

陈珊珊, 丁 健, 李 鑫, 等. 整体优化的信号肽和人溶菌酶基因在毕赤酵母的高效表达[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 20-28.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.003

整体优化的信号肽和人溶菌酶基因在毕赤酵母的高效表达

陈珊珊¹, 丁 健¹, 李 鑫², 刘 军², 贾禄强¹, 槐强强¹, 孙佼文¹, 史仲平¹

(1. 江南大学生物工程学院/工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214100; 2. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430040)

摘要: 人源溶菌酶作为一种天然的抑菌活力物质, 在畜牧、医药及食品等行业具有潜在的应用价值。本研究将信号肽序列和人源溶菌酶基因碱基序列作为一个整体进行密码子优化。并在优化的信号肽序列 2 处位置, 共新插入 39 个碱基, 构成增长的优化信号肽+溶菌酶优化基因。将 2 种优化的信号肽+溶菌酶基因碱基序列分别插入 pPICZαA 载体上, 并整合到毕赤酵母 KM71 的基因组上, 获得重组子 K1 (整体优化的 α 信号肽+人源溶菌酶基因) 和 K4 (整体优化的 α 信号肽+人源溶菌酶基因又整合了增长信号肽)。摇瓶诱导表达 72 h 后, 离心取上清液, 通过 Bradford 法和比浊法测定发现, K4 的蛋白质表达量和酶活力均高于 K1。5 L 发酵罐下, 采用高密度诱导表达策略, 诱导 54 h 后 K4 的总蛋白质表达量可达 3.02 g/L, 所表达的人源溶菌酶活力达到 324 072.0 U/ml。表明整体优化的 α 信号肽+人源溶菌酶基因又整合了增长信号肽有利于提高溶菌酶的分泌效率, 实现高效表达。

关键词: 人源溶菌酶; 信号肽序列; 毕赤酵母; 高效表达

中图分类号: Q814.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)01-0020-09

De novo design of α-factor signal and human lysozyme gene leads to high-level expression in *Pichia pastoris*

CHEN Shan-shan¹, DING Jian¹, LI Xin², LIU Jun², JIA Lu-qiang¹, HUAI Qiang-qiang¹,
SUN Jiao-wen¹, SHI Zhong-ping¹

(1. Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University/The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Wuxi 214100, China; 2. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430040, China)

Abstract: Human lysozyme (*hLYZ*) has potential application value in many fields, as a natural antibacterial agent. In this study, the codons of α-factor signal and *hLYZ* gene were optimized as a whole by using a *de novo* design strategy. Based on the optimization, 39 nucleotides were inserted into two different locations of α-factor signal sequence, obtaining an extended α-factor signal followed with *hLYZ* gene. These two optimized sequences were chemically synthesized and respectively constructed into the yeast secretory expression vector pPICZαA, then transformed into *Pichia pastoris* KM71 by electroporation. Two series of recombinants were harvested, the optimized α-factor+*hLYZ* (named K1) and the extended optimized α-factor+*hLYZ* (named K4). In shake-flask culture, protein expression content and antibacterial activity of the re-

combinant K4 were higher than those of K1, and measured by Bradford assay and turbidimetric method, respectively. In 5 L fermentor, the protein expression level of K4 achieved the maximum of 3.02 g/L at 54 h after induction by using the high cell density induction strategy, in which the antibacterial activity of the recombinant human lyso-

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21606106); 江苏省自然科学基金项目 (BK20150127、BK20160162)

作者简介: 陈珊珊 (1993-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程, (E-mail) 18811992800@163.com

通讯作者: 史仲平, (E-mail) jnbioprocess@163.com

zyme reached 324 072.0 U/ml. The results indicated that the extended α -factor signal could greatly promote secretion of the recombinant human lysozyme, leading to achievement of high-level expression.

Key words: human lysozyme; α -factor signal; *Pichia pastoris*; high-level expression

细菌对传统抗生素耐药性的增强使得越来越多的研究人员致力于开发一种新型的抗菌化合物。溶菌酶的抗菌机制不同于抗生素,不会使细菌产生耐药性,已引起科学界的极大关注^[1]。溶菌酶又称胞壁质酶或 *N*-乙酰胞壁质聚糖水解酶,能够水解细菌细胞壁中 β -1,4 糖苷键^[2],破坏细胞壁肽聚糖的结构,从而保护宿主细胞免受细菌感染。按来源可将溶菌酶分为微生物溶菌酶、植物溶菌酶和动物溶菌酶,其中动物溶菌酶又可分为 c、g、i 3 种类型。人溶菌酶属于 c 型,由 130 个氨基酸组成,相对分子量为 14 700^[3],其表达量及活力远远高于其他物种。

