

# 组合策略促进碱性果胶酶在毕赤酵母中高效表达

陈双全<sup>1,2</sup>, 刘松<sup>1,2</sup>, 堵国成<sup>\*1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 本研究组合了基因密码子优化及分子伴侣共表达策略提高碱性果胶酶(PGL)在毕赤酵母中的胞外产量。基于 *Pichia pastoris* 密码子偏好性, 优化了来源于 *Bacillus* sp. WSHB04-02 PGL 高热稳定性突变体 K314M 基因, 并克隆至 pPIC9K 的 *EcoR* I-*Not* I 得到 PGL 表达载体 pPIC9K-PGL。pPIC9K-PGL 转化 *Pichia pastoris* GS115(his<sup>-</sup>) 得到重组菌 GS115/PGL 14#, 胞外 PGL 酶活达到 301.32 U/mL, 较优化前提高 25.1%。在此基础上, 分别及同时共表达分子伴侣内质网蛋白折叠氧化还原辅助因子(ERO1)和泛素共轭酶(UBC1)。结果显示, 同时表达 ERO1 和 UBC1(GS115/PGL1-ERO1-UBC1 2#)使重组菌胞外 PGL 较共表达前提高 49.3%, 达到 450.12 U/mL。应用指数流加策略对重组菌株 GS115/PGL1-ERO1-UBC1 2# 进行 3 L 罐发酵, 诱导发酵 96 h 胞外 PGL 可达 1 362.31 U/mL。研究结果对促进 PGL 产量的提升及其应用具有重要现实意义。

**关键词:** 碱性果胶酶; 毕赤酵母; 密码子优化; 分子伴侣; 指数流加

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)02-0035-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.006

## High-Level Expression of Alkaline Polygalacturonate Lyase in *Pichia pastoris* by Using a Combined Strategy

CHEN Shuangquan<sup>1,2</sup>, LIU Song<sup>1,2</sup>, DU Guocheng<sup>\*1,2</sup>, CHEN Jian<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;  
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this study, codon usage optimization and co-expression of molecular chaperone are used to improve the extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase (PGL) in *Pichia pastoris*. According to the codon bias of *P. pastoris*, the gene of the stabilized mutant (K314M) of *Bacillus* sp. WSHB04-02 PGL is optimized and cloned into the *EcoR* I-*Not* I sites of pPIC9K-PGL, yielding the expression plasmid pPIC9K-PGL. pPIC9K-PGL is transformed into the *P. pastoris* GS115 (his<sup>-</sup>), yielding the strain GS115/PGL 14#. GS115/PGL 14# produced 301.32 U/mL of extracellular PGL which is 25.1% higher than that of the strain with native PGL gene. On this basis, two molecular chaperones the protein folding factors endoplasmic reticulum oxidoreduction 1 (ERO1) and ubiquitin-conjugating enzyme (UBC1) are co-expressed with the optimized K314M

收稿日期: 2016-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401638); 江苏省自然科学基金项目(BK20130132)。

\* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等领域的研究。

E-mail: gdcu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 陈双全, 刘松, 堵国成, 等. 组合策略促进碱性果胶酶在毕赤酵母中高效表达[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 35-43.

gene individually and simultaneously. It is showed that co-expression of ERO1 and UBC1 at the same time(GS115/PGL1-ERO1-UBC1 2#) increased the extracellular PGL by 49.3%, which is up to 450.12 U/mL. By using an exponential fed-batch strategy in 3L-fermenter, GS115/PGL1-ERO1-UBC1 2# produces 1 362.31 U/mL after the 96 h induction by methanol. The results here may benefit the industrial production and application of the PGL.

**Keywords:** alkaline polygalacturonate lyase, *Pichia pastoris*, codon-optimization, molecular chaperone, exponential fed-batch

碱性果胶酶(EC 4.2.2.2, PGL)可在碱性条件下将果胶质裂解为不饱和的寡聚半乳糖醛酸,广泛应用于纺织、食品、造纸及环境领域<sup>[1-2]</sup>。为实现高效生产,PGL已在枯草芽孢杆菌<sup>[3]</sup>、大肠杆菌<sup>[4]</sup>及毕赤酵母(*P. pastoris*)<sup>[5]</sup>中表达。其中,重组大肠杆菌获得的PGL产量最高,达到4 478 U/mL<sup>[4]</sup>。然而,大肠杆菌表达PGL仍存在诸多问题,包括培养基成本高(蛋白胨类)、需添加价格昂贵的诱导剂(异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)及易感染噬菌体等。对于工业生产,*P. pastoris*表达系统具有如下优势:目标基因整合于基因组表达,稳定性高;营养需求低;易于高密度培养;分泌系统强,胞外杂蛋白极少,目标蛋白易于分离纯化<sup>[6]</sup>。本团队前期研究中,成功实现了PGL在*P. pastoris*中的表达,产量达到863 U/mL,经补料策略优化可进一步提高<sup>[7]</sup>。

大量研究表明,外源蛋白在*P. pastoris*中高效表达受一系列因素影响<sup>[8-10]</sup>。首先,目标基因拷贝数将在基因转录水平上影响外源蛋白在*P. pastoris*中的表达<sup>[11]</sup>。其次,*P. pastoris*对密码子显示出偏好性也将在翻译阶段调控基因表达<sup>[12-13]</sup>。此外,外源蛋白的过量表达会引起未折叠蛋白效应(UPR),对外源蛋白的折叠和转运有重要作用。UPR包括大量的分泌辅助因子或分子伴侣,如:转录因子(HAC1)、蛋白二硫键折叠酶(PDI)、内质网中蛋白折叠氧化还原辅助因子(ERO1)、结合蛋白(BIP)、泛素共轭酶(UBC1)以及辅助转运及分泌过程的其他分子伴侣等<sup>[14-16]</sup>。因此,对基因拷贝数、密码子偏好性及UPR等因素的调控是促进PGL在*P. pastoris*中表达的重要策略。

