

• 生物技术与方法 •

一种增加毕赤酵母生产胰岛素前体的方法

梁晨晨^{1,2}, 王立^{1,2}, 罗秋玲², 吴静¹

1 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

梁晨晨, 王立, 罗秋玲, 等. 一种增加毕赤酵母生产胰岛素前体的方法. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1178–1189.

Liang CC, Wang L, Luo QL, et al. A method to increase the production of insulin precursor in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1178–1189.

摘要: 为了提高胰岛素前体 (PI) 的产量, 构建了 pPIC9K-PI 表达载体并电转化至毕赤酵母菌株 GS115 中, 在浓度为 4.0 mg/mL 的 G418 抗性平板上筛选到了 1 株拷贝数为 12 的菌株 CL012。将 SNAREs (可溶性 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子受体蛋白) 组分中的 SNC2 和 SNC2-SSO2 分别转入菌株 CL012 中, 并在摇瓶和 5 L 发酵罐水平上检测 SNAREs 对 PI 产量的影响。结果表明: 摇瓶水平上, 甲醇诱导 96 h 后, 菌株 CL012 的 PI 产量为 1.53 mg/L; 表达 SNC2 和 SNC2-SSO2 的菌株的 PI 产量分别为 1.89 mg/L 和 2.21 mg/L, 分别比菌株 CL012 提高了 23.53% 和 44.44%。在 5 L 发酵罐上进行高密度发酵, 甲醇诱导 96 h 后菌株 CL012 的 PI 产量为 53 mg/L, 是摇瓶水平的 34.64 倍; 表达 SNC2 和 SNC2-SSO2 的菌株的 PI 产量分别达到 64 mg/L 和 78 mg/L, 分别比菌株 CL012 提高了 20.75% 和 47.17%。由此得出结论 SNAREs 可以促进胰岛素前体的分泌, 从而提高在毕赤酵母中的异源表达。

关键词: 毕赤酵母, 胰岛素前体, SNAREs, 异源表达

Received: January 11, 2017; **Accepted:** March 24, 2017

Supported by: Key Technologies R&D Program of Jiangsu Province (No. BE2014652), National Natural Science Foundation of China (No. 21576117), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Nos. BE2015307, BK20131103).

Corresponding author: Jing Wu. Tel: +86-510-85197873; E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2014652), 国家自然科学基金 (No. 21576117), 江苏省自然科学基金 (Nos. BE2015307, BK20131103) 资助。

A method to increase the production of insulin precursor in *Pichia pastoris*

Chenchen Liang^{1,2}, Li Wang^{1,2}, Qiuling Luo², and Jing Wu¹

¹ College of Pharmacy, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: To improve the yield of insulin precursor (PI), we constructed a recombinant expression vector pPIC9K-PI and transformed it into *Pichia pastoris* GS115 using electroporation. After screening, a mutant strain CL012 with 12 copies was obtained on the YPDS plate containing 4.0 mg/mL G418. Then, the components of SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor proteins), SNC2 and SNC2-SSO2, were expressed in the strain CL012 to explore the effect of SNAREs on the yield of PI. In shake flask culture, the strains expressing SNC2 and SNC2-SSO2 yielded PI of 1.89 mg/L and 2.21 mg/L after methanol induction for 96 h, which were improved by 23.53% and 44.44% compared to that of strain CL012 (1.53 mg/L), respectively. Further, in a 5-L bioreactor, the yield of PI with strain CL012 was 53 mg/L for high-density fermentation, after 96 h of methanol induction, which was 34.64-fold higher than that of shake culture. The strains expressing SNC2 and SNC2-SSO2 yielded the PI of 64 mg/L and 78 mg/L, which were respectively increased by 20.75% and 47.17%, compared to that of strain CL012. This work indicated that SNAREs components promoted the secretion of PI to improve its heterologous expression in *P. pastoris*.

Keywords: *Pichia pastoris*, insulin precursor, SNAREs, heterologous expression

作为重要蛋白表达宿主, 毕赤酵母广泛应用于不同来源(人、动物、植物、真菌和病毒)和不同类型(分泌型和非分泌型)重组蛋白的高效生产^[1-2]。但是, 并不是所有的重组蛋白都能有效地分泌, 这是因为重组蛋白的高水平表达面临着基因剂量^[3]、mRNA的转录水平、蛋白质在内质网中的加工折叠^[4]以及在胞质中的运输等诸多制约其产量的关键瓶颈。其中, 重组蛋白的分泌运输是制约其高效生产的关键因素之一。重组蛋白在毕赤酵母中的分泌过程主要包括新生蛋白从核糖体上合成后到内质网的运输、蛋白质在内质网中的折叠、蛋白质从内质网到高尔基体的运输^[5]以及蛋白从高尔基体到质膜的运输。分泌路径中的每一步都可能成为蛋白分泌的限速步骤, 从而影响目标蛋白的有效分泌。其中新生蛋白到内质网的运输分为两

种: 共翻译运输^[6]和翻译后运输^[7]; 运输到内质网的新生肽链在内质网中折叠蛋白的作用下进行折叠加工^[8]; 紧接着蛋白质从内质网运输到高尔基体进行进一步加工, 加工成熟的蛋白质离开高尔基体运输到细胞质膜。蛋白质从内质网到高尔基体以及高尔基体到细胞质膜的运输需要运输囊泡的作用^[9-11]。运输囊泡和靶膜之间的相互作用需要 SNAREs 的作用, SNAREs (可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着型蛋白受体) 是一种 II 型膜蛋白, 在运输囊泡和靶膜的膜融合过程中促使膜融合^[12], 促进蛋白的运输。