溶菌酶作为一种天然蛋白质,能在胃肠内作为营养物质被消化和吸收,对人及动物无毒害作用,也不会体内残留,是一种安全性很高的药品、饲料和食品添加剂。在畜牧业溶菌酶可用作饲料防腐剂和杀菌剂,邱伟海等^[4]报道饲料中添加溶菌酶抑制剂可有效控制猪仔因消化不良而引起的腹泻;Sotirov 等^[5]报道溶菌酶可有效防治球虫病,提高鸡体的健康,减少死亡;此外在饲料中添加溶菌酶、聚合磷酸盐及甘氨酸等复合物可起到抑菌防腐的作用,延长饲料的保质期^[6]。在医学上溶菌酶具有抗菌、抗炎症、抗 HIV 病毒以及抗肿瘤活性等应用价值^[7-10]。在食品行业,溶菌酶可作为抗菌防腐剂添加到食品中,且对人体无任何毒副作用^[11],也可利用其具有一定甜味的特点,作为低卡路里的食品甜味剂^[12-13]。

目前,市场上销售的溶菌酶主要是从鸡蛋清、动物脏器中中提取获得的,这种溶菌酶热稳定性差,活力只有人溶菌酶活力的一半^[14]。但人源溶菌酶受限于原料来源、纯化精制成本等因素,制备量较少,无法满足各领域的需求。因此,科研人员采用基因工程手段,将人源溶菌酶基因克隆至原核或真核表达载体中,用以生产溶菌酶。表达载体包括大肠杆菌^[15]、酿酒酵母^[16-17]、毕赤酵母^[11, 18]以及黑曲霉^[19]等。其中,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)具有遗传操作简单,拥有强诱导型甲醇氧化酶(AOX)启动子,能对外源蛋白质进行转录后修饰(包括糖基化和二硫键形成)等,表达的外源蛋白可通过信号肽引导分泌至胞外等诸多优点,是表达真核细胞

来源蛋白质的理想系统之一。在将外源基因转入毕赤酵母前,研究者会根据毕赤酵母密码子偏爱性对外源基因序列进行优化设计。刘真英等^[20]对柞蚕溶菌酶基因进行密码子优化后,其在毕赤酵母中表达量可达 2.4 g/L,且纯化后的柞蚕溶菌酶比酶活力达到 23 970 U/mg。Zhou 等^[18]对人源溶菌酶基因进行优化,并转入毕赤酵母(*P. pastoris* SMD1168)进行表达,发酵上清液中人源溶菌酶蛋白浓度为 331 mg/L,比酶活力达到 7 069 U/mg。经过密码子优化,许多蛋白质在毕赤酵母中实现了高效表达。但包括人源溶菌酶在内,不少蛋白质的基因编码序列经密码子优化后仍表达量较低。信号肽是蛋白质分泌表达的一个重要影响因素。有研究者发现,表达载体上的 α 信号肽序列优化后,毕赤酵母中外源蛋白分泌表达量显著提高^[21-23]。因此,本研究根据毕赤酵母密码子偏爱性,对 α 信号肽序列和人源溶菌酶基因序列进行整体优化。并在优化的信号肽序列上 2 处不同位置,增加 39 个碱基,获得增长的 α 信号肽序列,并与人源溶菌酶基因碱基序列相连。将 2 个优化后的信号肽+溶菌酶基因碱基序列分别插入表达载体 pPICZ α ,并转入毕赤酵母 KM71 进行表达,以期在不影响酶活力的前提下,提高人源溶菌酶在毕赤酵母中的表达量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和载体 真核表达载体 pPICZ α A 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 DH5 α 、毕赤酵母 KM71 为本实验室保存。

1.1.2 酶及试剂 DNA 限制性内切酶、DNA marker (DL2 000 及 DL10 000)、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、TaKaRa *Ex Taq* 酶以及 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 购自大连 TaKaRa 公司,zeocin、质粒提取、PCR 产物回收及胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物公司,YNB、溶菌酶标准品购自 Sigma 公司。

1.1.3 通用引物 AOX-F: 5'-GACTGGTTCCAATT-GACAAGC-3'; AOX-R: 5'-GCAAATGGCATTCTGA-

CATCC-3'; MF4-F: 5'-AGCTTTCGAAACGATGGC-TATTCCA-3'; MF4-R: 5'-AGCTTCTAGATTACACAC-CACATCC-3'。

1.1.4 培养基 大肠杆菌培养基(DLB+LB)、酵母培养基(YPD、YPDS+zeocin)、诱导表达培养基(BMGY、BMMY)配制及培养方法参照 EasySelect; 5 L 发酵罐种子培养基、初始培养基、甘油流加培养基、甲醇诱导培养基参考文献[24]。

1.2 人源溶菌酶基因的设计合成及表达载体的构建

根据毕赤酵母偏爱性,对调控表达产物分泌的

信号肽序列及溶菌酶基因进行优化设计,并在这段序列 5'端加上 *Bsp*T104 I 酶切位点,3'端加上 *Xba* I 酶切位点。采用全基因人工合成,并克隆至 pPICZ α A 载体中构建含有人源溶菌酶基因的重组表达载体 pPICZ-Opt α F+hlyz。同时在已优化的信号肽的 2 处不同位置,插入 A I P 和 E E A E A E A E P K 等氨基酸,并完成增长后信号肽序列的合成。将增长的序列插入 pPICZ α A 空载,构建得到另一个人源溶菌酶表达载体 pPICZ-Ehn α F+hlyz(图 1)。

