

人乳铁蛋白在毕赤酵母中的高效分泌表达

张嘉欣，梁书利*

(华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 511400)

摘要：人乳铁蛋白（rhLf）具有抗微生物活性、抗炎症、抗肿瘤及参与免疫调节等多种生物学活性，在食品、化妆品以及饲料添加剂中具有广阔的应用前景。从乳液中提取乳铁蛋白的成本较高，制约乳铁蛋白的大规模生产及应用，通过构建高产细胞工厂获取 rhLf 有望解决这一问题。该研究首先对基因表达元件中的启动子信号肽进行优化，人乳铁蛋白表达菌株上清总蛋白从 215.00 mg/L 提升至 849.52 mg/L，表达元件的优化将人乳铁蛋白表达菌株上清总蛋白提高近 3 倍。进一步，过表达蛋白分泌途径相关的促分泌蛋白因子，调节细胞胁迫反应提高 rhLf 的产量。过表达调控谷胱甘肽氧化还原系统的 Yap1 和增加氧化耐受的 Msn2，平衡酵母细胞生产压力下的氧化还原状态，人乳铁蛋白表达菌株上清总蛋白从 849.52 mg/L 提升至 1 055.68 mg/L。最后，对目的蛋白进行半定量，目的蛋白从 34.82 mg/L 提升至 197.30 mg/L，提高近 4.8 倍。该研究通过多种组合策略大大提升了人乳铁蛋白表达菌株的蛋白生产能力，并为毕赤酵母高效分泌表达提供指导。

关键词：人乳铁蛋白；毕赤酵母；促分泌蛋白因子

文章编号：1673-9078(2025)05-79-88 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0408

Efficient Secretory Expression of Recombinant Human Lactoferrin in *Pichia pastoris*

ZHANG Jiaxin, LIANG Shuli*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 511400, China)

Abstract: Human lactoferrin is involved in various biological activities, such as antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-tumor activities, as well as immune regulation. Thus, it has broad application prospects in food, cosmetics, and feed additives. However, the high cost of extracting lactoferrin from milk restricts its mass production and application. A potential solution is to produce recombinant human lactoferrin (rhLF) by constructing a high-yield cell factory. In this study, the promoter and signal peptide in the rhLF gene expression element were optimized, resulting in an almost four-fold increase (from 215.00 to 849.52 mg/L) in total protein expression in the supernatant. Furthermore, rhLF production was increased by overexpressing protein secretion-promoting factors related to the rhLF production and secretion pathway and regulating cellular stress response. After the redox state of yeast cells under production pressure was balanced by overexpressing Yap1 (which regulates the glutathione redox system) and Msn2 (which enhances oxidative tolerance), the total protein in the

引文格式：

张嘉欣,梁书利.人乳铁蛋白在毕赤酵母中的高效分泌表达[J].现代食品科技,2025,41(5):79-88.

ZHANG Jiaxin, LIANG Shuli. Efficient secretory expression of recombinant human lactoferrin in *Pichia pastoris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 79-88.

收稿日期：2024-03-30
基金项目：国家自然科学基金面上项目（32272276）
作者简介：张嘉欣（1999-），女，硕士研究生，研究方向：酶学与酶工程，E-mail：202120149458@mail.scut.edu.cn
通讯作者：梁书利（1985-），男，博士，教授，研究方向：酶学与酶工程，E-mail：shuli@scut.edu.cn

supernatant of rhLF-expressing strains increased from 849.52 mg/L to 1 055.68 mg/L. Finally, the target protein was semi-quantified, showing an almost 4.8-fold increase (from 34.82 mg/L to 197.30 mg/L). In this study, the protein production capacity of rhLF-expressing strains was greatly improved by combining various strategies, providing guidance for the efficient secretory expression of rhLF in *Pichia pastoris*.

Key words: human lactoferrin; *Pichia pastoris*; secretagogues protein-stimulating factors

乳铁蛋白 (Lactoferrin, Lf) 是一种 80 ku 的铁结合糖蛋白, 属于转铁蛋白家族, 广泛分布于各种哺乳动物的乳汁和大多数生物体液 (如唾液、血清、眼泪) 中^[1]。在母乳中, 乳铁蛋白的含量较高, 占乳清蛋白总含量的 10%~30%, 其平均质量浓度在 5~6 mg/mL^[2]。重组人乳铁蛋白 (Recombinant Human Lactoferrin, rhLf) 是由 689 个氨基酸组成的单一多肽链, 折叠形成两片对称的球状同源裂片, 分别为多肽的 N 端和 C 端^[3]。两片对称的球状同源裂片在结构域的深裂隙中分别可以结合一个 Fe^{3+} 离子, 有研究证明, 由于其铁结合的特性, 乳铁蛋白可以从需铁的细菌中截留铁来充当抑菌剂^[4]。此外, 乳铁蛋白 N 端中含有大量的正电荷氨基酸, 可与细菌、病毒、真菌细胞表面的阴离子相互作用, 引起细胞裂解。乳铁蛋白具有广谱抗菌活性, 可作为天然抗生素应用于人类和兽医学^[5]; 还可以加速 T 细胞的成熟, 对先天性免疫和适应性免疫反应有很强的调节作用。乳铁蛋白作为一种功能糖蛋白在维持人类健康方面有很重要作用, 具有促进骨骼生长、抗微生物活性、抗炎症、抗肿瘤等多种生物学活性, 已经被视为一种新型的抗菌、抗癌抗炎药物和具有巨大发展潜力的食品、化妆品添加剂, 在医药、农业和食品等领域具有广阔的应用前景和重要的生物学意义。

几十年来, 乳铁蛋白主要从初乳中纯化获得, 而初乳中乳铁蛋白的含量极低, 且提取工艺极难导致乳铁蛋白价格高昂。因此, 越来越多的研究人员致力于乳铁蛋白在细菌、真菌和动物表达系统中的异源表达。毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为一种真核表达系统, 有类似高等真核细胞的翻译后修饰功能^[6], 已广泛应用于工业酶和生物制药等行业。迄今为止, 毕赤酵母表达系统已成功用于人血清白蛋白^[7]、人溶菌酶^[8]、和人重组干扰素^[9]的合成。尽管目前已经有许多外源蛋白通过毕赤酵母极具优势的表达平台达到克数级别的生产。但是, 来自高等动物如人源等具有复杂折叠和糖基化的分子量较大的蛋白生产仍然无法突破并满足工业级的量产。Jiang 等^[10]在高细胞密度发酵的诱导阶段以 4:1 的比率