SNAREs 分为两种: 一种存在于靶膜上, 被称为 v-SNAREs; 另一种存在于运输囊泡上, 被称为 t-SNAREs。v-SNAREs 和特定靶膜上的 t-SNAREs 相互作用形成复合体 SNAREs, 称为 SNAREpin^[13]。SNAREpin 由 3 种成分组成:

Sso1/2、Sec9 和 Snc1/2。其中 SNAREs 复合体由 Snc1/2 和 Sso1/2 的各一个 α 螺旋区域和 Sec9 的两个螺旋区域组成。SNAREs 已经被确定存在于内质网膜、高尔基体膜、液泡/溶酶体、质膜以及从这些膜衍生出的运输囊泡的膜上^[14]。在促进蛋白运输的过程中,SNAREs 在不同的囊泡和质膜之间的膜融合运输中扮演着重要的角色。van Zyl 等^[15]通过过表达酿酒酵母中 SNC1 将来自埃默森篮状菌的纤维二糖水解酶的产量提高 71%,过表达 SSO1 将来自扣裹腹膜酵母的 β -葡糖苷酶的产量提高 43.8%。Xu 等^[16]发现在酿酒酵母中过表达 SSO1 可以将来自里氏木霉的纤维二糖水解酶的产量提高 10%。Gasser 等^[17]通过在毕赤酵母中过表达 SSO2 将人免疫抗体 Fab 的产量提高 20%。Hou 等^[11]发现过表达 SNAREs 蛋白的辅助蛋白 SM 蛋白中的组分 SEC1 可以使 α -淀粉酶的产量提高 16%。

除了优化毕赤酵母中高尔基体到质膜的分泌路径,人们还常常使用以下策略用来提高毕赤酵母中异源蛋白的生产,如:增加拷贝数^[18]、优化密码子^[19]、使用强启动子^[20]、选择利于分泌的信号肽^[21],以及共表达内质网中帮助新生蛋白的正确折叠的分子伴侣 PDI^[22]和 BiP^[7]等。Zhu 等^[23]通过将猪胰岛素前体基因的拷贝数增加到 12,使得猪胰岛素前体的产量提高 12.5 倍,达到 181 mg/L。Ben 等^[1]利用密码子优化的序列使得狂犬病毒糖蛋白的产量增加了 2.1 倍。Ben 等^[24]利用组成型启动子 GAP 替换 AOX1 启动子将狂犬病毒糖蛋白的产量增加了 1.22 倍。Vadhana 等^[25]利用自身信号肽代替 α 信号肽将南极假丝酵母脂肪酶 B 的产量提高了 2 倍。Shen 等^[26]在毕赤酵母中共表达 PDI 使得白细胞介素-1 受体拮抗剂 (IL1ra) 的产量增加了 2.4 倍。

Damasceno 等^[8]在毕赤酵母中共表达 BiP 使 A33 单链抗体 (A33scFv) 的产量提高了 3 倍。

本研究中为了提高胰岛素前体的产量,以胰岛素前体作为模式蛋白检测 SNAREs 对胰岛素前体从高尔基体到细胞质膜运输的作用。单独与同时共表达来自酿酒酵母的 SNAREs,增加胰岛素前体的分泌。本实验中,首先在毕赤酵母中成功表达并分泌胰岛素前体基因 (PI),然后通过整合 SNARE 组分的 SNC2 和 SSO2,提高胰岛素前体的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体

pMD19-T-simple (TaKaRa 公司); pPICZ α 载体, pPIC9K 载体,大肠杆菌 JM109,毕赤酵母 GS115,本实验室保存。pPIC6 α 载体,军事医学科学院放射与辐射医学研究所高新老师惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Sal* I、*Sac* I、*Eco*R I、*Not* I、*Asu* II、*Xba* I、*Bgl* II、DNA marker DL10000、DNA marker DL2000,购自大连宝生物工程公司;蛋白 marker、蛋白质浓度测定试剂盒、Lyticase、引物合成、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒,购自上海生工生物工程公司;博莱霉素 (Zeocin)、遗传霉素 (G418)、杀稻瘟菌素 (Blasticidin),购自 Invitrogen 公司;酵母基因组试剂盒,购自天根公司; *iTaq* Universal SYBR Green Supermix,购自 Bio-rad 公司;PCR、QPCR 扩增仪、全自动凝胶成像系统、电穿孔仪 Green Pulser、核酸电泳仪、蛋白电泳仪,购自 Bio-rad 公司;Diode Array Bio Photometer U-0080D 核酸浓度测定

仪, 购自 HITACHI 公司; 5 L 发酵罐, 购自上海保兴生物工程设备有限公司。

1.1.3 培养基

低盐 LB、YPD、YPDS、MD、BMGY、BMMY、BSM 基础盐培养基、PTM1 微量元素的组成与配置参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.2 表达载体的构建

将含胰岛素前体基因 PI 的质粒 pUC57-PI 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切连接至相同双酶切的 pPIC9K 质粒上, 转化 JM109 后, 进行菌落 PCR 验证。根据伴侣蛋白 SNC2、SSO2 基因序列设计寡核苷酸链, 合成引物 (表 1), 通过 PCR 技术利用引物 SNC2-F 和 SNC2-R、SSO2-F 和 SSO2-R 分别以酿酒酵母的基因组为模板扩增出 SNC2 和 SSO2 基因序列, 两端均分别含有 *Asu* II 和 *Xba* I 酶切位点。PCR 产物纯化后将 SNC2 和 SSO2 的成熟片段与 pMD19-T 载体连接, 转化 JM109 感受态, 涂布于含氨苄抗性的 LB 固体培养基平板, 将长出的单菌落进行 PCR 验证, 验证正确的菌株送测序, 将测序正确的菌株提取质粒后使用 *Asu* II 和 *Xba* I 双酶切后进行胶回收, 与使用同样酶切的毕赤酵母表达载体 pPICZ α 、pPIC6 α 相连接, 构建克隆载体 (α 信号肽已除) pPICZ-SNC2、pPICZ-SSO2 和 pPIC6-SSO2。

