

运用 CRISPR/Cas9 技术构建表达 10rolGLP-1 的降糖酵母

张金睿, 杨佳明, 孟钰杰, 邢曙光, 刘奇奇, 李明刚*

南开大学生命科学学院 生物活性材料教育部重点实验室 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071

张金睿, 杨佳明, 孟钰杰, 邢曙光, 刘奇奇, 李明刚. 运用 CRISPR/Cas9 技术构建表达 10rolGLP-1 的降糖酵母[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3747-3756.

ZHANG Jinrui, YANG Jiaming, MENG Yujie, XING Shuguang, LIU Qiqi, LI Minggang. Construction of a 10rolGLP-1-expressing glucose-lowering *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR/Cas9 technique[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3747-3756.

摘要: 为研发一种用于治疗 2 型糖尿病的新型生物药物, 本研究运用实验室前期构建的 *10rolglp-1* 基因和 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术创建了重组酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)工程菌株。构建了向导 RNA (guide RNA, gRNA)表达载体 pyES2-gRNA、供体载体 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R 和 Cas9 表达载体 pGADT7-Cas9, 将这些表达载体共转化酿酒酵母 INVSc1 菌株, 通过同源重组途径敲入 PGK-10rolGLP-1 表达单元, 最终得到具有降血糖功能、高表达 10rolGLP-1 的酿酒酵母。通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹, 筛选出 2 种稳定表达 10rolGLP-1 的酿酒酵母重组菌株。降血糖实验结果表明, 重组降血糖酿酒酵母对糖尿病小鼠模型具有显著的降血糖作用, 其血糖下降平缓, 可避免引起低血糖风险。体重变化和多尿等其他症状也明显改善, 表明本研究构建的口服降血糖酿酒酵母有望成为一种简单有效、经济实用的糖尿病生物药物。

关键词: CRISPR/Cas9; 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1); 酿酒酵母; 2 型糖尿病; 生物药物

资助项目: 国家自然科学基金(31771066); 天津市重点技术研发计划(18YFZCSY00030, 18YFZCNC01200)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31771066) and the Key Technology Research and Development Project of Tianjin (18YFZCSY00030, 18YFZCNC01200).

*Corresponding author. E-mail: mgl@nankai.edu.cn

Received: 2022-11-02; Accepted: 2023-03-02; Published online: 2023-03-15

Construction of a 10rolGLP-1-expressing glucose-lowering *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR/Cas9 technique

ZHANG Jinrui, YANG Jiaming, MENG Yujie, XING Shuguang, LIU Qiqi, LI Minggang*

State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Key Laboratory for Bioactive Materials of the Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: To develop a novel glucose-lowering biomedicine with potential benefits in the treatment of type 2 diabetes, we used the *10rolGLP-1* gene previously constructed in our laboratory and the CRISPR/Cas9 genome editing technique to create an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. The gRNA expression vector pYES2-gRNA, the donor vector pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R and the Cas9 expression vector pGADT7-Cas9 were constructed and co-transformed into *S. cerevisiae* INVSc1 strain, with the PGK-10rolGLP-1 expressing unit specifically knocked in through homologous recombination. Finally, an *S. cerevisiae* strain highly expressing the 10rolGLP-1 with glucose-lowering activity was obtained. SDS-PAGE and Western blotting results confirmed that two recombinant strains of *S. cerevisiae* stably expressed the 10rolGLP-1 and exhibited the desired glucose-lowering property when orally administered to mice. Hypoglycemic experiment results showed that the recombinant hypoglycemic *S. cerevisiae* strain offered a highly hypoglycemic effect on the diabetic mouse model, and the blood glucose decline was adagio, which can avoid the dangerous consequences caused by rapid decline in blood glucose. Moreover, the body weight and other symptoms such as polyuria also improved significantly, indicating that the orally hypoglycemic *S. cerevisiae* strain that we constructed may develop into an effective, safe, economic, practical and ideal functional food for type 2 diabetes mellitus treatment.

Keywords: CRISPR/Cas9; glucagon like peptide-1 (GLP-1); *Saccharomyces cerevisiae*; type 2 diabetes mellitus; biomedicine

糖尿病是一种严重危害人类健康的慢性疾病,在世界各地变得越来越普遍。2021年全球20-79岁人群的糖尿病患病率估计为10.5%(5.366亿人),到2045年将上升至12.2%(7.832亿人)。中国是糖尿病患者最多的国家,根据IDF Diabetes Atlas (10 edition)可知,2021年,中国糖尿病患者人数达到1.41亿,到2045年将超过1.74亿。其中约80%患有2型糖尿病^[1]。目前,糖尿病药物的使用很多,但这些药物有一定的副作用,且不能从根本上改善糖尿病。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1)由胰高血糖素原基因编码。在胰岛 α 细

