

基于启动子和宿主改造的酿酒酵母表达系统优化研究*

张旭 王晶晶 刘建平**

(复旦大学生命科学院 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘要 生物医药领域中一套高效表达系统对于重组蛋白的生产至关重要。酿酒酵母作为一种食品级真核微生物,具有繁殖迅速、培养简单、遗传操作便捷等特点,是生产重组蛋白较理想的表达系统之一。对实验室已有的 pHR 酿酒酵母表达系统进行优化。分别通过易错 PCR 技术和菌株诱变技术对酿酒酵母启动子 P_{TEF} 和宿主酿酒酵母 Y16 进行突变改造,经筛选、鉴定获得表达性能提高的启动子 P_{TEFV1} 和酿酒酵母 Y16-E14、Y16-E19。随后,利用启动子 P_{TEFV1} 构建以 Y16-E14 为宿主的 pHR-N 酿酒酵母表达系统,以绿色荧光蛋白和人血清白蛋白为对象,比较表达系统改造前后性能变化。结果显示 pHR-N 酿酒酵母表达系统无论胞内表达绿色荧光蛋白还是分泌表达人血清白蛋白的能力均较改造前明显提高。pHR-N 系统为获得更多具有重要应用价值的重组蛋白提供了有利的工具。

关键词 酿酒酵母 表达系统 启动子 宿主 优化改造

中图分类号 Q815

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种低等单细胞真核生物,具有安全、生长繁殖快、培养简单、遗传操作便捷等特点,广泛应用于酿造、食品、医药等领域,一直是基础和应用研究的重要对象。酿酒酵母系统是最早发展起来用于表达异源蛋白的真核表达系统,第一个商品化的重组疫苗—乙肝疫苗即来自酿酒酵母,随后陆续有很多外源基因在该系统中成功表达^[1-2]。

影响外源基因在宿主内表达有多方面因素,包括启动子效率、宿主遗传特性、外源基因拷贝数及稳定性、培养条件等。近年来,利用基因工程方法和诱变育种来提高酿酒酵母表达蛋白能力、代谢产物等的研究进展较快。Miura S 等人利用亚硝基胍诱变 1 株 L-乳酸产生菌,突变株的乳酸产量超过 90 g/L,达原始菌株产量的 2 倍^[3]。张丽杰等以酿酒酵母 HY01 为出发菌,选用 2 种低毒性化学诱变剂 5-BU 和盐酸平阳霉素,在确定最佳配比的基础上,通过联用这 2 种诱变剂进行

复合诱变,获得了一定数量的正突变株,其中产能提高最高的 1 株发酵物中海藻糖含量达到 16%,比出发菌株提高了 10%^[4]。

启动子 (promoter) 位于结构基因 5 端上游区,是 RNA 聚合酶的结合区。启动子区的结构影响其与 RNA 聚合酶的亲和力,进而影响基因的转录表达效率。通过对启动子改造,筛选强启动子,是提高宿主重组蛋白表达水平的一种重要的方法^[5]。Partow S 等都通过筛选、构建强启动子实现了重组蛋白的高效表达^[6-7]。

pHR 酿酒酵母表达系统是本实验室前期研究中基于酵母 2 μ 质粒构建的一种新型酿酒酵母表达系统^[8-9]。与传统的以抗生素抗性基因作为筛选标记的酵母表达载体不同,除需表达的外源基因外,pHR 表达载体所有元件序列均来自酿酒酵母自身,不携带抗药基因序列和任何大肠杆菌基因序列,以酿酒酵母 Leu2 基因作为营养筛选标记。外源基因表达质粒只能在酵母细胞内生存。外源基因通过同源重组方式克隆于表达载体上,通用性好、效率高。该系统以酿酒酵母 Y16 为宿主,表达载体为 pHR- P_{TEF} -A,其启动子元件 P_{TEF} 为

收稿日期:2014-10-21 修回日期:2014-11-19

* 国家“863”计划资助项目(2007AA02Z107)

