TAT-SOD 在长期保藏的重组毕赤酵母中表达的条件优化

李孔翰， 陈玲琳， 周建森， 刘树滔*
（福州大学 生物工程研究所，福建 福州 350002）

摘要：TAT-SOD 是 TAT 蛋白转导结构域与 SOD 的融合蛋白质。作者以 2007 年构建的产 TAT-SOD 重组毕赤酵母菌为出发菌株，通过摇瓶实验研究不同温度、初始 pH、诱导剂浓度等因素对蛋白质表达的影响。通过比色分析法测定菌体浓度、超氧阴离子自由基清除法测定酶活、SDS-PAGE 分析目的蛋白质 TAT-SOD 的浓度；并采用定量 PCR 法分析表达菌株的目的基因的 mRNA 变化规律，从而研究长期保藏重组毕赤酵母菌株表达 TAT-SOD 的适合性及其条件优化。研究结果表明，摇瓶发酵的最佳条件下（YPDM 培养基，体积分数 1.0%诱导剂浓度，诱导温度 30.0 ℃，初始 pH 值 7.0），发酵液上清酶活水平为 753 U/mL，是未优化初始酶活水平的 5.1 倍，其中 pH 值优化使 TAT-SOD 表达水平提高到原始值的 3.4 倍。7.0 的初始诱导 pH 值的 mRNA 水平是对照组 pH 4.0 的 3.5 倍。这些结果说明，长期保藏的重组毕赤酵母菌株仍然适合表达 TAT-SOD，发酵条件会对毕赤酵母的 TAT-SOD 表达造成显著影响，影响表达水平的最主要因素是目的蛋白质的 mRNA 水平变化。

关键词：TAT-SOD；巴斯德毕赤酵母；基因表达；发酵；优化
中图分类号：Q 815　**文章编号**：1673-1689(2020)08-0051-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.007

Optimization of TAT-SOD Expression Conditions in Long-Term Preserved Recombinant *Pichia pastoris*

LI Konghan, *CHEN Linglin*, *ZHOU Jiansen*, *LIU Shutao**
(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: TAT-SOD is a fusion protein of TAT protein transduction domain and SOD. The TAT-SOD recombinant *Pichia pastoris* constructed in 2007 was used as the original strain to study the effects of different temperature,initial pH value, and inducer concentration on the expression of TAT-SOD in shake flask fermentation. Spectrophotometric analysis, scavenging of superoxide free radical and SDS-PAGE were used to measure the concentration of microorganism, the concentration of target protein TAT-SOD and the enzymatic activity of SOD, respectively. The mRNA changes of the target gene in the expressed strain were analyzed by quantitative PCR, aiming to investigate the

收稿日期：2019-03-01
基金项目：国家 973 计划项目(2016YFD0400202-4)。
* **通信作者**：刘树滔(1970—)，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食品与药物生物技术、自由基生物学及医学方面的研究。
E-mail：stliu@fzu.edu.cn

suitability and optimization of the expression of TAT-SOD in long-term preserved recombinant *Pichia pastoris* strain. The results indicted that YPDM medium, inducer concentration of 1.0% (V/V), induction temperature of 30 ℃, initial pH value of 7.0 were the optimal condition of shake flask fermentation, with an enzymatic activity level in fermentation supernatant of 753 U/mL which was 5.1 times of that in the initial conditions. When the initial pH was 7.0, the expression level improved to 3.4 times and the mRNA level was 3.5 times of that underthe control pH at 4.0. These results indicate that long-term preserved strain of recombinant *Pichia pastoris* is still suitable for the expression of TAT-SOD. The fermentation conditions significantly impact the expression of TAT-SOD, and the most important factor affecting the expression level is the mRNA level changes of the target protein.

Keywords: TAT-SOD, *Pichia pastoris*, expression, fermentation, optimization

超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，简称SOD)是一种含金属的、人体最重要的抗氧化酶,它在维持机体自由基产生和消除之间的动态平衡方面起着重要作用[1]。SOD可分为CuZn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD等3种类型。其中CuZn-SOD分布最广,广泛分布于细胞质、细胞核、过氧化物酶体及线粒体膜间隙中，对防御内源性和外源性活性氧毒性、预防衰老以及炎症等方面有重要意义[2-5]。目前CuZn-SOD虽然已在食品、医药、化妆品等方面有所应用,但由于它是大分子蛋白质,细胞膜通透性差。这限制了SOD的实际应用。TAT-SOD是TAT蛋白转导结构域与CuZn-SOD的融合蛋白质，其中的TAT片段可实现蛋白质的跨膜转导功能[6]。TAT-SOD作为独特的新型抗氧化酶,改善了细胞膜通透性差的问题,因此具有较大的应用潜力[7]。

