

基因拷贝数对重组毕赤酵母产谷氨酰胺转氨酶的影响

宋小平^{1,2}, 王雅洁¹, 蔡晶晶¹, 余银^{1,2}, 管利^{1,2}, 张宇亭¹

1 安徽医学高等专科学校 药学系, 安徽 合肥 230061

2 安徽省重组蛋白药物工程技术研究中心, 安徽 合肥 230022

宋小平, 王雅洁, 蔡晶晶, 等. 基因拷贝数对重组毕赤酵母产谷氨酰胺转氨酶的影响. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1679–1688.
Song XP, Wang YJ, Cai JJ, et al. Impact of gene dosage on recombinant transglutaminase production of *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1679–1688.

摘要: 基于毕赤酵母核糖体 DNA 序列 (rDNA), 构建多拷贝谷氨酰胺转氨酶基因表达载体 pPICZα-rDNA-mtg, 并转化到表达前导肽 (Pro peptide 或 pro) 的宿主菌 pGAP9-pro/GS115, 得到共表达菌株 pro/rDNA-mtg (GS115)。实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析了 4 株阳性表达菌株中 mtg 基因拷贝数, 进一步研究了不同基因拷贝数对重组毕赤酵母产酶的影响及高产菌株在 3 L 发酵罐高密度发酵。结果表明, 被检测的 4 株阳性表达菌株中 mtg 拷贝数分别为 2.21、3.36、5.72 和 7.62 (mtg-2c、mtg-3c、mtg-6c 和 mtg-8c), 其发酵产酶能力和蛋白质表达水平为 mtg-3c>mtg-2c>mtg-6c>mtg-8c; 高密度发酵较低和较高拷贝数的两株菌 mtg-3c 和 mtg-6c, 发酵上清的最高酶活和单位菌体酶活分别为 3.12 U/mL、52.1 U/g 湿重和 2.07 U/mL、36.5 U/g 湿重, 其中单位菌体酶活 mtg-3c 是 mtg-6c 的 1.4 倍; mtg-3c 纯化酶的最高酶活达到 7.21 U/mL, 蛋白浓度为 437.2 μg/mL。通过分析拷贝数对重组毕赤酵母产酶的影响, 发现 mtg-3c 适合 pro/rDNA-mtg 中 pro 和 mtg 共表达, MTG 高酶活与菌株较高分泌蛋白有关。

关键词: 基因拷贝数, 毕赤酵母, 谷氨酰胺转氨酶, 核糖体 DNA

Impact of gene dosage on recombinant transglutaminase production of *Pichia pastoris*

Xiaoping Song^{1,2}, Yajie Wang¹, Jingjing Cai¹, Yin Yu^{1,2}, Li Guan^{1,2}, and Yuting Zhang¹

1 Department of Pharmacy, Anhui Medical College, Hefei 230061, Anhui, China

2 Anhui Engineering Research Center of Recombinant Protein Pharmaceutical Biotechnology, Hefei 230022, Anhui, China

Abstract: Based on the rDNA sequence of *Pichia pastoris*, a multi-copy gene expression vector of transglutaminase (pPICZα-rDNA-mtg) was constructed and transformed to the host strain (pGAP9-pro/GS115) expressing pro peptide, to obtain

Received: November 27, 2019; **Accepted:** March 8, 2020

Supported by: Natural Science Foundation of Anhui Province, China (No. 1808085MC86), Key Research Project of Natural Science for University Teachers in Anhui Province, China (No. KJ2017A695), Research and Innovation Team Project of Anhui Medical College (No. 2019zrtd01).

Corresponding author: Xiaoping Song. Tel: +86-551-63818357; E-mail: sxp20081012@sina.com

安徽省自然科学基金 (No. 1808085MC86), 安徽高校教师自然科学研究重点项目 (No. KJ2017A695), 安徽医学高等专科学校科研创新团队项目 (No. 2019zrtd01) 资助。

网络出版时间: 2020-04-07

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200403.2248.003.html>

the co-expression strain *pro/rDNA-mtg* (GS115). Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to analyze transglutaminase gene copy number in the 4 positive strains. We further studied the effect of gene copy on the enzyme production of recombinant *Pichia pastoris* as well as high-density fermentation of higher expression strain in a 3-L fermenter. The *mtg* copy numbers of the 4 positive strains were 2.21, 3.36, 5.72 and 7.62 (*mtg-2c*, *mtg-3c*, *mtg-6c* and *mtg-8c*), respectively, and the enzyme production capacity and protein expression level were *mtg-3c*>*mtg-2c*>*mtg-6c*>*mtg-8c*. *Mtg-3c* and *mtg-6c* of high-density fermentation had the highest enzymatic activity and enzymatic activity per unit wet weight in the supernatant of 3.12 U/mL, 52.1 U/g (wet weight) and 2.07 U/mL and 36.5 U/g (wet weight), respectively. In terms of enzyme activity per unit wet weight, *mtg-3c* is 1.4 times higher than that of *mtg-6c*. The activity of purified enzyme (*mtg-3c*) was up to 7.21 U/mL and the protein concentration was 437.2 µg/mL. By analyzing the effect of *mtg* copy number on the enzyme production of recombinant strains, *mtg-3c* is suitable for the co-expression of two genes (*pro* and *mtg*) in *pro/rDNA-mtg*, and its enzyme activity is related to higher protein secretion of the strain.

