

过表达 *KAR2* 基因对毕赤酵母产米黑根毛霉脂肪酶的影响

黄金金, 孙梦雪, 王一洲, 赵庆伊, 张馨, 张恺倪 (江苏师范大学药用植物生物技术实验室, 生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要 Kar2p 是分子伴侣蛋白, 可与新生肽结合, 促进新生肽进入内质网。为研究其对米黑根毛霉脂肪酶 (RML) 在毕赤酵母中表达的影响, 通过 PCR 方法从毕赤酵母菌株中克隆到 *KAR2* 基因, 并用毕赤酵母胞内表达载体 pPIC3.5K 构建过表达质粒 *KAR2*-pPIC3.5K。用电转化的方法, 将 *KAR2*-pPIC3.5K 二次转化到含 4-拷贝 *rml* 基因的毕赤酵母重组菌株 4pRML-X33 中, 获得能同时过表达 RML 和 *KAR2* 的二次转化子 4pRML-X33-*KAR2*。摇瓶发酵发现, 过表达 *KAR2* 基因对菌株生长无明显影响, 但 RML 胞外酶活降低。采用 RT-qPCR 方法分析菌中 *rml* 及 UPR 相关基因的转录水平, 发现 *KAR2* 基因转录水平上调了 3.7 倍, 虽然仅引起与 UPR 相关的 *HAC1* 基因转录水平的下调, 但却使 *rml* 的表达下调 43%。说明 *KAR2* 过表达导致 RML 产量降低是降低了 *rml* 的 mRNA 量, 而不是增加内质网中蛋白折叠的压力。

关键词 米黑根毛霉脂肪酶; *KAR2*; 过表达; 毕赤酵母; UPR

中图分类号 Q78 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)14-0103-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.14.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effect of Overexpression of *KAR2* on *Rhizomucor miehei* Lipase Expression in *Pichia pastoris*

HUANG Jin-jin, SUN Meng-xue, WANG Yi-zhou et al (Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116)

Abstract Kar2p is a molecular chaperone that binds to new peptides and facilitates their entry into the endoplasmic reticulum (ER). In order to study its effect on the expression of *Rhizomucor miehei* lipase (RML) in *Pichia pastoris*, *KAR2* gene was cloned from *Pichia pastoris* gDNA by PCR method. And it was ligated to vector pPIC3.5K to obtain the intracellular overexpression plasmid *KAR2*-pPIC3.5K. *KAR2*-pPIC3.5K was then transformed into *Pichia pastoris* recombinant strain 4pRML-X33 which containing 4 copies of *rml* gene used electroporation transformation method. The twice transformant 4pRML-X33-*KAR2* that could overexpress both RML and *KAR2*p was obtained. Shaking flask fermentation found that overexpression of *KAR2* gene had no significant effect on strain growth, but the extracellular enzyme activity of RML decreased. Then *rml* mRNA level and transcription level of UPR-related genes were analyzed used RT-qPCR method. Results found that the transcription level of *KAR2* increased 3.7 times, and only caused downregulation of the transcription level of the *HAC1* gene associated with UPR, while *rml* mRNA decreased 43%. Those results suggested that the decrease in RML production after overexpression of *KAR2* was due to the reduction of *rml* mRNA, rather than increased the protein folding pressure in ER.

Key words *Rhizomucor miehei* lipase; *KAR2*; Overexpression; *Pichia pastoris*; UPR

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为异源基因的表达体系已有近 30 年的历史, 该表达体系成功表达了多种饲料酶、食品酶等, 目前已发展成生产异源蛋白质最重要的工业宿主之一^[1]。巴斯德毕赤酵母具有其他蛋白表达宿主不可替代的优势: 严格的醇氧化酶启动子调控机制; 基因操作方法简单; 工业发酵过程成熟; 内源蛋白分泌少; 可对异源蛋白进行翻译后修饰等^[2]。2009 年, 巴斯德毕赤酵母完整的基因组序列被公布^[3]。据统计, 有超过 5 000 种异源蛋白在巴斯德毕赤酵母表达体系中成功表达^[4]。目前在表达体系中报道的异源蛋白产量最高的是里氏木霉纤维素酶, 产量高达 18 g/L^[5]。