胞中,胰高血糖素原基因的主要表达产物是胰高血糖素,而在肠道L细胞中,前激素转换酶将胰高血糖素原进行切割,将其羧基端的肽链剪切和融合成为GLP-1。GLP-1有2种生物活性形式,分别为GLP-1(7-37)和GLP-1(7-36),两者仅相差一个氨基酸,GLP-1约80%的生物活性来自GLP-1(7-36)。GLP-1是由回肠和结肠的L细胞合成和分泌的一种肠促胰岛素,能有效刺激血糖依赖性胰岛素的分泌,并通过抑制胰高血糖素的分泌来改善和修复受损的胰岛 β 细胞,从而起到更好的降血糖作用^[2]。然而,由于二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-IV)

的降解作用,天然 GLP-1 的生物半衰期只有 2-3 min,限制了其临床应用。

本实验室前期通过点突变技术开发了重组口服长效 GLP-1 (rolGLP-1),将天然 GLP-1 中的 DPP-IV 切割位点和胰蛋白酶切割位点分别替换从而获得 rolGLP-1,可抵抗 DPP-IV 和胰蛋白酶降解^[3]。此外,还利用 rolGLP-1 中 C 端的最后一个氨基酸是胰蛋白酶识别和切割位点的特点,合成了 10 个无缝串联融合的 *rolglp-1* 基因 (*10rolglp-1*),并构建了高效表达 10rolGLP-1 的大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL(DE3)菌株,该策略不仅提高了 rolGLP-1 的表达量,而且使其半衰期延长至 68 h^[4]。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种安全的食用益生菌,含有丰富的 B 族维生素和消化酶,对胃肠功能(消化、排泄)具有调节作用,且不易被胃肠道内的酶降解,从而对其内容物起到类似缓释胶囊的保护作用^[5]。研究表明,酿酒酵母的基因组中有大量的非必需基因,特定的非必需基因可以被外源基因的导入所取代,从而在保证酿酒酵母的正常生长的同时研究其中定点敲入的外源基因的表达^[6]。本研究采用了安全有效的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术^[7],构建一种重组降血糖酿酒酵母(HS),并测定了其对小鼠糖尿病模型的治疗效果,为开发新型糖尿病生物药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、酿酒酵母 INVSc1、pYES2,由本实验室保存。pMD19-T-Simple 克隆载体,购自 TaKaRa 公司。pNK1-PGK-10rolGLP-1,由本实验室构建。pGADT7-Cas9,中国医学科学院药物研究所王伟教授馈赠。pZHY-988,南开大学生命科学学院宋文芹教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 pMD19-T-L-PGK-10rolGLP-1-R 克隆载体的构建

以 pNK1-PGK-10rolGLP-1 为模板,在 PGK-10rolGLP-1 的两端添加含同源臂的引物 GLP-1F 和 GLP-1R,并在引物的 5'和 3'末端加入 *Hind* III和 *Eco*R I限制性内切酶位点设计引物 GLP-2F 和 GLP-2R 进行第二步 PCR,使用的引物见表 1。回收产物 L-PGK-10rolGLP-1-R 并将其与 T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞并过夜培养,用通用引物 M13F 和 M13R 进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),用双酶切进行验证。

1.2.2 酿酒酵母 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R 表达载体的构建

使用限制性内切酶 *Hind* III和 *Eco*R I 酶切 pMD19-T-L-PGK-10rolGLP-1-R 载体。将 L-PGK-10rolGLP-1-R 片段与表达载体 pNK1 连接,转

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
GLP-1F	TTGGGTATTGACGGTGGTGAAGGTAAGAGGAGCTTGAAAGATGCCG	47
GLP-1R	AGGAATCACTTCAGTTACTTCTGAAGTGGTGACCAGCTTTAACGAACGC	49
GLP-2F	CCCAAGCTTCCAAGGCTATGGGTTACAGAGTCTTGGGTATTGACGGTGG	49
GLP-2R	CGGAATTCGTCGTGGCTGTTACAGGAAATCCTTAGTGAAGTCAATGAAG	49
gRNAF	ACTATAGGGAATATTAAGCTTGAAGAATTATTCAGATCC	39
gRNAR	TGATGGATATCTGCAGAATTCCTCTTAGGTTTACCCG	37

化大肠杆菌感受态细胞并过夜培养,进行菌落 PCR 和双酶切鉴定。

1.2.3 pMD19-T-gRNA 克隆载体的构建

通过 <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/> website looking for *S. cerevisiae* ADH 1 筛选靶向目的基因乙醇脱氢酶 I (alcohol dehydrogenase I, *adh 1*) 的 gRNA 序列,本研究选择使用最高评级的 gRNA 序列设计 gRNA 引物 gRNAF 和 gRNAR,引物序列见表 1。回收 gRNA 片段与 T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞过夜培养,进行菌落 PCR 和双酶切鉴定。

