



YPS1/YPS2 失活改进酿酒酵母 An- α 菌株 β -葡萄糖苷酶分泌表达

郭敬涵¹ 陆海燕¹ 洪解放² 贾玉蝶¹ 邹少兰^{*1,2}

1 天津大学化工学院 天津 300085

2 天津大学石化中心 天津 300072

摘要:【背景】工业酵母菌株的蛋白质表达通常存在表达量低、分泌效率低的问题。【目的】考察失活 Yapsin 蛋白酶 Yps1p 和 Yps2p 对 β -葡萄糖苷酶在酿酒酵母 An- α 菌株中表达的影响。【方法】利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术, 首先构建得到未折叠蛋白响应(Unfolded Protein Response, UPR)指示菌株 An- α (*leu2::UPRE-lacZ*)即 An- α L, 然后分别失活其 YPS1 和 YPS2 基因, 导入以 YEplac195 为载体的 β -葡萄糖苷酶表达质粒(简称 BG), 进行生长和酶活分析评价。【结果】菌株 An- α L 的 YPS1 和 YPS2 基因失活对其在酵母浸出粉胨葡萄糖(Yeast Extract Peptone Dextrose, YPD)培养基中的生长未造成明显的不利影响; 导入质粒 BG 后将在酵母浸出粉胨纤维二糖(Yeast Extract Peptone Cellobiose, YPC)培养基中生长的最大 OD_{600} 分别提高了 21.9%和 7.4%; 最大总酶活值为 0.087 5 和 0.068 6 U/(mL· OD_{600}), 是对照菌株相应值的 2.268 倍和 1.778 倍; 分泌比例提高了 19.4 %和 22.2%; β -葡萄糖苷酶表达水平与 β -半乳糖苷酶酶活水平所代表的 UPR 信号响应值之间呈现良好的相关性。【结论】YPS1 和 YPS2 基因失活有助于改进酿酒酵母 An- α 菌株中 β -葡萄糖苷酶的分泌表达。

关键词: YPS1/YPS2 基因失活, 酿酒酵母 An- α , β -葡萄糖苷酶, 分泌表达

Improved β -glucosidase expressing in *Saccharomyces cerevisiae* An- α by YPS1/YPS2 gene inactivation

GUO Jinghan¹ LU Haiyan¹ HONG Jiefang² JIA Yudie¹ ZOU Shaolan^{*1,2}

1 College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300085, China

2 Tianjin R&D Center for Petrochemical Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: [Background] Low level expression and poor secretion efficiency are the common problems in the production of secretory recombinant proteins by industrial yeast. [Objective] To investigate the effect of inactivating yapsin proteases Yps1p and Yps2p on β -glucosidase expression in *Saccharomyces cerevisiae* An- α , a yeast strain isolated from Angel industrial yeasts. [Methods] By utilizing CRISPR/Cas9-based gene editing technology, we firstly constructed a UPR-indicator strain

Foundation items: Tianjin Science and Technology Project (18YFZCNC01240); National Natural Science Foundation of China (31470208); National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905600)

*Corresponding author: Tel: 86-22-27892069; E-mail: slzhou@tju.edu.cn

Received: 02-04-2021; Accepted: 17-05-2021; Published online: 01-06-2021

基金项目: 天津市科技计划(18YFZCNC01240); 国家自然科学基金(31470208); 国家重点研发计划(2019YFA0905600)

*通信作者: Tel: 022-27892069; E-mail: slzhou@tju.edu.cn

收稿日期: 2021-04-02; 接受日期: 2021-05-17; 网络首发日期: 2021-06-01

An- α (*leu2::UPRE-lacZ*), designated as An- α L. Next, the *YPS1* and *YPS2* genes were inactivated, followed by transformation of the β -glucosidase-expressing plasmid BG that was constructed on the YEplac195 vector. The growth and enzymatic activities of the resultant strains were evaluated. **[Results]** Inactivation of the *YPS1* or *YPS2* gene of the strain An- α L did not affect the cell growth in YPD medium. The presence of the plasmid BG increased maximum OD_{600} values in the YPC medium by 21.9% and 7.4%, respectively. The maximum enzymatic activities were 0.087 5 and 0.068 6 U/(mL· OD_{600}), which were 2.268 and 1.778 times of the control value, respectively. The ratio of the secreted protein was also increased by 19.4% and 22.2%, respectively. There was a good correlation between the β -glucosidase activity level and the UPR signal response value as represented by the β -galactosidase activity level. **[Conclusion]** Inactivation of *YPS1* and *YPS2* could improve the secretory β -glucosidase yield of the strain An- α .

Keywords: *YPS1/YPS2* gene inactivation, *Saccharomyces cerevisiae* An- α , β -glucosidase, secretory expression

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是典型真核模式生物和最重要的真核微生物细胞工厂,被广泛用于生物学研究与工业生产^[1-5]。其中最重要的生产应用,一是作为全细胞催化剂的内源或异源代谢物合成与生产,如乙醇、丁醇、乳酸、琥珀酸等^[2-3];二是医药蛋白和工业应用蛋白的异源分泌表达生产^[4-5]。二者目标不同,决定了对酵母的性能要求、关键制约因素和实现的策略都彼此不同。前者通过代谢工程(Metabolic Engineering)和途径工程(Pathway Engineering)予以全局调控与优化,实现代谢物的高效经济生产^[2-3];后者则基于酵母细胞自身蛋白质质量控制(Protein Quality Control)系统调控规律,通过蛋白质分泌途径(Secretory Pathway)的全局调控与优化来实现^[1,6-8]。

β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase)即 β -D-葡萄糖苷水解酶(β -D-Glucoside hydrolase, EC 3.2.1.21),是非常重要的工业用酶,具有多方面的应用价值:在医药领域,通过催化具有强有力生物学活性的糖苷配基单元的释放和生产,可用于抗肿瘤试剂的生产;在食品领域,能催化大豆中的抗癌成分——大豆异黄酮的转化;在化工领域,能催化醇和糖合成烷基糖苷;在能源领域,是纤维素转化为葡萄糖的关键酶之一^[9]。鉴于 β -葡萄糖苷酶的重要性, β -葡萄糖苷酶编码基因从多种微生物中被分离、鉴定出来,并被克隆和表达于不同的宿主,应用于不同的领域;其中, β -葡萄糖苷酶在酿酒酵母中的表达和应用已经有大量报道^[9-11]。