**通讯作者,电子邮箱:jpliu@fudan.edu.cn

酿酒酵母翻译延伸因子 EF-1a 基因的启动子。本研究通过诱变剂处理和易错 PCR 技术分别对宿主 Y16 和启动子 P_{TEF} 进行突变改造, 构建 pHR-N 酿酒酵母表达系统, 提高其生产重组蛋白的能力。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ; 酵母菌: *S. cerevisiae* S1502B (*MATa ura3-52 leu2-3 112 trp1-289 his3- Δ*), 简称 Y16。大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEP353 (ATCC number 37725)。酿酒酵母表达载体 pHR- P_{TEF} -A 由本实验室构建。

1.2 主要试剂与仪器

KOD Plus Neo 高保真 DNA 聚合酶, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa。质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购于 Axygen。甲基磺酸乙酯 (Ethylmethyl sulfone, EMS)、X-Gal 和 ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside) 购于 Sigma。易错 PCR 试剂盒购于北京天恩泽生物技术公司。PCR 扩增仪 (Applied Biosystems); 流式细胞仪 (BD); 分光光度仪 (尤尼柯 UV-2000)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 所用引物由上海桑尼生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

| Primer application | Primer name | Primer sequence (5'-3') |
|--------------------|---------------|--|
| PCR P_{TEF} | P_{TEF} -F1 | ATGGATCCCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCC |
| | P_{TEF} -R1 | CGGAAGCTTTTCATAAACTTAGATTAGATTGCTATGCTTTTC |
| PCR HSA | HSA-F1 | AGATCCGATGCACACAAGACTGAGGTGC |
| | HSA-R1 | ACGTCGACTCATTATAAGCCTAAGGCAGCTTGACT |
| PCR GFP | GFP-F1 | CGTCGACAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTG |
| | GFP-R1 | CACTAGTTCATTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA |

1.3.2 分子克隆和质粒转化 PCR 获得的 P_{TEF} 序列经酶切后克隆于 YEP353 载体。突变改造的 P_{TEF} 、人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 基因或绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因分别经酶切后克隆于酿酒酵母表达载体 pHR- P_{TEF} -A。大肠杆菌转化采用 42 $^{\circ}$ C 热激方法, 酿酒酵母转化采用 LiAC 化学法^[10]。分子生物学操作方法参考《分子克隆实验指南》(1996 年第二版) 和《酵母遗传学方法实验指南》(2000 年第一版)。

1.3.3 易错 PCR 突变^[11-12] 按照易错 PCR 试剂盒说明书进行操作, 反应总体积为 60 μ l, PCR 程序设定如下:

94 $^{\circ}$ C 3min
 94 $^{\circ}$ C 1min
 55 $^{\circ}$ C 1min
 72 $^{\circ}$ C 1min
 20 $^{\circ}$ C HOLD
 } 45Cycles

1.3.4 甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 诱变处理^[13-14] 挑取少许 YEPD 固体培养基上的酿酒酵母 Y16 接入新鲜 YEPD 液体培养中, 30 $^{\circ}$ C 培养后, 离

心, 无菌水洗涤 2 次, 1ml PBS 悬浮, 加入 40 μ l EMS 溶液, 30 $^{\circ}$ C 温浴处理一定时间; 离心收获菌体, 5% 硫代硫酸钠溶液 1ml 洗涤 2 次, 得到的酵母菌体用于转化筛选。

1.3.5 突变筛选方法 1.3.5.1 初筛

(1) 启动子突变初筛^[15]

YEP353 载体携带 *LacZ* 报告基因, 通过检测 *LacZ* 基因产物 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -gal) 的活性, 能够反映 *LacZ* 前多克隆位点克隆的启动子的转录效率。经易错 PCR 突变后的启动子 P_{TEF} 连接到质粒 YEP353 上, 构建 YEP353- P_{TEF} -mutant 质粒, 连接产物转化 Y16 涂布于选择性 SD 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 天获得酵母转化子。随后转化子转接于含有 X-Gal 的固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 继续培养, 根据菌落蓝斑出现时间和颜色深浅 (与对照酵母比较) 筛选候选阳性克隆。

