

促进米黑根毛霉脂肪酶分泌的毕赤酵母 内源信号肽的筛选

苗杨利, 李站胜, 韩双艳

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 米黑根毛霉脂肪酶 (*Rhizomucor miehei* Lipase, RML) 在造纸、食品、化妆品以及医药等行业应用广泛。本研究通过SignalP 4.1在线预测软件预测出9种具有分泌潜力的毕赤酵母内源信号肽序列: FLO10、CPR5、PRY2、DSE4、NUP145、MSB2、SSP120、FRE2、FLO9。以广泛应用的酿酒酵母 α -交配因子 (α -mating factor, α -MF) 信号肽为对照, 考察这九种内源信号肽对增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 和RML在蛋白酶缺陷型 *PichiaPink*TM 表达系统的分泌效果。结果发现FLO10、PRY2、DSE4、MSB2、SSP120、FRE2能有效介导EGFP分泌, 且PRY2、DSE4、MSB2、FRE2介导EGFP的分泌水平优于 α -MF, 分别是 α -MF的2.15倍、1.15倍、1.33倍、1.30倍; FLO10、PRY2、DSE4、FRE2能有效介导RML的分泌, 且FLO10介导RML的分泌水平最高, 是 α -MF的1.50倍, 说明内源信号肽FLO10更能有效分泌RML。本研究为提高米黑根毛霉脂肪酶在蛋白酶缺陷型毕赤酵母的表达量奠定了一定的基础。

关键词: 蛋白酶缺陷型毕赤酵母; 信号肽; 增强型绿色荧光蛋白 (EGFP); 米黑根毛霉脂肪酶 (RML)

文章编号: 1673-9078(2019)010-155-163

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.022

Screening Endogenous Signal Peptides in *Pichia pastoris* for Promoting the Secretion of Lipase from *Rhizomucor Miehei*

MIAO Yang-li, LI Zhan-sheng, HAN Shuang-yan

(Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) is widely used in the paper, food, cosmetics, pharmaceutical industries. In this study, nine potential endogenous signal peptide-like sequences with a secretory potential from *Pichia pastoris* were predicted by a SignalP 4.1 online software: FLO10, CPR5, PRY2, DSE4, NUP145, MSB2, SSP120, FRE2 and FLO9. Using the widely used α -mating factor (α -MF) signal peptide of *Saccharomyces cerevisiae* as the control, the effects of the nine endogenous signal peptides on the secretion of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and RML in a protease-deficient *PichiaPink*TM expression system were investigated. The results showed that FLO10, PRY2, DSE4, MSB2, SSP120 and FRE2 could effectively mediate the secretion of EGFP. Moreover, the secretion level of EGFP mediated by PRY2, DSE4, MSB2 and FRE2 were 2.15, 1.15, 1.33, 1.30 folds, respectively, that of α -MF. FLO10, PRY2, DSE4 and FRE2 could effectively mediate RML secretion, with the highest secretion level of RML with FLO10 (which was 1.50 folds that of α -MF). This study laid a foundation for improving the expression of RML in protease-deficient *Pichia pastoris*.

Key words: protease-deficient *Pichia pastoris*; signal peptide; enhanced green fluorescent protein (EGFP); *Rhizomucor miehei* Lipase (RML)

酵母表达系统是目前外源蛋白表达最常用的真核表达系统^[1], 表达载体中各表达元件均会显著影响外

收稿日期: 2019-01-24

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012AA022205)

作者简介: 苗杨利 (1993-), 女, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程、发酵工程

通讯作者: 韩双艳 (1976-), 女, 教授, 研究方向: 生物催化、酶工程、发酵工程

源蛋白的表达效率。信号肽是实现外源蛋白表达的重要元件, 引导新生肽链向分泌通路转移^[2]。同一种蛋白在不同信号肽的作用下分泌效率也会不同^[3-5]; 适当改造信号肽的结构以及酶切位点均可显著提高外源蛋白的分泌效率^[6-10], 信号肽因其特有的功能在外源蛋白的表达上应用广泛^[11]。

毕赤酵母细胞对信号肽序列的识别具有一定的灵活性, 即使是常见的信号肽在引导重组蛋白的分泌过

程中亦可能表现不理想,因此在信号肽筛选时需要将宿主内源信号肽同时考虑,方能获得最优的适合特定外源蛋白分泌的信号肽。Liang 等^[12]等通过巴斯德毕赤酵母蛋白天然分泌的内源信号肽的筛选,得到三种 Scw11p, Dse4p, Exg1p 信号肽可以有效的分泌 EGFP 和南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB),且 Dse4p 分泌 EGFP 效率更高,Exg1p 分泌 CALB 效率更高。

脂肪酶(Lipase EC 3.1.1.3)即三酰基甘油酰基水解酶,广泛应用于油脂加工、食品、日化等工业,是重要的工业酶制剂之一,其催化活性仅仅取决于其蛋白质结构,因而不同来源的脂肪酶具有不同的催化特性和催化活力^[13,14]。米黑根毛霉脂肪酶 RML 的工业应用性很强,但天然的米黑根毛霉脂肪酶产量低下、成分不稳定,存在较大的缺陷,使得其应用成本偏高和应用受到限制^[15]。毕赤酵母在高密度发酵过程中,由于在转接过程中碳源从葡萄糖或者甘油到甲醇的转变,导致细胞器胁迫、发酵后期细胞受到饥饿胁迫、有毒有害物质的积累、pH 的影响,导致蛋白酶的增加,造成目的蛋白产率下降、分离纯化困难、产品纯度低、蛋白的比活降低等影响^[16-18]。

