

毕赤酵母蛋白质糖基化途径的改造

马加胤^{1,2}, 裴彩霞², 尹彬茹², 刘翔远³, 刘丽^{*1}, 金城^{*2}

1 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095

2 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

3 北京国科星联科技有限公司, 北京 100108

马加胤, 裴彩霞, 尹彬茹, 刘翔远, 刘丽, 金城. 毕赤酵母蛋白质糖基化途径的改造[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4311-4321.

MA Jiayin, PEI Caixia, YIN Binru, LIU Xiangyuan, LIU Li, JIN Cheng. Modification of *Pichia kudriavzevii* cells for humanized glycosylation[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4311-4321.

摘要: 【背景】以酵母为宿主生产的蛋白往往发生过糖基化, 形成高甘露糖型的 *N*-糖基化。高甘露糖型的结构易在人体中引起免疫反应, 这是酵母不能用于绝大部分糖蛋白药物生产的主要限制因素。因此, 构建表达人源糖基化糖蛋白的酵母底盘细胞将为糖蛋白药物的生产提供强有力的工具。库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)具有极强的抗逆性且生长迅速, 是一种近年来备受关注的非典型性酵母, 对其进行糖基化途径的改造将具有巨大的应用前景。【目的】对酵母 *N*-糖基化途径的改造, 首先要使其 *N*-糖基化转变为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 核心结构, 本研究对 *P. kudriavzevii* 的 *och1* 基因进行敲除并引入源自曲霉的 *msdS* 基因, 以改变其分泌糖蛋白 *N*-糖链的糖型结构。【方法】通过基因编辑对 *P. kudriavzevii* 的 *N*-糖基化途径进行改造, 获得 *P. kudriavzevii* $\Delta\text{ura3}\Delta\text{och1}::\text{msdS}$ 菌株, 分析 *P. kudriavzevii* $\Delta\text{ura3}\Delta\text{och1}::\text{msdS}$ 菌株分泌糖蛋白上 *N*-糖链的变化。【结果】与野生型 *P. kudriavzevii* 相比, *P. kudriavzevii* $\Delta\text{ura3}\Delta\text{och1}::\text{msdS}$ 菌株分泌糖蛋白上的 *N*-糖链中可检测到 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 型糖链结构。【结论】通过敲除 *och1* 基因和引入曲霉 *msdS* 基因, 可使 *P. kudriavzevii* 合成 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖链结构, 为后续糖基化途径的改造奠定了基础。

关键词: *Pichia kudriavzevii*; CRISPR-Cas9 基因编辑; *N*-链寡糖; 底盘细胞

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910601)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910601).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Li, lichen.liu@njau.edu.cn; JIN Cheng, jinc@im.ac.cn

Received: 2023-03-15; Accepted: 2023-05-28; Published online: 2023-06-16

Modification of *Pichia kudriavzevii* cells for humanized glycosylation

MA Jiayin^{1,2}, PEI Caixia², YIN Binru², LIU Xiangyuan³, LIU Li^{*1}, JIN Cheng^{*2}

1 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 CAS Star Union Limited Company, Beijing 100108, China

Abstract: [Background] Proteins produced by yeast usually undergo hyper glycosylation and form high mannose-type *N*-glycans, which can induce immune reactions in humans. As a result, the use of yeast is limited in the production of glycoprotein in drugs. Modifying the glycosylation pathway in yeast is a feasible approach for the production of glycoproteins used in drugs. *Pichia kudriavzevii*, a non-typical yeast species with strong stress resistance and rapid growth, has attracted much attention in recent years. By humanized glycosylation, *P. kudriavzevii* will serve as a cell factory to produce glycoproteins. [Objective] To obtain Man₅GlcNAc₂, the core structure of human *N*-glycan, is the key step to modify the glycosylation pathway in yeast. To achieve this goal, we deleted *och1* of *P. kudriavzevii* and introduced *msdS* of *Aspergillus* into *P. kudriavzevii*. [Methods] The CRISPR-Cas9 system was employed to modify the *N*-glycosylation pathway of *P. kudriavzevii*, and the modified strain Δ *ura3* Δ *och1::msdS* was obtained. Furthermore, the *N*-glycome of the glycoproteins secreted by Δ *ura3* Δ *och1::msdS* was analyzed. [Results] The *N*-linked Man₅GlcNAc₂ was detected on the glycoproteins secreted by Δ *ura3* Δ *och1::msdS*. [Conclusion] After the deletion of *och1* and the introduction of *msdS* from *Aspergillus*, *P. kudriavzevii* cells can secrete the proteins with *N*-linked Man₅GlcNAc₂, which underpins the further humanized glycosylation in *P. kudriavzevii*.

Keywords: *Pichia kudriavzevii*; CRISPR-Cas9 system; *N*-glycan; chassis cell

酵母表达系统作为一种近年来快速发展的真核表达系统，能对自身分泌的蛋白进行糖基化修饰，并且具有发酵周期短、培养成本低、遗传操作简单和分泌的内源蛋白少等特点，被认为是最佳的糖蛋白表达工具。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是常用于生产重组蛋白的酵母宿主菌，其中，酿酒酵母作为宿主已经被广泛应用于像人胰高血糖素样肽、重组凝血因子、人乳头瘤病毒疫苗和尿酸氧化酶等多种治疗性蛋白产品的工业化生产^[1]。尽管酵母细胞表达系统能够对表达的蛋白进行糖基化修饰，但其高甘露糖

型 *N*-糖链不仅改变了糖蛋白的药物代谢动力学，导致糖蛋白药物的半衰期缩短^[2]，还具有免疫原性^[3]，限制了其在药物蛋白生产中的应用。因此，对酵母细胞进行 *N*-糖基化的人源化改造是推动酵母底盘细胞广泛应用于糖蛋白生产的关键^[4]。