1.3 重组毕赤酵母的构建

用 *Bgl* II 线性化的表达载体 pPIC9K-PI 电转化入毕赤酵母 GS115 后, 涂布到 MD 固体平板上, 将长出的单菌落接入 YPD 培养基, 30 °C 培养至对数期, 提取酵母基因组, 以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物 (表 1), PCR 条件: 95 °C

表 1 PCR 引物序列列表

Table 1 PCR primers sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SNC2-F	GGGTTCGAAACGATGTCGTCATCAGTGC CATAAC
SNC2-R	GCTCTAGATTAGCTGAAATGGACGACGATAG
SSO2-F	GGGTTCGAAACGATGAGCAACGCTAAT CCTTATG
SSO2-R	GCTCTAGATTACTTTCTTGTTCACAAAC
PI-F	ATGAGATTTCTTCTATTTTCACTG
PI-R	TTAGTTGCAGTAGTTTTCCTCAACTG
5'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC
3'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC

2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 检测表达载体 pPIC9K-PI 是否整合进酵母基因组中。

1.4 重复电转化制备不同拷贝数的重组毕赤酵母

将 MD 平板上长出并且验证正确的菌株作为出发菌株, 进行下一轮电转化。以选出的出发菌制作酵母感受态细胞, 利用 *Sal* I 线性化的 pPIC9K-PI 对其再次电转化, 将转化的菌液涂布到含不同浓度的 G418 的 YPDS 平板上, 30 °C 倒置培养 2-5 d, G418 的浓度梯度为 1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 mg/mL, 将长出的菌落再次划线于含相同浓度 G418 的 YPDS 平板上, 并以出发菌作对照, 以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物, 验证制备的不同拷贝数的重组毕赤酵母。

1.5 定量 PCR 确定 PI 基因拷贝数

质粒的构建: 提取 X-33 菌株基因组, 以 GAP-F 和 GAP-R 为引物 (表 2) 从 X-33 基因组中扩增出 GAP 基因片段, 将扩增出的 GAP 片段连接 pMD19-simple-T 载体, 送测序, 将测序正确的 T 载体命名为 pMD19-GAP, 制作内参的

标准曲线；含有 PI 序列的表达载体 pPIC9K-PI 制作目的基因的标准曲线。

PI 基因拷贝数的测定：待测酵母菌株接种于 YPD 中，30 °C 培养至对数期，收集约 1×10^7 个细胞，先用酵母细胞壁裂解酶 (Lyticase) 进行破壁处理 30 min，再按照酵母基因组提取试剂盒说明进行操作。使用 Beacon Designer 软件设计定量 PCR 引物 (表 2)。反应体系：10 μ L 2 \times SYBR Premix Ex Taq, 1 μ L 10 μ mol/L 正向和反向引物, 2 μ L 质粒 (制作标准曲线) 或待测重组毕赤酵母基因组为模板, 6 μ L 水；反应条件：95 °C 2 min；95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。荧光信号在每个循环延伸结束时采集，扩增后，融解曲线按仪器默认程序进行，即 65–95 °C, 0.5 °C/s, 测定待测重组毕赤酵母 PI 基因的拷贝数^[27]。

1.6 含 SNAREs 毕赤酵母菌株的构建

以 Sac I 线性化表达载体 pPICZ-SNC2、pPICZ-SSO2 后电转化含 PI 拷贝数最高的毕赤酵母，分别涂布在 100 μ g/mL 的含博莱霉素的抗性平板，30 °C 倒置培养 2–5 d，将长出的菌落再次划线于含相同浓度博莱霉素的 YPDS 平板上，将长出的菌落进行基因组验证，以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物，验证含伴侣蛋白的重组毕赤酵母菌株的构建。将基因组验证正确的含 SNC2

的重组毕赤酵母菌株制作感受态，以 Sac I 线性化表达载体 pPIC6-SSO2 后电转化之，涂布在 400 μ g/mL 含杀稻瘟菌素的抗性平板上。30 °C 倒置培养 2–5 d，将长出的菌落再次划线于含相同浓度杀稻瘟菌素的 YPDS 平板上，将长出的菌落进行基因组验证，验证含两个 SNAREs 组成的 SNC2、SSO2 的重组毕赤酵母菌株的构建。

1.7 重组蛋白的诱导表达和 Tricine-SDS-PAGE 检测

将重组菌株 GS115/pPIC9K-PI 和分别整合分子伴侣的 SNC2、SSO2、SNC2-SSO2 的 GS115/pPIC9K-PI 的单菌落接种于 50 mL 生长培养基 BMGY/500 mL 三角瓶中，30 °C、200 r/min 培养 24 h；将上述生长培养基中的菌液以 4 000 r/min 离心 10 min 后弃掉上清液，用 30 mL BMMY 培养基重新悬浮菌体，加入 100% 甲醇至终浓度为 1% (V/V)，30 °C、200 r/min 培养，每隔 24 h 补加 100% 甲醇至终浓度为 1% (V/V) 进行诱导；甲醇诱导 96 h 后，12 000 r/min 离心 5 min，保留上清液，进行 Tricine-SDS-PAGE 或 RP-HPLC。

1.8 重组毕赤酵母的高密度发酵

接 1 mL 重组毕赤酵母甘油管菌液于 100 mL YPD/500 mL 三角瓶中，200 r/min、30 °C 培养 20 h；然后以 10% 接种量接入到 2 L BSM 培养

表 2 定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequence for quantitative PCR

