

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (12) :1446 – 1452; 4 December 2014  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.007

## 不同信号肽对毕赤酵母表达漆酶的影响

石艺平<sup>1</sup>, 周雪<sup>3</sup>, 胡美荣<sup>2</sup>, 林剑辉<sup>1</sup>, 陶勇<sup>2</sup>, 黄建忠<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108

<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>3</sup>山东大学威海分校, 山东 威海 264209

**摘要:**【目的】从毕赤酵母 X-33 的内源分泌蛋白中寻找高分泌能力的信号肽, 以提高漆酶 POXA1c 的表达水平。【方法】通过二维电泳的数据分析, 以及毕赤酵母的基因组测序结果筛选出 7 种毕赤酵母中高分泌水平的蛋白, 利用其引导漆酶的分泌, 通过测定漆酶的活力, 来确定信号肽的分泌能力。【结果】七种信号肽都能引导漆酶的分泌, 其中 PHO5 和 FLO10 信号肽, 其引导下漆酶 POXA1c 的活力分别是自身信号肽引导下的 2.5 倍和 2 倍。组合信号肽 FLO10- $\alpha$ pro 和 PHO5- $\alpha$ pro 引导下漆酶的活力分别为自身信号肽引导下的 3 倍和 3.5 倍, 分别比在  $\alpha$ -MF 引导下提高了 20% 和 40%。【结论】毕赤酵母内源分泌蛋白的信号肽可以有效的引导外源蛋白的分泌, 漆酶 POXA1c 在 PHO5- $\alpha$ pro 信号肽引导下, 通过高密度发酵培养后, 其漆酶活力达到 57.98 U/mL。

**关键词:** 毕赤酵母, 信号肽, 漆酶

中图分类号: Q814 文章编号: 0001-6209(2014)12-1446-7

巴斯德毕赤酵母是一种广泛应用的外源蛋白表达宿主, 目前已成功表达了 400 多种外源蛋白。毕赤酵母表达有些外源蛋白的水平可以达到 g/L 的级别<sup>[1]</sup>, 但是仍很多蛋白表达量相对较低。提高毕赤酵母表达外源蛋白的水平是减少工业生产成本的一个重要手段。提高外源蛋白表达水平常用的策略包括: 提高异源基因的剂量、共表达分子伴侣二硫键异构酶以及内质网中的结合蛋白<sup>[2]</sup>、优化发酵条件等。其中对毕赤酵母信号肽的研究较少, 目前广泛应用的主要是酿酒酵母的  $\alpha$ -信号肽 ( $\alpha$ -MF)<sup>[3]</sup>。

信号肽大多位于初生蛋白 N 端, 也有少量存在于蛋白内部或者 C 端, 长度从 15 个氨基酸到 50 个氨基酸不等。信号肽是蛋白胞外分泌表达必不可少

的元件, 现已有许多研究表明, 适当改造信号肽能显著提高外源蛋白的分泌表达效率。Chitoshi 等<sup>[4]</sup>用  $\alpha$ -MF 在毕赤酵母中表达人的溶解酵素 (Human Lysozyme, HLY), 其表达水平是鸡的溶解酵素信号肽 (CLY) 的 20 倍, 是酿酒酵母蔗糖转换酶信号肽 (SUC2) 的 70 倍; Akira 等<sup>[5]</sup>利用  $\alpha$ -MF、目的基因本身信号肽、毕赤酵母 PHO1 信号肽在 AOX 调控下表达人中期因子 (human mid-kine), 表达量分别为 28、1.5 和 0.12 mg/L,  $\alpha$ -MF 显示出了绝对优势。Diana Mat<sup>[6]</sup>等利用易错 PCR 的方法对  $\alpha$ -MF 进行随机突变, 发现 V10D、N23K 和 A87T 可分别提高漆酶表达量 2 倍、2 倍和 5 倍。

毕赤酵母外源表达系统主要应用的信号肽为酿

基金项目: 福建省产业化关键技术项目 (闽财指 [2010] 358 号)

\* 通信作者。Tel: +86-591-22868212; Fax: +86-591-22868212; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