通过混合甲醇 / 甘油诱导使重组乳铁蛋白表达量在 3.7 L 的发酵罐中达到 1 200 mg/L。应革等^[11]以毕赤酵母 KM71 为宿主生产人乳铁蛋白, 在摇瓶条件下得到 15 mg/L。实现人乳铁蛋白的高效率生产仍是有待解决的关键问题。毕赤酵母提高蛋白表达的策略有很多, 密码子优化、表达元件的优化、融合蛋白、共表达促分泌蛋白因子、发酵工艺优化等。在实际的生产中, 可以综合多种策略进一步提高人乳铁蛋白的产量。

本研究通过对目的蛋白表达元件的优化、增加目的基因拷贝剂量、相关促分泌蛋白因子的过表达、调控酵母细胞生产中的胁迫反应等多种组合策略提高人乳铁蛋白的分泌表达, 同时也为毕赤酵母高效表达其他外源重组蛋白提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

所用菌株毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 为本实验室保存。所用载体为本实验室保存的 pPIC9K、pPICZαA 和 pHKA。人源乳铁蛋白基因 (GenBank : BAF83548.1) 由北京擎科生物科技有限公司经过毕赤酵母密码子优化合成。

1.1.2 主要试剂和培养基

限制性内切酶 *NotI*、*EcoRI*、*BglII*、*BamHI*、*Kpn2I*、*Eam1105I*、*SacI*、*PmlI* 和 T4 DNA 连接酶, 购自 Thermo Fisher 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒, 购自广州美基生物科技有限公司; 高保真 PCR 酶 KOD, 购自东洋纺生物科技有限公司; 无缝克隆试剂盒, 购自美国 Clone Smarter 公司。LB 培养基: 0.5% (m/V) 酵母提取物; 1% (m/V) 蛋白胨; 1% (m/V) 氯化钠; MD : 1.34% (m/V) YNB ; 2% (m/V) 葡萄糖; 2% (m/V) 琼脂; YPD : 1% (m/V) 酵母提取物; 2% (m/V) 蛋白胨; 2% (m/V) 葡萄糖; BMGY : 1% (m/V) 酵母

提取物; 2% (m/V) 蛋白胨; 1.34% (m/V) YNB; 1% (V/V) 甘油; 10% (V/V) 1 mol/L pH 值 6.0 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液; BMMY: 1% (m/V) 酵母提取物; 2% (m/V) 蛋白胨; 1.34% (m/V) YNB; 1% (V/V) 甲醇; 10% (V/V) 1 mol/L pH 值 6.0 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液。所有的培养基都在 115 °C 下高压灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的优化和合成

根据毕赤酵母密码子偏爱性对 GenBank 中人源乳铁蛋白的序列进行密码子优化, 优化后的乳铁蛋白基因由北京擎科生物有限公司合成。

1.2.2 表达载体的构建

1.2.2.1 表达元件优化的重组质粒构建

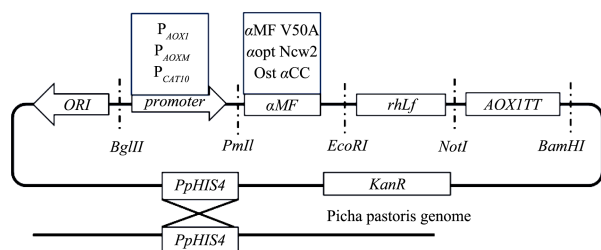


图 1 人乳铁蛋白重组质粒骨架

Fig.1 Human lactoferrin expression plasmid

密码子优化后的 *rhLf* 基因片段连接到载体 pPIC9k 上得到重组表达质粒 pPIC9k-rhLf。本研究选用的启动子为 P_{AOXI} 、 P_{AOXM} ^[12] 和 P_{CAT10} ^[13]。将目的基因 *rhLf* 替换到本实验室已构建的 P_{AOXM} 和 P_{CAT10} 所在的 pHKA 载体上, 得到 pHKA- P_{AOXM} - α -rhLf、pHKA- P_{CAT10} - α -rhLf; 本研究选用的信号肽为 α -factor、Ost^[14]、 α opt^[15]、 α CC^[16]、V50A^[17]、New2^[18]。通过引物 Ost1-F/Ost1-R、 α CC-F/ α CC-R、 α opt-F/ α opt-R、V50A-F/V50A-R、New2-F/New2-R, 以实验室保存的载体为模板进行 PCR 扩增得到信号肽片段, 替换 pHKA- P_{AOXM} - α -rhLf 的信号肽得到重组质粒 pHKA- P_{AOXM} -Ost-rhLf、pHKA- P_{AOXM} - α CC-rhLf、pHKA- P_{AOXM} - α opt-rhLf、pHKA- P_{AOXM} -V50A-rhLf、pHKA- P_{AOXM} -New2-rhLf; 通过体外构建的方式以引物 BOX1-F/BOX1-R 进行 PCR 扩增得到单表达盒, 同源重组构建质粒 pHKA- P_{AOXM} - α CC-rhLf-2c, 以引物 BOX2-F/BOX2-R 扩增单表达盒, 同源重组得到质粒 pPICZA- P_{AOXM} - α CC-rhLf; 以引物 BOX1-F/BOX1-R PCR 扩增双表

达盒, 构建质粒 pPICZA- P_{AOXM} - α CC-rhLf-2c。所有载体均经过菌落 PCR 鉴定, 提取的重组质粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序。质粒骨架如图 1。

