

一种通过过表达毕赤酵母翻译相关因子 提高重组蛋白胞内表达的策略

林雯炆, 廖锡豪, 陈南柱, 黄大富, 陈亮, 钟炳旭, 梁书利, 林影
(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 本研究为筛选对毕赤酵母重组蛋白表达有促进作用的翻译相关因子, 扩增了毕赤酵母中包括核糖体蛋白翻译起始因子、翻译延伸因子、氨酰-tRNA 合成酶、核糖体生物合成因子、核糖体分子伴侣五类翻译相关因子(共 28 个)的基因片段, 并将上述基因片段与质粒 pPICZA 进行同源重组, 进一步获得重组载体后分别转化至以增强型绿色荧光蛋白 eGFP 为报告蛋白的毕赤酵母中。之后通过测量计算 120 h 内 28 个过表达翻译相关因子菌株的荧光蛋白表达量, 筛选对毕赤酵母重组蛋白表达有潜在促进作用的因子, 进一步以红色荧光蛋白 mRFP 为报告蛋白进行验证。结果表明: 本研究共筛选到了 6 个对毕赤酵母重组蛋白胞内表达有促进作用的翻译相关因子 eIF4A、eEF1A、eEF3、Ded81、Bcy1、Ssb。其中 eIF4A、eEF1A、eEF3、Ded81、Bcy1、Ssb 的 eGFP 单位菌体表达量分别增加了 18.40%、18.80%、29.50%、28.45%、21.60%, mRFP 单位菌体表达量分别增加了 20.00%、8.00%、19.00%、5.40%、15.40%。Bcy1 使得 eGFP 表达菌株生物量增加 20.00%, mRFP 表达菌株生物量增加 30.90%。为从翻译层面提高毕赤酵母重组蛋白表达提供了思路。

关键词: 毕赤酵母; 翻译相关因子; 重组蛋白; 胞内表达

文章编号: 1673-9078(2021)07-66-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.0494

A Strategy to Increase the Intracellular Overexpression of Recombinant Proteins by Expressing *Pichia pastoris* Translation-related Factors

LIN Wen-yang, LIAO Xi-hao, CHEN Nan-zhu, HUANG Da-fu, CHEN Liang, ZHONG Bing-xu, LIANG Shu-li,
LIN Ying

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study was to screen the translation-related factors that promote the expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, and amplify gene fragments of five types of translation-related factors (a total of 28) in *Pichia pastoris* (including ribosomal proteins, translation initiation factors, elongation factors, aa-tRNA synthetases, ribosome biogenesis factors, and ribosome-associated chaperones). These gene fragments were cloned into the pPICZA vector through homologous recombination. The recombinant vectors were further obtained and transformed into the *Pichia pastoris* GS115 strain with enhanced green fluorescent protein (eGFP) as the reporter protein. Then, the expression levels of 28 strains with overexpressed translation-related factors within 120 h were measured and calculated, to identify the key factors that could potentially promote the expression of the recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Finally, the red fluorescent protein, monomeric red fluorescent protein (mRFP), was used as the reporter protein for verification. The results revealed that 6 translation-related factors (eIF4A, eEF1A, eEF3, Ded81, Bcy1, Ssb) that could improve the intracellular expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, were screened in

引文格式:

林雯炆, 廖锡豪, 陈南柱, 等. 一种通过过表达毕赤酵母翻译相关因子提高重组蛋白胞内表达的策略[J]. 现代食品科技, 2021, 37(7):66-73

LIN Wen-yang, LIAO Xi-hao, CHEN Nan-zhu, et al. A strategy to increase the intracellular overexpression of recombinant proteins by expressing *Pichia pastoris* translation-related factors [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 66-73

收稿日期: 2020-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31470159)

作者简介: 林雯炆(1999-), 女, 本科生, 研究方向: 微生物与酶学

通讯作者: 林影(1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物与酶学

this study. Among them, the eGFP unit cell expression of eIF4A, eEF1A, eEF3, Ded81, Bcy1, Ssb increased by 18.40%, 18.80%, 29.50%, 28.45% and 21.60%, respectively, and the mRFP unit cell expression increased by 20%, 8.00, 19.00%, 5.40% and 15.40%, respectively. Bcy1 increased the biomass of eGFP-expressing strains by 20.00% and the biomass of mRFP-expressing strains by 30.90%. These results provide ideas for improving the expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris* through the translation.

