

菌酶一体化重组酵母工程菌的设计与构建

Design and Construction of Recombinant Yeast with Surface-displayed Enzymes

王谦*, 王佳堃, 高德英

奶业科学研究所, 动物科学学院, 浙江大学, 杭州, 浙江

*通讯作者邮箱: emirate14@zju.edu.cn

摘要: 实验原理: 外源蛋白通过酿酒酵母 α 凝集素展示在细胞表面。 α 凝集素包含核心亚基 AGA1 及结合亚基 AGA2。AGA1 与酵母细胞壁 β -葡聚糖共价连接, 并通过两个二硫键与 AGA2 的 N 端共价相连。外源蛋白与 AGA2 的 C 端融合, 从而实现外源蛋白在酿酒酵母细胞的表面展示。实验目的: 通过 AGA1 和 AGA2 将外源蛋白固定在酵母细胞表面, 获得菌酶一体化的微生物细胞反应器。

关键词: α 凝集素, 外源蛋白, 表面展示, 酿酒酵母

材料与试剂

1. 盖玻片 (上海生工公司, catalog number: F518117)
2. 载玻片 (上海生工公司, catalog number: F518110)
3. FALCON 流式上样管 (BD, catalog number: 352003)
4. 离心管
5. 各种型号枪头
6. 酵母提取物 (BBI Life Sciences, catalog number: A610961)
7. 胰蛋白胨 (BBI Life Sciences, catalog number: A650217)
8. NaCl (BBI Life Sciences, catalog number: A610476)
9. 琼脂粉 Agar (上海生工公司, catalog number: A505255)
10. 琼脂糖 Agarose M (上海生工公司, catalog number: A610013)
11. pfu DNA 聚合酶 (上海生工公司, catalog number: B500014)
12. PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工公司, catalog number: B518141)
13. DNA Marker: GeneRuler™ 100 by Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™, catalog

- 31 number: SM0323)
- 32 14. 限制性核酸内切酶 (Thermo Scientific™, 中国)
- 33 15. Trelief™ SoSoo Cloning Kit (SoSoo, catalog number: TSV-S2)
- 34 16. Taq DNA 聚合酶 (上海生工公司, catalog number: B500010)
- 35 17. 质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit I (OMEGA, catalog number: D6943-02)
- 36 18. 酿酒酵母 EBY100 (杭州余杭紫耕生物科技服务部)
- 37 19. pYD1 质粒 (Invitrogen, catalog number: V835-01)
- 38 20. ProteinFind® Anti-V5 Mouse Monoclonal Antibody (TransGen Biotech, catalog
- 39 number: HT401-01)
- 40 21. FITC-conjugated Rabbit anti-mouse IgG (BBI Life Sciences, catalog number:
- 41 D110101)
- 42 22. 氨苄青霉素 ampicillin, Amp (BBI Life Sciences, catalog number: A610028)
- 43 23. D-(+)-葡萄糖 (BBI Life Sciences, catalog number: A610219)
- 44 24. D-(+)-半乳糖 galactose, Gal (BBI Life Sciences, catalog number: A600215)
- 45 25. 酪蛋白水解物 casaminoacid (BBI Life Sciences, catalog number: A603060)
- 46 26. 无氮基础培养基 yeast nitrogen base, without amino acids (上海生工公司, catalog
- 47 number: A610507)
- 48 27. L-亮氨酸 leucine, Leu (BBI Life Sciences, catalog number: A100811)
- 49 28. 醋酸锂粉末 (国药, catalog number: 30109760)
- 50 29. Tris (上海生工公司, catalog number: A610195)
- 51 30. PEG2000 (BBI Life Sciences, catalog number: A601785)
- 52 31. EDTA (BBI Life Sciences, catalog number: A610185)
- 53 32. LB (Luria-Bertani) 液体培养基 (见溶液配方)
- 54 33. 0.5 mol/L EDTA (见溶液配方)
- 55 34. 50× TAE (tris base-acetic acid-EDTA) 母液 (见溶液配方)
- 56 35. 1× PBS (phosphate-buffer-saline) 缓冲液 (pH 7.4) (见溶液配方)
- 57 36. 1 mol/L LiAc (见溶液配方)
- 58 37. 10 mg/mL Leu (见溶液配方)
- 59 38. 10× TE (Tris-EDTA) Buffer (见溶液配方)
- 60 39. 50% PEG2000 (见溶液配方)

