

• 工业生物技术 •

毕赤酵母中 $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因的表达及其作用效果

彭梦^{1,2*}, 谭明^{2*}, 曾艳², 郑宏臣², 宋谈²

1 天津科技大学, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

彭梦, 谭明, 曾艳, 等. 毕赤酵母中 $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因的表达及其作用效果. 生物工程学报, 2019, 35(1): 70–80.

Peng M, Tan M, Zeng Y, et al. Expression of *Pichia pastoris* $tRNA_{CCG}^{Pro}$ and its function. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 70–80.

摘 要: 转运核糖核酸 (tRNA) 是蛋白质合成过程中重要参与成分之一, 为了探索稀有密码子对应的 tRNA (稀少 tRNA) 丰度改变对外源基因表达量的影响, 文中构建了毕赤酵母稀少 tRNA 基因与外源基因共表达体系。首先在 *GFP* 基因中添加由 4 个连续脯氨酸稀有密码子 CCG 组成的阻遏区, 结果显示该 *GFP* 基因的表达量明显降低。然后将带有阻遏区的 *GFP* 基因和 $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因顺次连接于 pPIC9K 载体上, 在毕赤酵母 GS115 中共表达, 结果使 *GFP* 表达量提高了 4.9%; 另将带有阻遏区的 *GFP* 基因和 $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因分别连接于 pPIC9K 和 pFLD α 载体, 在毕赤酵母 GS115 中共表达, *GFP* 表达量最高提高了 12.5%; 应用同样方式将 $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因与 *NEATc3T-GFP* 融合基因共表达, 其表达量提高了 21.3%。可见, $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 在毕赤酵母 GS115 中确为稀少 tRNA, 通过共表达 $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因可显著提高带有连续该密码子的外源基因表达量, 并且, 文中构建的共表达体系将同样适用于其他稀少 tRNA 基因的筛选和验证。

关键词: 毕赤酵母, 稀少 tRNA 丰度, $tRNA_{CCG}^{Pro}$ 基因, 共表达

Expression of *Pichia pastoris* $tRNA_{CCG}^{Pro}$ and its function

Meng Peng^{1,2*}, Ming Tan^{2*}, Yan Zeng², Hongchen Zheng², and Hui Song²

1 Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Translocation ribonucleic acid (tRNA) is one of the important components in protein synthesis. In order to explore the effect of the changes of tRNAs corresponding to rare codons (rarity tRNAs) on the expression of exogenous genes, the co-expression system of rare tRNA gene and exogenous gene in *Pichia pastoris* was constructed. The expression of GFP in *P. pastoris* can be greatly reduced when a repressor region composed of four continuous proline rare codon CCG was added into the *GFP* gene. The expression amount of the repressed GFP could be increased about 4.9% when $tRNA_{CCG}^{Pro}$ gene was cointegrated to the 3' of the repressed *GFP* gene through pPIC9K to the genome of *P. pastoris* GS115. Meanwhile, the

Received: April 3, 2018; **Accepted:** June 1, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31701534), Key Deployment Project in Chinese Academy of Sciences (Nos. KFJ-STZ-ZDTP-016, KFZD-SW-211), Tianjin Science & Technology Planning Project (Nos. 16YFZCSY00790, 16YFXTSY00530, 15YFYssy00040).

Corresponding author: Hui Song. Tel/Fax: +86-22-84861934; E-mail: song_h@tib.cas.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31701534), 中国科学院重点部署项目 (Nos. KFJ-STZ-ZDTP-016, KFZD-SW-211), 天津市科技计划项目 (Nos. 16YFZCSY00790, 16YFXTSY00530, 15YFYssy00040) 资助。

expression amount of the repressed GFP increased about 12.5% by integrating the repressed *GFP* gene and $tRNA_{CCG}^{Pro}$ gene to the genome of *P. pastoris* GS115 through pPIC9K and pFLD α , respectively. Using the same method, *NFATc3T-GFP* fusion gene and $tRNA_{CCG}^{Pro}$ gene were co-expressed in *P. pastoris* GS115 resulting in 21.3% increased of the expression amount of NFATc3T-GFP fusion protein. In conclusion, $tRNA_{CCG}^{Pro}$ gene has been confirmed to be a kind of rare tRNAs in *P. pastoris* GS115. Through co-expression of $tRNA_{CCG}^{Pro}$ gene and heterologous genes which containing the continuous rare codon CCG, the expression of the repressed heterologous genes could be increased significantly. Furthermore, this co-expression system would contribute to screening and determining the other rare tRNAs.

Keywords: *Pichia pastoris*, rare tRNA abundance, $tRNA_{CCG}^{Pro}$ gene, co-expression

转运核糖核酸 (tRNA) 是在生物体内广泛存在的一类非编码 RNA 分子^[1]。在基因表达过程中, tRNA 是遗传信息传递过程中的重要参与者, 是连接核苷酸序列和氨基酸序列的重要纽带^[2]。细胞内每种 tRNA 的数量存在显著差异, 由于密码子简并性的存在, 生物体内的高表达基因均采用了数量相对丰富的 tRNA 所对应的密码子以保证表达过程的高效顺利完成, 这些密码子称为偏好密码子; 与此对应的, 数量相对稀少的 tRNA 对应的密码子生物体一般较少采用, 称为稀有密码子^[3]。这种生物对于使用部分密码子的倾向性现象被称为密码子偏好性, 不同生物的密码子的偏好性存在着显著差异^[4]。将一种生物来源的基因转入另外的宿主中进行外源表达时, 经常面临基因来源生物与宿主生物密码子偏好性不同的问题, 这将导致外源基因在核糖体上的翻译过程因为宿主体内对应 tRNA 短缺而出现停滞现象, 造成基因低表达或不表达。一般通过将外源基因按照宿主密码子偏好性进行改造的方式解决^[5-6]。另外一种方式是通过提高宿主体内稀少 tRNA 的丰度, 从而提高外源基因表达几率和表达量^[7-8]。

例如, 精氨酸密码子 AGA/AGG 是真核生物中常见的密码子, 但在大肠杆菌中特别罕见^[9-11]。Dieci 等^[12]通过使用携带大肠杆菌 *argU* 基因 (*argU* 基因编码的稀少 tRNA 识别 AGA/AGG 密码子) 的质粒来克服这种限制。用含有大肠杆菌 *argU* 基因的质粒转化已含有外源核糖体蛋白基因的大肠杆菌, 使 5 种真核生物来源的细胞质核糖体蛋白表达量提高至总细菌蛋白质的 50%。Kleber 等^[13]