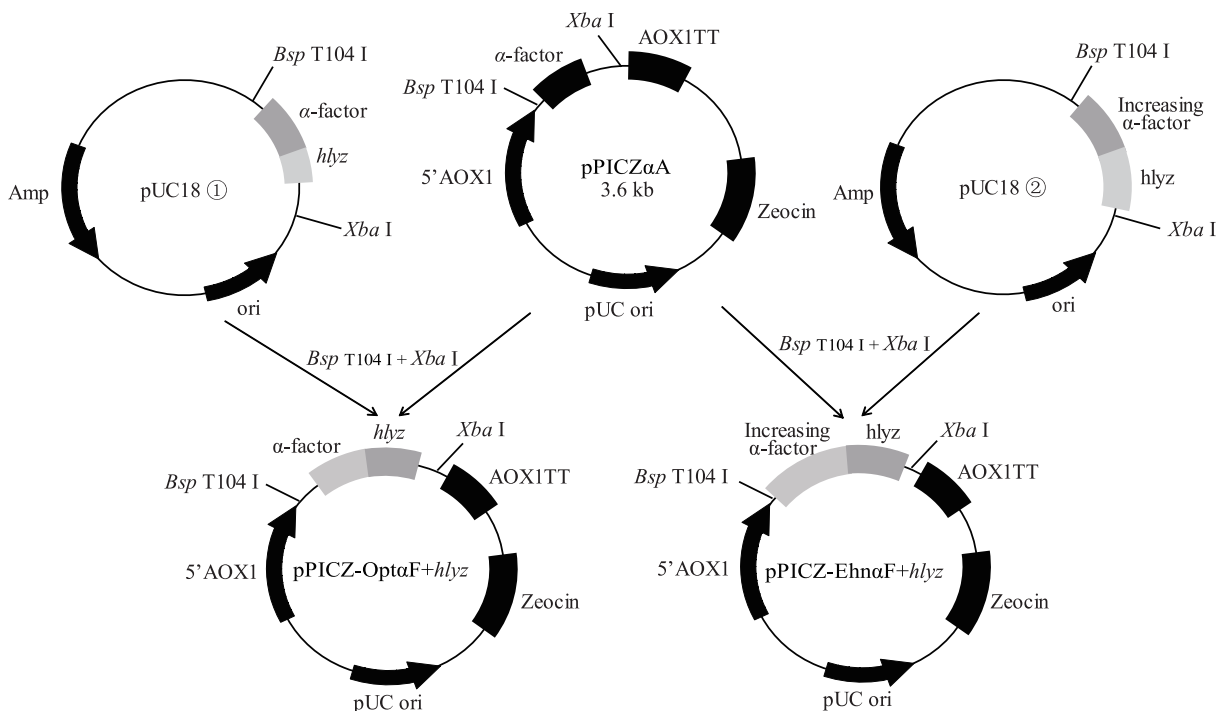


图 1 pPICZ α -hlyz 构建示意图

Fig.1 The schematic diagram of pPICZ α -hlyz structure

1.3 重组表达载体对毕赤酵母的转化及鉴定

经测序验证正确的 pPICZ-Opt α F+hlyz 及 pPICZ-Ehn α F+hlyz 重组质粒,用 *Sac* I 酶线性化并回收,DNA 量为 5~10 μ g。采用电转化法转化至毕赤酵母 KM71。取 100 μ l 转化产物涂布含 Zeocin 抗性的 YPDS 平板,培养 2~3 d,观察菌的生长情况,将菌落用无菌水洗脱下来再经 Zeocin 浓度为 200~1 000 μ g/ml 的 YPD 平板筛选,从而获得更高拷贝数的菌株。

挑取平板上长势较好的菌落于 4 ml YPD 液体

试管,28 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 18~24 h,取 100 μ l 菌悬液离心去上清液,加入 50 μ l 裂解液并用枪头吹打混匀,85 $^{\circ}$ C 热变性 15 min 后,6 000 r/min 离心 2 min,取 1 μ l 裂解的上清液作为 PCR 反应模板。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶 DNA 电泳验证。

1.4 重组菌株诱导表达

摇瓶表达:挑取单菌落接入装有 25 ml BMGY 培养基的 250 ml 三角瓶中,放置于摇床中以 200 r/min 的转速在 30 $^{\circ}$ C 下培养 18~20 h。将培养液转移至 50 ml 离心管中,5 000 r/min 室温离心 5 min,

除去上清液,用 25 ml 的 BMMY 培养基重新悬浮细胞,继续培养,每隔 24 h 向培养基中添加无水甲醇,使其终浓度为 0.5%,诱导表达 72 h 后,离心取上清液作进一步检测分析。