工业酵母菌株通常具有较实验室菌株更为突出的抗逆和生产性能,二者在抑制物和异源蛋白表达“蛋白质解折叠反应”响应和调控能力上也显示出巨大差异^[12]。工业酵母菌株往往存在倍性和遗传背景不明、选择标记少等问题,其遗传改造可能面临意想不到的困难,需要付出更多的努力^[13-14]。尽管 β -葡萄糖苷酶在酵母中的异源表达已经有大量报道,但在工业酵母菌株中的生产和应用方面仍然会面临一些问题,如遗传操作技术手段限制、表达水平有限、分泌效率低等^[9,11,15]。

Yapsin 蛋白酶是一类天冬氨酸蛋白酶,由糖基磷脂酰肌醇(Glycosyl Phosphatidylinositol, GPI)锚定,能特异性地切割底物中的单或双碱性氨基酸残基位点^[16-17]。酿酒酵母中被发现存在 5 个 Yapsin 蛋白酶成员: Yps1p、Yps2p、Yps3p、Yps6p 和 Yps7p^[18],其中 Yps1p 最早于 1990 年被报道发现,当时命名为 Yap3^[19]。Yapsin 蛋白酶被研究发现与工程菌表达某些外源蛋白时发生的降解现象有紧密关系,失活 Yapsin 蛋白酶可能会极大地降低外源蛋白的降解,从而显著提高外源蛋白表达量^[20]。

我们课题组在对分离得到的酿酒酵母 An- α 单倍体菌株进行遗传改造的过程中发现,其表达纤维素酶的酶活水平和分泌比例都偏低,不能满足底物利用和蛋白生产需求^[21]。为了解决此问题,本研究从 Yapsin 蛋白酶基因入手,首先失活其中起主要作用的 *YPS1* 和 *YPS2* 基因,考察对 β -葡萄糖苷酶基因表达的影响。失活 Yapsin 蛋白酶改进蛋白质生产报

道更多见于毕赤酵母宿主,用于酿酒酵母 An- α 菌株改造还未见报道,因此本工作将有助于推动对酿酒酵母的遗传改造和充分利用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

研究用到的菌株、质粒和引物分别见表 1、表 2。大肠杆菌 DH5 α 用于质粒载体的构建和扩增;酿酒酵母菌株 An- α 基因型为 *MAT α ura3*, 本实验室保存,本研究中用作亲本菌株。使用和构建得到的质粒见表 1,用到的引物见表 2。

1.1.2 主要试剂和仪器

鲑鱼精 DNA、LiAC 和 PEG4000, Sigma 公司;内切酶、DNA Marker 等,生工生物工程(上海)股份

有限公司和大连 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶片段回收试剂盒以及质粒抽提试剂盒, Omega 公司;Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 和无缝重组试剂盒, 诺唯赞公司;引物合成及序列测定由上海金唯智公司完成。PCR 仪, Biometra 公司; Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪, Waters 公司;电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.2 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L): 酵母抽提物 5.0, 胰化蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。固体培养基另添加琼脂粉 15 g/L, pH 7.0。大肠杆菌的培养用 LB 培养基, 固体培养时用 37 °C 培养箱, 液体培养条件是 37 °C、220 r/min, 转化子筛选时添加氨苄青霉素至终浓度 100 mg/L (简称为 LB+Amp 100 平板)。

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 All strains and plasmids used in this study

| 菌株和质粒 Strains or plasmids | 特征 Characteristics | 来源 Sources |
|--|--|-------------------------|
| Strains | | |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | F- <i>recA1 endA1 hsdR17</i> [rK-mK ⁻] <i>supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i> | Our lab |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | |
| An- α | <i>MATα ura 3</i> , derived from Angel high-temperature-resisting alcoholic active dry yeast (TH AADY) | Our lab |
| AZ | An- α (<i>leu2::UPRE-lacZ</i>) | Our lab ^[12] |
| An- α (YCplac33-Cas9) | Obtained by transforming plasmid YCplac33-Cas9 into strain An- α | This study |
| An- α L(YCplac33-Cas9) | An- α (<i>leu2::UPRE-lacZ</i>)(YCplac33-Cas9) | This study |
| An- α L | An- α (<i>leu2::UPRE-lacZ</i>) | This study |
| An- α L(<i>yps1</i>)(YCplac33-Cas9) | An- α L(Δ <i>yps1</i>)(YCplac33-Cas9) | This study |
| An- α L(<i>yps1</i>) | | This study |
| An- α L(<i>yps2</i>)(YCplac33-Cas9) | An- α L(Δ <i>yps2</i>)(YCplac33-Cas9) | This study |
| An- α L(<i>yps2</i>) | | This study |
| An- α L (YE) | Obtained by transforming plasmid YEplac195 into strain An- α | This study |
| An- α L (BG) | Obtained by transforming plasmid BG into strain An- α | This study |
| An- α L(<i>yps1</i>)(BG) | Obtained by transforming plasmid BG into strain An- α L(<i>yps1</i>) | This study |
| An- α L(<i>yps2</i>)(BG) | Obtained by transforming plasmid BG into strain An- α L(<i>yps2</i>) | This study |
| Plasmids | | |
| YCplac33-Cas9 | <i>Amp^r, URA 3, Cas 9, 5603 bp</i> | Our lab ^[22] |
| pRS42H-gRNA | <i>Amp^r, hphNT1, crRNA</i> | Our lab ^[22] |
| pRS42H-gLEU2 | <i>Amp^r, hph NT1, crRNA, 20 bp guide for LEU 2 gene</i> | Our lab ^[12] |
| BG | YEplac195- Ptpi-xyn2s-Aa BGL1-TadhI, β - glucosidase expressing vector | Our lab ^[23] |
| pRS42H-gYPS1 | Replacing <i>Not I</i> site in pRS42H-gRNA by 20 bp gRNA sequence targeting <i>YPS1</i> loci | This study |
| pRS42H-gYPS2 | Replacing <i>Not I</i> site in pRS42H-gRNA by 20 bp gRNA sequence targeting <i>YPS2</i> loci | This study |