Keywords: gene dosage, *Pichia pastoris*, transglutaminase, ribosomal DNA

微生物的谷氨酰胺转氨酶 (Microbial transglutaminase, MTG) 由于具有低蛋白分子量、非 Ca^{2+} 依赖性、较广的底物范围等较优的酶学性质, 被广泛用于食品工业、生物医药^[1-3]、组织工程^[4-5]、定点蛋白交联^[1,5]、同源抗体偶联药物的构建^[5]等多个领域。

目前, 由于微生物发酵法可用于大规模生产谷氨酰胺转氨酶, 所以最终实现了该酶的商业化生产^[5-6], 但 MTG 价格较高。鉴于茂源链霉菌特有的催化性能及活化机制使 MTG 在异源宿主中的高效表达遇到诸多问题^[7-9]。在酵母中单独表达 MTG 成熟酶, 无法获得活性 MTG^[8,10]。通过将该酶原的前导肽 (Pro-peptide) 和成熟酶 MTG 作为两个独立元件共表达, 可直接表达活性 MTG, 200 mL 摇瓶发酵上清中 MTG 酶活最高达 1.83 U/mL, 是目前报道的最高水平^[11-12], 然而其酶活水平需要进一步提高。

外源基因的拷贝数通常成为蛋白表达量的限制性因素, 增加外源基因的拷贝数能提高外源蛋白的表达量^[13]。根据酵母菌较易发生同源重组的特点, 使用重复序列作为载体同源重组位点是提高外源基因在酵母基因组中拷贝数的有效途径^[13-14]。核糖体 DNA (Ribosomal DNA, rDNA) 是指编码核糖体 RNA 的一段高度重复的 DNA 序列, 重复序列由转录区和非转录区组成^[14]。毕赤酵母 GS115 基因组的 4 种 rRNA 基因包括 18S、5.8S、25S 和 5S^[14-15], 其中 18S、5.8S 和 25S rRNA 基

因是串联在一起的, 存在 100-120 个重复序列, 被 rDNA 的非转录区 (Non-transcribed intergenic spacer, NTS) 隔开^[16]。如果以毕赤酵母非转录 rDNA 序列 (rDNA) 为目的基因整合位点, 理论上可以得到 100-120 个目的基因拷贝数^[13-14,17-18]。

本研究基于毕赤酵母非转录 rDNA 序列构建 *mtg* 拷贝数定向放大的表达载体 pPICZα-rDNA-*mtg*, 并被转化到表达前导肽 (Pro-peptide) 的重组菌株 pGAP9-*pro*/GS115, 构建得到共表达菌株 *pro/rDNA-mtg*, 分析了基因剂量对重组毕赤酵母表达 MTG 的影响, 并研究了较高表达菌株在发酵罐中高密度发酵。

1 材料与方法

1.1 试验菌株、试剂和培养基

1.1.1 菌株和质粒

质粒载体 pGAP9-*pro* 和 pPICZα-*mtg* 及 pGAP9-*pro*/GS115 菌株为本实验室构建。

1.1.2 试剂

N-carboxybenzoyl-L-glutaminy-L-glycine (N-CBZ-Gln-Gly) 和 L-谷氨酸-γ-单羟胺酸购自 Sigma-Aldrich 公司; 还原型谷胱甘肽购自华美生物工程有限公司; anti-MTG 购自 Eurogentec 公司。荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。AKTA Pure 蛋白质层析纯化系统和镍柱购自 GE 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

大肠杆菌 *Escherichia coli* 培养基: LLB; 毕赤酵母培养基: YPD、MD、BMGY、BMMY, 配方参照 Invitrogen 公司的操作手册, 毕赤酵母菌培养温度 28 °C, 诱导温度 25 °C^[12,14]。

1.2 方法

1.2.1 基因、引物合成和 DNA 序列测定

引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, DNA 测序由通用生物系统 (安徽) 有限公司完成。

1.2.2 多拷贝重组表达菌株的构建

多拷贝基因 (*mtg*) 及其前导肽基因 (*pro*) 共表达菌株的构建原理如图 1 所示。将谷氨酰胺转氨酶的前导肽基因 (*pro*) 与成熟酶基因 (*mtg*) 的编码序列分别插入到 pGAP9 和 pPICZα 的 *Xho* I、*Not* I 位点, 构建得到表达质粒 pGAP9-*pro* 和 pPICZα-rDNA-*mtg*。质粒 pGAP9-*pro* 和 pPICZα-rDNA-*mtg* 分别含有组氨酸脱氢酶 (*HIS4*) 和 rDNA 重复片段基因, 分别同源重组到 *P. pastoris* (GS115) 的基因组 *his4* 区和非编码 rDNA 序列 (图 1)。理论上避免了 *pro* 和 *mtg* 基因在 *P. pastoris* 同一点位同源重组的概率, 确保 *mtg* 定向整合到 *P. pastoris*

的 rDNA 序列, 保证 *mtg* 的多拷贝^[2,14]。

构建过程分两步:

第一步, 构建 rDNA 介导的多拷贝谷氨酰胺转氨酶基因 (*mtg*) 表达载体。首先, 重叠 PCR 扩增 AOX1-rDNA 融合基因: 分别扩增 AOX1-terminator (表 1: 引物 P1 和 P2) 和 rDNA 片段 (表 1: 引物 P3 和 P4), 其中 AOX1-terminator 5'端引入 *Not* I 酶切位点, 3'端引入 rDNA overlap 片段, 用于与 rDNA 基因的拼接, 大小 410 bp。rDNA 5'端引入 AOX1 terminator 重叠序列, 3'端引入 *Bam*H I 酶切位点, 含有 *Spe* I 单酶切位点, 大小为 1.2 kb。扩增产物采用核酸凝胶回收试剂盒回收, 得到预期为 1.6 kb 的产物, 此基因产物两端分别带上 *Not* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 命名为 AOX1-rDNA。然后, 将获得的 1.6 kb AOX1-rDNA 以及载体 pPICZα-*mtg* (实验室保存) 均使用限制性内切酶 *Not* I 和 *Bam*H I 双酶切。酶切产物采用 PCR 试剂盒回收。回收所得的产物采用 T4 DNA 连接酶连接, 并转至 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 均匀涂布到含 50 μg/mL Zeocin 抗性的 LLB 平板上, 37 °C 培养过夜。通过菌液 PCR 法鉴定阳性克隆, 鉴定正确的阳性克隆送测序, 测序正确的克隆命名为 pPICZα-rDNA-*mtg*。