在细菌中表达不同的花生过敏原时发现, *Arah 1*、*2*、*6* 的成熟基因中含有 8%–10% 稀有密码子 AGA/AGG, 其表达量比含 0.8% 同样稀有密码子 AGA/AGG 的 *Arah 5* 要低很多。在不改变基因密码子含量的情况下, 通过在大肠杆菌细胞中增加稀少 tRNA *argU*、*ileY* 和 *lueW* 基因的拷贝数, 使 *Arah 1*、*2*、*6* 表达量提高了 100 多倍。Robert 等^[14]通过补充大肠杆菌缺乏的 6 种稀少 tRNA, 构建了商业化的 Rosseta 大肠杆菌表达系统。实验结果验证 Rosseta 表达系统能够缓解由密码子偏好性导致的蛋白表达量低的问题, 可以提高外源基因尤其是真核基因在原核系统中的表达水平^[15-17]。Constanze 等^[18]在巨大芽孢杆菌中通过共表达稀少 tRNA 基因, 外源细胞外水解酶 (TFH) 蛋白质产量增加了 18 倍。但在目前应用较广泛的毕赤酵母真核表达系统中还未有相关研究报道。

为了实现在毕赤酵母中提高稀少 tRNA 丰度提高外源基因表达量的目的, 需要获得准确的毕赤酵母稀少 tRNA 基因。目前, tRNA 基因主要依靠软件预测技术进行发掘, 其中应用最为广泛的是 tRNA Scan-SE 软件^[19]。其预测结果被大多数基因组作为测序分析 tRNA 基因的注释依据而采用。但由于真核生物 tRNA 基因的转录后修饰较为复杂, 依靠识别基因组中 tRNA 基因的第 34–37 位碱基作为反密码子的预测方式偏差较大^[20], 因此需要对预测出的毕赤酵母 tRNA 基因结果进行实验验证。

Constanze 等在巨大芽孢杆菌构建了一种以 *GFP* 为报告基因的 tRNA 基因验证方法, 该验证方法在 *GFP* 基因序列 5'端 15 个碱基后加入多个

连续稀有密码子,在 *GFP* 基因序列之后加入待验证的稀有密码子对应 tRNA 的基因,构建表达载体后转入巨大芽孢杆菌共表达。若与未转入 tRNA 基因的带有连续稀有密码子的 *GFP* 对照组相比 *GFP* 的表达量有提高,则表明待验证的 tRNA 基因转录出的成熟 tRNA 可识别相应稀有密码子,能够克服由于连续稀有密码子对其表达造成的阻遏效果^[18]。

NFATc3T 是活化 T 细胞核因子 NFAT 家族成员,是一组在哺乳动物组织细胞中广泛表达的转录因子,在免疫反应中对诱导基因转录起重要作用^[21]。NFAT 在多种免疫细胞中均有表达,如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、肥大细胞、单核细胞和嗜酸粒细胞等,在细胞分化、生长过程中起重要作用,已成为肿瘤研究中的热点,并有可能成为新的肿瘤治疗靶点^[22]。NFAT 保守型较高,在氨基端约 100 个残基区域为一个很强的转录活化区(Trans-activation domain, TAD),在该区域基因内有多个连续脯氨酸稀有密码子 CCG,进行毕赤酵母外源表达时会造成极大概率的翻译提前终止^[23]。

本研究在毕赤酵母中优化了以 *GFP* 为报告基因的稀少 tRNA 基因验证方法,比较了将带有连续稀有密码子阻遏区的 *GFP* 基因和待验证 tRNA 基因使用同一载体共表达和使用不同载体共表达两种方式,并对毕赤酵母 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因进行了验证。完成了人类活化 T 细胞核因子 TAD 区域 *NFATc3T* 和 *GFP* 融合基因与 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因在毕赤酵母 GS115 中的共表达。验证了在毕赤酵母中表达 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因对连续稀有密码子 CCG 导致翻译提前终止现象的去阻遏作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

毕赤酵母 GS115 (*P. pastoris* GS115),大肠杆菌 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α) 及穿梭质粒

pPIC9K、pFLD α 均为中国科学院天津工业生物技术研究所工业酶工程研究组实验室保存。

1.1.2 主要试剂与耗材

D-葡萄糖、YNB、氨苄青霉素 (Amp)、博来霉素 (Zeosin) 购自 Solarbio (美国)。生物素 (D-Biotin) 购自 BIO BASIC INC 公司 (加拿大); 甲醇购自国药集团化学有限公司。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB (美国); 高保真 DNA 聚合酶购自康为世纪生物科技有限公司 (中国)。

质粒小提试剂盒、酵母基因组 DNA 提取试剂盒,购自天根生化科技有限公司 (中国)。

PCR 所需引物均由北京华大基因公司合成。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建

为了在毕赤酵母 GS115 中建立 tRNA 表达体系,选择绿色荧光蛋白 *GFP* 基因作为报告基因。*GFP* 基因由安徽通用生物公司进行全序列合成,并克隆到穿梭质粒 pPIC9K 多克隆位点 *EcoR* I 和 *Not* I 之间,构建重组质粒 pPIC9K-*GFP* (简写 pGFP)。同时在 *GFP* 基因序列 5'端的 15 个碱基对下游插入 4 个连续的毕赤酵母脯氨酸稀有密码子 CCG 作为基因表达的阻遏区,构建基因 *GFP_{4CCG}* (图 1)。

人类活化 T 细胞核因子 TAD 区域 *NFATc3T* 基因 (Gene ID: 100458008) 及绿色荧光蛋白 *GFP* 基因的融合基因 *NFATc3T-GFP* 由安徽通用生物公司进行全序列合成,并克隆到穿梭质粒 pPIC9K 多克隆位点的 *EcoR* I 和 *Not* I 之间,构建重组质粒 pPIC9K-NFATc3T-*GFP*。