巴斯德毕赤酵母作为甲醇营养酵母,近年来被公认为最优秀、应用最广泛的外源基因表达系统之一[8]。作者所在实验室的陈莹等2007年构建了TAT-SOD的重组毕赤酵母表达菌株,实现了TAT-SOD在该菌株的高水平表达[9]。由于发酵条件(包括pH值、培养温度、溶解氧、甲醇浓度、诱导时间等)的优化是提高外源蛋白质在毕赤酵母表达水平的重要手段，陈躬瑞等对摇瓶发酵条件进行优化,使SOD酶活水平从289 U/mL提高到475 U/mL[10]。类似,张海玲等使用毕赤酵母密码子的偏好性构建了能高效分泌表达人源CuZn-SOD的毕赤酵母工程菌,用来优化表达以提高产量[11]。郑屹峰等通过摇瓶实验,研究了不同因素对人CuZn-SOD在毕赤酵母中表达的影响[12]。但这些研究对SOD表达优化的内在机制，如目的基因转录水平的差异尚未深入分析。另外,表达菌株可能因长期保藏而发生退化,目前很少对长期保藏菌株表达目的蛋白质的优化条件进行研究。作者以2007年构筑并长期保藏在-20 ℃的TAT-SOD重组毕赤酵母菌作为出发表达菌株,研究摇瓶实验的诱导剂体积分数、诱导温度、初始pH等因素对发酵菌株的生物量、TAT-SOD的蛋白质表达水平和酶活的影响，并通过荧光定量PCR测定目的基因的mRNA的表达水平等方法分析优化表达的内在机制,以期更大程度地获得目的蛋白质,为TAT-SOD的产业化生产条件提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

-20 ℃低温长时间保存表达TAT-SOD菌株*Pichia pastoris* X33:福州大学生物工程研究所提供。

1.2 仪器设备与药品

高速离心机Avanti TMJ-251:日立公司;紫外分光光度计型号U-1900:日本HITACHI公司;蛋白质电泳仪：日本ATTO公司；恒温培养振荡器(ZHWY-200B):上海智城分析仪器有限公司;Yeast Extract和Tryptone:OXOID公司;盐酸羟胺、对氨基苯磺酸、甲萘胺、冰醋酸、甘油、葡萄糖等:均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；黄嘌呤氧化酶:Roche Diagnlstics公司。

1.3 培养基

种子液培养基YPD(组分g/L):酵母膏10,蛋白胨20,葡萄糖10;摇瓶诱导培养基(组分g/L):酵母

膏10,蛋白胨 20,葡萄糖 10。YPDM 培养基:体积分数 0.5%~3.0%甲醇;固体培养基在 YPD 培养基中加入质量分数 1.5%琼脂粉。

1.4 实验方法

1.4.1 菌种的活化及培养方法 菌种活化步骤是将菌株涂布在含有 Zeocin 的 YPD 固体培养基上活化,在 30 ℃条件生长 24~36 h,将平板上的单菌落平板划线或者在试管中斜面划线,在 30 ℃生长 24~36 h 后在 4 ℃冰箱保存。

摇瓶培养:4 ℃冰箱中取出保存菌株接种于 100 mL YPD 种子液培养基三角瓶中培养(装液量 25 mL),同时加入体积分数 0.1% Zeocin,培养至一定浓度以体积分数 1.0%转接于含有 0.1%Zeocin 的 YPDM 诱导培养基三角瓶,15 h 后用诱导剂甲醇进行诱导,甲醇诱导每 24 小时补加一次,诱导前后每 24 小时取样,共培养 135~159 h。摇瓶装液量为 100 mL(500 mL 三角瓶)[13],于 30 ℃转速 200 r/min 摇床培养。

1.4.2 比色分析法测定菌体浓度 使用比色法测定菌体浓度,以紫外分光光度计 600 nm 波长处的光密度值 OD_{600} 表示[14]。从斜面将接种体积分数 1.0%毕赤酵母于 25 mL YPD 培养基中摇瓶发酵培养,每隔 2 小时取样,测量样品菌体浓度 OD_{600} 值,直至数值趋于稳定为止。共持续 32 h,取样 16 次,以 OD_{600} 为纵坐标,时间为横坐标作种子液培养基生长曲线。将OD_{600} 为 15,摇瓶培养 20 h 的种子液按接种体积分数 1.0%接种于 YPD 诱导培养基中,确定诱导培养基生长曲线。每次试验都有一次重复试验,其中每批试验的各个梯度都做了 3 个平行。

1.4.3 超氧阴离子自由基清除法测定酶活及不同表达条件目的蛋白质 SDS-PAGE 分析 SOD 酶活测定:盐酸羟胺法测定[15]。通过黄嘌呤氧化酶对黄嘌呤的催化作用,可以产生超氧阴离子自由基,同时使盐酸羟胺氧化成亚硝酸盐,亚硝酸盐在对氨基苯磺酸与甲萘胺的共同作用下表现紫红色。采用紫外分光光度计测定了 530 nm 处的吸光度。当样品中含有抑制超氧阴离子自由基生成的组分时,样品中的亚硝酸盐含量降低。最后测量吸光值时,样品的氧化活性越高其吸光值就越低。因此,样品抗氧化活性可以用分光光度法测定。