对酵母细胞糖基化途径的改造早期主要在酿酒酵母中进行，通过一系列改造将其糖蛋白上的糖链变为更接近人源的 *N*-糖链核心结构 Man₅GlcNAc₂^[5]。然而糖基化途径的改造也给酿酒酵母细胞带来了巨大的负面影响，包括细胞壁完整性缺陷、细胞生长缺陷及蛋白产量下降

等^[6]。与酿酒酵母相比, 毕赤酵母的甘露糖基化程度远不如酿酒酵母, 阻断毕赤酵母高甘露糖型的合成也未影响细胞的正常生长^[7], 因此后期的酵母糖基化途径改造主要在毕赤酵母中进行。已经改造出的毕赤酵母底盘细胞能稳定产生 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 结构的糖蛋白^[8-9]。截至目前, 部分人源糖基化的酵母底盘细胞已在商业上得到应用, 如 BioGrammatics 公司和 Research Corporation Technologies (RCT) 公司合作开发的毕赤酵母底盘细胞^[10-11]以及默克子公司 GlycoFi 研发的毕赤酵母底盘细胞^[12], 主要用于小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、小鼠白介素-22、转铁蛋白、干扰素 β 、促红细胞生长素 (erythropoietin, EPO) 和 IgG 的生产。尽管以毕赤酵母为底盘细胞的人源化改造已经有了很大进展, 但这些改造仅限于常规的毕赤酵母且受专利保护, 因此, 研发新的酵母人源化糖蛋白表达底盘细胞具有重要的现实意义。

α -1,6-甘露糖转移酶 Och1 是酵母形成高甘露糖基化的第一步和最关键的酶, 其作用是在高尔基体 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 的 *N*-糖链上添加一个甘露糖残基而形成 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 结构, 随后在其他甘露糖转移酶的催化下继续添加甘露糖残基, 最终形成高甘露糖型的 *N*-糖链结构^[3,13]。因此对酵母进行糖基人源化改造, 首先要敲除 *och1* 基因以阻断库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 形成高甘露糖型糖基化的第一步^[5-13]。与酵母不同, 丝状真菌烟曲霉的分泌蛋白上 *N*-糖链结构为 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, 与哺乳动物糖蛋白 *N*-糖链核心结构相同。该 *N*-糖链结构产生由 *msdS* 基因编码的高尔基体 α -1,2-甘露糖苷酶负责, 可将进入高尔基体的糖蛋白上 *N*-糖链 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 加工为 $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$ ^[14]。

P. kudriavzevii 在自然界中广泛分布, 常发现于各种天然发酵的果实和土壤中, 这些生态

位存在各种环境压力: 低氧、低 pH 值、高温和高乙醇浓度等^[15]。因此, *P. kudriavzevii* 有着天然的生理代谢优势。*P. kudriavzevii* LC375240 菌株有着很好的耐热性, 能够在 37 °C 甚至在 42 °C 培养条件下仍旧保持良好的生长状态, 同时该菌株也表现出对多种胁迫强烈的耐受性, 如乙酸、糠醛、甲酸和 H_2O_2 等, 有成为工业底盘细胞的潜力^[16]。本研究通过基因编辑技术对 *P. kudriavzevii* 的糖基化途径进行改造, 以期获得哺乳动物 *N*-糖链的起始结构。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与生长条件

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 购于北京金沙生物科技有限公司; *P. kudriavzevii* LC375240 菌株为本实验室分离; *P. kudriavzevii* Δ *ura3* 菌株和 *pk-Cas9* 基因编辑质粒为本实验室构建。大肠杆菌 DH5 α 在 LB 培养基 (胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L) 中 37 °C 培养; *P. kudriavzevii* 在 YPD (yeast extract peptone dextrose) 培养基 (胰蛋白胨 20.0 g/L, 酵母提取物 10.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L) 中 30 °C 培养。以上培养基配制成固体培养基需加入 20 g/L 琼脂粉。配制完成后 121 °C 灭菌 20 min。葡萄糖与其他培养基成分需分开灭菌, 葡萄糖灭菌条件为 115 °C 15 min。SD (synthetic drop-out) 平板的配制: 称取 26.7 g Minimal SD Base 溶于 1 L 去离子水, 然后于灭菌锅中 115 °C 灭菌 20 min, 待培养基温度降至 55 °C 时制作平板。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨和酵母提取物, 安琪酵母股份有限公司; 氯化钠和葡萄糖, 国药集团化学试剂有限公司; D-山梨醇, 北京索莱宝科技有限公司; 无水乙酸锂, 上海麦克林生化科技有限公司; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), 军科弘创

(北京)生物技术有限公司; Minimal SD Base, 北京酷来搏科技有限公司; KOD FX DNA Polymerase, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, Axygen 公司; 同源重组试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶 *Dpn* I, Thermo Scientific 公司; 酵母总 RNA 快速提取试剂盒, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司; FastKing cDNA 第一链合成试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; KAPA SYBR[®] FAST qPCR 试剂盒, KAPA Biosystems 公司。基因扩增仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; FiveEasy Plus pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 可见分光光度计、真空离心浓缩干燥机、超低温保存冰箱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪, AB SCIEX 公司; 电转仪、实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.3 α -1,6-甘露糖转移酶序列检索

在 NCBI 网站上查找酿酒酵母(*S. cerevisiae*)与巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)的 α -1,6-甘露糖转移酶 Och1 的氨基酸序列,并在 *P. kudriavzevii* LC375240 菌株中找到相似的氨基酸序列与模式酵母序列进行比对。

1.4 CRISPR-Cas9 基因编辑质粒的构建

1.4.1 gRNA 的设计

利用 CRISPR 在线设计网站(<http://chopchop.cbu.uib.no/>)设计 *P. kudriavzevii* 靶标基因(*och1*)的 gRNA 靶向序列(20 bp),在得到的序列中根据实际条件选择最合适的 gRNA 靶向序列。