利用 tRNAScan-SE 2.0 软件检索 GS115 基因组序列后获得待验证的 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因序列以及作为对照组的 *tRNA^{Ala}_{GCA}* 基因序列。设计 PCR 引物 (表 1) 后,以酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取的毕赤酵母 GS115 基因组为模板 PCR 扩增获得 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因和 *tRNA^{Ala}_{GCA}* 基因 (图 1)。

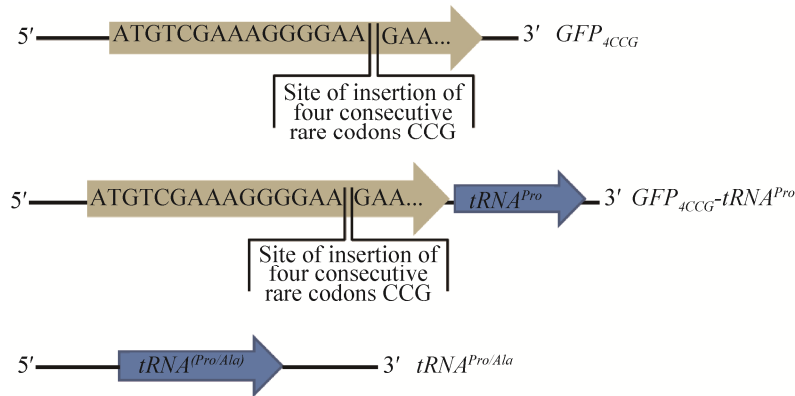


图 1 PCR 扩增得到的基因序列

Fig. 1 The gene sequence amplified by PCR. The gray broken arrow represents the open reading frame of *GFP*. Four identical consecutive rare codons CCG are integrated into the coding region of *GFP*. The blue arrow indicates the tRNA gene.

表 1 实验所用引物

Table 1 PCR primers used in the experiment

Amplified by PCR	Primer sequence (5'-3')
<i>GFP_{4CCG}</i> F	TACGTAGAATTCATGTCGAAAGGGGAACCG
<i>GFP_{4CCG}</i> R	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTATTTGTACAA
<i>GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}</i> F	CCGGAATTCATGTCGAAAGGGGAACCGCCGCGCCGAATTATCACT
<i>GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}</i> R	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCGAATCTGATTCTTAGAAAAAATTGAACTCGGG
<i>tRNA^{Pro}_{CCG}</i> F	CGCGGATGCACAAAACAATAGAATCAAGA
<i>tRNA^{Pro}_{CCG}</i> R	CGCGGATCCTAGGAGGGCATTAGC
<i>tRNA^{Ala}_{GCA}</i> F	CGCGGATGCATAAAAGCATTGAGCACG
<i>tRNA^{Ala}_{GCA}</i> R	CGCGGATGCATCTATTGGAAAAGTGACGAT

Underlines indicate the cleavage site of restriction endonuclease.

在 Constanze 等的同一载体共表达方法中, 带稀有密码子阻遏区的 *GFP* 基因与待验证 tRNA 基因距离太近, tRNA 基因回文序列可能对 *GFP* 基因的转录和表达造成影响^[24]。为了验证这一影响, 分别构建了利用同一载体表达 *GFP_{4CCG}* 基因和 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因的载体 pPIC9K-*GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}* (简称为 p*GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}*), 以及利用不同载体表达 *GFP_{4CCG}* 基因和 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因的载体 pPIC9K-*GFP_{4CCG}* (简写 p*GFP_{4CCG}*) 和 pFLDα-*tRNA^{Pro}_{CCG}* (简写 ptRNA^{Pro}_{CCG})。

为了给待验证的 *tRNA^{Pro}_{CCG}* 基因提供对照, 构建了包含不能识别密码子 CCG 的 *tRNA^{Ala}_{GCA}* 的基因的载体 pFLDα-*tRNA^{Ala}_{GCA}* (简写 ptRNA^{Ala}_{GCA})。

1.2.2 电击转化及转化子鉴定

重组质粒 pPIC9K-*GFP*、pPIC9K-*GFP_{4CCG}*、pPIC9K-*GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}* 以限制性内切酶 *Sal* I

作为线性化位点酶切后进行浓缩, 通过电击转化将质粒转入毕赤酵母 GS115 中, 通过在 MD 筛选培养基上培养分别获得 GS115/p*GFP*、GS115/p*GFP_{4CCG}* 和 GS115/p*GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}* 转化子。

重组质粒经 pFLDα-*tRNA^{Pro}_{CCG}*、pFLDα-*tRNA^{Ala}_{GCA}* 以限制性内切酶 *Nsi* I 作为线性化位点酶切后进行浓缩, 电击转化将质粒转入毕赤酵母 GS115/p*GFP_{4CCG}* 中。通过 YPD (Zeosin, 100 μg/mL) 筛选培养基上培养获得 GS115/p*GFP_{4CCG}*/ptRNA^{Pro}_{CCG}、GS115/p*GFP_{4CCG}*/ptRNA^{Ala}_{GCA} 转化子。

电击转化: 取 80 μL 毕赤酵母 GS115 感受态细胞与 10 μL (约 2 μg) 线性化 DNA 混合, 转入预冷的 0.2 cm 电击杯中, 在冰上放置 5 min, 电压 1 500 V 进行电击, 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇至电转杯中, 将内容物涂于筛选平板, 在 30 °C 培养箱培养至单克隆产生。

转化子鉴定：挑取筛选平板上的单菌落接种于 3 mL YPD 液体培养基中，29 °C、220 r/min 培养 24 h，取出 1 mL 用于保菌后，剩余菌液采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。并以酵母基因组 DNA 为模板，以通用引物 AOX 和 FLD α 引物 (pFLD α 骨架引物，于 tRNA 基因上下游各 150 bp 处设计引物) (表 2) 对转化子进行 PCR 验证。PCR 扩增体系：5×Cobuddy HF 缓冲液 10 μ L，dNTPs 1 μ L，上下游引物各 1.5 μ L，模板 1 μ L，Cobuddy 0.5 μ L，补 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件：98 °C 5 min；95 °C 30 s，51 °C 45 s，72 °C 90 s，30 个循环；72 °C 10 min；4 °C 终止。1%琼脂糖凝胶电泳 120 V、30 min，凝胶成像系统检测。