1.2.2.2 促蛋白分泌因子的质粒构建

以实验室保存的 pPICZA- P_{GAP} -Trapp1 质粒为模板, 通过引物 V-Pgapz-1 和 V-Pgapz-2 进行载体骨架 PCR; ZWF1、GSH2、PMP20、SOL3 的基因都是通过引物 F-ZWF1-1/F-ZWF1-2、F-GSH2-1/F-GSH2-2、F-PMP20-1/F-PMP20-2、F-SOL3-1/F-SOL3-2 从毕赤酵母 GS115 中 PCR 获得, 构建质粒 pPICZA- P_{GAP} -ZWF1、pPICZA- P_{GAP} -GSH2、pPICZA- P_{GAP} -PMP20、pPICZA- P_{GAP} -SOL3; pPICZA- P_{AOXI} -Yap1p 为本实验室保存; Msn2、Msn4、Hsf1、Hsp30 的基因都是通过引物 F-Msn2-1/F-Msn2-2、F-Msn4-1/F-Msn4-2、F-Hsf1-1/F-Hsf1-2、F-Hsp30-1/F-Hsp30-2 从酿酒酵母中 PCR 获得, 构建质粒 pPICZA- P_{GAP} -Msn2、pPICZA- P_{GAP} -Msn4、pPICZA- P_{GAP} -Hsf1、pPICZA- P_{GAP} -Hsp30。所有载体均经过菌落 PCR 鉴定, 提取的重组质粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 本研究所用的所有引物列于表 1。

1.2.3 表达菌株的构建与筛选

制备毕赤酵母 GS115 的感受态, 将乳铁蛋白重组表达质粒 pPIC9k-rhLf 在 His 位点的 *NcoI* 处线性化。取 500 ng 线性化的质粒和 80 μ L 的感受态细胞混合, 加入电击杯冰浴 5 min, 电击 4~6 ms, 立即加入 1 mL 浓度为 1 mol/L 的冰浴山梨醇, 30 °C 孵育 1.5 h, 取 100 μ L 液涂抹于 MD 平板, 30 °C 培养箱培养 3 d。

将启动子优化的重组质粒和信号肽优化的重组质粒在 *Kpn2I* 线性化, 电转至毕赤酵母 GS115 中, 通过 MD 平板筛选阳性转化子; 通过体外构建的方法构建多拷贝菌株, 重组质粒 pPHKA- P_{AOXM} - α CC-rhLf-2c 在 *Kpn2I* 线性化, 电转至毕赤酵母 GS115 中, 通过 MD 平板筛选得到二拷贝菌株; 重组质粒 pPICZA- P_{AOXM} - α CC-rhLf、pPICZA- P_{AOXM} - α CC-rhLf-2c 在 *Kpn2I* 线性化, 分别电转至毕赤酵母感受态 GS115-pPHKA- P_{AOXM} - α CC-rhLf-2c 中, 用 YPDZ (博来霉素) 平板筛选得到三拷贝、四拷贝菌株; 促分泌蛋白因子的重组质粒在 *Eam1105I* 线性化, 电转至毕赤酵母感受态 1C 中, 用 YPDZ (博来霉素) 平板筛选得到过表达促分泌蛋白因子的乳铁蛋白工程菌株。本研究使用构建的菌株列于表 2。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')
Ost-F	AAAACAAC TAATTATTCGAACACGTGATGAGGCAGGTTTG GTTCTCTTGG
Ost-R	TATGGTGATGGTGATGGTGATGATGGAATTCAGCTTCAGCCTCTCTTTTC
α CC-F	ACAAC TAATTATTCGAACACGTGATGAGATTCCCATCTATCTT
α CC-R	TGGTGATGGTGATGGTGATGATGGAATTCAGCTTCAGCCTCTCTCTTCTC
α opt-F	AAAAACAAC TAATTATTCGAACACGTGATGAGATTTCCTTCAATTTTTA
α opt-R	TATGGTGATGGTGATGGTGATGATGGAATTCAGCTTCAGCCTCTCTTTTC
New2-F	TGATTACTTTGGCTGCTGCTGAATTCATGAAATTGGTTTTCTTG GTTTTTGTTG
New2-R	GATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTTGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCTTACTTTTCTCA
TY-BOX1-F	GTGAGACCTTCGTTTGTGCGAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTG
TY-BOX1-R	CGCATTAAGCTTATCGATGGATCCACTAGTCCTAGGTCTCACTTAATCTTCTGTAC
TY-BOX2-F	GGATTTTGGTCATGAGATCAGATCTGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATG
TY-BOX2-R	GTCATGGATCCACTAGTCCTAGGTCTCACTTAATCTTCTGTACTCTGAAGAGGAGTG
TY-BOX1-R	CGCATTAAGCTTATCGATGGATCCACTAGTCCTAGGTCTCACTTAATCTTCTGTAC
TY-BOX2-F	GGATTTTGGTCATGAGATCAGATCTGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATG
V-Pgapz-1	GCGGCCGCCAGCTTGGGCCC
V-Pgapz-2	ATAGTTGTTCAATTGATTGA
F-ZWF1-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGACCGATACGAAAGCCGTAGAA
F-ZWF1-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCTTACATCTTGTGCAGCACATCGG
F-GSH2-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGACTGCACCAAAACCTCTTCC
F-GSH2-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCTTAGAAGAGATAAACACTGTCAA
F-PMP20-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGTCAAGAAATTTTCAAAC TGTTAAGAGAGGAGA
F-PMP20-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCTTACAAC TTTGCTAGAACCTGTCTGG
F-SOL3-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGGTACAAATCTATTCCTATGAACGATCTGATG
F-SOL3-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCTCAGTATTTCTGAAGTAGAAACGGAGACTCC
F-Msn2-1	CAATTGAACAAC TATTTCGAAACGAGGATGTCTACAACAAAACCAATGCAG
F-Msn2-2	TTTTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCTCACTGCTTACGGTGAGTACG
F-Msn4-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGTCTACAACAAAACCAATGCAGGT
F-Msn4-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCTCACTGCTTACGGTGAGTACG
F-Hsf1-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGAATAATGCTGCAAATACAGGGACG
F-Hsf1-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCCTATTTCTTAGCTCGTTTGGGCAGG
F-Hsp30-1	ACAAC TATTTCGAAACGAGGAATTCATGAACGATACGCTATCAAGCTTTTTAAATCG
F-Hsp30-2	TTGTTCTGGGCCCAAGCTGGCGGCCGCCTAAGCAGTATCTTCGACAGCTTGC