40. TE/LiAc Buffer (见溶液配方)
41. 40% PEG2000 (见溶液配方)
42. 10× D (dextrose) (见溶液配方)
43. YNB (yeast nitrogen base, without amino acids) 缺陷培养基 (见溶液配方)
44. YNB-CAA (yeast nitrogen base-casamino acid) 培养基(见溶液配方)
45. YPD (yeast extract-peptone-dextrose) (见溶液配方)
46. 10× Gal (galactose) (见溶液配方)

仪器设备

1. PCR 仪 (Eppendorf, model: Mastercycler Pros)
2. 核酸电泳仪 (北京市六一仪器厂, model: DYY-12)
3. 凝胶成像仪 (Bio-Rad, Hercules, model: USAGel Doc™ EZ)
4. 空气恒温摇床 (宁波科技园区新江南仪器有限公司, model: KYC-100B)
5. 生化培养箱 (宁波东南仪器有限公司, model: LRH-50)
6. 紫外分光光度计 (上海美普达仪器有限公司, model: UV-3200)
7. 离心机 (Eppendorf, model: Centrifuge MiniSpin)
8. 荧光显微镜 (Lecia, model: DFC450 C)
9. 流式细胞仪 (BD, model: FACSVers)

实验步骤

一、重组 pYD1 表达载体的构建

1. PCR 扩增木聚糖基因 *orf6-un*

以目标基因为模板，分别用上游引物 Primer-F：5' ACGATAAGGTACCAGGATCCGATTTTTGTCAAACTGCC 3'和下游引物 Primer-R：5' CCCTCTAGACTCGAGCGCCCCCTCGATATAGAC 3'进行 PCR 扩增，PCR 反应体系 (表 1)^[1]。

表 1. PCR 反应体系

Table 1. PCR reaction mixture

10× PCR Buffer (with 15 mmol/L Mg ²⁺)	5 μl
dNTP (10 mmol/L each)	1 μl
Primer-F (10 μmol/L)	2 μl
Primer-R (10 μmol/L)	2 μl
Template	5~10 ng
Pfu DNA polymerase (5 U/μl)	1 μl
加 ddH ₂ O 至	50 μl

将 PCR 扩增产物与 6× DNA 上样缓冲液以 1:5 的比例混合均匀，取混合液 3 μl 上样于 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。设置电压为 120 V，进行约 30 min 电泳后，将凝胶置于凝胶成像系统，使用 Image Lab v.5.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 观察图像并拍照（图 1）。使用 PCR 产物纯化试剂盒，按照其说明书方法纯化回收 PCR 扩增产物。

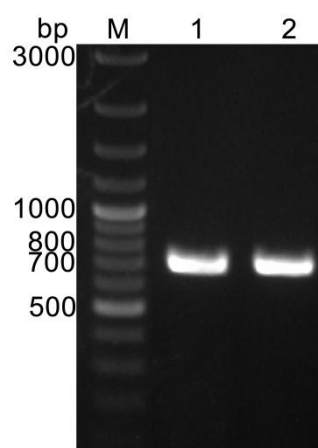


图 1 PCR 扩增 *orf6-un* 基因

Fig. 1 PCR amplification of *orf6-un* gene

泳道 1-2, *orf6-un* 基因; M, Marker

2. 双酶切目的基因和载体

使用限制性内切酶分别双酶切载体和基因，酶切体系（表 2），置于 37 °C 恒温培养 1-2 h，使用产物纯化试剂盒回收酶切产物。

表 2. 酶切体系

Table 2. Enzyme digestion reaction

基因/载体	1 µg
10× Buffer	5 µl
Enzyme I (10 U/µl)	1 µl
Enzyme II (10 U/µl)	1 µl
加 ddH ₂ O 至	50 µl

3. 目标基因与载体连接

利用同源重组的原理，通过 Trelief™ SoSoo Cloning Kit 同源重组试剂盒将目的基因定向克隆到线性化载体 pYD1 中，反应体系如表 3 所示。目标基因与表达载体摩尔比约为 5:1，50 °C 反应 30 min。

表 3. 同源重组体系

Table 3. Homologous recombination reaction

纯化回收后的 PCR 产物(120ng/µl)	3 µl
线性化载体(80ng/µl)	1 µl
2× SoSoo Mix	5 µl
灭菌 ddH ₂ O	1 µl
总计	10 µl

4. 重组质粒的转化

4.1 将 10 µl 连接产物与 50 µl 大肠杆菌 TOP10F'感受态细胞小心混匀后，冰浴 10~15 min；

4.2 将离心管置于 42 °C 水浴热激 60 s，立即取出冰浴 2~3 min；

4.3 向离心管中加入 500 µl 37 °C 预热的灭菌 LB 液体培养基 (不含抗生素)，混匀后置于 37 °C 摇床 150 rpm 恒温培养 45 min，使质粒上相关的抗性标记基因表达，菌体复苏；