1.2.3 菌株培养及 GFP 基因甲醇诱导表达

大肠杆菌培养：将验证正确的转化子接种于 LB 培养基中 (Amp, 100 μ g/mL)，37 °C、220 r/min 摇床中过夜培养，用于质粒提取。

毕赤酵母培养及诱导：将重组毕赤酵母菌株划线于 YPD 平板，30 °C 培养箱培养 2–3 d 至单菌落长出，挑取单菌落于 10 mL BMGY 液体培养基 (100 mL 三角瓶)，于 29 °C、220 r/min 培养 40 h，转接于 20 mL BMMY 液体培养基 (250 mL 避光挡板三角瓶) 测每个菌液 OD₆₀₀ 光吸收值，并将每个菌液调到同一个 OD₆₀₀ 水平。29 °C、220 r/min，每隔 24 h 添加甲醇至终浓度为 2% 诱导培养，同时测 OD₆₀₀ 光吸收值作菌液生长曲线。

1.2.4 GFP_{4CCG} 基因与 tRNA 基因共表达的荧光检测

每隔 24 h 取 2 mL 诱导表达菌液于包有铝箔的避光 EP 管中，12 000 r/min 离心 10 min，无菌

注射器小心吸取菌液上清，用已灭菌的 0.22 μ m 的滤器进行过滤除菌及杂质。并将过滤后的上清转至新的包有铝箔的避光 EP 管，分别取 200 μ L 样品于 96 孔荧光酶标板，以 BMMY 培养基 (已过滤除菌) 为空白对照，采用连续多功能酶标仪 Flex Station 3 进行荧光值的检测，检测激发光为 485 nm，发射光为 523 nm。

荧光显微镜下观察毕赤酵母细胞内荧光，取诱导表达相同时间的重组毕赤酵母菌液，12 000 r/min 离心 10 min，收集菌体，ddH₂O 悬浮菌体，洗涤，离心收集菌体，重复洗涤 3 遍，重悬菌体于 1 mL ddH₂O，荧光显微镜下观察细胞内荧光。

1.2.5 SDS-PAGE 验证

三氯乙酸沉淀：取发酵上清液 1 mL，加入 100% 三氯乙酸 (TCA) 溶液 150 μ L (终浓度 13%)，充分混匀，-20 °C 沉淀 10 min，4 °C 沉淀 12–24 h，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入 1 mL 丙酮吹悬洗涤沉淀，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，重复洗涤 3 次，室温干燥至丙酮完全挥发，所得沉淀即为蛋白样品。

SDS-PAGE 验证：将所得到的蛋白样品用 20 μ L 6 mol/L 的尿素溶解，并加入 7 μ L 4×蛋白上样缓冲液混匀，100 °C 煮沸 10 min；待样品冷却后，短暂离心，取 12 μ L 蛋白样品上样并开始电泳。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2 h，然后换脱色液，脱色至条带清晰可见，期间更换 1–2 次脱色液。

2 结果与分析

2.1 重组毕赤酵母菌株的构建

GFP_{4CCG} 基因和 GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG} 基因分别克隆到穿梭质粒 pPIC9K 多克隆位点 EcoR I 和 Not I 之间，得到的重组质粒 pPIC9K-GFP_{4CCG}、pPIC9K-GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG} 分别转入毕赤酵母 GS115 菌株，应用 AOX 引物 (表 2) 进行 PCR 筛选转化子，阳

表 2 AOX 与 FLD α 引物

Table 2 Primers: AOX and FLD α

Primer name	Primer sequence (5'–3')
5'AOX F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'AOX R	GCAAATGGCATTCTGACATCC
FLD α F	CTCGTACGAGCTTGCTCCTGA
FLD α R	CCGTCAGGGCGCGTCAGC

性转化子在琼脂糖凝胶电泳中可见两条带, 一条为含有目的基因加 492 bp AOX 部分基因序列的基因片段, 其中 GFP_{4CCG} 和 $GFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}$ 的基因验证条带大小应分别为 1 221 bp (729 bp+492 bp) 和 1 374 bp (882 bp+492 bp), 另一条为 AOX1 基因片段, 大小约为 2 200 bp (图 2A, 2B)。将验证正确的重组菌株送样测序, 从而成功得到重组菌株 GS115/pGFP_{4CCG} 和 GS115/pGFP_{4CCG}- $tRNA^{Pro}_{CCG}$ 。

同样, 将 $tRNA^{Pro}_{CCG}$ 基因和 $tRNA^{Ala}_{GCA}$ 基因克隆到

穿梭质粒 pFLD α 多克隆位点 *Bam*H I 处, 得到的重组质粒 pFLD α - $tRNA^{Pro}_{CCG}$ 、pFLD α - $tRNA^{Ala}_{GCA}$ 分别转入到重组菌株 GS115/pGFP_{4CCG} 中, 经 FLD α 引物 (表 2) PCR 筛选转化子, $tRNA^{Pro}_{CCG}$ 基因和 $tRNA^{Ala}_{GCA}$ 基因大小分别为 147 bp 和 150 bp, 加上 pFLD α 骨架上的 300 bp, 目的条带分别为 447 bp 和 450 bp (图 2C)。将验证正确的重组菌株送样测序, 最终成功构建了重组菌株 GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA $^{Pro}_{CCG}$ 和 GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA $^{Ala}_{GCA}$ 。

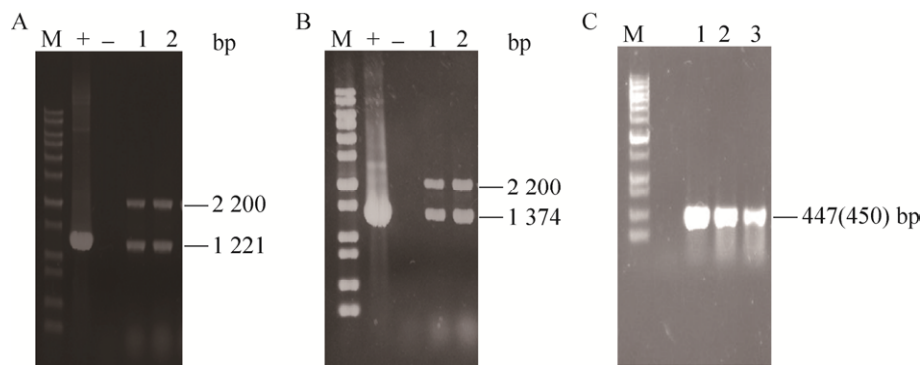


图 2 重组毕赤酵母的 PCR 验证

Fig. 2 PCR identification of the positive recombinant *P. pastoris* strains. M: nucleic acid molecular weight marker; +: positive control; -: negative control. (A) 1, 2: recombinant strain GS115/pGFP_{4CCG}. (B) 1, 2: recombinant strain GS115/pGFP_{4CCG}- $tRNA^{Pro}_{CCG}$. (C) 1, 2: recombinant strain GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA $^{Pro}_{CCG}$; 3: recombinant strain GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA $^{Ala}_{GCA}$.