Key words: *Pichia pastoris*; translation-related factors; recombinant protein; intracellular expression

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是重组蛋白表达的优良宿主, 它被美国食品药品监督管理局认定为 GRAS (通常认为安全的) 级微生物^[1], 且具有遗传操作简便、培养成本低、有接近高等真核生物的蛋白质翻译后加工和修饰能力^[2,3]、可进行高密度发酵^[4,5]等优点。此外, 毕赤酵母还具有甲醇诱导型强启动子 P_{AOX1} , 在以廉价碳一化合物甲醇为唯一碳源的情况下, 由 P_{AOX1} 启动的 AOX1 蛋白可达到胞内总蛋白的 30%^[6]。大量研究实例证明, 除了在分泌表达方面的优越性能, 毕赤酵母也被广泛应用于重组蛋白的胞内表达, 并且胞内表达的重组蛋白具有良好的活性和生物安全性, 如 HPV-16 的 L1-L2 蛋白^[7]、大豆血红素 C2^[8,9]、类胡萝卜素^[10,11]、重组人溶菌酶^[12]等。因此, 优化重组蛋白在毕赤酵母的胞内表达具有重要的意义。

目前, 毕赤酵母提高重组蛋白胞内蛋白表达的主要策略有启动子改造, 基因拷贝数增加, 密码子优化和发酵优化^[13]等, 在蛋白质翻译模块研究鲜有报道。然而, 基因的转录水平和蛋白表达水平并不是完全一致的, 从 mRNA 到蛋白质需要进行翻译和翻译后修饰等。翻译作为将 mRNA 遗传信息传递到蛋白质的桥梁, 它不仅决定多肽的合成质量与生成速率, 还影响蛋白质的翻译后易位, 折叠, 修饰及分泌等。最初, 由于蛋白质翻译存在复杂性, 关于重组蛋白过量表达在翻译水平的研究及调控的报道较少。而近年本实验室林小琼等人^[14]通过定量蛋白质组学方法 (iTRAQ-LC-MS/MS) 测定中过表达木聚糖酶基因 *xynA* 毕赤酵母菌株翻译蛋白系统中翻译相关因子的变化, 结果显示过表达重组蛋白时翻译系统的部分翻译相关因子出现上调 (本文中定义翻译相关因子为通过互作作用参与辅助, 调节目的蛋白质翻译, 折叠和加工的反式作用因子)。即表明部分翻译相关因子与重组蛋白过表达之间存在正相关关系。故本文基于 Schutter 等人^[15]发布的毕赤酵母基因组注释, 选取了部分核糖体蛋白, 翻译起始因子, 翻译延伸因子, 氨酰-tRNA 合成酶, 核糖体生物合成因子和核糖体相关分子伴侣 5 类在翻译及翻译后修饰中发挥重大作用的翻译相关因子在毕赤酵母中进行过表达, 以增强型绿色荧光

蛋白 eGFP 作为报告蛋白, 初筛选出对翻译有促进作用的因子, 并用红色荧光蛋白 mRFP 验证了其促进重组蛋白表达的功能。本研究首次提出了在毕赤酵母中过表达翻译相关因子从而提高外源表达的策略, 为从翻译层面提高重组蛋白及促进外源途径基因表达提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

宿主菌 *Pichia pastoris* GS115/eGFP、*Pichia pastoris* GS115/mRFP, 质粒 pPICZA 和 *Escherichia coli* TOP10 由本实验室保存; 限制性核酸内切酶, 质粒小提等试剂盒, Seamless Master Mix 酶购于广州美基生物科技有限公司; 引物由广州擎科生物技术有限公司合成。

主要实验仪器: DRP-90_52 型电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; NBS 恒温摇床, 美国 NBS 公司; NanoDrop 1000 紫外可见分光光度计, 德国 Eppendorf 公司, 凝胶成像仪 Gel DocXR; PCR 仪、电转仪、水平电泳槽 Mini-Sub Cell GT Cell, 美国 Bio-rad 公司。

1.2 表达载体的构建

根据网站 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/orca/overview/Picpa>) 上毕赤酵母基因组注释得到的基因序列, 以毕赤酵母 GS115 为模板, 用上, 下游引物 1-56, 分别扩增得到基因片段 RPS25、ASC1、Tif5、eIF4A、eIF4G、Tif11、Sui1、Tef4、Nip1、eEF1A、eEF2、eEF3、Ded81、Krs1、Ses1、Gln4、Ils1、Dps1、Sch9、Sfp1、Bcy1、Tpk1、Tpk2、Ssz1、Zuo1、Ssb、Egd1、Egd2。将这些片段回收并分别与 pPICZA 质粒通过 Seamless Master Mix 酶进行同源重组, 使得目的基因整合至 pPICZA 质粒中的 AOX1 启动子下游, (按照美基公司该产品的使用说明书) 构建重组质粒, 用 *E. coli* TOP10 扩增质粒并送至广州擎科生物技术有限公司测序验证无基因突变后用于毕赤酵母的转化。