表 2 实验所用引物

Table 2 All the primers used in this study

| 引物名称 Primers name | 序列 Sequences (5'→3') | 目的 Purpose | 产物长度 Size of product (bp) |
|----------------------|---|--|---|
| P1 | CACAATTTGCTAAAGGTA | To amplify donor DNA | 3 721 |
| P2 | CTTGTGATTCTTTGCACTTC | | |
| P3 | TGACCAAGTTCGTAAATCTA | To identify integrated strain | 795 |
| P4 | CCATCTCCACAATAGGCATA | An- α (<i>leu2::UPRE-lacZ</i>) | (control strain) 4 327 (indicator strain) |
| P5 | CTATTCGGTGGACTTGGAAAGGTTTATAGACTAGAA ATAGC | To amplify 20 bp guide RNA (underlined) for plasmid pRS42H-gYPS1 construction | |
| P6 | CTTCCAAGTCCACCGAATAGGATCATTATCTTTCA CTGC | | |
| P7 | CTTAGGAGGCGGTTTCAGGTAGTTTATAGACTAGAA ATAGC | To amplify 20 bp guide RNA (underlined) for plasmid pRS42H-gYPS2 construction | |
| P8 | TACCTGAACCGCCTCCTAAGGATCATTATCTTTCA CTGC | | |
| P9 | GGCTGACGGTTATGAAGAAA | To amplify the left homologous arm in | 75 |
| P10 | TCTGTGGTGGCTTCCAAGTCCACCGAAT | donor DNA for <i>YPS1</i> inactivation and the product PCR1 | |
| P11 | GACTTGGAAGCCACCACAGAACGTAACG | To amplify the right homologous arm in | 77 |
| P12 | TATCCGAGCCCATAATCCAT | donor DNA for <i>YPS1</i> inactivation and the product PCR2 | |
| P13 | TCGGTGGAAATTAGATATTGG | To amplify the left homologous arm in | 82 |
| P14 | GTCTGAACCCTAGATCAGAAGAACCAGT | donor DNA for <i>YPS2</i> inactivation and the product PCR3 | |
| P15 | TTCTGATCTAGGGTTCAGACAACCCATA | To amplify the right homologous arm in | 70 |
| P16 | TTAAAGGATGAGCCAGTGGT | donor DNA for <i>YPS2</i> inactivation and the product PCR4 | |
| P17 | GGTCTCGGTAAGATAATAC | To identify recombinant <i>yps1</i> strain | 352 |
| P18 | CGCTTGACGAATCATCAC | | |
| P19 | TCAGAAGAAATACGGCAGTT | To identify recombinant <i>yps2</i> strain | 421 |
| P20 | GAATGTAGACGACTTAGAGG | | |

YPD 培养基、CMG 完全基本培养基、筛选用培养基 CMG^{-URA}、CMG^{-URA}+潮霉素 B (HyB)和反选用 5'-乳清酸(简称 5'-FOA)平板的配制参见文献[12,22]; YPC 培养基的碳源为纤维二糖,其余同 YPD。这些培养基用于酵母的培养,固体培养时用 30 °C 培养箱,液体培养条件是 30 °C、220 r/min。

1.3 质粒构建

使用表 2 中的引物对 P5/P6 和 P7/P8,以 pRS42H-gRNA (表 1)为出发材料分别构建得到 pRS42H-gYPS1 和 pRS42H-gYPS2 (表 1)的流程参见文献[20]方法。预期 PCR 片段大小均为 6 528 bp。

1.4 Donor DNA 合成

用于菌株 An- α (*leu2::UPRE-lacZ*)构建的 Donor

DNA 片段合成方法为:以表 1 中菌株 AZ 的染色体为模板,以表 2 中的引物 P1、P2 进行 PCR 扩增。

用于基因 *YPS1* 和 *YPS2* 敲除失活的 Donor DNA 片段合成方法为:采用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 进行 PCR 反应。所有 PCR 反应体系里的引物终浓度均为 0.2 μ mol/L,其余组分参见说明书。PCR 反应条件:95 °C 5 min; 94 °C 30 s, (52–56) °C 30 s, 72 °C 1–5 min, 30 次循环; 72 °C 10 min。

第 1 次 PCR 全部以表 1 中菌株 AZ 的染色体为模板,对基因 *YPS1*,使用表 2 中引物 P9、P10 扩增左同源臂(PCR1),使用引物 P11、P12 扩增右同源臂(PCR2);对基因 *YPS2*,使用引物 P13、P14 扩

增左同源臂(PCR3), 使用引物 P15、P16 扩增右同源臂(PCR4)。第 2 次 PCR 分别以上述 PCR 产物为模板进行交叉重叠延伸 PCR: 对基因 *YPS1*, 使用模板 PCR1+PCR2 和引物 P9、P12 扩增 Donor DNA 片段; 对基因 *YPS2*, 使用模板 PCR3+PCR4 和引物 P13、P16 扩增 Donor DNA 片段。引物序列及产物长度见表 2。

1.5 酵母感受态细胞制备和质粒转化

用文献[24]中的醋酸锂方法制备感受态细胞并进行转化; 利用 CRISPR-Cas9 方法构建外源基因整合菌株或内源基因失活菌株时, 参照文献[12,22]进行转化、筛选和鉴定。转化子菌株的 PCR 鉴定使用的引物对及预期产物大小见表 2。

1.6 菌株生长和酶活评价

挑取 YPD 平板上新鲜生长的酵母菌落, 接入装有 YPD 培养液的试管中, 30°C、220 r/min 培养过夜, 转接进行二次液体培养, 所得菌液为种子液, 接种到装有 50 mL YPD 培养液的 250 mL 摇瓶中, 控制起始 OD_{600} 约为 0.2, 30°C、220 r/min 培养, 每 8 h 定期取样测定 OD_{600} 值, 绘制生长曲线。

当碳源为纤维二糖时, 试管种子液改为 CMG^{-URA} 培养基培养, 而摇瓶培养基改为 YPC 培养, 分别于 0、8、16、24、38、48、62、72 h 取样测定 OD_{600} 值和酶活, 其余同上。