尽管毕赤酵母成功表达多种异源蛋白, 但异源蛋白的产量受诸多因素影响。提高异源蛋白产量的研究主要集中在优化培养条件^[6]、启动子类型^[7]、外源基因密码子^[8]、外源基因拷贝数^[9]以及蛋白折叠过程和分泌途径的改造^[10]。特别是在多拷贝重组菌株中共表达蛋白合成分泌途径中的伴侣蛋白, 以缓解因异源蛋白过表达引起的宿主蛋白折叠压力和分泌阻力, 从而达到增加异源蛋白产量的目的^[10]。其中与内质网中未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 相关的 *HAC1*、*KAR2*、*PDI* 和 *ERO1* 等基因的共表达可分别增加内聚

葡萄糖 1^[11]、生物表面活性剂 HFPI^[12]、人类免疫缺陷病毒 I 型的抗体片段 (2F5mAb)^[13] 和 α -半乳糖苷酶^[14] 的产量。但不是共表达伴侣蛋白都可以提高蛋白产量, 研究发现, 过表达 *PDI* 降低了猪胰岛素前体在毕赤酵母中的表达水平^[15]。

在 4 个 UPR 相关基因中, Kar2p 可与新生肽结合, 促进其进入内质网^[9]。研究表明在毕赤酵母中过表达 *KAR2* 基因虽然抑制了假黑盘菌素表达^[16], 但提高了解脂耶氏酵母脂肪酶的表达^[14]。但上述研究均未阐明异源蛋白产量变化的原因。可见针对不同的异源蛋白, 在毕赤酵母中过表达 *KAR2* 基因对外源蛋白产量影响及机理不清楚。

米黑根毛霉脂肪酶 (*Rhizomucor miehei* lipase, RML) 是一种重要的工业用酶, 因其能够催化水解、酯化、转酯化和氨解等多种反应, 广泛用于饲料、油脂加工、食品风味改良、医药和能源等行业中^[9, 17]。研究前期, 获得了一株胞外产 RML 的 4-拷贝毕赤酵母重组菌株 (4pRML-X33)^[9]。目前没有 *KAR2* 基因在多拷贝 *rml* 毕赤酵母重组菌中过表达对 RML 产量影响及机制的研究。该研究通过在 4-拷贝的 RML 生产菌株 (4pRML-X33) 中过表达 *KAR2* 基因, 探讨其对 RML 胞外酶活的影响及机制, 为研究异源蛋白在毕赤酵母中表达提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

巴斯德毕赤酵母野生型菌株 X-33 (*Pichia pastoris* X-33) 和含有 4-拷贝 *rml* 基因的重组菌株

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目 (31901629)。

作者简介 黄金金 (1988—), 女, 山东临沂人, 讲师, 博士, 从事异源蛋白表达研究。

收稿日期 2020-02-05

(4pRML-X33)及胞内蛋白表达载体 pPIC3.5K 系中国农业大学李颖教授实验室赠与。大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞 (CD501-02) 购买于北京全式金生物技术有限公司。

1.2 KAR2 基因克隆及过表达菌株构建

1.2.1 D-2 buffer 提取毕赤酵母基因组 DNA (gDNA)。在超净台中,用灭菌的牙签挑取火柴头大小的毕赤酵母单菌落于 100 μ L D-2 buffer [4 mol/L 异硫氰酸胍, 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 5 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L β -巯基乙醇] 中,轻轻混匀。混合液在沸水中煮 5 min 后置于冰上冷却, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。沉淀用 200 μ L 无菌水洗涤, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。重复洗涤沉淀 3 次后, 用 20 μ L 无菌水悬浮。悬浮液在沸水中煮 5 min 后放冰上冷却。12 000 r/min 离心 2 min, 保存上清, 获得毕赤酵母的 gDNA。吸取上清 5~10 μ L 用作 PCR 模板。

1.2.2 KAR2 基因过表达质粒的构建。根据 KAR2 (GenBank: NC_012964.1) 的核苷酸序列设计扩增引物 KAR2-F: 5'-CGGGATCC (BamH I) ACCATGCTGTCGTTAAAC-CATCTTG-3' 和 KAR2-R: 5'-ATAAGAATGCGGCCGC (Not I) CTACAACATCATGATCATAGTCAT-3'。以 X-33 的 gDNA 为模板, KAR2-F 和 KAR2-R 为引物, 采用 Q5 超保真 DNA 聚合酶 (M0491, NEB) 克隆获得 KAR2 基因。琼脂糖凝胶电泳后回收 KAR2 基因片段。酵母胞内表达载体 pPIC3.5K 和 KAR2 基因片段分别用 BamH I 和 Not I 进行双酶切。双酶切后的基因片段和载体用 T₄ DNA Ligase (M0202, NEB) 连接后转化到大肠杆菌 Trans1-T1, 涂布到卡那霉素的 LB 平板上。待其长出单菌落, 取转化子进行菌落 PCR 验证。验证的引物为 5' AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') 和 3' AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3')。获得 KAR2 的胞内表达质粒 KAR2-pPIC3.5K。