(2) 诱变酵母菌株初筛

质粒 YEP353- P_{TEF} 转化经 EMS 诱变处理的 Y16 菌体, 涂布于选择性 SD 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 天后获得转化子克隆, 候选阳性克隆筛选方法同上述。

(3) 复筛^[16-17]

对于初筛获得的候选阳性克隆进行复筛,确认其可靠性。采用的方法为 ONPG 法。重组酵母中表达的 β -gal 能够将 ONPG 解为半乳糖和黄色的邻-硝基苯酚 (ONP)。将酵母克隆接入选择性 SD 液体培养基中 30℃ 摇床培养 24 h; 按 10% (V/V) 接入 1 ml YEPD 培养基中,培养 48 h,测 OD₆₀₀ 值; 取 100 μ l 菌液离心去上清,用 1 ml Z-Buffer 洗一次; 再用 800 μ l Z-Buffer 悬浮,置于 -80℃,反复冻融 3~4 次; 加入 200 μ l ONPG 反应一段时间,加入 400 μ l 1 mol/L NaCO₃ 终止反应; 离心,取上清分光光度计测 OD₄₂₀。 β -gal 酶活性 = (OD₄₂₀ × 1000) / (OD₆₀₀ × V (ml) × T (min))

2 结果

2.1 宿主酿酒酵母 Y16 诱变改造

选择 YEPD 中培养 10h 后的 Y16 酵母细胞,利用 EMS 进行诱变处理,测定 EMS 处理不同时间菌株的死亡率(结果略)。EMS 最佳诱变条件为: PBS (pH = 7.2) 溶液中,EMS 浓度 40 μ l/ml,处理 55 min, Y16 菌株死亡率为 70%~80%。收集 EMS 诱变处理后存活的 Y16 酵母,继续培养待用。

质粒 YEP353-P_{TEF} 转化诱变处理后的 Y16 酵母,获得的转化子分别测定 β -gal 酶活性,经过筛选鉴定,编号 E14 和 E19 的两个转化子 β -gal 酶活较未处理的 Y16 转化子(对照)酶活分别提高 22.31% 和 26.53% (表 2)。

表 2 Y16 诱变处理后转化子 β -gal 酶活性检测

Table 2 β -gal activity assay results of Y16 transformants after treatment with EMS

| 转化子 | β -gal 酶活性 | 提高比率 (%) |
|-----|------------------|----------|
| 对照 | 120.90 ± 10.23 | 0.00 |
| A13 | 129.94 ± 9.65 | 7.50% |
| A17 | 123.87 ± 15.06 | 2.46% |
| E14 | 147.87 ± 2.95 | 22.31% |
| E19 | 152.98 ± 11.25 | 26.53% |

将 E14 和 E19 在非选择性 YEPD 培养基中连续传代培养,丢失酵母细胞中 YEP353-P_{TEF} 质粒,经表型验证正确后,获得诱变菌株 Y16-E14 和 Y16-E19。为确认菌株发生有利突变,将质粒 YEP353-P_{TEF} 分别回转 Y16-E14 和 Y16-E19,检测细胞 β -gal 酶活性。结果如表 3 所示, Y16-E14 和 Y16-E19 菌株产生 β -gal 酶活性分别比未改造的 Y16 菌株高 73.53% 和 55.60%, 由此获得

了两株有利于重组 β -gal 酶表达的诱变酵母菌株 Y16-E14 和 Y16-E19。

表 3 质粒 YEP353-P_{TEF} 回转变菌株所得转化子 β -gal 酶活性检测

Table 3 β -gal activity assay results of Y16 mutant strains re-transformed with YEP353-P_{TEF}

| 菌株 | β -gal 酶活性提高比率 (%) | |
|---------|--------------------------|-------|
| Y16-E14 | 334.34 ± 11.90 | 73.53 |
| Y16-E19 | 299.80 ± 17.03 | 55.60 |
| 对照(Y16) | 192.67 ± 13.21 | 0.00 |