β -葡萄糖苷酶酶活测定参见文献[23], β -半乳糖苷酶酶活测定参见文献[12]。

测定均至少设 2 次重复, 数据处理时计算平均值和 SD 值。

1.7 SDS-PAGE 分析

取 3 mL 培养液到离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min 收集上清液, 加入 4 倍体积的无水酒精充分振荡混匀, 12 000 r/min 离心 5 min 去上清液, 室温晾干沉淀, 用 50 μ L 无菌水溶解即得蛋白质样品。使用考马斯亮蓝 G-250 方法进行蛋白质定量, 制备 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白质电泳^[25]。

2 结果与分析

未折叠蛋白响应(Unfolded Protein Response, UPR)是酵母最重要的蛋白质质量控制机制之一, 为了方便同时检测菌株对外源基因表达及对酸、醇等不利影响因素的 UPR 响应情况, 参考文献[12]的方法: 首先构建 UPR 响应指示菌株 An- α (*leu2::UPRE-lacZ*), 在此基础上敲除基因 *YPS1* 和 *YPS2*, 导入 β -葡萄糖苷酶基因表达载体, 进行生长及表达评价。

2.1 菌株 An- α (*leu2::UPRE-lacZ*)构建

按本实验室建立的操作流程^[23], 利用 CRISPR-Cas9 系统进行的菌株构建涉及三要素: (1) Cas9 蛋白表达菌株 An- α (YCplac33-Cas9)及其构建: 制备 An- α 感受态细胞, 用质粒 YCplac33-Cas9 进行转化得到; (2) gRNA 表达载体 pRS42H-gLEU2: 实验室已有材料(表 1)^[12]; (3) Donor DNA 及其合成: 参照文献[12], 以表 1 中菌株 AZ 的染色体为模板, 使用表 2 中的引物 P1、P2 扩增 Donor DNA 片段, 制备得到足量 3 721 bp 的 PCR 产物。

制备菌株 An- α (YCplac33-Cas9)感受态细胞, 将上述质粒 pRS42H-gLEU2 和 Donor DNA 片段共转化, 涂布 CMG^{-URA} +潮霉素筛选平板; 对筛选平板上生长的菌落顺次进行 CMG^{-URA} +HyB 平板复筛、菌落 PCR 鉴定及测序。PCR 鉴定所用引物为表 2 中的 P3、P4, 阳性转化子菌株和阴性对照菌株预期 PCR 片段分别为 4 327 bp 和 795 bp。提交 4.3 kb 左右大小 PCR 产物进行测序, 测序结果证明未突变。按文献[23]方法彻底丢失所得阳性转化子菌株中的质粒, 筛选和鉴定得到指示菌株 An- α (*leu2::UPRE-lacZ*), 为叙述方便, 以下将此菌株简称为 An- α L。

2.2 菌株 An- α L(*yps1*)和 An- α L(*yps2*)构建和生长初步评价

基因 *YPS1* 和 *YPS2* 失活菌株的构建分 3 个步骤, 然后进行 YPD 培养基上的生长评价。

2.2.1 pRS42H-gYPS1 和 pRS42H-gYPS2 质粒构建

主要按文献[26] Guide RNA 设计原则, 设计了靶向 *YPS1* 基因位点的供 Guide RNA 合成的 DNA

序列: 5'-CTATTCGGTGGACTTGGAAG-3' (参见表 2 中的引物对 P5/P6), 其对应于 *YPS1* 基因 ORF 的第 246–265 位碱基序列; 设计了靶向 *YPS2* 基因位点的供 Guide RNA 合成的 DNA 序列如下: 5'-ACACTGGTTCTTCTGATCTA-3' (参见表 2 中的引物对 P7/P8), 其对应于 *YPS2* 基因 ORF 的第 296–315 位碱基序列。

以限制性内切酶 *Not* I 酶切线性化的 pRS42H-gRNA 片段为模板, 分别利用引物对 P5/P6 和 P7/P8 进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳的结果见图 1。由图 1 可知, PCR 产物符合 6 528 bp 的预期大小。构建所得质粒的测序结果进一步证明发生了预期的变化, 确认获得了目的质粒 pRS42H-gYPS1 和 pRS42H-gYPS2。

2.2.2 Donor DNA 合成

对 Donor DNA 合成所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 2。条带大小与预期相符, 证明为目的 Donor DNA。

2.2.3 *YPS1* 和 *YPS2* 失活菌株的构建

制备菌株 An- α L(YCplac33-Cas9)感受态细胞, 分别将质粒 pRS42H-gYPS1、pRS42H-gYPS2 和各

自的 Donor DNA 片段共转化此感受态细胞, 涂布 CMG^{-URA}+HyB 300 筛选平板, 30 °C 培养 3 d。对筛选平板上生长的菌落进行菌体 PCR 鉴定及 PCR 产物测序, 鉴定引物对分别为 YPS1-鉴-U/YPS1-鉴-D 和 YPS2-鉴-U/YPS2-鉴-D, 对应 PCR 产物大小分别为 352 bp 和 421 bp。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 3, 条带大小与预期相符, 证明为目的产物。

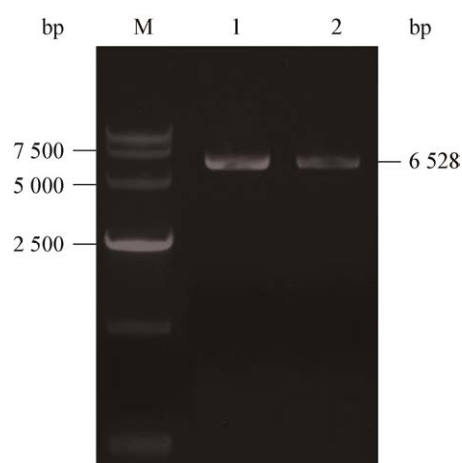


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Examination of PCR products by agarose gel electrophoresis