1.4.2 线性化载体的制备

设计引物 Line-Fw (5'-CATTCAAATATGTA TCCGCTC-3')和 Line-Rv (5'-GTCTACTGTAAT ACAATCCC-3'),以 pk-Cas9 质粒为模板,利用

反向 PCR 技术对 pk-Cas9 载体进行线性化。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times KOD buffer 25 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 10 μ L, 正向引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L, DNA 模板(160 ng/ μ L) 1 μ L, KOD polymerase (1 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 9 min, 共 35 次循环; 68 $^{\circ}$ C 5 min。使用限制性内切酶 *Dpn* I 对线性化 DNA 纯化产物进行酶切。

1.4.3 gRNA 靶向序列的更换

设计引物 P1 (5'-CAGTGGCGACACACTA TG-3')和 P2 (5'-TGAGCACTTACAATGCACGT GTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3')以及 P3 (5'-AC GTGCATTGTAAGTGCTCATGCATAAGACAGG GTTCG-3')和 P4 (5'-ACGTTCTTCGGGGCGAA A-3'),以 pk-Cas9 质粒为模板扩增目标片段。以 P1、P4 为引物利用重叠 PCR 技术更换 gRNA 靶向序列。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times KOD buffer 25 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 10 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1.5 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L, DNA 模板(160 ng/ μ L) 1 μ L, KOD polymerase (1 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 次循环; 68 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,在成像仪中查看电泳结果并切取目标条带,用凝胶回收试剂盒进行 DNA 纯化回收。

1.4.4 *och1* 基因编辑质粒的构建

将扩增得到的目的基因与线性化载体进行体外同源重组,采用热激转化的方法转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,对转化子进行菌落 PCR 验证。PCR 反应体系(10 μ L): 2 \times Taq Plus Master Mix 5 μ L, 正向引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L, ddH₂O 4.2 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C

15 s, 72 °C 1 min, 共 35 次循环; 72 °C 5 min。然后提取阳性转化子的质粒进行测序, 测序正确的质粒即为 *och1* 基因编辑质粒, 于 -20 °C 保存。

1.5 酵母感受态的制备及电转化

挑取 *P. kudriavzevii* 单菌落于 5 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜。将培养过夜的菌液按 1% 的接种量接种于 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 扩大培养。待扩大培养的酵母菌液 OD_{600} 为 1.3–1.5 时, 将菌液置于 50 mL 离心管中, 4 °C、5 000×g 离心 5 min 后弃上清; 沉淀的菌体用 50 mL 无菌 ddH₂O 洗 2 次, 加入 20 mL 预处理液(100 mmol/L 乙酸锂, 10 mmol/L DTT, 0.6 mol/L 山梨醇, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 30 °C、100 r/min 培养 30 min 后, 4 °C、5 000×g 离心 5 min 后弃上清; 用 20 mL 山梨醇(1 mol/L)洗 2 次; 最后用 200 μL 山梨醇(1 mol/L)重悬。将 80 μL 的酵母感受态与 500 ng *pk-Cas9-och1* 质粒、1 μg 的供体 DNA 混匀, 加入预冷 2 mm 电击杯中, 冰浴 5 min 后, 电击转化(2.5 kV, 5 ms, 25 μF), 电击后立即加入 1 mL 山梨醇和 1 mL YPD, 30 °C 复苏 2 h, 最后取 200 μL 涂布于 SD 平板上于 30 °C 培养。

1.6 *Pichia kudriavzevii* Δ *ura3* Δ *och1::msdS* 菌株的筛选

待 SD 平板长出转化子后进行 PCR 验证, 挑取单菌落转化子溶于 10 μL 20 mmol/L NaOH 溶液中, 98 °C 反应 40 min 释放基因组 DNA, 吸取 1 μL 上清作为 PCR 模板, 以野生型 *P. kudriavzevii* 基因组作为对照。设计引物 F (5'-TCAGGGAG GAAAACACGAAAC-3') 和 R (5'-TTGAGTCGT CTAGCACAAAC-3'), 以基因组 DNA 为模板, 使用 *Taq* 酶进行扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×*Taq* Plus Master Mix 25 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 2 μL, 模板 DNA (80 ng/μL) 1 μL,

ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 6 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 2 min, 共 35 次循环; 72 °C 5 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在成像仪中查看电泳结果。

1.7 RT-qPCR 检测 *msdS* 基因的表达量

酵母 RNA 的提取按照酵母总 RNA 快速提取试剂盒的操作说明书进行, 总 RNA 的浓度与纯度使用 NanoDrop 超微量分光光度计测定浓度及 A_{260}/A_{280} , cDNA 的合成使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录反应体系: 总 RNA (500 ng/μL) 2 μL, 5×gDNA buffer 2 μL, 加 RNase-Free ddH₂O 至 10 μL, 混匀后在 42 °C 反应 3 min 去除基因组 DNA, 在 10 μL 反应液中加入 2 μL 10×King RT buffer, 1 μL FastKing RT Enzyme Mix, 2 μL FQ-RT Primer Mix, 加 RNase-Free ddH₂O 至 20 μL, 混匀后 42 °C 孵育 15 min, 95 °C 孵育 3 min, 反应结束后于 -20 °C 储存。以肌动蛋白基因(*act1*) 为内参基因(引物 *act1-F*: 5'-GGTAGACCAAG ACATCAAGG-3'; 引物 *act1-R*: 5'-CCATATCAT CCCAGTTGGTG-3')。设计引物 *msds-F* (5'-GCA TTTACCCTCTTTGTCCG-3') 和 *msds-R* (5'-CAT ATACCCATCCCAGGCATG-3'), 以 cDNA 为模板, 用 KAPA SYBR® FAST qPCR 试剂盒在实时荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应体系: cDNA 模板(1 μg/μL) 1 μL, 正、反向引物(10 μmol/L) 各 0.4 μL, 2×KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μL, 50×ROX High 0.4 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 共 40 次循环; 循环结束后从 65 °C 缓慢升温至 95 °C, 每 5 s 升温 0.5 °C, 采集荧光信号。采用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析数据。计算公式: $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因 Mutant}} - C_{t \text{ 内参基因 Mutant}}) - (C_{t \text{ 目的基因 WT}} - C_{t \text{ 内参基因 WT}})$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示突变株中目的基因的转录水平相较于野生型中目的基因的变化倍数^[17]。