本团队在前期研究中筛选得到的一株产PGL的*Bacillus* sp. WSHB04-02菌株,经分子改造提高了其热稳定性及催化活性<sup>[17]</sup>。本研究以PGL高热稳定性突变体K314M为研究对象,通过密码子优化及过量表达分子伴侣ERO1及UBC1,以期提高PGL

在*P. pastoris*中的分泌表达效率,并在3 L罐水平上考查了重组菌的发酵性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** 编码*Bacillus* sp. WSHB04-02 PGL高热稳定性突变体K314M基因的载体pET-22b(+)/pgl,由本研究室在前期工作中构建<sup>[17]</sup>。表达载体pPIC9K及pGAPZA,表达宿主*P. pastoris* GS115 (his<sup>-</sup>)及克隆宿主*E. coli* TOP10均购于Invitrogen公司(美国)。

**1.1.2 主要试剂** 限制性内切酶EcoR I、Not I、Sac I、BamH I、Bsp119 I、Kpn I和Avr II购自ThermoFisher公司(美国)。胶回收柱回收试剂盒、Prime STAR HS DNA聚合酶、酵母Total RNA提取试剂盒(Yeast RNAiso Kit),反转录试剂盒(Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser)及定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex Taq TM Tli RNase H Plus)购自大连宝生物Takara公司。One Step Cloning Kit试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。质粒提取试剂盒、G418、Zeocin、蛋白定量试剂购自生工生物工程(上海)有限公司。聚半乳糖醛酸购自Sigma公司(美国)。其他常用试剂及药品均为分析纯,进口分装或国产。

**1.1.3 培养基** YPD培养基(g/L):蛋白胨20、酵母提取物10、葡萄糖20。

BMGY培养基(g/L):蛋白胨20、酵母提取物10、甘油40、YNB13.4、生物素0.000 4、0.1 M磷酸盐缓冲液,pH 6.0。

BMMY培养基(g/L):蛋白胨20、酵母提取物10、YNB13.4、生物素0.000 4、9%甲醇(v/v)、0.1 M磷酸盐缓冲液,pH 6.0。

PTM1溶液(g/L):CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 6.0、KI 0.08、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.0、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.02、

CoCl<sub>2</sub> 0.5、ZnCl<sub>2</sub> 20.0、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 65.0、生物素 0.2、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 mL/L。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PGL 及分子伴侣表达载体构建

1)PGL 表达载体 pPIC9K-PGL 构建 研究发现不同物种对密码子使用频率不同,*P. pastoris* 对密码子显示出偏好性,也将在翻译阶段调控基因表达<sup>[12-13]</sup>。基于 *P. pastoris* 密码子偏好性对 PGL 高热稳定性突变体 K314M 的基因优化,并克隆至宿主 pUC57(金斯瑞生物科技有限公司)。以 pUC57-PGL 为模板,用引物 PGL-F/R(表 1)扩增 PGL 基因,PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min;随后进行 34 个循环(95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min),最后 72 ℃ 保温 10 min。载体 pPIC9K 用 *Eco*R I 及 *Not* I 双酶切,PCR 片段及酶切后的载体柱回收,根据 One Step Cloning Kit 试剂盒说明书进行重组连接,连接产物转化 *E.coli* TOP10,质粒提出得到 PGL 表达载体 pPIC9K-PGL。未经密码子优化的 K314M 基因通过引物 PGLN-F 和 PGLN-R 从 pET-22b (+)/*pgl* 扩增得到,并克隆至 pPIC9K 中 *Eco*R I-*Not* I 位点,得到表达载体 pPIC9K-PGLN。

2)内参基因载体 pPIC9K-GAPDH 构建 内参基因在各组织和细胞中表达相对恒定,常用做参照

物,在测定基因转录水平及拷贝数时甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(GenBank No:U62648.1)常用做内参基因<sup>[18-19]</sup>,以 *P. pastoris* GS115 cDNA 为模板,用引物 GAPDH-F/R(表 1)扩增 GAPDH 基因,PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min;随后进行 34 个循环(95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min),最后 72 ℃ 保温 10 min。载体 pPIC9K 用 *Eco*R I 及 *Not* I 双酶切,PCR 片段及酶切后的载体柱回收,根据 One Step Cloning Kit 试剂盒说明书进行重组连接,得到 GAPDH 载体 pPIC9K-GAPDH。

3)分子伴侣共表达载体的构建 以 *P. pastoris* GS115 cDNA 为模板,分别用引物 ERO1-F/R 和 UBC1-F/R(表 1)扩增 ERO1(GenBank No:XM\_002489600.1)和 UBC1(GenBank No:XM\_002493814.1)基因。PCR 扩增条件为:95 ℃预变性 5 min,随后进行 34 个循环(95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min),最后 72 ℃保温 10 min。载体 pGAPZA 用 *Bsp*119 I 及 *Kpn* I 双酶切,PCR 片段及酶切后的载体柱回收,根据 One Step Cloning Kit 试剂盒说明书进行重组连接,分别得到 ERO1 和 UBC1 表达载体 pGAPZA-ERO1 及 pGAPZA-UBC1。利用 *Bgl* II 与 *Bam*H I 为同尾酶效应,将构建好的 pGAPZA-ERO1 用 *Bgl* II 与 *Bam*H I 双酶切,