4.4 吸取 100 µl 已转化后的细胞，涂布于具有抗性筛选的 LB 固体培养基中。将平板置于室温直至液体被吸收，倒置平板 37 °C 恒温培养 12~16 h；

4.5 挑取菌斑进行 PCR 鉴定，将筛选出的阳性转化子送公司测序。

二、酿酒酵母感受态制备

1. 挑取酿酒酵母 EBY100 单菌落于 5 ml 含 Amp 的 YPD 液体培养基，30 °C，200 rpm 培养过夜；
2. 取新鲜种子液 100 μ l 接种于含 10 ml YPD 液体培养基的摇瓶中，30 °C，200 rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6；
3. 4 °C，3,000 rpm，离心 5 min，回收菌体；
4. 倒去上清液，用 2 ml 灭菌 ddH₂O 反复洗涤两次，4 °C，3,000 rpm，离心 5 min；
5. 倒去上清液，用 1 ml 的 TE/LiAc buffer 重悬沉淀；
6. 倒去上清液，用 200 μ l 的 TE/LiAc buffer 重悬沉淀，每管分装 50 μ l，即为酵母感受态。

三、LiAc 转化法

1. 向 50 μ l 酵母感受态细胞中加入 5 μ l 重组质粒 (1~1.5 μ g)混合均匀，30 °C 保温 30 min，每间隔 10 min 混匀一次；
2. 每管加入 1 ml 40% PEG2000，重悬沉淀，30 °C 保温 1 h；
3. 42 °C 水浴中热激 15 min；
4. 4 °C，12,000 rpm，离心 1 min，去上清；
5. 每管加入 1 ml YPD 液体培养基，30 °C 保温 2 h；
6. 取转化产物 100 μ l 涂布于含亮氨酸的 YNB 固体缺陷培养基上，待液体被吸收将平板倒置，30 °C 培养 2~3 d。

四、支架蛋白的表面展示

1. 支架蛋白的表达

挑取单菌落于 5 ml YNB-CAA 液体培养基，30 °C 培养 12~24 h。按 5%的接种量将新鲜种子液接种于 50 ml YNB-CAA 液体培养基中，30 °C 恒温培养 12~24 h 至 OD₆₀₀ 为 1~1.5。3,500 rpm，4 °C 离心 5 min 收集菌体，使用灭菌 ddH₂O 清洗两

次。加入 75 ml YNB-CAA 液体培养基重悬菌体，并加入终浓度为 2% 的半乳糖，25 °C 诱导 48 h 后，取上清液和菌体用于后续分析。

2. 免疫荧光分析

将诱导后新鲜的酵母细胞（EBY100/*orf6-un*）稀释至 OD₆₀₀ = 0.5，设置 EBY100 为阴性对照。取酵母细胞体积 500 μl 加入 V₅ 标记的鼠抗 1 μl，16 °C 杂交 1 h，1× PBS 缓冲液反复清洗 5 次。加入 500 μl 的 1×PBS 缓冲液重悬沉淀，加入 2.5 μl FITC 标记的 IgG 兔抗鼠，16 °C 避光杂交 1 h，1× PBS 缓冲液反复清洗 5 次后。1 ml 1× PBS 缓冲液重悬沉淀，置于荧光显微镜下观察拍照（图 2）。

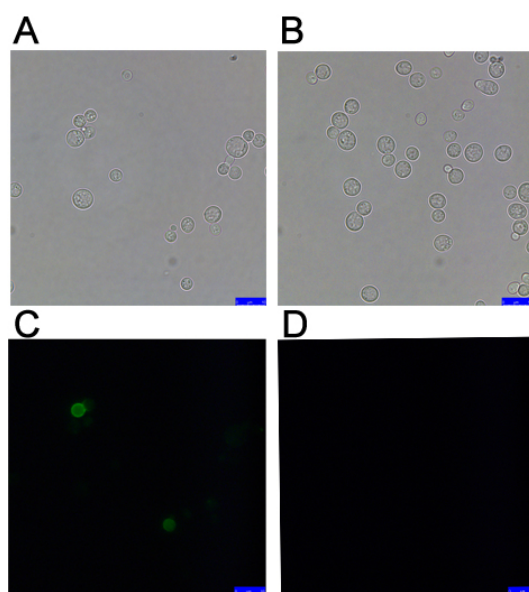


图 2 免疫荧光分析木聚糖酶 ORF6-UN 表面展示

Fig. 2 Immunofluorescence microscopy analysis of surface-displayed xylanase ORF6-UN

