



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117264791 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202310264215.3
(22) 申请日 2023.03.19
(83) 生物保藏信息
CGMCC No.10621 2015.03.13
CGMCC NO.26724 2023.03.03
(71) 申请人 复旦大学
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号
(72) 发明人 吕红 周峻岗 余垚 任海燕
(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
31200
专利代理师 陆飞 陆尤
(51) Int. Cl.
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/805 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

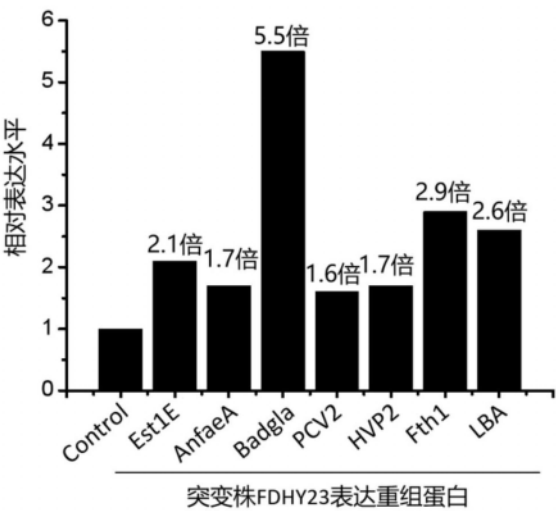
权利要求书2页 说明书12页
序列表（电子公布） 附图3页

(54) 发明名称

高效表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域，具体为一种高效重组表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株及其应用。本发明提供的马克斯克鲁维酵母工程菌株，是以马克斯克鲁维酵母FIM1作为出发菌株，在FIM1的染色体上添加16个loxPsym位点，通过Cre重组酶处理，然后在46℃高温高压下进行筛选获得突变菌株，记为FDHY23；该突变菌株至少携带腺苷酸环化酶基因的突变。该突变菌株FDHY23可重组表达不同外源蛋白，表达水平提高了1.6~5.5倍，在高温下依然具有表达外源蛋白的能力。



1. 一种高效表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株,其特征在于,是以保藏编号为CGMCC No.10621的马克斯克鲁维酵母FIM1作为出发菌株,利用基因组编辑技术删除马克斯克鲁维酵母FIM1基因组上的基因URA3;利用基因编辑技术,在该ura3缺陷菌株的8条染色体上,分别选择2个位点整合loxPsym序列,获得菌株,命名为LHP1044,该菌株的染色体上包含16个loxPsym序列;将Cre重组酶基因连接到载体上,获得重组质粒LHZ893,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;用酵母醋酸锂转化方法,将重组质粒LHZ893转化菌株LHP1044后,在46℃高温压力下筛选获得具有明显生长优势的突变菌株,命名为FDHY23,保藏号CGMCCNo.26724,保藏日期:2023.3.3。

2. 根据权利要求1所述的高效表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株,其特征在于,所述16个loxPsym序列在染色体上整合的具体位置为:1号染色体的80654bp和297580bp,2号染色体的706654bp和885427bp,3号染色体的327216bp和1226714bp,4号染色体的715829bp和1172907bp,5号染色体的340152bp和746775bp,6号染色体的130814bp和446862bp,7号染色体的392737bp和674407bp,8号染色体的435906bp和606918bp;所述的马克斯克鲁维酵母FIM1的参考基因版本号为GCA_001854445.2。

3. 根据权利要求1所述的马克斯克鲁维酵母工程菌株,其特征在于,所述菌株FDHY23携带94处突变,其中有38个是SNP,56个是InDel,具体突变情况如表1所示。

4. 根据权利要求1所述的马克斯克鲁维酵母工程菌株,其特征在于,所述的突变菌株至少携带腺苷酸环化酶基因的突变。

5. 根据权利要求4所述的马克斯克鲁维酵母工程菌株,其特征在于,所述菌株FDHY23的腺苷酸环化酶基因CYR1基因相对于菌株LHP1044的CYR1基因突变,至少包含突变点:第1546位的氨基酸由天冬酰胺(N)变成赖氨酸(K)。