Gene	Primer name	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)
PI	PI-F	AGCCGAAGCAGTTATTGGTTAC	92
	PI-R	ACAACAGACCGTTATTAGTGGA	
GAP	GAP -F	ATGACCGCCACTCAAAAGAC	98
	GAP -R	GCACCAGTGGAAGATGGAAT	

基/5 L 罐中进行发酵, 用 30% 的氨水维持 pH 5.5, 当甘油耗尽后, 溶氧陡然上升, 开始流加甘油 (控制溶氧大于 10%), 6 h 后停止, 待甘油再次耗尽并饥饿菌体 2 h 后, 开始流加甲醇, 并通过调节其流速维持培养基中的甲醇浓度在 2 g/L^[28]。

胰岛素前体浓度的测定: 发酵液于 12 000×g 离心 10 min, 保留上清液, 将上清用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后, 利用液相进行分析。使用 Dionex UltiMate 3000 system, 色谱柱为 Vydac Grace C18 (4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 柱温 30 °C, 检测波长 214 nm, 进样量 20 μL, 采用梯度洗脱进行分析, 流动相 A 为 0.1% TFA 水, B 为 0.1% TFA 乙腈, 梯度为 20%–35% B (0–30 min), 35%–70% B (30–35 min), 70%–20% B (35–36 min), 20%–20% B (36–46 min)。

2 结果与分析

2.1 多拷贝重组毕赤酵母菌株的构建和表达

用 *Bgl* II 线性化表达载体 pPIC9K-PI 后电转化毕赤酵母 GS115, 涂布到 MD 平板上, 将 MD 平板上长出并且验证正确的菌株作为出发菌株, 进行下一轮电转化: 以选出的出发菌株制作酵母感受态细胞, 利用 *Sal* I 线性化的 pPIC9K-PI 对其再次电转化, 转化液涂布到含有 1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 mg/mL G418 的 YPDS 固体平板上 (图 1A)。将不同浓度 G418 平板上筛选出的突变株进行基因组 PCR 验证, 验证结果发现所有的菌株都可以扩增出 2.2 kb (醇氧化酶基因) 和 927 bp (表达载体上目的片段) 的片段 (图 1B)。GAP (3'-磷酸甘油醛脱氢酶基因) 在酵母基因组中拷贝数为 1, 通过计算待测重组毕赤酵母基因组中目的基因总拷贝数与 GAP 总

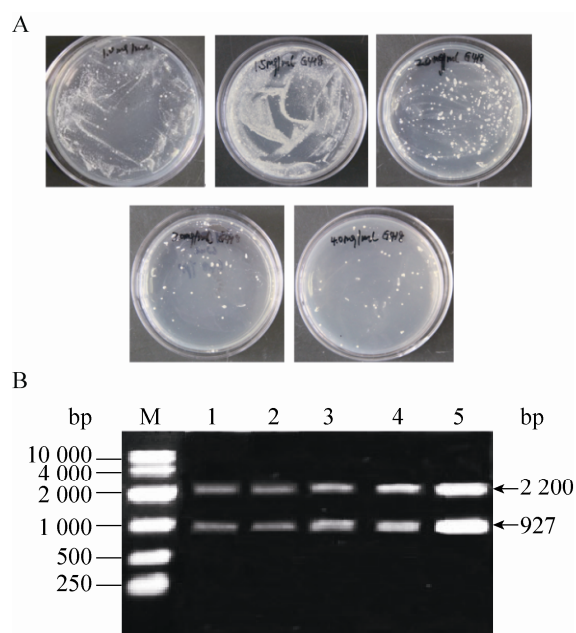


图 1 多拷贝重组毕赤酵母的构建

Fig. 1 Construction of multi-copy recombinant yeast. (A) The selection of transformants on YPDS plate containing 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 mg/mL G418. (B) Confirmation of recombinant yeast; M: DNA DL10000 marker; lane 1–5 represent transformant on 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 mg/mL G418 YPDS plate respectively.

拷贝数的比值, 确定出目的基因的拷贝数。对 pMD19-GAP 和表达载体 pPIC9K-PI 进行系列稀释, 从而获得目的基因 PI 和内参基因 GAP 的标准曲线。然后将从 1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 mg/mL G418 平板上筛选获得的突变菌株进行拷贝数测定, 测定的拷贝数分别为 2、3、6、7、12, 将对应的菌株分别命名为 CL002、CL003、CL006、CL007 和 CL012 (表 3)。进一步将 5 株菌株分别进行甲醇诱导表达, 胞外上清进行 Tricine-SDS-PAGE 分析 (图 2), 结果表明在 6.7 kDa 处有一明显条带, 其中菌株 CL012 的条带最为明显。

2.2 含 SNAREs 重组毕赤酵母菌株的构建

将 *Sac* I 线性化的表达载体 pPICZ-SSO2、

表 3 不同浓度 G418 平板上筛选出的菌株 PI 基因拷贝数的测定

Table 3 Copy number determination of each strain on different concentration G418 plates

G418 (mg/mL)	Strain	Log (PI)	PI	Log (GAP)	GAP	PI/GAP	Copy number
1.0	CL002	7.22	1.65×10^7	6.86	7.24×10^6	2.27	2
1.5	CL003	7.27	1.86×10^7	6.80	6.31×10^6	2.94	3
2.0	CL006	7.19	1.55×10^7	6.38	2.40×10^6	6.45	6
3.0	CL007	7.77	5.88×10^7	6.94	8.71×10^6	6.75	7
4.0	CL012	8.00	1.00×10^8	6.92	8.32×10^6	12.02	12