1.8 酵母分泌蛋白的提取

将 YPD 平板上生长的单菌落接种到 5 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜制成种子液。将种子液扩大培养接种至 100 mL YPD 培养基中, 接种量为 1%, 30 °C、200 r/min 培养 4 d。将培养 4 d 的发酵液于 6 000 r/min 离心 20 min, 分离上清与沉淀, 上清即为 *P. kudriavzevii* 分泌蛋白。取适量的分泌蛋白加入三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA) 至终浓度为 20%, 充分混匀以沉淀蛋白, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。沉淀用 100% 丙酮重悬, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复该步骤 2 次以去除游离寡糖。将沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 溶解。

1.9 N-糖链的解析

采用 PNGase F 特异酶切 N-糖链的方法进行解析, 10 µg 酵母分泌蛋白中, 加入 1 µL 的 10×糖蛋白变性缓冲液 (含 0.5% SDS 和 40 mmol/L DTT), 置于 100 °C 金属浴中反应 10 min 使其变性。待反应体系的温度降至室温后, 再加入 1% NP-40 的 1×反应缓冲液 (pH 7.5 的 50 mmol/L 磷酸钠) 和 1 µL PNGase F (50 U/µL) 酶液, 于 37 °C 恒温培养箱中反应 60 min。酶切结束后, 75 °C 金属浴反应 10 min, 使酶热失活。然后将整个反应体系于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 将上清部分置于 Ep 管中并加入 3 倍体积的无水乙醇在 4 °C 条件下过夜。将过夜反应的体系于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取出上清部分于真空离心浓缩干燥机中旋干。加入超纯水溶解旋干的 N-糖链, 通过 Supelclean™ ENVI-Carb™ 预装柱纯化 N-链寡糖, 具体步骤如下: 用 3 倍柱体积的 80% 乙腈 (acetonitrile, ACN) [含 0.1% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 溶液] 和 3 倍柱体积的超纯水活化预装碳柱; 将超纯水复溶的 N-糖链反应体系转移至预装碳柱内, 使其在不受外力的

作用下自然流出; 用 3 倍柱体积的超纯水冲洗预装碳柱; 分别用 1.5 mL 20% ACN (含 0.1% TFA 溶液) 和 40% ACN (含 0.1% TFA 溶液) 对预装碳柱中结合的 N-链寡糖进行洗脱。将收集得到的洗脱液于真空离心浓缩干燥机中旋干^[18]。

将旋干的样品用 10 µL ddH₂O 复溶, 取 1 µL 点样在靶板上, 待其完全干燥后, 加入 1 µL 基质 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) 溶液 (6 mg DHB 溶于 70% ACN, 含 1 mmol/L NaCl) 覆盖样品, 再次干燥后, 可用于基质辅助激光离子化飞行时间质谱 (matrix assisted laser ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 检测。同时, 将马心肌红蛋白的胰蛋白酶酶解肽段与 α-氰基-4-羟基肉桂酸 (α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid, HCCA) 混合后, 取出 1 µL 点样于靶板上作为标准肽校正溶液。以标准肽进行校正, 使仪器的准确度达到 0.1 Da。检测模式选择正离子模式, 加速电压设置为 20 kV, 扫描范围为 $m/z=1\ 000-2\ 500$, 激光能量为 6 000。所得到的 N-糖链一级质谱图通过 GlycoWorkbench 进行分析^[18]。

2 结果与分析

2.1 α-1,6-甘露糖转移酶序列比对分析

在 NCBI 检索到 *S. cerevisiae* 与 *P. pastoris* 的 α-1,6-甘露糖转移酶 Och1 的氨基酸序列, 其序列号分别是 NP_011477.1 和 ANZ74831.1。如图 1 所示, *P. kudriavzevii* LC375240 菌株的 α-1,6-甘露糖转移酶 Och1 的氨基酸序列与 *S. cerevisiae* 和 *P. pastoris* 的相似度都为 44.3%, 说明 *P. kudriavzevii* LC375240 菌株的 α-1,6-甘露糖转移酶 Och1 与模式酵母之间存在高度的保守性, 其功能也可能相同或者非常相似。

2.2 och1 基因敲除与 msdS 基因引入

为获得表达人源核心 N-糖链结构的

P. kudriavzevii 细胞, 我们采取敲除 *och1* 基因的同时引入曲霉 *msdS* 基因的策略。以 pk-Cas9 质粒为模板, 利用反向 PCR 技术将载体线性化, 线性化载体片段大小为 9 822 bp (图 2A); 利用重叠 PCR 技术更换 gRNA 靶向序列, 目标条带大小为 1 020 bp (图 2B)。

将构建好的基因编辑质粒 pk-Cas9-*och1* 与供体 DNA 电转入 *P. kudriavzevii* 感受态细胞中, 在 SD 基本培养基平板上进行筛选, 待平板长

出转化子后, 提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。其中未敲除 *och1* 基因且未引入 *msdS* 基因的条带大小为 1 718 bp, 与对照组条带相同。敲除 *och1* 基因且引入 *msdS* 基因的条带大小为 2 000 bp。经过大量的筛选, 发现 4 号转化子为目标纯合子突变株(图 2C)。

2.3 *msdS* 基因转录分析

分别以 *P. kudriavzevii* Δ *ura3* 和 Δ *ura3* Δ *och1*::*msdS* 菌株的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 分析。