6. 一种提高菌株耐温性和蛋白表达水平的CYR1基因的突变。

7. 如权利要求1-6之一所述的马克斯克鲁维酵母工程菌株及CYR1基因突变在高效表达外源蛋白中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述外源蛋白为阿魏酸酯酶、糖化酶、猪圆环病毒样颗粒蛋白、传染性法氏囊病毒样颗粒蛋白、铁蛋白或豆血红蛋白。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:

利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到牦牛牛胃来源的阿魏酸酯酶的编码基因Est1E和PUKDN132载体连接构建重组表达质粒PUKDN132-Est1E,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达牦牛牛胃来源的阿魏酸酯酶的工程菌株FDHY23-Est1E;

利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到的黑曲霉来源的阿魏酸酯酶的编码基因AnfaeA和PUKDN132载体连接构建重组表达质粒PUKDN132-AnfaeA,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达黑曲霉来源的阿魏酸酯酶的工程菌株FDHY23-AnfaeA;

利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到的食腺嘌呤芽生葡萄孢酵母来源的糖化酶的编码基因Badg1a和PUKDN132载体连接构建重组表达质粒PUKDN132-Badg1a,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达食腺嘌呤芽生葡萄孢酵母来源的糖化酶的工程菌株FDHY23-Badg1a;

利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到的GenBank号为ABV21950.1的猪圆环病毒衣壳蛋白的编码基因PCV2和PUKDN115载体连接构建成重组表达质粒PUKDN132-PCV2,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达猪圆环病毒样颗粒蛋白的工程菌株FDHY23-PCV2;

利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到的GenBank号为OK167034的法氏囊病毒衣壳蛋白基因HVP2的编码基因和PUKDN115载体连接构建成重组表达质粒PUKDN132-HVP2,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达法氏囊病毒衣壳蛋白的工程菌株FDHY23-HVP2;

利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到的GenBank号为NP_002023.2的铁蛋白的编码基因FTH1和PUKDN115载体连接构建成重组表达质粒PUKDN132-Fth1,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达铁蛋白的工程菌株FDHY23-Fth1;

或者,利用同源重组一步法连接的方法将PCR扩增得到的NCBI参考序列编号为NP_001235928.1的豆血红蛋白基因LBA的编码基因和PUKDN115载体连接构建成重组表达质粒PUKDN132-LBA,用醋酸锂转化的方法将重组表达质粒转化到菌株FDHY23,获得高效重组表达血红蛋白的工程菌株FDHY23-LBA。

高效表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种高效重组表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株及其应用。

背景技术

[0002] 遗传突变是提高宿主菌株重组表达外源蛋白能力的重要手段。遗传突变有多种方法,包括物理化学诱变(Liu Y et al.Microb Cell Fact.2018 Sep 14;17(1):144.)、适应性进化(Huang CJ et al.Mol Biol Evol.2018 Aug 1;35(8):1823-1839.)、基因组重组(Wu L et al.Front Bioeng Biotechnol.2022 Jan 11;9:799756.)和染色体重排(Gowers GF et al.Nat Commun.2020 Feb 13;11(1):868.)等。Cre-loxP系统是一种基因组特定位点的DNA重组技术,由P1噬菌体来源的Cre重组酶和34bp的loxP序列两部分组成。通过在基因组DNA上引入loxP位点,原始的34bp的loxP序列是有方向性的,Cre重组酶根据两个loxP序列的方向性可以实现在特定位点上删除、插入、重复、倒置和易位,造成基因组DNA的遗传改变(Sternberg N et al.J Mol Biol.1981Aug 25;150(4):467-86.)。loxPsym序列是loxP序列的变体,是完全对称回文的一段34bp序列,没有方向性(Hoess RH et al.Nucleic Acids Res.1986Mar 11;14(5):2287-300.)。将loxPsym序列引入基因组,在Cre重组酶的作用下,重排类型具有随机性,可以产生更多的染色体变化类型。在利用这些遗传突变方法的时候往往会产生大量的突变菌株,从中快速筛选获得高产菌株,一直都是难题。传统的筛选方法有酶活测定、荧光筛选等。这些方法操作复杂,耗时长,且需要很多人力。