2.2 启动子 P_{TEF} 突变改造

以启动子 P_{TEF} 序列为模板,以 P_{TEF}-F1/P_{TEF}-R1 为引物进行易错 PCR,PCR 产物经 BamH I/Hind III 酶切后,克隆于 YEP353 载体,重组载体转化酵母 Y16。经过初筛和复筛鉴定,发现编号 E49-24、N36、N37 三个转化子的 β -gal 酶活性较对照组分别提高了 47.09%、46.55%、55.43%。三个转化子中 YEP353-P_{TEF-mutant} 质粒抽提出来测序,发现三个质粒 P_{TEF} 启动子区均在 234 位发生突变,即由 T 变为 C (T234C),将突变启动子命名为 P_{TEFv1}。

为确认突变启动子 P_{TEFv1} 的有效性和稳定性,将质粒 YEP353-P_{TEFv1} 回转变酵母 Y16,检测重组酵母 β -gal 酶活,结果如表 4 所示,装配突变启动子 P_{TEFv1} 的重组酵母产生的 β -gal 酶活较对照重组酵母(启动子 P_{TEF}) 提高 61.47%,说明突变启动子 P_{TEFv1} 转录效率明显强于野生型启动子 P_{TEF}。

表 4 质粒 P_{TEFv1}-YEP353 回转变 Y16 转化子 β -gal 酶活性检测

Table 4 β -gal activity assay of Y16 strain re-transformed with P_{TEFv1}-YEP353

| 重组酵母 | β -gal 酶活性提高比例 (%) | |
|--------------------------------|--------------------------|-------|
| Y16/P _{TEF} -YEP353 | 127.52 ± 29.58 | 0.00 |
| Y16/P _{TEFv1} -YEP353 | 205.91 ± 4.84 | 61.47 |

2.3 表达系统改造效果评价

经过突变改造,我们获得了较 P_{TEF} 启动子效率更高的 P_{TEFv1} 启动子和有利于重组蛋白表达的诱变改造菌株 Y16-E14、Y16-E19。随后将 P_{TEFv1} 启动子和 Y16-E14 菌株应用于改造 pHR 酿酒酵母表达系统。将 P_{TEFv1} 启动子替换酿酒酵母表达载体 pHR-P_{TEF}-A 上的 P_{TEF} 启动子,以 Y16-E14 作为宿主细胞,构建胞内表达 GFP 或分泌表达 HSA 的重组酵母,评价新构建的 pHR-N 表达系

统的效能(表5)。

表5 基于 pHR-N 表达系统构建的重组酵母

Table 5 List of the recombinant yeasts utilizing pHR-N system

| 组别 | Y16 宿主 | Y16-E14 宿主 |
|-------|--|--|
| GFP 组 | Y16/pHR-P _{TEF} -GFP(Y1) | Y16-E14/pHR-P _{TEF} -GFP(E1) |
| | Y16/pHR-P _{TEFv1} -GFP(Y2) | Y16-E14/pHR-P _{TEFv1} -GFP(E2) |
| HSA 组 | Y16/pHR-P _{TEF} - α F-HSA(Y3) | Y16-E14/pHR-P _{TEF} - α F-HSA(E3) |
| | Y16/pHR-P _{TEFv1} - α F-HSA(Y4) | Y16-E14/pHR-P _{TEFv1} - α F-HSA(E4) |

对照组分别为 Y16/pHR-P_{TEF}(YC) 和 Y16-E14/ pHR-P_{TEF}(EC) . α F α -Factor 信号肽

分别利用荧光显微镜和流式细胞仪检测重组酵母表达 GFP 情况。荧光显微镜观察显示 E2 组酵母(Y16-E14/pHR-P_{TEFv1}-GFP) 荧光不仅强于 E1 组(Y16-E14/pHR-P_{TEF}-GFP) 也明显强于 Y1 组(Y16/pHR-P_{TEF}-GFP) 或 Y2 组(Y16/pHR-P_{TEFv1}-GFP) ,说明突变启动子