5 L 发酵罐表达:按 13% 的接种量将种子液接入发酵罐中,初始发酵装液量为 2 L,温度 30 ℃,通气量为 1.3 vvm,pH 为 6.0(用 50% 的磷酸和氨水调节 pH)。发酵过程中溶解氧浓度(DO)逐渐下降,逐级提高搅拌速度将 DO 水平维持于 20% 以上。当初始培养基中的甘油耗尽时,DO 急剧上升,启动 DO-Start 甘油流加程序,进入甘油流加阶段。当菌体浓度达到预期水平($OD_{600}=200$)时停止流加甘油,饥饿培养 2 h 后进入甲醇诱导阶段。通过 On-Off 控制模式调节甲醇流加速度,将甲醇浓度控制在 5~10 g/L^[25]。对于产量较高的 K4 进一步采取高密度($OD_{600}=400$)诱导策略。

1.5 重组人源溶菌酶蛋白产量分析及活力检测

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对重组人源溶菌酶进行定性分析,配制 12% 的分离胶及 5% 浓缩胶,电泳电压 120 V,考马斯亮蓝染色液染色 10 min,脱色 10 min。

对发酵液总蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[26],以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线,利用标准曲线计算发酵上清液总蛋白质含量。

利用管碟法^[27]鉴定人源溶菌酶的生物活性,并通过比浊法^[28]定量测定人源溶菌酶酶活力大小。管碟法是效仿抗毒素的生物学鉴定方法,指示菌为 1.5% 溶壁微球菌($OD_{600}=1$),双碟制备好后静置 10 min,在牛津杯中加入样品及阴性对照,24 h 后观察透明圈的大小。比浊法以溶壁微球菌作为底物,通过菌悬液 OD_{450} 处吸光度值的变化进行酶活力测定。溶壁微球菌活化及培养步骤参照国标 GB/T 30990-2014。称取一定量的溶菌酶标品(100 000 U/mg),用缓冲液稀释成一定的浓度梯度(50~250 U/ml),取 0.5 ml 的酶液加入 2.5 ml 的菌悬液混匀,记录在 450 nm 处反应 1 min 时的读数 A_1 ,反应 2 min 时的读数 A_2 ,计算 $\Delta E=|A_1-A_2|$ 的值,以酶活力为纵坐标, ΔE 为横坐标作酶活力标准曲线。同样测定发酵上清液的 ΔE (1 min 内的变化范围在 0.025~0.125),根据酶活力标准曲线计算出发酵上清液的酶活力。

1.6 数据处理

数据采用 Excel2010、Origin8.5 处理,使用 SPSS10.0 进行方差分析。

2 结果与分析

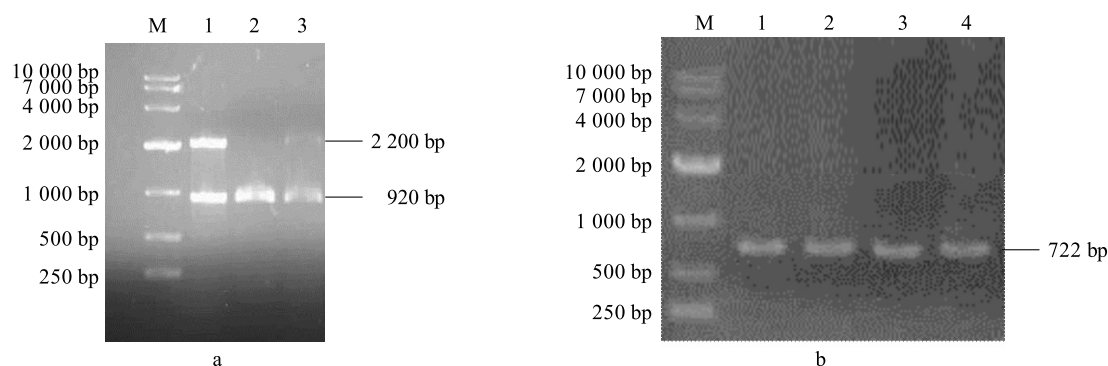
2.1 信号肽和溶菌酶基因碱基序列的整体优化

原始序列存在的主要问题有:1.载体上的酿酒酵母 α 信号肽及人源溶菌酶基因编码序列所使用的密码子有不少在毕赤酵母中属于稀有密码子;2.序列 GC 含量不平衡;3.序列中存在较多重复序列。针对上述问题,我们将 α 信号肽及人源溶菌酶序列作为一个整体进行序列优化,优化策略如下:1.使用毕赤酵母偏爱密码子,替换序列中的稀有密码子;2.对 α 信号肽和人源溶菌酶蛋白中出现的丰度氨基酸,除了选择偏爱密码子外,也使用毕赤酵母第二或第三常用密码子,避免在表达过程中出现某一 tRNA 不足,影响蛋白质表达量;3.平衡序列整体及局部区域的 GC 含量控制在 40%~60%;4.避免出现影响 mRNA 稳定及其他不利于表达的序列。按上述策略优化后的序列如图 2 所示。其中, α 信号肽在原始序列密码子优化的基础上,在序列 ATG 后增加了共 9 个碱基,对应的氨基酸为 AIP,在序列的 190 bp 位置后面加上 1 个胞嘧啶(C),而在 193 bp 后面加上 29 个碱基,连同 193 位的碱基一起表达 10 个氨基酸(氨基酸序列为 E E A E A E A E P K)。因此,增长后的 α 信号肽比仅做密码子优化的信号肽多表达 13 个氨基酸。