2.2 重组毕赤酵母表达水平检测

2.2.1 重组毕赤酵母的生长曲线

在 BMGY 培养基中培养的菌体转接至 BMMY 培养基中进行甲醇诱导培养, 诱导培养前将各个菌液的 OD_{600} 调整为同一水平 (7.35 左右)。在诱导过程中, 各个重组表达菌株生长状态情况 (图 3) 基本一致, 添加 $tRNA$ 基因与目的基因共表达没有对菌株的生长产生负面影响。

2.2.2 带有连续稀有密码子阻遏的 GFP 表达

通过荧光显微镜 (图 4) 和 SDS-PAGE (图 5) 比较诱导培养 72 h 左右菌株 GS115/pGFP 和 GS115/pGFP_{4CCG} 受激发光源激发后荧光值和 GFP 表达水平 (GFP 理论分子量约为 27 kDa), 结果显

示, 加入连续稀有密码子后, GFP 的表达受到了明显阻遏。

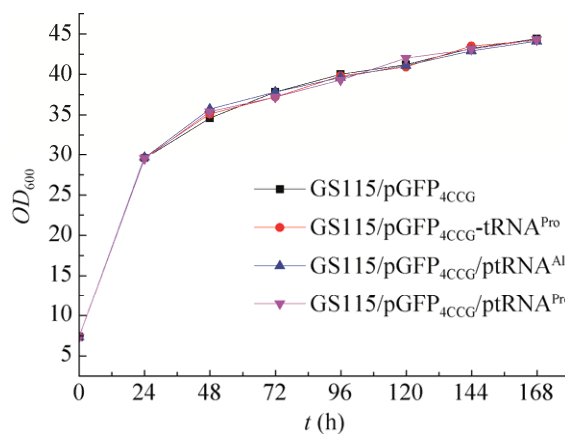


图 3 重组毕赤酵母生长曲线

Fig. 3 The growth curve of recombinant *P. pastoris*.

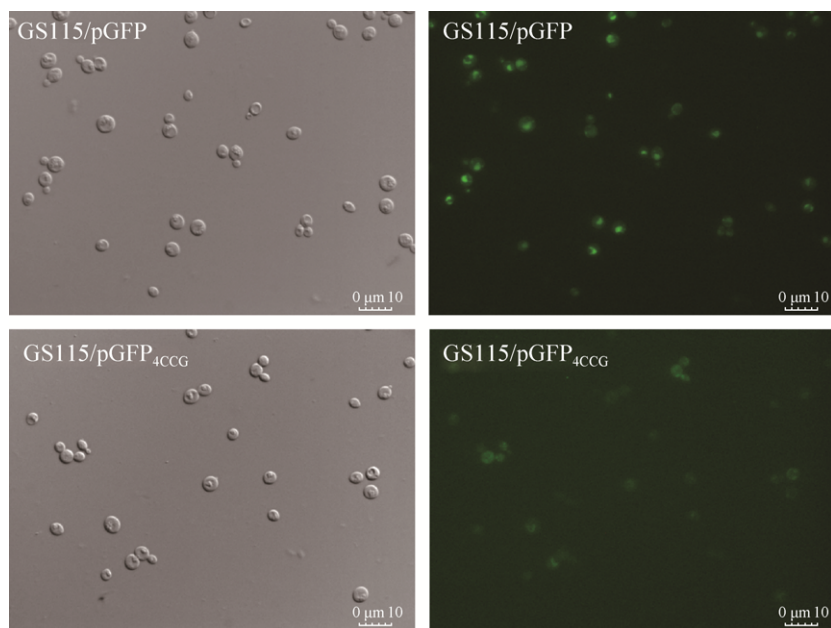


图4 GS115/pGFP 转化子和 GS115/pGFP_{4CCG} 转化子荧光对比

Fig. 4 Fluorescence comparison between GS115/pGFP and GS115/pGFP_{4CCG}.

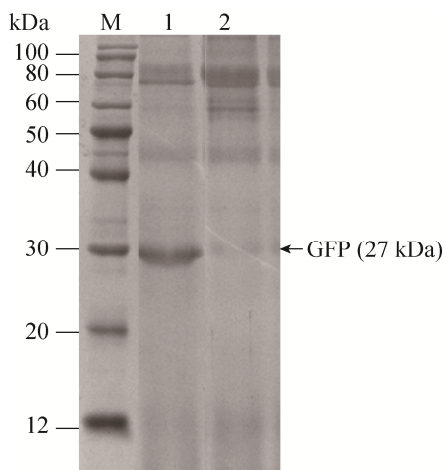


图5 SDS-PAGE 比较 GFP 基因添加连续稀有密码子前后表达水平

Fig. 5 Comparing the expression levels of GFP gene before and after adding continuous rare codons by SDS-PAGE. M: protein molecular weight marker; 1: GS115/Pgfp; 2: GS115/pGFP_{4CCG}.

