rDNA 介导的乳酸克鲁维酵母整合型表达载体的构建及初步验证

孙海烨[1]，张 梁[*1,2]，李由然[1]，顾正华[1]，丁重阳[1,2]，石贵阳[1,2]
（1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要： 构建一个适用于乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）稳定的整合型表达载体，并通过鼠灰链霉菌（*Streptomyces murinus*）来源的腺苷酸脱氨酶基因（*AMPD*）的表达对该载体进行初步验证。以质粒 pMD 19T-simple 为空骨架，*K. lactis* GG799 来源的 18S rDNA 序列为同源重组位点，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）来源的半乳糖苷酶启动子（*pScGAL7*）为外源基因调控元件，乙酰胺酶基因（*amdS*）为筛选标记，*AMPD* 为报告基因，构建重组表达载体 pTRGA-*amdS*。载体经 *Sac* II 线性化后，去除了大肠杆菌（*Escherichia coli*）来源的 *ori* 和氨苄青霉素抗性基因（*Amp*^{r}），将同源重组片段电转化 *K. lactis* GG799 得到重组菌，利用实时荧光定量 PCR（RT-QPCR）测定重组菌 *AMPD* 基因整合拷贝数为 1~3，AMP 脱氨酶酶活测定结果表明：酶活与拷贝数呈正相关，含 3 个整合拷贝的重组菌在半乳糖诱导下酶活提高了 32.6%，达到（590±13.33）U/mL。在无选择压力下重组菌连续生长 58 世代稳定性为 98.59%。通过载体 pTRGA-*amdS* 的构建与应用实现了外源基因在 *K. lactis* 中的稳定表达，初步探究了 18S rDNA 在同源重组中的作用，为 *K. lactis* 的进一步分子改造提供参考。

关键词： 乳酸克鲁维酵母；18S rDNA；整合表达；AMP 脱氨酶；RT-QPCR；拷贝数
中图分类号：Q 78　**文章编号：**1673-1689(2019)10-0087-11　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.013

Construction and Verification of a Ribosomal DNA-Mediated Integrative Expression Vector in *Kluyveromyces lactis*

SUN Haiye[1]，*ZHANG Liang*[*1,2]，*LI Youran*[1]，*GU Zhenghua*[1]，*DING Zhongyang*[1,2]，*SHI Guiyang*[1,2]
（1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: An integrative expression vector applied for *Kluyveromyces lactis* was constructed in this study. To verify its application, the adenylate deaminase gene (*AMPD*) derived from *Streptomyces*

收稿日期： 2017-02-23
基金项目： 国家 863 计划项目（2011AA100905）；江苏省杰出青年科学基金项目（BK20140002）；国家星火计划重点项目（2015GA690004）。
* **通信作者：** 张 梁（1978—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酵母生理与代谢工程、工业微生物等领域的研究。
E-mail：zhangl@jiangnan.edu.cn
引用本文： 孙海烨，张梁，李由然，等. rDNA 介导的乳酸克鲁维酵母整合型表达载体的构建及初步验证[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（10）：87-97.

murinus was sucessfully expressed by this vector. The recombinant vector pTRGA-*amdS* that based on the plasmid pMD 19T-simple was established containing *K. lactis*-derived 18S rDNA sequence for homologous recombination, the *Saccharomyces cerevisiae*-derived galactosidase gene promoter (*pScGAL7*) for expression of heterologous genes, the acetamidase gene (*amdS*) as selection marker, and *AMPD* as reporter gene. The recombinant expression vector was linearized by *Sac* II, removing *E.coli ori* and *Amp* resistant gene, then electransformed into *K. lactis* GG799 to obtain transformants. Real-time quantitative PCR analysis indicated that the copy number of the integrated *AMPD* gene ranged from 1 to 3 and positively correlated with AMP deaminase activity. When the inducer galactose was used as carbon source, the AMP deaminase activity in the culture supernant of the recombinant with three *AMPD* gene copies reached to 590±13.33 U/mL, improved 32.6%. The integrants were mitoically stable for 58 generations under the non-selective pressure condition (98.58%). We constructed a new vector with the stable expression ability of heterologous gene and confirmed the 18S rDNA as a suitable recombination site. These research results lay a foundation for further molecular modification of *K. lactis*.

Keywords: *Kluyveromyces lactis*, 18S rDNA, integrative expression, adenylate deaminase, real-time quantitative PCR, copy number

乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)能以乳酸为唯一碳源和能源,具有营养要求简单、生长速率快、分泌蛋白能力强、不会对蛋白高度糖基化、不产生内毒素等优点[1],作为美国 FDA(Food and Drug Administration)认定的食品安全级酵母菌,到目前为止,已有上百种蛋白在该酵母中成功表达并实现规模化生产,涉及食品、生物和医药等领域[2]。*K. lactis* 外源基因表达的载体主要包括游离型和整合型两类,前者如 pKD1、pKRAS,拷贝数高但在无选择压力条件下易丢失,后者主要为当前应用最广泛的载体 pKLAC1,稳定性高,但拷贝数相对较低且只能满足单个基因的整合表达[3-4]。此外,*K. lactis* 在外源蛋白分泌表达中仍存在瓶颈,其蛋白产量还有很大的提升空间。随着生物技术的广泛应用,酵母表达系统得到相应的发展,Dujon 等于 2004 年完成 *K. lactis* 的全基因组测序[5],有利于深入掌握该菌株的遗传信息并进行合理改造。研究者主要通过增加外源基因的剂量或共表达分泌途径中的辅助因子、分子伴侣等方式来提高外源蛋白的产量,而目前表达载体的选择较为局限,因此亟待构建合适的分子工具满足工业化的不同需求。

核糖体 DNA (rDNA) 是细胞核中编码核糖体 RNA(rRNA)的脱氧核苷酸序列,由转录区和非转录区组成,具有高度保守性,以重复单元存在于真核生物基因组中[6]。以 rDNA 为同源重组位点构建表达载体,在无选择压力条件下可以实现单个目的基因多拷贝或多个目的基因单拷贝稳定整合于基因组中[7-8],通过增加外源基因拷贝数或共表达辅助因子从而实现外源蛋白高效分泌表达的目的[9],且对宿主菌无不良影响[10],该策略已成功应用于酿酒酵母(*Sacchormyces cerevisiae*)[11-12]、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)[9]、*K. lactis* [13-15]、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)[16]、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)[17-18]、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)[19]、法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)[20]、*Arxula adeninivorans*[21-22]和产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)[23]等酵母菌的异源表达。研究发现,整合位点在 rDNA 单元中的位置、性质,表达盒的大小以及筛选标记的选择对整合效率和稳定性产生影响[6,11,14,18-19],从单拷贝到多达数十个拷贝均有报道,表明整合位点的选择导致宿主菌种基因拷贝数的差异。*K. lactis* 基因组中 rDNA 有 68 个重复单元,每个单元长度为 8.6 kb 左右,由 5S、26S、18S、基因内转录间隔序列(ITS)和外转录间隔区(ETS)组成[14,24]。目前,在 *K. lactis* 中利用 rDNA 介导同源重组尚处于初步阶段, 研究发现因选取 rDNA 单元中不同位置的同源整合序列,重组菌的整合拷贝数有很大差异,少则几个,多则达到120 个[13-15]。现阶段,对于rDNA 重复单元的结构、