1.2.4 gRNA 表达载体 pYES2-gRNA 的构建

使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pMD19-T-gRNA 和 pYES2 载体,将 gRNA 片段与载体连接,连接体系转化大肠杆菌感受态细胞并过夜培养,用 T7 通用引物进行菌落 PCR 和双酶切鉴定。

1.2.5 CRISPR/Cas9 表达载体和酿酒酵母表达载体的共转化

Hpa I 酶切酿酒酵母表达载体 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R,与环状 pGADT-Cas9 和 pYES2-gRNA 混合,用电穿孔法共转化酿酒酵母 INVSc1 感受态细胞,涂布在尿嘧啶亮氨酸缺乏的酿酒酵母固体培养基上,培养 48 h 挑单克隆进行 PCR 鉴定,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和蛋白质印迹进一步筛选阳性重组子。

1.2.6 重组酿酒酵母的降血糖活性测定

对无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57/BL 小鼠高脂高糖饲喂,并用链脲佐菌素(streptozocin, STZ)联合诱导构建糖尿病小鼠模型。将实验小鼠按血糖水平随机分为 4 组:正常组($n=5$)、阴性对照组($n=5$)、阳性药物组($n=5$)和 HS 组($n=5$)。其中,正常组灌胃等量的生理盐水,阴性对照组灌胃等量的出发菌株酿酒酵

母(INVSc1,即编辑前的起始菌株),阳性药物组用罗格列酮(5 mg/kg)和 HS 组灌胃重组降血糖酿酒酵母(8 g/kg)处理,1次/d,连续给药 15 d,测定小鼠血糖水平、体重变化及观察其饮水和摄食量变化。本实验动物研究方案经南开大学动物实验中心实验动物伦理委员会批准[审批号:SYXK(津)2019-0001]。

1.2.7 统计分析

所有数据都用平均值±标准差表示,通过单因素方差分析和多重比较(LSD 法)进行差异显著性检验。使用的软件是 SPSS 13.0 版。 $P<0.01$ 被认为差异具有统计显著性。

2 结果与分析

2.1 克隆载体 pMD19-T-L-PGK-10rolGLP-1-R 的构建

以质粒 pNK1-PGK-10rolGLP-1-R 为模板,通过 2 次顺序 PCR 扩增出 L-PGK-10rolGLP-1-R 片段。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1A 所示。泳道 1-3 是 56 °C、55 °C、54 °C 不同退火温度下的 PCR 产物。根据条带的亮度,选择 54 °C 作为扩增 L-PGK-10rolGLP-1-R 最合适的退火温度。

将 L-PGK-10rolGLP-1-R 的 PCR 产物克隆到 T 载体并转化大肠杆菌。1%琼脂糖凝胶 PCR 电泳结果如图 1B 所示。泳道 2-5 扩增出了 2 000 bp 目标条带,从 2-5 泳道样品中提取质粒进行双酶切鉴定,所有样品都得到 2 000 bp 的目的条带(图 1C),对样品进行测序,测序结果完全正确,结果表明已成功构建了 pMD19-T-L-PGK-10rolGLP-1-R 克隆载体。

2.2 表达载体 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R 的构建

PCR 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳结果如图 1D 所示,在 2 100 bp 的位置扩增出了目的条带。

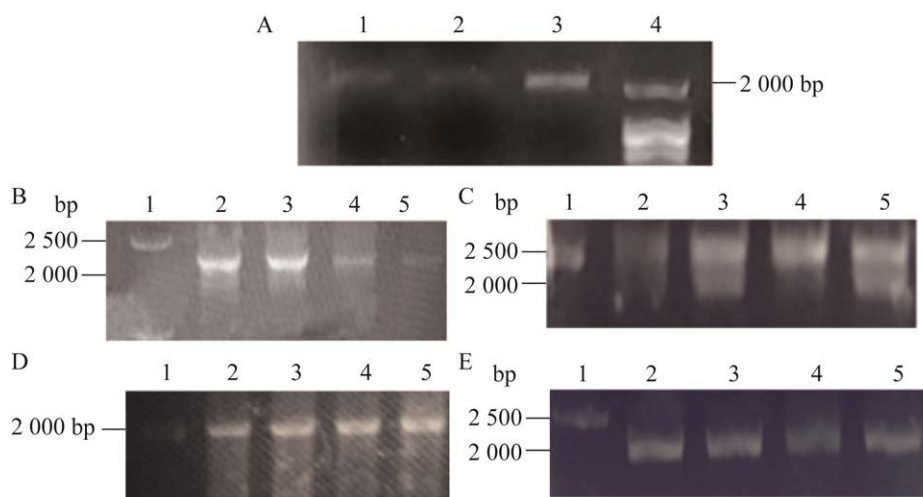


图 1 构建的 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R 表达载体的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the constructed pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R expression vector. A: Gradient PCR products of L-PGK-10rolGLP-1-R expression units. 1–3: PCR products at different annealing temperatures. 4: DL2000 DNA marker. B: Colony PCR products of pMD19-T-L-PGK-10rolGLP-1-R. C: Results of pMD19-T-L-PGK-10 double enzyme digest. 1: DL15000 DNA marker. D: Colony PCR products of pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R. 1: DL2000 DNA marker. E: Results of pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R double enzyme digest. 1: DL15000 DNA marker.