P_{TEFv1} 和诱变改造后的宿主 Y16-E14 能够增强 GFP 蛋白表达(图1)。流式细胞仪对重组酵母荧光强度进行定量检测分析,结果显示 E2 组酵母荧光强度显著高于其他各组(图2),证实突变启动子 P_{TEFv1} 和宿主 Y16-E14 对重组 GFP 产生的促进作用。

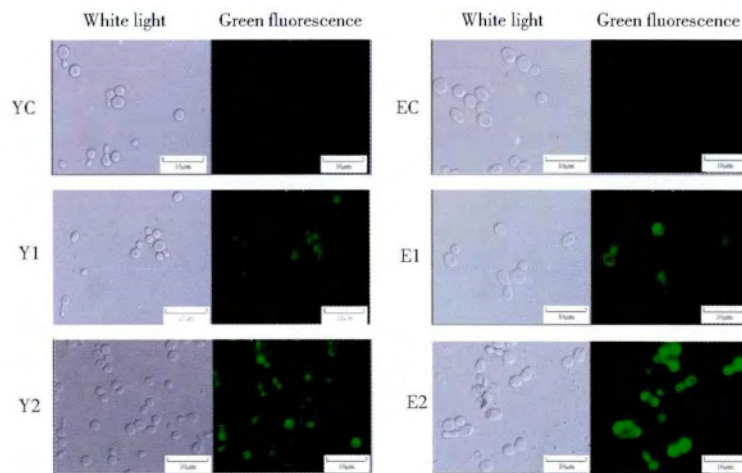


图1 荧光显微镜检测重组酵母表达 GFP 情况

Fig.1 Fluorescence microscope analysis of the recombinant yeasts expressing GFP

HSA 组重组酵母培养 2 天后,取培养液上清进行 SDS-PAGE 分析,结果显示 E4 组的分泌的 HSA 量明显多于其他各组(图3),说明 E4 组重组酵母(Y16-E14/pHR-P_{TEFv1}- α F-HSA) 分泌表达 HSA 能力最强,即改造的 Y16-E14 宿主和 P_{TEFv1} 启动子有助于重组蛋白 HSA 的分泌表达。

3 讨论

YEP353 是一种大肠杆菌-酿酒酵母穿梭载体,将启动子克隆于该载体 LacZ 基因上游的多克隆位点区域,构建的重组载体转化酿酒酵母,通过重组酵母中 LacZ 基因表达产生的 β -半乳糖苷酶(β -gal) 活性测定可鉴别 YEP353 所克隆的启动子在酵母中的效率。本研究

中,为了获得较已有的酿酒酵母强启动子 P_{TEF} 效率更高的启动子,以 P_{TEF} 序列为模板,易错 PCR 产生突变 P_{TEF} 序列。突变启动子克隆于 YEP353 载体后转化酿酒酵母 Y16 菌株,获得重组酵母转化子文库。经过含 X-Gal 培养基平板初筛以及 ONPG 法复筛鉴定, N36 等三个转化子产生的 β -gal 明显高于启动子未改造的对照酵母。测序后分析发现三个转化子重组 YEP353 质粒上克隆的突变 P_{TEF} 序列完全一致,均仅有一个碱基突变(T234C)。筛选获得的三个突变启动子来自不同批次的易错 PCR 产物。实验中,虽然为了获得尽可能多的突变启动子,进行了多管多次易错 PCR,但每一次 PCR 的退火温度、延伸时间等程序完全一致,在相同条件下,可能存在偏好突变位点的情况。T234C 位点突变显

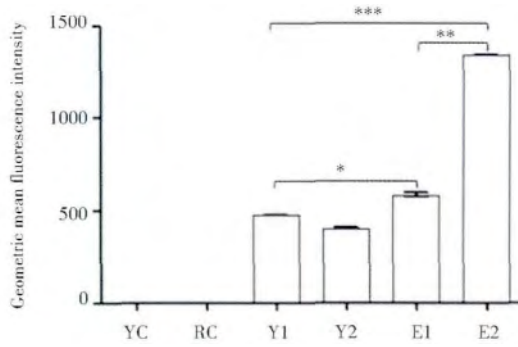


图2 流式细胞仪检测重组酵母平均荧光强度

Fig. 2 Flow cytometry analysis of geometric mean fluorescence intensity of the recombinant yeasts
Cell number of each test sample is 5×10^4 . * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