1.2.4 重组表达菌株的摇瓶发酵和SDS-PAGE

对筛选的阳性转化子进行摇瓶发酵，将单菌落接种于 10 mL BMGY 培养基，在 30 ℃、250 r/min 条件下培养 24 h，取初始 OD₆₀₀ 为 1 的菌体进行转接，4 500 r/min 离心 2 min，用 25 mL 甲醇诱导 BMMY 培养基重悬，继续摇瓶发酵 120 h，同时补加 1% 体

积分数的甲醇，菌株 GS115-pPIC9k 为阴性对照菌。离心取适量 120 h 发酵菌株的上清，在 100 ℃沸水中，用巯基乙醇缓冲液对上清进行变性预处理 8 min，通过体积分数分别为 6% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色，观察蛋白条带的大小和宽度。

表 2 本研究所构建菌株
Table 2 Strains used in this study

Strain	Description
阴性对照	GS115- pPIC9k
G01	GS115-pPIC9k- α -rhLf
G02	GS115-pHKA-P _{AOXM} - α -rhLf
G03	GS115-pHKA-P _{CAT10} - α -rhLf
F01	GS115-pHKA-P _{AOXM} -Ost-rhLf
F02	GS115-pHKA-P _{AOXM} - α opt-rhLf
F03	GS115-pHKA-P _{AOXM} -V50A-rhLf
F04	GS115-pHKA-P _{AOXM} -Ncw2-rhLf
1C	GS115-pHKA-P _{AOXM} - α CC-rhLf
2C	GS115-pHKA-P _{AOXM} - α CC-rhLf-2c
3C	GS115-pHKA-P _{AOXM} - α CC-rhLf-2c-pPICZA-P _{AOXM} - α CC-rhLf
4C	GS115-pHKA-P _{AOXM} - α CC-rhLf-2c-pPICZA-P _{AOXM} - α CC-rhLf-2c
P01	1C-pPICZA-P _{AOXI} -Yap1p
P02	1C-pPICZA-P _{GAP} -ZWF1
P03	1C-pPICZA-P _{GAP} -GSH2
P04	1C-pPICZA-P _{GAP} -PMP20
P05	1C-pPICZA-P _{GAP} -SOL3
P06	1C-pPICZA-P _{GAP} -Msn2
P07	1C-pPICZA-P _{GAP} -Msn4
P08	1C-pPICZA-P _{GAP} -Hsf1
P09	1C-pPICZA-P _{GAP} -Hsp30

1.2.5 发酵液中总分泌蛋白的浓度测定和目的蛋白的半定量分析

按照 Bradford 蛋白浓度检测试剂盒上的操作说明测定发酵上清的总蛋白质量浓度，将 20 μ L 系列梯度稀释的质量浓度分别为（0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL）的标准样 BSA 加入 200 μ L Bradford 工作液，室温反应 5 min，测定 595 nm 处的吸光度，得到梯度标准样 BSA 标准曲线。上清样品测定方法相同，以标准曲线计算得到总分泌蛋白的质量浓度。进行乳铁蛋白的半定量分析，取不同稀释质量浓度的标准样品 BSA（0.05、0.15、0.2、0.3 mg/mL）和相同体积的人乳铁蛋白菌株发酵上清样品进行

SDS-PAGE，用 Image J 进行 SDS-PAGE 条带灰度值分析，得到标准样品 BSA 的质量浓度和绝对灰度（255-灰度平均值）之间的拟合标准曲线，测定目的蛋白理论大小处的条带的绝对灰度，进行目的蛋白的相对半定量分析。

1.2.6 人乳铁蛋白的LC-MS/MS

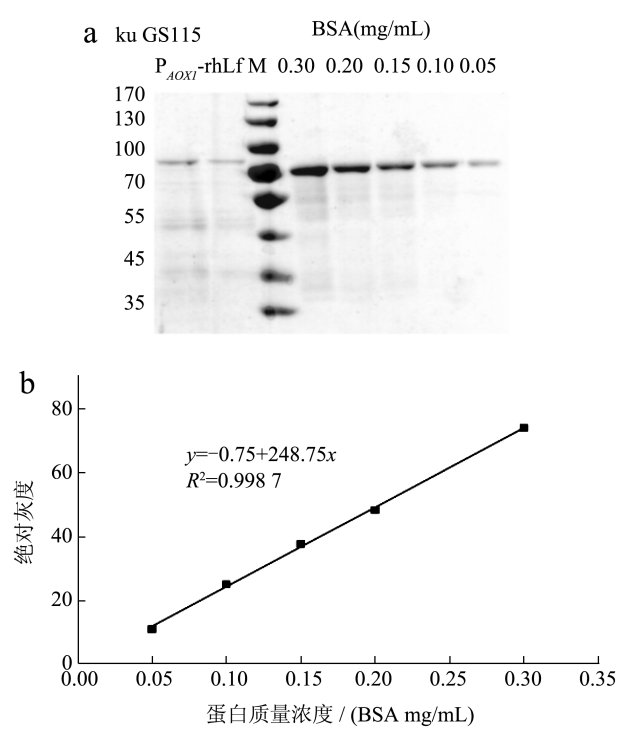
LC-MS/MS 是鉴定肽段和蛋白质的一种重要的分析技术。将 SDS-PAGE 中 80 ku 处和 40 ku 处的样品的凝胶块切下并进行质谱分析。质谱的二级谱图中横坐标为质量 / 电荷（ m/z ）比值，纵坐标为检测到离子的相对强度。二级谱图中的峰为碎片离子的信号峰，有色峰为匹配的碎片离子。一般认为，碎片离子越多，鉴定证据越充分。将重组人乳铁蛋白菌株 120 h 的发酵上清经过 SDS-PAGE 后，切胶回收 80 ku 和 40 ku 的重组人乳铁蛋白条带，送至暨南大学实验平台进行液相色谱串联质谱分析。将检测结果与 rhLf 和 *Pichia pastoris* GS115 的内源蛋白库进行序列比对，鉴定上清蛋白是否为人乳铁蛋白。

1.2.7 统计学分析

使用 Origin 2022 进行数据统计分析，每次实验测试 3 组平行数值，所有的数据均以均值标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 重组工程菌株的诱导表达