样品酶活测定取离心发酵上清液(4 ℃、12 000 r/min,5 min);发酵液上清液的 SDS-PAGE 分析及目的蛋白质相对分子质量确定的具体步骤参照文献[15]。采用 SPSS 统计分析软件进行数据处理,每组重复 3 次,3 次测定结果的平均标准偏差不大于±10%。实验结果做 3 个平行,结果标准偏差±5%,否则不予使用。

1.4.4 目的蛋白质诱导表达测定 作者以 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达说明书为参考,先从平板上挑取重组菌株置于 YPD 种子液培养基中,30 ℃振荡培养 20 h 后,按 1.0%的接种体积分数转接至 100 mL 的 YPDM 诱导培养基中培养。加入体积分数 1.0%甲醇诱导,30 ℃摇瓶培养,每隔 24 小时取样并添加甲醇作为诱导剂,在诱导 4 d 后将发酵液收集,进一步离心后取上清液做 SDS-PAGE 实验。

1.4.5 TAT-SOD 基因的荧光定量 PCR 分析 采用 UNIQ-10 柱 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取表达菌株总 RNA,使用第一链 cDNA 合成试剂盒合成的 cDNA 进行定量 PCR 试验,试验方法按照试剂盒说明书进行。根据 TAT-SOD 基因序列设计定量 PCR 的引物 SOD-F2(5′-TCAACCCATTGTCCAGAAAGC-3′)和 SOD-R2(5′-GGTCACCAGACAAAGAGATAACAGA-3′)。定量 PCR 采用 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪,实验反应体系为:0.4 μL 的引物 F2(10 mmol/L),0.4 μL 的引物 R2(10 mmol/L),10 μL 的 SYBR Green qPCR Master Mix (2X),2 μL 模板 cDNA,,加无菌水至 20 μL。定量 PCR 扩增程序按照标准程序为:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 5 s;60 ℃退火加延伸 30 s;45 个循环,其中融解曲线的程序温度为 65~95 ℃。实验所用试剂为 SybrGreen SG Fast qPCRMaster Mix 购自 BBI 公司,相对表达量计算采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法。

2 结果与讨论

2.1 种子液的生长曲线

比色分析法测定菌体浓度从而制作生长曲线。从斜面将菌体接种于摇瓶培养后,每隔 2 小时取样测量菌体浓度,结果见图 1。从图 1 可知,种子液在摇瓶培养 18~22 h 之间,即 OD_{600} 在 10~21 范围内时,菌体生长处于指数期且浓度较高,比较合适接种到诱导培养基中。

2.2 菌株在 YPDM 诱导培养基的生长曲线

诱导时需要较强的菌体活力与一定菌体浓度,

因此将 OD_{600} 为 15，摇瓶培养 20 h 的 YPD 种子液按接种体积分数 1%接种于 YPDM 诱导培养基中，并每隔 2 小时 取样，使用比色分析法测定菌体浓度得到生长曲线。从图 2 可以看出，菌体在培养 10~16 h 为指数期，为得到一定菌体浓度与较高菌体活力，在培养 12~16 h（OD_{600} 为 5~17 范围内）时诱导较为合适。

