. 参照 Philippsen 等^[5]方法进行, 其中探针标记和信号检测参照地高辛试剂盒说明进行.

(7) 其它分子生物学操作. 参照 Sambrook 等^[6]方法进行.

2 结果与讨论

2.1 载体构建

pMIRH 型载体除包含 MOX 表达盒外, 尚包含 rDNA 顺序. 选择型标记基因 *Hpleu2a* 和 SV40 早期启动子控制的 *neo* 基因等 3 个供高拷贝整合和筛选用的关键元件. 其中 rDNA 顺序可引导载体向宿主基因组的多个 rDNA 位点靶向整合, *Hpleu2a* 则利用其低效表达来为高拷贝整合提供强大的选择压力, 而 *neo* 基因则用于高拷贝整合子的 G418 抗性筛选. 故本文在构建新载体时所遵循的原则是, 在保留 MOX 盒和保证上述 3 个元件发挥应有功能的前提下尽量缩小载体大小. pMIRH-2 (7 300 bp) 的构建如图 1 所示, 先将克隆化的 4 000 bp rDNA 顺序中的 800 bp *Eco* R I -*Clal* 片段亚克隆至 Bluescript, 再以包含 rDNA 顺序的 *Bam* H I -*Kpn* I 片段取代 pCI-*neo* 中的 2 000 bp *Bgl* I I -*Kpn* I 序列, 并将 pMIRH-1 中包含 MOX 表达盒和 *Hpleu2a* 的 *Kpn* I -*Sal* I 片段插入即得. pMIRH-2 与 pMIRH-1 的主要差别是, pMIRH-1 所引入的 rDNA 顺序更短 (800 bp), 载体也更小 (7 300 bp).

2.2 转化与筛选

在对宿主 *H. polymorpha* A16 (*leu2*⁻) 进行的系列转化试验中, 为比较 2 种 pMIRH 型载体转化宿主的特性, 以 rDNA 顺序中的 *Hin* d III 和 *Eco* R V 位点分别线性化 pMIRH-1 和 pMIRH-2, 以含野生型 *Hpleu2* 基因的 YIp 型载体 pJF5-1 (MOX 中的 *Eco* R V 位点线性

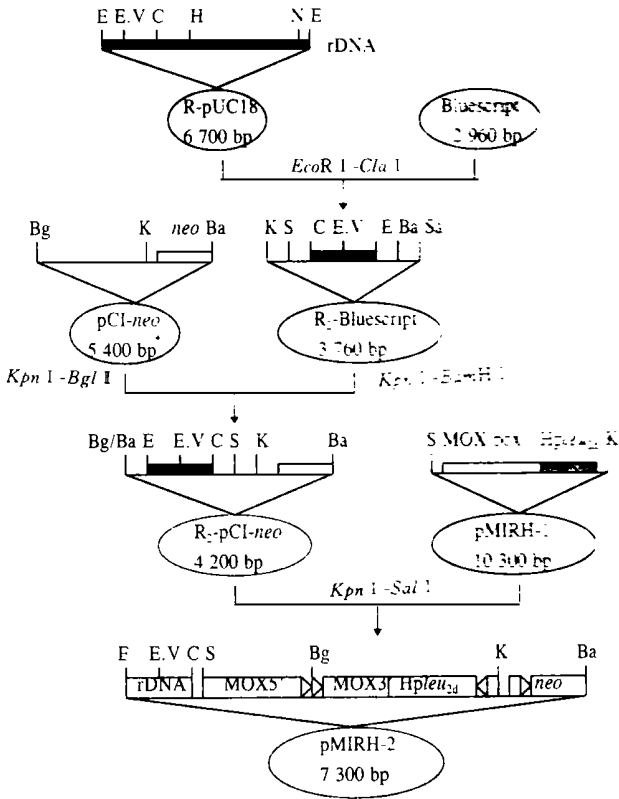


图 1 pMIRH-2 的构建

Fig. 1 Construction of pMIRH-2

Ba *Bam* H I ; Bg *Bgl* I I ; G *Clal* ; E *Eco* R I ;
E.V : *Eco* R V ; H *Hind* I I I ; K *Kpn* I ;
N : *Nde* I ; S *Sal* I

化) 作对照. 结果显示在宿主株的标准电激转化系统^[4]中, pMIRH-1与 pMIRH-2的线性化 DNA有效转化宿主所需 DNA量均需达到 1.0 μ g 以上 (pJF5-1为 0.1 μ g), 且在 DNA用量均达到 10.0 μ g (pJF5-1的为 1.0 μ g) 时转化频率 (以 μ gDNA所含的转化子量表示, 下同) 方呈显著下降 (表 1).

表 1 转化频率
Tab. 1 Transformation frequency

DNA	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	15.0	20.0	50.0
pJF5-1	820	930	960	630				
pMIRH-1	0	0	3	16	33	23	21	10
pMIRH-2	0	0	5	19	38	26	25	13

方可有效转化宿主及只有在较高 DNA浓度下方达到饱和. 显然, 这些特性与 pMIRH型载体的缺陷型标记基因及高拷贝整合属性有关. 本文对 10.0 μ g pMIRH-1和 pMIRH-2转化宿主所获的 *leu⁺* 转化子 (分别为 331个和 382个) 混合物分别以 5.0 g/L G418平板进行二级筛选试验, 结果分别得到 53个和 61个生长菌株. 根据文 [3] 研究结果, 能在 5.0 g/L G418平板上生长的转化子均为高拷贝 (大于 40拷贝) 整合子. 所以, pMIRH-2的高拷贝整合能力并未因所引入的 rDNA顺序缩短而改变.