第二步, 将构建成功的表达载体 pPICZα-rDNA-*mtg* 用 *Spe* I 线性化并电转化到 pGAP9-*pro*/GS115 (实验室保存)^[2], 电转液均匀涂布于 MD+Zeocin (200 μg/mL) 平板上, 同时设置阴性对照, 28 °C 培养 3-4 d, 直至长出直径 1 mm 左右克隆, 选择 8 个克隆进行直接 PCR 鉴定。

鉴定正确的克隆 GS115 (*pro*/rDNA-*mtg*) 接入 24 孔板筛选阳性表达克隆, BMGY (pH 6.0) 培养体系 2 mL, 28 °C、200 r/min 过夜培养, 24 h 后测 $OD_{600}=5-6$, 离心收集菌体, 用 2 mL BMMY (1% 甲醇, pH 6.0) 中重悬菌体后诱导表达, 25 °C 诱导、每隔 24 h 补加一次甲醇至终浓度为 1% (V/V), 诱导 48 h, 发酵液 12 000×g 离心 10 min, 滤液进行 Western blotting 检测, 抗体为 Anti-MTG, 阳性表达克隆保存于 -20 °C。

表 1 文中所用引物列表

Table 1 List of primer used in this study

Primer	Primer sequence (5'-3')
P1	TATGCGGCCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTC
P2	<u>CTTAAATATTAGGAAAAACGGTAACCTTATC</u> TCACTTAATCTTCTGTACTCTG
P3	<u>CAGAGTACAGAAGATTAAGAGAGATAGTT</u> AGGTTACCGTTTTTCCTAATATTTAAG
P4	<u>CGCGGATCCCTTCCACCAACAGTCAACCAC</u> P5 CAGTC
P6	GGTATTAACGGTTTCGGACGTATTG
P7	GATGTTGACAGGGTCTCTCTCTTGG
P8	TGAAGAAAGAATTGGCTAACGG AGCTGGTCTGAAAGCATCTGG

Remarks: The underlined sites (—) and the double corrugated underlined sites(~~~~~)are thoses for the digestion of restriction enzymes *Xho* I and *Bam*H I, respectively. The overlapping segments of the AOX1 terminal-rDNA fusion gene is marked with the bold underlining(____).

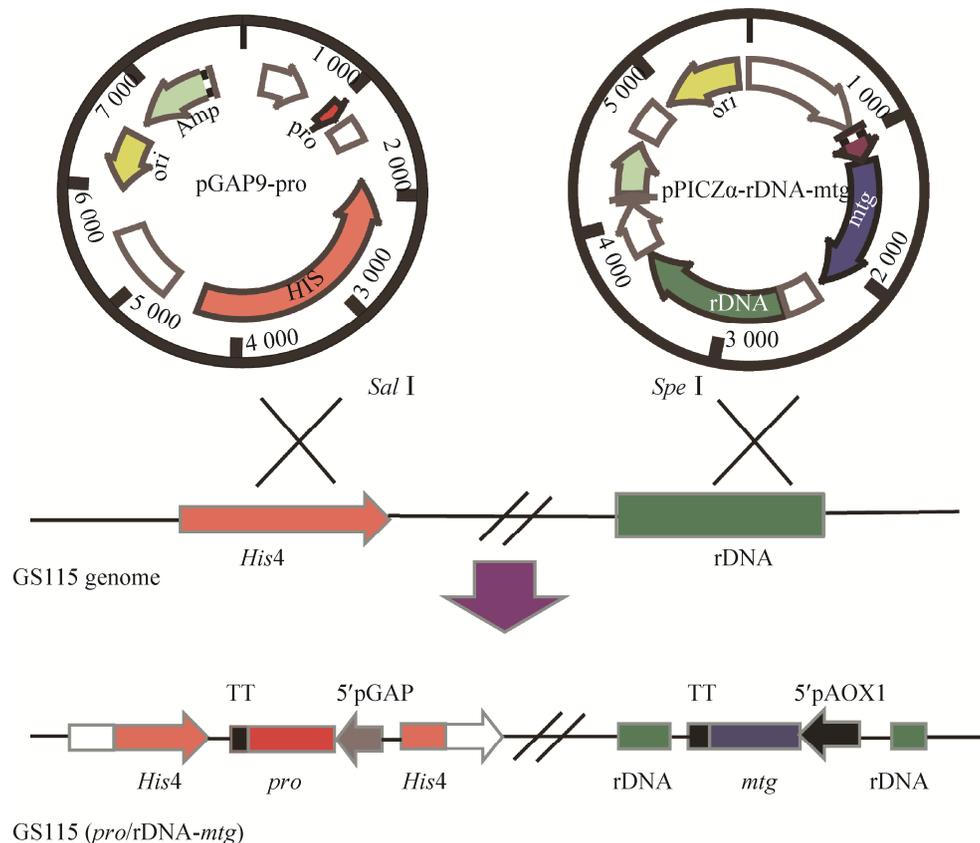


图1 基于 rDNA 的多拷贝基因 (rDNA-mtg) 及其前导肽基因 (pro) 共表达菌株的构建

Fig. 1 Principle of co-expression of multicopy gene (rDNA-mtg) and its precursor peptide gene (pro).