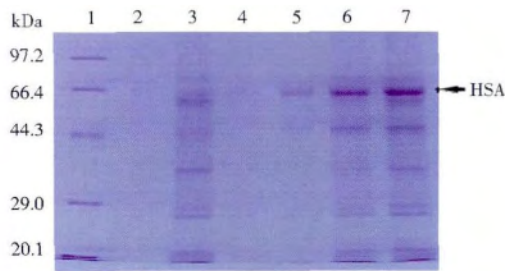


图3 SDS-PAGE 鉴定各重组酵母分泌表达 HSA 情况
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of HSA secreted by the recombinant yeasts

1: Marker; 2: Corotrol YC; 3: Corotrol EC; 4: Y3; 5: Y4; 6: E3; 7: E4

著提高 P_{TEF} 启动子的转录效率可能与该位点突变后影响启动子区结构,促进 RNA 聚合酶与启动子区结合有关,其具体机制有待实验确认。本研究证实通过易错 PCR 优化酵母启动子是一种行之有效的办法。

宿主也是表达系统需要考虑的重要因素,宿主细胞内生化环境(RNA 转录和翻译速率、蛋白质折叠速率、稳定性等)对重组蛋白的产生具有重要影响^[2,18]。诱变、代谢工程等可以通过各种途径改变宿主细胞内环境,进而改善宿主生产重组蛋白的能力。国内外不少研究报道证实了化学诱变剂 EMS 改造宿主的有效性。为了提高酿酒酵母 Y16 生产重组蛋白(特别是分泌重组蛋白)的能力,我们采用 EMS 对 Y16 进行诱变处理。通过 EMS 对 Y16 酵母的处理,筛选获得了表达 β -gal 能力提高的二株突变酵母 Y16-E14、Y16-E19。研究中发现与未诱变的 Y16 比较,Y16-E14 酵母形态发生了明显变化,即 Y16-E14 酵母细胞个体更大。诱变

改造的菌株生理特性是否发生变化、通过何种途径提高重组蛋白表达水平需要后续进一步研究探究。

将原有的 pHR 酿酒酵母表达载体启动子 P_{TEF} 替换为突变启动子 P_{TEFv1} 、宿主酵母 Y16 替换为 Y16-E14,获得预期性能有所改进的 pHR-N 酵母表达系统。为了解 pHR-N 酵母表达系统的普适性,我们分别以 GFP、HSA 为报告基因验证 pHR-N 系统胞内表达或分泌表达重组蛋白的能力。研究结果显示,相对启动子或宿主单一因素优化 P_{TEFv1} 和 Y16-E14 协同应用大大提高了重组蛋白胞内表达或分泌表达水平。

通过启动子和宿主两方面的改造,优化后的 pHR-N 表达系统表达外源基因的能力进一步提升,为拓展新型 pHR 酿酒酵母表达系统在生物医药领域的应用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] McAleer W J, Buynak E B, Maigetter R Z, et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 1984, 307: 178-180.
- [2] Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 2012, 30: 1108-1118.
- [3] Miura S, Dwiarti L, Arimura T, et al. Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97(1): 19-23.
- [4] 张丽杰, 邸进申, 全学军等. 诱变选育高产海藻糖的酵母菌株. *生物技术* 2005, 15(1): 31-33.
Zhang L J, Di J S, Quan X J, et al. Breeding of high trehalose producing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology*, 2005, 15(1): 31-33.
- [5] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *PNAS*, 2005, 102(36): 12678-12683.
- [6] Partow S, Siewers V, Sara Björn S, et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2010; 27: 955-964.
- [7] Blount B A, Weenink T, Ellis T. Construction of synthetic regulatory networks in yeast. *FEBS Letters*, 2012, 586: 2112-2121.
- [8] Yu J, Jian J X, Ji W M, et al. Glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol Lett*, 2011, 33: 147-152.
- [9] 江佳稀, 张宇飞, 沈洪波等. 表达结核杆菌抗原的重组酿酒酵母免疫小鼠研究. *复旦学报(自然科学版)*, 2011, 50(2): 192-197.