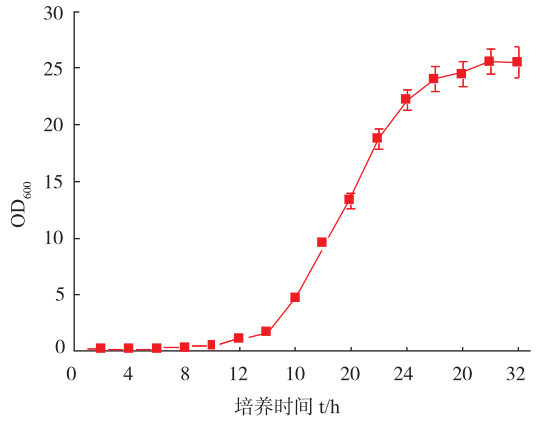


图 1　种子液的生长曲线

Fig. 1　Growth curve of seed broth

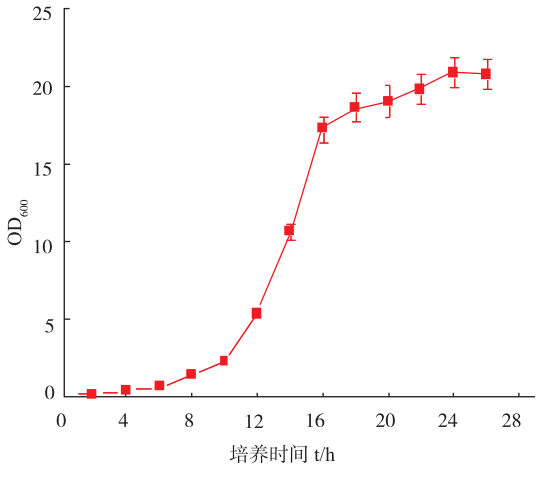
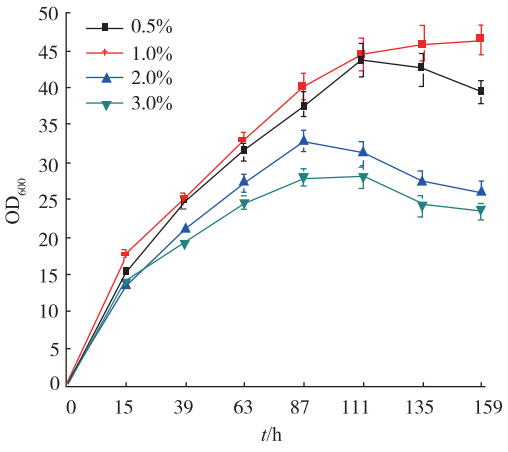


图 2　菌株在 YPDM 培养基的生长曲线

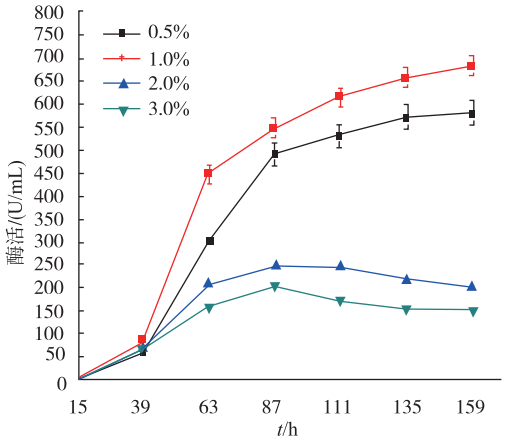
Fig. 2　Strains growth curve in YPDM medium

2.3　诱导剂体积分数对目的蛋白质表达水平的影响

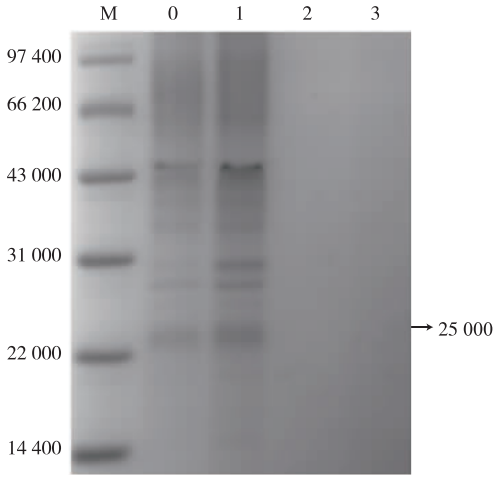
在 30 ℃摇床培养 15 h 后，每天加入不同体积分数的甲醇进行诱导。诱导剂体积分数分别为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%。诱导开始及随后的每 24 小时取样，测定样品菌体浓度和酶活，并进行上清液 SDS-PAGE 分析，结果见图 3。



(a)不同体积分数诱导剂的生长曲线



(b)不同体积分数诱导剂的酶活变化



M：蛋白质marker；0：体积分数0.5%；1：体积分数1.0%；2：体积分数2.0%；3：体积分数3.0%.

(c)不同体积分数诱导剂诱导表达的SDS-PAGE电泳图

图 3　不同体积分数诱导剂的生长曲线、酶活变化及 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3　Effect of different inducer concentration on cell growth, enzyme production and SDS-PAGE result

从图 3(a)和图 3(b)可看出,当诱导剂体积分数为 1.0%时,样品的菌体浓度达到最高,酶活达到最高。经 SPSS 软件分析,图 3(a)各梯度浓度菌体生长 159 h 时 F 值为 178.90,图 3(b)各梯度浓度酶活 159 h 时 F 值为 885.98,查表得 $F_{0.01(3,4)}$ =16.69,各组显著差异(P<0.05)。由此可见,诱导剂甲醇体积分数对菌体浓度和 SOD 酶活的影响显著。诱导剂的每天补加量大于体积分数 1.0%时,前期菌体生长和蛋白质表达差异不明显,但后期酵母可能因甲醇中毒导致生长和表达蛋白质受到抑制;每天补加量少于体积分数 1.0%时菌体生长较慢, 酶活也提高缓慢。因为毕赤酵母以诱导剂甲醇为其惟一碳源时,若甲醇体积分数过低将限制菌体生长。从图 3(b)可看出,每天补加体积分数 1.0%甲醇在诱导 111 h 后增加不明显。图 3(c)的 SDS-PAGE 结果也可以看出,试验中诱导剂体积分数为 1.0%时最佳,体积分数过低限制菌体生长,影响目的蛋白质的表达;在此体积分数以上目标蛋白质的表达逐渐下降,可能是由于毕赤酵母以甲醇为惟一碳源。其代谢产物甲醛和过氧化氢的积累对毕赤酵母有毒害作用[16],因此后续实验的诱导时间定为 111 h, 每日加入体积分数 1.0%甲醇进行诱导。