作者简介: 石艺平 (1987-), 女, 福建平和人, 硕士研究生, 主要从事酶工程相关研究。E-mail: yplingshi@163.com

收稿日期: 2014-03-03; 修回日期: 2014-05-19

酒酵母的  $\alpha$ -MF, 将酿酒酵母  $\alpha$ -MF 做定点突变后, 能使外源蛋白表达量至少提高 50%<sup>[7]</sup>。而随着毕赤酵母 X33 蛋白质组的研究深入, 利用二维胶 (2D gel) 分析<sup>[8]</sup>, 发现一些毕赤酵母自身的分泌蛋白 (多为细胞壁组成成分) 也有较强的分泌能力。并且推测来源于自身的信号肽更加有利于宿主识别系统的辨识, 从而有利于外源蛋白的分泌。De Schutter 等<sup>[9]</sup> 对毕赤酵母 GS115 的基因组序列进行研究, 提

高工程菌株在生物科技领域的应用水平。而目前对于毕赤酵母自身信号肽的研究还处于起步阶段, 相对系统的研究还较为少见。本实验选择了 7 个二维胶中条带较明显并且与酵母细胞壁合成有关的蛋白的信号肽加以研究 (表 1), 同时以糙皮侧耳漆酶自身信号肽、 $\alpha$ -MF 为对照, 研究不同信号对漆酶 POXA1c 分泌的影响。

表 1.7 种毕赤酵母 X-33 自身分泌蛋白基本信息

Table 1. Essential information of secretory protein from *P. pastoris* X-33

No.	<i>P. pastoris</i> ' ORF	homologous	function of protein	MW/pI
1a	gi 254564921	SCW10	Cell wall protein with similarity to glucanases	35.8/4.9
4a	gi 254568502	EXG1	Major exo-1,3-beta-glucanase of the cell wall, involved in cell wall beta-glucan assembly	47.8/4.53
5	gi 254567221	FLO10	Lectin-like protein with similarity to Flo1p, thought to be expressed and involved in flocculation	51.2/4.36
10a	gi 254566893	BGL2	Endo-beta-1,3-glucanase, major protein of the cell wall, involved in cell wall maintenance	33.9/4.07pr
11	gi 254570078	SIM1	Protein of the SUN family	44.9/4.37
33	gi 254567898	DAN4	Hypothetical protein	182/4.03
38	gi 254567750	PHO5	One of three repressible acid phosphatases, a glycoprotein that is transported to the cell surface	52.7/4.41

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:** 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) X-33、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 的 cDNA (本实验室保存), 表达载体 pGAPZ $\alpha$ A、pGAPZA 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.2 试剂耗材:** Q5 DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Eco*R I、*Not* I、*Avr* II、T4 DNA 连接酶、蛋白 Maker 购自 NEB 公司, mix-Tag DNA 聚合酶、DNA 染料 Gold view、DNA Maker 购自奥赛博公司, dNTP 购自 Thermo scientific 公司, 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, Bicine、乙二醇、二甲基亚砜 (DMSO)、山梨醇、二硫苏糖醇 (DTT)、考马斯亮蓝 (G-250)、氯化钙、氯化钾、2,2'-氨基二 (3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6) 铵盐 (ABTS) 购自 SIGMA 公司, 博来霉素 (Zeocin) 购自 Invitrogen 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基:** LB 培养基 (g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10。YPD 培养基 (g/L): 酵母提取

物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。YPS 培养基 (g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 山梨醇 5。YPDS 培养基 (g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 山梨醇 1。BSM 基础盐发酵培养基: 85% 磷酸 26.7 mL/L, 二水合硫酸钙 0.93 g/L, 硫酸钾 18.2 g/L, 二水合 14.9 g/L, 氢氧化钾 4.13 g/L, 甘油 40 g/L, PTM1 4.0 mL/L。