1.2.3 KAR2 基因过表达菌株的构建。用 BspE I 线性化胞内过表达质粒 KAR2-pPIC3.5K。将线性化的 KAR2-pPIC3.5K 二次电转化到含有 4-拷贝 *rml* 基因的重组菌株 (4pRML-X33) 中, 电转化的条件为 1.5 kV、200 Ω 和 25 μ F。转化液涂布于含有 G418 (250 μ g/mL) 和 Zeocin (100 μ g/mL) 的 YPDS (1% 酵母粉、2% 蛋白胍、2% 葡萄糖、1 mol/L 山梨醇、2% 琼脂粉) 平板上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 2~3 d, 长出过表达菌株的单菌落。单菌落在 YPDS 平板上划线扩大培养后, 用 D-2 buffer 快速提取各菌株的 gDNA。以 gDNA 为模板, 5' AOX1 和 KAR2-R 为扩增引物, 扩增 KAR2 基因, 以筛选获得正确的 KAR2 过表达菌株 4pRML-X33-KAR2。同样的步骤将 pPIC3.5K 电转化到 4pRML-X33 中, 筛选获得只含有 pPIC3.5K 的重组菌株 4pRML-X33-3.5K。

1.3 菌株摇瓶发酵及 RML 酶活检测

1.3.1 摇瓶发酵。重组菌株 4pRML-X33, 4pRML-X33-3.5K 和 4pRML-X33-KAR2 的摇瓶发酵方法参照文献[9]。菌株在 YPD 平板上长出单菌落, 将单菌落接种于 BMGY 培养基 (1% 酵母粉、2% 蛋白胍和 1% 甘油) 的三角瓶中, 三角瓶装液量为 1/10。摇床 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 介于 4.0~8.0,

作为种子液。取种子液转接到含有 BMMY 培养基 (1% 酵母粉、2% 蛋白胍、1.0% 甲醇、100 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0) 的三角瓶中, 装液量为 1/10。三角瓶置于 28 $^{\circ}$ C 摇床发酵、转速为 200 r/min。每 24 h 向三角瓶中补加甲醇至其终浓度为 1% (V/V), 以诱导蛋白表达。当酶活不再增加时停止发酵。每 24 h 取样检测菌株生长和胞外酶活。

1.3.2 NaOH 滴定法检测 RML 的酶活。用无 CO₂ 的 ddH₂O 配制成 5 mol/L 的 NaOH 储液, 准确稀释成 0.05 mol/L 的工作液。用邻苯二甲酸氢钾确定储液的准确浓度。称 20 g PVA-1750 于 1 L 蒸馏水中, 反复加热使之溶解。溶解液冷却后用四层纱布过滤, 并定容至 1 L 获得 2% PVA-1750。橄榄油与 2% PVA-1750 按体积比 1:3 混合, 乳化成 PVA-橄榄油乳化液。取 5 mL PVA-橄榄油乳化液和 4 mL 0.1 mol/L pH 6.0 的柠檬酸-磷酸钠缓冲液于 150 mL 三角瓶中, 置于水浴摇床中 35 $^{\circ}$ C、150 r/min, 预热 10 min。将 1 mL 稀释好的发酵液加到上述三角瓶中反应 10 min, 用 15 mL 无水乙醇终止反应。空白对照: 将 1 mL 发酵液加入到 15 mL 无水乙醇中失活 10 min, 再加入到底物和缓冲液中。以酚酞作指示剂, 0.05 mol/L NaOH 进行酸碱滴定反应, 直至溶液刚刚变为粉红色且 30 s 不褪色, 记录反应消耗的 NaOH 体积。在该测定条件下, 1 min 释放 1 μ mol 脂肪酸的酶量定义为一个酶活单位。酶活计算公式: $V_{\text{NaOH}} \times \text{发酵液稀释倍数} \times 5$ 。消耗的 NaOH 体积需处于 1.0~2.5 mL, 否则要对发酵液重新稀释。