1.2.3 重组菌株中 mtg 拷贝数的检测

选择蛋白表达较高的 4 个阳性克隆, 实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术测定 mtg 基因在毕赤酵母基因组中的拷贝数, 用管家基因 gap 的拷贝数表征模板中基因组的起始拷贝数^[19]。首先, 用含有 gap 和 mtg 的标准质粒制备 gap 和 mtg 的标准曲线。然后, 荧光定量 PCR 获得每个样品 gap 和 mtg 的 Ct 值, 将得到的 Ct 值分别代入 gap 和 mtg 标准曲线中, 求出每个样品中 gap 基因和 mtg 基因的起始模板拷贝数^[19-20]。mtg 基因在毕赤酵母基因组中的拷贝数可以通过 mtg 基因起始模板拷贝数与 gap 基因起始模板拷贝数的比值求出^[19,21]。具体方法: 提取 4 个样品中毕赤酵母菌株基因组 DNA 作为模板, 分别用引物 P5/P6 和 P7/P8 (表 1) 进行荧光定量 PCR, 每个样品重复检测 3 次,

每次进行独立的质粒抽提和荧光定量 PCR 过程^[21]。反应体系: 10 μ L, 其中包括 SYBR Green Realtime PCR Master 5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), dd H₂O 3 μ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 保温 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环^[21]。

1.2.4 拷贝数对酶活和蛋白表达的影响

将上述实验获得的不同拷贝数的菌株接种于 YPDZ (Z: 200 μ g/mL) 固体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d, 直至长出单克隆。挑取单菌落于 5 mL YPD 液体培养基中, 摇瓶过夜培养, 全部转接到 50 mL BMGY (pH 6.0) 的摇瓶中, 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 24 h 后测 OD_{600} , 当 OD_{600} 达到 6 时, 低速离心收集菌体, 用 200 mL 的 BMMY (甲醇 1%, pH 6.0) 重悬菌体后诱导表达, 初始 OD_{600} =

1.0–1.5, 诱导温度 25 °C, 每隔 24 h 补加一次甲醇至终浓度为 1% (V/V), 并取样, 诱导 72 h。

将 72 h 发酵上清 pH 调至 7.2, 12 000×g 离心 10 min, 去除菌体沉淀, 留上清。将样品进样, 注入 AKTA 蛋白纯化仪的镍柱。按照流程: 平衡→上样→平衡→Wash→洗脱。A 液平衡 (50 mmol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, pH 7.2), B 液冲洗 (50 mmol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.2), C 液洗脱 (20 mmol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, pH 7.2); 收集洗脱液。洗脱液用 0.2 mol/L PBS (pH 7.2) 透析去除咪唑, 透析样品采用非还原 SDS-PAGE 检测, 胶浓度 10%, 每孔上样量 20 μL, Western blotting 鉴定目标蛋白, 鉴定用抗体 Anti-MTG。

异羟肟酸比色法测定 MTG 酶活, 按照参考文献^[2,7,11,12]的方法进行。MTG 酶活定义为: 在 37 °C 条件下, MTG 每分钟催化底物 (N-CBZ-Gln-Gly, Sigma 公司) 生成 1 μmol 谷氨酸-单羟胺酸 (氧肟酸) 为 1 个酶活单位。蛋白浓度测定采用 Bradford 方法, 标准蛋白为牛血清蛋白 (Sigma)^[2,11]。

1.2.5 *mtg-3c*、*mtg-6c* 的高密度发酵

摇瓶发酵初步考察了拷贝数对 MTG 酶活和蛋白表达的影响, 为了进一步考察拷贝数对菌体细胞产酶和细胞生长过程的影响, 分别选择其中较低和较高拷贝数的两株菌 (*mtg-3c*、*mtg-6c*) 进行高密度发酵。在保证发酵条件一致的前提下, 比较发酵过程的变化情况。将 100 mL YPD 种子液接到 1.2 L BMGY (pH 6.0) 发酵培养基, 初始培养基组成: 1.2 L BMGY (4% 甘油) +150 mL YNB+150 mL PPB, 发酵参数设定为: pH 6.0, 生长温度 28 °C, 搅拌转速 600–800 r/min, 通气量 10 L/min。当罐内基础甘油用完后, 溶氧会在短时间内上升, 此时开始补甘油, 50% 甘油 (含 12 mL/L PTM1) 恒速补料 25 mL/(L·h)。当菌体湿重达到 35–40 g/L 时停止补甘油, 开始补加 100% 甲醇诱导 (甲醇含 12 mL/L PTM1)。甲醇诱导采用三步补

料 (根据甲醇电极判断补料时间点), 第一步补甲醇速率 3.6 mL/(L·h) (大约持续 4–6 h), 第二步补甲醇速率 7.2 mL/(L·h), 第三步补甲醇 10.8 mL/(L·h), 持续到下罐。诱导温度调整为 25 °C。整个发酵过程中控制溶氧水平为 25%–30%^[14]。每 12 h 取样测定菌体湿重和酶活, 诱导 72 h。发酵液预处理及 MTG 纯化过程参照 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 不同拷贝数重组毕赤酵母菌株的构建

提取 GS115 (*pro/rDNA-mtg*) 8 个克隆的基因组, 分别采用目的基因 *pro* 和 *mtg* 的上、下游引物进行 PCR 鉴定, 分别扩增出 100–200 bp 和 1 000 bp 左右的条带 (图 2A)。PCR 结果显示 *pro* 和 *mtg* 基因分别整合到毕赤酵母染色体的不同位点, 所有克隆构建正确 (图 2A)。

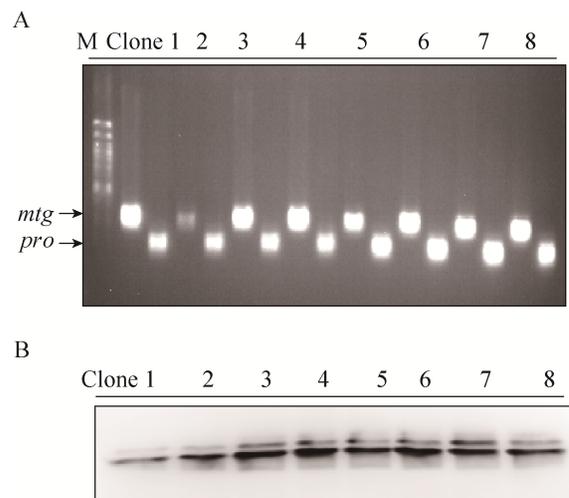


图 2 不同拷贝数重组毕赤酵母菌株 *pro/rDNA-mtg* 的建立

Fig. 2 Establishment of *pro/rDNA-mtg* with different copy number. (A) Detection of GS115(*pro/rDNA-mtg*) expression strains by PCR. M: DNA marker; 1–8: the 8 clones of *pro/rDNA-mtg* were amplified by PCR with the primers of *pro* and *mtg*, and the products were 1 000 bp and 150 bp, respectively. (B) The transformed clones of *pro/rDNA-mtg* were screened by Western blotting (Anti-MTG).