2.2.3 *tRNA*^{Pro}_{CCG} 基因效果验证

各重组毕赤酵母的表达水平通过报告基因 *GFP* 的荧光值来体现。采用连续多功能酶标仪在 485 nm 激发光源照射下, 检测 523 nm 发射光数据作为荧光值。诱导表达过程中各重组毕赤酵母

的荧光值变化趋势高度一致。

其中同载体共表达菌株 GS115/pGFP_{4CCG}-*tRNA*^{Pro}_{CCG} 与对照菌株 GS115/pGFP_{4CCG} 相比, GFP 表达量平均提高 4.9%, 不同载体共表达菌株 GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA^{Pro}_{CCG} 与对照菌株 GS115/pGFP_{4CCG} 相比 GFP 表达量平均提高 12.5%。而共表达 *GFP*_{4CCG} 和 *tRNA*^{Ala}_{GCA} 的菌株荧光值与对照菌株 GS115/pGFP_{4CCG} 相比有所降低 (图 6)。

取诱导表达 168 h 的各菌液上清, 通过 SDS-PAGE 检测各重组毕赤酵母菌株中目的蛋白最终表达水平 (图 7)。GFP 理论分子量约为 27 kDa, 从图中可以看出 4 个重组毕赤酵母菌株都成功表达了 GFP, 其中 GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA^{Pro}_{CCG} 菌株的 GFP 表达量最高, 其次是 GS115/pGFP_{4CCG}-*tRNA*^{Pro}_{CCG}, 都高于 GS115/pGFP_{4CCG}, 而 GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA^{Ala}_{GCA} 菌株的 GFP 表达量最低。经软件 Quantity One 对蛋白胶图进行定量分析, 其中, 菌株 GS115/pGFP_{4CCG}、GS115/pGFP_{4CCG}-*tRNA*^{Pro}_{CCG} 和 GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA^{Pro}_{CCG} 的蛋白表达量分别为 2.43、2.45、2.99 μg/mL, 与检测的荧光值结果一致。

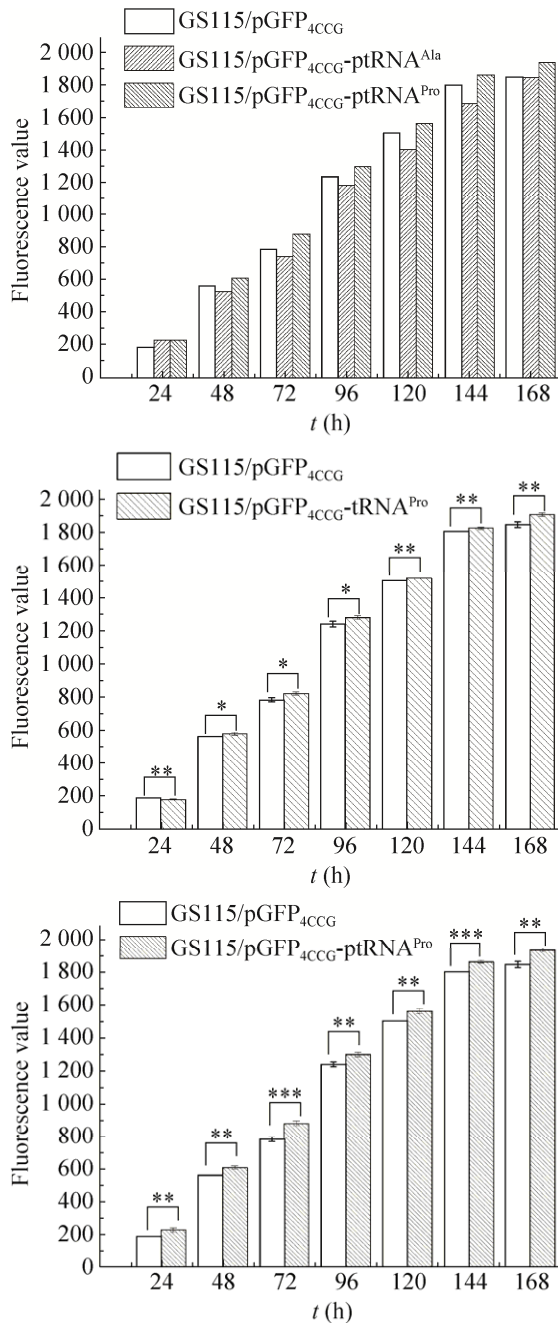


图6 重组毕赤酵母表达 GFP 荧光值对比

Fig. 6 Comparison of fluorescence values of GFP expressed in recombinant *P. pastoris*. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$ (Student's *t*-test). Error bars indicate standard deviations from three parallel experiments.

2.3 tRNA 共表达系统验证

2.3.1 融合基因 *NFATc3T-GFP* 表达菌株的构建

重组质粒 pPIC9K-NFATc3T-GFP 以限制性内切酶 *Sal* I 作为线性化位点酶切后进行浓缩, 通过

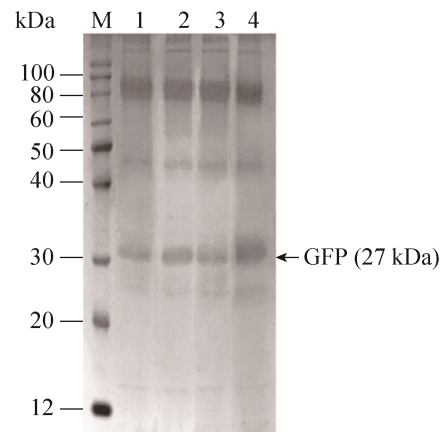


图7 SDS-PAGE 比较 GFP 表达水平

Fig. 7 Comparing the expression levels of GFP by SDS-PAGE. M: protein molecular weight marker. 1: GS115/pGFP_{4CCG}. 2: GS115/pGFP_{4CCG}-tRNA^{Pro}_{CCG}. 3: GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA^{Ala}_{GCA}. 4: GS115/pGFP_{4CCG}/ptRNA^{Pro}_{CCG}.