2.4 发酵初始 pH 值对目的蛋白质表达水平的影响

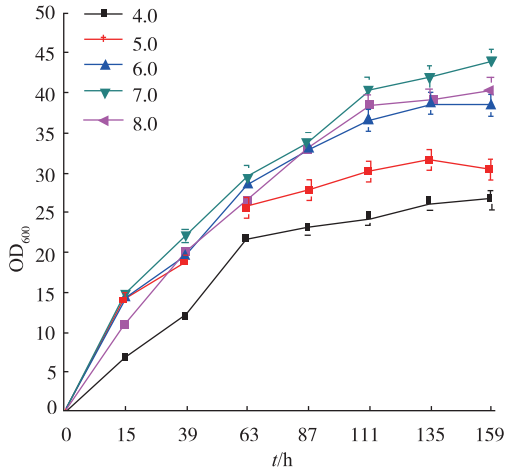
为了调整 YPDM 诱导培养基的 pH 值, 使用柠檬酸缓冲液和磷酸缓冲液将初始 pH 值分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。将酵母于 30 ℃摇床培养,在 15 h 后用体积分数 1.0%甲醇持续进行诱导 159 h,诱导前和诱导后每 24 小时取样测定样品, 培养基 pH 变化见表 1,最终菌体浓度、酶活和 SDS-PAGE 电泳图见图 4。

表 1 不同 pH 值培养基在培养前后 pH 值的变化

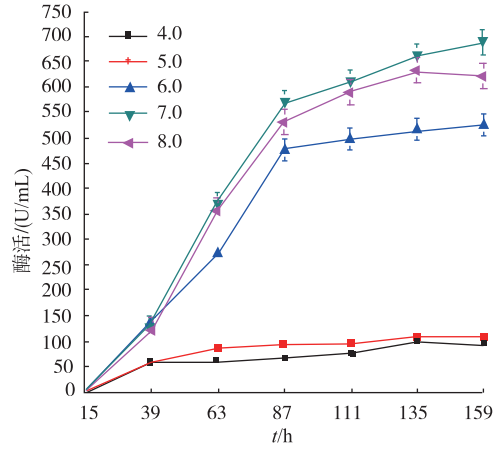
Table 1 The change of pH value in different pH medium before and after fermentation

初始 pH 值	最终 pH 值
4.00	3.86
5.00	4.85
6.00	5.66
7.00	6.59
8.00	7.45

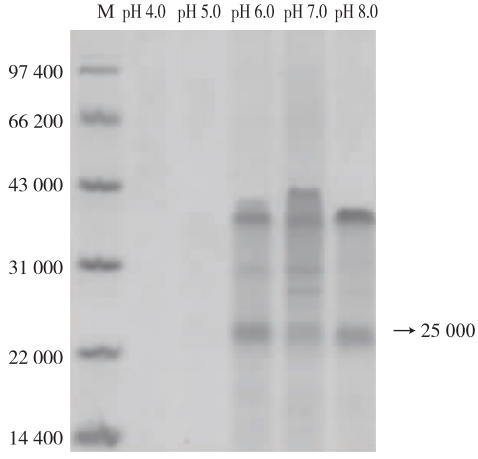
由表 1 可知, 使用缓冲溶液可以将 pH 值稳定在一定范围,说明实验结果有一定参考价值。各梯度初始 pH 值得到 159 h 酶活数据经 SPSS 软件分



(a)不同初始 pH 值的生长曲线



(b)不同初始 pH 值的酶活变化



M: 蛋白质marker.

(c)不同pH值诱导表达的SDS-PAGE电泳图

图 4 不同初始 pH 值的生长曲线、酶活变化及 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 Effect of different initial pH value on cell growth, enzyme production and SDS-PAGE result

析得 F 值为 946.64,查表 $F_{0.01(4,5)}$=11.39,各组差异显著(P<0.05)。这表示不同初始 pH 值对菌株酶活、目的蛋白质表达水平有较大影响。比较图 4(b)中各梯度初始 pH 所对应表达酶活,在初始 pH 值为 5.0 以下时酶活很低,pH 值为 7.0 时酶活最高。从图 4(a) 可以看出,初始 pH 值小于 5.0 时菌株可以生长但比较缓慢,在 pH 6.0~8.0 时生长较快,说明该菌株有较强的 pH 适应性。图 4(c)也说明目的蛋白质表达受不同初始 pH 影响明显,随着 pH 值的升高,电泳目的条带也逐渐增粗,pH 值达到 6.0~8.0 后,继续提高 pH 值对目的蛋白质表达水平影响不大,初始 pH 值达到 7.0 后蛋白质表达较好。综上可知,相比于菌体生长情况, 不同初始 pH 范围对酶活和蛋白质表达有较大影响,因此以 7.0 为最佳初始 pH 值。