选择构建正确的 8 个克隆,用 24 孔板初步筛选阳性克隆,对诱导 48 h 的发酵上清进行检测,结果如图 2B 所示。经检测的 8 个克隆均有阳性表达,其中克隆 # 3、# 4、# 6、# 7 表达较高。

2.2 重组菌株中 *mtg* 基因拷贝数

将 MTG 表达量较高的阳性表达克隆 (# 3、# 4、# 6、# 7) 进行实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测, *mtg* 基因在毕赤酵母基因组中的拷贝数结果见图 3 和表 2。 *gap* 和 *mtg* 基因标准曲线为: $y = -3.754 6x + 39.663$ ($R^2 = 0.998 5$), $y = -3.363 2x + 37.131$ ($R^2 = 0.997 8$) (图 3A、B)。标准曲线的反应效率即引物扩增效率,用 E 表示,通过公式 $E = 10^{(-1/\text{斜率})} - 1$ 计算出 *gap* 和 *mtg* 基因的扩增效率分别为 86.66% 和 94.88%,说明两者的扩增反应有效,因而该标准曲线可用于计算被测菌株中 *mtg* 基因拷

贝数。

被检测的 4 个共表达菌株基因组中 *mtg* 拷贝数如表 2^[2]所示,结果显示酶活最高的菌株中 *mtg* 基因以 3.36 个拷贝的形式存在于酵母基因组中,命名为 *mtg*-3c。其他 3 个菌株中 *mtg* 基因拷贝数分别为 2.21、5.72 和 7.62 (命名为 *mtg*-2c、*mtg*-6c、*mtg*-8c)。实验结果表明,不同拷贝的 *mtg* 基因定向到 *P. pastoris* 的重复 rDNA 位点,被检测菌株的最高拷贝数为 *mtg*-8c,但是表达蛋白和酶活都表现出最低。*mtg*-3c 菌株产 MTG 酶活最高。

2.3 基因拷贝数影响蛋白表达和酶活

为了考察基因的拷贝数对蛋白质表达的影响,通过对发酵过程中诱导阶段不同时间点取样的测定,结果如图 4、5 和表 3 所示。

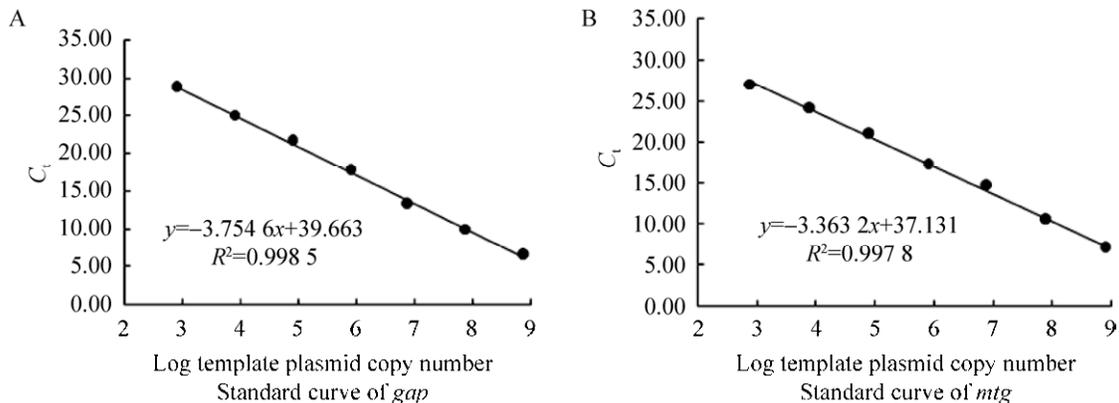


图 3 *gap* (A) 和 *mtg* (B) 基因的标准曲线

Fig. 3 Standard curves for *gap* (A) and *mtg* genes (B).

表 2 实时荧光定量 PCR 检测 *gap* 和 *mtg* 基因拷贝数^[2]

Table 2 Copy numbers of *gap* and *mtg* gene detected by real-time fluorescent quantitative PCR^[2]

Strain	Value C_t		Gene copy (10^6)		Number of copies of <i>mtg</i> gene in <i>P. pichia</i> genome (<i>mtg</i> copy number/ <i>gap</i> copy number)
	<i>mtg</i> gene	<i>gap</i> gene	<i>mtg</i> gene	<i>gap</i> gene	
1	14.14±0.27	16.49±0.17	5.58±1.02	1.66±0.19	3.36±0.24
2	14.93±0.28	16.67±0.22	3.29±0.50	1.48±0.18	2.21±0.11
3	14.97±0.30	18.23±0.23	3.20±0.63	5.60±0.71	5.72±0.35
4	15.30±0.41	19.05±0.17	2.56±0.55	3.36±0.31	7.62±1.11

Datas are presented as $\bar{x} \pm s$ of triplicate observations. strain 1: the clone with the highest enzyme activity. strain 2, 3, 4: another three positive clones tested.