表1 引物汇总表

Table 1 Primer used in this study

编号	名称	引物序列 5'-3'
1	Rps25-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGCCACCAAAGATTCAACAATGCCACCAAAGATTCAACA
2	Rps25-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTACTTATCGTCATCATCCTTGTAATCCTCGGAAGCAGTAGCTCTAG
3	ASC1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGCTGACAACAGAGAAGTTCTTG
4	ASC1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTACGAACTTGAAGTCATAACTTGC
5	eIF4A-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCTGAAGGTATTATTGAAATCGACAC
6	eIF4A-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTACTTATCGTCATCATCCTTGTAATCAGACTCATTAACTTCCTCAGTCTCA ACA
7	eIF4G-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCCAATAAGAACGTGGATACAGC
8	eIF4G-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTAAACTTCCTGTTCTCTTCTTGCTC
9	Tif5-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCGTTCTGCAATATTGTC
10	Tif5-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTCAATCACTGTCCTCTCTTC
11	Tif1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGGTAAATCAAACGGCAAAG
12	Tif1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTAAATATCGTCAATATCAAGCTCTT
13	Sui1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGCATCAATAGAGAACCTAAAGTCT
14	Sui1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTCAGAATCCATGAATTTTGATGTTCTT
15	Nip1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCCCGTTTCTTTGCGTCA
16	Nip1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTATTTACTATAGATCTTCTTTGGTCTTTGACATT
17	Tef4-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCACAAGGAACAATTTACTTAG
18	Tef4-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAATTGCCCTTAGGAGGAGCA
19	eEF1A-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGGTAAAGAAAAGTTGCACG
20	eEF1A-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTATTTCTTAGCGGCCCTTTTGAGC
21	eEF2-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGTAACTTCACTGTCTG
22	eEF2-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTACTTATCGTCATCATCCTTGTAATCCAATTTGTCGTAGTACTCTTC
23	eEF3-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGC ATGTCTGCTGCTAGTGAATC
24	eEF3-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAAAACCTCCTCATCGGA
25	DED81-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCTGCCACCTATTACATCAAT
26	DED81-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAAGGCTTACATCTCCCAGTGAAG
27	KRS1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGCTGACCAAACCTGAAAAAATTA
28	KRS1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAGTTTTGTTCTTTTCTTCACC
29	SES1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGCTAGATATTGTCCAATTCATTGAAGAGA
30	SES1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTATTTCTTCTTTTGAGAGGTTGAGT
31	GLN4-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCCATGTCTACCACTGATGAAGAATTAGC
32	GLN4-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTTAATCTTTGGAAGAATCTTCCTTCAAT
33	ILS1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCAGAACAGGACACTAGA
34	ILS1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAGATATTAAGCAAACGGATC
35	DPS1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGCTGAAGAACTACTCAAAAAATTG
36	DPS1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTATGGGCGGAGACGTTTIG
37	Sch9-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCAGACTTTGCAAAGAATCTATTCCG
38	Sch9-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTCACAAATCAAATTGTCCATTCACAAAAT
39	Sfp1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGATAATCCGTTTGGAC
40	Sfp1-A	TTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTAATGCGTCGAATGTCC

转下页

接上页

41	Bcy1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGACAGCATAACACGGACG
42	Bcy1-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAGATCTTGGTGGGATCTTG
43	Tpk1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGGACTATAATCAGGTACACTTGAAC
44	Tpk1-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAAAAGTCCGGAAATAGATATCCAA
45	Tpk2-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGCCCTTTTTGAATAGACTACATATTCC
46	Tpk2-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTG TAAAAGTCTTGAAAATGCTGTGCG
47	Ssz1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCCTTTATCGGTCTACA
48	Ssz1-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTAAGTCAATGAACATCAACTC
49	Zuo1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGTCCTTGACTTTGCCTGCA
50	Zuo1-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTATTTTGCAAAGAACTTCAAGTCG
51	Ssb-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGC ATGGCTGACGGTGTTTTCC
52	Ssb-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTAACGGGTTGCCATAGCC
53	Egd1-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGC ATGCCAATTGATCAACAGAAATTAGAG
54	Egd1-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGCTAATCGATGTTCTTGTCAAAGGTCTC
55	Egd2-S	AGGAATTCACGTGGCCCAGCATGCTGTGTCGAAGAACCAAAGATTGA
56	Egd2-A	TTTTGTTCGGGCCCAAGCTGTTAAGAAGATAAAGACATAATAGCGTTGACC

1.3 翻译相关因子过表达菌株的构建

构建得到的重组质粒经 *mss1* 酶线性化 (Bcy1 用 *Sac1* 酶), 并用 PCR 产物纯化回收试剂盒纯化后, 取 10 μL 纯化回收产物分别加入 100 μL 感受态细胞毕赤酵母 GS115/eGFP 和 GS115/mRFP 中, 轻轻吹打混匀, 转移至冰浴的电击杯中, 冰浴 5 min。使用电穿孔仪进行 *fungi* 档电击。电击结束后立即加入 1 mL 冰浴的 1 mol/L 的山梨醇, 混匀后转移至 1.5 mL 离心管中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温培养箱中孵育 1 h。取 200 μL 孵育后的悬浮液用无菌三角拭涂布于 YPD 抗性平板中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 3~4 d。挑取重组菌株菌落为模板, 以每个翻译相关因子对应的上游引物和通用引物 3'AOX1 对其进行菌落 PCR 验证以筛选出阳性转化子。