任敏等^[19]比较 *PichiaPink*TM 表达系统和巴斯德毕赤酵母 GS115 在表达外源蛋白方面的差异,认为 *pichiaPink*TM 表达系统产生的转化子较 GS115 菌株产生的转化子易于筛选;蛋白酶 A(由 *pep4* 基因编码)敲除菌生长与野生型相差不大且明显减少外源蛋白降解。本文选择 *pichiaPink*TM 表达系统中蛋白酶 A 缺陷型毕赤酵母为宿主,系统比较毕赤酵母内源信号肽对 EGFP 和 RML 分泌的影响,先用便于检测的 EGFP 做报告蛋白初筛,将筛选到有较好分泌能力的内源信号肽与目的蛋白 RML 形成融合蛋白,期望筛选到比常用的 α -MF 分泌效率高的内源信号肽实现 RML 更好分泌。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10、*P.pastoris* GS115 来自于本实验室保藏, *P.pastoris* GS115 *ade2* Δ *pep4* Δ 从 Invitrogen 公司购买;质粒 pPink-LC 从 Invitrogen 公司购买,质粒 pPICZ α A-EGFP、质粒 pHKA-RML-GCW21、pPICZ α A-EG1-G 由本实验室构建。

1.1.2 培养基和溶液

LB 培养基:0.5%氯化钠,0.5%酵母提取物,1%

胰蛋白胨。固体培养基再添加 2%琼脂粉;YPD 培养基:2%琼脂粉,1%酵母提取物,2%葡萄糖,2%蛋白胨。固体培养基再添加 2%琼脂粉;BMGY 液体培养基:2%蛋白胨,1.34% YNB,1%酵母提取物,1%甘油,100 mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.0);BMMY 液体培养基:2%蛋白胨,1.34% YNB;1%酵母提取物,100 mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)。用蒸馏水定容至所需体积,115 °C 灭菌 20 min 冷却后加入 0.00004%生物素(过滤除菌)和 1%甲醇;PAD 固体培养基:0.8% PAD;2%葡萄糖;2%琼脂粉;1 M PBS (pH 6.0) 缓冲液:66 mL 1 M 磷酸氢二钾溶液和 343 mL 1 M 磷酸二氢钾溶液混合,用磷酸调节 pH 至 6.0,用容量瓶定容到 500 mL,121 °C 灭菌 20 min,室温保存;1 M Tris-HCl 溶液(pH 8.0):称取 60.57 g Tris,溶于 450 mL 蒸馏水,用浓盐酸调节 pH 至 8.0,加蒸馏水定容至 500 mL,121 °C 高温灭菌 20 min,室温保存。

1.1.3 酶与化学试剂

限制性内切酶、Ex Taq DNA、T₄ DNA 连接酶、KOD 高保真 DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司;2 \times PCR Master Mix 购于 Thermo Scientific 公司、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 购于 NEW ENGLAND BioLabs 公司。

蛋白胨、酵母氮源购于美国 BD 公司;酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂粉购于英国 OXOID 公司;溴化乙锭(EB)购于北京鼎国生物有限公司;氯化钠、葡萄糖购于天津市大茂化学试剂厂;三丁酸甘油酯购于美国 Sigma 公司;聚乙烯醇(PVA)购于广州天马精细化工厂进口分装。

1.2 仪器与设备

Multiskan asent 酶标仪购于美国 Thermo 公司;Olympus BX51 荧光显微镜购于日本 Olympus 公司;UV-2350 型分光光度计购于美国 UNICON 公司;Nano Drop 1000 紫外可见分光光度计购于美国 UNICON 公司;Tecan Infinite M200 酶标仪购于瑞士 TUCAN 公司;F0199 型 96 孔板购于美国 Coring 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 信号肽的预测与筛选

参照 Huang^[20]等人总结的毕赤酵母内源信号肽序列,利用信号肽预测软件 SignalP 4.1 Sever (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 计算氨基酸序列的 D 值来预测其是否为信号肽,依据 Liang 等和 Huang 等人的研究所得,SignalP 4.1 信号肽预测软件预测的 D 值超过 0.7 的氨基酸序列很有可能为信号肽。

将 Huang 等人总结的毕赤酵母内源信号肽氨基酸序列与报告蛋白 EGFP 和 RML 形成融合蛋白预测氨基酸序列的 D 值, 筛选得到 D 值超过 0.7 的融合蛋白, 并通过实验验证这些信号肽的分泌能力, 筛选得到最适合 RML 分泌的内源信号肽, 并以常用的 α -MF 信号