电击转化将质粒转入毕赤酵母 GS115 和毕赤酵母重组菌株 GS115/pFLD α -tRNA^{Pro}_{CCG} 中, 通过在 MD 筛选培养基上培养获得转化子 GS115/pNFATc3T-GFP 和 GS115/pNFATc3T-GFP/ptRNA^{Pro}_{CCG}。其中, 融合基因 *NFATc3T-GFP* 序列全长为 1 170 bp, 由北京华大基因公司测序验证正确。

2.3.2 NFATc3T-GFP 融合蛋白表达水平检测

诱导表达过程中各重组毕赤酵母的荧光值变化见图 8, 荧光值变化趋势高度一致。重组菌株

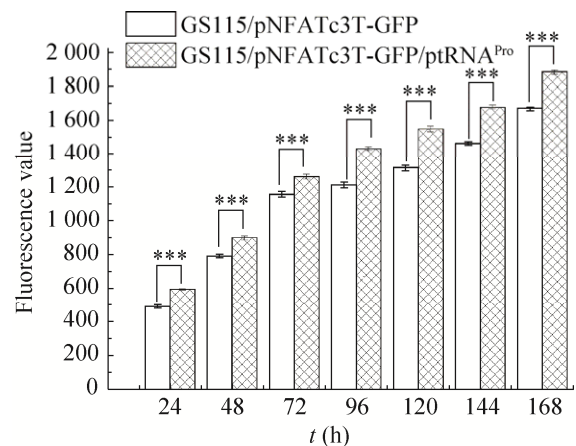


图8 重组毕赤酵母表达 NFATC3T-GFP 融合蛋白的荧光值对比

Fig. 8 Fluorescence contrast of NFATc3T-GFP expressed in recombinant *P. pastoris*. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$ (Student's *t*-test). Error bars indicate standard deviations from three parallel experiments.

GS115/pNFATc3T-GFP/ptRNA^{Pro}_{CCG}表达 NFATc3T-GFP 融合蛋白的荧光值与重组菌株 GS115/pNFATc3T-GFP 相比, 平均提高了 21.3%。

取诱导表达 168 h 的菌液上清, 通过 SDS-PAGE 检测各重组毕赤酵母中目的蛋白最终表达水平 (图 9)。NFATc3T-GFP 融合蛋白理论分子量约为 43 kDa, 从图中可以看出 2 个重组菌株均成功表达出了目的蛋白。通过软件 Quantity One 对蛋白胶图进行定量分析, 菌株 GS115/pNFATc3T-GFP/ptRNA^{Pro}_{CCG}的融合蛋白表达量约为 2.59 μ g/mL, 与菌株 GS115/pNFATc3T-GFP 的融合蛋白表达量 2.19 μ g/mL 相比, 提高了 18.3%, 与检测的荧光值结果相近。

3 讨论

本文以带有连续稀有密码子 CCG 的 *GFP* 基因为报告基因, 分别构建了利用同载体表达 *GFP*_{4CCG} 基因和 *tRNA*^{Pro}_{CCG} 基因的载体 pPIC9K-*GFP*_{4CCG}-*tRNA*^{Pro}_{CCG}, 以及利用不同载体表达 *GFP*_{4CCG} 基因和 *tRNA*^{Pro}_{CCG} 基因的载体 pPIC9K-*GFP*_{4CCG} 和 pFLD α -*tRNA*^{Pro}_{CCG}, 并将重组载体转入毕赤酵母中进行表达。结果显示, 与单独表达 *GFP*_{4CCG} 相比, 两种共表达方式的 *GFP* 表达量均有提高, 同载体共表达 *GFP* 表达量可提高 4.9%, 不同载体共表达 *GFP*

表达量可提高 12.5%。采用不同载体共表达的方式优于同一个载体共表达方式, SDS-PAGE 定量分析 *GFP* 表达量的结果也得到相同结论。这一结果显示 *tRNA* 基因与预表达的目的基因不在同一转录单元下表达, 有利于其发挥抗阻遏的作用, 这与 Shin 等^[25]在大肠杆菌中获得的结果一致。

为了进一步验证不同载体共表达稀少 *tRNA*^{Pro}_{CCG} 基因的毕赤酵母表达体系可以提高含连续稀有密码子 CCG 外源基因的表达, 以含有多个连续脯氨酸稀有密码子 CCG 的 *NFATc3T* 基因为例, 构建融合基因 *NFATc3T-GFP* 表达菌株 GS115/pNFATc3T-GFP/ptRNA^{Pro}_{CCG} 和 GS115/pNFATc3T-GFP。实验结果表明, 通过不同载体共表达 NFATc3T-GFP 融合蛋白的表达水平可提高 21.3%。此结果进一步验证了共表达稀少 *tRNA*^{Pro}_{CCG} 基因对提高含连续稀有密码子 CCG 外源基因表达量的有效性。

在动植物中, 基因上游出现连续多个毕赤酵母稀有密码子的情況是较为常见的, 例如本文中表达的活化 T 细胞核因子 *NFATc3T* 基因 (含连续 CCG)、菊科植物糖基转移酶 *UGT76G1* 基因 (含连续 CGG)、拟南芥蔗糖转运蛋白 *SUC1* 编码基因 (含连续 GCG) 等。这些基因在毕赤酵母中进行外源表达时, 连续的稀有密码子极易导致表达过程的提前终止。文中在毕赤酵母细胞中初步建立了提高外源基因表达的稀有 *tRNA* 共表达系统, 并验证了其有效性, 通过该策略可有效改善毕赤酵母表达过程中由于连续稀有密码子存在导致的表达提前终止现象。

与目前普遍采用的密码子优化后进行全基因合成的方法相比, 文中提供的策略在实验周期和成本方面具有一定优势, 可作为一种备选和补充方案。同时, 本策略更适用于除基因合成外的各种功能基因的高通量筛选工作, 理论上可有效提高功能基因表达的成功率, 进而扩大筛选库的容量, 提高筛选目的基因的成功率。

同时, 在部分表达系统中, 共表达多个优化

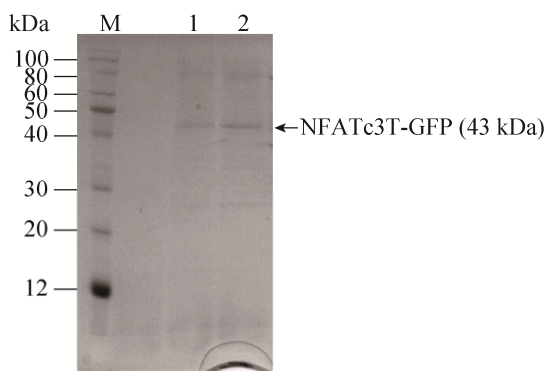


图9 SDS-PAGE 比较 NFATc3T-GFP 融合蛋白表达水平
Fig. 9 Comparing the expression levels of NFATc3T-GFP by SDS-PAGE. M: protein molecular weight marker. 1: GS115/pNFATc3T-GFP/ptRNA^{Pro}_{CCG}; 2: GS115/pNFATc3T-GFP.