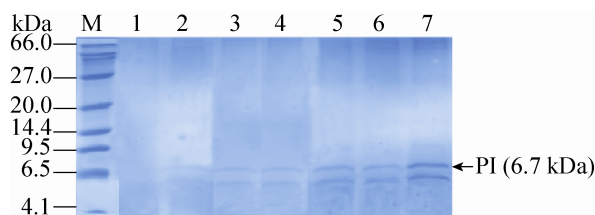


图 2 不同拷贝数重组蛋白 PI 表达上清的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE analysis of the effect of copy number on recombinant protein PI. M: protein marker; 1: control; 2: GS115/pPIC9K; 3: CL002; 4: CL003; 5: CL006; 6: CL007; 7: CL0012.

pPICZ-SNC2 电转化毕赤酵母 CL012, 涂布在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的含博来霉素的抗性平板上, 将长出的菌落进行基因组验证, 将验证正确的菌株分别命名为 CL0121 和 CL0122。以 *Sac I* 线性化表达载体 pPIC6-SSO2 后电转化毕赤酵母 CL0122, 涂布在 400 $\mu\text{g/mL}$ 的含杀稻瘟菌素的抗性平板上, 将长出的菌落进行基因组验证, 将验证正确的菌株命名为 CL0123。表达载体的构建过程如图 3A 所示。以 5'AOX1 和 3'AOX1 为引物进行基因组验证 (图 3B), 结果表明: 菌株 CL0121、CL0122 和 CL0123 中都含有大小为 2.2 kb (醇氧化酶基因) 和 927 bp (表达载体 pPIC9K-PI 上的目的片段) 的片段, 由于毕赤酵母表达载体 pPICZ α /pPIC6 α 自身可以扩增出 588 bp (醇氧化酶基因) 大小的片段, 而

pPICZ α /pPIC6 α 中信号肽的大小为 266 bp 且已经被切除, 所以 pPICZ α /pPIC6 α 应该扩增出 322 bp 大小的片段, 由于 SNC2 片段大小为 348 bp, SSO2 的大小为 888 bp, 所以表达载体 pPICZ-SNC2、pPICZ-SSO2 和 pPIC6-SSO2 扩增出的大小分别为 670 bp、1 210 bp 和 1 210 bp 的片段。

2.3 摇瓶水平检测 SNAREs 对 PI 表达的影响

将菌株 CL012、CL0121、CL0122 和 CL0123 经甲醇诱导 96 h 后, 保留上清液, 进行 Tricine-SDS-PAGE (图 4A) 和 RP-HPLC。其中 CL012 菌株作为对照菌株, 发现对照菌株 CL012 的产量为 1.53 mg/L, 菌株 CL0121、CL0122 和 CL0123 的产量分别为 1.58 mg/L、1.89 mg/L 和 2.21 mg/L, 比对照菌株 CL012 提高了 3.27%、23.53% 和 44.44% (图 4B)。菌株 CL012 的生产能力为 0.015 mg/(L·h), CL0121、CL0122 和 CL0123 的生产能力分别为 0.016 mg/(L·h)、0.019 mg/(L·h) 和 0.023 mg/(L·h) (图 4C), 比对照菌株 CL012 提高了 6.67%、26.67% 和 53.33%。