1.4 翻译相关因子过表达菌株的摇瓶发酵

重组蛋白在毕赤酵母中的表达分为两个阶段, 即菌体的生长阶段和重组蛋白的表达阶段。菌体生长阶段以甘油为碳源, 将已经活化的菌种直接接种到 5 mL 的初始 pH 6.0 的 BMMY 摇瓶生长培养基 (0.1 g 蛋白胨, 0.05 g 酵母提取物, 0.067 g YNB, 10% (*m/V*) 的甘油), 在 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 的条件下培养 22~24 h, 使菌体进行大量的生长繁殖。

在菌体大量繁殖之后, 可将其转接到以甲醇为碳源的 BMMY 液体培养基中进行诱导培养, 使其进入重组蛋白表达阶段。为控制起始 OD 相同, 可每瓶取 2 mL 菌液, 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。用 1 mL BMMY 摇瓶生长培养基重悬菌体。控制 BMMY 摇瓶

培养基中菌体的起始 OD=1.0, 将重悬的菌液转接到 20 mL BMMY 摇瓶生长培养基 (0.4 g 蛋白胨, 0.2 g 酵母提取物, 0.268 g YNB, 1% (*V/V*) 的甲醇)。在 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 条件下恒温培养 120 h 进行重组蛋白的诱导表达, 每隔 24 h \pm 2 h 取样测定 OD 值和荧光强度, 菌液取样量为 200 μL 。并向培养基中补加 200 μL 的 100% 甲醇 (AR)。

1.5 菌体生物量与荧光蛋白表达总量的测定

每次取样品菌液 40 μL 稀释 50 倍用紫外分光光度计测量 OD₆₀₀ 代表菌体生物量, 剩余菌液 13000 r/min 离心 1 min 后的上清液 10 μL , 用 Refolding Buffer (0.05 mol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 0.1 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Zmidazole) 稀释 20 倍后加到 96 孔板中, 每个样品做 3 组平行实验, 用酶标仪 (PerkinElmer) 检测荧光强度代表荧光蛋白表达总量 (eGFP, 激发波长: 488 nm, 发射波长: 520 nm; mRFP, 激发波长: 584 nm, 发射波长: 610 nm), 则荧光蛋白单位菌体表达量 (每单位菌体生物量荧光蛋白表达量) 计算公式如下:

$$\text{荧光蛋白单位菌体表达} = \frac{\text{荧光蛋白表达总量}}{\text{单位菌体生物量}}$$

1.6 数据处理

每个重组酵母菌株重复发酵三次, 每次反应合 RA 设置三个平行, 数据值为平行样品的平均值, 用误差线表示标准偏差。采用 Microsoft Office 2016 分析处理数据, 采用 Graph PadPrism 7 绘制图。

表2 *Pichia pastoris* GS115 翻译相关因子的筛选Table 2 Selected translation-related factors of *Pichia pastoris* GS115