重要元件的作用以及分子重组机制等缺乏系统认识,需要进一步深入研究。

腺苷酸脱氨酶(AMP deaminase,EC 3.5.4.6)是一种氨基水解酶,催化腺苷酸脱去氨基产生肌苷酸和 NH_3,在嘌呤代谢循环中起着至关重要的作用,维持机体免疫力和腺苷酸能荷,作为工业生产中重要的酶已广泛用于食品、医药和农业等领域[25]。基于该酶稳定性高、易于定量检测的优点,以 AMPD 为报告基因,并以实验室前期研究中的强启动子 pScGAL7 为外源基因表达的调控元件,构建 18S rDNA 介导的整合型表达载体 pTRGA-amdS,利用 RT-QPCR 测定重组菌外源基因的整合拷贝数[26],初步探究拷贝数与 AMP 脱氨酶酶活的关系,并测定重组载体的稳定性,为进一步研究 rDNA 单元在 *K. lactis* 基因工程中的应用作了初步尝试,对具有广阔应用前景的 *K. lactis* 进一步分子改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 文中所用质粒和菌株见表 1。

表 1 本研究中所使用的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

质粒和菌株	相关特性和用途	来源
pMD19-T simple vector	克隆载体,*Amp*^{r}	购自 Takara 公司
pKLAC1	*pLAC4*,α-mating factor, *Amp*^{r}	New England Biolabs
pT-*AMPD*	克隆载体,*AMPD*,*Amp*^{r}	本研究中心保藏
pKLAC1-*AMPD*	表达载体,*AMPD*,*amdS*,*Amp*^{r}	本研究构建
pTR	克隆载体,18S rDNA-3',18S rDNA-5',*Amp*^{r}	本研究构建
pTLA	克隆载体,*pLAC4*,α-mating factor,*AMPD*,*Amp*^{r}	本研究构建
pTGA	克隆载体,*pScGAL7*,α-mating factor,*AMPD*D,*Amp*^{r}	本研究构建
pTGA-*amdS*	克隆载体,*pScGAL7*,α-mating factor,*AMPD*,*amdS*,*Amp*^{r}	本研究构建
pTRGA-*amdS*	表达载体,18S rDNA-3',*pScGAL7*,α-mating factor,*AMPD*,*amdS*,18S rDNA-5',*Amp*^{r}	本研究构建
pT-GAPDH	克隆载体,*GAPDH*,*Amp*^{r}	本研究构建
Escherichia coli JM109	保藏载体	本研究中心保藏
Kluyveromyces lactis GG799	表达宿主,用于克隆 18S rDNA	本研究中心保藏
Saccharomyces cerevisiae W303-1A	用于克隆 *pScGAL7*	本研究中心保藏
K. lactis/pTRGA-*amdS*	重组 *K. lactis*,pTRGA-*amdS*	本研究构建

1.1.2 引物 根据基因序列设计 PCR 特异性引物(表 2),委托金唯智公司合成。

1.1.3 培养基 LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0,固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉,添加终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素用于 *E. coli* 转化子的筛选;YEPD 培养基(g/L):蛋白胨 20.0,酵母粉 10.0,葡萄糖 20.0,用于 *K. lactis*、*S. cerevisiae* 的培养;YEPDG 培养基(g/L):蛋白胨 20.0,酵母粉 10.0,葡萄糖 10.0,半乳糖 10.0;YEPG 培养基(g/L):蛋白胨 20.0,酵母粉 10.0,半乳糖 20.0;YCB 固体培养基(g/L)[26]:酵母基础碳源 11.7,1 mol/L pH 7.0 的 KH_2PO_4-K_2HPO_4 缓冲液 30 mL/L(终浓度 30 mmol/L),琼脂粉 20,灭菌后加入 0.5 mol/L 的乙酰胺 10 mL/L(终浓度 5 mmol/L),用于 *K. lactis* 重组菌的筛选。

1.1.4 工具酶、主要试剂及仪器 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I、*Sal* I、*Hind* III、*Bgl* II,美国 Fermentas 公司;SYBR Premix Ex Taq™ II、CIAP、T4 DNA 连接酶,大连 Takara 公司;质粒小量提取、DNA 片段的纯化、回收试剂盒,*pfu*、*taq* 等 DNA 聚合酶,杭州宝赛生物技术有限公司;氨苄青霉素(Amp),上海生工生物工程股份有限公司;酵母基础碳源(yeast carbon base,YCB),New England Biolabs 公司;5'-腺苷酸,美国 Sigma 公司。Multiporator 电转仪,德国 Eppendorf 公司;Bio-Rad S1000 PCR 仪、Chemi Doc 凝胶成像仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;紫外分光光度计,美国 UNICO 公司。

1.1.5 溶液配制 原始底物:取 1 mL 0.08 mol/L $NaHCO_3$ 溶液溶解 13.9 mg 5'-腺苷酸。反应底物:

表 2　本研究所用的引物

Table 2　Primers used in this study

引物	序列(5'→3')	酶切位点
AMPD-F	CCGCTCGAGAAAAGAGCTCCACCACCTAGACAAGC	*Xho* I
AMPD-R	GAAGTCGACTTATCCTCTTGCATGTGCTC	*Sal* I
pLAC4-*AMPD*-F	CGGGGTACCAGTAGACAACAGACAGGGAG	*Kpn* I
pLAC4-*AMPD*-R	GGAAGATCTTATACAACATCGAAGAAGAG	*Bgl* II
pScGAL7-F	CGGGGTACCCTCCTTTTGGAAAGCTATAC	*Kpn* I
pScGAL7-R	CCCAAGCTTTTTTGAGGGAATATTCAACT	*Hind* III
amdS-F	GGAAGATCTTGTACAATATGGACTTCCTC	*Bgl* II
amdS-R	GGAAGATCTCGGGGTACCCGACCAAAGCGGCCATCGTG	*Bgl* II,*Kpn* I
18S rDNA-3'-F	TCCCCGCGGCCGCGGTAATTCCAGCTCCA	*Sac* II
18S rDNA-3'-R	CAAGCATATGACTACTGGCAGGTACCAAACCTTGTTACGACTTTTA	*Kpn* I
18S rDNA-5'-F	TAAAAGTCGTAACAAGGTTTGGTACCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	*Kpn* I
18S rDNA-5'-R	TCCCCGCGGCCGCGGCTGCTGGCACCAGA	*Sac* II
Dir1-F	ACATCGAGAAAATTTCAGCA	—
Dir1-R	AGGAAAAAGTTTCGTGTGCT	—
Dir2-F	CGCGCTACACTGACGGAGCC	—
Dir2-R	GTCGACGGTACCCCTAGGAG	—
Int-F	TCTCAAAGATTAAGCCATGC	—
Int-R	ATCATGTTGAGCTCTGCAT	—
GAPDH-F	CCGCTCGAGGGTTTCGGTAGAATCGGTAG	*Xho* I
GAPDH-R	GGAAGATCTACTCTTGAAGAGTAACCG	*Bgl* II
RT-*GAPDH*-F	GAAGCTTTGATGACTACCGTTC	—
RT-*GAPDH*-R	CTTTACCGACAGCCTTAGCAG	—
RT-*AMPD*-F	ATCGCAGAAGCTGTTGATGTG	—
RT-*AMPD*-R	GTGCGTTTGAAGAGAATGGAG	—

注:下划线部分为酶切位点

原始底物用 pH 6.0 的 0.1 mol/L 琥珀酸钠-NaOH 溶液稀释 400 倍至终浓度为 0.1×10^{-3} mol/L。

1.2　方法

1.2.1　基因克隆及质粒的构建　以质粒 pT-AMPD 为模板,扩增鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)来源并经密码子优化的 *AMPD* 基因,*Xho* I 和 *Sal* I 双酶切该片段,连接至经同样双酶切的载体 pKLAC1,构建质粒 pKLAC1-*AMPD*。以该质粒为模板,分别利用 pLAC4-*AMPD*-F/R、*amdS*-F/R 引物,扩增 pLAC4-αMF-*AMPD*-tLAC4 片段和 pADH2-*amdS*-TT 片段,与质粒 pMD 19T-simple 连接,构建质粒 pTLA 和 pT-*amdS*。

用酸性玻璃珠法提取酵母染色体基因组,以 *S. cerevisiae* W303-1A 基因组为模板,pScGAL7-F/R 为引物,扩增得到长度为 301 bp 的 pScGAL7 片段,*Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切连接至同样酶切的质粒 pTLA,替换 pLAC4,构建质粒 pTGA。质粒 pT-*amdS* 经 *Bgl* II 酶切后胶回收目的片段(2 527 bp)后连接至 *Bgl* II 单酶切并经 CIAP 去磷酸化的线性化质粒 pTGA,经 Dir1-F/R 引物验证正确的重组质粒命名为 pTGA-*amdS*。

以 *K. lactis* GG799 基因组为模板,分别以 18S rDNA-3'-F/R 和 18S rDNA-5'-F/R 为引物,扩增得到长度为 1 199 bp 的 18S rDNA-3' 片段和 562 bp 的 18S rDNA-5'片段,采用重叠延伸 PCR 扩增得到 18S rDNA-3'-18S rDNA-5'融合片段,与质粒 pMD 19T-simple 连接,构建质粒 pTR。

质粒 pTGA-*amdS* 经 *Kpn* I 酶切后胶回收目的片段(5 282 bp)后连接至 *Kpn* I 单酶切并经 CIAP 去磷酸化的线性化质粒 pTR,经 Dir2-F/R 引物验证

正确的重组表达载体命名为 pTRGA-*amdS*。

1.2.2 重组载体电转化 *K. lactis* GG799 *Sac* II 线性化重组表达载体 pTRGA-*amdS* 后电转化 *K. lactis* GG799,涂布 YCB 平板,于 30 ℃培养 3~4 d,挑取单菌落提取染色体基因组,利用 Int-F/R 引物进行 PCR 验证,正确整合的重组菌可以扩增得到大小为 2 032 bp 的片段。

1.2.3 内参基因 *GAPDH* 的克隆及标准质粒的构建 以 *K. lactis*/pTRGA-*amdS* 染色体为模板,根据 NCBI 数据库中 *K. lactis* 三磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)序列(GenBank 登录号 X52871)设计特异性引物 *GAPDH*-F/R,扩增得到 941 bp 的片段,连接至质粒 pMD 19-T simple,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,挑取阳性转化子,委托上海生工公司测序,得到标准质粒 pT-*GAPDH*。*AMPD* 基因的标准质粒为 pT-AMPD。

1.2.4 *GAPDH* 基因和 *AMPD* 基因 RT-QPCR 反应的标准曲线 以标准质粒 pT-*GAPDH* 和 pT-*AMPD* 为标准品,用微量核酸定量仪测定浓度后相应的分子数(拷贝数)为

$$\mathrm{DNA}=\frac{6.02\times1023\times m}{L\times660} \tag{1}$$

式中:m 为 DNA 质量,g;L 为 DNA 长度,bp。

根据标准品每微升质粒溶液所含的拷贝数,对其进行 10 倍梯度稀释后用作 RT-QPCR 反应的模板,其中 pT-*GAPDH* 标准品分别稀释至 10^3、10^4、10^5、10^6、10^7 个拷贝/μL 的样品,pT-*AMPD* 标准品分别稀释至 10^2、10^3、10^4、10^5、10^6 个拷贝/μL 的样品。根据 *GAPDH* 和 *AMPD* 基因序列,分别设计 RT-QPCR 反应引物 RT-*GAPDH*-F/R 和 RT-*AMPD*-F/R,扩增产物大小为 144,142 bp。反应体系(10 μL):SYBR Premix ExTaq™ II PCR buffer 5 μL,模板 0.5 μL,上下游引物各 0.3 μL,灭菌的 dd H_2O 3.9 μL;扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。每个浓度设置 3 个平行反应。以起始模板中质粒拷贝数的对数为横坐标,不同浓度梯度下的 Ct 值为纵坐标,建立 *GAPDH* 和 *AMPD* 标准曲线。RT-QPCR 的扩增效率为