从图 4 看出, 诱导 24 h, 谷氨酰胺转胺酶酶活随基因拷贝数的增加而增加, 即呈正效应 (拷贝数不超过 6); 诱导 48 h, *mtg-6c* 和 *mtg-8c* 菌株表达谷氨酰胺转胺酶的酶活急剧下降; 诱导 72 h, *mtg-3c* 菌株表达的谷氨酰胺转胺酶活力最高, 可达到 1.41 U/mL; 拷贝数为 2、6、8 (*mtg-2c*, *mtg-6c*, *mtg-8c*) 菌株均表现出较低的酶活 (酶活分别为 0.75、0.32、0.19 U/mL)。由此推测, 在一定拷贝数范围内 (拷贝数不超过 6), 毕赤酵母表达重组谷氨酰胺转胺酶的能力先随目的基因拷贝数的增加而增加, 呈递增趋势; 当拷贝数超过一定数值时 (拷贝数为 3), 则呈下降趋势。

由于发酵液中总蛋白含有杂蛋白, 总蛋白浓度并不能真实反映拷贝数对目的蛋白的影响, 因此, 对诱导 72 h 后发酵液纯化, 纯化蛋白的电泳结果见图 5。从图 5 可见, *mtg-3c*、*mtg-2c* 和 *mtg-6c* 在 43 kDa 处均有两条特异性蛋白带, 大小分别为 38 kDa 和 40 kDa, 分别为非糖基化条带和糖基化条带 (非糖基化条带有活性, 糖基化条带是否有活性需要进一步实验验证), 与文献报道出现 1-3 条带的结果相一致^[2,11], 说明目的蛋白纯度高。

不同拷贝数菌株表达的蛋白结果为: *mtg-3c* > *mtg-2c* > *mtg-6c* > *mtg-8c* (表 3), 结果表明, *mtg-3c* 表达最高; 高拷贝数 (*mtg-8c*、*mtg-6c*) 随着诱导时间的延长, 目的蛋白表达显著减少或降解加剧。目的蛋白浓度的水平也从侧面验证了谷氨酰胺转

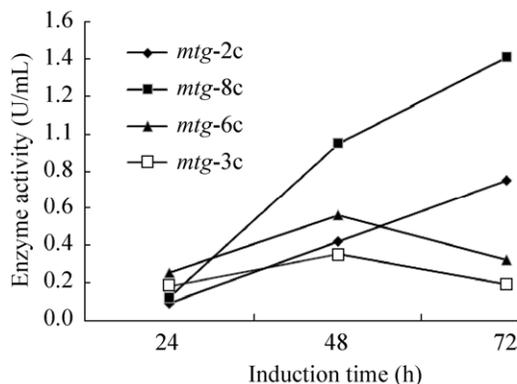


图 4 不同拷贝数 *mtg* 对谷氨酰胺转胺酶活力的影响
Fig. 4 Effect of different gene copy number on transaminase activity.

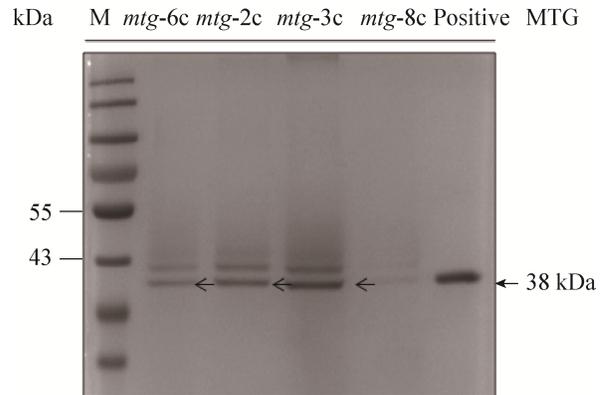


图 5 不同拷贝数的菌株表达蛋白的纯化结果
Fig. 5 Purified protein expressed by different copy number

表 3 不同基因拷贝数的谷氨酰胺转胺酶蛋白浓度 (纯化酶)

Table 3 The MTG protein concentration of different gene copy number

Strain (<i>pro/rDNA-mtg</i>)	Enzyme activity (U/mL)	Protein concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>mtg-2c</i>	0.75 ± 0.04^b	51.3 ± 3.24^b
<i>mtg-3c</i>	1.41 ± 0.08^a	89.13 ± 5.85^a
<i>mtg-6c</i>	0.32 ± 0.03^c	21.18 ± 3.21^c
<i>mtg-8c</i>	0.19 ± 0.03^c	16.35 ± 2.51^c

Datas are presented as $\bar{x} \pm s$ of triplicate observations. Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

胺酶活力的高低。这与诱导 72 h 后谷氨酰胺转胺酶的活力显著下降是相一致的 (图 4)。

2.4 *pro/rDNA-mtg* (*mtg-3c*, *mtg-6c*) 的高密度表达

在保证发酵条件一致的前提下, *mtg-3c*、*mtg-6c* 的发酵结果见图 6, 整个诱导过程持续 72 h。结果表明, *mtg-3c* 诱导前 60 h, 发酵上清酶活呈现上升趋势, 诱导 60 h 后酶活力不再继续升高, 此时最高酶活为 3.12 U/mL, 发酵菌体浓度可以达到 59.4 g/L, *mtg-3c* 的单位菌体酶活为 52.1 U/g 湿重。而 *mtg-6c* 在诱导前 48 h, 发酵上清酶活呈现上升趋势, 48 h 的最高酶活达到 2.07 U/mL (最高水平), 此时菌体浓度可以达到 56.7 g/L, 单位菌体酶活为 36.5 U/g 湿重; 48 h 后, 酶活快速降至 1.12 U/mL。从图 6 可以看出, *mtg-3c* 和 *mtg-6c*

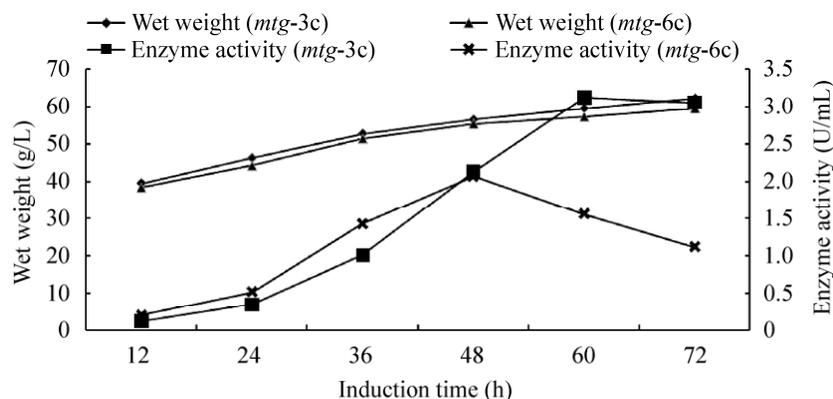


图 6 不同拷贝数菌株 (*mtg-3c*、*mtg-6c*) 的生长和产酶分析

Fig. 6 Analysis of growth and enzyme production of strains with different copy numbers.