类别	蛋白名称	调控	功能注释 (酿酒酵母)
核糖体蛋白	Rps25	重要的	与 IRES 介导的翻译起始相关的 40S 亚基蛋白组分
	Asc1	上升	高效翻译短 mRNA 所需的 40S 亚基的核心成分
翻译起始因子	eIF4A	上升	翻译起始因子 eIF4A, 与 eIF4G 共同作用, 起始翻译
	eIF4G	重要的	翻译起始因子 eIF4G, mRNA 帽结合蛋白复合物 (eIF4F) 的组成成分
	Tif5	上升	翻译起始因子 eIF5
	Tif11	上升	翻译起始因子 eIF1A, 40S 亚基复合物形成的必需蛋白质
	Sui1	上升	翻译起始因子 eIF1, 参与组成起始密码子识别的复合物
	Nip1	上升	翻译起始因子 eIF3 的亚基, 参与翻译起始复合物前体的组装
翻译延伸因子	Tef4	上升	翻译延伸因子 eEF1B 的 γ 亚基
	eEF1A	上升	翻译延伸因子 EF-1 的 α 亚基, 在氨酰-tRNA 与核糖体结合中起作用
	eEF2	重要的	假设蛋白, 与翻译延伸因子 EFG/EF2 作用相同
	eEF3	重要的	翻译延伸因子 eEF3, 在刺激 EF-1 α 亚基的释放使氨酰-tRNA 与核糖体结合中起作用
氨酰-tRNA 合成酶	Ded81	上升	蛋白质合成必需的胞质天冬酰胺酰-tRNA 合成酶
	Krs1	上升	赖氨酰-tRNA 合成酶, 也被认为是氨基酸生物合成的负调控因子
	Ses1	上升	胞质色氨酰-tRNA 合成酶, II 类氨酰-tRNA 合成酶
	Gln4	上升	谷氨酰胺 tRNA 合成酶, 单体 I 类 tRNA 合成酶
	Ils1	上升	胞质异亮氨酸-tRNA 合成酶, G1 期特异性抑制剂雷诺霉素 A 的靶点
Dps1	上升	胞质天冬氨酰-tRNA 合成酶, II 类氨酰-tRNA 合成酶	
核糖体生物合成因子	Sch9	重要的	参与渗透胁迫应答基因的转录激活的蛋白激酶
	Sfp1	重要的	调控多种核糖体生物合成基因对营养物质和胁迫的反应的转录因子
	Bcy1	上升	环腺苷酸依赖性蛋白激酶的调节亚基
	Tpk1	重要的	环腺苷酸依赖性蛋白激酶催化亚基; 在营养足够条件下促进营养生长
	Tpk2	重要的	环腺苷酸依赖性蛋白激酶催化亚基; 在营养足够条件下促进营养生长
核糖体分子伴侣	Ssz1	重要的	Hsp70 蛋白, 与 Zuo 1p 相互作用形成结合核糖体的核糖体相关复合物
	Zuo1	重要的	胞质核糖体相关分子伴侣, 与 Ssz1p 和 Ssb 蛋白共同作用于新生肽链折叠加工
	Ssb	重要的	胞质 ATP 酶, 核糖体相关分子伴侣, 与 J-蛋白伴侣 Zuo1p 共同作用
	Egd1	上升	新生多肽相关复合物 (NAC) 的 β 亚基, 参与蛋白靶定
	Egd2	上升	新生多肽相关复合物 (NAC) 的 α 亚基, 参与蛋白质分类和转运

2 结果与讨论

2.1 翻译相关因子的选取

本实验室研究表明, 在表达重组蛋白时, 毕赤酵母翻译系统相关基因出现上调的现象,^[14]由此我们筛选了在重组蛋白表达时出现上调的翻译相关因子 (表 2), 尝试通过过表达这些翻译相关因子, 观察其对重组蛋白的翻译能力主动地上调的变化, 力图促进重组蛋白表达。此外, 我们还筛选了对翻译至关重要的参与 IRES 介导翻译起始的 Rps25, 组成 mRNA 帽子结合复合物的 eIF4G, 参与翻译延伸的 eEF2 和 eEF3 筛选潜在的重组蛋白翻译促进因子, 并分析翻译相关因子对重组毕赤酵母重组蛋白表达及细胞生长的影响。

2.2 翻译促进因子的初筛选

为研究各个翻译相关因子过表达对重组蛋白表达的影响, 本文以绿色荧光蛋白为报告蛋白, 构建毕赤酵母翻译相关因子过表达菌株, 在 BMNY 培养基中进行摇瓶发酵, 测定且计算其菌体生物量、eGFP 表达总量和 eGFP 单位菌体表达量, 并与未存在翻译相关因子重组表达的 eGFP 毕赤酵母表达菌株比较。通过发酵测定 28 个翻译相关因子对胞内 eGFP 表达影响的分析, 发现过表达翻译核糖体相关分子伴侣 Ssb 可提高 eGFP 表达量 21.60%, 过表达翻译延伸因子 eEF1A、eEF3、翻译起始因子 eIF4A 和氨酰-tRNA 合成酶因子 Ded81 也有明显促进作用。核糖体生物合成因子 Bcy1 可提高细胞生物量, 从而提高单位体积 eGFP 表达量, 如图 1。