1.4 SDS-PAGE 检测目的蛋白 取 1 mL 发酵后的菌液 12 000 r/min 离心 5 min。上清与 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合。上样缓冲液的成分为 250 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、5% (W/V) β -巯基乙醇、0.5% (W/V) BPB、10% (W/V) SDS 和 50% (V/V) 甘油。混合液在沸水中煮 10 min, 室温冷却, 作为 SDS-PAGE 样品。SDS-PAGE 采用 5% 浓缩胶和 12% 分离胶, 染色采用考马斯亮蓝 R250 染色法。具体方法参照文献[18]。

1.5 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)

1.5.1 毕赤酵母总 RNA 提取及反转录成 cDNA。取摇瓶发酵 96 h 的菌体, 用 TRIzol 法提取总酵母 RNA^[19]。TransScript Green 两步法 RT-qPCR SuperMix (Transgen biotech Co., Beijing, China) 将 RNA 反转录成 cDNA。

1.5.2 RT-qPCR。RT-qPCR 的方法参照文献[9], 使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (*gap*) 为内参基因。不同之处是该试验采用 ABI StepOnePlus 系统, 以 ABI PowerUp SYBR Green Master Mix (A25742, ABI, USA) 作为荧光染料。*gap*、*rml* 和 UPR 相关基因 *HAC1*、*KAR2*、*PDI*、*ERO1* 的 qPCR 引物列于表 1^[9]。

2 结果与分析

2.1 过表达质粒 KAR2-pPIC3.5K 的构建 根据 pPIC3.5K 多克隆位点和 KAR2 基因的特点, 在 KAR2 基因的上游和下游引物上分别引入 BamH I 和 Not I 酶切位点。以 X-33 的 gDNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得 KAR2 基因, 基因长度为

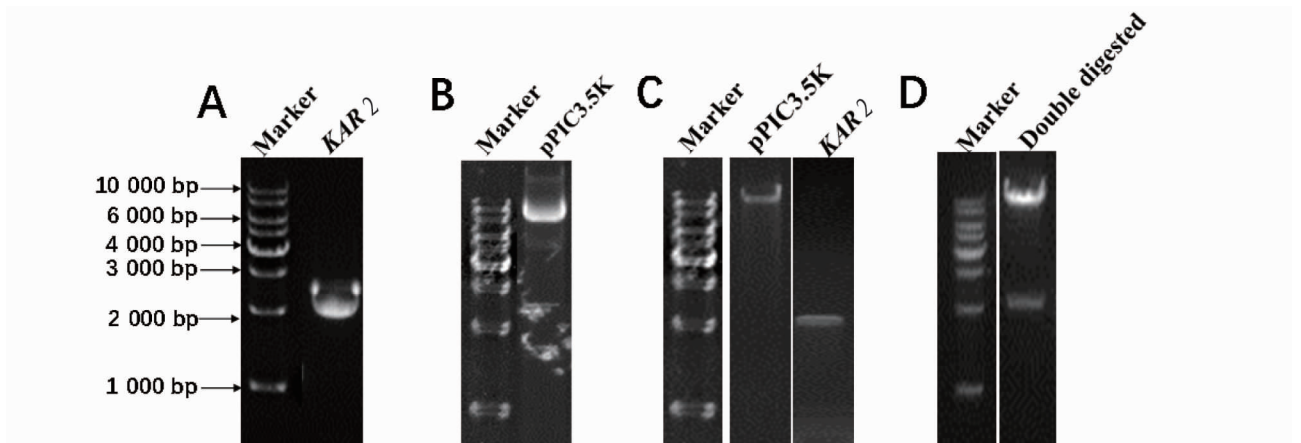
表 1 目标基因及其荧光定量检测引物

Table 1 Target gene and its detection primer for RT-qPCR

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence(5'—3')	扩增大小 Amplification size//bp
<i>gap</i>	<i>gap-f</i>	TACGTCATTGAGTCCACCGGT	184
	<i>gap-r</i>	TGGTAGTACAAGAAGCATTGGAG	
<i>rml</i>	<i>rml-r</i>	AGCATTGATGGTGGTATCCGC	179
	<i>rml-f</i>	ATAGATGAGCGTGCTCCAAGT	
<i>HAC1</i>	<i>HAC1-f</i>	CAAGAATCAGCCAAAGCC	199
	<i>HAC1-r</i>	TGCGAGTGGATGTAGATGC	
<i>KAR2</i>	<i>KAR2-f</i>	CCTACTTCAACGACGCTCAA	199
	<i>KAR2-r</i>	CCACCCTCAATAGAAAAGCAGA	
<i>PDI</i>	<i>PDI-f</i>	GAGCAACAAGAAGTTGGAGTTCC	260
	<i>PDI-r</i>	CCTGATAAGCAGGAGCCATTC	
<i>ERO1</i>	<i>ERO1-f</i>	CGTTAGCAAACCCTCAAATCC	201
	<i>ERO1-r</i>	GCAGAATCCCTCATCACCATT	