最高酶活时的菌体浓度接近,但是 *mtg-3c* 的单位菌体酶活是 *mtg-6c* 的 1.4 倍,与表 3 中拷贝数影响谷氨酰胺转氨酶蛋白浓度的结果一致,推测 *mtg-3c* 的高酶活与菌株较高分泌蛋白有关。

对 *mtg-3c* 的 72 h 发酵上清进行纯化,检测纯化酶的酶活最高达到 7.21 U/mL,蛋白浓度为 437.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

毕赤酵母作为外源蛋白表达的宿主具有强效可调控启动子 AOX1、表达量高、遗传性状稳定、培养基成分简单等突出的优点,已高效表达了干扰素、乙型肝炎病毒表面抗原、肌醇六磷酸酶、白蛋白、抗体、胶原蛋白等多种外源蛋白^[1,3-5]。尽管已经有研究人员尝试利用毕赤酵母来表达重组链霉菌 MTG,但是 MTG 的产量还达不到工业化要求^[9,11]。本文基于 rDNA 构建多拷贝的谷氨酰胺转氨酶菌株,获得基因拷贝数分别为 2、3、6 和 8 的工程菌,并通过摇瓶发酵初步考察了拷贝数 (2、3、6 和 8) 对 MTG 酶活和蛋白表达的影响,在此基础上,对 3 拷贝和 6 拷贝菌株进行高密度发酵,进一步考察了拷贝数对菌体细胞产酶和细胞生长过程的影响。研究结果显示 *mtg-3c* 和 *mtg-6c* 最高酶活时的发酵菌体浓度相近,但是 *mtg-3c* 的最高单位菌体酶活是 *mtg-6c* 的 1.4 倍,

与拷贝数影响谷氨酰胺转氨酶蛋白浓度的结果一致,推测 *mtg-3c* 的高酶活与菌株较高分泌表达有关。*mtg-3c* 的纯化酶酶活最高达到 7.21 U/mL,蛋白浓度为 437.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

研究表明,外源基因的拷贝数是影响外源蛋白高效表达的重要因素之一,通过增加基因的拷贝数可以有效提高外源蛋白的表达^[13,17-18,22]。对于分泌表达的蛋白,当基因拷贝数为 4-9 左右,基因拷贝数与蛋白量呈正相关,一旦拷贝数超出这个范围,表达水平反而降低,可能是由于高拷贝外源基因的表达影响菌体生长,从而影响目的蛋白前体的合成和所需能量的供给^[18,23]。因此,适合毕赤酵母高表达的拷贝数,需要通过实验筛选,并不是拷贝数越多越好^[18,23]。本研究构建了表达载体 pPICZ α -rDNA-*mtg*,这个载体包括目的基因 *mtg* 以及在其两端连上来自宿主 GS115 rDNA 的非转录基因间隔区 (NTS),基于 rDNA 定向增加 *mtg* 基因拷贝数,构建了 *mtg* 不同拷贝数的重组菌株^[13,17-18]。运用绝对定量 PCR 技术检测重组菌株 *mtg* 拷贝数,在被检测的阳性克隆中,*mtg* 基因分别以 2、3、6、8 拷贝的形式存在于毕赤酵母基因组中。在相同培养条件下 (200 mL BMMY),不同拷贝 *mtg* 对蛋白表达和酶活性的影响为: *mtg-3c*>*mtg-2c*>*mtg-6c* (表 3 和图 4)。结果表明,在 *mtg* 基因拷贝数不超过 3 的情况下,重

组菌株产生酶的速度较快,表明基因拷贝数对酶的产生有积极的影响。但是当基因拷贝数大于3时,菌株产酶活性明显下降。因此,对于毕赤酵母分泌表达MTG,3拷贝最适合 $pro/rDNA-mtg$ 中 pro 和 mtg 的共表达,一旦超过这个3拷贝,此时基因拷贝数已经不再是MTG分泌表达的主要限制性因素,而蛋白翻译、翻译后修饰及蛋白质前体的靶向输送等蛋白表达环节可能成为影响其产量的主要瓶颈^[24-25]。

最后,对3拷贝和6拷贝菌株进行高密度发酵,在相同培养条件下(pH、温度、溶解氧、甲醇三步补料), $mtg-3c$ 和 $mtg-6c$ 发酵上清的最高酶活和单位菌体酶活分别为3.12 U/mL、52.1 U/g湿重和2.07 U/mL、36.5 U/g湿重。结果表明 $mtg-3c$ 的单位菌体酶活是 $mtg-6c$ 的1.4倍, $mtg-3c$ 生产的纯化酶活最高达到7.21 U/mL,蛋白浓度为437.2 $\mu\text{g/mL}$ 。在高密度发酵过程中,通过严格控制pH、温度、溶氧及甲醇分步补料,可以较大幅度提高MTG的产量。

研究表明,在 mtg 基因拷贝数不超过3的情况下,基因拷贝数对酶的产生有积极的影响,然而通过单纯增加基因的剂量提高蛋白表达而提高酶活是有限的。若结合分子进化改造获得突变酶可大幅度提高酶活及其热稳定性^[25-27],是目前比较有效的方法,这有待后续研究。