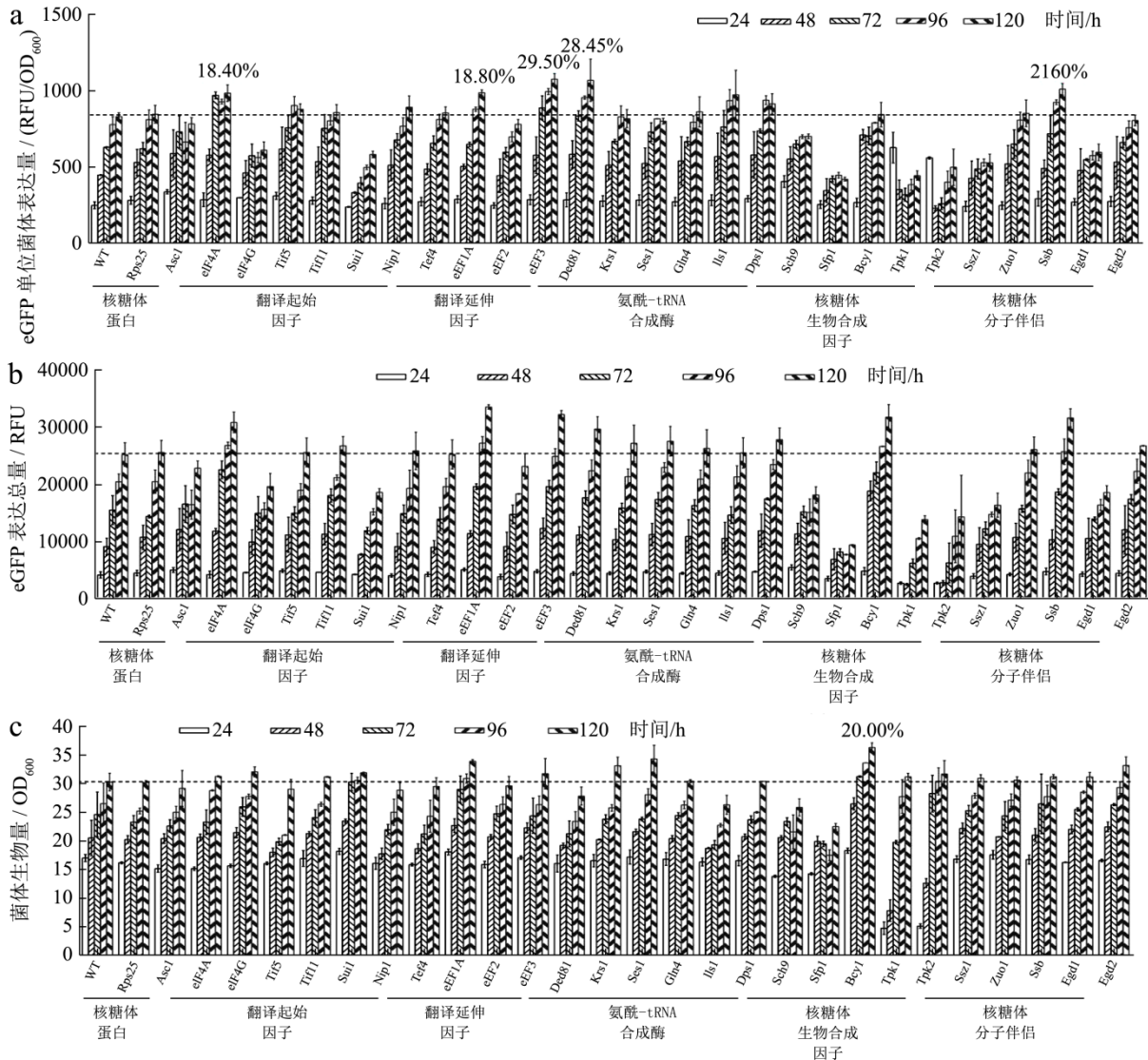


图1 发酵测定 28 个翻译相关因子过表达菌株的 eGFP 表达总量和菌体生物量

Fig.1 eGFP intensity and biomass of 28 translation-related factors overexpressed strains

2.3 翻译促进因子的再验证

为进一步验证对 eGFP 表达有促进作用的 6 个潜在的翻译促进因子对重组蛋白表达有促进作用，本文通过发酵对上文所提及对重组蛋白表达有促进作用的 6 个翻译相关因子进行了胞内 mRFP 表达分析。实验结果表明，红色荧光蛋白 mRFP 的表达与绿色荧光蛋白 eGFP 的表达实验结果相吻合，成功验证了翻译相关因子 eIF4A、eEF1A、eEF3、Ded81、Bcy1、Ssb 可显著促进重组蛋白的表达，结果如图 2 所示。

2.4 比较

目前提高毕赤酵母胞内表达的策略主要集中在对重组蛋白基因进行改造，如启动子优化^[16]、增加基因拷贝数^[17]、密码子优化^[18]发酵条件优化，如通过单因素试验和正交试验来优化培养基成分和摇瓶发酵条件

^[19]、改善前体供应^[16]优化 pH、溶氧、甲醇流加速率及搅拌转速通风量^[18]等。本研究通过过表达翻译相关因子，利用反式因子提高蛋白翻译效率来提高外源表达，从而使得 eIF4A、eEF1A、eEF3、Ded81、Ssb 的 eGFP 单位菌体表达量分别增加了 18.40%、18.80%、29.50%、28.45%、21.60%，使得 eIF4A、eEF1A、eEF3、Ded81、Ssb 的 mRFP 单位菌体表达量分别增加了 20.00%、8.00%、19.00%、5.40%、15.40%。此外还筛选到一个可以提高毕赤酵母菌体生物量从而提高毕赤酵母荧光表达总量的 Bcy1 翻译相关因子，可以使得 eGFP 表达菌株生物量增加 20.00%，mRFP 表达菌株生物量增加 30.90%。说明过表达翻译相关因子提高重组蛋白表达具有普适性。本研究通过过表达翻译相关因子提高毕赤酵母重组蛋白表达的策略，虽然相较于提高了 4 倍重组蛋白胞内表达的密码子优化^[18]等策略提高量较少，但首次通过过表达单一的翻译相关因子