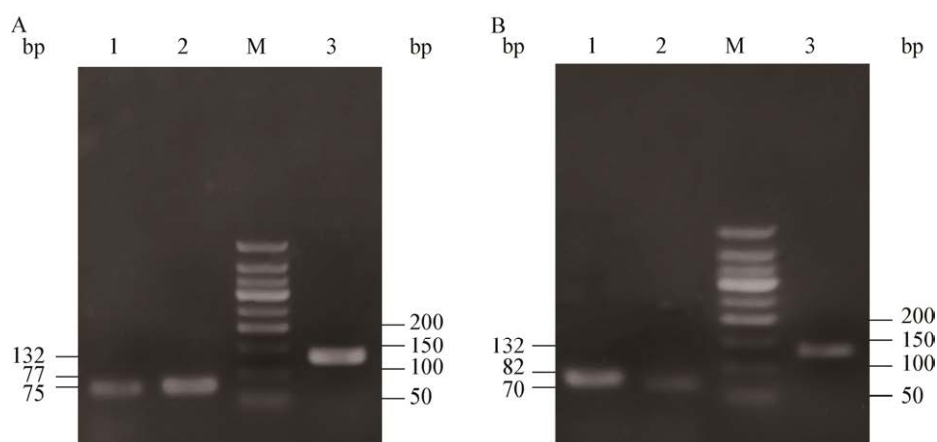


图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 Examination of PCR products by agarose gel electrophoresis

注: A: 基因 *YPS1*; B: 基因 *YPS2*。1: 左同源臂片段; 2: 右同源臂片段; 3: Donor DNA。M: 50 bp DNA Ladder Marker

Note: A: The *YPS1* gene; B: The *YPS2* gene. 1: Left homologous arm in donor DNA for *YPS2* inactivation; 2: Right homologous arm in donor DNA for *YPS2* inactivation; 3: Donor DNA for *YPS2* inactivation. M: 50 bp DNA Ladder Marker

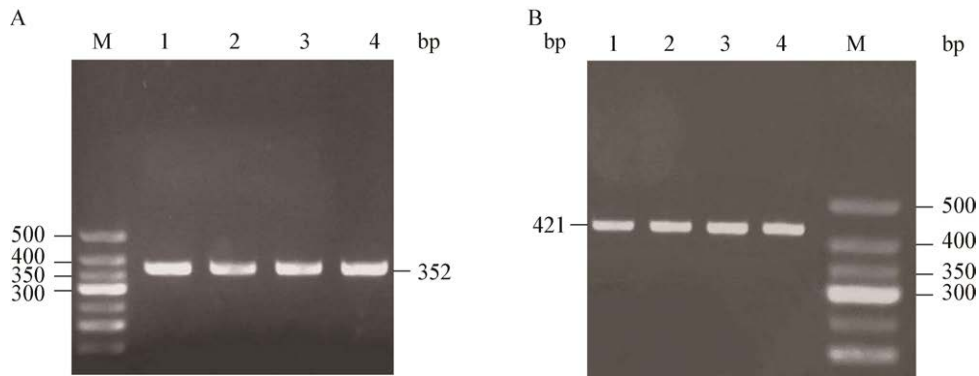


图3 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 3 Examination of PCR products by agarose gel electrophoresis

Note: A: The *YPS1* gene: 1–4: PCR products for *YPS1* transformants, 352 bp; B: The *YPS2* gene: 1–4: PCR products for *YPS2* transformants, 421 bp. M: DNA Marker

分别挑选3个转化子鉴定PCR产物送测序公司测序,测序结果表明转化子染色体都发生了预期变化,即分别实现了 *YPS1*、*YPS2* 基因 ORF 的第266–273位和第296–315位各8 bp 碱基序列的缺失,造成移码突变使 *YPS1* 基因和 *YPS2* 基因失活。

将测序证明正确的转化子经过2次YPD液体培养和5'-FOA平板反选,确认质粒彻底丢失后即获得 *YPS1* 失活菌株 *An- α L(yps1)* 和 *YPS2* 失活菌株 *An- α L(yps2)*。

2.2.4 *YPS1* 和 *YPS2* 失活菌株的生长初步评价

对本菌株 *An- α L* 和失活菌株 *An- α L(yps1)*、*An- α L(yps2)* 进行了丰富培养基 YPD 中的生长对比评价,结果见图4。结果显示二者生长无明显差

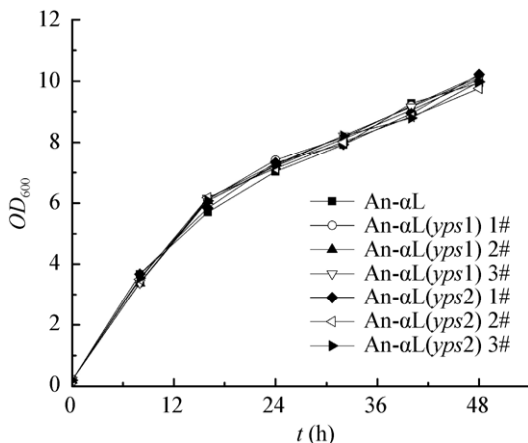


图4 重组菌株在YPD培养基(2%葡萄糖)中的生长曲线
Figure 4 Growth curves of the recombinant strains in the YPD medium containing 2% glucose

异,初步说明基因失活及全程操作对在YPD培养基中的生长未造成明显的不利影响。

2.3 菌株 *An- α L(yps1)*(BG)和 *An- α L(yps2)*(BG) 的构建和评价

2.3.1 菌株 *An- α L(yps1)*(BG)和 *An- α L(yps2)*(BG) 的构建

BG是质粒YEplac195-Ptpi-xyn2s-Aa BGL1-TadhI^[23]的简称。用BG分别转化菌株 *An- α L(yps1)* 和菌株 *An- α L(yps2)* 的感受态细胞,用CMG^{-URA}平板筛选,所得转化子菌株分别命名为 *An- α L(yps1)*(BG)和 *An- α L(yps2)*(BG)。

2.3.2 菌株 *An- α L(yps1)*(BG)和 *An- α L(yps2)*(BG) 的生长与酶活分析评价

纤维二糖是 β -葡萄糖苷酶的作用底物,以纤维二糖为唯一碳源生长时,生长的快慢和强弱受 β -葡萄糖苷酶表达的制约,因此,首先选择含2%纤维二糖培养基YPC在好氧条件下的生长及酶活情况,对比考察基因 *YPS1* 和 *YPS2* 失活的影响。结果见图5–8和表3。这些结果非常清楚地说明了基因 *YPS1* 和 *YPS2* 失活对 β -葡萄糖苷酶表达有非常显著的影响,而且基因 *YPS1* 的效果远较基因 *YPS2* 突出,表现为:(1)生长:与对照菌株 *An- α L*(BG)相比, *YPS1* 和 *YPS2* 失活菌株生长加快,进入稳定期的时间提前(图5);最大 OD_{600} 值分别提高了21.9%和7.4%(图5和表3);(2)总酶活:菌株 *An- α L(yps1)* (BG)和 *An- α L(yps2)*(BG)培养物总酶活随培养时间