2.2 重组表达载体的构建

根据毕赤酵母偏爱性和密码子组成的分析,对负责分泌表达的信号肽序列和溶菌酶基因进行整体优化,并完成全序列合成。通过 *Bsp*T104I 和 *Xba*I 酶切后,将合成序列插入 pPICZ α A 载体中,构建得到人源溶菌酶表达载体 pPICZ-Opt α F+hlyz。使用引物 5' AOX-F/3' AOX-R 对载体进行 PCR 鉴定,扩增出 912 bp 片段与信号肽加溶菌酶基因的大小完全一致。

以相同的方法,将增长的信号肽和溶菌酶基因碱基序列插入 pPICZ α 载体中,构建得到另一个人源溶菌酶表达载体 pPICZ-Ehn α F+hlyz。使用引物 MF4-F/MF4-R 对载体进行 PCR 鉴定,扩增出 722 bp 片段与增长的信号肽序列的大小完全一致。DNA 测序结果显示,上述 PCR 产物序列与对应的原始合成序列完全一致。



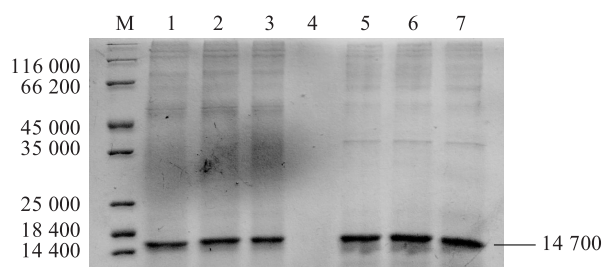
a 图: M; DL10 000 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2~3: K1 重组子 PCR 鉴定。b 图: M; DL10 000 分子质量标准; 1~4: K4 重组子 PCR 鉴定。

图3 毕赤酵母重组子 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of *Pichia pastoris* recombinants by PCR

2.4 重组菌株摇瓶诱导表达

对上述筛选并经过验证的重组子进行摇瓶表达。在诱导表达 72 h 后取发酵上清液, 用 SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 4 所示。1~3 泳道表示重组子 K1 (信号肽和溶菌酶基因整体优化的重组子) 摇瓶诱导试验的 3 个重复, 在 14 700 处有明显的条带。5~7 泳道表示重组子 K4 (信号肽和溶解酶基因整体优化后又整合了增长信号肽的重组子) 摇瓶诱导试验的 3 个重复, K4 重组子在 14 700 处的条带亮度明显高于重组子 K1。通过 Bradford 法测定发酵上清液中总蛋白质含量, 结果列于表 1。信号肽和溶菌酶基因整体优化的重组子 K1, 平均总蛋白质产量为 260 mg/L; 整体优化的信号肽和溶菌酶基因又整合了增长信号肽的重组子 K4, 平均总蛋白质产量为 320 mg/L, 相比重组子 K1 提高了 23%。



M: 蛋白质分子量标准; 1~3: K1 重组子诱导表达 72 h 后发酵上清液; 5~7: K4 重组子诱导表达 72 h 后发酵上清液。

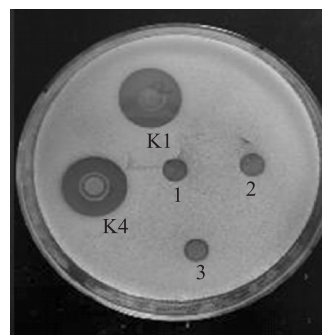
图4 摇瓶表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the expression product by shaking bottle

2.5 人源溶菌酶酶活力

采用管碟法对重组子所表达蛋白质的抑菌活力

进行定性检测, 以磷酸盐缓冲液作空白对照, 以 KM71 原始菌和携带 pPICZ α 空载体的 KM71 菌株经诱导培养后的上清液作为阴性对照。结果如图 5 所示, 空白对照、KM71 原始菌和携带 pPICZ α 空载体的 KM71 诱导的发酵上清液都未见有透明圈出现, 而重组子 K1 和 K4 的发酵上清液所在区域, 有明显透明圈出现。对比发现, 重组子 K4 形成的透明圈要大于 K1 形成的透明圈。



K1: 信号肽和溶菌酶基因整体优化的重组子诱导表达的上清液; K4: 整体优化的信号肽和溶菌酶基因又整合了增长信号肽的重组子诱导表达的上清液; 1: 空白对照; 2: 携带 pPICZ α 空载体的酵母重组子诱导表达的上清液; 3: KM71 原始菌诱导表达的上清液。

图5 重组毕赤酵母表达的人源溶菌酶抑菌效果

Fig.5 Measurement of hLYZ activity by cylinder-plate method

进一步利用国标 GB/T 30990-2014, 以鸡蛋白溶菌酶标准品 (标准曲线如图 6 所示), 对重组毕赤酵母表达的人源溶菌酶进行活力检测, 结果如表 1 所示。信号肽和溶菌酶整体优化的重组子 K1, 总酶活力平均值为 12 937.0 U/ml; 整体优化的信号肽和溶菌酶基因又整合了增长信号肽的重组子 K4, 总酶