肽作为对照。

1.3.2 PCR 引物的设计与合成

本实验所用引物由上海捷瑞生物科技有限公司完成, 如表 1 所示。下划线为酶切位点。

表1 本实验室所用引物

Table 1 Primer list used in the current study

引物名称	引物序列 (从5'→3')	酶切位点
pPink-LC-F	CCTTTTCCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGC	
pPink-LC-R	TTCATGGCCATGAATTCGTTTCGAATAATTAGTTGTTTTTG	<i>EcoR I</i>
α -MF-F	<u>GAATTC</u> ATGGCCATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAG	<i>EcoR I</i>
α -MF-R ₁	CGTCATCCTTGTAATCCCATGGAGCTTCAGCCTCTCTTTT	<i>Nco I</i>
α -MF-R ₂	AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAGATACCCC	
RML-F	CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCCATGGGATTACAAGGATGACGACGATAAAGGTICC	<i>Nco I</i>
RML-R	GATATCGACAAAGGAAAAGGGGCAGGCCCTTTAAGTACACAAACCAGTGTT	<i>Stu I</i>
EGFP-F	AAAAGAGAGGCTGAAGCTCCATGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	<i>Nco I</i>
EGFP-R	TGATATCGACAAAGGAAAAGGGGCAGGCCCTTTGTACAGCTCGTCC	<i>Stu I</i>
FLO10-F	CGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGTTTGAGAAGAGTAA	<i>EcoR I</i>
FLO10-R	TCCCATGGTCCATGTACACCAAGGACACAAAATAGCTGC	<i>Nco I</i>
CPR5-F	CGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGAAATGTTGAACTTTC	<i>EcoR I</i>
CPR5-R	TCCCATGGTGCAAACACAGAACCCTGATAATAGT	<i>Nco I</i>
PRY2-F	CGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGAAGCTCTCCACCAA	<i>EcoR I</i>
PRY2-R	TAATCCCATGGACGCTTGTGCAAGTGGTTTGCTGCCTCTT	<i>Nco I</i>
DSE4-F	ACGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGTCATTCTCTT	<i>EcoR I</i>
DSE4-R	TTGTAATCCCATGGTCCACTGACTATATTGGTCAACAGAAC	<i>Nco I</i>
NUP145-F	CGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGAGCACCCCTGACATTGC	<i>EcoR I</i>
NUP145-R	TCCCATGGAGCAAGAGCTGAATTTTGAAGCG	<i>Nco I</i>
MSB2-F	GGAAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGATTAATTTAAACTCC	<i>EcoR I</i>
MSB2-R	TCCCATGGTCTTTTAGCAAGGTCGTCTTTTGC	<i>Nco I</i>
SSP120-F	CGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGTTGCTCGCTGTTTCATATCTG	<i>EcoR I</i>
SSP120-R	GTAATCCCATGGTCCAAGGACCAAAGG	<i>Nco I</i>
FRE2-F	AAACGGAAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGAGAAACCACC	<i>EcoR I</i>
FRE2-R	TAATCCCATGGGGCCTGAGCTGCTACTGTGAGAAGC	<i>Nco I</i>
FLO9-F	CGGAATTC <u>AATTCGAAAC</u> GATGAAATTTCTGTGCCAC	<i>EcoR I</i>
FLO9-R	TCCCATGGATCTCCTTGTGTTGCAATAATAAAGAACAGC	<i>Nco I</i>
RT-PCR-RML-F	GATTACAAGGATGACGACGATA	
RT-PCR-RML-R	GGGTAAGAAGTAGCGTTCAAAG	
RT-PCR-GAPDH-F	GCTGAAATGTGCCGATGA	
RT-PCR-GAPDH-R	CACAGTTTTCCAGTAGTCCGA	
GAPDH-F	CGGAATTC <u>TGTGAGG</u> CTGAAATGTGCCGATG	<i>EcoR I</i>
GAPDH-R	TTCCATGGCGCGGATCCCATGCCAACTCAAT	<i>Nco I</i>

1.3.3 重组质粒的构建

本文所构建的重组质粒和菌株对应表 2。

1.3.3.1 含 EGFP 基因质粒的构建

以商业化质粒 pPink-LC 为模板, 分别以

pPink-LC-F 和 pPink-LC-R 为上下游引物 PCR 扩增出 pPink-LC 基因质粒片段, 反应体系为 KOD neno 体系, 反应条件为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s; 55 °C 30 s; 68 °C 4 min; 循环 30 次, 68 °C 10 min。PCR 产物

按照 PCR 产物回收试剂盒说明书的要求进行纯化回收。以 pPICZ α A-EGFP 质粒为模板, 分别以 EGFP-F 和 EGFP-R 为上下游引物 PCR 扩增出 EGFP 基因片段, 反应体系为 KOD 体系, 反应条件与 KOD neno 体系相同; 分别以 α -MF-F 和 α -MF-R1 为上下游引物 PCR 扩增出 α -MF1 基因片段, 构建同源重组质粒 pPink-LC- α -MF1-EGFP。连接体系如下: 将所得的纯化的载体质粒和目的基因按照 pmols 比为 pPink-LC:EGFP: α -MF1 secretion signal=1:2:2, (pmols 的计算方法: pmols=(weight in ng) \times 1000/(base pairs \times 650 daltons)) 将三个片段进行混合, 总体积为 2.5 μ L, 加 2.5 μ L NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 于 50 $^{\circ}$ C PCR 仪反应 1 h, 转化至大肠杆

菌。并涂布在含有 Amp+(50 mg/mL)抗性 LB 平板, 24 h 后筛选阳性转化子并用 EcoR I 和 Stu I 对重组质粒进行双酶切鉴定; 鉴定成功后委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

以毕赤酵母 GS115 基因组为模板, 分别以表 1 各毕赤酵母内源信号肽上下游引物进行 PCR, 扩增出各信号肽片段分别为: FLO10、CPR5、PRY2、DSE4、NUP145、MSB2、SSP120、FRE2 和 FLO9。将测序成功的重组质粒以及各内源信号肽用相同的限制性内切酶 EcoR I 和 Nco I 进行双酶切, 更换 α -MF, 用 T4DNA 连接酶连接, 转化得到重组质粒 F10-EGFP、C-EGFP、P-EGFP、D-EGFP、N-EGFP、M-EGFP、S-EGFP、F-EGFP、F9-EGFP。

表2 本文构建的重组质粒和菌株

Table 2 Construction of recombinant plasmids and strains

类别	信号肽	重组质粒	简写	对应菌株
含EGFP基因的重组质粒和菌株	α -MF	pPink-LC- α -MF-EGFP	α -EGFP	GS115/ α -EGFP
	FLO10	pPink-LC-FLO10-EGFP	F10-EGFP	GS115/F10-EGFP
	CPR5	pPink-LC-CPR5-EGFP	C-EGFP	GS115/C-EGFP
	PRY2	pPink-LC-PRY2-EGFP	P-EGFP	GS115/P-EGFP
	DSE4	pPink-LC-DSE4-EGFP	D-EGFP	GS115/D-EGFP
	NUP145	pPink-LC-NUP145-EGFP	N-EGFP	GS115/N-EGFP
	MSB2	pPink-LC-MSB2-EGFP	M-EGFP	GS115/M-EGFP
	SSP120	pPink-LC-SSP120-EGFP	S-EGFP	GS115/S-EGFP
	FRE2	pPink-LC-FRE2-EGFP	F-EGFP	GS115/F-EGFP
	FLO9	pPink-LC-FLO9-EGFP	F9-EGFP	GS115/F9-EGFP
含RML基因的重组质粒和菌株	α -MF	pPink-LC- α -MF-RML	α -RML	GS115/ α -RML
	FLO10	pPink-LC-FLO10-RML	F10-RML	GS115/F10-RML
	PRY2	pPink-LC-PRY2-RML	P-RML	GS115/P-RML
	DSE4	pPink-LC-DSE4-RML	D-RML	GS115/D-RML
	FRE2	pPink-LC-FRE2-RML	F-RML	GS115/F-RML
阴性对照菌				GS115/ Δ pep4