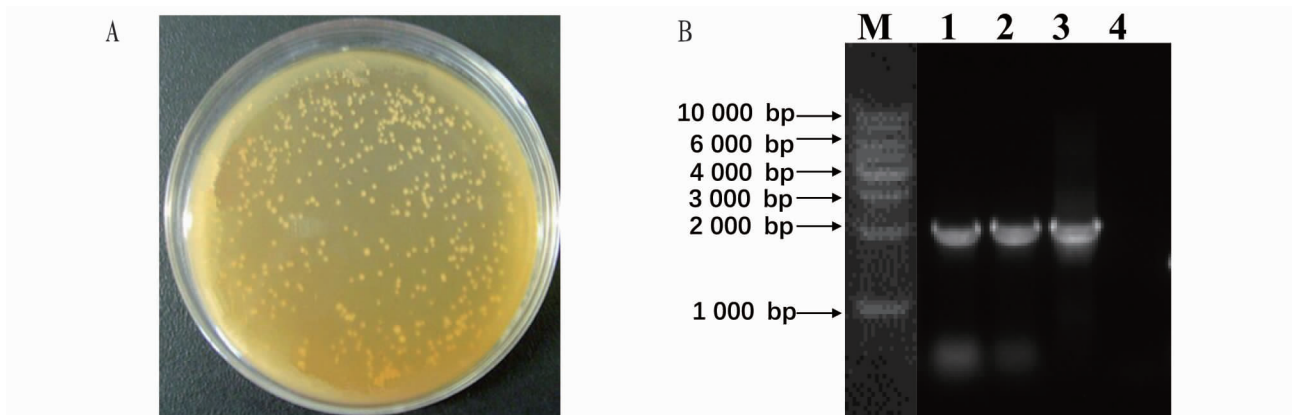
2 037 bp (图 1 A)。用质粒提取试剂盒提取 pPIC3.5K 载体, 载体大小为 9 004 bp (图 1B)。用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切 *KAR2* 基因片段和 pPIC3.5K 载体 (图 1C), 并通过 T_4 DNA 连接酶将二者连接, 转化到大肠杆菌中, 提取转化子中的重组质粒。用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切筛选重组质粒, 发现出现 2 条带: 一条大小约为 2 037 bp, 另一条约为 9 004 bp (图 1D)。将 *KAR2*-pPIC3.5K 送至苏州金唯智生物科技有限公司进行序列测定, 发现测序结果与 GenBank: NC_012964.1 中序列完全一致, 获得 *KAR2*-pPIC3.5K 重组质粒。

2.2 过表达菌株 4pRML-X33-KAR2 的构建及验证 按照前述方法, 用 *Bsp*E I 线性化重组质粒 *KAR2*-pPIC3.5K 后, 采用电转化的方法将线性化的质粒二次转化到 4pRML-X33 中。G418 和 Zeocin 双抗性平板筛选得到 4pRML-X33-KAR2 转化子 (图 2A)。将转化子进行平板划线扩大培养, 取 3 个



注: A. PCR 扩增获得 *KAR2* 基因; B. 电泳检测提取的 pPIC3.5K 载体; C. *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切 *KAR2* 基因片段和 pPIC3.5K 载体; D. *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切筛选正确的 *KAR2*-pPIC3.5K 质粒

Note: A. *KAR2* gene was obtained by PCR amplification; B. pPIC3.5K detected by agarose gelelectrophoresis; C. Double enzyme digestion of *KAR2* gene fragment and pPIC3.5K vector by *Bam*H I and *Not* I; D. Double enzyme digestion screened the *KAR2*-pPIC3.5K plasmid by *Bam*H I and *Not* I

图 1 *KAR2*-pPIC3.5K 胞内表达质粒的构建Fig.1 Construction of intracellular overexpression plasmid *KAR2*-pPIC3.5K