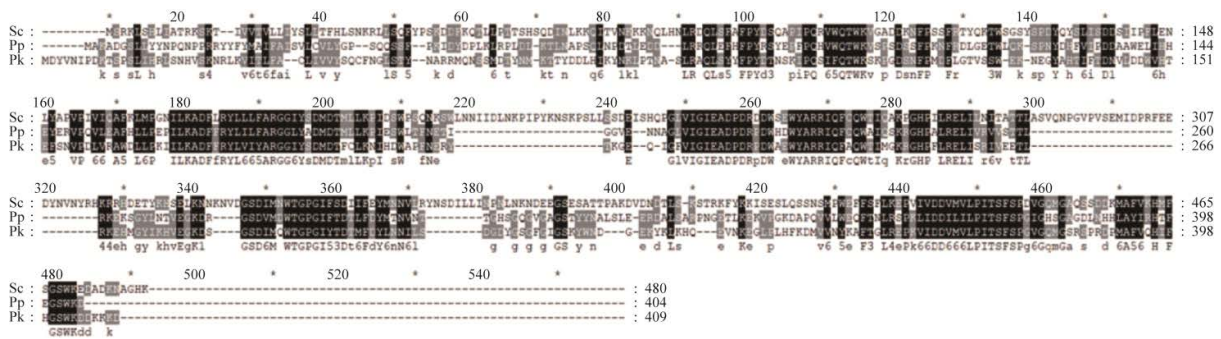


图 1 不同酵母来源 α -1,6-甘露糖转移酶的序列比对

Figure 1 Sequence alignment of α -1,6-mannosyltransferase from different yeasts.

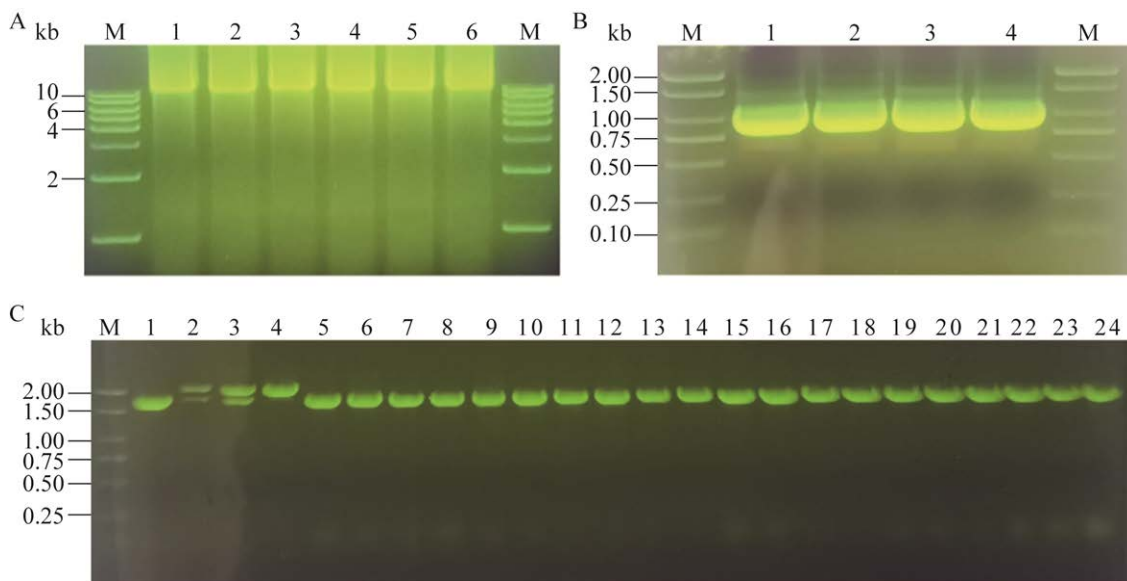


图 2 线性化载体(A)、重叠 PCR (B)和 *ura3* 基因敲除株(C)的 PCR 扩增结果

Figure 2 PCR results of linearized vector (A), overlap PCR (B) and *ura3* mutant strains (C). M: DNA Marker; 1–20: Transformants; 21–23: Control.

以 *P. kudriavzevii* 中的 *och1* 基因作为对照, 定量检测引入 *msdS* 基因在转录水平的表达量, RT-qPCR 结果如图 3 所示。以 *act1* 作为内参基因, 未经密码子优化的 *msdS* 基因在转录水平的表达量仅为野生型中 *och1* 基因表达量的 1/6 (图 3A)。经宿主密码子优化后的 *msdS* 基因在转录水平的表达量是野生型中 *och1* 基因表达量的 3.5 倍 (图 3B)。说明经宿主密码子优化的 *msdS* 基因可在 $\Deltaura3\Deltaoch1::msdS$ 菌株中有较高水平的表达。

2.4 基因编辑后菌株 *N*-糖链的变化

为检测 *P. kudriavzevii* $\Deltaura3$ 和 $\Deltaura3\Deltaoch1::msdS$ 菌株分泌蛋白上的 *N*-糖链结构, 收集菌株培养上清液中的分泌蛋白, 经 PNGase F 酶特异释放分泌蛋白上 *N*-糖链后, 对释放的 *N*-糖链进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析。如图 4A 所示, 野生型 *P. kudriavzevii* 分泌糖蛋白中存在 3 种 *N*-糖链类型, 分别为 m/z 1 597.798 [M+K]⁺、 m/z

1 744.871 [M+Na]⁺ 和 m/z 1 905.928 [M+Na]⁺, 它们对应的结构依次是 Man₇GlcNAc₂、Man₈GlcNAc₂ 和 Man₉GlcNAc₂。与野生株相比, $\Deltaura3\Deltaoch1::msdS$ 菌株分泌蛋白的 *N*-糖链未发现上述 *N*-糖链类型, 而是出现了 m/z 1 257.607 [M+Na]⁺ 的峰, 对应于 Man₅GlcNAc₂ *N*-糖链结构 (图 4B)。