呈现出规律性的变化, 38 h 时分别达到最大值 0.087 5 U/(mL·OD₆₀₀)和 0.068 6 U/(mL·OD₆₀₀), 是对照菌株相应值[0.038 6 U/(mL·OD₆₀₀)]的 2.268 倍和 1.778 倍(图 6 和表 3); (3) 分泌比例: 菌株 An- α L(*yps1*)(BG)和 An- α L(*yps2*)(BG)培养物分泌比例较对照菌株培养物提高, 其中 38 h 时的数值较对照分别提高了 19.4%和 22.2%(图 7 和表 3); (4) 对照菌株 An- α L(YE)在 YPC 培养基中呈现了微弱的生长, 因为利用纤维二糖以外组分所致(图 5), 未检测到 β -葡萄糖苷酶酶活。

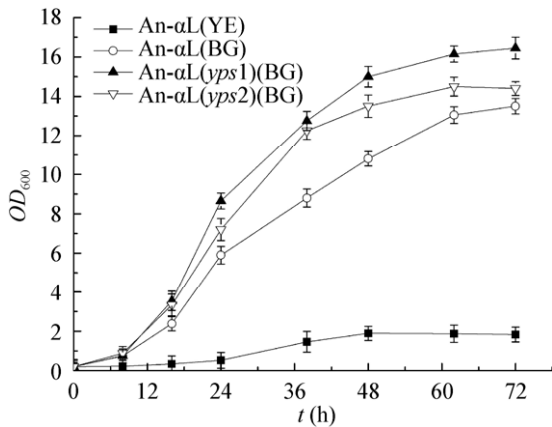


图 5 重组菌株在 YPC 培养基(2%纤维二糖)中的生长曲线
Figure 5 Growth curves of the recombinant strains in the YPC medium containing 2% cellobiose

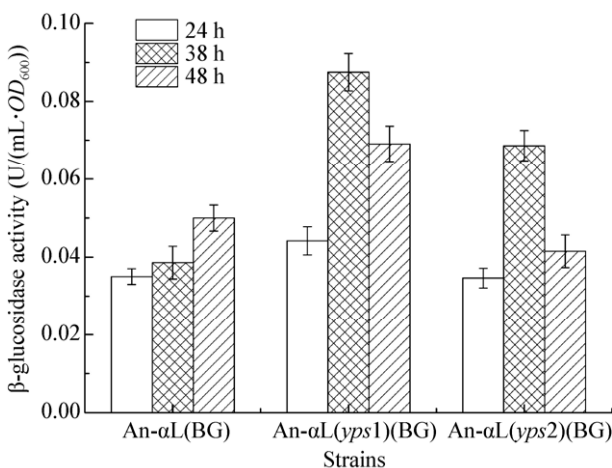


图 6 不同培养时间 β -葡萄糖苷酶的酶活
Figure 6 The β -glucosidase activities at indicated culture time points

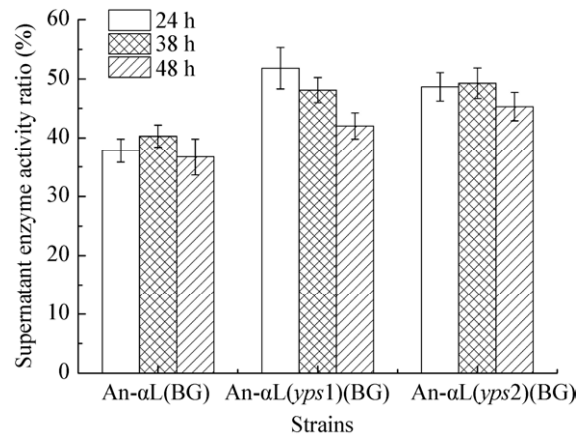


图 7 上清液 β -葡萄糖苷酶的酶活比例
Figure 7 Ratio of the β -glucosidase activity in the supernatant

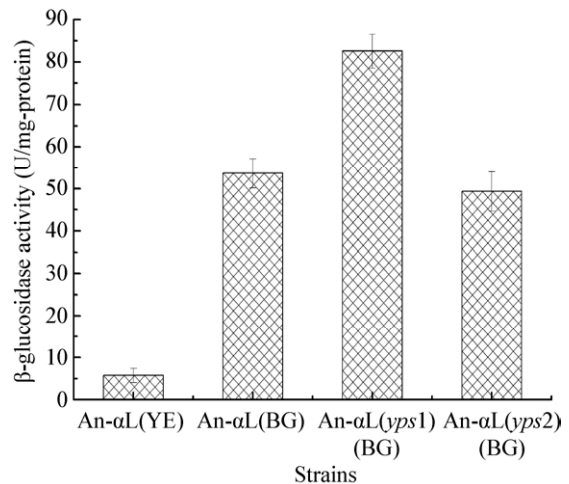


图 8 β -半乳糖苷酶的酶活(48 h)
Figure 8 The β -galactosidase activity (at 48 h)

表 3 重组菌株在 YPC 培养基(2%纤维二糖)中的生长与酶活比较

Table 3 The growth of recombinant strains in YPC medium (2% cellobiose)

| 菌株 Strains | 最大 OD ₆₀₀ OD ₆₀₀ maximum | 38 h 酶活比值 38 h β-glucosidase activity ratio | 38 h 分泌比例比值 38 h secretory ratio |
|-----------------------------------|--|--|---|
| An- α L(YE) | 1.89 | — | — |
| An- α L(BG) | 13.50 | 1.000 | 1.000 |
| An- α L(<i>yps1</i>)(BG) | 16.45 | 2.268 | 1.194 |
| An- α L(<i>yps2</i>)(BG) | 14.50 | 1.778 | 1.222 |

Note: —: Activity not detected

以上数据的综合分析表明： β -葡萄糖苷酶表达水平决定了菌株对底物纤维二糖的利用能力，结果显示了二者良好的相关性；而图 8 结果则显示了 β -葡萄糖苷酶表达水平与 β -半乳糖苷酶酶活水平所代表的 UPR 信号响应值之间良好的相关性。