### 1.2 载体构建

根据基因序列 POXA1b (gi|78192166), 将 7 个信号肽分别与基因 *poxa1c* (与基因序列 POXA1b 有 98.3% 的同源性) 成熟蛋白的碱基序列组合设计引物, 另外将信号肽 FLO10 和 PHO5 分别与酿酒酵母  $\alpha$ -MF 的导肽序列 ( $\alpha$ pro) 相结合构成信号肽 FLO10- $\alpha$ pro 和 PHO5- $\alpha$ pro, 对照组的引物不加信号肽包括 POXA1cN 及  $\alpha$ -MF, 反向引物均为 *poxa1c*-R (表 2)。分别扩增出基因 SCW10-*poxa1c*、EXG1-*poxa1c*、BGL2-*poxa1c*、SIM1-*poxa1c*、DAN4-*poxa1c*、FLO10-*poxa1c*、PHO5-*poxa1c*、FLO10- $\alpha$ pro-*poxa1c*、PHO5- $\alpha$ pro-*poxa1c*、Native signal-*poxa1c*。将上述片段及载体 pGAPZ $\alpha$ A、pGAPZA 用 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切, 纯化回收后进行连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。

表 2. 实验中所用的引物序列

Table 2. The primers sequence used for experiment

primer name	primer sequence (5'→3')
SCW10-F	CGGAATTCATGCAAGTTAAATCTATCGTTAACCTACTGTTGGCATGTTCTGTTGGCCGTGGCCAGACCTTTGAGCATTGGGCC CCGCGGAACGCTGAAC
EXG1-F	CGGAATTCATGAACTTGTACCTAATTACATTACTATTGCCAGTCTATGCAGCGCAATTACTCTCAGCATTGGGCCCGCGG GAACGCTGAAC
SIM1-F	CGGAATTCATGAAAGATATCCGCTCTTACAGCCTGCGCTGTACTCTAGCTGGTCTTGAATTGCAGCACCAGCTAGCATTG GGCCCCGCGGAACGCTGAAC
DAN4-F	CGGAATTCATGTTCTCTCAAAAGTCTCCTTAGTTTTGCGTCTATCCTAACGCTTTGCAAGGCTGGGATCTGAGCATTGGGCC CCGCGGAACGCTGAAC
FL010-F	CGGAATTCATGTTGAGAAGAGTAAATTTGTGTTTCTGTTTCTGCTTTTACTGCAGCTATTTGTCTTGGTGTACATGGA CAAGAAAAGTAGCATTGGGCCCGCGGAACGCTGAAC
PH05-F	CGGAATTCATGTTTTCTCTATTCTAAGTCTGGAAATTATTCTCGCTTTGGCTACTCTCCAATCAGTCTTTCGGTTGAGTTG AGCATTGGGCCCGCGGAACGCTGAAC
FL010- $\alpha$ pro-F	CGGAATTCATGTTGAGAAGAGTAAATTTGTGTTTCTGTTTCTGCTTTTACTGCAGCTATTTGTCTTGGTGTACATGGA CAAGAAAAGTCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG
PH05- $\alpha$ pro-F	CGGAATTCATGTTTTCTCTATTCTAAGTCTGGAAATTATTCTCGCTTTGGCTACTCTCCAATCAGTCTTTCGGTTGAGTTG GCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG
a-MF	CGGAATTCAGCATTGGGCCCGCGGAACGCTGAAC
POXA1cN	GGGAATTCATGGCGTTGCATTGCTTGGCGCTTG
poxa1c-R	ATAAGAATGCGGCCCTCATGCTTTCAATGGCGCAGGCAGAC

Expect a-MF, POXA1cN and poxa1c-R, italicized letters is enzyme site.

大肠杆菌感受态细胞的制备、转化子筛选、质粒提取及酶切分析等均参照文献<sup>[10]</sup>进行。从 Zeocin 抗性平板挑取单克隆做菌落 PCR 验证,再将克隆接种于 Zeocin 抗性的 LB 培养基中,待菌液达到一定浓度后提取质粒,用 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切验证。将两种验证均为阳性的送北京博尚生物技术公司测序。

### 1.3 酵母转化子的筛选与鉴定

制备毕赤酵母 X-33 感受态及电击转化实验参照文献<sup>[11-12]</sup>,重组表达载体用 *Avr II* 限制性内切酶进行线性化,电击转化毕赤酵母 X-33 感受态,孵育后涂布于含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 和 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ABTS 的 YPD 平板上。能在抗性平板上生长,并且使漆酶作用底物 ABTS 显紫色的菌落即为阳性克隆。