为了进一步确认 Man₅GlcNAc₂ 的糖链结构的正确性, 采用 MALDI-TOF-MS/MS 对 m/z 1 257.607 [M+Na]⁺ 的组分进行二级解析。母离子 m/z 1 257.607 的二级谱图中 (图 5), 可以看到该母离子产生的主要碎片峰都可以进行归属, 进一步确定了该分子量的结构类型为 Man₅GlcNAc₂, 说明 *P. kudriavzevii* $\Deltaura3\Deltaoch1::msdS$ 可形成哺乳动物细胞的 *N*-糖链核心结构 Man₅GlcNAc₂。表明改造后的 *P. kudriavzevii* $\Deltaura3\Deltaoch1::msdS$ 菌株形成了哺乳动物细胞的 *N*-糖链核心结构 Man₅GlcNAc₂。

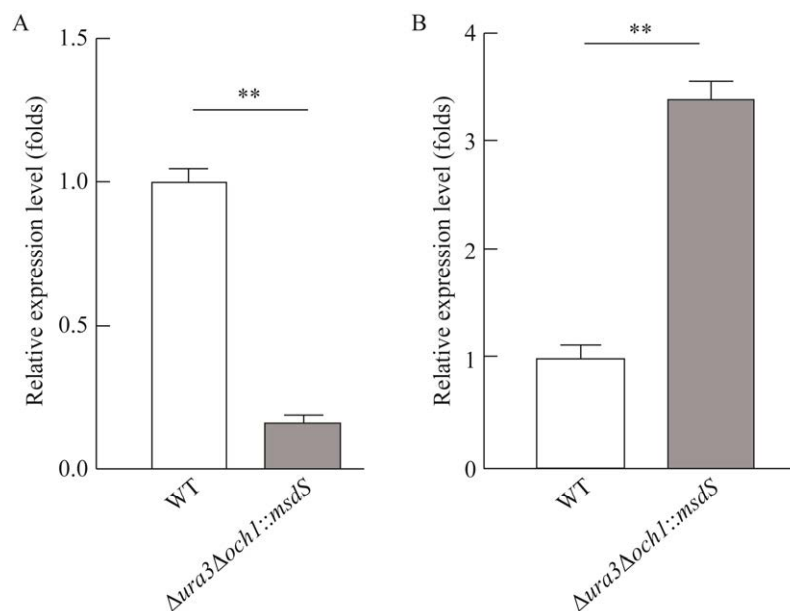


图 3 目标基因 RT-qPCR 分析 A: 未经宿主密码子优化. B: 经宿主密码子优化

Figure 3 RT-qPCR analysis of the target gene. **: $P < 0.05$. A: Not optimized by the host codon. B: Optimized by the host codon.

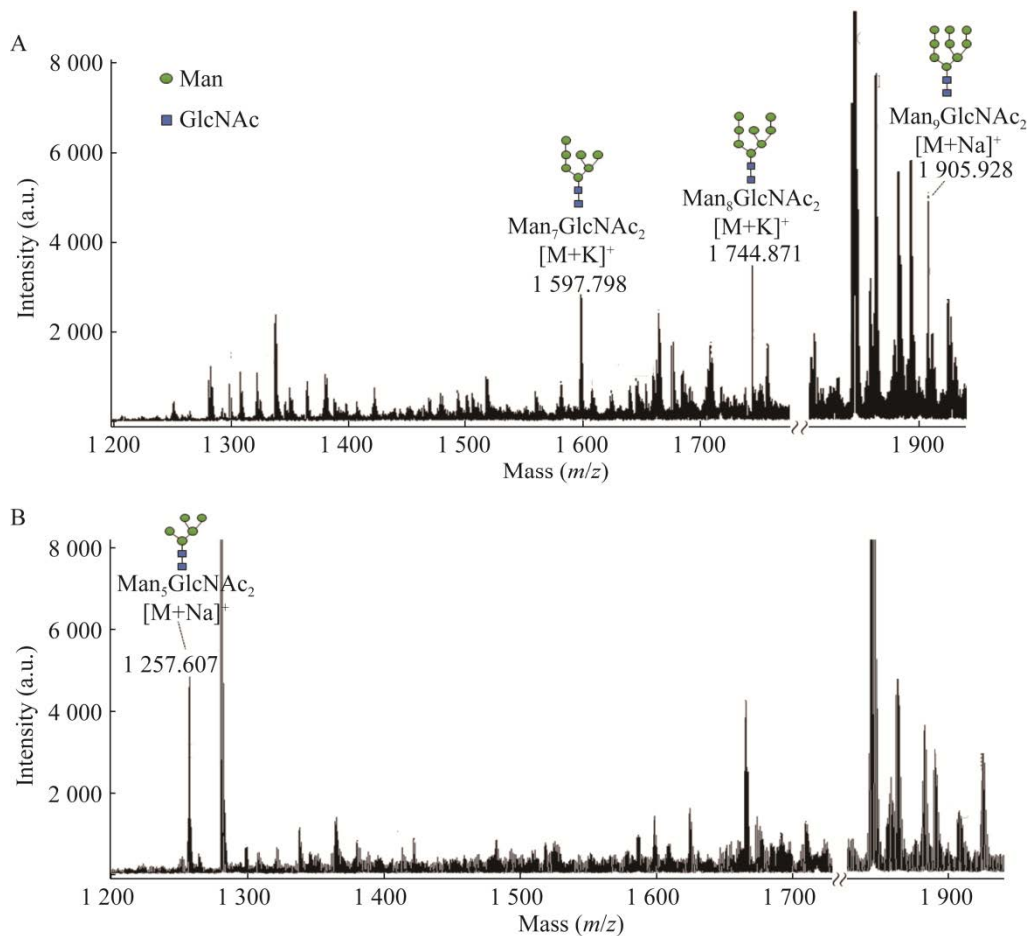


图4 野生型 *Pichia kudriavzevii* (A)和基因编辑后菌株(B)的 *N*-糖链 MALDI-TOF-MS 分析

Figure 4 MALDI-TOF-MS analysis of *N*-glycans from *Pichia kudriavzevii* wild-type (A) and *Dura3Δoch1::msd1* strain (B).