活力平均值为 16 973.5 U/ml, 略高于重组子 K1 的总酶活力。

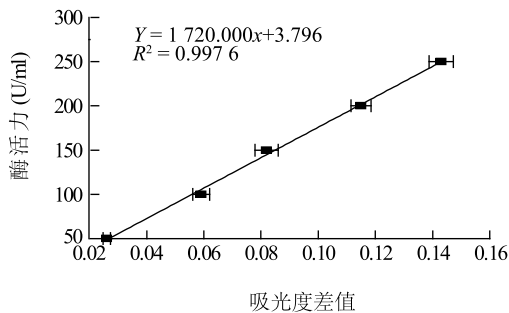


图 6 以鸡蛋白溶菌酶为标准品的酶活力标准曲线

Fig.6 Enzyme activity standard curve by chicken egg white lysozyme

表 1 重组子 K1、K4 摇瓶蛋白质表达量及酶活力

Table 1 Total protein and enzyme activity result of K1 and K4 by shaking bottle

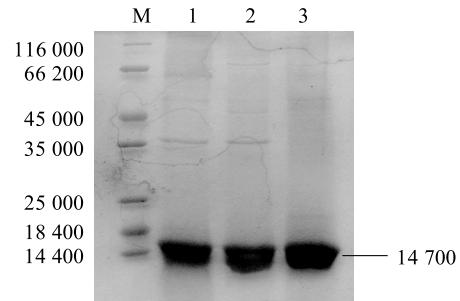
重组子	平均总蛋白 (mg/L)	平均总酶活力 (U/ml)
K1	260±6B	12 937.0±1 255.8B
K4	320±10A	16 973.5±627.9A

K1: 信号肽和溶菌酶基因整体优化的重组子; K4: 信号肽和溶菌酶基因整体优化又整合了增长信号肽的重组子。同列数据后不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.6 重组菌株发酵罐规模诱导表达

在 5 L 发酵罐中进行重组子 K1 和 K4 的诱导表达试验, 由于 K4 摇瓶蛋白质表达量及酶活力都比较高, 因此 K1 采取低密度诱导策略, K4 采取高低 2 种诱导策略。分别采集 3 个发酵批次诱导期的发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 7 所示。1~3 泳道分别表示 K1 低密度 (菌体浓度 $OD_{600} = 200$)、K4 低密度 (菌体浓度 $OD_{600} = 200$)、K4 高密度 (菌体浓度 $OD_{600} = 400$) 的发酵上清液样品。采用 Bradford 法测定发酵上清液中的总蛋白质浓度, 总蛋白质浓度随时间呈现出逐渐上升的趋势 (图 8a)。K1 菌株发酵批次诱导 80 h 总蛋白质浓度为 1.71 g/L; K4 低密度发酵批次诱导 80 h 总蛋白质浓度为 2.54 g/L。K4 高密度发酵批次诱导 54 h 总蛋白质浓度为 3.02 g/L。3 个批次发酵上清液中人源溶菌酶蛋白占总蛋白质的比例均不低于 85%。采用比浊法测定 3 个批次最终发酵上清液的溶菌酶活力, 结果表明: K1、K4 低密度诱导 80 h 以及 K4 高密度诱导 54 h 发酵液中的总酶活力分别为 262 152.0

U/ml、258 712.0 U/ml、324 072.0 U/ml (图 8b), 对应的比酶活力分别为 152 971.9 U/mg、101 996.4 U/mg、107 030.7 U/mg (图 8b)。



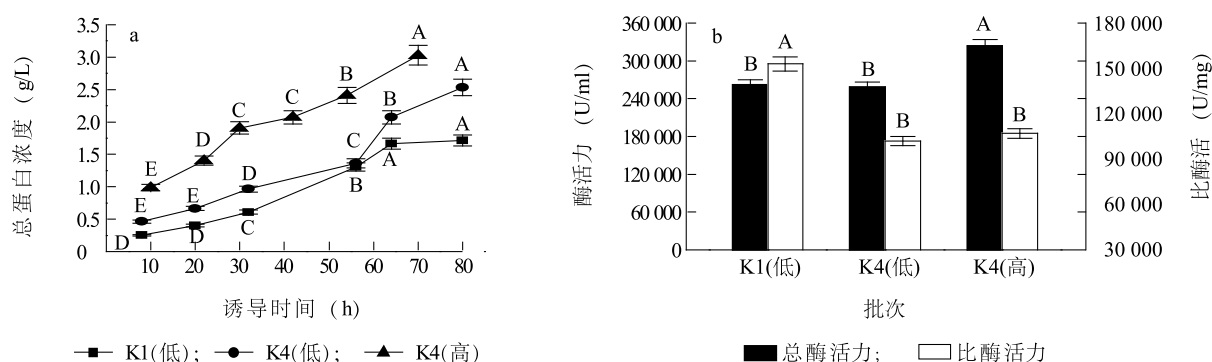
M: 蛋白质分子量标准; 1: K1 重组子低密度诱导 80 h 发酵上清液; 2: K4 重组子低密度诱导 80 h 发酵上清液; 3: K4 重组子高密度诱导 54 h 发酵上清液。