2.5 诱导温度对目的蛋白质表达水平的影响

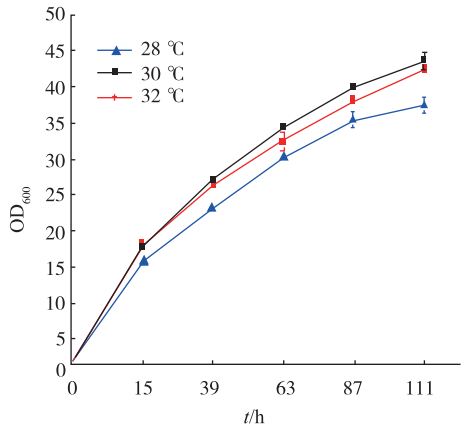
毕赤酵母通常在 30 ℃时利于外源蛋白质表达,当温度高于 32 ℃时,酵母的外源蛋白质表达受到较大影响。在上述优化条件基础上确定诱导温度,分别选取在 28、30、32 ℃共 3 个温度培养菌株,并使用体积分数 1%甲醇诱导 111 h,测定最终菌体浓度(OD_{600})和酶活,结果见图 5(a)和图 5(b),培养上清液蛋白质电泳图见 5(c)。

SPSS 软件结果显示,F =157.65,$F_{0.01(2,3)}$ =30.82,各组间差异有显着性(P<0.05),表明温度对目标蛋白质的表达有显著影响。当诱导温度为 30 ℃时,酶活性和目标蛋白质表达水平最高。

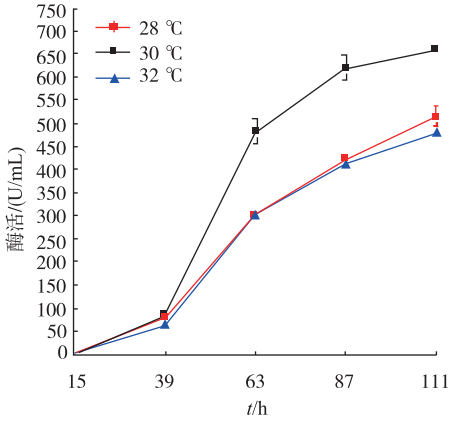
从图 5(a)可以看出,在试验的 3 个温度下,随着温度的升高,菌体生长加快,在 30 ℃和 32 ℃得到较高的菌体浓度,在 30 ℃菌体生长最好。从图 5(b)可以看出,在 30 ℃时,测得的酶活最高,在 32 ℃时酶活降低较多。图 5(c)电泳结果说明,30 ℃时菌体外源蛋白质表达最大。虽然毕赤酵母在 28~32 ℃时菌体均迅速生长,但低的诱导温度使菌体浓度和表达外源蛋白质不足,高温下外源蛋白质表达受到抑制。所以选取 30 ℃作为 TAT-SOD 表达菌株的生长温度和最佳诱导表达温度。

2.6 目的蛋白质诱导表达最终优化条件测定

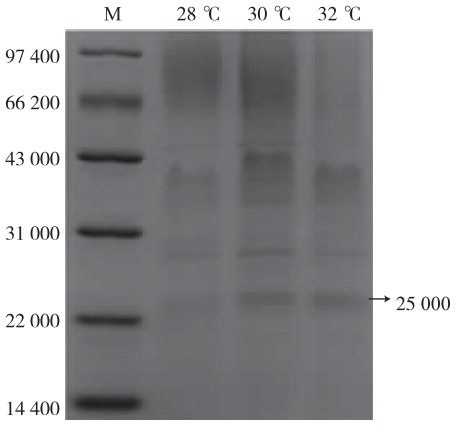
TAT-SOD 酵母菌株 X33 摇瓶试验得到菌体浓度和 SOD 酶活见图 6(a),上清液菌体样品 SDS-PAGE 见图 6(b)。确定发酵条件为:经过 20 h 摇瓶培养 OD_{600} 为 15 的 YPD 种子液按接种体积分数 1.0%接种到 YPDM 诱导培养基中,在优化摇瓶发酵条件下