表 1 本研究中所用 PCR 引物  
Table 1 Primers used for PCR in this study

| 引物名称       | 引物序列(5'-3')                                      |
|------------|--------------------------------------------------|
| PGL-F      | GCTGAAGCTTACGTAGAATTCGCTGATTTCGGTCATCAAACACTTG   |
| PGL-R      | AAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAGTTCAATTTCCAGCACCTGCT  |
| PGLN-F     | GCTGAAGCTTACGTAGAATTCGCTGATTAGGCCACCAGACGT       |
| PGLN-R     | AAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAATTTAATTTACCCGCACCCG   |
| GAPDH-F    | GCTGAAGCTTACGTAGAATTCATGGCTATCACTGTCTGGTATTAACG  |
| GAPDH-R    | AAGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAAGCCTTAGCAACGTGTTGCA   |
| ERO1-F     | CAATTGAACAACATATTCGAAACGATGAGGATAGTAAGGAGCGT     |
| ERO1-R     | GCCGCCGCGGCTCGAGGTACCTTACAAGTCTACTCTATATGTGTA    |
| UBC1-F     | CAATTGAACAACATATTCGAAACGATGACTAGCATTAAACGAATCAGC |
| UBC1-R     | GCCGCCGCGGCTCGAGGTACCTCATCTCAAAAGCTCTTCTAAAATT   |
| PGL-RT-F   | CGAGTTTCAAGATGCCTACG                             |
| PGL-RT-R   | GGTGATGTGGAGTCTGGTC                              |
| GAPDH-RT-F | ACGGCTTCTGTTAACATC                               |
| GAPDH-RT-R | TCAACAACGGAGACATCG                               |
| ERO1-RT-F  | TGAGGATAGTAAGGAGCGTAG                            |
| ERO1-RT-R  | TGTTGACCAGTTCCACCAG                              |
| UBC1-RT-F  | TATTGAAGAATGCCTGGAC                              |
| UBC1-RT-R  | CCTTTATAGTCGGGATTGG                              |

注:下划线为 DNA 限制性内切酶识别位点

胶回收得到完整的 GAP-ERO1-AOX(TT)表达框,再与用 *Bam*H I 单酶切的 pGAPZA-UBC1 载体连接,得到共表达 ERO1 和 UBC1 的载体 pGAPZ-ERO1-UBC1。

**1.2.2 *P. pastoris* GS115 转化与筛选** 为表达 PGL 基因,用 *Sac* I 将质粒 pPIC9K-PGL 线性化,电转化至感受态 *P. pastoris* GS115 菌株。转化后涂布 MD 平板,30 ℃培养 3~4 d,经 MD/MM 平板筛选 Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>-</sup> 菌株,再经 YPD+1~4 mg/mL G418 平板初步筛选基因拷贝数,挑选 5~10 个重组菌进行摇瓶发酵。

为共表达分子伴侣,用 *Avr* II 线性化 pGAPZA-ERO1, pGAPZA-UBC1 及 pGAPZA-ERO1-UBC1,电转化至以第 1 次转化筛选得到的重组菌株 GS115/PGL14#,涂布 YPD+100 μg/mL Zeocin 平板,30 ℃培养 3~4 d,经 100~400 μg/mL Zeocin 平板初步筛选基因拷贝数,挑选 5~10 个重组菌进行摇瓶发酵。

**1.2.3 重组 *P. pastoris* 摇瓶发酵** 摇瓶培养条件:从固体培养基上挑取单菌落接种于 YPD 培养基中 30 ℃,220 r/min 培养 14 h,以 10%接种量转接于 BMGY 培养基中 30 ℃,220 r/min 培养 24 h,收集菌体,生理盐水清洗 2 次,转接至 BMMY 培养基中 22 ℃,220 r/min 诱导 PGL 表达,每 24 h 补加 1.5%甲醇(v/v)。

细胞生长情况及酶活每 24 h 取样测定,筛选得到的较优重组菌株通过荧光定量 PCR 准确测定其基因拷贝数。

**1.2.4 3 L 罐发酵** 从平板上挑取单菌落接种于 YPD 培养基中 30 ℃,220 r/min 培养 24 h,以 10%接种量接种于包含 800 mL 分批发酵培养基(85%磷酸 26.7 mL/L, CaSO<sub>4</sub> 0.93 g/L, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18.2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 甘油 40.0 g/L, PTM<sub>1</sub> 4.35 mL/L)的 3 L 发酵罐(美国 NBS 公司)中,初始搅拌转速为 500 r/min,通气量为 2 vvm,50%氨水及 30%磷酸控制 pH5.5,生长期培养温度为 30 ℃,当甘油耗尽溶氧反弹时以指数流加方式补加 50%(w/v 含 12 mL/L PTM<sub>2</sub>)甘油,待甘油再次耗尽溶氧反弹时,饥饿培养 2 h,开始流加诱导培养基(100%甲醇含 12 mL/L PTM<sub>2</sub>),同时温度降低至 22 ℃,搅拌转速升高至 900 r/min,诱导 PGL 表达。诱导培养基采用分阶段流加方式:0~8 h 流速 2 mL/h,8~90 h 流速 9.6 mL/h,>90 h 流速 2 mL/h<sup>[20]</sup>。每隔 12 h

取样一次,测定生物量、酶活、蛋白含量等参数。

**1.2.5 指数流加** 指数流加是建立在对物料平衡及反应动力学两方面进行合理假设基础上的一种较为常见的前置流加控制法,可使限制性基质的供给与反应器中细胞量随时间的指数增加相适应。流加速率为

$$F(t) = \frac{\mu_{\text{set}} X_0 V_0 \exp(\mu_{\text{set}} t)}{S_f Y_{XS}} \quad (1)$$