3 讨论与结论

在真核细胞中 *N*-糖基化都起始于内质网, 其异质性出现在高尔基体内的后续加工过程中, 在不同真核生物细胞中可产生不同的 *N*-糖链结构。内质网中的 *N*-糖基化修饰在所有真核细胞中都是高度保守的, 首先合成由葡萄糖、甘露糖、*N*-乙酰葡萄糖胺与磷酸多萜醇构成的脂多糖前体 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, 该前体被转移至新生肽链 Asn-X-Ser/Thr 序列的天冬酰胺残基上。随后在葡萄糖苷酶I和II的作用下切除3个葡萄糖残基, 再被内质网甘露糖苷酶I切除一个

甘露糖, 形成 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 结构^[4]。在酵母中, 携带 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖链的蛋白被转运到高尔基体中以后, 会在 α -1,6-甘露糖基转移酶 *Och1* 的催化下, 在 α -1,3-甘露糖分支末端添加一个甘露糖, 随后再由其他的甘露糖转移酶催化, 继续添加甘露糖, 最终形成高甘露糖型的 *N*-糖链结构^[13]。然而在哺乳动物细胞中, *N*-糖链会在高尔基体中被甘露糖苷酶加工成 $\text{Man}_{3,5}\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ 的核心结构, 然后在核心结构上添加 GlcNAc 、 Gal 、 NeuAc 和 Fuc 残基形成复杂型或杂合型 *N*-糖链。因此要对酵母细胞的糖基化途径进行人源化改造, 首先需要阻断其 *N*-糖链中甘露糖

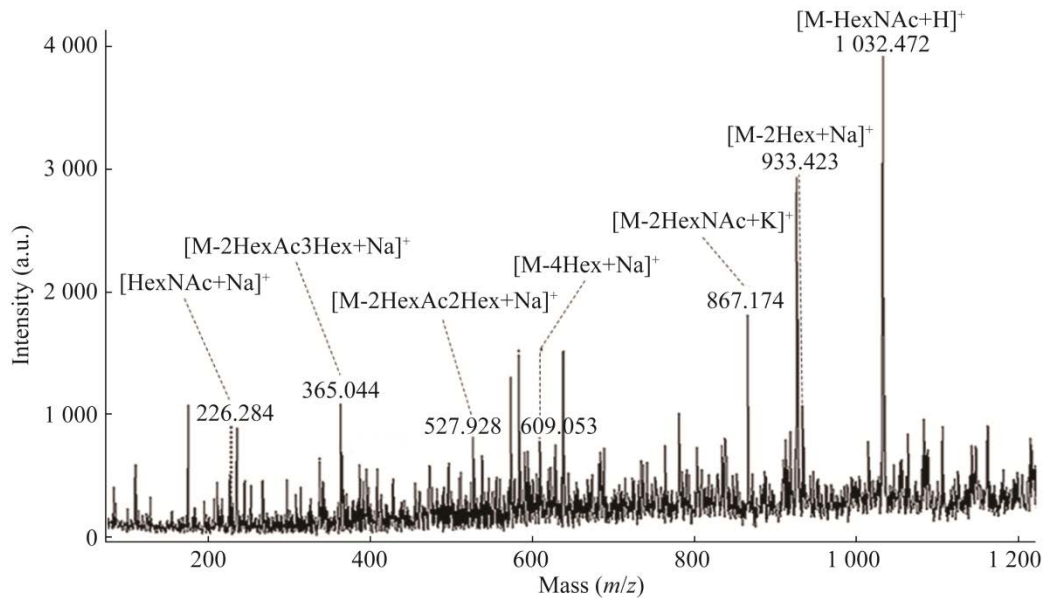


图5 m/z 1 257.607 $[M+Na]^+$ 质谱峰的 MALDI-TOF-MS/MS 分析

Figure 5 MALDI-TOF-MS/MS analysis of the m/z 1 257.607 $[M+Na]^+$ peak from *Pichia kudriavzevii* Δ *ura3* Δ *och1::msdS* strain.

残基在高尔基体中的继续添加,为此需要阻断高甘露糖型 *N*-糖链合成起始的过程,即敲除负责延伸反应的第一个甘露糖基转移酶基因 *och1*。

我们前期的研究表明,烟曲霉 *msdS* 基因编码一个高尔基体 α -甘露糖苷酶 I,可将 *N*-糖链的 $Man_8GlcNAc_2$ 结构加工为 $Man_5GlcNAc_2$ ^[14]。我们最近的研究显示,将该基因转入里氏木霉后可将里氏木霉分泌糖蛋白上的 *N*-糖链由出发株的 $Man_8GlcNAc_2$ 加工为 $Man_6GlcNAc_2$,能促进纤维素酶的分泌,并且细胞壁完整性未受影响^[19]。因此,我们在本研究中尝试用烟曲霉 α -甘露糖苷酶 I 基因 *msdS* 对 *P. kudriavzevii* 的糖基化途径进行改造。在 *P. kudriavzevii* Δ *ura3* 菌株中敲除 *och1* 基因的同时引入了 *msdS* 基因。转录分析显示 *msdS* 基因在 Δ *ura3* Δ *och1::msdS* 菌株中高表达,未能证明 Δ *ura3* Δ *och1::msdS* 菌株表达了 MsdS 蛋白。我们曾经用在大肠杆菌