$$\mathrm{PCR}=10^{1/-S}-1 \tag{2}$$

式中:S 为标准曲线的斜率。

1.2.5 *AMPD* 基因拷贝数的检测 提取重组菌染色体基因组并稀释至 40~60 ng/μL 后作为模板,与上述测定标准曲线的 RT-QPCR 反应同步进行,得到重组菌基因组中 *GAPDH* 和 *AMPD* 基因的 Ct 值,分别代入标准曲线即可得到基因的初始拷贝数,因 *K. lactis* GG799 为单倍体菌株,且 *GAPDH* 在基因组中为单拷贝,*AMPD* 基因的拷贝数为

$$\mathrm{Copy_n}=\frac{\mathrm{Copy_A}}{\mathrm{Copy_G}} \tag{3}$$

式中:$\mathrm{Copy_A}$ 为目的基因起始模板拷贝数;$\mathrm{Copy_G}$ 为 *GAPDH* 基因起始模板拷贝数。

1.2.6 重组菌 AMP 脱氨酶酶活测定 AMP 脱氨酶酶活定义:在 pH 6.0,60 ℃条件下,反应液于波长 265 nm 处吸光值每分钟改变 0.001 为酶的一个活力单位。

$$\text{酶活(U/mL)}=\frac{\Delta A_{265}\times K\times10}{0.001\times T} \tag{4}$$

其中:ΔA_{265} 为试验组与对照组在 265 nm 处吸光值的差值;K 为待测酶液的稀释倍数;T 为反应时间,min。

AMP 脱氨酶的酶活参照文献[25]的方法采用紫外分光光度计检测:在试管中加入 3 mL 反应底物后置于 60 ℃水浴锅中保温 5 min,加入 100 μL 稀释适当倍数的待测酶液并充分混匀,立即计时,反应 15 min,加入 3 mL 10%(v/v)高氯酸溶液终止反应。对照试验方法同上,反应底物 60 ℃保温后冰水预冷,加 3 mL 10%(v/v)的高氯酸后再加 100 μL 待测酶液混匀。紫外分光光度计于 265 nm 处,用光程 10 mm 的石英比色皿测定吸光值(以去离子水校零)。

YEPD 平板活化重组菌,挑取单菌落接种于 YEPD 培养基,30 ℃,200 r/min 培养 36 h 后转接至 50 mL YEPD 培养基,使菌体初始 $\mathrm{OD_{600}}$ 在 0.5 左右,30 ℃,200 r/min 摇瓶培养 120 h,测定发酵上清液 AMP 脱氨酶酶活,设置 3 个平行。

1.2.7 重组菌株质粒稳定性测定 YEPD 平板活化重组菌,挑取单菌落接种于 20 mL YCB 培养基(100 mL 摇瓶装液量为 20 mL),30 ℃,200 r/min 培养 16 h,转接至 20 mL 新鲜的 YEPD 培养基,30 ℃,200 r/min 培养 12 h,测定菌液 $\mathrm{OD_{600}}$,记为 N,转接至新鲜 YEPD 培养基中,并控制菌体初始 $\mathrm{OD_{600}}$ 在 0.1 左右,每隔 12 h 重复此操作,共转接 10 次至酵母总繁殖时间为 120 h,取适量菌体用无菌水稀释后分别涂布 YCB 及 YEPD 平板,30 ℃培养 3 d,计相应平

板上的菌落数,分别记为 A_1 和 A_2。酵母繁殖世代及质粒稳定性计算公式如下

$$n=\frac{\lg N-\lg 0.1}{\lg 2} \quad (5)$$

$$\text{Stability}(\%)=\frac{A_1}{A_2}\times 100\% \quad (6)$$

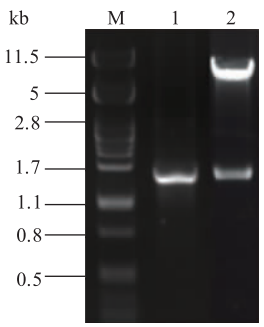
式中:n 为繁殖世代;N:菌液 OD_{600} 值;A_1 为 YCB 平板菌落数;A_2 为 YEPD 平板菌落数。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pTRGA–*amdS* 的构建

以质粒 pT–*AMPD* 为模板 PCR 扩增得到 *AMPD* 片段大小为 1 476 bp，凝胶电泳显示在 1.1~1.7 kb 有单一核酸条带，测序后与目的序列进行 BLAST 比对，一致性达到 100%，将其连接至载体 pKLAC1,酶切验证(图 1),构建重组质粒 pKLAC1–*AMPD*。以该质粒为模板,PCR 扩增分别获得 4.3 kb 的 APMD 基因表达框(*pLAC4*–αMF–*AMPD*–*tLAC4*)和 2.6 kb 的筛选标记基因表达框 (*pADH2*–*amdS*–TT),连接载体 pMD 19T–simple,经测序及 BLAST 比对表明成功构建质粒 pTLA 和 pT–*amdS*。

采用强启动子是实现外源基因高效表达的另一途径，最常用的启动子包括 *S. cerevisiae* 的磷酸甘油酸激酶基因 (*PGK*) 启动子和酸性磷酸酶基因 (*PHO5*) 启动子,*K. lactis* 的 β–半乳糖苷酶基因 (*LAC4*)启动子[3]。在实验室前期启动子研究工作中,发现 *S. cerevisiae* 来源的 *pScGAL7* 性能优于 *K. lactis* 自身来源的 *pLAC4*(数据他处发表),因此以 *pScGAL7* (301 bp) 调控 *AMPD* 的表达，构建质粒 pTGA。



注:M:λ DNA/*Pst* I Marker;1:*AMPD* 基因 PCR 产物;2:*Xho* I 和 *Sal* I 酶切

图 1 质粒 pKLAC1–*AMPD* 的酶切验证

Fig. 1 Enzymatic digestion of plasmid pKLAC1–*AMPD*

根据 1.2.1 节所述方法，依次构建质粒 pTGA–*amdS* 和 pTR,*Kpn* I 酶切后连接上述两个质粒得重组表达载体 pTRGA–*amdS*,具体构建流程见图 2,酶切验证见图 3。