2.4 高密度发酵水平检测 SNAREs 对 PI 表达的影响

选取重组毕赤酵母 CL012、CL0121、CL0122 和 CL0123 在 5 L 发酵罐上以甘油为碳源进行分批补料发酵, 20 h 甘油耗尽, 继续流

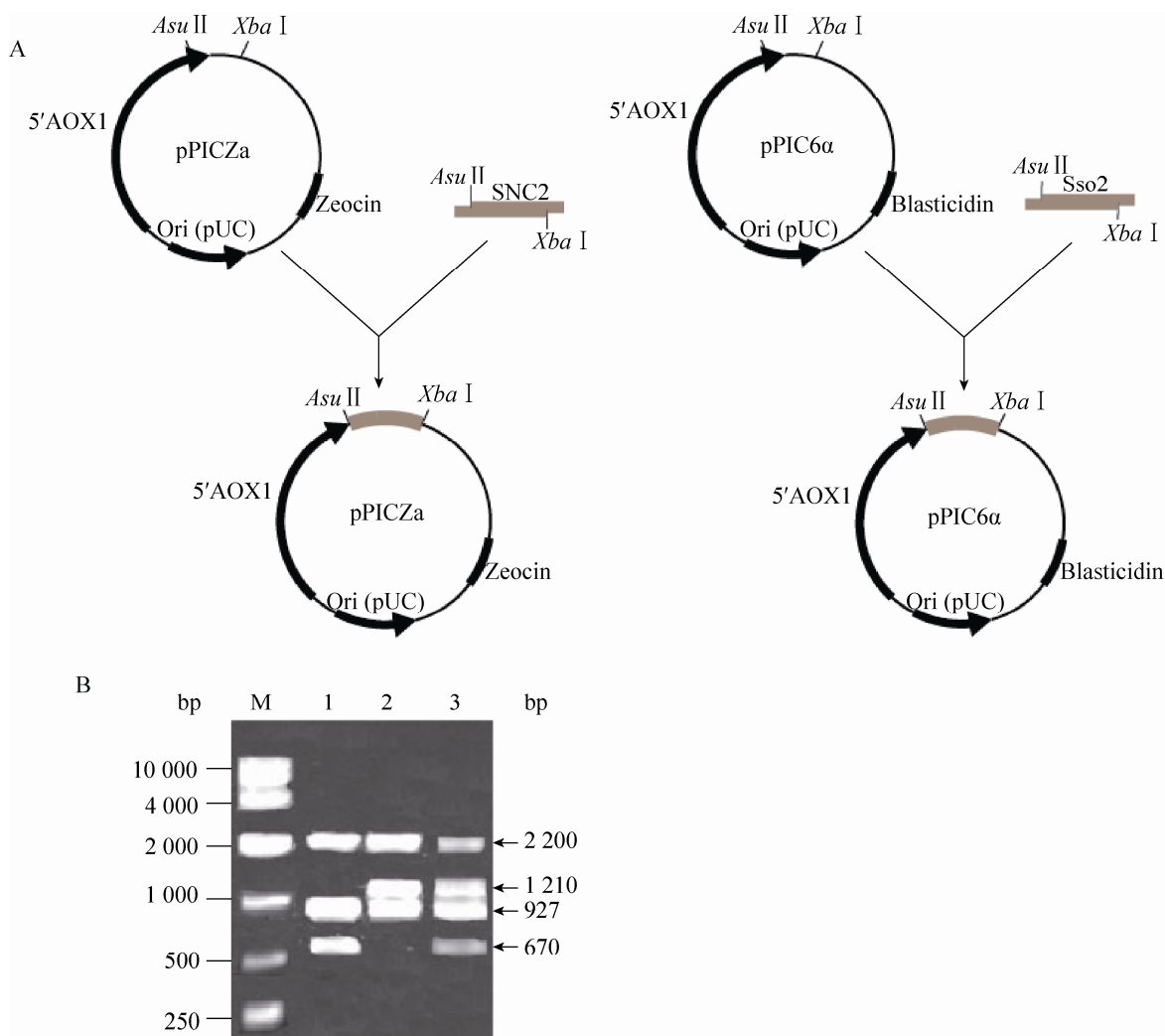


图3 含 SNAREs 的重组毕赤酵母的构建

Fig. 3 Construction of the recombinant *P. pastoris* with SNAREs. (A) The construction of recombinant plasmid. (B) Confirmation of recombinant *P. pastoris* (CL012) with SNAREs. M: DNA DL10000 marker; 1: CL0122; 2: CL0121; 3: CL0123.

加甘油 6 h, 待溶氧陡然升高后再饥饿菌体 2 h, 然后流加甲醇开始诱导培养, 并维持培养液中甲醇浓度为 2 g/L, 共诱导 96 h。发酵液上清进行 Tricine-SDS-PAGE 分析 (图 5), 高密度发酵数据如图 6 所示, 相关发酵参数计算并总结于表 4。其中 CL012 是对照菌株, 结果表明: 在 5 L 发酵罐上进行高密度发酵, 甲醇诱导 96 h

后菌株 CL012 的 OD_{600} 达到 567, 甲醇诱导 96 h 后菌株 CL0121、CL0122 和 CL0123 的 OD_{600} 分别为 502、460 和 470, 比菌株 CL012 分别降低了 12.95%、23.26% 和 20.64% (图 6A)。对照菌株 CL012 的产量为 53 mg/L, 菌株 CL0121、CL0122 和 CL0123 的产量分别为 54 mg/L、64 mg/L 和 78 mg/L (图 6B), 比对照菌株 CL012 提高了

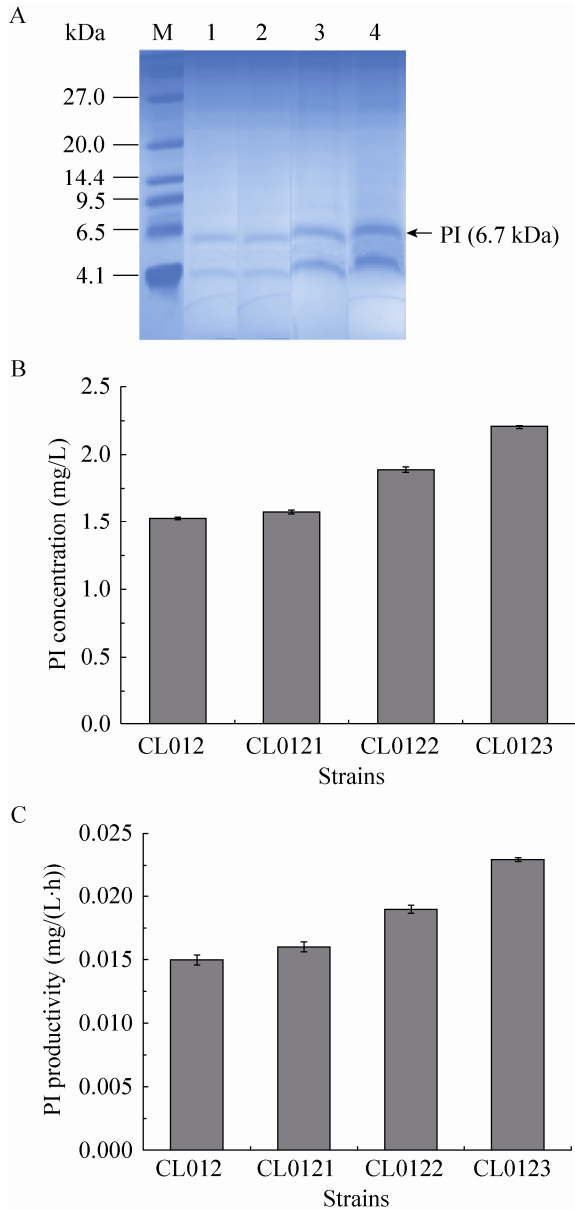


图 4 摇瓶水平检测 SNAREs 对 PI 表达的影响

Fig. 4 Analysis of the effect of SNAREs on PI after shake-flake induction for 96 h. (A) Tricine-SDS-PAGE analysis of the effect of SNAREs on PI. (B) The yield of PI of different recombinant *P. pastoris* strains. M: protein marker; 1: CL012; 2: CL0121; 3: CL0122; 4: CL0123. (C) Comparison of the PI productivity of different recombinant strains after shake-flake induction for 96 h. Measurements are the average value \pm standard error from independently duplicate cultivations.