1.3.3.2 含 RML 基因质粒的构建

通过 EGFP 初筛以及 RML 复筛得到四种内源信号肽能有效 RML, 用同源重组方法构建 pPink-LC- α -MF2-RML 质粒, 用相同的 EcoR I 和 Nco I 进行双酶切, 更换 α -MF, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化得到重组质粒 F10-RML、P-RML、D-RML、F-RML。

1.3.3.3 标准质粒的构建

本研究采用管家基因 GAPDH 基因中的一段 250 bp 的 GAPDH 片段作为内参基因, 通过实时荧光定量 PCR 的方法进行分析, 鉴定转化子拷贝数。以 pPICZ α A/EG1-G 为模板, 分别用 GAPDH-F 和 GAPDH-R 为上下游引物, 扩增 GAPDH 片段, 用 EcoR I 和 Nco I 进行双酶切, 质粒 pPink-LC- α -MF-RML

用相同的限制性内切酶进行双酶切, 将回收的酶切片段用 T₄ DNA 连接酶连接, 构建标准质粒 pPink-LC-GAPDH-RML。

1.3.4 重组蛋白酶缺陷型毕赤酵母构建和培养条件

将所有测序成功的重组质粒用 Spe I 线性化后电转蛋白酶 A 缺陷型毕赤酵母, 涂布在 PAD 筛选平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 4~5 d 后, 挑选 3~8 个白色的阳性转化子于 10 mL BMGY 培养基在 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 的摇床培养 24 h 后, 控制起始 OD₆₀₀=1, 转接到 25 mL BMMY 培养基 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 的摇床培养 72 h 后, 分析目的蛋白表达。在此期间每隔 24 h 添加 1% 甲醇诱导。

1.3.5 重组 EGFP 荧光测定

采用激发波长和反射波长分别为 488 nm 和 520 nm 的 EGFP 标准设置测定重组蛋白酶缺陷型毕赤酵母的上清和菌体的荧光强度。将 20 μ L 的发酵上清与 180 μ L Tris-HCl 8.0 缓冲液混合均匀加入到 96 孔板在酶标仪上测定荧光。将 20 μ L 发酵上清, 10000 r/min 于室温下离心 2 min 收集菌体, 并用 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤三次, 用 200 μ L 缓冲液重悬并于酶标仪上测定荧光强度。上清和菌体的相对荧光强度通过如下公式计算获得:

$$\text{相对荧光强度}_{\text{上清/胞内}} = \frac{\text{荧光强度}_{\text{上清/胞内}}}{\text{OD}_{600}} \quad (1)$$

1.3.6 重组 RML 脂肪酶活力测定

以对硝基苯基辛酸酯为 RML 的最适底物, 利用 pNPC 法测定发酵上清液中脂肪酶的活力^[12]。测定溶液由 50 μ L pNPC (25 mM, 用 Tris/HCl pH 7.5 缓冲液

溶解, 添加 0.5% 的 Triton-X100) 和 940 μ L Tris/ HCl 缓冲液 (50 mM, pH 8.0) 组成。通过向 990 μ L 测定溶液中加入 10 μ L 上清液开始反应, 后在 45 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 测定 OD₄₀₅ 值。一个酶活力单位 (U) 定义为每分钟水解底物对硝基苯酚辛酸酯生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量^[21]。

1.3.7 酵母基因组提取以及拷贝数测定

用酵母基因组提取试剂盒提取含不同信号肽的毕赤酵母基因组, 并用信号肽上游引物和目的基因下游引物验证载体基因是否整合到毕赤酵母基因组。目的基因拷贝数采用标准曲线方法进行分析。以表 1 的引物 RT-PCR-RML-F、RT-PCR-RML-R、RT-PCR-EGFP-F、RT-PCR-EGFP-R 进行 RT-PCR, 得到 Ct 值和模板浓度的关系, 绘制双标曲线, 依据计算公式得到目的基因 EGFP 和 RML 的拷贝数。

$$\text{目的基因拷贝数} = \frac{\text{基因组中测定目的基因}}{\text{(标准质粒中测定目的基因)}} \div \frac{\text{(基因组中测定 GAPDH)}}{\text{(标准质粒测定 GAPDH)}} \quad (2)$$

表3 利用SignalP 4.1预测内源信号肽和RML/EGFP融合蛋白的D值

Table 3 Prediction of D values of endogenous signal peptides and RML/EGFP fusion proteins using SignalP 4.1