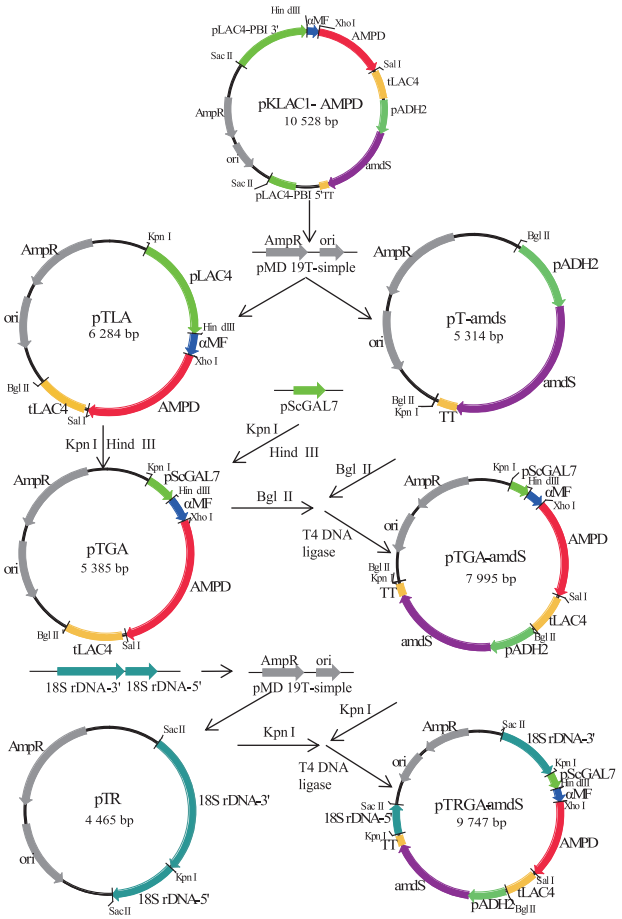
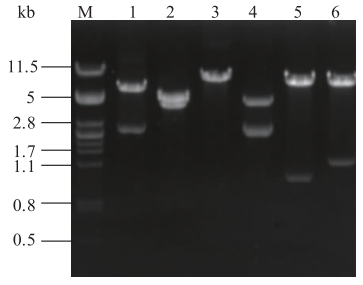


图 2 重组表达载体 pTRGA–*amdS* 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant expression vector pTRGA–*amdS*



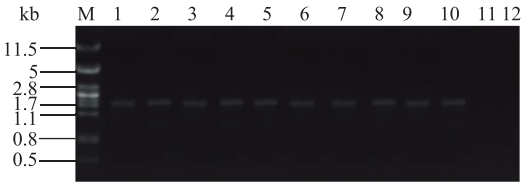
注:M:λ DNA/*Pst* I Marker;1:*Sac* II 酶切;2:*Kpn* I 酶切;3:*Bgl* II 酶切;4:*Kpn* I 和 *Bgl* II 酶切;5:*Xho* I 和 *Sal* I 酶切;6:*Hind* III 和 *Sal* I 酶切

图 3 重组表达载体 pTRGA–*amdS* 酶切验证

Fig. 3 Enzymatic digestion of recombinant expression vector pTRGA–*amdS*

2.2 转化子的筛选及验证

重组载体 pTRGA–*amdS* 经 *Sac* II 酶切线性化后电转化 *K. lactis* GG799，与基因组中 18S rDNA 发生同源重组，将 AMPD 基因整合到染色体中，α 因子信号肽（α–Mating Factor，αMF）介导下实现 AMP 脱氨酶的分泌表达，*amdS* 基因编码的乙酰胺酶能将培养基中的乙酰胺转化为 *K. lactis* 可利用的氮源，只有正确整合的重组菌才能在 YCB 培养基中生长，30 ℃培养 3~4 d，挑取菌落明显的转化子，提取染色体基因组，设计特异性引物 Int–F/R，阳性转化子 PCR 扩增片段大小为 2 032 bp，而原始菌株无 PCR 产物（图 4），筛选得到 10 株阳性重组菌，–70 ℃甘油管保藏待用。



注：M：λ DNA/*Pst* I Marker；1~10：阳性重组菌；11~12：野生型菌株 *K. lactis* GG799

图 4 重组菌 *K .lactis*/pTRGA–amdS 的 PCR 验证

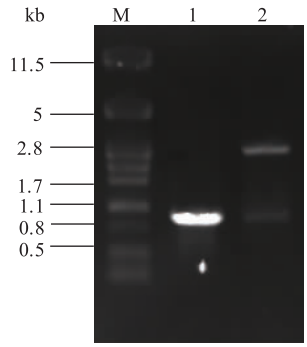
Fig. 4 Integrated identification of recombinant *K .lactis*/pTRGA–amdS

2.3 重组菌 *AMPD* 基因拷贝数的测定

以基因组中单拷贝的 *GAPDH* 为内参基因，PCR 扩增得到 941 bp 的目的片段，测序结果与 *K. lactis* NRRL Y–1140 的 *GAPDH* 基因序列进行 BLAST 比对，一致性达到 99.7%，构建标准质粒 pT–*GAPDH*，*Xho* I 和 *Bgl* II 酶切验证（图 5）。采用 RT–QPCR 建立 *GAPDH* 和 *AMPD* 基因的标准曲线见图 6。可知，*GAPDH* 和 *AMPD* 基因的熔解曲线均为单一峰，表明反应过程中未出现非特异性扩增，特异性良好，标准曲线分别为

y=–3.584 7x+39.988 和y=–3.357 3x+37.677，

相关系数（R^2）分别为 0.998 4 和 0.999 1，扩增效率分别为 0.9 和 0.985 4，符合 RT–QPCR 绝对定量扩增效率的要求。以稀释后的阳性重组菌染色体 DNA 为模板进行 RT–QPCR 反应，*GAPDH* 和 *AMPD* 基因的 Ct 值如表 3 所示，通过标准曲线计算即可得到反应体系中 *GAPDH* 和 *AMPD* 基因的初始拷贝数，可得 10 株重组菌的 *AMPD* 基因拷贝数从 1~3 个。