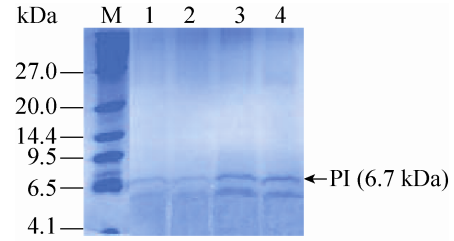


图 5 Tricine-SDS-PAGE 分析发酵罐水平上 SNAREs 对 PI 的影响

Fig. 5 Tricine-SDS-PAGE analysis of the fermentation in a 5 L bioreactor after induction for 96 h. M: protein marker; 1: CL012; 2: CL0121; 3: CL0122; 4: CL0123.

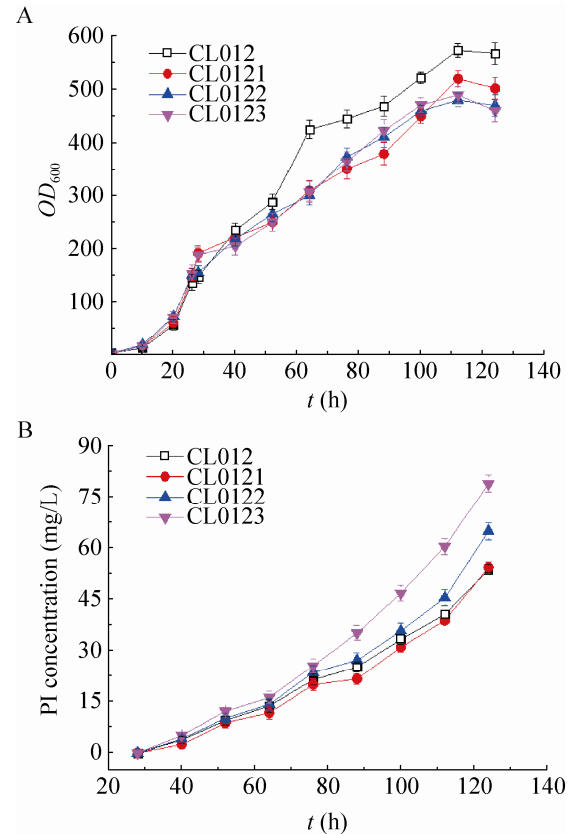


图 6 高密度发酵检测 SNAREs 对胰岛素前体产量的影响

Fig. 6 Analysis of the cell growth and yield of recombinant strains, which expressing SNC2, SSO2 and SNC2-SSO2 in a 5 L bioreactor after induction for 96 h. (A) The OD_{600} of different recombinant strains. (B) The PI yield of different recombinant strains. Measurements are the average value \pm standard error from independently duplicate fermentations.

表 4 甲醇诱导阶段重组毕赤酵母细胞生长和 PI 的合成情况

Table 4 Comparison of cell growth and insulin precursor formation of different recombinant strain

Parameters	Strain			
	CL012	CL0121	CL0122	CL0123
Initial DCW (g/L)	26.77	34.73	28.22	34.19
Average methanol concentration (g/L)	2.00	2.00	2.00	2.00
Final DCW (g/L)	102.57	90.81	85.02	83.21
Maximum insulin precursor (mg/L)	53.00	54.00	64.00	78.00
Total consumed methanol (g/L)	320.00	327.00	356.00	382.00
Yield of DCW on methanol (g/g)	0.32	0.28	0.24	0.22
Yield of insulin precursor on methanol (mg/g)	0.17	0.17	0.18	0.20
Insulin precursor productivity (mg/(L·h))	0.43	0.43	0.52	0.63
Culture time (h)	124.00	124.00	124.00	124.00

1.89%、20.75%和 47.17%。5 L 发酵罐上进行高密度发酵, CL012 的 OD_{600} 达到 567, 产量为 53 mg/L, 是摇瓶水平的 34.64 倍。CL0121、CL0122 和 CL0123 的罐上产量分别是摇瓶水平的 34.18 倍、33.86 倍和 35.29 倍。高密度发酵可以大幅度提升菌体的密度, 增加胰岛素前体的产量。5 L 发酵罐的发酵周期是 124 h, 对照菌株 CL012 单位时间内生产胰岛素前体的生产能力为 0.43 mg/(L·h), 菌株 CL0121 的生产能力也是 0.43 mg/(L·h), CL0122 和 CL0123 的生产能力分别为 0.52 mg/(L·h)和 0.63 mg/(L·h), 比对照菌株 CL012 提高了 20.93%和 46.51%。

3 讨论

毕赤酵母表达系统已经是一种成熟的外源蛋白表达系统, 由于分泌路径的瓶颈导致很多外源蛋白留在胞内, 不能有效地运输到胞外^[9]。本文通过共表达 SNAREs 中的组分 SNC2 和 SSO2 希望可以增加目的蛋白从高尔基体到细胞质膜的运输, 增加目的蛋白的分泌。本文以胰岛素前体 (PI) 作为模式蛋白, 研究 SNAREs 在毕赤酵母中促进异源蛋白从高尔基体到细胞