式中: $F(t)$ 为流加速率,L/h; $X_0$ 为细胞密度,g<sub>cell</sub>/L; $V_0$ 为初始体积,L; $S_f$ 代表补料液中甘油浓度,g/L; $Y_{XS}$ 对底物细胞得率(g<sub>cell</sub>/g<sub>glycerol</sub>); $\mu_{\text{set}}$ 为设定的比生长速率(h<sup>-1</sup>)。其中 $\mu_{\text{set}}$ 为 0.176 h<sup>-1</sup>, $Y_{XS}$ 为 0.435 g/g, $S_f$ 为 500 g/L<sup>[5]</sup>。

**1.2.6 PGL 蛋白纯化** 取发酵液于 4 ℃,8 000 r/min 离心 10 min 获得含 PGL 发酵上清,将发酵上清置于冰上,边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末,至终浓度 40%~60%,离心得富集的粗 PGL 蛋白,粗蛋白用 5 mL 缓冲液 A (20 mmol/L 甘氨酸-NaOH 溶液,pH 7.5)复溶,并置于 A 液中透析 24 h,将样品用 0.22 μmol/L 微孔滤膜过滤,纯化使用 AKTA 纯化仪及 5 mL 阳离子柱(HiTrapTM SP FF 2.5 cm,GE)。柱纯化条件如下:用 5~10 倍柱体积的缓冲液 A 平衡阳离子柱,之后以 1 mL/min 流速进样,进样结束以 5 个柱体积 A 液继续平衡柱子,流速改为 2 mL/min,用洗脱缓冲液 B (20 mmol/L 甘氨酸-NaOH 溶液,pH 7.5,1 mol/L NaCl)梯度洗脱,收集洗脱液,取测得 PGL 酶活的洗脱液在 A 液中透析过夜,样品 4 ℃保存。

**1.2.7 PGL 活力测定** 酶活测定条件为:发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,胞外 PGL 即包含于发酵上清液之中,取一定量稀释做检测。PGL 反应体系<sup>[21]</sup>:含 0.2% 聚半乳糖醛酸(底物)的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (0.2 mol/L,0.44 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>,pH 9.4)2 mL,待测样品 20 μL,无活性的酶液为空白对照。PGL 反应条件为:将反应体系置于 45 ℃下水浴 15 min,用 3 mL 磷酸溶液(0.03 mol/L)终止反应,在 235 nm 处测定吸光度值。单位酶活定义:单位时间(1 min)裂解聚半乳糖醛酸产生 1 μmol 的不饱和聚半乳糖醛酸所用的酶量。计算方法如下

$$\frac{OD_{235} \times 10^6 \times \text{体系体积} \times \text{稀释倍数}}{10^3 \times b \times 4\ 600 \times t \times \text{酶液体积}} \quad (2)$$

式中: $b$ 为比色皿厚度,cm;4 600 为不饱和 PGA 于

235 nm 处的摩尔吸光系数, L/mol/cm;  $t$  为酶促反应时间(在酶促反应线性范围之内), min。

**1.2.8 荧光定量 PCR** 目标基因拷贝数通过 RT-PCR 测定<sup>[18-19]</sup>, 定量 PCR 引物(表 1)。20  $\mu$ L 反应体系包括 10  $\mu$ L SYBR Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus), 0.8  $\mu$ L RT-PCR F/R 引物 (10  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ L DNA 模板(<100 ng), 6.4  $\mu$ L 灭菌蒸馏水。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C, 30 s 预变性; 95  $^{\circ}$ C, 5 s, 55  $^{\circ}$ C, 30 s, 40 个循环反应。40 个循环后通过融解曲线分析特异性。以 10 倍梯度稀释的内参基因 GAPDH 及目标基因作为模板建立标准曲线, 以重组菌株基因组作为 RT-PCR 的模板, 通过双曲线法计算不同重组菌株中相关基因的拷贝数。

**1.2.9 PGL 去糖基化** 纯化后的 PGL 用去糖基化酶 Endo H(美国 NEB 公司)处理<sup>[22]</sup>: 10  $\mu$ L PGL 上清, 加入 1  $\mu$ L 10 $\times$ Glycoprotein Denaturing Buffer 混合, 100  $^{\circ}$ C 反应 10 min, 再加入 2  $\mu$ L 10 $\times$ GlycoBuffer 3, 2.5  $\mu$ L Endo H, 加水补足至 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h。

**1.2.10 PGL 半衰期的测定** 重组 PGL 及突变体的热稳定性用 55  $^{\circ}$ C 下酶活力半衰期( $t_{1/2}$ , min)来表示。将纯化后的 PGL 用 20 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 7.5)稀释至 100  $\mu$ g/mL, 并在 55  $^{\circ}$ C 保温, 间隔测定残余酶活, 将残余酶活按照文献所述方式

拟合并计算  $t_{1/2}$ <sup>[23]</sup>。

**1.2.11 SDS-PAGE 分析** 样品与 4 $\times$ 加样 Buffer 混合, 72  $^{\circ}$ C 处理 10 min, 5% 浓缩胶及 12% 分离胶购自 Invitrogen 公司(美国), 操作参考产品说明书。

## 2 结果与分析

### 2.1 密码子优化对 PGL 表达的影响

*P. pastoris* 对一些密码子显示出偏好性, 从而影响编码基因的表达效率<sup>[13]</sup>。研究发现, 密码子优化可使葡萄糖异构酶在 *P. pastoris* 中的表达效率提高 2.4 倍<sup>[24]</sup>。为提高 PGL 的转录及翻译效率, 基于 *P. pastoris* 的密码子偏好性对 *Bacillus* sp. WSHB04-02 来源的 PGL 基因进行优化(图 1), 使其密码子适应指数(CAI)由 0.63 提高至 0.84<sup>[25]</sup>, GC 含量从 46.64% 降为 42.41%。基因结构分析表明, 不适宜的 GC 峰也被优化以延长 mRNA 的半衰期; 影响 mRNA 稳定性及核糖体结合的茎环结构被破坏掉; 消极的顺式位点也被成功修饰。

