

高效表达内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌的构建

王禹焜^{1,2}, 张斯童^{1,2}, 陈光^{1,2}

1 吉林农业大学 秸秆生物学与利用教育部重点实验室, 吉林 长春 130118

2 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118

王禹焜, 张斯童, 陈光. 高效表达内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌的构建. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2193-2205.

Wang YK, Zhang ST, Chen G. Construction of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing endoglucanase efficiently. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2193-2205.

摘要: 内切葡聚糖酶 (EG) 是纤维素酶的重要组分, 在纤维素降解酶系中发挥重要作用。由于天然微生物来源的内切葡聚糖酶产量低, 极大地制约了其生产和应用, 所以对内切葡聚糖酶进行高效异源表达是解决这一问题的有效途径。为了获得高效内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌, 本研究从纤维梭菌中克隆了内切葡聚糖酶 (EG) 基因, 全长 1 996 bp, 编码 440 个氨基酸, 并与来源于酿酒酵母的 *PGK* 启动子序列、来源于 pPIC9K 质粒的 α -信号肽序列以及来源于 pSH65 质粒的 *CYCI* 终止子序列通过重叠延伸 PCR 法构建完整表达盒 (P α EGC), 通过整合 rDNA 的方法构建内切葡聚糖酶酿酒酵母的表达载体, 在酿酒酵母中进行内切葡聚糖酶的随机多拷贝表达。利用微滴数字 PCR 鉴定内切葡聚糖酶拷贝数, 并探索拷贝数与蛋白表达量之间的关系。通过 rDNA 整合法获得了拷贝数为 1、3、4、7、9、11、15、16、19、21、22、23 的内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌, 结果表明当拷贝数为 15 时, 酶活性最高, 为 351 U/mL。本研究成功构建了内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌, 为其他工业酶异源高效表达提供参考和借鉴。

关键词: 酿酒酵母, 内切葡聚糖酶, rDNA 整合法, 微滴数字 PCR 技术

Construction of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing endoglucanase efficiently

Yukun Wang^{1,2}, Sitong Zhang^{1,2}, and Guang Chen^{1,2}

1 Key Laboratory of Straw Biology and Utilization, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: Endoglucanase (EG) is an important component of cellulases and play an important role in cellulose degradation. However, its application is limited due to the low yield of endoglucanase from natural microorganisms.

Received: March 9, 2020; **Accepted:** May 18, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program Projects (No. 2017YFD0501000), Key Issues of Jilin Provincial Education Department (No. JJKH20180688KJ).

Corresponding authors: Sitong Zhang. Tel/Fax: +86-431-84333712; E-mail: 18943132269@163.com

Guang Chen. Tel: +86-431-84333713; Fax: +86-431-84333712; E-mail: chg61@163.com

国家重点研发计划 (No. 2017YFD0501000), 吉林省教育厅重点课题 (No. JJKH20180688KJ) 资助。

网络出版时间: 2020-10-15

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201015.0845.001.html>

Efficient heterologous expression of endoglucanase is an effective way to solve this problem. To obtain the engineered *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield endoglucanase, endoglucanase gene was cloned from *Clostridium cellulovorans*, with a total length of 1 996 bp, encoding 440 amino acids, and the complete expression cassette (P α EGC) was constructed with the *PGK* promoter sequence from *Saccharomyces cerevisiae*, α -signal peptide sequence from pPIC9K plasmid and *CYC1* terminator sequence from pSH65 plasmid by gene splicing by overlap extension PCR (SOE PCR), and the expression vector of endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* was constructed by rDNA integration. The relationship between copy number and protein expression was explored. Random multicopy expression of endoglucanase was performed in *Saccharomyces cerevisiae*. The copy number of endoglucanase was identified by Droplet Digital PCR and explore the relationship between copy number and protein expression. The engineered *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase with copy numbers of 1, 3, 4, 7, 9, 11, 15, 16, 19, 21, 22 and 23 were obtained by rDNA integration, respectively. The results showed that when the copy number was 15, the enzyme activity was the highest, namely 351 U/mL. The engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* for endoglucanase was successfully constructed, which can provide reference for the heterologous expression of other industrial enzymes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, endoglucanase, rDNA integration method, droplet digital PCR technology

纤维素是地球上储量最丰富的可再生资源,近年来,随着能源问题愈发严峻,纤维素资源的开发与利用已经成为研究的热点^[1]。降解和利用纤维素的方法有很多,一般采用物理、化学、生物法,物理和化学降解法一般存在成本高、危险性高、环境污染严重等问题,生物降解法因其作用条件温和、环境友好而备受青睐^[2]。纤维素酶可以有效降解纤维素生成葡萄糖,Novozymes、Genencor 等国际酶制剂巨头控制了纤维素酶、木聚糖酶等木质纤维类物质转化酶的生产 and 供应,高昂的酶制剂成本严重阻碍了我国纤维素类资源综合利用。因此,研究开发具有自主知识产权的高产纤维素酶菌株迫在眉睫。纤维素酶中的内切葡聚糖酶 (Endo-1,4- β -D-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4, 简称 EG) 能够水解糖苷键、打破纤维素链,在纤维素降解酶系中发挥重要作用^[3]。但由于天然微生物产的内切葡聚糖酶通常产量较低,纯化困难,严重限制了其生产与应用。通过异源表达的方式提高内切葡聚糖酶的表达成为研究人员关注的热点,虽然实现了在原核和真核系统中的表达,但表达量大多不高,无法实现内切葡聚糖酶的工业化生产^[4-5]。因此,选择合适的宿主并采取多种手段相结合的方式构建高效内切葡聚糖酶工程菌的探索显得尤为重要。

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 是典型的真核生物单细胞模型和重要的模式生物,属于酵母菌科,其具有生长繁殖快、代谢周期短、易于分离培养、遗传背景清晰等特性,得到研究者的青睐,目前已有多种外源蛋白以其作为宿主实现异源表达^[6-7]。酿酒酵母基因组中,有 100–200 个序列长度为 9.1 kb 的重复单元,大约占基因组全长的 60%,存在于第 XII 条染色体上,被称为核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA)^[8]。研究表明,酵母基因组中 rDNA 的拷贝数明显高于其他位点,是介导外源基因同源重组的位点之一,将 rDNA 介导的外源基因整合至酿酒酵母中可使外源基因得到高效表达^[9]。孙恒一等利用 rDNA 整合实现降钙素 (Calcitonin, CT) 在酿酒酵母中的稳定高效表达,经 ELISA 检测其表达量占酵母总蛋白的 2.05%^[10];赵文萱等利用 rDNA 整合成功实现 β -葡萄糖苷酶在酿酒酵母中的多拷贝表达,酶活力是单拷贝时的 3.04 倍^[11]。