进一步提取对应样品质粒进行双酶切鉴定，结果如图 1E 所示。所有选定的样本都被切出 2 000 bp 的目的条带。将样品进行测序，测序结果完全正确，表明 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R 表达载体成功构建。

2.3 克隆载体 pMD19-T-gRNA 的构建

gRNA 片段 PCR 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳的结果如图 2A 所示。泳道 2–8 是 50 °C、51 °C、52 °C、53 °C、54 °C、55 °C、56 °C、57 °C 温度下的 PCR 产物。根据条带亮度，选择 53 °C 作为最佳 PCR 温度。回收 PCR 产物与 T 载体连接，转化大肠杆菌，菌落 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2B 所示。除泳道 4 外，其他样本均扩增出了 250 bp 目的条带。从 2、3 号样品中提取 DNA，通过双酶切鉴定，结果如图 2C 所示，2 个样品均切出了 250 bp 目的条带。将 2 份样品测序，测序结果完全正确，表明 pMD19-T-gRNA 克隆载体成功构建。

2.4 表达载体 pYES2-gRNA 的构建

双酶切 pMD19-T-gRNA 和 pYES2 载体，将 gRNA 片段与 pYES2 载体连接转化。随机选取 6 个单菌落进行菌落 PCR，琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，结果如图 2D 所示，均扩增出了 250 bp 的目的条带。测序结果完全正确，表明 pYES2-gRNA 表达载体成功构建。

2.5 酿酒酵母表达载体 10rolGLP-1 CRISPR/Cas9 的构建与筛选

CRISPR/Cas9 表达载体和酿酒酵母表达载体的共转化与阳性转化子的筛选，将载体 pYES2-gRNA、pGADT7-Cas9 和 pNK1-L-PGK-10rolGLP-1-R 共转化酿酒酵母，在亮氨酸尿嘧啶缺陷培养基中培养，然后转移到酵母粉脲葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)液体培养基中培养，提取基因组 DNA。琼脂糖凝胶电泳的结果如图 3A 所示。所有选定的样品中都成功提取基因组 DNA。以这些基因组 DNA

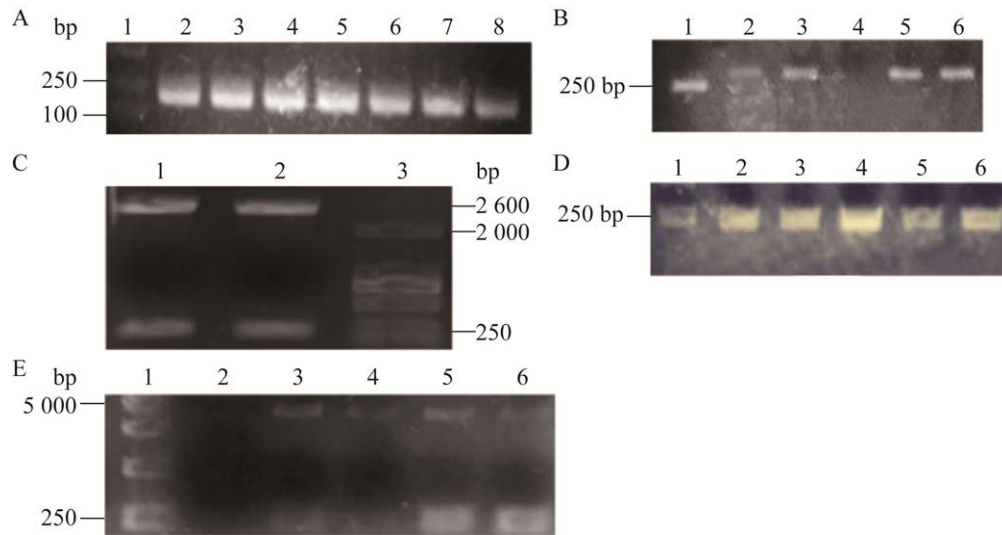


图2 构建的 pMD19-T-gRNA 和 pyES2-gRNA 表达载体用琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of pMD19-T-gRNA and pyES2-gRNA expression vectors. A: Gradient PCR products of gRNA fragments at different temperatures. 1: DL2000 DNA marker. B: Colony PCR products of pMD19-T-gRNA. 1: DL15000 DNA marker. C: Results of pMD19-T-gRNA double enzyme digest. 3: DL2000 DNA marker. D: Colony PCR products of pyES2-gRNA. 1: DL15000 DNA marker. E: Results of pyES2-gRNA double enzyme digest. 1: DL15000 DNA marker.