提高毕赤酵母胞内蛋白表达, 为从翻译层面提高毕赤酵母外源表达提供了一种新思路。

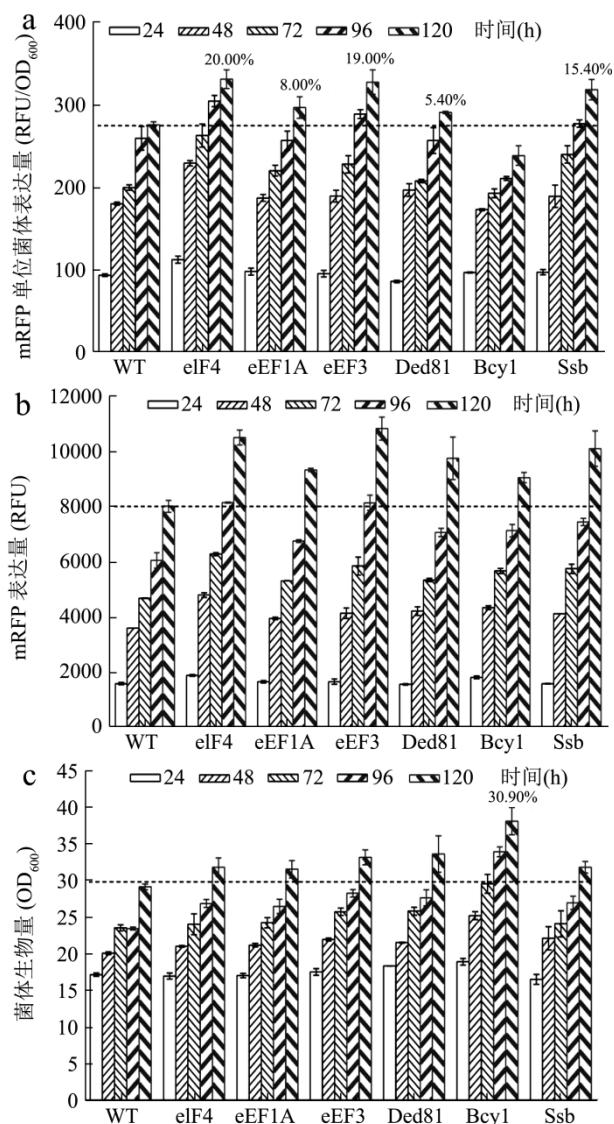


图2 发酵测定6个翻译相关因子过表达菌株的mRFP表达总量和菌体生物量

Fig.2 mRFP intensity and biomass of 6 translation-related factors overexpressed strains

3 结论

毕赤酵母是一种甲醇营养型酵母, 由于它可以实现高密度发酵以及作为目前已广泛应用于生产的重组蛋白, 近期人们开始关注毕赤酵母在外源代谢途径表达及新的代谢产物合成的研究。近年来, 关于提高毕赤酵母外源表达的策略, 较多的研究报道集中在增加基因拷贝数^[20], 优化外源基因密码子^[21]以及优化菌种培养和发酵条件^[22]等, 在翻译层面报道较为缺失, 本文选用毕赤酵母诱导型强启动子 AOX1, 以增强型绿色荧光蛋白 eGFP 为报告蛋白对 28 个可能提高外源表达的翻译相关因子进行初筛, 并用红色荧光蛋白

mRFP 为报告蛋白对其提高外源表达的作用进行了复筛和再验证, 总共筛选到 6 个翻译相关因子 eIF4A、eEF1A、eEF3、Ded81、Bcy1、Ssb 可显著提高重组蛋白表达, 其中翻译延伸因子 eEF3 可提高 eGFP 表达量达 30.90%, 核糖体生物合成因子 Bcy1 可显著提高细胞生物量而有利于重组蛋白生产过程中的积累。为提高毕赤酵母重组蛋白及外源途径基因的表达提供了新思路。