- Jiang J X , Zhang Y F , Shen H B , et al. Induction of antigen-specific humoral immune response by subcutaneous vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing Mycobacterium tuberculosis antigen. *Journal of Fudan University (Natural Science)* , 2011 , 50(2) : 192-197.
- [10] Gietz R D , Schiestl R H. Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/ PEG method. *Nat Protoc* , 2007 , 2(1) : 1-4.
- [11] Cline J , Braman J C , Hogrefe H H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* , 1996 , 24: 3546-3551.
- [12] Chaput J C , Woodbury N W , Stearns L A , et al. Creating protein biocatalysts as tools for future industrial applications. *Expert Opin Biol Ther* , 2008 , 8: 1087-1098.
- [13] Burns P A , Allen F L , Glickman B W. DNA sequence analysis of mutagenicity and site specificity of ethyl methanesulfonate in Uvr + and UvrB- strains of *E. coli*. *Genetics* , 1986 , 113: 811-819.
- [14] 程明 崔承彬 李长伟等. 化学诱变技术在微生物育种研究中的应用. *国际药学研究杂志*. 2009 , 36(6) : 412-417.
- Cheng M , Cui C B , Li C W , et al. Chemical mutation technique applied in microorganism breeding. *Journal of International Pharmaceutical Research* , 2009 , 36(6) : 412-417.
- [15] Guarente L. Yeast promoters and *lac-Z* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol* , 1983 , 101: 181-191.
- [16] Fashena S J , Serebriiskii IGand Golemis E A. The continued evolution of hybrid screening approaches in yeast: How to outwit different baits with different preys. *Gene* , 2000 , 250: 1-14.
- [17] Menzel R. A microtiter plate-based system for the semiautomated growth and assay of bacterial cells for beta-galactosidase activity. *Anal Biochem* , 1989 , 181: 40-50.
- [18] Böer E , Steinborn G , Kunze G , et al. Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2007 , 77: 513-523.

The Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* Expression System by Mutagenesis of Promoter and Host Strain

ZHANG Xu WANG Jing-jing LIU Jian-ping

(State Key Laboratory of Genetic Engineering , School of Life Sciences , Fudan University , Shanghai 200433 , China)

Abstract An expression system with high efficiency is very important for recombinant proteins production in biopharmaceutical field. *Saccharomyces cerevisiae* is a food-graded eukaryotic organism. The features of short generation time , simple culture condition and well-characterized manipulation techniques make yeast *S. cerevisiae* an attractive cell factory for production of heterologous protein. Here , for the purpose to improve the efficiency of pHR expression system which was constructed in our lab previously. , the promoter of pHR expression vector (P_{TEF}) and host strain Y16 were modified by the way of error-prone PCR and mutagenesis respectively. After several rounds of screening , a mutant P_{TEFv1} with higher efficiency than the mother promoter P_{TEF} was obtained. Two modified yeast strains Y16-E14 and Y16-E19 were identified with higher productivity of heterologous protein than yeast Y16. Then P_{TEFv1} and yeast Y16-E14 were used to construct the novel pHR-N expression system. To evaluate the ability of pHR-N expression system , yeast green fluorescent protein (GFP) and human serum albumin (HSA) were chosen to be expressed intracellularly and extracellularly respectively. The results showed that pHR-N system had higher ability to produce either intracellular GFP or extracellular HSA than pHR system. The pHR-N yeast expression system provides a valuable resource for future application in recombinant protein production.

Key words *Saccharomyces cerevisiae* Expression system Promoter Host strain optimization