注: A. G418 和 Zeocin 双抗性 YPDS 平板筛选 *KAR2* 过表达菌株; B. PCR 筛选 *KAR2* 过表达菌株; M. DNA Marker; 1-3. 以 *KAR2* 基因转化子 gDNA 为模板; 4. 以 4pRML-X33 gDNA 为模板的负对照

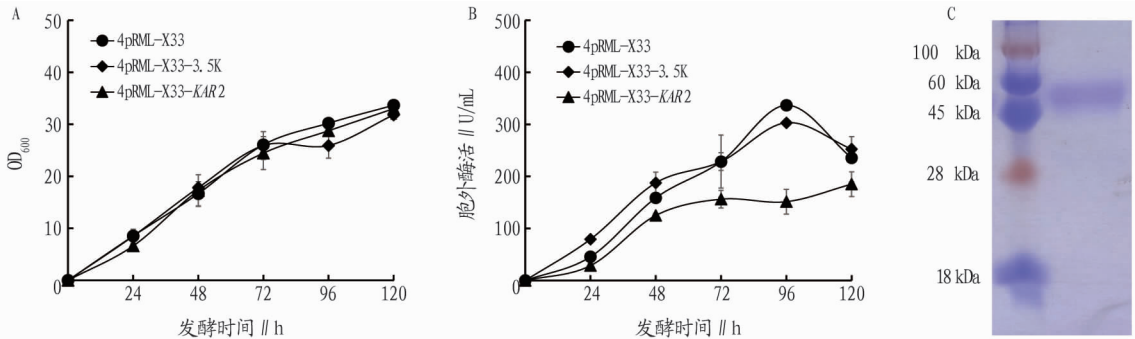
Note: A. YPDS plate containing G418 and Zeocin were used to screen *KAR2* overexpressed strain; B. PCR was used to screen *KAR2* overexpressed strain; M. DNA Marker; 1-3. The gDNA of *KAR2* gene overexpressed strains were used as template; 4. Negative control with 4pRML-X33 gDNA as template

图 2 *KAR2* 基因过表达菌株 4pRML-X33-KAR2 的筛选Fig.2 Screening of *KAR2* gene overexpression strain 4pRML-X33-KAR2

转化子用 D-2 buffer 提取转化子的 gDNA。分别以 3 个转化子的 gDNA 为模板,5' AOX1 和 KAR2-R 引物进行菌落 PCR 验证阳性转化子,结果见图 2B。结果发现,3 个转化子均扩增到目的条带,说明均为阳性转化子,成功筛选到 4pRML-X33-KAR2 菌株。对照菌株 4pRML-X33-3.5K 是将 pPIC3.5K 线性化后电转到 4pRML-X33。

2.3 过表达 KAR2 基因对 4pRML-X33 菌株产酶的影响 将菌株 4pRML-X33、4pRML-X33-3.5K 和 4pRML-X33-KAR2 进行摇瓶发酵,每隔 24 h 取样测细胞密度 (OD₆₀₀) 及胞外酶活 (图 3)。从图 3A 发现,4pRML-X33-3.5K 和 4pRML-X33-KAR2 的细胞生长与 4pRML-X33 一致,说明 pPIC3.5K 和 KAR2 基因对重组菌株生长无影响。各菌株胞

外酶活曲线见图 3B,从图中发现 3 株菌的胞外酶活均在 96 h 时达到最大。4pRML-X33-3.5K 与 4pRML-X33 胞外酶活曲线基本一致,说明 pPIC3.5K 对菌株胞外酶活无影响。但 4pRML-X33-KAR2 的胞外酶活比 4pRML-X33 和 4pRML-X33-3.5K 都低。发酵 96 h 时,酶活从 303.03 U/mL (4pRML-X33-3.5K) 下降到 151.52 U/mL (4pRML-X33-KAR2),降低 50%。说明过表达 KAR2 基因显著降低了菌株的胞外酶活。该结果与过表达 KAR2 基因降低假黑盘菌素在毕赤酵母中表达量一致^[16]。另外,通过 SDS-PAGE 检测了 4pRML-X33-KAR2 的胞外目的蛋白,结果见图 3C,发现在 45~60 kDa 有目的条带。RML 的蛋白大小预测值为 43 kDa,但由于毕赤酵母对 RML 进行糖基化修饰,导致其分子量变大^[9]。