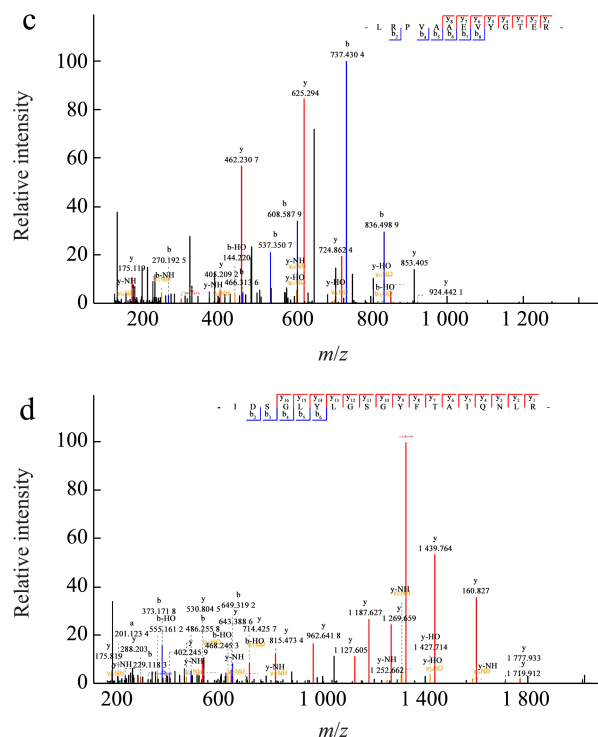


图2 人乳铁蛋白在毕赤酵母中的初步分泌表达

Fig.2 Preliminary secretory expression of rhLf in *Pichia pastoris*

注：(a) SDS-PAGE；(b) BSA 灰度半定量方法的标准曲线；(c) 80 ku 蛋白 LC-MS：100~112 aa；(d) 80 ku 蛋白 LC-MS：340~358 aa。

重组菌株在摇瓶条件下诱导发酵，取 120 h 的发酵上清，测定上清总蛋白的质量浓度并进行 SDS-PAGE。结果如图 2a，Bradford 法检测人乳铁蛋白重组工程菌株 GS115-pPIC9k-rhLf 发酵上清的总蛋白为 215.00 mg/L；SDS-PAGE 在 80 ku 处有明显的条带，与目的蛋白理论值大小相同。对目的蛋白进行灰度半定量分析，80 ku 处的目的蛋白产量达 34.82 mg/L。但是，在非目的蛋白大小处存在大量较小的肽段条带，人乳铁蛋白的分子量较大，在蛋白分泌的过程中可能发生多肽的降解，因此对 80 ku 和 40 ku 的胶条样品进行进一步的质谱鉴定。质谱离子选择装置会自动选取强度相对较大的肽段离子进行二级质谱分析，输出选取肽段的二级质谱峰图，对检测到的肽段序列与目的蛋白的序列进行比对，在 80 ku 样品发现人乳铁蛋白的专属肽段，如图 2c、2d，序列分别为 AEVYGTER、GLYLGSGYFTAIQNLR，肽段覆盖率为 5.9%，从而鉴定 80 ku 处蛋白为人乳铁蛋白，40 ku 处鉴定结果为毕赤酵母内源蛋白。重组人乳铁蛋白在毕赤酵母中成功诱导表达。

2.2 表达元件的优化和拷贝剂量的增加对人乳铁蛋白分泌表达的影响

2.2.1 优化启动子对人乳铁蛋白菌株蛋白分泌表达的影响

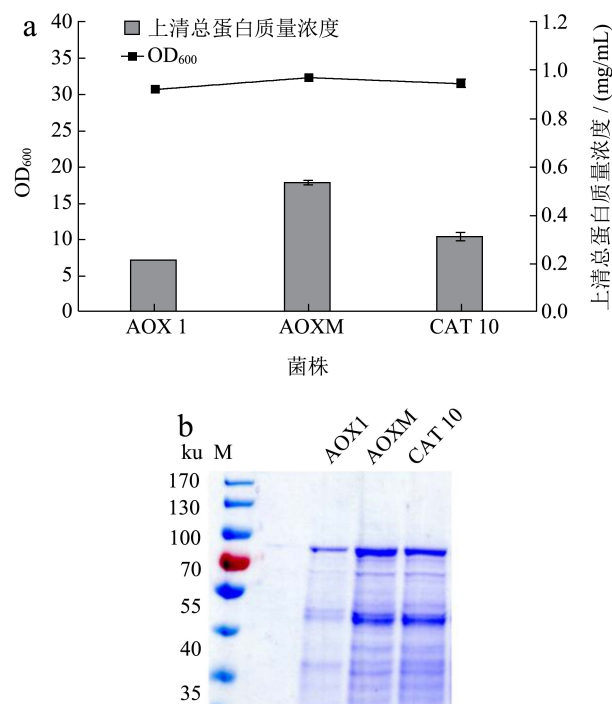


图3 优化启动子对人乳铁蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of promoter optimization on rhLf expressions

注：(a) 优化启动子菌株上清的总蛋白浓度；(b) 优化启动子菌株的上清 SDS-PAGE。

启动子通常是决定外源蛋白表达强度的基础调控元件，本研究选用甲醇诱导的强启动子 P_{AOX1} 成功表达重组人乳铁蛋白。Hartner 等^[12]分析 P_{AOX1} 上可能与转录因子结合的顺式作用元件，通过对元件进行缺失构建启动子突变库，得到强度达到原来 160% 的启动子。Nong 等^[13]通过删除或复制过氧化氢酶启动子序列中假定的 TFBS 基序，构建了 P_{CAT1} 的突变文库，与原始启动子 P_{CAT1} 相比突变体 P4 将脂肪酶水解活性增加了 28%。本研究替换过氧化氢酶启动子突变体 P_{CAT10} 以及 P_{AOX1} 的突变体 P_{AOXM} ，构建菌株 GS115-pPHKA- P_{CAT10} -rhLf、GS115-pPHKA- P_{AOXM} -rhLf。将优化后的菌株进行摇瓶发酵，选用 GS115-pPIC9k-rhLf 菌株作为对照，发酵 120 h 后离心收集上清，进行蛋白浓度测定和 SDS-PAGE 检测。结果如图 3，替换 P_{CAT10} 的菌株上清的总蛋白为 314.20 mg/L， P_{AOXM} 的菌株上清总蛋白为 536.46 mg/L， P_{AOXM} 的提高效果最显著，GS115-pPHKA- P_{AOXM} -rhLf