参考文献

- [1] Jan-Philipp Schwarzahns, Tobias Luttermannet, Martina Geier, et al. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(6): 681-710
- [2] Mudassar Ahmad, Melanie Hirz, Harald Pichler, 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
- [3] Leonardo M Damasceno, Chung-Jr Huang, Carl A Batt. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 31-39
- [4] J L Cereghino, J M Cregg. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66
- [5] Richard J Zahrl, David A Peña, Diethard Mattanovich, et al. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(7): 2893-4418
- [6] M Inan, M M Meagher. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(6): 585-589
- [7] Helba Bredell, Jacques J Smith, Johann F Görgens, et al. Expression of unique chimeric human papilloma virus type 16 (HPV-16) L1-L2 proteins in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha* [J]. *Yeast (Chichester, England)*, 2018, 35(9): 519-529
- [8] Rachel Z Fraser, Mithila Shitut, Puja Agrawal, et al. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat [J]. *International Journal of Toxicology*, 2018, 37(3): 241-262
- [9] Yuan Jin, Xiaoyun He, Kwame Andoh-Kumi, et al. Evaluating potential risks of food allergy and toxicity of soy leghemoglobin expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(1): 1700297
- [10] osé Miguel Araya-Garay, José M Ageitos, Juan A Vallejo, et

- al. Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls [J]. *AMB Express*, 2012, 2(1): 24
- [11] Patricia Veiga-Crespo, José Miguel Araya-Garay, Tomás G Villa. Engineering *Pichia pastoris* for the production of carotenoids [J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2018, 1852: 311-326
- [12] 李浩杰,杨雪珍,蓝文康,等.重组人溶菌酶在毕赤酵母中的诱导表达及活性研究[J].*家畜生态学报*,2019,10:33-36,71
- LI Hao-jie, YANG Xue-zhen, LAN Wen-kang, et al. Expression of recombinant human lysozyme in *Pichia pastoris* and its bacteriostatic activity determination [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2019, 10: 33-36, 71
- [13] YANG Zhi-liang, ZHANG Zi-sheng. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: a review [J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 182-195
- [14] LIN Xiao-qiong, LIANG Shu-li, HAN Shuang-yan, et al. Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals the cellular response to heterologous protein overexpression and the regulation of HAC1 in *Pichia pastoris* [J]. *J Proteomics*, 2013, 91: 58-72
- [15] De Schutter K, Lin Y C, Tiels P, et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris* [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(6): 561-566
- [16] ZHANG Xin-ying, WANG Deng-gang, DUAN Ye-hong, et al. Production of lycopene by metabolically engineered [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(3): 463-470
- [17] 吴云华,孙鹏宇.重组人细胞色素 P450 2C9 在毕赤酵母中的胞内表达[J].*中南民族大学学报(自然科学版)*,2013,32(2): 41-45
- WU Yun-hua, SUN Peng-yu. Intracellular expression of human cytochrome P450 2C9 in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of South-Central University for Nationalities* (Nat. Sci. Edition), 2013, 32(2): 41-45
- [18] 王兵波,沈微,钱灵芝,等.一种密码子优化的酸性普鲁兰酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达[J].*食品与发酵工业*, 2016,42(7):9-15
- WANG Bing-bo, SHEN Wei, QIAN Ling-zi, et al. High expression of a codon-optimized acid-resistant pullulanase-encoding gene in *Pichia pastoris* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(7): 9-15
- [19] 齐小雨,陈熙,张炜.人溶菌酶重组酵母工程菌的构建和活性干粉的制备[J].*江苏农业学报*,2016,32(5):1122-1127
- QI Xiao-yu, CHEN Xi, ZHANG Wei. Construction of recombinant yeast expressing human lysozyme and preparation of active dry powder [J]. *Jiangsu J of Agric Sci*, 2016, 32(5): 1122-1127
- [20] SHU Min, SHEN Wei, YANG Shi-hui, et al. High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 92: 56-66
- [21] Chanika Ouephanit, Nassapat Boonvitthya, Sophie Bozonnet, et al. High-level heterologous expression of endo-1,4- β -xylanase from in X-33 directed through codon optimization and optimized expression [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(19): 3515
- [22] WANG Jian-rong, LI Yang-yuan, LIU Dan-ni. Improved production of *Aspergillus usamii* endo- β -1,4-xylanase in *Pichia pastoris* via combined strategies [J]. *Biomed Research International*, 2016, 2: 1-9

(上接第 314 页)

- [19] Mengyu Yin, Zihui Yang, Ke Min, et al. Rapid microwave-assisted porter method for determination of proanthocyanidins [J]. *Phytochemical Analysis*, 2020, 31(2): 215-220
- [20] 陈洋,王冰,玉佳男,等.RP-HPLC-ESI-MS/MS分离鉴定花生红衣原花青素 A 型和 B 型二聚体[J].*食品科学*,2013,34(23): 142-146
- CHEN Yang, WANG Bing, YU Jia-nan, et al. Separation and identification of A-type and B-type dimers of procyanidins from peanut skin by RP-HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2013, 34(23): 142-146
- [21] Yi Cai, Yingjia Yu, Gengli Duan, et al. Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(4): 1872-1877