为模板,用设计的 10rolGLP-1 引物进行 PCR 扩增,结果如图 3B 所示。在泳道 1-3 和 7-9 中观察到靶条带,表明靶基因 *10rolglp-1* 已成功整合到酿酒酵母 INVSc1 基因组中,可被鉴定为酿酒酵母阳性转化子。这些阳性克隆被命名为重组降糖酿酒酵母 HS1-3 和 HS7-9。

2.6 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析

收集 YPD 培养的酿酒酵母阳性转化子,提取蛋白质,进行 SDS-PAGE,结果如图 3C 所示。泳道 1、2 样品与对照组相比,在 33 kDa 处出现明显的条带,表明存在 10rolGLP-1 蛋白。但泳道 3 号、4 号、5 号样本中没有明显的靶条带。使用 Glyko 灰度扫描软件分析电泳条带,结果如图 3E 所示,泳道 1 样品中目的蛋白的总可溶性蛋白为 24.5%,泳道号 5 样品为 22.9%,表明 1 号样品中的表达量较高。指定泳道 8 行 22 条带为标准(0.04 mg/mL),通过灰度对比分析,泳道 1 行 24 的目的带约为 0.07 mg/mL,即 70 mg/L。

在凝胶上切下 1 号和对照组样品并进行蛋白质印迹分析。从图 3D 可以看出,在样品 1 中明显观察到表达 10rolGLP-1 (HS)免疫反应条带,但对对照组 2 号中未出现,表明成功构建了表达 10rolGLP-1 的重组酿酒酵母。

2.7 构建糖尿病小鼠模型和 HS 的降血糖效果测定

将 3 周龄的 C57/BL 小鼠饲喂糖尿病建模饲料,4 周后注射剂量为 50 mg/kg 的 STZ 溶液,12 d 后测定空腹血糖值,发现 20 只小鼠中有 15 只成模,血糖值大于 11.0 mmol/L,成模率为 80%。将小鼠随机分为正常对照组、阴性对照组、阳性药物组和 HS 治疗组 4 组。

给药 15 d 后,灌胃 HS 组的小鼠体重明显增加,分别由(21.13±0.81) g 增加到(24.33±0.76) g,对应正常组和阳性药组也表现出类似趋势。阴性对照组的体重则明显减轻,从(23.51±0.52) g 到(21.12±1.23) g,如图 4A 所示。