的表达量为初始表达菌株的 2.5 倍。因此, 选择 P_{AOXM} 作为乳铁蛋白表达启动子。

2.2.2 优化信号肽对人乳铁蛋白菌株蛋白分泌表达的影响

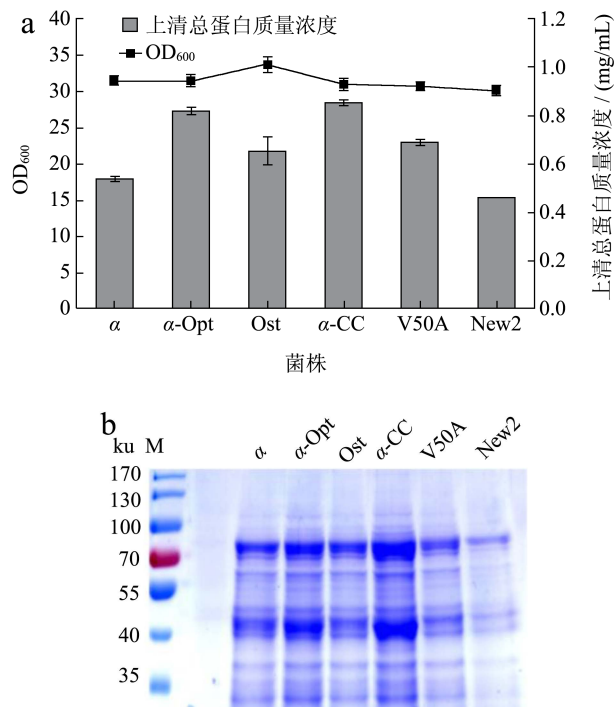


图 4 优化信号肽对人乳铁蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of signal peptide optimization on rhLf expressions

注: (a) 优化信号肽菌株上清的总蛋白浓度; (b) 优化信号肽菌株的上清 SDS-PAGE。

新生的肽链在完成转录和翻译后, 会在信号肽的作用下被内质网膜上的受体识别并结合, 经由膜中形成的孔道到达内质网, 在多种分子伴侣和辅助因子的辅助下折叠形成正确构象的蛋白。Ito 等^[17]通过对 α 信号肽进行突变, 避免了分泌蛋白进入蛋白质降解途径, 使抗溶菌酶单链可变片段抗体的分泌水平提高了约 6 倍。Ahn 等^[16]通过将 α -factor 经过毕赤酵母密码子优化, 得到信号肽 α CC, 显著提高了毕赤酵母南极假丝酵母脂肪酶的分泌产量。本研究将 α -MF 信号肽替换为 α opt、Ost1、 α CC、V50A、NCW2, 发酵 120 h 后离心收集上清, 进行蛋白质量浓度测定和 SDS-PAGE 检测。结果如图 4, 信号肽为 α opt、Ost、 α CC、V50A、NCW2 时, 菌株发酵上清的总蛋白的产量分别为 816.15、650.51、849.52、684.74、454.77 mg/L; α opt、Ost、 α CC、V50A 信号肽的替换都比 α -MF 信号肽的分泌效果好。其中, 当信号肽为 α CC 时, 菌株上清总蛋白的产量最高, 为 GS115-pPHKA- P_{AOXM} -rhLf 菌株上清总

蛋白的 1.6 倍。经过 SDS-PAGE 鉴定, 目的蛋白 80 ku 处的目的条带也呈相同增加趋势。因此, 选择 α CC 作为人乳铁蛋白分泌表达的信号肽。

2.2.3 基因剂量的增加对人乳铁蛋白菌株分泌蛋白的影响

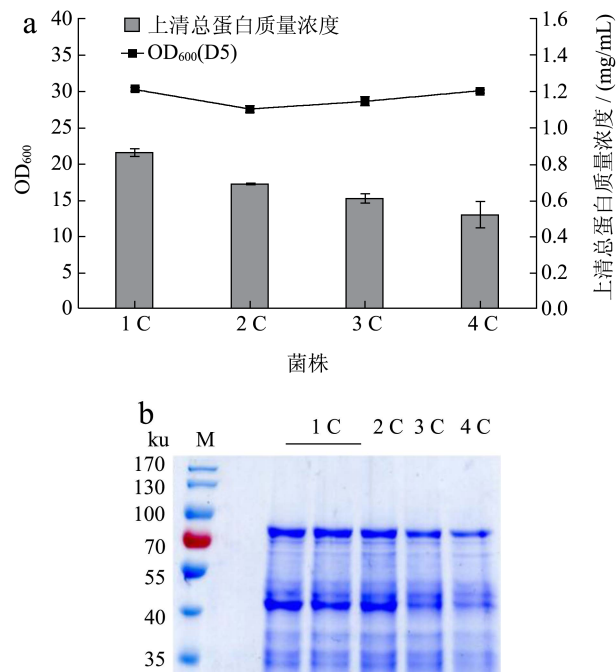


图 5 基因拷贝的增加对人乳铁蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of increased copies on human lactoferrin expression

注: (a) 多拷贝菌株上清的总蛋白浓度; (b) 多拷贝菌株的上清 SDS-PAGE。

提高外源蛋白的基因剂量, 在毕赤酵母中对异源蛋白的表达具有显著的提升作用。Jiao^[19]等通过构建 5 拷贝的米根霉脂肪酶 (Rhizopus Oryzae Lipase, ROL) 表达菌株, 将其产量提高了 8 倍。本研究通过体外构建的方法构建多拷贝菌株 1C、2C、3C、4C。发酵 120 h 后离心收集上清, 进行蛋白浓度测定和 SDS-PAGE 检测。结果如图 5, 随着乳铁蛋白基因剂量的增加, 重组工程菌株发酵分泌总蛋白出现下降的趋势, SDS-PAGE 检测中 80 ku 处的条带大小也呈减小趋势。其中二、三、四拷贝菌株 2C、3C、4C 的发酵上清的总蛋白质量分数相比单拷贝菌株 1C 分别降低了 19.8%、29.3%、39.4%。有研究证明, 蛋白的产量并不会随着拷贝的增加持续增加, Zhu 等^[20]构建猪胰岛素前体的毕赤酵母菌株, 当拷贝数超过 12 时, 重组菌株的生长速率和对甲醇的利用效率都受到了影响, 从而导致目的产物浓度下降。新生多肽进入内质网的折叠修饰和分泌运输通量都是有限的, 只有正确折叠的蛋白质才