### 1.4 漆酶在毕赤酵母中的表达

挑取阳性单克隆经试管活化后,用摇瓶发酵培养,检测酶活力,漆酶酶活的测定参照文献<sup>[13]</sup>,酶活力测定的反应体系为:0.1 mol/L pH4.5 的磷酸二氢钾-柠檬酸缓冲液 270  $\mu\text{L}$ , 20 mmol/L 的 ABTS 母液 30  $\mu\text{L}$ , 粗酶液(发酵液经 10000  $\times$  g, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min 后的上清液)适当稀释 10-100 倍,加 1  $\mu\text{L}$  于反应体系中,混合均匀后在室温下反应 1 min,用分光光度计在 420 nm 处测定其反应前后吸光值的差值  $\Delta A$ ,同时事先灭活的粗酶液为对照,根据公式(1)计算出酶活力,1 个酶活力单位(U)定义为:在室温

条件下每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  底物 ABTS 所需的酶量。每一样品平行 3 份进行测定,取值为标准偏差小于 5% 的数据的平均值,筛选到酶活较高的样品进行 SDS-PAGE 分析。

酶活力(U/mL) =  $\Delta A \times$  稀释倍数  $\times$  反应体系体积(mL) /  $\epsilon$  公式(1)

$\Delta A$ : A420nm 条件下的吸光值的差值,  $\epsilon$ : ABTS 消光系数,  $\epsilon_{420} = 36000$  (mol/L)<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>。

### 1.5 漆酶高密度发酵

将筛选的单克隆接到 YPD 培养基中,培养约 24 h,转接到装液量为 2 L 的 5 L 发酵罐中,接种量为 10% (V/V)。50% 葡萄糖(内含 50 mL 营养盐)补料流加培养,发酵 pH 通过 30% 的氨水控制在 5.0-6.0,发酵温度 28  $\pm$  2 $^{\circ}\text{C}$ ,搅拌速率为 500-700 r/min,通气量为 1:0.5-1:2.5 V/(V $\cdot$ min),溶氧控制在 30% 左右。大约 24 h 后培养基中的碳源耗尽,开始补料,同时向发酵液中加入终浓度 0.6 mmol/L 的 CuSO<sub>4</sub>,并且每 24 h 补加 1 次 1% 无水乙醇。定期取样,测 OD<sub>600</sub>,每隔 10 h 取 1 次样品,检测酶活力。培养 72 h 后用冷冻离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5000  $\times$  g 离心 10 min,收集发酵液备用。

### 1.6 胞内漆酶活力的测定

将酶活最高对应时间点的细胞,取相同的细胞,用预冷的 PBS 重悬,4 $^{\circ}\text{C}$ , 5000  $\times$  g 离心,弃上清,重

复 2 次尽量去除杂质。细胞用预冷的裂解液 (50 mmol/L PBS pH6.0) 重悬, 加入酸性玻璃珠振荡破碎, 4℃, 10000 × g 离心, 收集上清, 根据 1.4 的方法检测酶活。

## 2 结果

### 2.1 信号肽序列分析

将所选的 7 种毕赤酵母 X-33 自身分泌的蛋白序列 (表 1) 利用在线分析软件 signal P 4.0<sup>[14]</sup> 对信号肽序列进行分析, 经预测, 确定各个蛋白的信号肽序列。根据文献所述, 信号肽后的氨基酸序列会影响信号肽酶对信号肽切割的效率<sup>[15]</sup>, 所以设计时保留信号肽自身蛋白的 3 个氨基酸残基, 以防止外源蛋白的氨基酸序列影响信号肽切割位点的正常识别与切割。截取的信号肽序列及保留的自身成熟蛋白氨基酸残基如 (表 3) 所示。

表 3. 信号肽序列及保留氨基酸残基

Table 3. Signal peptide sequence and preservation of amino acid residue

name	sequence of signal peptide	amino acid residue
SCW10	MQVKSIVNLLLACSLAVA	/RPL
EXG1	MNLYLITLLFASLCSA	/ITL
FLO10	MFEKSKFVVSFLLLLQLFCVGLGVHG	/QES
BGL2	MIFNLKTLAAVAISQVSA	/VSS
SIM1	MKISALTACAVTLAAGLAIA	/APA
DAN4	MFLKSLLSFASILTCKA	/WDL
PHO5	MFSPILSLEIHLALATLQSVFA	/VEL