SP No.	Predict SP	Prediction results			
		D-score-EGFP	Cleavage site	D-score-RML	Cleavage site
FLO10	MFEKSKFVVVFLLLLQLFCVLG ↓ VHG (25)	D=0.853	AA22-23	D=0.854	AA22-23
CPR5	MKLLNFLLSFVTLFGLLSGSVFA ↓ (23)	D=0.874	AA23-24	D=0.890	AA23-24
PRY2	MKLSTNLILAIAAASAVVSA ↓ APVAPA EEAANHLHKR (36)	D=0.816	AA20-21	D=0.808	AA20-21
DSE4	MSFSSNVPQLFLLLVLNTIVSG ↓ (23)	D=0.816	AA23-24	D=0.837	AA23-24
NUP145	MSTLTLLAVLLSLQNSALA ↓ (19)	D=0.881	AA19-20	D=0.871	AA19-20
MSB2	MINLNSFLILTVTLLSPA LA ↓ LPKNVLEE QQAKDDLAKR (38)	D=0.867	AA20-21	D=0.863	AA20-21
SSP120	MWSLFISGLLIFYPLVLG ↓ (18)	D=0.900	AA18-19	D=0.880	AA18-19
FRE2	MRNHLNDLVVLFLLLTVAAQA ↓ (21)	D=0.857	AA19-20	D=0.851	AA21-22
FLO9	MKFPVPLLFLQLFFIATQG ↓ D (22)	D=0.815	AA21-22	D=0.842	AA21-22
α -MF	MRFPSIFTAVLFAASSALA ↓ APVNTTTE DETAQIPAEAVIGYSLEGLDFDVAVLPFSNSTN NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA (89)	D=0.884	AA19-20	D=0.884	AA19-20

注: ↓代表signalP 4.1在线软件预测的信号肽切割位置。

1.3.8 数据统计与分析

以上实验均设置三个平行组, 各组数据均以平均值 \pm 标准偏差表示, 实验数据采用 Excel 2010、SPSS 22.0 等软件处理, Duncan's multiple range test 分析差异显著性 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 信号肽预测结果

将筛选到具有一定分泌潜力的毕赤酵母内源信号肽与报告蛋白 EGFP、RML 形成融合蛋白, 用 SignalP4.1 信号肽预测软件预测 D 值, 结果如表 3 所示。结果表明除了 FRE2 以外, 其它信号肽切割位点均未发生变化, 且 D 值都高于 0.7, 说明上述表达载体整合到酵母基因组上的重组酵母能有效将报告蛋白分泌至胞外, 但结果还需进一步验证。

2.2 重组质粒的构建以及重组毕赤酵母鉴定

通过 PCR 扩增得到 EGFP、RML、 α -MF、pPink-LC 片段, 如图 1a~d, 扩增的信号肽片段, 如图 1e, 将 pPink-LC、EGFP/RML、 α -MF 三个片段进行同源重组, 得到 α -EGFP、 α -RML 质粒, 并将其它内源信号肽经过 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切、*T*₄ DNA 连接酶连接的方法替换 α -MF, 用 *Spe* I 线性化电转至蛋白酶 A 缺陷型毕赤酵母, 构建过程如图 2。

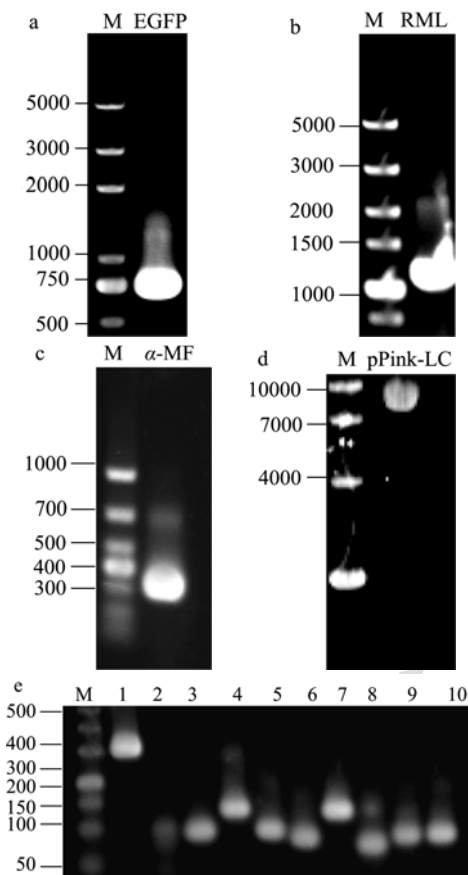


图1 目的基因PCR扩增

Fig.1 PCR amplification of target genes

注: 图a、b、c、d分别为EGFP、RML、 α -MF和pPink-LC扩增片段; 图e为信号肽序列的扩增; 图中1~10分别为 α -MF、FLO10、CPR5、PRY2、DSE4、NUP145、MSB2、SSP120、FRE2、FLO9。

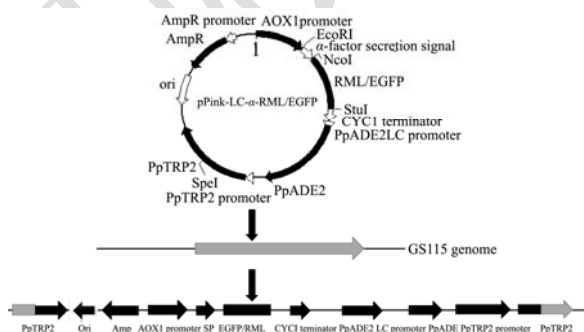


图2 载体结构及酵母基因组的整合

Fig.2 The structure of expression vectors and their integration into the *P. pastoris* genome