2.3.3 上清液蛋白质的 SDS-PAGE 分析比较

对上述 YPC 中培养 38 h 的发酵液进行上清液中蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析，结果见图 9。图 9 显示基因 *YPS1* 和 *YPS2* 失活后胞外蛋白质带型发生了明显变化：菌株 An- α L(BG)的典型条带为条带 2、4 和 5 (对应图 9 中条带 2、4、5)，而菌株 An- α L(*yps1*)(BG)和 An- α L(*yps2*)(BG)则为条带 1 和 3。本研究使用的 β -葡萄糖苷酶编码基因来自棘孢曲霉，棘孢曲霉自身生产的 β -葡萄糖苷酶经 SDS-PAGE 电泳分析其分子量为 93 kD^[27]；而在酿酒酵母中分泌表达外源基因时则发现存在严重的糖基化现象，会导致胞外蛋白质分子量发生很大变化^[28]。这里推测条带 1 和条带 2 为被糖基化的 β -葡萄糖苷酶，基因 *YPS1* 和 *YPS2* 失活使得 β -葡萄糖苷酶表达量相比对照菌株 An- α L(BG)明显上升，与上述生长与酶活结果一致。初步证明 β -葡萄糖苷酶表达后确实存在降解，此降解与 Yps1p、Yps2p 相关。

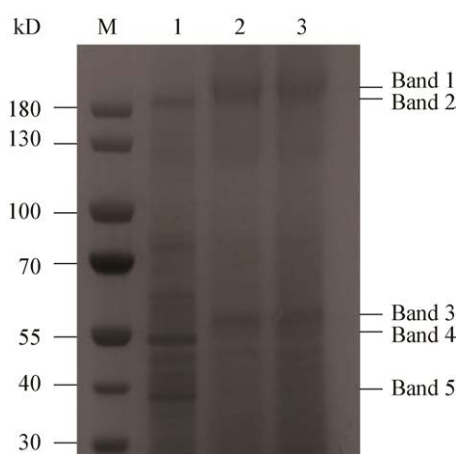


图 9 上清液 SDS-PAGE 分析

Figure 9 Analyses of the the supernatant by SDS-PAGE

Note: M: Protein Marker

3 讨论与结论

Davison 等报道酿酒酵母不同菌株的胞外蛋白质生产容量差异显著，菌株选择是确保重组酶最大生产量至关重要的因素^[29]，也有其他研究结果观察到了这个差异显著的现象^[10,12,23]。在我们的前期工作中，表 1 中质粒 BG 在酿酒酵母实验室菌株 W303-1A(*MATa* or *MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*)中表达所达到的最大总酶活值为 5.75 U/mL^[23]；当 BG 引入到菌株 An- α 中时酶活值很低，对照菌株 38 h 酶活值 0.038 6 U/(mL·*OD*₆₀₀) 对应比酶活值为 0.339 7 U/mL，远远低于宿主 W303-1A 中的表达水平。菌株表达差异的影响因素极为复杂^[1,5-8,10-12,29]，本研究从蛋白酶途径进行改造来提高其在菌株 An- α 中的表达水平。

酿酒酵母的 Yapsin 蛋白酶 Yps1p、Yps2p 被证明与蛋白质质量控制机制相关，都在过量或错误折叠蛋白质的处理过程中起作用；Yps1p 被内质网压力诱导激活而表达，Yps12p 则为非压力状态下的组成型表达，其表达就足以处理基础水平的过量或错误折叠蛋白质^[30]。很多研究发现 Yapsin 蛋白酶对异源蛋白质表达存在负效应，特别是 Yps1p 更导致重组蛋白质的降解^[16-17,30]。本研究以高拷贝数质粒为载体表达 β -葡萄糖苷酶基因，Yps1p 失活对 β -葡萄糖苷酶表达水平和分泌比例的影响比 Yps2p 失活的影响显著得多，正好证明 β -葡萄糖苷酶基因过量表达导致了高的 UPR 压力，而且 Yps1p 在此压力应激反应中起主导作用。

Yapsin 蛋白酶的降解作用与蛋白质底物中的特异性酶切位点有关，因此，重组蛋白被降解的程度和 Yapsin 蛋白酶被失活后重组蛋白表达改进的程度视重组蛋白序列不同而有相当大的差异^[16-17,20,30]。本研究中的 β -葡萄糖苷酶共 842 个氨基酸，推测第 820 位和第 821 位连续 2 个碱性氨基酸赖氨酸是 Yps1p、Yps2p 的作用位点。图 9 初步证明了 β -葡萄糖苷酶的降解确实存在，但降解位点和被降解的小分子产物还需要进一步鉴定。

除了降解过量或错误折叠蛋白质、参与蛋白质质量控制外, Yapsin 蛋白酶在保持细胞完整性方面也起着重要作用, 不同的 Yapsin 缺陷突变株对直接作用于细胞壁的不同药物的敏感性不同。本研究中, Yps1p、Yps2p 的失活显著改进了 β -葡萄糖苷酶的分泌表达; 但另一方面, 菌株本身的抗逆性和生产性能是否因为 Yps1p、Yps2p 参与的其他功能的丧失而受到影响, 还需要进一步的考察。

与此同时, 虽然失活基因 *YPS1* 和 *YPS2* 显著提高了 β -葡萄糖苷酶的酶活水平, 但最大总酶活值为 0.087 5 U/(mL·*OD*₆₀₀)和 0.068 6 U/(mL·*OD*₆₀₀)对应值 1.115 6、0.840 4 U/mL 仍然明显低于 W303-1A 中的表达水平^[23], 提示要进一步改进菌株 An- α 中的胞外表达, 还需要分析和改造蛋白质分泌途径和调控机制中的其他关键制约因素^[1,5-8,10-12,29]。