微滴数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR) 采用泊松分布原理,通过大量单个反应室的单分子 DNA 进行 PCR 扩增,最终将正信号转换为绝对定量的技术。通过检测终端收集每个反应单元的荧光信号,直接计数样品的原始含量或通过泊松分布原理计数,以实现样品的绝对定量^[12-15]。

本研究中, 为了构建高效内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌, 利用重叠延伸 PCR 技术将组成型启动子 *PGK*、分泌信号肽 *α -factor*、来源于纤维素梭菌 *Clostridium cellulovorans* 的内切葡聚糖酶基因 (EG) 和终止子 *CYCI* 组合在表达盒 (P α EGC) 中, 通过 rDNA 整合法实现内切葡聚糖酶基因 (EG) 在酿酒酵母中的多拷贝表达, 希望通过启动子、分泌信号肽的引入及基因剂量的提高以实现内切葡聚糖酶在酿酒酵母中的高效表达。应用 ddPCR 技术对重组内切葡聚糖酶的工程菌拷贝数进行鉴定, 结合对重组工程菌内切葡聚糖酶酶活力的考察, 研究内切葡聚糖酶基因拷贝数与酶活力之间的关系, 并对酶活力最高的转化子遗传稳定性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究用到的菌种和质粒如表 1 所示。

去磷酸化试剂盒、反转录试剂盒、限制性内切酶、SD-Ura 培养基, 购自日本 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Salmon Sperm DNA 购自上海源叶生物科技有限公司; Droplet reader

oil、ddPCR Eva Green Supermix 购自美国 BIO-RAD 公司; 酵母基因组提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自美国 AXYGEN 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

PDA 固体培养基 (g/L): 葡萄糖 20, MgSO₄·7H₂O 1.5, KH₂PO₄ 1, 琼脂粉 20, 马铃薯 200, 蒸馏水定容, 自然 pH。

YPD 液体培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 10, 蒸馏水定容, 自然 pH。

YPD 固体培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 10, 琼脂糖 20, 蒸馏水定容, 自然 pH。

LB 液体培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 蒸馏水定容, 自然 pH。

LB 固体培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 琼脂糖 20, 蒸馏水定容, 自然 pH。

纤维素梭菌发酵培养基 (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 2.4, 蛋白胨 10, KH₂PO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 1.5, CaCl₂·2H₂O 0.1, 吐温-80 1, 蒸馏水定容, 自然 pH。

1.2 引物

本文所用引物如表 2 所示, 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Features	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	Host of gene cloning	TaKaRa, Japan
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Used to clone EG gene	China Industrial Microbial Species Preservation Center
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	Expression host of <i>MATa</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp</i> , <i>ura3</i>	Invitrogen, American
pYES2	Expression host of <i>ura3</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invitrogen, American
pPIC9K	Applied to amplify signal peptide <i>α-factor</i> sequence	China Plasmid Strain Preservation Center(NTCC)
pMD19-T	Gene cloning vector	TaKaRa, Japan
pSH65	Used to amplify terminator <i>CYCI</i>	China Plasmid Strain Preservation Center(NTCC)
pYES2-P α EGC	Constitutive single copy expression of endoglucanase vector	This study
pYES2-P α EGC-rDNA	Constitutive multi copy expression of endoglucanase vector	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
<i>EG-F</i>	ATCATACATTATTA AAAATCAACTAG
<i>EG-R</i>	ACATTATTAGAACTTATATTA ACTC
<i>PGK-F</i>	CCGGAATTCAGCTTTCTAACTGATCTATCCAAAAC
<i>PGK-R</i>	GCTGCCTTGATCTGAACCATTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGA
<i>α-factor-F</i>	TCTACTTTTACAACAAATATAAAAACAATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGC
<i>α-factor-R</i>	TGTCGATGCTCACTGAAGCCTGTCTTTTCTCGAGAGATACCCCTT
<i>CYCI-F</i>	ACACTGCTATCGCAAATGCTCTCTAGGTCATGTAATTAGTTATGTCACGC
<i>CYCI-R</i>	TGCTCTAGACGGCCGCAAATTAAGCCTT
rDNA-F	CCTACGTACAACGAACGAGACCTTAACCT
rDNA-R	GGTACGTACGGAACCTCTAATCATTCGCT

Note: italic letters indicate restriction enzyme sites.

1.3 方法

1.3.1 *PGK* 启动子序列克隆

用 YPD 固体培养基将酿酒酵母 INVSc1 菌株活化后,挑取单菌落接种到 YPD 液体培养基培养 48 h 后提取菌体,用 OMEGA 酵母基因组提取试剂盒,提取酿酒酵母的基因组^[16]。以提取后的酿酒酵母基因组作为模板,*PGK-F*、*PGK-R* 为引物扩增 *PGK* 启动子序列,采用琼脂糖凝胶电泳进行验证并对目的条带进行回收^[17]。扩增条件如下:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 后延伸 7 min。

1.3.2 α -factor 序列克隆

使用 LB 固体培养基将携带有 pPIC9K 质粒的大肠杆菌 DH5 α 活化,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,12 h 后用质粒抽提试剂盒提取 pPIC9K 质粒,以质粒为模板, α -F、 α -R 为引物扩增 α -factor 序列,采用琼脂糖凝胶电泳进行验证并对目的条带进行回收^[17]。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 30 s;72 °C 后延伸 7 min。

1.3.3 内切葡聚糖酶基因克隆

将纤维梭菌菌种经 PDA 平板划线活化后,挑取单菌落接种到发酵培养基中,在 30 °C、150 r/min

条件下培养 72 h 后,按照 AXYGEn 总 RNA 提取试剂盒的方法提取纤维梭菌菌种的总 RNA。以纤维梭菌菌种提取的总 RNA 作为模板,按照 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA,再以 cDNA 作为模板,*EG-F*、*EG-R* 为引物扩增 *EG* 基因,采用琼脂糖凝胶电泳进行验证并对目的条带进行回收^[17]。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 2 min,72 °C 后延伸 7 min。

1.3.4 *CYCI* 终止子序列克隆

将含有 pSH65 质粒的大肠杆菌经 LB 平板活化后,挑取单菌落接种至 LB 液体培养基,12 h 后按照质粒提取试剂盒的方法提取 pSH65 质粒。以 pSH65 质粒为模板,*CYCI-F*、*CYCI-R* 为引物扩增 *CYCI* 序列,采用琼脂糖凝胶电泳进行验证并对目的条带进行回收^[17]。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 30 s,72 °C 后延伸 7 min。