的稀少 tRNA 提高了宿主总体 mRNA 的翻译效率,提高了部分已经过密码子优化的基因的表达和分泌量^[18]。目前毕赤酵母中是否同样会出现这种情况还有待研究。

将含有稀有密码子的目的基因与对应 tRNA 共表达以提高表达量的策略在原核表达系统中有较多报道,例如前文提到的 Stratagene 等^[13]的大肠杆菌 CodonPlus 菌株、Novagen 等^[14]的大肠杆菌 Rosetta 菌株、以及 Finger 等^[18]报道的巨大芽孢杆菌等,均是通过共表达多个经优化后的稀少 tRNA,最终显著提高了目的蛋白表达量。本研究完成了在毕赤酵母表达系统中目的基因与稀少 tRNA 共表达的初步探索,为下一步工作提供了研究基础,经不断优化稀少 tRNA 的种类和数量,将会达到更为理想的效果,极具研究潜力和开发前景。

4 结论

本研究通过同一载体和不同载体两种共表达方式,构建了毕赤酵母稀少 tRNA 基因与外源基因共表达体系。得到一种适用于含连续稀有密码子 CCG 的基因与 $tRNA^{Pro}_{CCG}$ 基因共表达的毕赤酵母表达体系,提高了外源基因表达量,从而为提高外源基因表达量提供新的思路。该方法不局限于含连续稀有密码子 CCG 的外源基因与稀少 $tRNA^{Pro}_{CCG}$ 基因共表达,还可给其他含连续稀有密码子的外源基因与其相对应的稀少 tRNA 基因在毕赤酵母中共表达提供方法。

从基因工程的角度改变 tRNA 丰度能够影响毕赤酵母基因表达水平,对于完善毕赤酵母表达系统和提高外源基因的表达量都具有十分重要的意义。

REFERENCES

- [1] Hopper AK, Phizicky EM. tRNA transfers to the limelight. *Genes Devel*, 2003, 17(2): 162–180.
- [2] Fedyunin I, Lehnhardt L, Böhmer N, et al. tRNA concentration fine tunes protein solubility. *FEBS Lett*, 2012, 586(19): 3336–3340.
- [3] Feng DJ, Liu X, Li XG, et al. The relationship between tRNA abundance and gene expression. *China Biotechnol*, 2002, 22(6): 4–8 (in Chinese). 冯德江, 刘翔, 李旭刚, 等. tRNA 丰度与基因表达的关系. *中国生物工程杂志*, 2002, 22(6): 4–8.
- [4] Quax TEF, Claassens NJ, Söll D, et al. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 149–161.
- [5] Bierne N, Eyre-Walker A. Variation in synonymous codon use and DNA polymorphism within the *Drosophila* genome. *J Evol Biol*, 2006, 19(1): 1–11.
- [6] Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Prot Expr Purif*, 2008, 59(1): 94–102.
- [7] Niu DD, Shen W, Wang ZX. Modification of intracellular aminoacyl-tRNA pool to improve expression level of exogenous genes in *Escherichia coli*. *J Microbiol*, 2005, 25(2): 9–12 (in Chinese). 牛丹丹, 沈微, 王正祥. 改善大肠杆菌胞内氨基酰 tRNA 池提高外源基因表达水平. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 9–12.
- [8] Cheng DH, Wang R, Prather KJ, et al. Tackling codon usage bias for heterologous expression in *Rhodobacter sphaeroides* by supplementation of rare tRNAs. *Enzym Microb Technol*, 2015, 72: 25–34.
- [9] Calderone TL, Stevens RD, Oas TG. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1996, 262(4): 407–412.
- [10] Aguirre-López B, Cabrera N, de Gómez-Puyou MT, et al. The importance of arginine codons AGA and AGG for the expression in *E. coli* of triosephosphate isomerase from seven different species. *Biotechnol Rep*, 2017, 13: 42–48.
- [11] Rosano GL, Ceccarelli EA. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 41.
- [12] Dieci G, Bottarelli L, Ballabeni A, et al. tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Prot Expr Purificat*, 2000, 18(3): 346–354.

- [13] Kleber-Janke T, Becker WM. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Prot Expr Purificat*, 2000, 19(3): 419–424.
- [14] Novy R, Drott D, Yaeger K, et al. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Sibirskmatzh*, 2001, 3: 613–623.
- [15] Raval R, Simsa R, Raval K. Expression studies of *Bacillus licheniformis* chitin deacetylase in *E. coli* Rosetta cells. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104: 1692–1696.
- [16] Yedahalli SS, Rehmann L, Bassi A. Expression of exo-inulinase gene from *Aspergillus niger* 12 in *E. coli* strain Rosetta-gami B (DE3) and its characterization. *Biotechnol Prog*, 2016, 32(3): 629–637.
- [17] Tegel H, Tourle S, Ottosson J, et al. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). *Protein Expr Purif*, 2010, 69(2): 159–167.
- [18] Finger C, Gamer M, Klunkelfuß S, et al. Impact of rare codons and the functional coproduction of rate-limiting tRNAs on recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(21): 8999–9010.
- [19] Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE on-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W54–W57.
- [20] Rogers HH, Griffiths-Jones S. tRNA anticodon shifts in eukaryotic genomes. *RNA*, 2014, 20(3): 269–281.
- [21] Lagunas L, Clipstone NA. Deregulated NFATc1 activity transforms murine fibroblasts via an autocrine growth factor-mediated Stat3-dependent pathway. *J Cellul Biochem*, 2009, 108(1): 237–248.
- [22] Zhao H, Zhao SH. Progress of nuclear factor of activated T cells in cancer progression. *Chin J Clin Electr Ed*, 2014, 8(14): 2696–2700 (in Chinese). 赵宏, 赵守华. 活化 T 细胞核因子与肿瘤的研究进展. *中华临床医师杂志*, 2014, 8(14): 2696–2700.
- [23] Clarke IV TF, Clark PL. Rare codons cluster. *PLoS ONE*, 2008, 3(10): e3412.
- [24] Novoa EM, de Pouplana LR. Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends Genet*, 2012, 28(11): 574–581.
- [25] Shin CS, Min SH, Shin HC, et al. High-level production of recombinant human IFN- α 2a with co-expression of tRNA^{Arg(AGG/AGA)} in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 6(4): 301–305.

(本文责编 郝丽芳)