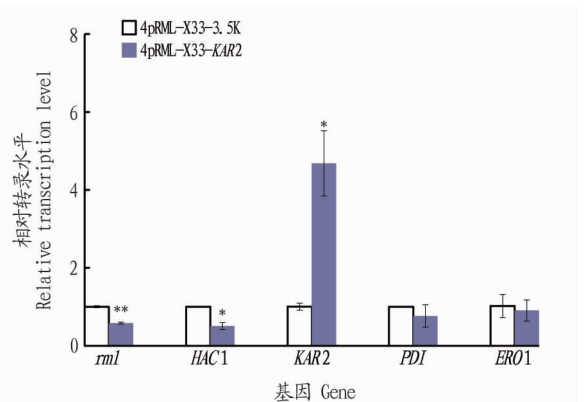
注:A.菌体生长曲线;B.胞外酶活曲线;C.SDS-PAGE 检测过表达菌株胞外目的脂肪酶

Note:A.Growth curve of recombinant strains;B.Extracellular enzyme activity curve;C.Extracellular lipase protein detection of 4pRML-X33-KAR2 by SDS-PAGE

图3 重组菌株摇瓶发酵及蛋白检测

Fig.3 Shaking fermentation and protein detection of recombinant strains

2.4 荧光定量 PCR 分析 在蛋白过量表达时,大量新生肽进入内质网,会引起内质网中蛋白折叠压力,大量错误折叠或未折叠的蛋白聚集在内质网腔中,打破内质网腔的稳态^[20]。为维持内质网腔的稳态,细胞会激活一系列信号途径帮助恢复内质网的内环境,包括加强内质网中蛋白折叠的能力和加速错误蛋白或未折叠蛋白降解等,该过程称为解折叠蛋白反应,即 UPR^[20]。4pRML-X33-KAR2 菌株的胞外 RML 酶活降低,推测是 KAR2 基因过表达,使大量新生肽进入到内质网中,导致蛋白折叠压力增大,引起 UPR 反应。HAC1、KAR2、PDI 和 ERO1 的转录水平变化可指示细胞内是否发生 UPR 反应,进而表明是否产生内质网中蛋白折叠压力^[9]。该研究采用 RT-qPCR 法比较 4pRML-X33-3.5K 和 4pRML-X33-KAR2 菌株中与 UPR 相关的基因转录水平变化,同时检测了目的基因 rml 的 mRNA 量变化,结果见图 4。从图 4 可以看出,与 4pRML-X33-3.5K 相比,4pRML-X33-KAR2 中 KAR2 基因相对转录水平提高了 3.7 倍。另外,还发现 HAC1 的相对转录水平显著降低,但 PDI 和 ERO1 的相对转录水平未发生显著变化,即 KAR2 基因过表达并未造成内质网中蛋白折叠压力的增大。有趣的是,从图 4 中发现 4pRML-X33-KAR2 中 rml 的 mRNA 量显著降低了 43%,说明 KAR2 基因过表达导致了 rml 的 mRNA 量显著减少。rml 的 mRNA 减少量 (43%) 与胞外酶活减少量 (50%) 基本一致,



注:用 SPSS 统计软件计算数据的偏度和峰度值。对于正态分布数据,采用不配对、双尾、方差不等的 *t* 检验来评价其显著性,用“*”或“**”表示,分别代表 $P \leq 0.05$ 或 $P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$ 为差异显著, $P \leq 0.01$ 为差异极显著

Note:SPSS was used to calculate the skewness and kurtosis of the data. For normally distributed data, t-tests of unpaired, two-tailed and variance inequality was used to evaluate its significance (*P*). *P* was denoted by “*” or “**”, representing $P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$ respectively. $P \leq 0.05$ was considered as significant difference, $P \leq 0.01$ was extremely significant difference

图4 RT-qPCR 检测 rml 和 UPR 相关基因的转录水平

Fig.4 Transcription levels of rml and UPR related genes were detected by RT-qPCR

认为 4pRML-X33-*KAR2* 胞外酶活的降低是 *rml* 基因的 mRNA 量下降导致的,而不是加剧了内质网腔的蛋白折叠压力。

3 结论

该试验通过在产 RML 的多拷贝菌株 4pRML-X33 中过表达 *KAR2* 基因,发现过表达 *KAR2* 基因对菌株生长无影响,但胞外酶活从 303.03 U/mL 下降到 151.52 U/mL,下降 50%。通过 RT-qPCR 分析 UPR 相关基因的转录水平变化,发现过表达 *KAR2* 后,仅 *HAC1* 的相对转录水平下调,*PDI* 和 *ERO1* 基因转录水平未显著变化,说明未增加内质网中蛋白折叠的压力。另外发现,*KAR2* 过表达后使菌株中 *rml* 的 mRNA 量下调 43%,与酶活降低量基本一致,说明 *KAR2* 过表达导致 RML 胞外酶活降低是因为减少了菌株细胞内 *rml* 的 mRNA 水平。该研究探讨过表达 *KAR2* 使 RML 胞外酶活降低的原因,为过表达伴侣蛋白影响其他外源蛋白的表达提供了参考。