2.3 传代稳定性分析

虽然上述 2个 pMIRH型载体均可引起高拷贝整合, 但 pMIRH-1过大的 *M_r* 和 pMIRH-2所引入的过小的 rDNA顺序会否影响传代稳定性呢? 本文从上述 2个载体的高 G418抗性转化子中各随机挑取 3个菌株进行整合子传代稳定性试验. 首先供试菌株于非选择培养基 YEPD中连续传代 60代后, 再与原始样品一起应用 96孔板法进行 G418抗性分析. 结果表明所有供试高拷贝整合子经 60代无选择压力培养后均未呈现 G418抗性的显著下降 (表 2).

表 2 整合子的 G418抗性敏感质量浓度¹⁾

Tab. 2 Susceptible concentration
of Anti-G418 of integrants g/L

株号	pMIRH-1			pMIRH-2		
	I	II	III	I	II	III
原代	11.0	7.5	10.0	9.5	11.0	8.5
第60代	10.0	7.0	9.5	9.0	10.5	8.5

1) 宿主 *H. polymorpha* A16(*leu⁻*) 的 G418抗性敏感质量浓度为 0.075 g/L

为了进一步考察整合子经传代试验后整合化载体的数量是否有明显改变, 本文还对 pMIRH-1I 号株和 pMIRH-2II 号株进行了基因组 DNA Southern杂交分析. 在杂交试验中, 以 pUC序列作为检测整合化载体的探针, 而

因此, 虽然 pMIRH-1和 pMIRH-2拥有不同的大小、引入的 rDNA顺序的长度及线性化位点也不同, 但均拥有相似的转化宿主的特性, 即需要较高浓度的 DNA



图 2 整合子基因组 DNA Southern杂交分析
Fig. 2 Southern analysis of genomic
DNA from integrants
a pMIRH-2-II 株基因组 DNA/EcoRI 消化
b pMIRH-1-I 株基因组 DNA/HindIII 消化

以 MOX 5'端序列作为检测宿主基因组中单拷贝 MOX 基因的探针. 由各 DNA 样品中的载体杂交带与单拷贝 MOX 杂交带间的相对信号强度可知, 上述 2 个菌株均为高拷贝整合子, 进一步证实了 pMIRH 型载体的高拷贝整合能力及高拷贝整合子 G418 抗性筛选方法的可靠性; 而由原代样品与第 60 代样品间整合化载体杂交信号的相对强度可知, pMIRH-1 和 pMIRH-2 的高拷贝整合子在非选择培养条件下传代 60 代后未呈现载体丢失现象 (图 2), 表明 pMIRH-1 和 pMIRH-2 均具有较高的传代稳定性. 由于 pMIRH 型载体是以高拷贝数靶向整合于宿主基因组的 rDNA 位点的, 这种整合模式必然存在一种“量”的效应, 即当插入的外源 DNA 超过一定的量时, 宿主的生长就会受到严重影响而必然影响整合化载体的传代稳定性. 所整合的外源 DNA 的量是与载体的大小和整合拷贝数高度相关的, 有必要尽量减小 pMIRH 型载体的大小, 以满足高表达对高拷贝数的需要, 因此 pMIRH-2 比 pMIRH-1 更具应用价值. 我们正在利用 pMIRH-2 进行有关外源基因表达的试验, 并已取得一些令人满意的结果, 有关结果待发表.

参 考 文 献

- 1 Sudbery P E. The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr Opin Biotechnol*, 1996 (7): 517~ 524
- 2 Gellissen G, Hollenberg C P. Applications of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, 1997, 190: 87
- 3 李黄金, 龙繁新, 林志雄, 等. 甲醇酵母 *Hansenula polymorpha* 表达系统高拷贝整合型表达载体的构建. *生物工程学报*, 1998, 14 (4): 98~ 103
- 4 Faber K N, Haima P, Harder W, et al. Highly efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Current Genetics*, 1994, 25: 305~ 310
- 5 Philippsen P, Stotz A, Scherf C. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Guthrie C, et al. eds. *Guide to yeast genetics and molecular biology*. San Diego: Academic Press, INC, 1991. 169
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989

Study on pMIRH-Type Vectors of Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* Expression System

Li Huangjin* Long Qingxin Qiu Baoli Tu Guihong Wang Xunzhang

Abstract pMIRH-2 (7 300 bp), a new pMIRH-type expression vector for multiple integration into ribosomal DNA of *Hansenula polymorpha*, was constructed based on our pMIRH-1 (10 300 bp) reported recently. These two pMIRH-type vectors are different in size and length of rDNA sequence introduced, however, both showed similar properties in a series of tests on transformation and G418-Screening of high-copy-number integrants, as well as, equally possessed a high mitotic stability.

Keywords methylophilic yeast, expression vector, multiple integration, mitotic stability

* National Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China