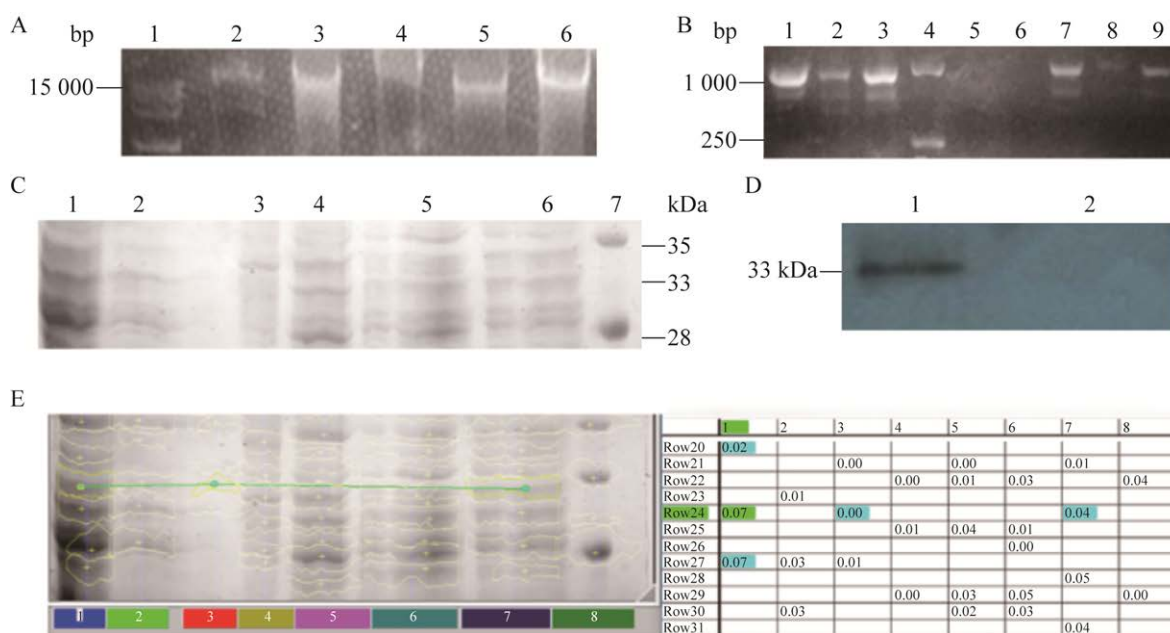


图3 重组降糖酿酒酵母(HS)的琼脂糖凝胶电泳和 SDS-PAGE 的鉴定结果

Figure 3 Agarose gel electrophoresis and SDS-PAGE for recombinant glucose-lowering *Saccharomyces cerevisiae* (HS). A: Genomic DNA of *Saccharomyces cerevisiae*-positive transformants. 1: DL15000 DNA marker. B: Product of target genes for *Saccharomyces cerevisiae*-positive transformant. 4: DL15000 DNA marker. C: SDS-PAGE analysis results of *Saccharomyces cerevisiae* transformant extract. 7: Prism ultra protein ladder standard (10–180 kDa). D: Western blotting results for *Saccharomyces cerevisiae*-positive transformant extracts. E: Results of protein band grayscale scanning using Glyko, left panel for scan grayscale for each lane, right panel for percentage of protein in each lane.

给药 15 d 后, 发现经 HS 治疗的糖尿病小鼠空腹血糖显著降低, 灌胃 HS 的小鼠血糖值显著下降, 其血糖值从(12.32±0.51) mmol/L 降至(7.43±0.43) mmol/L ($P < 0.01$ 时显著 vs. 对照组), 正常组实验前后血糖值无显著变化, 如图 4B 所示, 表明重组降血糖酿酒酵母(HS)可显著降低模型小鼠的血糖水平, 而且其血糖下降平缓, 从而可以避免血糖快速陡然下降的不良后果。

3 讨论与结论

通过敲除 *adh 1* 基因, 可以有效降低乙醇含量以产生低酒精并且其本身生长不受影响的酿酒酵母^[8]。因此, 本研究以 *adh 1* 为靶基因, 通过专业服务网站设计选择 *adh 1* 基因最合适的

gRNA, 然后设计出包括 20 bp 引导靶向互补序列到靶点的引物, 通过 PCR 扩增得到完整的 gRNA 片段, 并通过酶切连接的手段将 gRNA 片段克隆到 pYES2 质粒, 最终构建了 pYES2-gRNA 表达载体。

CRISPR/Cas9 是 II 型的 CRISPR/Cas 系统, 结构相对简单, 具有易于设计和实施的特点, 常用于对靶细胞中特定基因的删除、添加、激活、抑制等修饰。CRISPR/Cas9 系统的特异性主要取决于 sgRNA 的识别序列。由于设计的 sgRNA 可能会以较低频率与非靶点 DNA 序列形成错配, 导致非预期的基因突变, 该效应称为脱靶效应(off-target effects)。采用 CRISPR/Cas9 对动植物等多细胞生物进行基因组编辑时必须

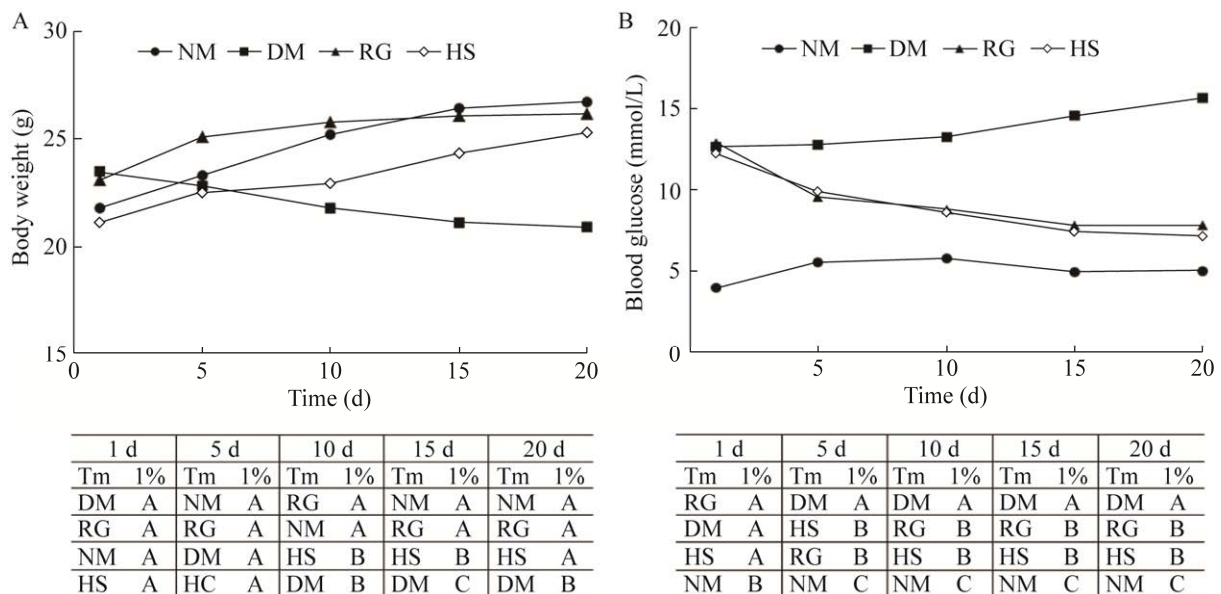


图4 用重组降血糖酿酒酵母(HS)治疗20 d后的小鼠体重(A)和血糖水平(B)的变化

Figure 4 Changes in mouse body weight (A) and blood glucose level (B) after 20 days treatment with recombinant hypoglycemic *Saccharomyces cerevisiae* (HS). Curves with different markers indicate normal control (normal, NM), negative control (diabetes, DM), positive control (rosiglitazone, RG), and HS gavage group. The different letters in the 1% column indicate a significant difference between treatments at the $P < 0.01$ level.