1.3.5 克隆载体的连接、转化、鉴定

将 1.3.1–1.3.4 中的回收产物分别与 pMD19-T 载体进行连接^[18],转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,接种至含有 Amp 的 LB 抗性固体培养基上进行筛选。12 h 后,选择单克隆用于菌落 PCR 鉴定,收集阳性克隆并在含 Amp 抗性的 LB 液体培养基,于 37 °C 和 150 r/min 培养^[17]。12 h 后通过离

心收集菌体,并提取质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.3.6 重叠延伸 PCR 构建 P α EGC 完整表达盒

确定 1.3.1–1.3.4 回收的 *PGK*、 *α -factor*、*EG* 及 *CYCI* 的片段准确无误后,等比例混合后进行片段融合预实验^[19],最终确定最佳融合条件:59 °C 退火,延伸 60 s,35 个循环数,各个片段稀释 8 倍后使用^[17],融合条件如下:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 1 min;72 °C 后延伸 7 min。

用融合实验的产物为模板,以 *PGK-F* 和 *CYCI-R* 为引物,扩增 *PGK*、 *α -factor*、*EG* 及 *CYCI* 全长的融合片段,称为 *PGK- α -factor-EG-CYCI* (P α EGC) 表达盒,采用琼脂糖凝胶电泳进行验证并对目的条带进行回收,将回收产物连接 pMD19-T 载体,命名为 pMD19-T-P α EGC,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后,经菌液 PCR 检测,提取质粒并送至苏州金唯智生物科技有限公司测序^[17]。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 3 min 30 s,72 °C 后延伸 7 min。

1.3.7 rDNA 序列扩增

以 1.3.1 中提取的酿酒酵母基因组为模板,以 rDNA-F、rDNA-R 为引物扩增 rDNA 单元中的核心元件序列,将回收产物与 pMD19-T 载体连接,命名为 pMD19-T-rDNA,转化到大肠杆菌 DH5 α 中,并接种在含有 Amp 抗性的 LB 平板上进行筛选。12 h 后选择单个菌落进行菌落 PCR 鉴定,选择阳性克隆在含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37 °C、150 r/min 下培养 12 h 后离心收集菌体,提取质粒并送至苏州金唯智生物科技有限公司测序^[17]。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 2 min 30 s,72 °C 后延伸 7 min。

1.3.8 pYES2-P α EGC 载体的构建

在上述构建 P α EGC 完整表达盒时,在上下游

引物中引入了 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点,用 *EcoR* I 和 *Xba* I 分别对 pYES2 载体和 PMD19-T-P α EGC 质粒进行双酶切,酶切后回收目的条带,经 T4 DNA 连接酶于 16 °C 过夜连接,连接体系全量转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经菌液 PCR 检测,将阳性转化子接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,摇瓶过夜,提取质粒,送至苏州金唯智生物科技有限公司测序^[17]。

1.3.9 pYES2-P α EGC-rDNA 载体的构建

克隆 rDNA 片段时上下游引物引入了 *SnaB* I 酶切位点,分别对载体 pYES2-P α EGC 和 PMD19-T-rDNA 用 *SnaB* I 进行单酶切,对回收的 pYES2-P α EGC 片段去磷酸化后,经 T4 DNA 连接酶于 16 °C 过夜后连接,连接体系全部用于转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经过菌液 PCR 后,将阳性转化子接种在含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,摇床过夜,提取质粒后酶切鉴定,命名为 pYES2-P α EGC-rDNA^[17]。

1.3.10 线性化 pYES2-P α EGC-rDNA 载体转化酿酒酵母

用 *Sph* I 在 rDNA 上对 pYES2-P α EGC-rDNA 进行酶切,使质粒线性化后,经琼脂糖凝胶回收后,用 LiAc/SS carrier DNA/PEG 法转化酿酒酵母 *S. cerevisiae* 50 μ L、50% PEG3350 240 μ L、1 mol/L LiAc 36 μ L、2 mg/mL boiled carrier DNA 50 μ L、Plasmid DNA 34 μ L。42 °C 孵育 30 min 后,将细胞重悬于 1 mL YPD 液体培养基中,30 °C、150 r/min 培养 1 h,收集菌体,用 100 μ L ddH₂O 重悬菌体后,将它涂布在 SD-U 平板上,30 °C 培养箱培养直至出现单菌落^[17]。对所挑取的单菌落进行内切葡聚糖酶基因的菌液 PCR 验证。

1.3.11 数字 PCR 鉴定阳性转化子的拷贝数

引物及探针:将得到的阳性转化子接种于 YPD 培养基中,30 °C、150 r/min 培养 48 h,收集菌体用 OMEGA 公司的酵母基因组提取试剂盒提取各转化子基因组 DNA。以基因组 DNA 为模

板, *ACT1* 基因为内参基因, 利用 BIO-RAD QX200 微滴数字 PCR 仪对 *EG* 基因拷贝数进行鉴定^[22-23]。内参基因荧光标记基因为 HEX, 目的基因荧光标记基因为 FAM。引物探针序列如表 3 所示。

微滴数字 PCR 反应包括 4 个步骤: 配制 PCR 反应体系、微滴生成、扩增循环和信号读取^[24]。ddPCR 体系为 20 μ L, 包括 10 μ L 2 \times ddPCR Master Mix, 10 μ mol/L 内参基因的上游和下游引物各 1.8 μ L, 探针各 0.5 μ L, 基因组模板 2 μ L。微滴的产生需要专用的微滴产生卡和微滴生成仪。将 20 μ L PCR 体系加入微滴生成卡中, 并加入专用的微滴生成油后覆盖专用胶垫置入微滴生成仪, 启动程序, 生成微滴^[17]。微滴数字 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 45 个循环。扩增结束后进行 98 $^{\circ}$ C、10 min 的热失活。每个模板重复 3 个平行检测。扩增完成后, 将孔板放置在液滴读取器上读取荧光信号, 使用 Quanta Soft V1.3.2 软件分析实验数据, 获得绝对定量结果^[25-26]。

1.3.12 内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌发酵液蛋白制备

发酵液蛋白制备步骤如下: (1) 将野生型酿酒酵母 1 拷贝、6 拷贝、15 拷贝和 21 拷贝的内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌接种于 YPD 培养基, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 72 h 后, 取 5 mL 菌液 8 000 \times g 离心 5 min, 收集上清。(2) 在上清液中依次加入 20 mL 甲醇、5 mL CHCl_3 和 15 mL ddH₂O, 漩涡振荡 30 s, 于冰上静置 30 min。(3) 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 15 min, 这时液体出现分层。(4) 用移液器轻轻移去上层甲醇和下层 CHCl_3 , 中间为蛋白沉淀。(5) 残留的蛋白沉淀经 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 5 min 后去除液体, 得到发酵液蛋白。