2.3 目的基因拷贝数的测定

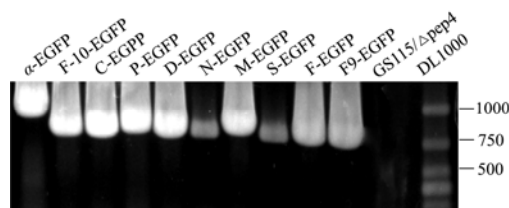


图3 含EGFP表达质粒重组菌PCR验证

Fig.3 PCR identification of recombinant strains harboring

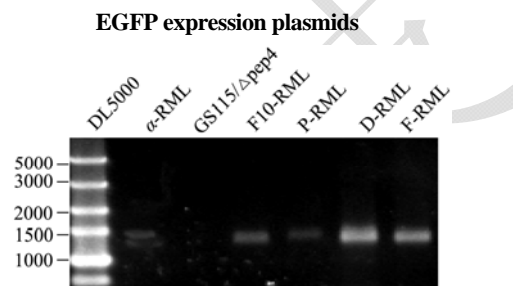


图4 含RML表达质粒重组菌PCR验证

Fig.4 PCR identification of recombinant strains harboring

RML expression plasmids

表4 报告蛋白拷贝数的测定

Table 4 The copy number of reporter genes

Strains	Reporter gene copy number in <i>P. pastoris</i> genome
α -EGFP	1.03±0.03
F10-EGFP	0.95±0.02
C-EGFP	1.05±0.02
P-EGFP	0.97±0.01
D-EGFP	0.98±0.01
N-EGFP	1.09±0.01
M-EGFP	1.02±0.02
S-EGFP	1.08±0.03
F-EGFP	1.12±0.03
F9-EGFP	1.05±0.02
α -RML	1.05±0.03
F10-RML	1.25±0.02
P-RML	0.97±0.01
D-RML	0.98±0.01
F-RML	1.02±0.02

目的基因的拷贝数在一定程度上会影响目的蛋白的生产, 如果忽略拷贝数对表达的影响, 则会使信号肽筛选的结果不准确。因此本文选择 *PichiaPink*TM 系统中低拷贝 pPink-LC 质粒进行实验, 实验结果的可靠性还需要筛选单个目的基因拷贝数的转化子进行表达, 需要提取毕赤酵母基因组 DNA, 进行 RT-PCR 检测目的基因拷贝数。含 EGFP 重组菌基因组 PCR 鉴定

结果如图 3, 含 RML 重组基因组 PCR 鉴定结果如图 4。拷贝数鉴定结果如表 4。

2.4 内源信号肽介导 EGFP 分泌表达

将筛选到的单拷贝 EGFP 菌株在 BMMY 培养基发酵 72 h, 测其上清和菌体的荧光强度。如图 5 所示, 阴性对照菌 GS115/ Δ pep4 的荧光强度很低, 而阳性对照菌 GS115/ α -EGFP 有较强的荧光强度, 重组菌 GS115/F10-EGFP、GS115/P-EGFP、GS115/D-EGFP、GS115/M-EGFP、GS115/S-EGFP、GS115/F-EGFP 能有效分泌 EGFP, 且重组菌 GS115/P-EGFP、GS115/D-EGFP、GS115/M-EGFP、GS115/S-EGFP、GS115/F-EGFP 的荧光强度比 α -EGFP 高。重组菌 GS115/P-EGFP 荧光强度最高, 为阳性对照菌的 2.15 倍。为证明上清蛋白是 EGFP, 用 SDS-PAGE 验证上清蛋白的分子量, 如图 6 所示, 25~35 ku 有明显条带, 说明内源信号肽更能有效引导 EGFP 在蛋白酶 A 缺陷型毕赤酵母分泌表达。

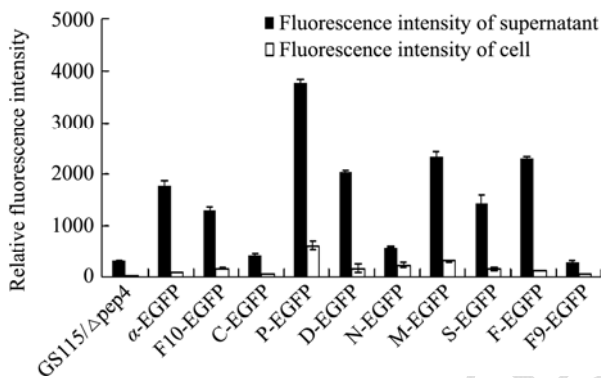


图5 重组酵母菌体和上清荧光强度

Fig.5 The fluorescence intensity of supernatants and cell

本研究发现 α -MF、FLO10、PRY2、DSE4、MSB2、SSP120、FRE2 能有效分泌 EGFP, 且 PRY2、DSE4、MSB2、FRE2 分泌 EGFP 分别是 α -MF 的 2.15 倍、1.15 倍、1.33 倍、1.30 倍; 依据 D 值大小, 筛选得到的信号肽均在其它蛋白中有实验验证, 说明 signalP 4.1 软件可以作为筛选信号肽的依据。

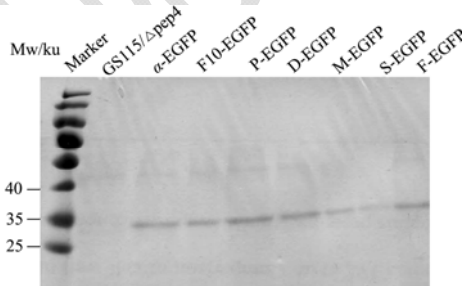


图6 SDS-PAGE检测上清中EGFP

Fig.6 The SDS-PAGE analysis of extracellular EGFP

2.5 内源信号肽介导 RML 分泌表达

将信号肽 α -MF、FLO10、PRY2、DSE4、MSB2、SSP120、FRE2 与 RML 融合表达, 筛选比 α -MF 分泌效率更高的适合 RML 表达的毕赤酵母内源信号肽。在 BMMY 培养基发酵 72 h 后, 收集上清测上清中脂肪酶水解活力, 发现 F10-RML、P-RML、D-RML、F-RML、 α -RML 重组菌在三丁酸甘油酯平板上用甲醇诱导 24 h 后有明显的水解圈, F10-RML 重组菌的水解圈比 α -RML 大, P-RML、D-RML、F-RML 则与 α -RML 相当, 如图 7。