### 2.2 不同信号肽引导下漆酶的活力

挑取筛选的阳性克隆, 以 POXA1c 自身信号肽的菌株 Native signal/poxa1c 及酿酒酵母  $\alpha$ -MF 肽的菌株  $\alpha$ -MF signal/poxa1c 为对照, 菌株经试管活化后, 用摇瓶发酵培养, 检测酶活力。如 (图 1) 所示,

表 4. 组合信号肽的氨基酸序列

Table 4. Recombination signal peptide sequence

name	signal sequence	propeptide sequence
$\alpha$ pro	MRFPSIFTAV LFAASSALA	APVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEGDFDV
FLO- $\alpha$ pro	MFEKSKFVVSFLLLLQLFCVGLGVHG/QES	APVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEGDFDV...
PHO- $\alpha$ pro	MFSPILSLEIHLALATLQSVFA/VEL	APVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEGDFDV...

组合信号肽明显提高漆酶的酶活, 图 2 所示, POXA1c 在信号肽 FLO10- $\alpha$ pro 和 PHO- $\alpha$ pro 引导下菌株酶活力分别为自身信号肽引导下的 3 倍和 3.5 倍, 分别比在  $\alpha$ -MF 引导下提高了 20% 和 40%。

毕赤酵母 PHO5 和 FLO10 信号肽, 比漆酶自身信号肽高, 其引导下的菌株酶活力分别是自身信号肽引导下的 2.5 倍和 2 倍。漆酶在毕赤酵母 SCW10、EXG1 和 BGL2 蛋白信号肽引导下菌株酶活力与漆酶自身信号肽引导下的活力差异不大, 而 DAN4 蛋白信号肽引导下酶活力较漆酶自身信号肽引导下低。

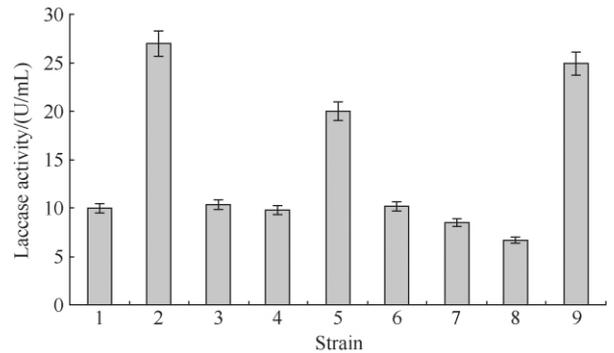


图 1 不同信号肽引导下 POXA1c 的酶活力

Figure 1. Activity of POXA1c with different signal peptide. 1: Native signal/poxa1c; 2:  $\alpha$ -MF signal/poxa1c; 3: *P. pastoris*SCW10signal/poxa1c; 4: *P. pastoris*EXG1 signal/poxa1c; 5: *P. pastoris*FLO10 signal/poxa1c; 6: *P. pastoris*BGL2 signal/poxa1c; 7: *P. pastoris*SIM1 signal/poxa1c; 8: *P. pastoris*DAN4 signal/poxa1c; 9: *P. pastoris*PHO5 signal/poxa1c.

### 2.3 组合信号肽引导下漆酶的活力

根据 2.2 的结果分析表明, 酿酒酵母  $\alpha$ -MF 对 POXA1c 表达效果相对较好, 原因可能是与其信号肽后的导肽上有 3 个糖基化位点有关, 其存在有利于辅助蛋白的折叠与糖基化, 因而设计将  $\alpha$ -MF 上的导肽序列 ( $\alpha$ pro) 分别与筛选得到的两个毕赤酵母信号肽 FLO10 和 PHO5 结合, 构成 FLO- $\alpha$ pro 和 PHO- $\alpha$ pro 两种组合信号肽 (表 4)。