将 *Bacillus* sp PGL 基因克隆至 pPIC9K 中的 *EcoR* I-*Not* I 位点, 构建得到 PGL 表达质粒 pPIC9K-PGL (图 2 (a)), 转化 *P. pastoris* GS115 (*his*<sup>-</sup>) 得到重组菌 GS115/PGL 转化子, 经 MD/MM 平板筛选 Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>s</sup> 菌株, 获得表型为 Mut<sup>+</sup> 的数十株菌

```
GCTGATTGGGTCATCAAACTTGGATCTAATGACGGTTGGGGAGCATACTCAACTGGTACTACCGGTGGTAGT
AAGGCTTCTTCCTTGAACGTTTACACTGTCTCTAACAGAAACCAGTTGGTTTCCGCTCTTGGTAAAGAAACCAAC
ACAACTCCAAAGATCATCTACATCAAGGGAACAATCGATATGAACGTTGATGACAATTTGAAGCCATTGGGTCTT
AACGATTACAAAGACCCTGAATATGATTTGGACAAGTACCTTAAAGCTTATGATCCATCAACTTGGGGTAAAAAG
GAGCCTAGTGGAACCCAGAAGAGGCCAGAGCAAGATCTCAAAAGAATCAGAAAGCTAGAGTTATGGTCGATATT
CCTGCCAACACCACAATCGTTGGTTCAAGAACTAATGCAAAGGTTGTGGGTGGAACTTCCAAATTAATCTGAC
AACGTCATCATCAGAAATATCGAGTTTCAAGATGCCACGACTATTTCCACAGTGGGATCCTACCGACGGTTCA
AGTGGAAACTGGAACCTCAGTACGATAACATTACTATCAATGGTGGAAACCCATATTGGATCGACCCTGTACC
TTTAATGATGGTTCAAGACCAGACTCCACATCACCTAAGTACTACGGAAGAAAGTACCAACATCACGATGGTCAG
ACTGACGCCTCTAACGGAGCAAACCTAGATCACCATGTCTTACAACCTACTATCATGATCAGGACAAAGTCTTCCATT
TTCCGTTCAAGTGATAGTAAAAACATCTGATGACGGAAAGTTGAAAATTACTCTTCATCACAACAGATACAAGAAT
ATCGTTCAAAGAGCTCCAAGAGTCAGATTTGGTCAGGTTTCATGTCTACAACAACCTACTACGAAGGATCAACTTCT
TCCTCAAGTTACCCATTGAGTTATGCTGGGGTATTGGAATGTCTTCCAAGATCTACGCACAAAACAATGTTATT
GATGTCCCTGGTTTGTCTGCTGCCAAAACCATCTCCGTTTCTCAGGTGGAACAGCTTTGTATGACTCTGGTACA
TTGCTTAACGGAACCTCAGATTAATGCCTCCGAGCTAACGGTTTGTCAAGTCTGTGGATGGACTCCTAGTCTT
CACGGTTCTATTGATGCTTCCGCCAATGTTAAGTCCAACGTCATTAATCAAGCAGGTGCTGGAAAATTGAACATAA
```

注: 黄颜色代表优化的密码子

图 1 密码子优化后的 PGL 基因序列

Fig. 1 Optimized PGL gene sequence

株,再经不同浓度梯度 G418 平板筛选,从 1~4 mg/mL 平板上各挑取 10 个单菌落进行摇瓶发酵 96 h。其中,菌株 GS115/PGL 9#、14# 和 19# 胞外酶活分别为 256.35、301.32 U/mL 和 273.24 U/mL。重组菌株 PGL 基因拷贝数使用 RT-PCR 进行确定(表 2),PGL 拷贝数为 3 时重组菌株具有最佳的 PGL 表达能力。未经密码子优化的 PGL 基因克隆至 pPIC9K 中的 *EcoR* I-*Not* I 位点得到 pPIC9K-PGLN,转化 *P. pastoris* GS115(his<sup>-</sup>)得到含 3 个拷贝数 PGL 基因的重组菌 GS115/PGLN。在相同拷贝数情况下,GS115/

PGL 14# 较 GS115/PGLN 胞外 PGL 酶活提高 25.1%, 表明密码子优化能有效提高 PGL 在 *P. pastoris* 分泌表达。

## 2.2 共表达分子伴侣对 PGL 胞外表达的影响

共表达 UPR 相关分子伴侣可有效减缓未折叠蛋白效应,促进外源蛋白在 *P. pastoris* 中的表达<sup>[14-16]</sup>。ERO1 可以辅助促进外源蛋白在内质网中的折叠,UBC1 可以通过泛素化作用辅助错误折叠蛋白的降解,共表达 ERO1 及 UBC1 可有效促进外源蛋白正确折叠及错误折叠蛋白的快速降解,从而缓解细胞