考虑其脱靶效应可能造成基因突变对机体带来的有害风险,但酵母等单细胞生物这种风险可通过克隆筛选鉴定加以剔除或避免^[9]。

本研究运用 E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/>) 网站设计 sgRNA 序列,寻找评估潜在的脱靶位点选择最高评级的 gRNA 序列设计 gRNA 引物,尽量降低脱靶效应发生的概率,以提高筛选到理想阳性克隆的几率。此外,过高浓度的 sgRNA-Cas9 复合物可能会切割 Protospacer Adjacent Motif (PAM) 序列附近或内部位点,形成脱靶效应。通过调节 sgRNA 和 Cas9 核酸酶的浓度可降低脱靶风险。但浓度降低会使其基因组编辑能力减弱,因此调整 gRNA 与 Cas9 复合物的浓度比例(一般当 gRNA:Cas9 复合物比值为 3:1 时最佳),可在保证基因敲除效率的基础上,最大程度地降低脱靶效应。

酿酒酵母转化方法有醋酸锂化学法、电法和聚乙二醇法等多种。一般来说,醋酸锂化学法应用最为广泛,但转化效率不是很高,电法的效率明显高于醋酸锂转化法。本研究需要利用 pNK1-L-PGK-10roIGLP-1-R、PYES2-gRNA 和 pGADT7-Cas9 这 3 个载体共转化酿酒酵母菌株 INVSc1,首先采用醋酸锂法筛选重组酵母,但效率很低。在后期阶段,进一步尝试了电转化法,结果转化效率有了明显提高。酿酒酵母阳性重组体的筛选方法一般采用营养缺陷方法。营养缺陷的筛选标志物是能够使用一些突变宿主细胞不能合成酿酒酵母生长所需的一些氨基酸,从而不能在缺乏该氨基酸的筛选培养基上生长,通过该培养基可以初步筛选重组酿酒酵母^[10]。筛选后,进一步鉴定靶基因是否整合到酵母基因组中,通常使用酿酒酵母基因组

DNA 为模板通过 PCR 进行。本研究已从酿酒酵母阳性转化子基因组 DNA 中成功扩增出靶基因 *10rolglp-1*, PCR 产物的测序结果均正确, 表明 *10rolglp-1* 基因已成功整合到酿酒酵母基因组。

本研究将 3 周龄的 C57/BL 小鼠饲喂糖尿病建模饲料, 同时注射剂量为 50 mg/kg 的 STZ 溶液, 成模率相对较高达到 80%。给药重组降血糖酿酒酵母(HS) 15 d 后, HS 治疗组体重略显现出恢复性升高, 同时, 观察到 HS 治疗组小鼠体重减轻和多尿等症状明显改善。证明灌胃 HS 降低小鼠血糖的同时改善了其新陈代谢, 增强胰岛功能, 使小鼠的生理状态趋于正常。因此, 本研究构建的降血糖酿酒酵母(HS)可能成为防治 2 型糖尿病的有效和安全方法。

酿酒酵母是一种较为理想的真核表达系统, 随着生物制药技术的发展, 酿酒酵母被广泛用于表达外源性蛋白质(多肽)药物。最近, 一种使用益生菌细胞作为缓释胶囊的新型药物输送系统正悄然出现, 给糖尿病患者带来了康复的希望^[11]。与之前报道的酿酒酵母益生菌细胞作为生物药物相比^[12], 本研究构建的 HS 对 2 型糖尿病小鼠模型具有显著的降血糖作用。与通过传统的同源重组策略将外源靶基因随机整合到 rRNA 必需基因重复簇中相比, 本研究构建的 HS 使 PGK-10roIGLP-1 表达单元特异性地整合在酿酒酵母基因组中乙醇脱氢酶 I (*adh I*) 位点的非必需基因上, 可以高度稳定地表达 10roIGLP-1 蛋白, 并较好保持酿酒酵母的原有性状。HS 可以调节血糖, 并且其自身富含 B 族维生素、消化酶和胃肠道调节功能等很多优点。虽然与最近发布的各种多肽药物, 包括艾塞那肽注射液、利拉鲁肽注射液^[13]、恩夫韦肽^[14]和口服索马鲁肽^[15]相比, HS 食疗法的剂量更高, 但 HS 可能具有许多卓越性, 例如通过口服给药更