### 2.4 毕赤酵母中漆酶表达水平

将 2.2 中得到的菌株 *P. pastoris*FLO10 signal/poxa1c、*P. pastoris*PHO5 signal/poxa1c 和 2.3 中得到的菌株 *P. pastoris*FLO10- $\alpha$ pro signal/poxa1c、*P.*

*pastoris*PHO5- $\alpha$ pro signal/poxa1c, 以及对对照菌株 Native signal/poxa1c、 $\alpha$ -MF signal/poxa1c 经试管发酵和诱导后,取相同体积的上清进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色后,漆酶的条带如图 3,约 67 kDa。

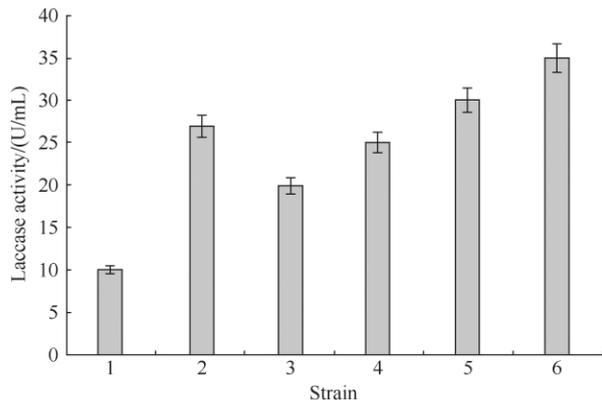


图 2. 不同信号肽引导下 POXA1c 的酶活力

Figure 2. Activity of POXA1c with different signal peptide. 1: Native signal/poxa1c; 2:  $\alpha$ -MF signal/poxa1c; 3: *P. pastoris*FLO10 signal/poxa1c; 4: *P. pastoris*PHO5 signal/poxa1c; 5: *P. pastoris*FLO10- $\alpha$ pro signal/poxa1c; 6: *P. pastoris*PHO5- $\alpha$ pro signal/poxa1c.

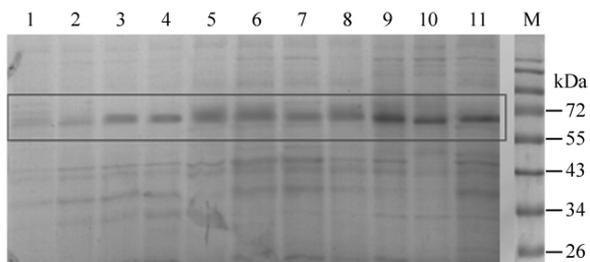


图 3. 不同信号肽引导下漆酶的 SDS-PAGE 电泳

Figure 3. SDS-PAGE of laccase under the leading of different signal peptides sequence. Lane 1 - 2: Native signal/poxa1c; lane 3 - 4:  $\alpha$ -MF signal/poxa1c; lane 5 - 6: *P. pastoris* FLO signal/poxa1c; lane 7 - 8: *P. pastoris* PHO signal/poxa1c; lane 9 - 10: *P. Pastoris*FLO- $\alpha$  pro signal/poxa1c; lane 11: *P. pastoris*PHO- $\alpha$  pro signal/poxa1c.

## 2.5 漆酶高密度发酵结果及胞内外酶活力分析

根据上述实验结果,选择酶活力最高的菌株 *P. Pastoris*PHO5- $\alpha$ pro signal/poxa1c 及对对照菌株  $\alpha$ -MF signal/poxa1c 做高密度发酵,绘制菌株生长曲线和酶活曲线,如图 4 所示,菌体长势良好,当发酵时间为 70 h,生物量最高。PHO5- $\alpha$ pro 对应的菌株生物量比  $\alpha$ -MF 低,除发酵时间为 50 h 外。发酵过程整体的酶活略高于摇瓶发酵的结果,但是发酵的实验结果和摇瓶的实验结果是一致的,