1.3.13 SDS-PAGE 检测

按照 1:1 的比例在蛋白提取物中加入上样缓冲液, 煮沸 10 min 后, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 取 10 μ L 用于 SDS-PAGE。

表 3 探针及引物序列

Table 3 Probes and primer sequences

Primer probe	Sequence (5'-3')
<i>ACT1</i> Upperreaches	TATCCCCTGCATCCCTATCA
downstream probe	CAGGCTTCGTTGCAGATACA CATCTTCGTTAGCTTCATCCGACG CTA
<i>EG</i> Upperreaches	GCTAAAATCACAAAAGTATGGAC ACAA
downstream probe	TAGGAGCCACCAGACCATTCA AATGAACCTCGTCCAGTAGGCGC AGC

1.3.14 转化子产酶能力测定

将在 1.3.11 微滴数字 PCR 中鉴定出的不同拷贝数的阳性转化子分别接种到 YPD 培养基中, 在 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下培养 48 h 后, 取上清, 测定内切葡聚糖酶的酶活性。内切葡聚糖酶活力具体测定方法参考文献[27]。

酶活力单位定义: 1 mL 酶液 1 min 分解底物生成 1 μ g 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)。

$$\text{酶活力(U/mL)} = (\text{N} \times \text{D} \times 1\,000) / (\text{M} \times \text{T} \times \text{V})$$

式中, N 为还原糖浓度; D 为酶液的稀释倍数; M 为葡萄糖分子量; T 为水解反应时间; V 为酶液体积; 1 000 为将葡萄糖由 mg 换算为 μ g 的换算。

1.3.15 转化子产酶稳定性实验

将在 1.3.14 中获得的具有最高酶活力的阳性转化子接种于 YPD 液体培养基中, 并连续通过 10 次传代。每次传代后, 取 1 mL 酶液用于测内切葡聚糖酶的酶活力。

2 结果与分析

2.1 *PGK* 启动子序列、 *α -factor* 序列克隆、*EG* 基因序列、*CYCI* 终止子序列克隆及 *P α EGC* 表达盒构建

以提取的酿酒酵母基因组 DNA 为模板, *PGK-F*、*PGK-R* 为引物扩增, 得到预期大小的目的片段, 大小为 850 bp (GenBank 登录号: AH001380)。以 pPIC9K 质粒为模板, α -F、 α -R 为引物扩增, 得到预期大小的目的片段, 大小为

254 bp (GenBank 登录号: KM032189)。以提取的纤维梭菌总 RNA 为模板,一步法反转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,以 *EG*-F、*EG*-R 为引物扩增得到 *EG* 目的片段,大小为 1 996 bp (GenBank 登录号: M75706.1)。以 pYES2 质粒为模板,*CYCI*-F、*CYCI*-R 为引物扩增,得到预期大小的目的片段,大小为 260 bp (GenBank 登录号: AF298780.1)。扩增产物大小均与预期相符。将上述基因片段均连接至 pMD19-T 载体,以转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,经菌液 PCR 验证后提取质粒进行测序,将测序结果与 GenBank 对比,相似度 100%,表明序列扩增成功。

在进行 *PGK*、 *α -factor*、*EG* 和 *CYCI* 序列扩增时,设计的引物是重叠延伸 PCR 的引物,每个序列下游均带有与下一序列的融合位点,利用重叠延伸 PCR 技术将组成型启动子 *PGK*、分泌信号肽 *α -factor*、*EG* 基因、终止子 *CYCI* 片段融合构建 PaEGC 表达盒,得到预期大小的目的片段,大小为 3 360 bp (图 1)。

2.2 表达载体 pYES2-PaEGC 的构建

用 *EcoR* I 和 *Xba* I 分别对 pYES2 载体和 pMD19-T-PaEGC 质粒进行双酶切,回收目的片段后,T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经 *EG* 基因菌液 PCR 鉴定得到质粒 pYES2-PaEGC,结果如图 2 所示。图中第三泳道即为 pYES2-PaEGC 质粒单酶切后的电泳结果,大小约为 9 220 bp。

2.3 表达载体 pYES2-PaEGC-rDNA 的构建

将酿酒酵母提取的基因组 DNA 为模板,使用特异性引物 rDNA-F 和 rDNA-R 扩增预期大小为 2 300 bp 的目的片段 (GenBank 登录号: BK006945.2)。将 rDNA 基因片段与 pMD19-T 载体连接,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,在菌液 PCR 验证后提取质粒并测序。将测序结果与 GenBank 进行对比,相似度为 100%。用 *SnaB* I 分别酶切质粒 pYES2-PaEGC 和质粒 pMD19-T-rDNA,

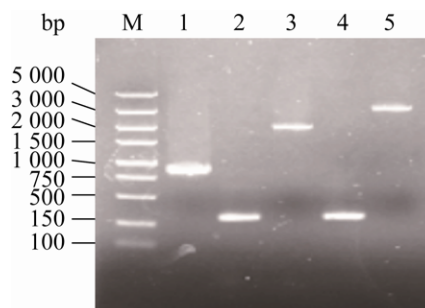


图 1 *PGK* 启动子、 *α -factor* 信号肽、*EG* 基因、*CYCI* 终止子及 PaEGC 表达盒 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of *PGK* promoter, *α -factor* signal peptide, *EG* gene, *CYCI* terminator sequence and PaEGC expression cassette construction. M: DL5000 marker; lanes 1, 2, 3, and 4 are PCR amplified products of the *PGK* promoter, *α -factor* signal peptide, *EG* gene, and terminator *CYCI* fragment; lane 5 is the PCR amplification of the PaEGC expression cassette.

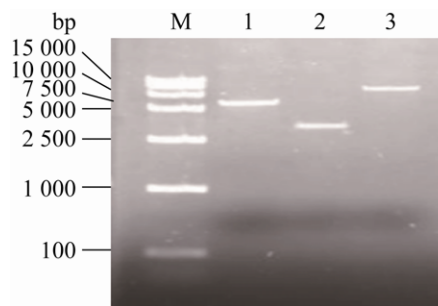


图 2 质粒 pYES2-PaEGC 的构建

Fig. 2 Construction of plasmid pYES2-PaEGC. M: DL15000 marker; lane 1 is 5 864 bp pYES2 expression vector; lane 2 is PCR amplification of PaEGC expression cassette; lane 3 is pYES2-PaEGC vector.