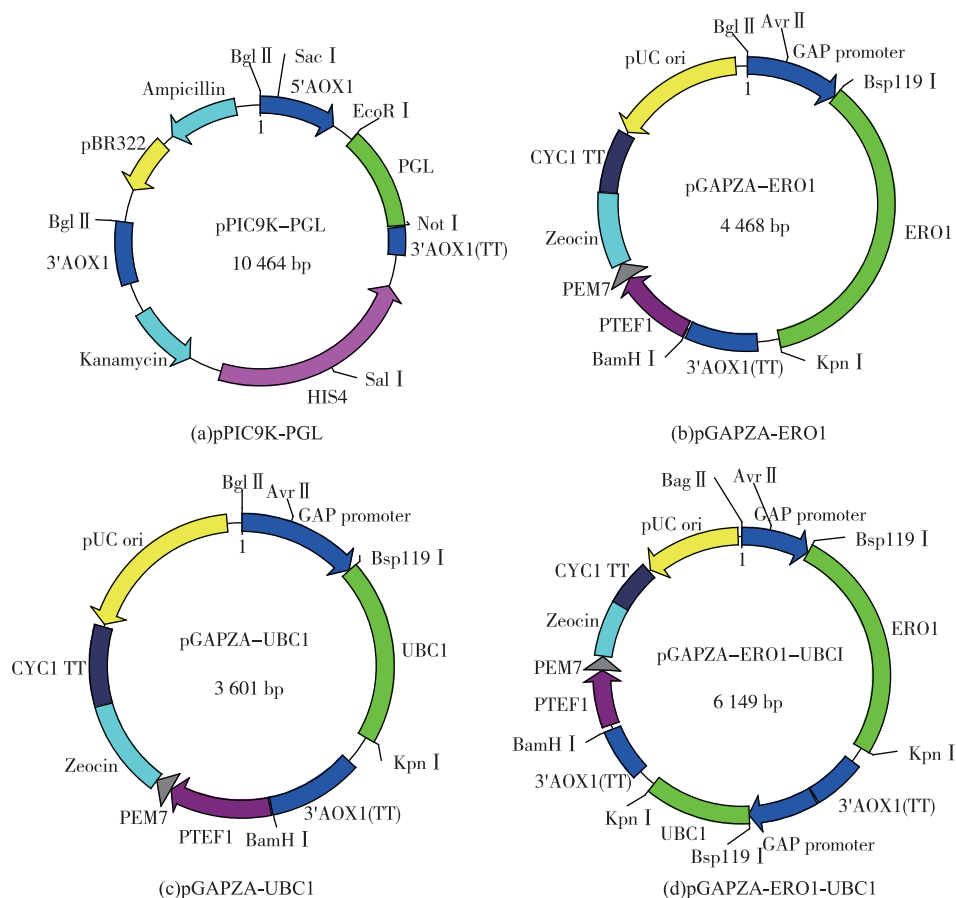


图 2 重组质粒示意图

Fig. 2 Schematic plot of recombinant plasmids

表 2 重组菌生产性能及 PGL 基因拷贝数

Table 2 Productivity of recombinant strains and copy numbers of PGL gene

| 菌株               | 酶活/(U/mL) | C <sub>t</sub> 值 |            | PGL 拷贝数 |
|------------------|-----------|------------------|------------|---------|
|                  |           | GAPDH            | PGL        |         |
| GS115/pPIC9K(CK) | —         | 16.78±0.16       | —          | 0       |
| GS115/PGL 9#     | 256.35    | 17.51±0.12       | 16.18±0.08 | 1       |
| GS115/PGL 14#    | 301.32    | 17.77±0.15       | 14.83±0.11 | 3       |
| GS115/PGL 19#    | 273.24    | 17.44±0.09       | 13.85±0.03 | 5       |
| GS115/PGLN       | 240.84    | 17.88±0.11       | 15.03±0.14 | 3       |

代谢压力,促进外源蛋白高效表达。为提高 PGL 胞外表达水平,在重组菌 GS115/PGL 14# 中分别共表达 ERO1 及 UBC1。将 ERO1 及 UBC1 基因克隆至 pGAPZA 中的 *Bsp*119 I-*Kpn* I 位点,构建得到表达质粒 pGAPZA-ERO1(图 2(b))和 pGAPZA-UBC1(图 2(c)),电转化 GS115/PGL 14#,得到 10 个转化子进行摇瓶发酵。经过 96 h 甲醇诱导发酵,PGL 酶活达到最大值,其中重组菌 GS115/PGL-ERO1 6# 及 GS115/PGL-UBC1 3# 的 PGL 酶活分别达到 408.27 U/mL 及 368.54 U/mL(图 3),较出发菌分别提高 35.5%及 22.3%。

为进一步提高 PGL 产量,在重组菌 GS115/PGL 14# 中共表达 ERO1 及 UBC1。将 pGAPZA-ERO1 用 *Bgl* II 与 *Bam*H I 双酶切,得到 GAP-ERO1-AOX(TT)表达框,克隆至 *Bam*H I 单酶切的 pGAPZA-UBC1 载体,得到共表达载体 pGAPZ-ERO1-UBC1(图 2d)。发酵结果显示,GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# 重组菌株其最大酶活达到 450.12 U/mL,相比于出发菌株提高 49.3%(图 3)。

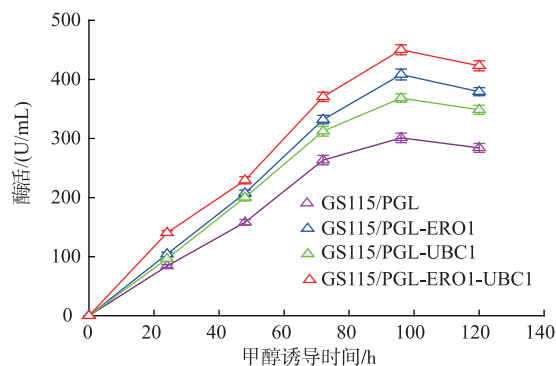


图 3 重组菌摇瓶发酵过程曲线

Fig. 3 Fermentation process curve of the recombinant strains in shake flask

以 GAPDH 基因为内参,应用 RT-PCR 测定了重组菌中分子伴侣的基因拷贝数。结果显示,GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# 中 ERO1 与 UBC1 基因拷贝数分别与 GS115/PGL-ERO1 6# 和 GS115/PGL-UBC1 3# 相同(表 3)。