中表达的 MsdS 蛋白制备抗体,但遗憾的是未能获得可用于 Western blotting 的特异性抗体^[19]。即便如此,对 Δ *ura3* Δ *och1::msdS* 菌株分泌糖蛋白上的 *N*-糖链进行 MALDI-TOF-MS 分析证明,其 *N*-糖链结构从野生型的 $Man_{7,9}GlcNAc_2$ 变为 $Man_5GlcNAc_2$,说明 MsdS 蛋白已在 Δ *ura3* Δ *och1::msdS* 菌株中表达,并能对 *N*-糖链进一步剪切。这一结果也说明,敲除 *och1* 基因的同时引入 *msdS* 基因是一个有效的策略,可使 *P. kudriavzevii* 的 *N*-糖链转变为哺乳动物细胞的 *N*-糖链核心结构 $Man_5GlcNAc_2$ 。

综上所述,我们利用基因编辑系统对 *P. kudriavzevii* 产生高甘露糖型的关键基因 *och1* 进行了敲除,阻断了其糖蛋白 *N*-糖链上甘露糖链的延伸;同时引入曲霉 *msdS* 基因对 *N*-糖链进一步剪切,获得了表达哺乳动物细胞核心 *N*-糖链结构 $Man_5GlcNAc_2$ 的细胞,为 *P. kudriavzevii* 的人源糖基化改造奠定了基础。

REFERENCES

- [1] MADHAVAN A, ARUN KB, SINDHU R, KRISHNAMOORTHY J, RESHMY R, SIROHI R, PUGAZHENDI A, AWASTHI MK, SZAKACS G, BINOD P. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-17.
- [2] LIU YD, FLYNN GC. Effect of high mannose glycan pairing on IgG antibody clearance[J]. *Biologicals*, 2016, 44(3): 163-169.
- [3] de WACHTER C, van LANDUYT L, CALLEWAERT N. Engineering of yeast glycoprotein expression[M]// *Advances in Glycobiotechnology*. Cham: Springer International Publishing, 2018: 93-135.
- [4] FREEZE HH. Genetic defects in the human glycome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(7): 537-551.
- [5] CHIBA Y, SUZUKI M, YOSHIDA S, YOSHIDA A, IKENAGA H, TAKEUCHI M, JIGAMI Y, ICHISHIMA E. Production of human compatible high mannose-type (Man₅GlcNAc₂) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(41): 26298-26304.
- [6] TANG HT, WANG SH, WANG JJ, SONG MH, XU MY, ZHANG MY, SHEN Y, HOU J, BAO XM. N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25654.
- [7] 顾鹏飞, 李萌, 朱瑞宇, 金坚. 双缺陷型毕赤酵母 X33 突变株的诱变育种[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(2): 129-135.
- GU PF, LI M, ZHU RY, JIN J. Mutation breeding of double deficient mutant *Pichia pastoris* X33 strain[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(2): 129-135 (in Chinese).
- [8] CHOI BK, BOBROWICZ P, DAVIDSON RC, HAMILTON SR, KUNG DH, LI HJ, MIELE RG, NETT JH, WILDT S, GERNGROSS TU. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(9): 5022-5027.
- [9] VERVECKEN W, KAIGORODOV V, CALLEWAERT N, GEYSSENS S, de VUSSER K, CONTRERAS R. *In vivo* synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2639-2646.
- [10] JACOBS PP, GEYSSENS S, VERVECKEN W, CONTRERAS R, CALLEWAERT N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 58-70.
- [11] LAUKENS B, de WACHTER C, CALLEWAERT N. Engineering the *Pichia pastoris* N-glycosylation pathway using the GlycoSwitch technology[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N J)*, 2015, 1321: 103-122.
- [12] BECK A, COCHET O, WURCH T. GlycoFi's technology to control the glycosylation of recombinant therapeutic proteins[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2010, 5(1): 95-111.
- [13] GEMMILL TR, TRIMBLE RB. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1999, 1426(2): 227-237.
- [14] LI YJ, ZHANG L, WANG DP, ZHOU H, OUYANG HM, MING J, JIN C. Deletion of the *msdS/AfmsdC* gene induces abnormal polarity and septation in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Microbiology*, 2008, 154(7): 1960-1972.
- [15] PARK HJ, KO HJ, JEONG H, LEE SH, KO HJ, BAE JH, SUNG BH, HAN JI, SOHN JH. Draft genome sequence of a multistress-tolerant yeast, *Pichia kudriavzevii* NG7[J]. *Genome Announcements*, 2018, 6(3): e01515-17.
- [16] NDUBUISI IA, QIN QJ, LIAO GY, WANG B, MONEKE AN, OGBONNA JC, JIN C, FANG WX. Effects of various inhibitory substances and immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-12.
- [17] FANG WX, DU T, RAIMI OG, HURTADO-GUERRERO R, MARIÑO K, IBRAHIM AFM, ALBARBARAWI O, FERGUSON MAJ, JIN C, van AALTEN DMF. Genetic and structural validation of *Aspergillus fumigatus* N-acetylphosphoglucosaminase as an antifungal target[J]. *Bioscience Reports*, 2013, 33(5): BSR20130053.
- [18] SHI ZH, YIN BR, LI YQ, ZHOU GH, LI CB, XU XL, LUO X, ZHANG XB, QI J, VOGLMEIR J, LIU L. N-glycan profile as a tool in qualitative and quantitative analysis of meat adulteration[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(37): 10543-10551.
- [19] SHARMA GP, 欧阳浩森, 赵光亚, 解明明, 周慧, 杨静华, 金城. N-糖链加工影响里氏木霉形态发生并提高木质纤维素降解能力[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(10): 3432-3448.
- SHARMA GP, OUYANG HM, ZHAO GY, XIE MM, ZHOU H, YANG JH, JIN C. Altered N-glycan processing in *Trichoderma reesei* affects the morphogenesis and improves the degradation of lignocellulose[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3432-3448 (in Chinese).