能离开内质网并穿过分泌途径分泌到酵母细胞外。因此,推测是在蛋白生产分泌的过程中,内质网中未折叠和错误折叠蛋白的大量积累激活了未折叠蛋白反应,导致酵母细胞的代谢压力和生产压力过大,导致乳铁蛋白的产量下降。

2.3 过表达促分泌蛋白因子对人乳铁蛋白表达的影响

毕赤酵母在利用甲醇代谢的过程中,甲醛和活性氧(ROS)的积累会引起酵母细胞产生氧化应激,影响异源蛋白的生产。Lin等^[21,22]通过对一株高产脂肪酶的突变菌株进行转录组分析,发现突变体中与抗氧化、MAPK途径、麦角固醇合成途径、过氧化物酶体途径等相关的基因均上调表达,突变菌株具有比野生型菌株较强的ROS缓冲能力,其赋予了菌株更高的异源蛋白表达能力。因此,考虑到增强菌株的抗逆性可能有助于异源蛋白的生产,本研究在单拷贝菌株中过表达与菌株抗逆性相关的促分泌蛋白因子。

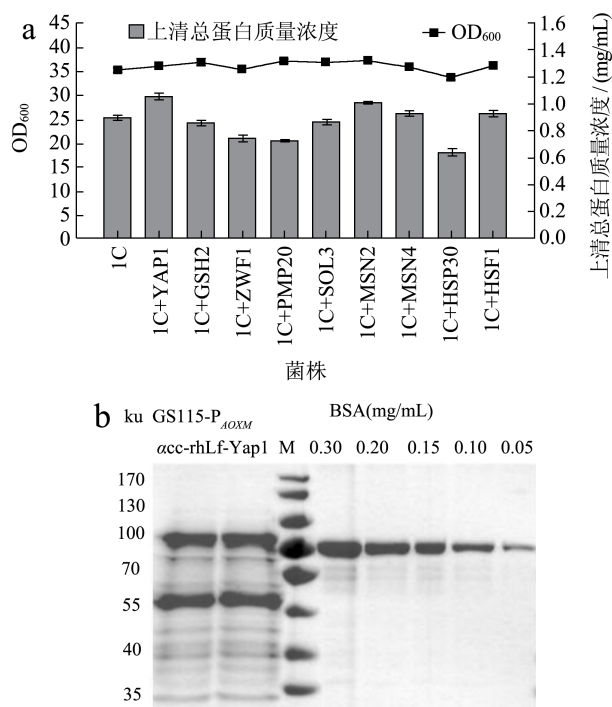


图6 过表达促蛋白分泌因子对人乳铁蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of overexpression of proprotein secretion factors on rhIF expression

注:(a) 过表达促蛋白分泌因子的菌株上清的总蛋白浓度;(b) 1C-pPICZA-PAOX1-Yap1p 菌株的半定量。

转录因子 Yap1 可以调控谷胱甘肽氧化还原系统^[23]; 戊糖磷酸途径中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 ZWF1、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 SOL3, 可以通过提

高磷酸戊糖的流量^[24]产生 NADPH, 提供还原力; 谷胱甘肽 GSH2、谷胱甘肽过氧化物酶 PMP20, 可共同清除细胞内的氧化分子。来自酿酒酵母的转录因子 Msn2、Msn4^[25]可以通过介导脯氨酸结合来增加氧化耐受, 在响应氧化应激、渗透胁迫、营养饥饿和温度变化等环境胁迫反应中发挥关键作用^[26]。来自酿酒酵母的热蛋白 Hsp30 和转录因子 Hsf1 可以调控在高转录水平胁迫下细胞响应的应激机制^[27], 本研究将上述促分泌蛋白因子分别在单拷贝菌株中过表达, 调控氧化应激系统来平衡酵母细胞生产压力下的氧化还原状态。发酵 120 h 后离心收集上清, 进行蛋白浓度测定和 SDS-PAGE 检测。

结果如图 6a, 过表达 Yap1 的菌株上清的总蛋白比单拷贝菌株 1C 增加了约 15%, 上清的总蛋白达 1 055.68 mg/L。Lin 等^[22]通过过表达内源抗氧化的相关基因强化细胞的抗氧化防御系统提高异源蛋白的分泌表达, 当过表达谷胱甘肽的 GSH2 时将脂肪酶的表达量提高了约 1.6 倍; 过表达戊糖磷酸途径中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 ZWF1 时将脂肪酶的表达量提高了约 1.4 倍。本研究中 GSH2、ZWF1、PMP20、SOL3 的过表达相比较单拷贝菌株 1C 的上清的总蛋白产量并没有明显提升, 甚至 ZWF1、PMP20 出现略微的降低。Zahrl 等^[28]以推拉策略研究 Msn2/4 家族成员的过表达对毕赤酵母生产重组蛋白的影响, 在联合过表达 Hac1 和 Msn4 时, ScFv 的效价和产量提高了约 4 倍。在本研究过表达 Msn2 的菌株上清的总蛋白比单拷贝菌株 1C 增加了约 11%, 菌株的上清的总蛋白达 1 009.35 mg/L。最后, 按照 1.2.6 的方法对菌株 1C-pPICZA-P_{AOXI}-Yap1p 进行目的蛋白半定量的分析, 如图 6b, 80 ku 处的目的蛋白质量浓度达 197.30 mg/L, 是初始表达菌株 GS115-pPIC9k-rhLf 的近 5.8 倍。后续, 可以发掘更多的促分泌蛋白因子进行尝试, 筛选能够进一步提升人乳铁蛋白生产水平的有效促分泌蛋白因子。