### 2.3 3 L 罐发酵培养

分批补料发酵是一种简单有效的发酵模式,可在短时间内增加 *P. pastoris* 菌体浓度来提高目的产物的产量以及生产强度。通过分批补料发酵及相关参数优化,目标产物的产量可以提高数倍之多<sup>[26-27]</sup>。本实验室前期研究 PGL 时,通过分批补料发酵策略

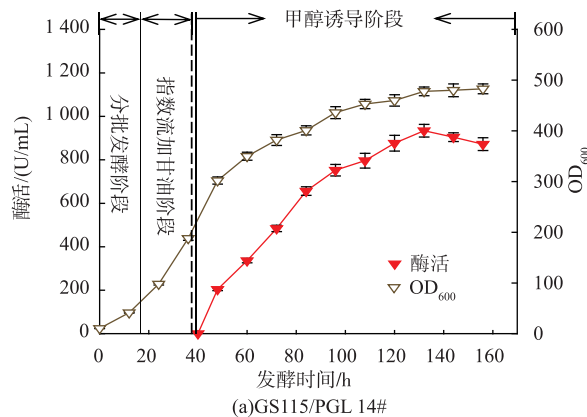
提高了 PGL 的表达水平<sup>[5,7]</sup>。因此,比较了重组菌 GS115/PGL 14# 及 GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# 在 3 L 罐中分批补料发酵。

表 3 RT-PCR 测定共表达基因拷贝数

Table 3 Copy numbers of co-expressing gene detected by real-time PCR

| 菌株                     | Ct 值       |            |            | 拷贝数 |
|------------------------|------------|------------|------------|-----|
|                        | GAPDH      | ERO1/UBC1  | 目标基因       |     |
| GS115/pPIC9K (CK)      | 16.78±0.16 | 17.54±0.13 | ERO1       | 1   |
| GS115/PGL-ERO1 6#      | 17.22±0.10 | 16.92±0.07 | ERO1       | 2   |
| GS115/PGL-UBC1 3#      | 17.02±0.07 | 16.48±0.09 | UBC1       | 2   |
| GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# | 17.34±0.11 | 17.11±0.10 | ERO1/ UBC1 | 2   |

发酵起始采取分批培养,在第 19 h DO 反弹初始甘油耗尽后,开始采用指数流加方式流加 50%的甘油溶液,控制比生长速率( $\mu_{set}$ )为 0.176 h<sup>-1</sup>,指数流加 19 h,当甘油耗尽 DO 再次反弹后,饥饿培养 2 h 后开始分阶段 (0~8 h 流速 2 mL/h,8~90 h 流速 9.6 mL/h,>90 h 流速 2 mL/h)流加诱导培养基,诱导重组菌生产 PGL<sup>[20]</sup>。如图 4 所示,在 20~40 h 细胞生长较快,诱导发酵初期菌体依然缓慢生长,至发酵后期 (100~160 h) 菌体量不再增加,此时重组菌 GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# 的细胞干重可达 120 g/L,组合共表达 ERO1 及 UBC1 的重组菌株 GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# 在诱导 96 h 时 PGL 酶活达到最大值为 1 362.31 U/mL,相比于未共表达分子伴侣的重组菌株 GS115/PGL 14# 的 934.34 U/mL 提高 45.8%,且菌体生长更好。这些结果表明共表达分子伴侣 ERO1 及 UBC1 可有效促进菌体生长及外源蛋白表达。



(a)GS115/PGL 14#

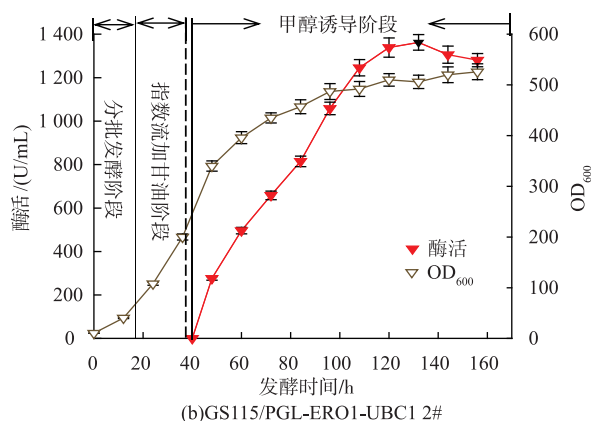


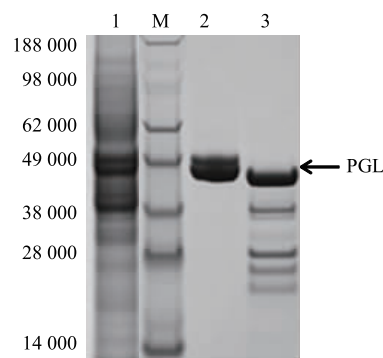
图4 重组菌3 L罐分批补料发酵过程曲线

Fig. 4 Fermentation process curve of the recombinant strains during fed-batch fermentation in the 3 L fermentor

为进一步研究糖基化对PGL表达的影响,通过阳离子柱纯化方法从GS115/PGL-ERO1-UBC1 2#诱导96 h发酵上清中分离纯化得到PGL纯酶。图5中SDS-PAGE分析显示,纯化后的PGL蛋白条大小为47 kDa和49 kDa,较PGL理论分子量43.5 kDa偏大。纯化的PGL经去糖基化酶Endo H处理后,PGL主要转化为43.5 kDa蛋白及其它未知低分子量蛋白,上述结果表明,PGL在*P. pastoris*表达后发生了糖基化。研究表明,糖基化对酶分子在酵母表达水平有重要作用<sup>[22,28]</sup>。在下一步工作中,将通过去糖基化修饰来进一步提高PGL的胞外表达水平。此外,GS115/PGL-ERO1-UBC1 2#生产的PGL 55℃下酶活力半衰期较野生酶提高81.3%,达到1.16 h,稳定性明显提升。