注：M：λ DNA/*Pst* I Marker；1：*GAPDH* 基因 PCR 产物；2：*Xho* I 和 *Bgl* II 酶切

图 5 质粒 pT–*GAPDH* 的酶切验证

Fig. 5 Enzymatic digestion of plasmid pT–*GAPDH*

K. lactis 染色体中存在 68 个 rDNA 串联重复序列，每个单元由转录区和非转录区组成，以 rDNA 序列为同源重组的整合位点兼具高效和稳定的优点而备受青睐。Lin 等[27]利用 2.7 kb 的 rDNA 序列、URA3 缺陷型筛选标记介导葡糖淀粉酶在 *S. cerevisiae* 中整合表达，拷贝数为 25~140。Wery 等[20]以 3 kb rDNA 序列同源重组并通过 G418 筛选得到 50 个拷贝的重组红法夫酵母（*P. rhodozyma*）。Klabunde 等[18]以 *H. polymorpha* 来源的 2.4 kb 的 25S–NTS1–5S–NTS2 为同源重组位点构建了多宿主适用的整合型载体，拷贝数为 30~40。但是 Steinborn 等[21]以 *A. adeninivoras* 为宿主菌，选取 *H. polymorpha* 来源的 rDNA 不同位置的序列构建了一系列重组载体，均得到单拷贝整合重组菌。相似的是，Wartmann 等[22]研究以 *A. adeninivoras* rDNA 为整合位点时发现重组菌均以单拷贝或低拷贝整合。研究发现，rDNA 单元中整合位点的位置、载体的大小会影响整合拷贝数及稳定性。目前对于 rDNA 整合的分子机制尚不清楚，推测 HOT 序列可能与整合稳定性相关[28]，该序列是具有重组刺激活性的顺式作用元件，能够促进或激活遗传基因的交流，rDNA 中存在 2 个 HOT 序列，分别位于 35S rDNA 前体 5’端转录区域的上游和 3’ 端的下游，此外，rDNA 中存在的 Fob1 因子、Sir2p、RAD52 因子和 MRX 复合体因子等重要功能元件均会影响整合的效率和稳定性[6,18]。另外，缺陷型筛选标记或弱启动子的选择下形成的强选择压力易于获得高拷贝重组菌。本研究以完整的 18S rDNA 序列为整合位点、*amdS* 为筛选标记构

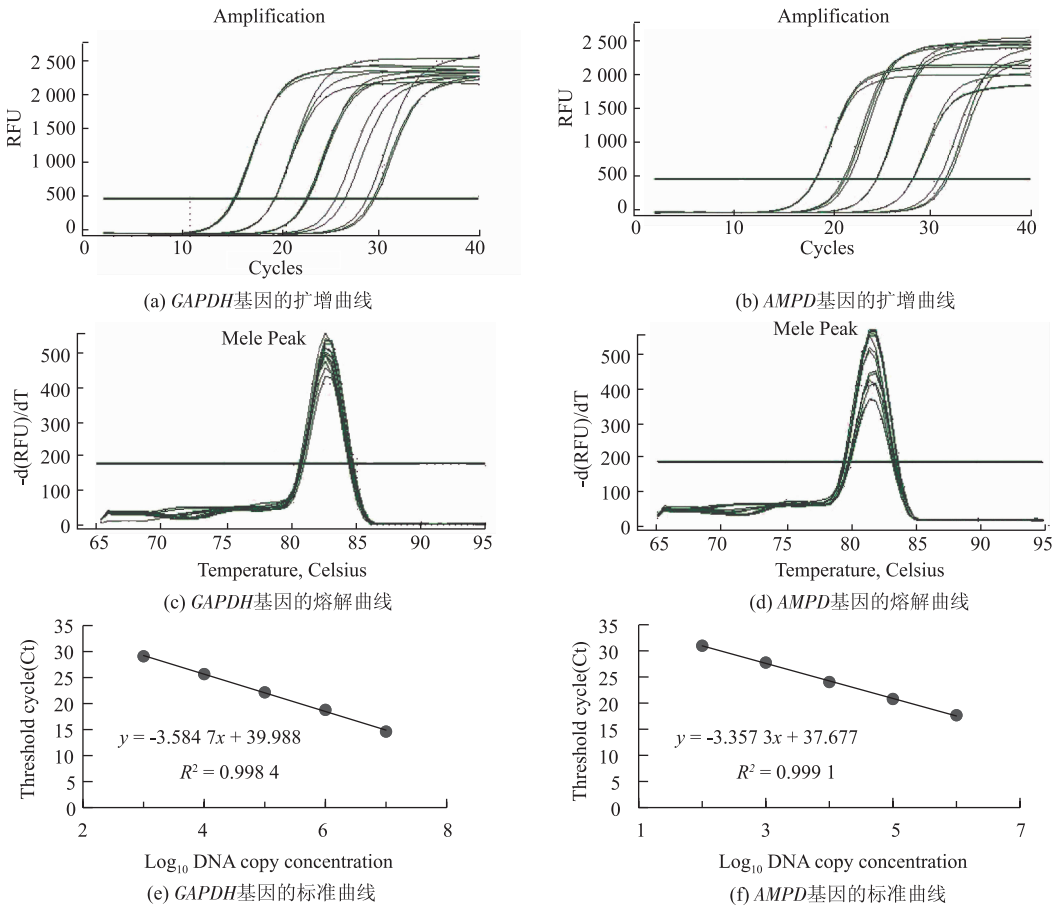


图 6　*GAPDH* 和 *AMPD* 基因标准曲线的建立

Fig. 6　Construction of standard curve of *GAPDH* and *AMPD* gene

表 3　实时荧光定量 PCR 检测重组菌 *AMPD* 基因的整合拷贝数

Table 3　Estimated *AMPD* gene copy number of recombinants by real-time fluorescent quantitative PCR

K. lactis 重组菌	*GAPDH* 基因 Ct 值			Ct 均值	标准偏差	*AMPD* 基因 Ct 值			Ct 均值	标准偏差	$Copy_A/Copy_G$	拷贝数
	1	2	3			1	2	3				
1	18.92	19.31	19.24	19.15	0.17	17.11	17.03	17.06	17.07	0.03	2.13	2
2	19.48	19.41	19.62	19.50	0.09	16.86	16.57	16.78	16.73	0.12	3.34	3
3	18.02	18.36	18.50	18.30	0.20	16.39	16.47	16.07	16.31	0.17	2.06	2
4	20.33	21.21	20.39	20.64	0.40	19.11	19.15	19.03	19.10	0.05	1.37	1
5	19.14	18.95	19.39	19.16	0.18	17.01	16.91	17.51	17.14	0.26	2.02	2
6	20.73	20.48	20.48	20.56	0.12	17.92	17.75	17.75	17.81	0.08	3.16	3
7	20.62	20.12	20.10	20.28	0.24	18.64	17.94	17.81	18.13	0.36	2.11	2
8	21.76	21.85	21.57	21.73	0.12	19.00	19.00	18.68	18.89	0.15	3.17	3
9	21.88	21.76	21.80	21.82	0.05	19.34	19.08	19.47	19.30	0.17	2.54	3
10	21.22	20.90	20.92	21.01	0.15	18.48	18.74	18.69	18.64	0.11	2.39	2