3 结论

本研究通过多种组合策略成功实现人乳铁蛋白在毕赤酵母中的分泌表达。首先, 本研究对外源基因的表达元件进行优化, 筛选强启动子以及适合乳铁蛋白分泌表达的信号肽, 将人乳铁蛋白工程菌株上清的总蛋白含量提高了近 3 倍, 达 849.52 mg/L。通过增加乳铁蛋白工程菌株中目的基因的剂量, 发现蛋白表达量随拷贝剂量的增加而下降, 推测可能

是基因拷贝数增加的同时也增加了菌株的代谢生产压力,导致蛋白表达量下降。进一步,通过过表达调控谷胱甘肽氧化还原系统的转录因子 Yap1 和介导脯氨酸结合增加氧化耐受的 Msn2, 共同来清除发酵过程中酵母细胞产生的 ROS, 调控酵母细胞的氧化应激系统, 平衡细胞生产压力下的氧化还原状态, 成功通过多种组合策略将人乳铁蛋白工程菌株上清的总蛋白提高至 1 055.68 mg/L, 目的蛋白提高至 197.30 mg/L, 目的蛋白提高了约 4.8 倍。除了对外源蛋白表达分泌的关键途径进行优化和调控, 外源蛋白生产过程中保证蛋白的稳定, 敲除相关蛋白酶的基因, 减少蛋白质的降解也是保证异源蛋白高产的关键策略, 因此, 后续对人乳铁蛋白的高效表达分泌仍需进一步探索和研究。

参考文献

- [1] K KANWAR R, R KANWAR J. Immunomodulatory lactoferrin in the regulation of apoptosis modulatory proteins in cancer [J]. Protein & Peptide Letters, 2013, 20(4): 450-458.
- [2] CUI S, LV X, SUN G, et al. Recent advances and prospects in purification and heterologous expression of lactoferrin [J]. Food Bioengineering, 2022, 1(1): 58-67.
- [3] ANDERSON B F, BAKER H M, NORRIS G E, et al. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.43 Å resolution [J]. Journal of Molecular Biology, 1989, 209(4): 711-734.
- [4] GONZÁLEZ-CHÁVEZ S A, ARÉVALO-GALLEGOS S, RASCÓN-CRUZ Q. Lactoferrin: structure, function, and applications [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009, 33(4): 301.e1-301.e8.
- [5] KELL D B, HEYDEN E L, PRETORIUS E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1221.
- [6] YANG Z, ZHANG Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(1): 182-195.
- [7] MAITY N, JASWAL A S, GAUTAM A, et al. High-level production of stable human serum albumin in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant product [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2022, 45(2): 409-424.
- [8] WANG Y, WANG B, GAO Y, et al. Highly efficient expression and secretion of human lysozyme using multiple strategies in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(11): e2300259.
- [9] CHRONOPOULOU S, TSOCHANTARIDIS I, TOKAMANI M, et al. Expression and purification of human interferon alpha 2a (IFNα2a) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2023, 211: 106339.
- [10] JIANG T, CHEN L, JIA S, et al. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris* [J]. Dairy Science and Technology, 2008, 88(2): 173-181.
- [11] 应革, 吴淑华, 王静, 等. 重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达人乳铁蛋白的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18: 181-185.
- [12] HARTNER F S, RUTH C, LANGENEGGER D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(12): e76.
- [13] NONG L, ZHANG Y, DUAN Y, et al. Engineering the regulatory site of the catalase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(12): 2703-2709.
- [14] BARRERO J J, CASLER J C, VALERO F, et al. An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris* [J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 161.
- [15] AZA P, MOLPECERES G, DE SALAS F, et al. Design of an improved universal signal peptide based on the α-factor mating secretion signal for enzyme production in yeast [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2021, 78(7): 3691-3707.
- [16] AHN J, JANG M J, ANG K S, et al. Codon optimization of *Saccharomyces cerevisiae* mating factor alpha prepro-leader to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(12): 2137-2143.
- [17] ITO Y, ISHIGAMI M, HASHIBA N, et al. Avoiding entry into intracellular protein degradation pathways by signal mutations increases protein secretion in *Pichia pastoris* [J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(9): 2364-2378.
- [18] XUE S, LIU X, PAN Y, et al. Comprehensive analysis of signal peptides in *Saccharomyces cerevisiae* reveals features for efficient secretion [J]. Advanced Science, 2023, 10(2): 2203433.
- [19] JIAO L, ZHOU Q, SU Z, et al. High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with co-expression of ERAD-related proteins [J]. Protein Expression and Purification, 2018, 147: 1-12.
- [20] ZHU T, GUO M, TANG Z, et al. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression

- of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 954-963.
- [21] LIN N X, HE R Z, XU Y, et al. Augmented peroxisomal ROS buffering capacity renders oxidative and thermal stress cross-tolerance in yeast [J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 131.
- [22] LIN N X, HE R Z, XU Y, et al. Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 160.
- [23] YANO T, TAKIGAMI E, YURIMOTO H, et al. Yap1-regulated glutathione redox system curtails accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris* [J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(4): 540-549.
- [24] NOCON J, STEIGER M, MAIRINGER T, et al. Increasing pentose phosphate pathway flux enhances recombinant protein production in *Pichia pastoris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(13): 5955-5963.
- [25] MAT NANYAN N S B, WATANABE D, SUGIMOTO Y, et al. Involvement of the stress-responsive transcription factor gene *MSN2* in the control of amino acid uptake in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Research, 2019, 19(5): foz052.
- [26] CAUSTON H C, REN B, KOH S S, et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes [J]. Molecular Biology of the Cell, 2001, 12(2): 323-337.
- [27] CUI D, LIU L, SUN L, et al. Genome-wide analysis reveals Hsf1 maintains high transcript abundance of target genes controlled by strong constitutive promoter in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 72.
- [28] ZAHRL R J, PRIELHOFER R, BURGARD J, et al. Synthetic activation of yeast stress response improves secretion of recombinant proteins [J]. New Biotechnology, 2023, 73: 19-28.