图 7 重组菌株发酵罐表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE analysis of the expression product via fermentation

3 讨论

目前, 已有 500 多种外源蛋白在毕赤酵母系统成功表达, 但绝大多数外源蛋白的表达量并不是很高。人源溶菌酶在医药、食品、畜牧等行业具有广泛的应用前景, 虽然通过基因工程的手段解决了原料来源、纯化成本等限制因素, 但其在外源表达系统中表达量和单位体积发酵液中酶活总量并不高。因此, 提高人源溶菌酶的表达量及酶活力是将其向市场推广的根本途径。许多研究人员根据毕赤酵母密码子偏爱性, 对溶菌酶基因进行密码子优化, 使溶菌酶蛋白表达量和酶活力总量得到一定程度提高^[18,20,29]。但影响毕赤酵母表达外源蛋白的因素有很多, 存在于转录、翻译、折叠修饰、细胞分泌等各个环节, 因此, 仅通过优化外源基因序列密码子对蛋白质表达量的影响程度非常有限。信号肽是分泌型蛋白质 N 端的一段富含疏水性氨基酸残基的短肽, 其残基性质对于蛋白质的分泌效率和后续信号肽切割具有重要影响。陈熙等^[22]利用 PCR 法将人源溶菌酶成熟肽与载体信号肽连接处的氨基酸残基进行定点突变, 结果表明突变体人源溶菌酶表达量和活力较突变前均有显著提高。Xiong 等^[30]在优化植酸酶基因序列密码子的同时, 使用经密码子优化的酿酒酵母 α 信号肽序列替换原有信号肽, 整体转入毕赤酵母进行表达, 相比使用原始信号肽的菌株, 植酸酶



a: 3 个发酵批次总蛋白浓度随时间变化趋势;b:3 个发酵批次最终总酶活力及比酶活力。K1(低)、K4(低):K1、K4 重组子低密度($OD_{600} = 200$)甲醇诱导;K4(高):K4 重组子高密度($OD_{600} = 400$)甲醇诱导。不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

图 8 不同批次最终总蛋白及酶活力

Fig.8 Total protein and enzyme activities at different fermentation batches

产量提高了 14.5 倍。

本研究将 α 信号肽和溶菌酶基因作为整体进行密码子优化,再转入毕赤酵母进行表达。结果显示,5 L 发酵罐诱导培养 80 h 后,总蛋白质表达量为 1.71 g/L(人源溶菌酶占比超过 85%),单位发酵液的总酶活力达到 262 152.0 U/ml。相比之下,前期仅针对人源溶菌酶基因序列进行密码子优化的报道中,几乎没有见到总蛋白表达量到克级、单位发酵液总酶活力达到 100 000.0 U/ml 以上的。上述结果表明,将 α 信号肽和外源基因作为整体进行基因序列的密码子优化,可显著提高外源蛋白的分泌表达量。在 α 信号肽和溶菌酶基因碱基序列整体优化的基础上,我们又针对 α 信号肽序列做进一步优化,在 α 信号肽起始密码子 ATG 后增加毕赤酵母 *Aox1* 基因 ATG 后编码 3 个氨基酸(AIP)的碱基,另外,在信号肽序列第 64 位氨基酸后面,插入 10 个氨基酸(氨基酸序列为 E E A E A E A E P K)。上述 2 种信号肽的改造曾应用于毕赤酵母表达植酸酶和胰岛素,外源蛋白分泌表达量分别提高 5 倍^[21]和 2^[31]倍多。5 L 发酵罐诱导培养 80 h 后,携带增长型 α 信号肽和溶菌酶基因的毕赤酵母重组子 K4 表达蛋白总量达到 2.54 g/L,相比未增长信号肽前的重组子 K1 提高了 48.5%。但其单位发酵液的总酶活力仅为 258 712.0 U/ml,相比增长信号肽前的水平还略有降低。这可能是由于增长 α 信号肽的引入使毕赤酵母蛋白质分泌效率大幅提高,而毕赤酵母自身蛋白质折叠和修饰的能力有限,无法将大量分泌表达的溶菌酶酶原激活成为有活性的酶,造成了比酶活

力的下降。为验证这一推论,在 5 L 发酵罐下采用了高密度诱导策略。诱导 54 h 后重组子 K4 的总蛋白质表达量达到 3.2 g/L,单位发酵液的总酶活力为 324 072.0 U/ml,对应的比酶活力与低密度诱导条件下获得的比酶活力水平相当。该结果基本佐证了上述推论。

本研究通过整体优化 α 信号肽和人源溶菌酶基因,实现了人源溶菌酶在毕赤酵母中的高效表达。在 α 信号肽和人源溶菌酶基因整体优化后又整合增长 α 信号肽后,人源溶菌酶在毕赤酵母中的表达量进一步提高,但受限于酵母自身蛋白质折叠修饰的能力范围,人源溶菌酶的比酶活力有所下降。在后续研究中我们将着眼于提高毕赤酵母的蛋白质折叠和修饰效率,以期在毕赤酵母高表达人源溶菌酶的基础上,实现更高的比酶活力。