(a)不同诱导温度的生长曲线



(b)不同诱导温度的酶活变化

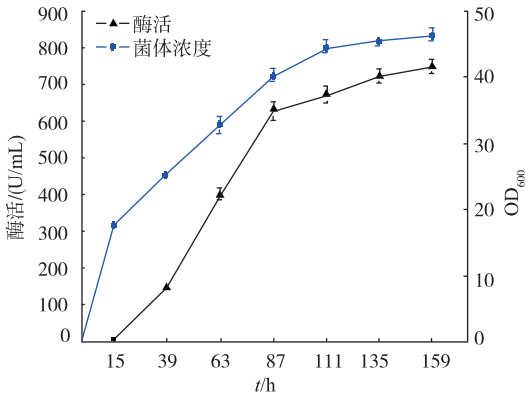


M:蛋白质marker.
(c)不同温度诱导表达的SDS-PAGE电泳图

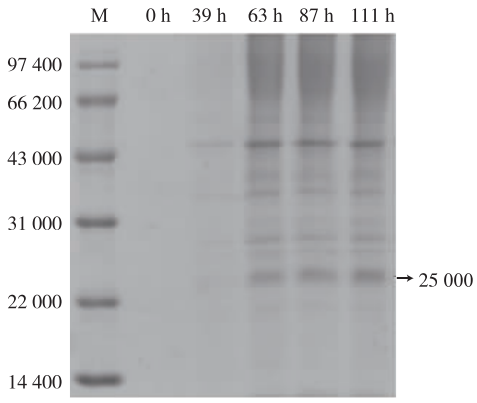
图 5 不同诱导温度的生长曲线、酶活变化及 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 Effect of different inducing temperature on cell growth, enzyme production and SDS -PAGE result

(培养 15 h 时诱导,诱导剂体积分数 1.0%,诱导温度 30 ℃,初始 pH 值为 7.0),诱导 159 h 后收样,发酵液上清液酶活水平为753 U/mL, 较初始提高 5.1倍。



(a)摇瓶发酵酶活和菌体生长曲线



(b)最终摇瓶样品SDS-PAGE电泳图

图 6 摇瓶发酵酶活、菌体生长曲线和样品 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 The enzyme production, cell growth and SDS-PAGE result of induced expression in shake flask fermentation

从图 6(a)可以看出,菌体生长随着酶活分泌同步增加。在 111 h 之后菌体生长与酶活变化不大,最终诱导 159 h 摇瓶上清液酶活为 753 U/mL。从图 6(b)的电泳图也可以清晰看到,电泳条带随诱导时间逐渐变粗,在诱导 87 h 后电泳条带不变,目的蛋白质表达提高不明显。因此该菌株最佳摇瓶诱导时间为 111 h,可以避免发酵后期染菌的风险。

2.7 pH 值对 TAT-SOD 基因的转录水平的影响分析

诱导培养基发酵培养酵母,研究随着不同初始 pH 变化 TAT-SOD 基因的表达规律。荧光定量 PCR 选择内参基因 *actin* 对目的基因相对定量的分析结果, 并 3 次重复实验得到 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值进行单因素方差分析。定量 PCR 结果显示,在不同 pH 值培养下菌株中 TAT-SOD 基因的诱导表达情况不相同。从图 7 可知,以菌株在 pH 4.0 时的样品作为对照组,pH 在 5.0 时表达 mRNA 与对照组的差别不显著。而 pH 为 6.0、7.0、8.0 时表达 mRNA 分别是对照组的 2.4 倍、3.5 倍和 3.1 倍, 各组跟对照组有显著差异 (P<0.05),经 SPSS 软件分析得 F 值为 657.32,查表 $F_{0.01(4,5)}$ =11.39。并认为有显著的组间差异,这说明不同 pH 环境对菌株的基因转录表达水平有显著影响。

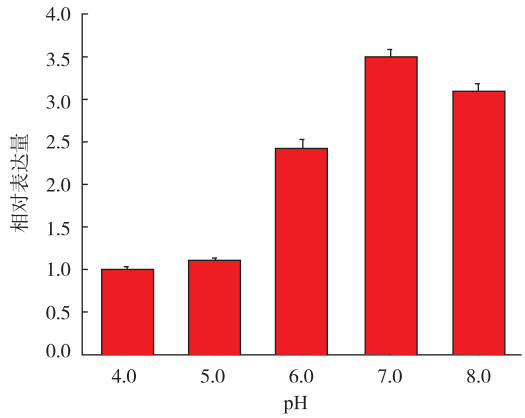


图 7 菌株在不同 pH 值培养下 TAT-SOD 基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of TAT-SOD in *Pichia pastoris* grown at different initial pH value

图 7 可以看出,X33 菌株在不同 pH 条件下,TAT-SOD 基因随着 pH 值的升高均有一定倍数的上调表达。其中在 pH 7 时上调表达的倍数最高,是对照组 pH 4.0 上调倍数的 3.5 倍。在 pH 8 下,基因的表达量比 pH 7 时略低。在对照组pH 4.0 中,TAT-SOD 基因的表达量要比其它组显著变低。而不同初始 pH 条件下基因表达趋势与最终得到的酶活趋势基本相符合。这表明除了菌体生长浓度影响目的蛋白质在发酵液中的表达水平, 不同 pH 下基因转录水平差异也较大地影响了菌株的 TAT-SOD 的表达程度。