## 参考文献:

- [1] YADAV S, YADAV P K, YADAV D, et al. Pectin lyase: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(1): 1-10.
- [2] HOONDAL G S, TIWARI R P, TEWARI R, et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4/5): 409-418.
- [3] ZOU M Y, LI X Z, SHI W J, et al. Improved production of alkaline polygalacturonate lyase by homologous overexpression pelA in *Bacillus subtilis*[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(8): 1143-1150.
- [4] WANG H L, LI X M, MA Y H, et al. Process optimization of high-level extracellular production of alkaline pectate lyase in recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 93: 38-46.
- [5] WANG Y, WANG Z H, DU G C, et al. Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1343-1349.
- [6] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66.
- [7] WANG Z H, WANG Y, ZHANG D X, et al. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1318-1323.



M: 蛋白分子量标准;1:GS115/PGL-ERO1-UBC1 2# 诱导 96 h 发酵上清;2:纯化后的 PGL;3:Endo H 处理后的 PGL

图5 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis

## 3 结语

本研究表明系统性的密码子偏好性优化及共表达分子伴侣可显著促进宿主细胞生长及外源蛋白PGL的表达。单独共表达分子伴侣ERO1或UBC1对促进PGL的表达拥有较好效果,组合共表达ERO1-UBC1效果更加显著,也说明两个分子伴侣之间拥有积极的相互作用。在相同分批发酵条件下,改造后的重组菌GS115/PGL-ERO1-UBC1 2#胞外PGL酶活达到1 362.31 U/mL,较改造前PGL酶活863 U/mL提高57.9%<sup>[7]</sup>。此外,GS115/PGL-ERO1-UBC1 2#生产的PGL 55℃下酶活力半衰期较野生酶提高81.3%,达到1.16 h,稳定性明显提升。研究结果对促进PGL产量的提升及其应用具有重要意义。

- [ 8 ] AHMAD M,HIRZ M,PICHLER H,et al. Protein expression in *Pichia pastoris*:recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2014,98(12):5301-5317.
- [ 9 ] HOU J,TYO K E,LIU Z,et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **FEMS Yeast Res**,2012,12(5):491-510.
- [10] HOHENBLUM H,GASSER B,MAURER M,et al. Effects of gene dosage,promoters,and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2004,85(4):367-375.
- [11] VASSILEVA A,CHUGH D A,SWAMINATHAN S,et al. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**,2001,21(1):71-80.
- [12] DEML L,BOJAK A,STECK S,et al. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein [J]. **Journal of Virology**,2001,75(22):10991-11001.
- [13] AKCAPINAR G B,GUL O,SEZERMAN U. Effect of Codon optimization on the expression of *Trichoderma reesei* Endoglucanase 1 in *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnology Progress**,2011,27(5):1257-1263.
- [14] GASSER B,MAURER M,RAUTIO J,et al. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions[J]. **BMC Genomics**,2007,8:179.
- [15] SHA C,YU X W,LIN N X,et al. Enhancement of lipase r27RCL production in *Pichia pastoris* by regulating gene dosage and co-expression with chaperone protein disulfide isomerase[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2013,53:438-443.
- [16] YU P,ZHU Q,CHEN K,et al. Improving the secretory production of the heterologous protein in *Pichia pastoris* by focusing on protein folding[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2015,175(1):535-548.
- [17] LIU Song,WANG Mingxing,DU Guocheng,et al. Improvement of thermal stability of alkaline polygalacturonate lyase through site-directed mutagenesis[J]. **Food and Fermentation Industries**,2015,41(9):333-339.(in Chinese)
- [18] XUAN Yaoji,ZHOU Xiangshan,ZHANG Yuanxing. Determination of copy number of foreign gene in genome of *Pichia pastoris* by real-time fluorescent quantitative PCR[J]. **Chinese Journal of Biologicals**,2009,22(19):1236-1239.(in Chinese)
- [19] ABAD S,KITZ K,HORMANN A,et al. Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris* [J]. **Biotechnology Journal**,2010,5(4):413-420.
- [20] WANG Yun,HUA Zhaozhe,LIU Liming,et al. High-level production of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2008,24:835-839.(in Chinese)
- [21] WANG Mingxing,LIU Song,LIU Long,et al. Fusions of amphipathic peptide to the alkaline polygalacturonate lyase from *Bacillus* sp. WSHB04-02 improves the production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(5):504-509.(in Chinese)
- [22] HAGGLUND P,BUNKENBORG J,ELORTZA F,et al. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation [J]. **Journal of Proteome Research**,2004,3(3):556-566.
- [23] XU Z,LIU S,LU X,et al. Thermal inactivation of a recombinant lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* BBE in the absence and presence of additives[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2014,94(9):1753-1757.
- [24] ATA O,BOY E,GUNES H,et al. Codon optimization of xylA gene for recombinant glucose isomerase production in *Pichia pastoris* and fed-batch feeding strategies to fine-tune bioreactor performance [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**,2015,38(5):889-903.
- [25] PAUL M S ,LI W H. The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias,and its potential applications[J]. **Nucleic Acids Research**,1987,15:1281-1296.
- [26] ADIVITIY A,DAGAR V K,DEVI N,et al. High level production of active streptokinase in *Pichia pastoris* fed-batch culture[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2015,83:50-60.
- [27] HONG F,MEINANDER N Q,JONSSON L J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2002,79(4):438-449.
- [28] WEI W,CHEN L,ZOU G,et al. N-glycosylation affects the proper folding,enzymatic characteristics and production of a fungal  $\beta$ -glucosidase[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2013,110:3075-3084.