PHO5- $\alpha$ pro 信号肽引导下的活力要比  $\alpha$ -MF 信号肽高 40% (图 4)。

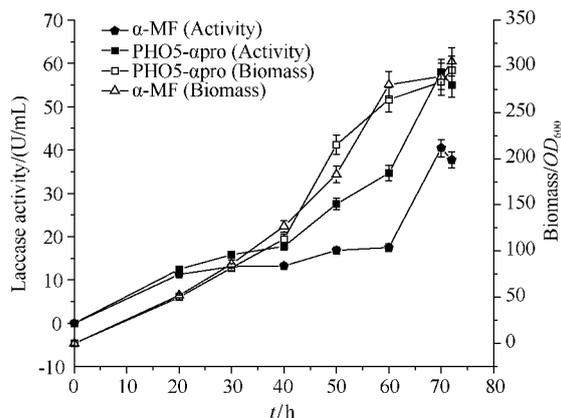


图 4. 不同发酵时间段胞外漆酶活力及菌株高密度发酵生长曲线

Figure 4. The laccase activity from different time of fermentation and growth curve of strain.

在细胞内,漆酶的酶活极低,推测这可能是由于分泌能力好的信号肽可以很快的将漆酶分泌到胞外,避免了胞内蛋白酶的降解。而分泌能力差的信号肽,使蛋白滞留在胞内,被蛋白酶降解,所以也检测不到很高的酶活力(表 5)。

表 5. 漆酶胞内外酶活比较

Table 5. Comparison of extracellular and intracellular laccase activity

strain	extracellular	intracellular
$\alpha$ -MF signal/poxa1c	40.45	0.07
<i>P. Pastoris</i> PHO- $\alpha$ pro signal/poxa1c	57.98	0.08

## 3 讨论

毕赤酵母表达系统是一种广泛应用的外源蛋白表达系统,其具有以下优点:生长速度快,对营养的要求不高,成本低,易于培养,有利于工业化生产;胞内含有过氧化物酶体(peroxisome)的细胞器,该细胞器能够大量合成并储存过氧化物酶,使外源基因免受蛋白酶的降解,减少蛋白的损失;能够对蛋白进行翻译后修饰加工(如形成二硫键,信号序列加工、折叠,蛋白糖基化等),使表达的蛋白具有生物学活性;分泌效率较好,表达量高,表达菌株稳定;其自身分泌的蛋白较少,有利于产物蛋白的纯化;同源重组

后的重组子遗传稳定性好, 外源基因能够稳定存在。本研究选择毕赤酵母表达系统表达的漆酶, 具有糖基化修饰, 理论蛋白大小是 55 kDa, 经过糖基化修饰后, 蛋白大小为 67 kDa。

信号肽被广泛应用于原核表达系统和真核表达系统中, 而应用于毕赤酵母表达系统的信号肽主要有:  $\alpha$ -MF、INU、PHO1 等。本研究采用毕赤酵母自身分泌蛋白的信号肽分别单独引导表达漆酶, 发现毕赤酵母中内源蛋白的信号肽能提高漆酶的酶活力, 与漆酶自身信号肽相比, 其中 PHO5 引导下的漆酶酶活力最高, FLO 次之, SCW10、EXG1 和 BGL2 蛋白信号肽引导下的漆酶活力也有所提高, 而 DAN4 蛋白信号肽引导下的漆酶活力有所降低。毕赤酵母信号肽 PHO5 是一种酸性磷酸酶, 被转运到细胞表面的糖蛋白; 而 FLO10 是与 Flo1p 相似的外源凝集素蛋白, 与絮凝有关; 另外 SCW10、EXG1、BGL2 及 DAN4 均是细胞壁蛋白<sup>[8]</sup>。接下来将用 PHO5 及 FLO10 这两个信号肽引导其他蛋白表达, 确定它们对其他蛋白表达是否也起作用。

$\alpha$ -MF 信号肽后的导肽上存在糖基化位点, 本研究中保留  $\alpha$ -MF 信号肽的导肽序列, 然后分别与 FLO10 及 PHO5 信号肽构成两个组合信号肽: PHO5- $\alpha$ pro 和 FLO10- $\alpha$ pro。利用组合信号肽引导漆酶表达, 对应漆酶的分泌量比对照组 (漆酶 POXA1c 自身信号肽、 $\alpha$ -MF、FLO10、PHO5) 高。从漆酶 SDS-PAGE 电泳图谱上可以看出, 漆酶表达量高的菌株对应的酶活也比较高, 说明所表达的漆酶在翻译后得到正确修饰, 并且在信号肽的引导下分泌到胞外。因此, 适当改造信号肽是提高外源基因表达的另一个重要手段。