回收目的片段后,用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,菌液 PCR 验证后提取质粒进行酶切和验证,结果如图 3 所示,rDNA 片段大小为 2 300 bp;pYES2-PaEGC 载体大小为 9 224 bp;pYES2-PaEGC-rDNA 载体大小为 11 524 bp。

2.4 ddPCR 检测转化子拷贝数

使用 *Sph* I 在 rDNA 位置对 pYES2-PaEGC-rDNA 线性化后,转化酿酒酵母 INVSc1,对经 SD-U 培养基筛选得到的转化子提取基因组

后, 使用 ddPCR 检测转化子拷贝数。图 4 显示仪器在两个检测通道下, 检测到的阴性和阳性微滴数的分布, 图中阴性和阳性微滴数的分布清晰可辨, 仪器可以准确判断阴性和阳性微滴的数量^[28]。

数字微滴 PCR 扩增每个样品中数万个微滴, 并总结 HEX 和 FAM 荧光信号的结果。在比较目的基因和内参基因的荧光信号强度后, 获得目的基因 *EG* 的拷贝数。即利用 rDNA 整合法, 共得到 12 种不同拷贝数内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌, 其拷贝数分别为: 1、3、4、7、9、11、15、16、19、21、22、23 (图 5)。

2.5 内切葡聚糖酶 SDS-PAGE 分析

将野生型酿酒酵母、1 拷贝、6 拷贝、15 拷贝和 21 拷贝的内切葡聚糖酶酿酒酵母工程菌分

别接种于 YPD 培养基中, 培养 72 h 后, 提取酿酒酵母发酵液总蛋白, 并进行 SDS-PAGE 分析。如图 6 所示, 在 48 kDa 处呈现出特异条带, 与蛋白理论预测值相符。

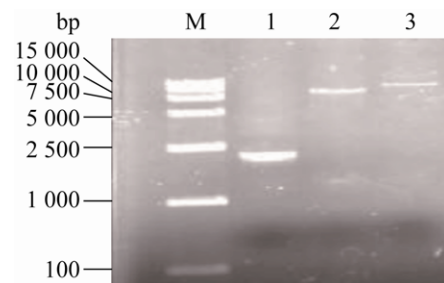


图 3 质粒 pYES2- PaEGC-rDNA 的构建

Fig. 3 Construction of plasmid pYES2-PaEGC-rDNA. M: DL15000 marker; lane 1 is the PCR amplification product of rDNA; lane 2 is the pYES2- PaEGC vector; lane 3 is the pYES2-PaEGC-rDNA vector.

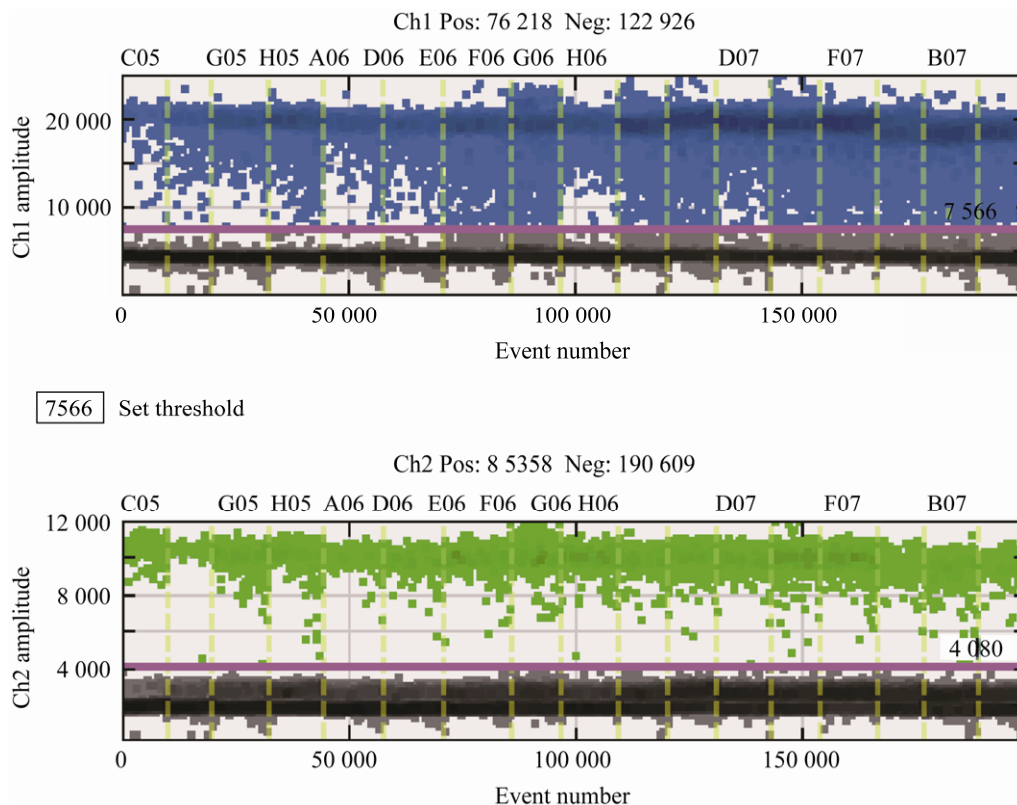


图 4 ddPCR 鉴定转化子拷贝数

Fig. 4 Detection of copy number of transformants by ddPCR. The upper graph shows the number of positive and negative droplets under the FAM channel, the lower graph shows the number of positive and negative droplets under the HEX channel.

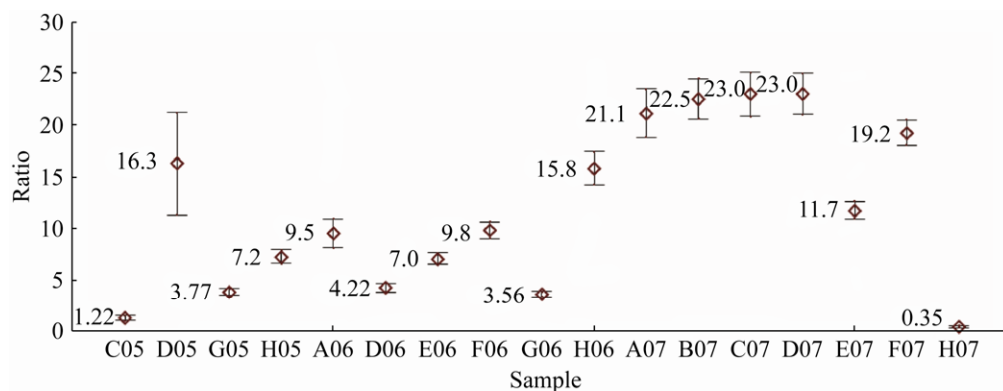


图5 ddPCR 测定转化子拷贝数结果

Fig. 5 Identification of the copy number of converters by digital microdrop polymerase chain reaction.