建重组载体，重组菌整合拷贝数为 1~3。在此基础上，可以通过改变整合位点在 rDNA 的位置以及利用缺陷型启动子或弱启动子调控 *amdS* 基因来筛选高拷贝重组菌。

2.4　重组菌 AMP 脱氨酶酶活测定

2.4.1 *重组菌 AMPD 基因拷贝数与 AMP 脱氨酶酶活之间的关系*　将含不同 *AMPD* 基因整合拷贝的重组菌接种于 YEPD 培养基中，测定发酵上清液重

组 AMP 脱氨酶酶活，结果如图 8 所示。重组菌基因组中 *AMPD* 基因拷贝数的差异影响 AMP 脱氨酶的表达水平，在同样发酵条件下，只含 1 个 *AMPD* 基因拷贝的重组菌发酵上清液 AMP 脱氨酶酶活性最低，含 3 个 *AMPD* 基因拷贝的重组菌酶活性最高，达到(444.44±23.15) U/mL，比前者提高了 88%，含 2 个 *AMPD* 基因拷贝的重组菌酶活介于 1 个和 3 个拷贝的重组菌，表明在一定范围内随着拷贝数的增加，重组菌的酶活相应提高，与 Marx[9]等研究结果一致，因此，提高目的基因在宿主菌株中的拷贝数是提高外源蛋白表达量的有效途径。虽然本试验中重组菌拷贝数较低，但在强启动子 *pScGAL7* 的调控下外源基因仍得到高效表达。

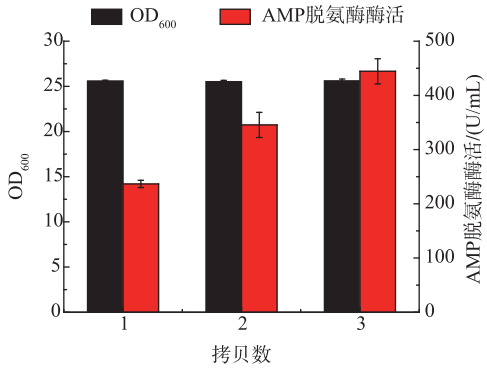


图 7　重组菌 AMP 脱氨酶酶活性与 *AMPD* 基因拷贝数的关系

Fig. 7　Relationship between AMP deaminase activity and the copy number of the *AMPD* gene in recombinants

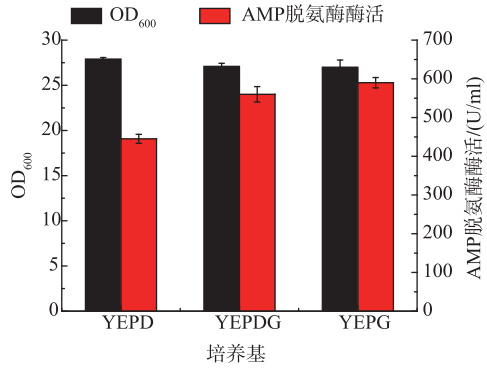


图 8　培养基成分对重组菌菌体生长及产酶的影响

Fig. 8　Effects of media composition on the cell growth and AMP deaminase production of recombinant

2.4.2　培养基成分对重组菌生长和产酶的影响

重组菌 *K. lactis*/pTRGA–*amdS* 中 *AMPD* 基因的表达受 *pScGAL7* 调控，该启动子为非严格诱导型启动子，由乳糖或半乳糖诱导，但不完全被葡萄糖抑制。在诱导和非诱导培养基中分别测定重组菌菌体生长量和发酵上清液 AMP 脱氨酶酶活，结果如图 9 所示。在 *K. lactis* 中，*pScGAL7* 在缺少诱导物的条件下存在一定量的本底表达，AMP 脱氨酶酶活为 (445±11.67) U/mL，诱导条件下，YEPDG 培养基中酶活为 (560±20) U/mL，YEPG 培养基中酶活最高，为(590±13.33) U/mL，与非诱导条件下相比分别提高了 25.8%和 32.6%，而在不同培养基中重组菌菌体生长量相当，进一步表明酶活的提高是由于诱导物存在下启动子调控外源蛋白表达的能力增强，且随着诱导物浓度的增加，酶活相应提高。

2.5　乳酸克鲁维酵母整合表达体系稳定性

在无选择压力条件下，与游离型表达载体相比，整合型表达载体具有在宿主菌基因组中稳定遗传的优点。根据 1.2.7 节所述方法，对构建的重组表达载体在细胞内的稳定性进行了测定，重组菌传代 58 次后的稳定性为 98.59%，表明整合于 *K. lactis* 基因组中的外源基因具有良好的遗传稳定性。

3　讨　论

以 18S rDNA 为同源重组的整合位点构建了适用于 *K. lactis* 的整合型表达载体 pTRGA–*amdS*，并实现了 AMP 脱氨酶在宿主菌中的分泌表达。所构建的载体在以下方面具有一定的优势：1）以 rDNA 为同源重组位点，外源基因整合于宿主细胞基因组中，且在无选择压力条件下稳定遗传；2）线性化重组载体后，同源重组片段去除了 *E. coli* 来源的 *ori* 序列和氨苄青霉素抗性基因(*Amp*^{r})，减小了载体的大小，同时提高了稳定性和生物安全性[12]；3）以 *amdS* 为筛选标记，可直接从野生型菌株出发，不需要利用 URA、LEU 或 TRP 等营养缺陷型筛选标记，省去了营养缺陷型菌株的筛选，并避免了回复突变的问题[2]，此外，也降低了使用 G418、潮霉素等抗生素在筛选中的成本，不会对环境和人类产生危害；4）在整合拷贝数较低的情况下，强启动子 *pScGAL7* 调控外源基因的表达达到较高的胞外蛋白产量，另外，因 rDNA 在 *K. lactis* 中基因组中存在 70 个左右拷贝，该表达载体也为同时共表达多个外源基因(如酵母分泌途径中的辅助因子或分子伴侣等)提供了可能[7-8]。

与此同时，该表达载体也存在一定的不足之

处,即重组菌整合拷贝数较低,推测可能原因一方面是本研究所选取的同源臂序列为完整的 18S rDNA,该位点具有高度保守性,且同源重组片段缺少了 HOT、Fob1 等重要功能元件,因此影响了整合的效率[6,18],另一方面是调控筛选标记的 *pADH2* 为强启动子,重组菌只需达到较低拷贝即能在 YCB 平板上生长,不利于拷贝数的复制。为了避免上述情况,后续试验可以从两个角度出发,一是对 *K. lactis* 的 rDNA 序列进行分析,选择合适的同源臂序列,二是将 *amdS* 基因前的启动子替换为缺陷型启动子或弱启动子,通过增强选择压力来筛选高拷贝重组菌。

4 结 语

利用本研究构建的表达载体能够实现外源基因的稳定表达,为 *K. lactis* 进行分子改造提供了理想工具。因目前对于 rDNA 的重要元件、重组的分子机制研究尚不完善,通过不断深入研究,以 rDNA 重复单元作为同源重组的整合位点将在基因工程应用中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

[1] IDIRIS A,TOHDA H,KUMAGAI H,et al. Engineering of protein secretion in yeast:strategies and impact on protein production [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2010,86(2):403-417.