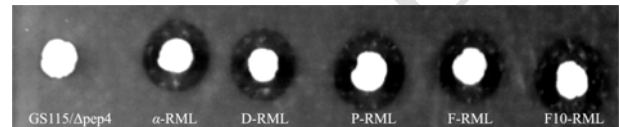


图7 不同重组菌在三丁酸甘油酯平板诱导24 h水解情况

Fig.7 Screening on the tributyrin agar plate of secretory

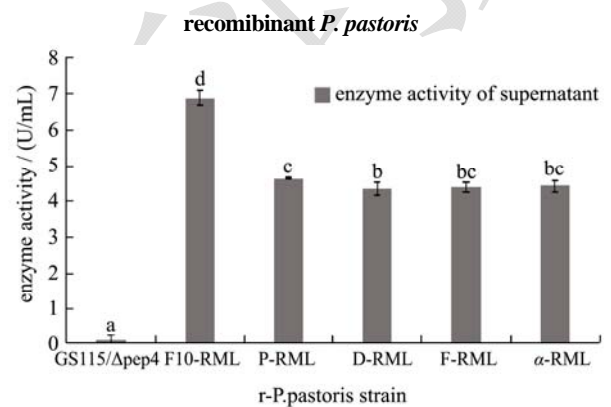


图8 含内源信号肽重组菌RML上清酶活测定

Fig.8 The lipase activity of endogenous signal peptide-RML in the supernatant

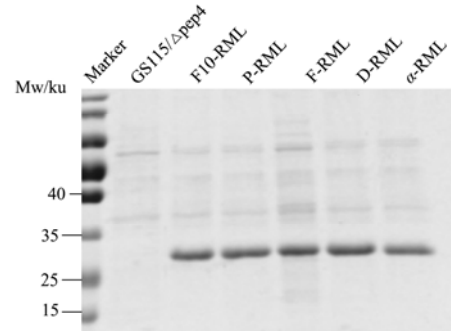


图9 SDS-PAGE分析上清含内源信号肽RML

Fig.9 The SDS-PAGE analysis of endogenous signal peptide-RML

其中 F10-RML 的脂肪酶水解活力是对照菌 α -RML 的 1.50 倍, 其上清脂肪酶水解活力显著高于 α -RML ($p < 0.05$); P-RML、D-RML、F-RML 上清脂肪酶水解活力与 α -RML 相比差异不显著 ($p > 0.05$), 说明与 α -MF 相比, 内源信号肽 FLO10 更能有效分泌脂肪酶 RML, 如图 8。SDS-PAGE 结果进一步表明 RML 已经分泌到发酵上清中, 有明显的蛋白条带位于

25~35 ku 之间,证明内源信号肽可以有效介导 RML 分泌,如图 9。

3 结论

信号肽对异源蛋白在毕赤酵母中的分泌表达有重要作用,因此本文利用 SignalP 4.1 在线预测软件,预测出 9 种 D 值超过 0.7 的毕赤酵母内源信号肽:FLO10、CPR5、PRY2、DSE4、NUP145、MSB2、SSP120、FRE2、FLO9,其中 5 种信号肽辅助分泌功能在以往文献中有报道,如:FLO10 信号肽引导漆酶 POXA1c 的活力分别是自身信号肽引导下的 2 倍^[22];MSB2、FRE2 及 DSE4 三种内源信号肽介导的 EGFP 分泌均高于 α -MF^[23];SSP120 被认为在早期分泌途径中起作用^[24],PRY2 是与植物 PR-1 类病原体相似的未知蛋白,且 PR-1 具有分泌能力^[25]。结合后续实验结果,可以证明,SignalP 4.1 预测的结果有较好的可靠性,可以作为筛选信号肽的依据和方法之一。值得指出的是,筛选得到的信号肽虽然都能够在巴斯德毕赤酵母中有效协助 EGFP 和目的蛋白 RML 的分泌,但是分泌效率有所不同,与常用的酿酒酵母 α -MF 相比,毕赤酵母内源信号肽 PRY2 更能有效地将 EGFP 分泌到培养基中,而内源信号肽 FLO10 更能有效分泌 RML。这提示:除信号肽本身性质外,信号肽与外源蛋白形成的融合蛋白之间的相互作用也会对最终分泌效果有所影响。对于目的脂肪酶 RML 来讲,内源信号肽 FLO10 是引导其分泌能力最强的。FLO10 是与 Flo1p 相似的外源凝集素蛋白,与絮凝有关蛋白强分泌信号肽,另外由于 FLO10 的信号肽长度明显比 α -MF 短,在表达脂肪酶 RML 时,FLO10 内源信号肽可以替代 α -MF,实现 RML 更好的分泌。故用毕赤酵母作为表达系统时,由于内源信号肽存在于毕赤酵母自身的分泌蛋白中,可以被更好地被加工,在表达目的蛋白时可能会表现出更高的分泌效率。本课题研究所筛选到有效介导 EGFP 和 RML 的内源信号肽为其它蛋白在毕赤酵母中的分泌表达奠定了基础。

参考文献

- [1] 闫子祥,杨然,李秀婷.微生物表达系统研究进展[J].中国食品学报,2013,13(10):126-135
YAN Zi-xiang, YANG Ran, LI Xiu-ting. Advances in microbial expression system [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 126-135
- [2] Von H G. The signal peptide [J]. Journal of Membrane Biology, 1990, 115(3): 195-201
- [3] Sagiya Y, Yamagata H, Udaka S. Direct high-level secretion