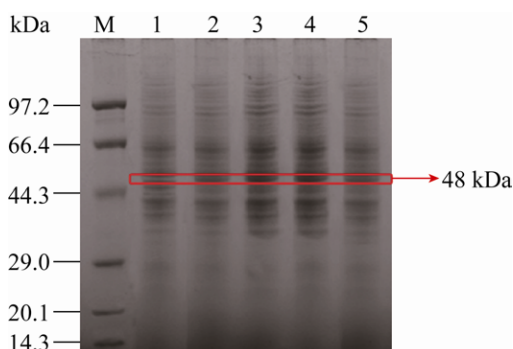


图6 不同拷贝数转化子发酵液 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of fermentation broth of transformants with different copy numbers.

2.6 不同拷贝数转化子中的内切葡聚糖酶活力分析

通过摇瓶发酵培养,对12株不同拷贝数的转化子菌株,每12 h用DNS法测定内切葡聚糖酶活力,如图7所示,12株不同拷贝数转化子内切葡聚糖酶活力,当拷贝数小于15时,内切葡聚糖酶活力随拷贝数增加而增加,15拷贝时内切葡聚糖酶活力最高为351 U/mL,是单拷贝时内切葡聚糖酶活力的1.47倍;超过15拷贝后,内切葡聚糖酶活力下降,到23拷贝时,酶活力仅为15拷贝时的62%。酶活力随着拷贝数增加呈现先增加后降低的趋势,并不与拷贝数呈线性关系。

2.7 转化子产酶稳定性实验

对获得的酶活力最高的15拷贝转化子,进行遗传稳定性实验,结果如图8所示,用rDNA整合获得的内切葡聚糖酶转化子产酶稳定性良好,经过10次传代后,酶活力几乎没有变化,仍能保持稳定遗传。

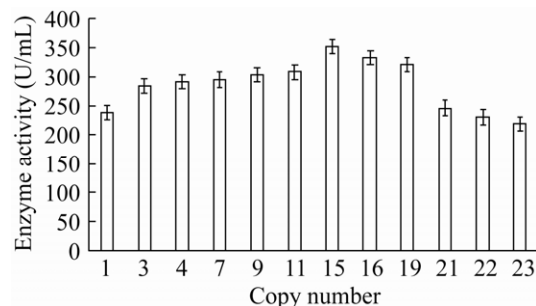


图7 拷贝数与酶活力的关系

Fig. 7 The relationship between copy number and enzyme activity.

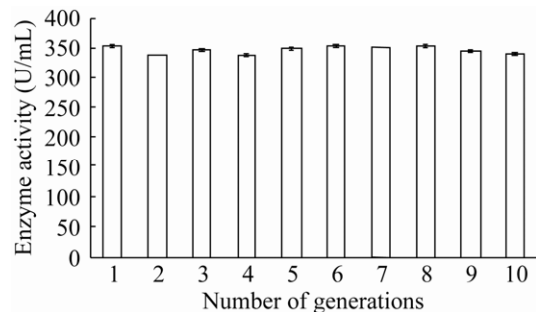


图8 传代稳定性验证

Fig. 8 Progeny stability verification.

3 讨论

启动子改造、分泌信号肽的引入以及目的基因多拷贝是提高外源蛋白表达水平的主要策略^[29-30]。

启动子是表达载体的一个重要元件,它是影响 mRNA 分子合成速率的主要因素之一,一个强的启动子能有利于载体表达更高水平的外源蛋白^[31-32]。Julia 等^[33]通过将组成型 *PGK* 启动子在毕赤酵母异源表达重组脂肪酶实现了在工业上对饲料的连续生产,增加了相当高的效率^[34]。本文在构建内切葡聚糖酶表达载体时使用了组成型 *PGK* 启动子,使原本需在半乳糖培养基中诱导表达的转化子可以直接在 YPD 培养基中实现内切葡聚糖酶的表达,且表达效率显著提高。

信号肽是蛋白分泌的关键因子,外源蛋白质产生后,在信号肽的引导下分泌到细胞特定区间,信号肽与靶蛋白的结合程度决定了外源蛋白在重组微生物中的分泌效率^[35]。Han 等^[36]合成的新型信号肽可增加毒蛋白 *AT_{H35L}* 在大肠杆菌中的分泌水平,比采用普通信号肽时蛋白质表达提高了 35 倍。有研究人员对不同信号肽组合进行筛选优化,使抗 HIV 抗体 *VRC01* 在毕赤酵母中的分泌水平提高了 2-7 倍,在摇瓶水平上最高产量可达 6.50 mg/mL^[37]。本研究在构建内切葡聚糖酶表达载体时添加了酿酒酵母偏好型信号肽 *α -factor*,成功实现内切葡聚糖酶的胞外分泌表达。

增加目的基因拷贝数是提高外源蛋白质表达水平的有效手段,但并不是基因的拷贝数越高表达量越好。Rawsthorne 等^[38]将绿色荧光蛋白基因和 *L1.ltrB* 基因连接后,得到拷贝数为 3-8 的多条不同片段,结果发现 4 拷贝工程菌的外源蛋白质表达量最高; Tamakawa 等^[39]将木酮糖激酶基因 *XYL3*、木糖还原酶基因 *mXYL1*、木糖醇脱氢酶基因 *XYL2* 分别构建了 1-10 不同拷贝数的表达载体并转化宿主细胞,结果发现拷贝数与基因表达量呈正相关但非倍数关系; 兰雪等利用 rDNA 整合法将来源于黑曲霉 *Aspergillus niger* 的内切

β -1,4 木聚糖酶基因在酿酒酵母中实现随机多拷贝表达,发现 8 拷贝时酶活力最高,超过 8 拷贝时,酶活力水平反而降低^[40]。本研究利用 rDNA 整合法实现了内切葡聚糖酶在酿酒酵母中的随机多拷贝表达,经拷贝数和酶活力测定发现 15 拷贝时工程菌内切葡聚糖酶酶活力最高,低于 15 拷贝时,酶活力随拷贝数增加而增高,超过 15 拷贝时,酶活力反而降低,说明基因拷贝数增加有利于提高蛋白表达量,但存在阈值。