[2] VAN OOYEN A J J,DEKKER P,HUANG M,et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. **FEMS Yeast Research**,2006,6(3):381-392.

[3] SPOHNER S C,SCHAUM V,QUITMANN H,et al. *Kluyveromyces lactis*:An emerging tool in biotechnology [J]. **Journal of Biotechnology**,2016,222:104-116.

[4] LIU Bo,MA Qingjun,WU Jun. Advance in the production of heterologous proteins in the yeast *kluyveromyces lactis* [J]. **Letters in Biotechnology**,2016,222:104-116.(in Chinese)

[5] DUJON B,SHERMAN D,FISCHER G,et al. Genome evolution in yeasts[J]. **Nature**,2004,430(6995):35-44.

[6] SUN Hengyi,ZANG Xiaonan,ZHANG Xuecheng. Review of the rDNA structure and the influence factors for rDNA-mediated integration in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **J Wuhan Univ(Nat Sci Ed)**,2014,60(1):37-44.(in Chinese)

[7] LOPES T S,HAKKAART G J A J,KOERTS B L,et al. Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Gene**,1991,105(1):83-90.

[8] LOPES T S,DE WIJS I J,STEENHAUER S I,et al. Factors affecting the mitotic stability of high-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**,1996,12(5):467-477.

[9] MARX H,MECKLENBRAUKER A,GASSER B,et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus[J]. **FEMS Yeast Research**,2009,9(8):1260-1270.

[10] CHENG R B,LIN X Z,WANG Z K,et al. Establishment of a transgene expression system for the marine microalga *Schizochytrium* by 18S rDNA-targeted homologous recombination [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2011,27(3):737-741.

[11] LOPES T S,KLOOTWIJK J,VEENSTRA A E,et al. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*:a new vector for high-level expression[J]. **Gene**,1989,79(2):199-206.

[12] LEITE F C B,DOS ANJOS R S G,BASILIO A C M,et al. Construction of integrative plasmids suitable for genetic modification of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Plasmid**,2013,69(1):114-117.

[13] ROSSOLINI G M,RICCIO M L,GALLO E,et al. *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination[J]. **Gene**,1992,119(1):75-81.

[14] BERGKAMP R J M,KOOL I M,GEERSE R H,et al. Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*[J]. **Current Genetics**,1992,21(4/5):365-370.

[15] TANG Nanyun,HUO Keke,LI Yuyang. The construction and application of the muti-copy integration vector in *K. lactis*[J]. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**,1996,28(5):540-546.(in Chinese)

[16] KONDO K,SAITO T,KAJIWARA S,et al. A transformation system for the yeast *Candida utilis*:use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA [J]. **Journal of Bacteriology**,1995,177(24):7171-7177.

[17] LIU Y,LI Y,LIU L,et al. Design of vectors for efficient integration and transformation in *Hansenula polymorpha* [J]. **Biotechnology Letters**,2005,27(19):1529-1534.
[18] KLABUNDE J,DIESEL A,WASCHK D,et al. Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* [J]. **Applied Microbiology Biotechnology**,2002,58(6):797-805.
[19] DALL M T,NICAUD J M,GAILLARDIN C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. **Current Genetics**,1994,26(1):38-44.
[20] WERY J,GUTKER D,RENNIERS A C H M,et al. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. **Gene**,1997,184(1):89-97.
[21] STEINBORN G,GELLISSEN G,KUNZE G. Assessment of *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*-derived rDNA-targeting elements for the design of *Arxula adeninivorans* expression vectors [J]. **FEMS Yeast Research**,2005,5(11):1047-1054.
[22] WARTMANN T,BOER E,PICO A H,et al. High-level production and secretion of recombinant proteins by the dimorphic yeast *Arxula adeninivorans*[J]. **FEMS Yeast Research**,2002,2(3):363-369.
[23] XU Dan,LU Xingyao,ZHUGE Bin,et al. Development and verification of an integrative vector for the industrial osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(8):842-848.(in Chinese)
[24] MALESZKA R,CLARK-WALKER G D. Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number [J]. **Yeast**, 1993,9(1):53-58.
[25] FANG Wei,ZHANG Liang,GU Zhenghua,et al. Constitutive expression of AMP deaminase from *Streptomyces murinus* in *Pichia pastoris* GS115 using the GAP promoter[J]. **Microbiology China**,2014,41(10):2022-2028.(in Chinese)
[26] WANG H,ZHANG L,SHI G. Secretory expression of a phospholipase A2 from *Lactobacillus casei* DSM20011 in *Kluyveromyces lactis*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2015,120(6):601-607.
[27] LIN L L,MA Y J,CHIEN H R,et al. Construction of an amylolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene into a *Saccharomyces cerevisiae* chromosome[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1998,23(6):360-365.
[28] KLABUNDE J,KUNZE G,GELLISSEN G,et al. Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived rDNA-targeting element[J]. **FEMS Yeast Research**, 2003,4(2):185-193.

科　技　信　息

加拿大批准聚山梨酯 80 用于制备部分婴儿食品的喷雾干燥细菌培养制剂

2019 年 8 月 13 日,加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0138 号文件,修订其他允许使用的食品添加剂列表,批准聚山梨酯 80(Polysorbate 80)用于制备喷雾干燥细菌培养制剂,这种制剂在婴儿配方粉、干燥的婴儿谷类产品和营养补充粉中使用。

据了解,聚山梨酯 80 在加拿大已经被允许用作各种食品的乳化剂、胶凝剂、稳定剂或增稠剂。该规定于 2019 年 8 月 13 日生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 加拿大批准聚山梨酯 80 用于制备部分婴儿食品的喷雾干燥细菌培养制剂 [EB/OL]. (2019-8-15). http://news.foodmate.net/2019/08/530189.html