参考文献:

- [1] ZHAO H, TANG J Y, CAO L, et al. Characterization of bioactive recombinant antimicrobial peptide parasin I fused with human lysozyme expressed in the yeast *Pichia pastoris* system[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 77: 61-67.
- [2] OZOREN N, KIM K H, BURNS T F, et al. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(22): 6259-6265.
- [3] SWAMINATHAN R, RAVI V K, KUMAR S, et al. Lysozyme: a model protein for amyloid research[M]. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2011: 63-111.
- [4] 邱伟海,潘宏涛,蒋宏伟. 溶菌酶对断奶仔猪生产性能的影响

- [J]. 饲料博览, 2006 (2): 39-41.
- [5] SOTIROV L, KOINARSKI V. Lysozyme and complement activities in broiler-chickens with coccidiosis[J]. *Revue De Medecine Veterinaire*, 2003, 154(12): 780-784.
- [6] 花城, 陈立祥. 溶菌酶的功能及在畜牧业中的应用[J]. 湖南饲料, 2008 (4): 31-33.
- [7] OGUNDELE M O. A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation[J]. *Mediators of Inflammation*, 1998, 7(5): 363-365.
- [8] LEE-HUANG S, MAIOROV V, HUANG P L, et al. Structural and functional modeling of human lysozyme reveals a unique non-a peptide, HL9, with anti-HIV activity[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(12): 4648-4655.
- [9] LEMARBRE P, RINEHART J J, KAY N E, et al. Lysozyme enhances monocyte-mediated tumoricidal activity: a potential amplifying mechanism of tumor killing[J]. *Blood*, 1981, 58(5): 994-999.
- [10] GUO T K, ZHAO X H, XIE X D, et al. The anti-proliferative effects of recombinant human lysozyme on human gastric cancer cells[J]. *Journal of International Medical Research*, 2007, 35(3): 353-360.
- [11] WEI J T, TANG C D, WU M C, et al. Cloning and functional expression of a human lysozyme gene (hly) from human leukocytes in *Pichia pastoris*[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 6(1): 173-178.
- [12] MATANO M, NAKAJIMA K, KASHIWAGI Y, et al. Sweetness characterization of recombinant human lysozyme[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2015, 188: 8-14.
- [13] MASUDA T, UENO Y, KITABATAKE N. High yield secretion of the sweet-tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 39(1): 35-42.
- [14] 刘仲敏, 何伯安. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 1995(5): 80-82.
- [15] PING O, LIAN-CHENG L E I, SHUANG L V. Prokaryotic expression and biological activity of human lysozyme[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2009, 22(6): 544-547.
- [16] ARIMA H, KINOSHITA T, IBRAHIM H R, et al. Enhanced secretion of hydrophobic peptide fused lysozyme by the introduction of N-glycosylation signal and the disruption of calnexin gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Letters*, 1998, 440(1/2): 89-92.
- [17] YAMAMOTO Y, TANIYAMA Y, KIKUCHI M, et al. Engineering of the hydrophobic segment of the signal sequence for efficient secretion of human lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1987, 149(2): 431-436.
- [18] ZHOU X Y, YU Y, TAO J J, et al. Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(4): 420-425.
- [19] PARRA R, ALDRED D, MAGAN N. A novel immobilised design for the production of the heterologous protein lysozyme by a genetically engineered *Aspergillus niger* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(3): 336-344.
- [20] 刘真英, 李文利. 密码子优化后的柞蚕溶菌酶在酵母中的表达及活性测定[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 292-300.
- [21] 熊爱生, 彭日荷, 李 贤, 等. 信号肽序列对毕赤酵母表达外源蛋白质的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(2): 154-160.
- [22] 陈 熙, 陈 毓, 齐小雨, 等. 人溶菌酶定点突变基因在毕赤酵母中的表达及活性分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6): 1396-1401.
- [23] 齐小雨, 陈 熙, 张 炜. 人溶菌酶重组酵母工程菌的构建和活性干粉的制备[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1122-1127.
- [24] 丁 健. 基于人工智能和代谢调控的典型好氧发酵过程在线控制和故障诊断[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [25] ZHANG W H, BEVINS M A, PLANTZ B A, et al. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 70(1): 1-8.
- [26] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [27] 裴娟萍. 用管碟法测定碱性蛋白酶活力[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(2): 20-24.
- [28] 赵玉萍, 张 灏, 杨严俊. 溶菌酶测定方法的改进[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 116-119.
- [29] 李新新, 陶建军, 余 龙. 人源溶菌酶基因 *LYZL4* 在毕赤酵母中的重组表达及活性测定[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(1): 79-85.
- [30] XIONG A S, YAO Q H, PENG R H, et al. High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(2): 418-428.
- [31] KJELDSEN T, PETTERSSON A F, HACH M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29: 79-86.

(责任编辑: 陈海霞)