近年来,随着纤维素资源受到越来越多的关注,对内切葡聚糖酶的报道也越来越多,虽然实现了在原核和真核系统中的表达,但表达量大多不高^[41]。刘海英等^[42]将来源于长梗木霉 *Trichoderma longibrachiatum* SSL 的内切-1-4- β -D-葡聚糖酶 I、III 通过重组质粒电转化毕赤酵母后成功表达,酶活力分别为 73 U/mL 和 110 U/mL。Haifa 等^[43]将来源于核盘菌 *GH45* 的内切葡聚糖酶用同样的方法在毕赤酵母中成功表达,比活力为 19 U/mg。本实验选择酿酒酵母 *INVSC1* 为内切葡聚糖酶基因的表达宿主,利用组成型启动子 *PGK* 和分泌信号肽 *α -factor* 实现了内切葡聚糖酶的组成型分泌表达,并利用 rDNA 整合法获得了不同拷贝数的转化子,当拷贝数为 15 时,内切葡聚糖酶活力最高,达到 351 U/mL,较目前文献报道的异源表达内切葡聚糖酶的酶活力水平均有较大幅度提升,实现了内切葡聚糖酶在酿酒酵母中的高效表达。

4 结论

本研究通过启动子、分泌信号肽改造以及 rDNA 整合法实现了内切葡聚糖酶在酿酒酵母中的随机多拷贝组成型分泌表达,经 ddPCR 检测获得 12 个具有不同拷贝数的菌株;测定酶活性,发现当拷贝数小于 15 时,产酶能力和拷贝数成正相关。15 拷贝时工程菌酶活力最高,酶活力为 351 U/mL,超过 15 拷贝时,酶活力降低。在 23 个拷贝时,酶活力仅为 15 拷贝的 62%。综上

所述,本研究实现了内切葡聚糖酶在酿酒酵母中的高效表达。

REFERENCES

- [1] Yu JM, Shi KQ, Wang SW, et al. Analysis of crop straw distribution in China and research progress on converting crop straw into fuel ethanol. *Biotechnol Business*, 2018, (4): 33–40 (in Chinese).
余建明, 施凯强, 王盛炜, 等. 我国秸秆分布情况及转化生产燃料乙醇的研究进展. *生物产业技术*, 2018, (4): 33–40.
- [2] Zhang XX, Chen FS, Xin Y, et al. Research progress of cellulose pretreatment technology. *Cereals Oils*, 2018, 31(6): 7–10 (in Chinese).
张晓旭, 陈复生, 辛颖, 等. 纤维素预处理技术的研究进展. *粮食与油脂*, 2018, 31(6): 7–10.
- [3] Rahman MS, Fernando S, Ross B, et al. Endoglucanase (EG) Activity Assays. *Methods Mol Biol*, 2018, 1796: 169–183.
- [4] Kim ES, Kim BS, Kim KY, et al. Aerobic and anaerobic cellulose utilization by *Paenibacillus* sp. CAA11 and enhancement of its cellulolytic ability by expressing a heterologous endoglucanase. *J Biotechnol*, 2018, 268: 21–27.
- [5] Hou JH, Zhang X, Qiao GX. Cloning, expression and activity of an Endo-1,4- β -D-glucanase from *Pantoea ananatis*. *Food Sci*, 2016, 37(23): 211–215 (in Chinese).
侯进慧, 张翔, 乔高翔. 菠萝泛菌 β -1,4-内切葡聚糖酶基因克隆、表达与酶活性分析. *食品科学*, 2016, 37(23): 211–215.
- [6] Iimura Y, Sonoki T, Habe H. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*, 2018, 141: 39–43.
- [7] Wang WG, Zhang QW, Zhao YL, et al. Progress on the research of *saccharomyces cerevisiae*'s breeding and its applications. *J Henan Univ Technol: Nat Sci Ed*, 2015, 36(6): 104–112 (in Chinese).
王卫国, 张仟伟, 赵永亮, 等. 酿酒酵母的选育及其应用研究进展. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2015, 36(6): 104–112.
- [8] Cutler S, Lee LJ, Tsukiyama T. Chromatin remodeling factors Isw2 and Ino80 regulate chromatin, replication, and copy number of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA locus. *Genetics*, 2018, 210(4): 1543–1556.
- [9] Zhang WZ, Tang JJ, Li BZ, et al. Effect of integration loci of genome on heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2016, 32(7): 901–911 (in Chinese).
张文政, 唐继军, 李炳志, 等. 酿酒酵母基因组位置效应对外源基因表达的影响. *生物工程学报*, 2016, 32(7): 901–911.
- [10] Sun HY. Optimization of expression and safety evaluation of the multi-copy human/salmon chimeric calcitonin in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015 (in Chinese).
孙恒一. 多拷贝人/鲑嵌合降钙素在酿酒酵母中表达优化及安全性评价研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [11] Zhao WX. Construction of high-yield β -glucosidase engineered strain and research of the effect on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* WXY12[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019 (in Chinese).
赵文萱. 高产 β -葡萄糖苷酶工程菌构建及对酿酒酵母 WXY12 发酵产乙醇的影响研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [12] Cassland P, Jönsson LJ. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(3): 393–400.
- [13] Kwan EX, Wang XS, Amemiya HM, et al. rDNA copy number variants are frequent passenger mutations in *Saccharomyces cerevisiae* deletion collections and *de novo* transformants. *G3 (Bethesda)*, 2016, 6(9): 2829–2838.
- [14] Sun Y, Joyce PA. Application of droplet digital PCR to determine copy number of endogenous genes and transgenes in sugarcane. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(11): 1775–1783.
- [15] Wu G, Zhang L, Wu YH, et al. Comparison of five endogenous reference genes for specific PCR detection and quantification of *Brassica napus*. *J*