发酵罐的生物量要远高于摇瓶, 本应发酵罐的活力更高才对, 推测这可能是由于发酵和摇瓶所采用的培养基不同所致, 还有可能是流加的葡萄糖过快所致, 待进一步的优化。细胞内几乎检测不到酶活, 可能与胞内的酶降解有关。

## 参考文献

[1] Zhang Y, Teng D, Mao R, Wang X, Xi D, Hu X, Wang J. High expression of a plectasin-derived peptide NZ2114 in *Pichia pastoris* and its pharmacodynamics, postantibiotic and synergy against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (2) :

681-94.

- [2] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74 (2) : 381-389.
- [3] Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 2005, 31 (3) : 245-259.
- [4] Oka C, Tanaka M, Muraki M, Harata K, Suzuki K, Jigami Y. Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63 (11) : 1977-1983.
- [5] Murasugi A, Tohma-Aiba Y. Comparison of three signals for secretory expression of recombinant human midkine in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65 (10) : 2291-2293.
- [6] Maté D, García-Burgos C, García-Ruiz E, Ballesteros AO, Camarero S, Alcalde M. Laboratory evolution of high-redox potential laccases. *Chemistry & Biology*, 2010, 17 (9) : 1030-1041.
- [7] Calera JA, Paris S, Monod M, Hamilton AJ, Debeaupuis J-P, Diaquin M, Lopez-Medrano R, Leal F, Latgé JP. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 1997, 65 (11) : 4718-4724.
- [8] Huang CJ, Damasceno LM, Anderson KA, Zhang S, Old LJ, Batt CA. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90 (1) : 235-247.
- [9] De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 2009, 27 (6) : 561-566.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 2004, 36 (1) : 152-155.
- [12] Lin-Cereghino J, Wong WW, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the

- methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques*, 2005, 38 (1) : 44-48.
- [13] Johannes C, Majcherzyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 2000, 78 (2) : 193-199.
- [14] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011, 8 (10) : 785-786.
- [15] Kjeldsen T, Pettersson AF, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29 (1) : 79-86.

## Effect of signal peptides on the expression of laccase in *Pichia pastoris*

Yiping Shi<sup>1</sup>, Xue Zhou<sup>3</sup>, Meirong Hu<sup>2</sup>, Jianhui Lin<sup>1</sup>, Yong Tao<sup>2</sup>, Jianzhong Huang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>3</sup>Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] Expression level of laccase POXA1c would be increased by screening effective signal peptide in *Pichia pastoris*. [Methods] According to 2D-gel and profile of *P. pastoris* genome sequence, seven signal peptides from high secreted endogenous proteins of *P. pastoris* X-33 were chosen to evaluate their secreted ability by using POXA1c as reporter protein. [Results] Compared with POXA1c's native signal peptide, the signal peptide of repressible acid phosphatases PHO5 and lectin-like protein FLO10 showed 2.5-fold and 2-fold increase of laccase activity. Furthermore, PHO5- $\alpha$ pro and FLO10- $\alpha$ pro were constructed by fusing signal peptide of PHO5 and FLO10 with pro-peptide of  $\alpha$ -MF respectively. The laccase activity under the leading of FLO10- $\alpha$ pro and PHO5- $\alpha$ pro showed 3-fold and 3.5-fold laccase activity higher than native signal peptide, and showed 20% and 40% increase compared with *saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -MF signal respectively. [Conclusion] Signal peptides from high secreted endogenous proteins of *P. pastoris* X-33 could be effectively used to lead laccase expression in *P. pastoris*. The activity of POXA1c under the leading of the PHO5- $\alpha$ pro signal peptide was 57.98 U/mL after high density fermentation.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, signal peptide, laccase

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Industrialization of Key Technology Item of Fujian Province( [2010] 358)

\* Corresponding author. Tel: +86-591-22868212; Fax: +86-591-22868212; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

Received: 3 March 2014 /Revised: 19 May 2014