方便, 成本更低, 更容易制备(不需要破坏细胞和纯化有效成分)。

本研究首次报道了一种采用基因编辑技术创制的口服重组降糖酵母(HS)生物药物。结果表明, 口服降糖酵母(HS)可能成为一种简单有效、经济实用的糖尿病生物药物。今后需要对其药物代谢动力学、毒理学和人体剂量等进行进一步研究, 为临床应用积累更多理论基础和实验数据。

致谢

感谢王伟教授(中国医学科学院药物研究所)和宋文芹教授(南开大学生命科学学院)馈赠质粒 pGADT7-Cas9 和 pZHY-988 以及对研究的技术支持。

REFERENCES

- [1] HONG S. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2022, 183: 109119.
- [2] 胡中平, 程念, 杨帆, 苏正定. GLP-1R 结构和功能及小分子药物筛选研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(2): 30-40.
HU ZP, CHENG N, YANG F, SU ZD. Research progress on structure and function of GLP-1R and screening for small molecule drugs[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(2): 30-40 (in Chinese).
- [3] HOU JH, YAN RX, DING DF, YANG LQ, WANG CY, WU ZQ, YU XJ, LI WD, LI MG. Oral administration of a fusion protein containing eight GLP-1 analogues produced in *Escherichia coli* BL21(DE3) in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(10): 1439-1446.
- [4] MA B, HU X, ZHAO X, ZHANG Y, LI C, MA Z, ABBAS S, CHEN W, QU S, LI M. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and cytotoxicity of recombinant orally-administrated long-lasting GLP-1 and its therapeutic effect on db/db mice[J]. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2014, 122(4): 215-221.

- [5] WU ZQ, JIA NB, LI N, MA BC, LI MG. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain stably expressing a fusion protein containing ten tandem recombinant human glucagon-like peptide-1 analogues[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2009, 25(6): 882-886.
- [6] TAVARES S, GROTKJÆR T, OBSER T, HASLAM RP, NAPIER JA, GUNNARSSON N. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of eicosapentaenoic acid, using a novel $\Delta 5$ -desaturase from *Paramecium tetraurelia*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1854-1861.
- [7] MALI P, YANG L, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DiCARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [8] 宋浩雷, 郭晓贤, 黄建忠. 酿酒酵母乙醇脱氢酶基因敲除的研究[C]. 2006 中国微生物学会第九次全国会员代表大会暨学术年会论文摘要集, 2006: 1. SONG HL, GUO XX, HUANG JZ. Study on the ethanol dehydrogenase gene knockout of *Saccharomyces cerevisiae*[C]. 2006 The Ninth National Congress and Annual Conference of the Chinese Microbiology Association, 2006: 1 (in Chinese).
- [9] 秦丽娜, 江贤章, 田宝玉, 舒正玉, 黄建忠. 酿酒酵母乙醇脱氢酶I基因的超表达[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 261-266. QIN LN, JIANG XZ, TIAN BY, SHU ZY, HUANG JZ. Overexpression of alcohol dehydrogenase I in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2008, 35(2): 261-266 (in Chinese).
- [10] VIGENTINI I, GEBBIA M, BELOTTI A, FOSCHINO R, ROTH FP. CRISPR/Cas9 system as a valuable genome editing tool for wine yeasts with application to decrease urea production[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2194.
- [11] DAI ZB, WANG BB, LIU Y, SHI MY, WANG D, ZHANG XN, LIU T, HUANG LQ, ZHANG XL. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 3698.
- [12] JIANG PZ, MA C, HAO JF, HAN YK, LI MG. Construction of a dietary-cure *Saccharomyces cerevisiae* expressing long-acting glucagon-like peptide-1 and investigation of its hypoglycemic activity in type 2 diabetes mellitus mouse model[J]. Journal of Biosciences, 2019, 44(1): 1-10.
- [13] GARBER A, HENRY R, RATNER R, GARCIA-HERNANDEZ PA, RODRIGUEZ-PATZTI H, OLVERA-ALVAREZ I, HALE PM, ZDRAVKOVIC M, BODE B. Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial[J]. The Lancet, 2009, 373(9662): 473-481.
- [14] BONORA S, CALCAGNO A, COMETTO C, FONTANA S, AGUILAR D, D'AVOLIO A, GONZALEZ de REQUENA D, MAIELLO A, dal CONTE I, LUCCHINI A, Di PERRI G. Short-term additional enfuvirtide therapy is associated with a greater immunological recovery in HIV very late presenters: a controlled pilot study[J]. Infection, 2012, 40(1): 69-75.
- [15] PEARSON S, KIETSIRIROJE N, AJJAN RA. Oral semaglutide in the management of type 2 diabetes: a report on the evidence to date[J]. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 2019, 12: 2515-2529.

(本文责编 郝丽芳)