**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](mailto: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: GeneRulerTM 100 by Plus DNA Ladder (Thermo ScientificTM, catalog number: SM0323)
14. 限制性核酸内切酶 (Thermo ScientificTM, 中国)
15. TreliefTM SoSoo Cloning Kit (SoSoo, catalog number: TSV-S2)
16. Taq DNA聚合酶 (上海生工公司, catalog number: B500010)
17. 质粒提取试剂盒Plasmid Mini Kit I (OMEGA, catalog number: D6943-02)
18. 酿酒酵母EBY100 (杭州余杭紫耕生物科技服务部)
19. pYD1质粒 (Invitrogen, catalog number: V835-01)
20. ProteinFind® Anti-V5 Mouse Monoclonal Antibody (TransGen Biotech, catalog number: HT401-01)
21. FITC-conjugated Rabbit anti-mouse IgG (BBI Life Sciences, catalog number: D110101)
22. 氨苄青霉素ampicillin，Amp (BBI Life Sciences, catalog number: A610028)
23. D-(+)-葡萄糖 (BBI Life Sciences, catalog number: A610219)
24. D-(+)-半乳糖galactose，Gal (BBI Life Sciences, catalog number: A600215)
25. 酪蛋白水解物casaminoacid (BBI Life Sciences, catalog number: A603060)
26. 无氮基础培养基yeast nitrogen base, without amino acids (上海生工公司, catalog number: A610507)
27. L-亮氨酸leucine，Leu (BBI Life Sciences, catalog number: A100811)
28. 醋酸锂粉末 (国药, catalog number: 30109760)
29. Tris (上海生工公司, catalog number: A610195)
30. PEG2000 (BBI Life Sciences, catalog number: A601785)
31. EDTA (BBI Life Sciences, catalog number: A610185)
32. LB (Luria-Bertani) 液体培养基 (见溶液配方)
33. 0.5 mol/L EDTA (见溶液配方)
34. 50× TAE (tris base-acetic acid-EDTA) 母液 (见溶液配方)
35. 1× PBS (phosphate-buffer-saline) 缓冲液 (pH 7.4) (见溶液配方)
36. 1 mol/L LiAc (见溶液配方)
37. 10 mg/mL Leu (见溶液配方)
38. 10× TE (Tris-EDTA) Buffer (见溶液配方)
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 DocTM 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: FACSVerse)

**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*

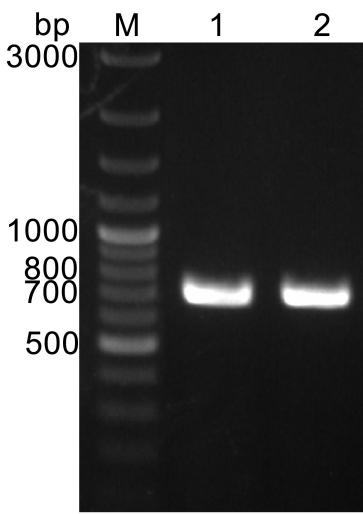
以目标基因为模板，分别用上游引物Primer-F：5' ACGATAAGGTACCAGGATCCGATTTTTGTCAAACTGCC 3'和下游引物Primer-R：5' CCCTCTAGACTCGAGCGCCCCCTCGATATAGAC 3'进行PCR扩增，PCR反应体系 (表1)[1]。

**表1. PCR反应体系**

**Table 1. PCR reaction mixture**

|  |  |
| --- | --- |
| 10× PCR Buffer (with 15 mmol/L Mg2+) | 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ddH2O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**

* 1. 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ddH2O至 | 50 μl |

* 1. 目标基因与载体连接

利用同源重组的原理，通过TreliefTM 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ddH2O | 1 μl |
| 总计 | 10 μl |

* 1. 重组质粒的转化
  2. 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；
  3. 将离心管置于42 °C水浴热激60 s，立即取出冰浴2~3 min；
  4. 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；
  5. 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；
  6. 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 μl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 μl的TE/LiAc buffer重悬沉淀，每管分装50 μl，即为酵母感受态。

三、LiAc转化法

1. 向50 μl酵母感受态细胞中加入5 μl重组质粒 (1~1.5 μg)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 μl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。

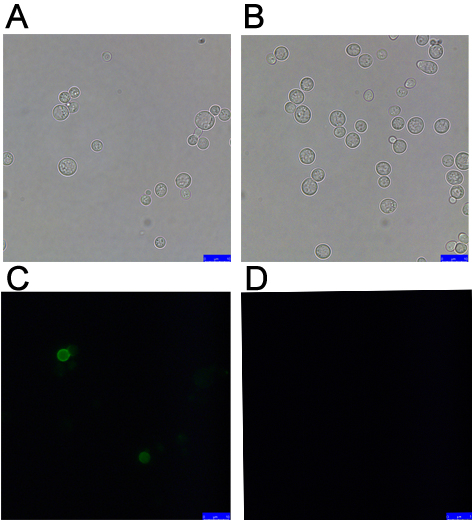
四、支架蛋白的表面展示

* 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。

* 1. 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**

* 1. 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~106 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**

1. LB液体培养基

称取酵母提取物 (yeast extract) 2.5 g

胰蛋白胨 (tryptone) 5.0 g

NaCl 5.0 g

加500 ml ddH2O溶解，121 °C，20 min

加入2.0%的琼脂粉即为LB固体培养基

1. 0.5 mol/L EDTA (ethylene diaminete traacetic acid)

称取1.861 g EDTA·2H2O加入8.0 ml ddH2O，用NaOH调pH至8.0，ddH2O定容至10 ml

1. 50× TAE (tris base-acetic acid-EDTA) 母液

称取Tris 242.0 g

冰醋酸57.1 ml

0.05 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 ml

加ddH2O至1,000 ml，将其稀释至1×为工作液

1. 1× PBS缓冲液 (pH 7.4)

称取NaCl 8.0 g

KCl 0.2 g

Na2HPO4 1.42 g

KH2PO4 0.27 g

加800 ml ddH2O溶解，调pH至7.4，定容至1,000 ml

1. 1 mol/L LiAc

称取10.2 g醋酸锂粉末，溶于80 ml ddH2O，定容至100 ml，121 °C，20 min，4 °C保存

1. 10 mg/mL Leu

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，分装至1.5 ml离心管，-20 °C保存

1. 10× TE Buffer

100 ml 1 mol/L的Tris-HCl (pH 8.0)，200 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)，加ddH2O定容至100 ml，121 °C，20 min，4 °C保存

1. 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

1. 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

1. 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

1. 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

1. 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

1. 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

1. 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

1. 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**

 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](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840115002308). *Anim Feed Sci Technol*, 208: 44-52.

Boder, E. T. and Wittrup, K. D. (1997). [Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9181578) *Nat Biotechnol* 15(6): 553-557.