A, C: 表面展示细胞 EBY100/*orf6-un*; B, D: 阴性对照 EBY100

3. 流式细胞术分析

参照免疫荧光抗体杂交的方法进行抗体杂交，细胞终浓度控制在 $\sim 10^6$ cell/ml。取 300 μl 稀释好的带有 FITC 抗体的酵母细胞于流式上样管中，在激发波长 488 nm 及发射波长 535 nm 的条件下，分析荧光细胞的比例。同时设置 EBY100 为阴性对照^[2]。

溶液配方

- 173 1. LB 液体培养基
- 174 称取酵母提取物 (yeast extract) 2.5 g
- 175 胰蛋白胨 (tryptone) 5.0 g
- 176 NaCl 5.0 g
- 177 加 500 ml ddH₂O 溶解, 121 °C, 20 min
- 178 加入 2.0%的琼脂粉即为 LB 固体培养基
- 179 2. 0.5 mol/L EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)
- 180 称取 1.861 g EDTA·2H₂O 加入 8.0 ml ddH₂O, 用 NaOH 调 pH 至 8.0, ddH₂O 定
- 181 容至 10 ml
- 182 3. 50× TAE (tris base-acetic acid-EDTA) 母液
- 183 称取 Tris 242.0 g
- 184 冰醋酸 57.1 ml
- 185 0.05 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 ml
- 186 加 ddH₂O 至 1,000 ml, 将其稀释至 1×为工作液
- 187 4. 1× PBS 缓冲液 (pH 7.4)
- 188 称取 NaCl 8.0 g
- 189 KCl 0.2 g
- 190 Na₂HPO₄ 1.42 g
- 191 KH₂PO₄ 0.27 g
- 192 加 800 ml ddH₂O 溶解, 调 pH 至 7.4, 定容至 1,000 ml
- 193 5. 1 mol/L LiAc
- 194 称取 10.2 g 醋酸锂粉末, 溶于 80 ml ddH₂O, 定容至 100 ml, 121 °C, 20 min,
- 195 4 °C 保存
- 196 6. 10 mg/mL Leu
- 197 称取 1.0 g 亮氨酸粉末, 溶于 10 ml 灭菌 ddH₂O 中, 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 分装
- 198 至 1.5 ml 离心管, -20 °C 保存
- 199 7. 10× TE Buffer
- 200 100 ml 1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0), 200 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 加 ddH₂O
- 201 定容至 100 ml, 121 °C, 20 min, 4 °C 保存
- 202 8. 50% PEG2000

称取 50 g PEG2000 粉末，溶于 80 ml ddH₂O，待粉末彻底溶解，定容至 100 ml，121 °C，20 min，4 °C 保存

9. TE/LiAc Buffer

1 ml 10× TE Buffer，1 ml 1 mol/L LiAc，加 ddH₂O 定容至 10 ml，4 °C 保存

10. 40% PEG2000

10×TE Buffer 和 1 mol/L LiAc 各 1 ml 与 8 ml 50%的 PEG2000 混合均匀，4 °C 保存

11. 10× D

称取 20.0 g D-葡萄糖，加 ddH₂O 溶解并定容至 100 ml，121 °C，20 min，室温放置

12. YNB 缺陷培养基

称取 0.67 g YNB 溶于 90 ml ddH₂O，121 °C，20 min

加 10 ml 10× D，1 ml 10 mg/ml Leu，4 °C 保存

在液体培养基中加入 2.0%琼脂即为 YNB 固体缺陷培养基

13. YNB-CAA 培养基

称取 0.67 g YNB 和 0.5 g CAA，加 ddH₂O 至 90 ml，121 °C，20 min，4 °C 保存

14. YPD (yeast extract peptone dextrose)

称取酵母膏 0.5 g，蛋白胨 1 g，加 ddH₂O 至 45 ml，121 °C，20 min

加 5 ml 灭菌的 10× D，4 °C 保存

15. 10× Gal

称取 20.0 g D-半乳糖溶于 100 ml ddH₂O，121 °C，20 min，室温保存

致谢

国家重点研发计划重点专项子课题“农副产品利用与饲料资源开发技术集成与应用”(2018YFD0501903)

参考文献

1. Wang, J. K. He, B. Du, W. et al. (2015). [Yeast with surface displayed xylanase as a new dual purpose delivery vehicle of xylanase and yeast](#). *Anim Feed Sci Technol*, 208: 44-52.
2. Boder, E. T. and Wittrup, K. D. (1997). [Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries](#). *Nat Biotechnol* 15(6): 553-557.