参考文献

- [1] YANG Z L,ZHANG Z S.Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*:A review[J].Biotechnol Adv, 2018,36(1):182-195.
- [2] LI P Z,ANUMANTHAN A,GAO X G,et al.Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*[J].Appl Microbiol Biotechnol,2007,142:105-124.
- [3] MATTANOVICH D,GRAF A,STADLMANN J,et al.Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*[J].Microb Cell Fact,2009,8:1-13.
- [4] SCHWARZHANS J P,LUTTERMANN T,GEIER M,et al.Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*[J].Biotechnol Adv,2017,35:681-710.
- [5] MELLITZER A,RUTH C,GUSTAFSSON C,et al.Synergistic modular promoter and gene optimization to push cellulase secretion by *Pichia pastoris* beyond existing benchmarks[J].J Biotechnol,2014,191:187-195.
- [6] HUANG J J,YANG Z,GUAN F F,et al.A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation[J].Process Biochem,2013,48:1899-1904.
- [7] HE D,LUO W,WANG Z Y,et al.Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of *Rhizomucor miehei* lipase[J].J Ind Microbiol Biotechnol,2015,42:1175-1182.
- [8] LUO W,WANG Z Y,MIAO C L,et al.Expression of lipase gene from *Rhizomucor miehei* in *Pichia pastoris* and properties of lipase[J].Chem Ind Forest Prod,2016,36:135-140.
- [9] HUANG J J,XIA J,YANG Z,et al.Improved production of a recombinant *Rhizomucor miehei* lipase expressed in *Pichia pastoris* and its application for conversion of microalgae oil to biodiesel[J].Biotechnol Biofuels,2014,7:1-11.
- [10] ZHENG X Y,ZHANG Y M,ZHANG X Y,et al.Fhl1p protein,a positive transcription factor in *Pichia pastoris*,enhances the expression of recombinant proteins[J].Microb Cell Fact,2019,18:207.
- [11] LI L,HUANG C,ZHAO F G,et al.Improved production and characterization of *Volvariella volvacea* Endoglucanase 1 expressed in *Pichia pastoris* [J].Protein Expres Purif,2018,152:107-113.
- [12] SALLADA N G,HARKINS L E,BERGER B W.Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*[J].Biotechnol Bioeng,2019,116:2029-2040.
- [13] GASSER B,SAUER M,MAURER M et al.Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts [J].Applied and environmental microbiology,2007,73:6499-6507.
- [14] HAN Z G,ZHANG J W,JIANG X F,et al. Gene dosage and coexpression with endoplasmic reticulum secretion-associated factors improved the secretory expression of alpha-galactosidase[J].Protein Expres Purif,2019,153:83-91.
- [15] ZHU T,GUO M,TANG Z,et al.Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*[J].J Appl Microbiol,2009,107:954-963.
- [16] 王楠,李刚强,郭文芳,等.毕赤酵母 *KAR2p* 过表达对假黑盘菌素表达量的影响[J].生物技术通报,2016,32(1):180-186.
- [17] DIAO X Q,GUAN H N,KONG B H,et al.Preparation of diacylglycerol from lard by enzymatic glycerolysis and its compositional characteristics [J].Korean J Food Sci An,2017,37:813-822.
- [18] SHEN Q,WU M,WANG H B,et al.The effect of gene copy number and co-expression of chaperone on production of albumin fusion proteins in *Pichia pastoris*[J].Appl Microbiol Biotechnol,2012,96:763-772.
- [19] HUANG J J,WANG Q,BU W,et al.Different construction strategies affected on the physiology of *Pichia pastoris* strains highly expressed lipase by transcriptional analysis of key genes[J].Bioengineered,2019,10(1):150-161.
- [20] DELIC M,VALLI M,GRAF A B,et al.The secretory pathway:Exploring yeast diversity[J].FEMS Microbiol Rev,2013,37:872-914.