- Agric Food Chem, 2010, 58(5): 2812–2817.
- [16] Zhang SW. Cloning and functional characterization of sugar transporter genes from *Saccharomyces cerevisiae* and using *Candida tropicalis* as a host [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
张思伟. 热带假丝酵母单糖转运蛋白基因的克隆鉴定及功能研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- [17] Xiao JL, Zhang ST, Sun XZ, et al. Construction of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* for lignin peroxidase production. *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60(5): 951–962 (in Chinese).
肖建龙, 张斯童, 孙晓仲, 等. 高效组成型分泌表达木素过氧化物酶酿酒酵母工程菌的构建. *微生物学报*, 2020, 60(5): 951–962.
- [18] Zhang YQ, Zhang YF, Long CL, et al. Construction of T vectors based on Xcm I recognition site and optimization of PCR fragments for ligation. *Chin J Appl Physiol*, 2016, 32(1): 46–50 (in Chinese).
张峰桥, 张雁芳, 龙超良, 等. 基于 XcmI 识别序列的 T 载体的构建及连接 PCR 片段的优化. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(1): 46–50.
- [19] Gao Y, Shi JJ, Fan DT. High-level production of active human fibroblast growth factor 1 using a dual-promoter vector in *Pichia pastoris*. *J Northwest Univ: Nat Sci Ed*, 2017, 47(5): 693–698 (in Chinese).
高源, 史静静, 范代娣. 利用双启动子质粒在毕赤酵母中高效表达人 FGF1. *西北大学学报: 自然科学版*, 2017, 47(5): 693–698.
- [20] Gietz RD. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method // Smith J, Burke D, Eds. *Yeast Genetics*. New York, NY: Humana Press, 2014, 1205: 1–12.
- [21] Gao LL, Wang QH, Liang HC, et al. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* haploid mutant deficient in lanosterol synthase gene. *Acta Pharmaceut Sin*, 2014, 49(5): 742–746 (in Chinese).
高丽丽, 王庆华, 梁会超, 等. 酿酒酵母羊毛甾醇合酶基因单倍体缺陷型突变株的构建. *药学报*, 2014, 49(5): 742–746.
- [22] Sinha M, Mack H, Coleman TP, et al. A high-resolution digital DNA melting platform for robust sequence profiling and enhanced genotype discrimination. *SLAS Technol*, 2018, 23(6): 580–591.
- [23] Kühnemund M, Hernández-Neuta I, Sharif MI, et al. Sensitive and inexpensive digital DNA analysis by microfluidic enrichment of rolling circle amplified single-molecules. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(8): e59.
- [24] Jiang Y, Hu JY, Yang LT. Estimating the exogenous genes copy number of genetically modified organisms by droplet digital PCR. *J Agric Biotechnol*, 2014, 22(10): 1298–1305 (in Chinese).
姜羽, 胡佳莹, 杨立桃. 利用微滴数字 PCR 分析转基因生物外源基因拷贝数. *农业生物技术学报*, 2014, 22(10): 1298–1305.
- [25] Jia P, Purcell MK, Pan G, et al. Analytical validation of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for quantitative detection of infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods*, 2017, 245: 73–80.
- [26] Arvia R, Sollai M, Pierucci F, et al. Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J Virol Methods*, 2017, 246: 15–20.
- [27] Miao H. Directed evolution of alkali resistance endoglucanase [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017 (in Chinese).
苗会. 耐碱内切葡聚糖酶的定向进化 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [28] Lillsunde LG, Helenius G. Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40(5): 521–527.
- [29] Velasco J, Oliva B, Mulinari EJ, et al. Heterologous expression and functional characterization of a GH10 endoxylanase from *Aspergillus fumigatus* var. *niveus* with potential biotechnological application. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2019, 24: e382.
- [30] Rungsa P, Janpan P, Saengkun Y, et al. Heterologous expression and mutagenesis of recombinant *Vespa affinis* hyaluronidase protein (rVesA2). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2019, 25(21): e20190030.
- [31] Mordkovich NN, Okorokova NA, Veiko VP. Structural and functional organization of the signal peptide of proenterotoxin B from *Staphylococcus*

- aureus*. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2015, 51(6): 561–569.
- [32] Villanueva M, Jousselin A, Baek KT, et al. Rifampin resistance *rpoB* alleles or multicopy thioredoxin/thioredoxin reductase suppresses the lethality of disruption of the global stress regulator *spx* in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2016, 198(19): 2719–2731.
- [33] de Macedo Robert J, Garcia-Ortega X, Montesinos-Seguí JL, et al. Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter PGK in *Pichia pastoris*. Biochem Eng J, 2019, 147: 39–47.
- [34] Madhavan A, Pandey A, Sukumaran RK. Expression system for heterologous protein expression in the filamentous fungus *Aspergillus unguis*. Bioresour Technol, 2017, 245: 1334–1342.
- [35] Ziska A, Tatzelt J, Dudek J, et al. The signal peptide plus a cluster of positive charges in prion protein dictate chaperone-mediated Sec61 channel gating. Biol Open, 2019, 8(3): bio040691.
- [36] Han S, Machhi S, Berge M, et al. Novel signal peptides improve the secretion of recombinant *Staphylococcus aureus* Alpha toxin_{H35L} in *Escherichia coli*. AMB Expr, 2017, 7: 93.
- [37] Aw R, McKay PF, Shattock RJ, et al. A systematic analysis of the expression of the anti-HIV VRC01 antibody in *Pichia pastoris* through signal peptide optimization. Protein Expr Purif, 2018, 149: 43–50.
- [38] Rawsthorne H, Turner KN, Mills DA. Multicopy integration of heterologous genes, using the lactococcal group II intron targeted to bacterial insertion sequences. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9): 6088–6093.
- [39] Tamakawa H, Ikushima S, Yoshida S. Construction of a *Candida utilis* strain with ratio-optimized expression of xylose-metabolizing enzyme genes by cocktail multicopy integration method. J Biosci Bioeng, 2013, 115(5): 532–539.
- [40] Lan X, Zhang ST, Li Z, et al. Application of droplet digital PCR in screening of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* for multicopy expression of xylanase. Food Sci, 2018, 39(10): 179–184 (in Chinese).
兰雪, 张斯童, 李哲, 等. 微滴数字PCR技术在多拷贝木聚糖酶酿酒酵母工程菌筛选中的应用. 食品科学, 2018, 39(10): 179–184.
- [41] Lu Y, Zhong H, Tang Q, et al. Construction and verification of CYP3A5 gene polymorphisms using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system to predict drug metabolism. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 1593–1600.
- [42] Liu HY, Shu ZY, Wu SG, et al. Study on cloning and expression of endoglucanase gene from *Trichoderma longibrachiatum*[C]. 2009 Academic Exchange Meeting of the Society of Biochemistry and Molecular Biology in Six Provinces and One City, Hefei, Anhui, China, 2009 (in Chinese).
刘海英, 舒正玉, 吴松刚, 等. 长梗木霉内切葡聚糖酶基因的克隆与表达研究//华东六省一市生物化学与分子生物学会2009年学术交流会论文摘要汇编. 合肥: 山东省科学技术协会, 2009.
- [43] Chahed H, Boumaiza M, Ezzine A, et al. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel thermostable *Sclerotinia sclerotiorum* GH45 endoglucanase in *Pichia pastoris*. Int J Biol Macromol, 2018, 106: 629–635.

(本文责编 郝丽芳)