REFERENCES

- [1] de Souza CFV, Venzke JG, Flôres SH, et al. Enzymatic properties of transglutaminase produced by a new strain of *Bacillus circulans* BL32 and its action over food proteins. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44(2): 443–450.
- [2] Song XP, Shao CS, Guo YG, et al. Improved the expression level of active transglutaminase by directional increasing copy of mtg gene in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol*, 2019, 19: 54, doi: 10.1186/s12896-019-0542-6.
- [3] Garcia Y, Wilkins B, Collighan RJ, et al. Towards development of a dermal rudiment for enhanced wound healing response. *Biomaterials*, 2008, 29(7): 857–868.
- [4] Martins IM, Matos M, Costa R, et al. Transglutaminases: recent achievements and new sources. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(16): 6957–6964.
- [5] Dennler P, Chiotellis A, Fischer E, et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody- drug conjugates. *Bioconjugate Chem*, 2014, 25(3): 569–578.
- [6] Huang L, Liu YH, Li MJ, et al. Expression of the transglutaminase from *Bacillus subtilis* and optimization of fermentation conditions for *Corynebacterium glutamicum*. *J Tianjin Univ Sci Technol*, 2016, 31(6): 11–16 (in Chinese).
黄琳, 刘逸寒, 李明杰, 等. 枯草芽胞杆菌谷氨酰胺转氨酶在谷氨酸棒杆菌中的分泌表达及诱导条件的优化. *天津科技大学学报*, 2016, 31(6): 11–16.
- [7] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agri Biol Chem*, 1989, 53(10): 2613–2617.
- [8] Javitt G, Ben-Barak-Zelas Z, Jerabek-Willemsen M, et al. Constitutive expression of active microbial transglutaminase in *Escherichia coli* and comparative characterization to a known variant. *BMC Biotechnol*, 2017, 17: 23.
- [9] Liu S, Zhang DX, Du GC, et al. Progress in expression and molecular modification of microbial transglutaminase. *Chin J Biotech*, 2011, 27(12): 1681–1689 (in Chinese).
刘松, 张东旭, 堵国成, 等. 微生物谷氨酰胺转氨酶的表达及分子改造研究进展. *生物工程学报*, 2011, 27(12): 1681–1889.
- [10] Salis B, Spinetti G, Scaramuzza S, et al. High-level expression of a recombinant active microbial transglutaminase in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 84.
- [11] Yurimoto H, Yamane M, Kikuchi Y, et al. The pro-peptide of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase functions in *cis* and in *trans* to mediate efficient secretion of active enzyme from methylotrophic yeasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(10): 2058–2069.

- [12] Li PF, Sun HB, You LJ, et al. Direct secretory expression of active microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2013, 29(2):180–188 (in Chinese).
李鹏飞, 孙红兵, 游丽金, 等. 利用毕赤酵母系统直接分泌表达具有活性的谷氨酰胺转氨酶. 生物工程学报, 2013, 29(2): 180–188.
- [13] Marx H, Mecklenbräuker A, Gasser B, et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. FEMS Yeast Res, 2009, 9(8): 1260–1270.
- [14] Guo YG, Wu J, Jia H, et al. Balancing the expression and production of a heterodimeric protein: recombinant agkisacutacin as a novel antithrombotic drug candidate. Sci Rep, 2015, 25: 11730.
- [15] Zhi XH, Wang LN, Zhu P, et al. Construction and application of *Saccharomyces cerevisiae* integration vector based on rDNA sequence. Chin Med Biotechnol, 2011, 6(5): 330–335 (in Chinese).
支晓慧, 王丽娜, 朱平, 等. 基于 rDNA 序列的酵母整合载体的构建及应用. 中国医药生物技术, 2011, 6(5): 330–335.
- [16] Li H, Fan H, Li Y, et al. Construction and application of multi-host integrative vector system for xylose-fermenting yeast. Fems Yeast Res, 2017, 17(6), fox055: 1–10.
- [17] Sun HY, Zang XN, Zhang XC. Optimization of expression and safety evaluation of the multi-copy human/salmon chimeric calcitonin in *Saccharomyces cerevisiae*. J Wuhan Univ, 2014, 43(1): 37–44 (in Chinese).
孙恒一, 臧晓南, 张学成. 酿酒酵母 rDNA 的结构及其介导整合影响因素研究进展. 武汉大学学报, 2014, 43(1): 37–44.
- [18] Lin XQ. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of high-level expression of xylanase in *Pichia pastoris*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013 (in Chinese).
林小琼. 基于 iTRAQ 技术的高效表达木聚糖酶重组毕赤酵母细胞的蛋白质组学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [19] Johnson MR, Wang K, Smith JB, et al. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Anal Biochem, 2000, 278(2): 175–184.
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [21] Xuan YJ, Zhou XS, Zhang YX. Determination of copy number of foreign gene in genome of *Pichia pastoris* by real-time fluorescent quantitative PCR. Chin J Biologicals, 2009, 22(12): 1236–1243 (in Chinese).
宣姚吉, 周祥山, 张元兴. 实时荧光定量 PCR 检测毕赤酵母基因组中外源基因拷贝数. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(12): 1236–1243.
- [22] Salim D, Bradford WD, Freeland A, et al. DNA replication stress restricts ribosomal DNA copy number. PLoS Genet, 2017, 13(9): e1007006.
- [23] Juturu V, Wu JC. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. ChemBioChem, 2017, 19(1): 7–21.
- [24] Li F, Yu XW, Sha C, et al. Impact of gene dosage and methanol concentration on *Rhizopus chinensis* recombinant lipase production in *Pichia pastoris*. Microb China, 2011, 38(3): 301–309 (in Chinese).
李飞, 喻晓蔚, 沙冲, 等. 基因拷贝数和甲醇浓度对重组毕赤酵母产华根霉脂肪酶的影响. 微生物学通报, 2011, 38(3): 301–309.
- [25] Li AT, Ilie A, Sun ZT, et al. Whole-cell-catalyzed multiple regio- and stereoselective functionalizations in cascade reactions enabled by directed evolution. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, 55(39): 12026–12029.
- [26] Yu D, Wang JB, Reetz MT. Exploiting designed oxidase-peroxygenase mutual benefit system for asymmetric cascade reactions. J Am Chem Soc, 2019, 141(14): 5655–5658.
- [27] Qu G, Zhu T, Jiang YY, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design. Chin J Biotech, 2019, 35(10): 1843–1856 (in Chinese).
曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1843–1856.

(本文责编 陈宏宇)