- into the culture medium of tuna growth hormone in biologically active form by *Bacillus brevis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42(2-3): 358-363
- [4] Klatt S, Zoltán Konthur. Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae* [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 97
- [5] Peng R H, Li X, Fan H Q, et al. Influence of signal peptide sequences on the expression of heterogeneous proteins in *Pichia pastoris* [J]. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2003, 35(2): 154-160
- [6] Xu Jing-ning, Gong Yi. Increased hydrophobicity of signal peptide promotes secretion of penicillin G acylase [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2000, 32(2):163-168
- [7] Lin-Cereghino G P, Stark C M, Kim D, et al. The Effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Gene, 2013, 519(2): 311-317
- [8] Sabreen Chahal, Peter Wei, et al. Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris* [J]. Gene, 2017, 598: 50-62
- [9] Yim D S, Park S O, Lee C K. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin [J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 31
- [10] Helena Maresová, Zdena Marková, Renáta Valesová, et al. Heterologous expression of leader-less pga gene in *Pichia pastoris*: Intracellular production of prokaryotic enzyme [J]. BMC Biotechnology, 2010, 10: 7
- [11] 赵慧,郑文岭,马文丽.信号肽对外源蛋白分泌效率的影响[J].生命的化学,2003,20(5):177-179
ZHAO Hui, ZHENG Wen-ling, MA Wen-li. The effects of signal peptide on efficiency of foreign protein secretion [J]. Journal of Biology, 2003, 20(5): 177-179
- [12] Liang S, Li C, Ye Y, et al. Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(1): 97-105
- [13] Zhang T, Wu Z, Chen H, et al. Progress in strategies for sequence diversity library creation for directed evolution [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(54): 9277-9285
- [14] 李香春.脂肪酶特性及其应用[J].粮食与油脂,2003,3:19-20
LI Xiang-chun. Properties and Application of Lipases [J].

- Journal of Cereals & Oils, 2003, 3: 19-20
- [15] Suwei X, Ying L, Zhenlin H, et al. High level expression of rhizomucor miehei lipase gene in *Pichia pastoris* [J]. Food & Fermentation Industries, 2008, 34(11): 10-14
- [16] Li Z, Xiong F, Lin Q, et al. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2001, 21(3): 438-445
- [17] Zhou X S, Zhang Y X. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(17): 1449-1453
- [18] Knop M, Schiffer H H, Rupp S, et al. Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates mechanisms [J]. Current Opinion in Cell Biology, 1993, 5(6): 990-996
- [19] 任敏,赵洪亮,薛冲,等.重组人血清白蛋白-干扰素 $\alpha 2b$ 融合蛋白在 *PichiaPink* 系统中的表达[J].生物技术通讯,2011,22(6):818-822
REN Min, ZHAO Hong-liang, XUE Chong, et al. Expression of human serum albumin and interferon $\alpha 2b$ fusion protein in the pichiapink system [J]. Letters in Biotechnology, 2011, 22(6): 818-822
- [20] Huang C J, Damasceno L M, Anderson K A, et al. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 90(1): 235-247
- [21] Pan Z, Han S, Lin Y, et al. Expression of Candida Antarctica Lipase B on yeast surface and synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(4): 673-678
- [22] 石艺平,周雪,胡美荣,等.不同信号肽对毕赤酵母表达漆酶的影响[J].微生物学报,2014,54(12):1446-1452
SHI Yi-ping, ZHOU Xue, HU Mei-rong, et al. Effect of signal peptides on the expression of laccase in *Pichia pastoris* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(12): 1446-1452
- [23] 丁璐妹.毕赤酵母内源信号肽的筛选及头孢菌素 C 酰化酶的分泌表达[D].上海:华东理工大学,2015
Ding Lu-mei. Screening of *Pichia pastoris* endogenous signal peptide and secretion of cephalosporin C Acylase [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015
- [24] Margulis N G, Wilson J D, Bentivoglio C M, et al. Analysis of COPII vesicles indicates a role for the Emp47-Ssp120 complex in transport of cell surface glycoproteins [J]. Traffic, 2016, 17(3): 191-210
- [25] 蒋冬花,孔世海,郭泽建.激发子隐地蛋白(cryptogein)基因的克隆及其植物表达载体的构建[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,28(6):649-654
JIANG Dong-hua, KONG Shi-hai, GUO Ze-jiang. Cloning of cryptogein gene and construction of its plant expression vector [J]. Journal of Zhejiang Agricultural University, 2002, 28(6): 649-654

(上接第 173 页)

- [13] 徐文慧,周锦云,张俊.低温等离子体技术处理难降解有机废水研究进展[J].江西化工,2018,3:40-43
XU Wen-hui, ZHOU Jin-yun, ZHANG Jun. Progress in the treatment of refractory organic wastewater by low temperature plasma technology [J]. Jiangxi Chemical Industry, 2018, 3: 40-43
- [14] GB 11914-89 食品安全国家标准 COD 标准测定法[S]
GB 11914-89 National Food Safety Standard-COD Standard Method [S]
- [15] 日本食品工业学会编辑委员会编.食品分析法[M].成都:四川科学技术出版社,1985
Editorial Board of Japan Food Industry Society. Food Analysis Method [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1985
- [16] Yangbing Li, Zhaojun Yin, Bo Wang, et al. Synthesis of orthogonally protected L-glucose, L-mannose and L-galactose from D-glucose [J]. Tetrahedron, 2012, 68(34): 6981-6989
- [17] Fina Amreta Laksmi, Shigeki Arai, Hirohito Tsurumaru, et al. Improved substrate specificity for D-galactose of L-arabinose isomerase for industrial application [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2018, 1866(11): 1084-1091
- [18] Hariyadi Soetedjo, Jukka Rätty. Use of a modified Drude's equation to investigate the optical rotation property of sugars [J]. Optik, 2014, 125(24): 7162-7165
- [19] James N Be Miller. 1-Monosaccharides Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition) [M]. AACC International Press, 2019.
- [20] I. Graça, M C Bacariza, D Chadwick. Glucose isomerisation into fructose over Mg-impregnated Na-zeolites: Influence of zeolite structure [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2018, 255(1): 130-139