3 结 语

作者采用经低温长时间保存的毕赤酵母表达菌株, 使含有 TAT-SOD 基因的菌株在优化摇瓶发

酵条件下成功地胞外分泌表达 TAT-SOD。分泌出目的蛋白质可以改善大分子蛋白质 SOD 细胞膜通透性[17],实现将外源 SOD 输送进入细胞内部协助相应的生命活动,清除胞内外自由基,增加超氧化物歧化酶 SOD 在临床上的使用范围。可能是诱导表达 TAT-SOD 可提高毕赤酵母的抗衰老能力,长期低温保存的毕赤酵母在保藏过程中没有出现退化现象,仍可保持较强的目的蛋白质表达能力。

毕赤酵母表达外源蛋白质的主要发酵条件包括诱导时间、甲醇体积分数、pH 值、培养温度等因素。优化摇瓶发酵条件,诱导剂体积分数 1.0%,诱导温度 30 ℃,YPDM 培养基,初始 pH 值为 7.0 条件下,发酵上清液酶活水平为 753 U/mL,未优化酶活水平为 148 U/mL,较未优化初始酶活提高 5.1 倍;初始 pH 值为 7.0 时表达水平提高 3.4 倍;后期经过 5 L 发酵罐发酵,最终得到 TAT-SOD 酶活达到 14 934 U/mL,是摇瓶水平的 19.8 倍,说明长期保藏的重组菌株仍适合表达。荧光定量 PCR 试验表明,在转录水平差异上,不同 pH 条件下目的蛋白质表达水平受到基因转录水平和菌体生长的双重影响,而且前者的影响强于后者。

研究发酵条件是提高外源蛋白质在毕赤酵母表达水平的重要手段。从本研究数据来看,TAT-SOD 的毕赤酵母表达菌株,经长时间保存后仍可保持较强的活力;而且诱导初始 pH 值对目的蛋白质的影响显著。这些结果为该菌株的工业生产提供更多数据,有助于降低生产成本,更大程度上获得目的蛋白质。

参考文献:

[1] KIM T S,JUNG Y H,NA B K,et al. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*[J]. **Infection and Immunity**,2000,68(7):3941-3948.

[2] ZELKO I N,MARIANI T J,FOLZ R J. Superoxide dismutase multigene family:a comparison of the CuZn-SOD (SOD1),Mn-SOD (SOD2),and EC-SOD (SOD3) gene structures,evolution,and expression[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2002,33(3):337-349.

[3] ASADA K,FOYER C H,MULLINEAUX P M. Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues[M]. CRC Press:Boca Raton FL,1994:77-104.

[4] 杜秀敏,殷文璇,张慧,等. 超氧化物歧化酶(SOD)研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(1):48-50.

[5] MCCORD J M,FRIDOVICH I. Superoxide Dismutase[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1969,244(22):6049-6055.

[6] VIVES E. Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems:“is the Trojan horse too wild to go only to Troy?”[J]. **Journal of Controlled Release**,2005,109(1-3):77-85.

[7] 赵辉,潘剑茹,刘树滔,等. TAT-SOD 融合蛋白的跨膜转导性质的研究[J]. 福州大学学报:自然科学版,2007,35(6):936-940.

[8] SREEKRISHNA K,BRANKAMP R G,KROPP K E,et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. **Gene**,1997,190(1):55-62.

[9] 陈莹,陈菁,刘树滔,等. PTD-SOD 融合蛋白的毕赤酵母表达载体的构建和表达[J]. 海峡药学,2007,19(7):10-12.

[10] 陈躬瑞,杨坤宝,郑屹峰,等. 重组 SOD 在毕赤酵母中表达的发酵工艺研究[J]. 福州大学学报:自然科学版,2013,41(6):1126-1130.

[11] 张海玲,刘超,程欲,等. 超氧化物歧化酶重组酵母的构建及其发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(9):918-921.

[12] 郑屹峰,孙金钰,巫启明,等. 人 Cu,Zn-SOD 在重组毕赤酵母中表达的发酵工艺研究[J]. 福州大学学报:自然科学版,2014,42(5):801-806.

[13] 陈龙军,陈济琛,林晓栩,等. 嗜热芽孢杆菌 CHB1 环糊精酶基因优化及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(9):994-999.

[14] 刘晓筱,张娟,陈坚,等. 葡萄糖氧化酶基因在解脂耶氏酵母中的表达及发酵优化[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(12):1233-1241.

[15] 杨志强,张晨,敖伟,等. 毕赤酵母表达重组人源 Cu/Zn SOD 的分离纯化与稳定性表征[J]. 中国食品学报,2011,11(5):108-113.

[16] 彭毅,杨希才,康良仪. 影响甲醇酵母中外源蛋白表达的因素[J]. 生物技术通报,2000,16(4):33-36.

[17] BRODIN P,LEBLEU B,VIVES E. A truncated hiv-1 tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1997,272(25):16010-16017.