综上所述, *YPS1* 和 *YPS2* 基因失活本身对菌株在 YPD 培养基中的生长未造成明显的不利影响, 导入高拷贝 β -葡萄糖苷酶表达质粒 BG 后, *YPS1* 和 *YPS2* 基因失活促进了所得菌株在 YPC 培养基中的生长, 最大 *OD*₆₀₀ 分别提高 21.9%和 7.4%; 提高了总酶活, 最大酶活值为 0.087 5、0.068 6 U/(mL·*OD*₆₀₀), 分别是对照菌株相应值的 2.268 倍和 1.778 倍; 分泌比例提高了 19.4%和 22.2%; 同时 β -葡萄糖苷酶表达水平与 β -半乳糖苷酶酶活水平所代表的 UPR 信号响应值之间呈现良好的相关性。简而言之, *YPS1* 和 *YPS2* 基因失活有助于改进酿酒酵母 An- α 菌株中 β -葡萄糖苷酶的分泌表达。

REFERENCES

- [1] Dallbey RE, Heijne G. Protein targeting, transport and translocation[M]. Beijing: Science Press, 2009
达尔贝, 范海列. 蛋白质定向、转运和转位[M]. 万平, 张彦琼译. 北京: 科学出版社, 2009
- [2] Baptista SL, Costa CE, Cunha JT, Soares PO, Domingues L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from biorefinery carbohydrates[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 47: 107697
- [3] Majidian P, Tabatabaei M, Zeinolabedini M, Naghshbandi MP, Chisti Y. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 82: 3863-3885
- [4] Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Mafi A, Hoseinpoor R, Rahbarnia L, Aria M. Yeast expression systems: overview and recent advances[J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(5): 365-384
- [5] Thak EJ, Yoo SJ, Moon HY, Kang HA. Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins[J]. *FEMS Yeast Research*, 2020, 20(2): foaa009
- [6] Feizi A, Österlund T, Petranovic D, Bordel S, Nielsen J. Genome-scale modeling of the protein secretory machinery in yeast[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63284
- [7] Young CL, Robinson AS. Protein folding and secretion: mechanistic insights advancing recombinant protein production in *S. cerevisiae*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30: 168-177
- [8] Sun ZH, Brodsky JL. Protein quality control in the secretory pathway[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2019, 218(10): 3171-3187
- [9] Singhanian RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 500-507
- [10] Ding JJ, Liang GH, Zhang K, Hong JF, Zou SL, Lu HY, Ma YY, Zhang MH. Extra metabolic burden by displaying over secreting: growth, fermentation and enzymatic activity in cellobiose of recombinant yeast expressing β -glucosidase[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 107-114
- [11] Davison SA, Den Haan R, Van Zyl WH. Exploiting strain diversity and rational engineering strategies to enhance recombinant cellulase secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(12): 5163-5184
- [12] Zhang XM, Guo JH, Hong JF, Lu HY, Ding JJ, Zou SL, Fan H. Evaluation of UPR response in yeast by using *UPRE-lac Z* as a reporter gene[J]. *China Biotechnology*, 2020, 40(10): 1-9 (in Chinese)
章小毛, 郭敬涵, 洪解放, 陆海燕, 丁娟娟, 邹少兰, 范寰. *UPRE-lac Z* 为报告基因评价酵母 UPR 响应初步研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(10): 1-9
- [13] Querol A, Bond U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 293(1): 1-10
- [14] Donohoue PD, Barrangou R, May AP. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-cas systems[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(2): 134-146
- [15] Li J, Zeng Y, Zhang MM, Bai FW, Zhao XQ. Disrupting cell wall protein encoding gene *CWP2* enhances extracellular β -glucosidase activity by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 681-690 (in Chinese)

- 李洁, 曾钰, 张明明, 白凤武, 赵心清. 破坏细胞壁蛋白 *CWP2* 基因提高重组酿酒酵母 β -葡萄糖苷酶胞外酶活[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 681-690
- [16] Gagnon-Arsenault I, Tremblay J, Bourbonnais Y. Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(7): 966-978
- [17] Qin ZX, Liu ZM. The research progress in yapsin protease family[J]. Letters in Biotechnology, 2008, 19(4): 591-596 (in Chinese)
秦作先, 刘志敏. Yapsin 蛋白酶家族研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(4): 591-596
- [18] Krysan DJ, Ting EL, Abeijon C, Kroos L, Fuller RS. Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(8): 1364-1374
- [19] Egel-Mitani M, Flygenring HP, Hansen MT. A novel aspartyl protease allowing *KEX2*-independent *MF α* propheromone processing in yeast[J]. Yeast, 1990, 6(2): 127-137
- [20] Cho EY, Cheon SA, Kim H, Choo J, Lee DJ, Ryu HM, Rhee SK, Chung BH, Kim JY, Kang HA. Multiple-yapsin-deficient mutant strains for high-level production of intact recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(1/2): 1-7
- [21] Wang JJ. Study on cellulase expression in *Saccharomyces cerevisiae*: the influencing factors and its application[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2016 (in Chinese)
王建军. 纤维素酶在酿酒酵母中表达影响因素及其应用研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2016
- [22] Lu HY, Li JM, Sun SF, Zhang XM, Ding JJ, Zou SL. Construction of an auxotrophic mutant from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain by CRISPR-Cas9 system[J]. China Biotechnology, 2019, 39(10): 67-74 (in Chinese)
陆海燕, 李佳蔓, 孙思凡, 章小毛, 丁娟娟, 邹少兰. CRISPR-Cas9 系统介导的工业酵母营养缺陷型菌株构建[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(10): 67-74
- [23] Wang GQ, Liu C, Hong JF, Ma YY, Zhang K, Huang XY, Zou SL, Zhang MH. Comparison of process configurations for ethanol production from acid- and alkali-pretreated corn cob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without β -glucosidase expression[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 154-161
- [24] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure[J]. Yeast, 1995, 11(4): 355-360
- [25] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Translated by Huang PT, et al. Beijing: Science Press, 2002
萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [26] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): 4336-4343
- [27] Decker CH, Visser J, Schreier P. B-glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(10): 4929-4936
- [28] Machida M, Ohtsuki I, Fukui S, Yamashita I. Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular beta-glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(12): 3147-3155
- [29] Davison SA, Den Haan R, Van Zyl WH. Heterologous expression of cellulase genes in natural *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(18): 8241-8254
- [30] Miller KA, DiDone L, Krysan DJ. Extracellular secretion of overexpressed glycosylphosphatidylinositol-linked cell wall protein Utr2/Crh2p as a novel protein quality control mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(11): 1669-1679