质膜的运输作用。SNAREs 通过和其辅助蛋白 SM 相互作用, SM 蛋白结合到 t-SNARE 的突触区域, 促进 t-SNARE 和运输囊泡上的 v-SNARE 结合, t-SNARE 和 v-SNARE 结合后就会引起构型改变, 在靶膜上形成融合孔, 促进目的蛋白的释放^[13]。在 5 L 发酵罐上单独表达 SNC2 可以使 PI 的产量提高 20.75%, 同时 PI 的生产能力也增加了 20.93%, 说明表达 SNC2 可以促进胰岛素前体更多释放, 也和 SNC2 本身可以促进目的蛋白从高尔基体到细胞质膜的运输作用相一致。单独表达 SSO2 对 PI 的产量没有影响, 不能促进更多的胰岛素前体从高尔基体到细胞质膜的运输。但是同时共表达 SNC2 和 SSO2 可以进一步提高胰岛素前体的产量, 使 PI 的产量提高 47.17%, 对 PI 的生产能力提高 46.51%。SNC2 属于 v-SNARE, SSO2 属于 t-SNARE, 说明 SNC2 和 SSO2 在促进 PI 于毕赤酵母中的运输过程中具有协同作用, 将两者共表达时可以进一步促进胰岛素前体的运输, 提高胰岛素前体的产量。蛋白伴侣之间经常存在着这种协同作用, 如陈飞等^[22]利用 PDI 和 Ero1 之间的协同作用将灰盖鬼伞过氧化物酶的酶活提高 2.62 倍。

Shusta 等^[29]利用 PDI 和 BIP 之间的协同作用将单链抗体片段的产量提高了 8 倍。

本文通过共表达促进高尔基体到细胞质膜的 SNAREs 组分, 提高了毕赤酵母分泌异源蛋白的能力, 寻找到了可以提高异源蛋白在毕赤酵母中表达的方法, 为促进其他外源蛋白在毕赤酵母中的分泌提供了新的方法和思路, 同时也找到了一种可以提高胰岛素前体产量的新方法。

REFERENCES

- [1] Ben AS, Belhaj AE, Göngrich R, et al. Molecular optimization of rabies virus glycoprotein expression in *Pichia pastoris*. *Microb Biotechnol*, 2016, 9(3): 355–368.
- [2] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 31–39.
- [3] Nordén K, Agemark M, Danielson JÅ, et al. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 47.
- [4] Sha C, Yu XW, Zhang M, et al. Efficient secretion of lipase r27RCL in *Pichia pastoris* by enhancing the disulfide bond formation pathway in the endoplasmic reticulum. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(11): 1241–1249.
- [5] van Zyl JHD, den Haan R, van Zyl WH. Overexpression of native *Saccharomyces cerevisiae* ER-to-Golgi SNARE genes increased heterologous cellulase secretion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(1): 505–518.
- [6] Bui N, Strub K. New insights into signal recognition and elongation arrest activities of the signal recognition particle. *Biol Chem*, 1999, 380(2): 135–145.
- [7] Zhang W, Zhao HL, Xue C, et al. Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins. *Biotechnol Progr*, 2006, 22(4): 1090–1095.
- [8] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, et al. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(2): 381–389.
- [9] Marizela D, Rebecca G, Diethard M, et al. Engineering of protein folding and secretion-strategies to overcome bottlenecks for efficient production of recombinant proteins. *Antioxid Redox Sign*, 2014, 21(3): 414–437.
- [10] Delic M, Valli M, Graf AB, et al. The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, 37(6): 872–914.
- [11] Hou J, Tyo K, Liu ZH, et al. Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2012, 14(2): 120–127.
- [12] Malsam J, Kreye S, Söllner TH. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(18): 2814–2832.
- [13] Jahn R, Scheller RH. SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2006, 7(9): 631–643.
- [14] Burri L, Lithgow T. A complete set of SNAREs in yeast. *Traffic*, 2004, 5(1): 45–52.
- [15] van Zyl JHD, den Haan R, van Zyl WH. Over-expression of native *Saccharomyces cerevisiae* exocytic SNARE genes increased heterologous cellulase secretion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5567–5578.
- [16] Xu LL, Shen Y, Hou J, et al. Secretory pathway engineering enhances secretion of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117(1): 45–52.
- [17] Gasser B, Sauer M, Maurer M, et al. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Appl Environ Microb*, 2007, 73(20): 6311–6318.

- 6499–6507.
- [18] Gong XY, Ding CY, Liu LM, et al. Enhancement of human insulin precursor production by increasing the copy number in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(6): 545–552 (in Chinese).
龚香艺, 丁重阳, 刘立明, 等. 一种增加重组毕赤酵母拷贝数提高胰岛素前体产量的策略. *微生物学报*, 2013, 53(6): 545–552.
- [19] Zhao HL, Blazanovic K, Choi Y, et al. Gene and protein sequence optimization for high-level production of fully active and aglycosylated lysostaphin in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microb*, 2014, 80(9): 2746–2753.
- [20] Vogl T, Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol*, 2013, 30(4): 385–404.
- [21] Yarimizu T, Nakamura M, Hoshida H, et al. Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1): 20.
- [22] Chen F, Hu MR, Jiang XZ, et al. Enhancement of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by co-expression chaperone PDI and Ero1. *Chin J Biotech*, 2015, 31(12): 1682–1689 (in Chinese).
陈飞, 胡美荣, 江贤章, 等. 共表达分子伴侣 PDI 和 Ero1 对灰盖鬼伞过氧化物酶在毕赤酵母中表达的影响. *生物工程学报*, 2015, 31(12): 1682–1689.
- [23] 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 Appl Microbiol*, 2009, 107(3): 954–963.
- [24] Ben AS, Belhaj AE, Kallel H. Rabies virus glycoprotein enhanced expression in *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochem Eng J*, 2016, 113: 77–85.
- [25] Vadhana AKP, Samuel P, Berin RM, et al. Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2013, 52(3): 177–183.
- [26] Shen Q, Wu M, Wang HB, et al. The effect of gene copy number and co-expression of chaperone on production of albumin fusion proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(3): 763–772.
- [27] Lee C, Kim J, Shin SG, et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 273–280.
- [28] Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, et al. 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. *Microb Cell Fact*, 2010, 9(1): 31.
- [29] Shusta EV, Raines RT, Plückthun A, et al. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(8): 773–777.

(本文责编 郝丽芳)