[0003] 外源蛋白在宿主细胞中的重组高表达往往会引起宿主细胞的内质网应激和氧化应激,提高宿主细胞对氧化应激的耐受性是外源蛋白高产的一个关键(Raschmanová H et al.Appl Microbiol Biotechnol.2021 Jun;105(11):4397-4414.Chen X et al.Metab Eng.2022 Jul;72:311-324.)。高温等压力环境也会引起细胞内的一系列应激反应,利用高温作为筛选压力,细胞为了生存,需要获得应对这些应激的能力,提高耐受性的菌株也具备了外源蛋白高产的潜力。通过温度压力进行筛选,筛选方法具有操作简单,筛选量大,耗时间短等优势。

[0004] 马克斯克鲁维酵母FIM1是食品安全级的宿主菌,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.10621。马克斯克鲁维酵母FIM1具有很好工业应用潜力,特别是外源蛋白高产的马克斯克鲁维酵母工程菌株,是工业生产应用的核心技术。外源蛋白重组表达的水平受到宿主马克斯克鲁维酵母遗传突变的影响,不同的突变会产生不同的效果,影响了马克斯克鲁维酵母的重组表达外源蛋白的能力。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种高效表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株及其应用。

[0006] 本发明首先提供一种高效表达外源蛋白的马克斯克鲁维酵母工程菌株。该菌株是

以保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心、保藏编号为CGMCC No.10621,保藏日期为2015.3.13的马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)FIM1作为出发菌株,在FIM1的染色体上添加16个loxPsym位点,通过Cre重组酶处理,然后在46℃高温压力下进行筛选获得突变菌株,记为FDHY23;

[0007] 具体地,利用常规的基因组编辑技术删除FIM1基因组上的基因URA3;在该URA3缺陷菌株中,利用常规的基因编辑技术,在马克斯克鲁维酵母8条染色体上,分别选择2个位点整合loxPsym序列,获得的菌株命名为LHP1044,该菌株的染色体上包含了16个loxPsym序列;利用常规的基因克隆技术,将Cre重组酶基因连接到载体pFA6a-PanARS-PLAC4(-1000)-KANMX6上,获得重组质粒LHZ893(SEQ ID No.1);用酵母常规的醋酸锂转化方法,将重组质粒LHZ893转化到LHP1044,在46℃高温压力下培养、筛选具有明显的生长优势的突变菌株,该菌株命名为FDHY23。

[0008] 本发明所述的马克斯克鲁维酵母FDHY23突变株,具有明显高温生长优势。

[0009] 本发明所述的马克斯克鲁维酵母FDHY23突变株,携带了94处突变,其中有38个是SNP,56个是InDel,具体突变情况如表1所示。

[0010] 本发明所述的马克斯克鲁维酵母FDHY23突变株,至少携带腺苷酸环化酶基因的突变。

[0011] 本发明所述的马克斯克鲁维酵母FDHY23突变株,CYR1基因突变,至少包含但不限于如下的点突变,即第1546位的氨基酸由天冬酰胺(N)变成了赖氨酸(K)。

[0012] 本发明所述的腺苷酸环化酶基因CYR1的突变能提高蛋白重组表达量和高温耐受性。

[0013] 本发明所述的马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)突变株FDHY23,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号CGMCC No.26724,保藏日期:2023.3.3。

[0014] 本发明构建的上述马克斯克鲁维酵母工程菌株FDHY23可用于高效表达外源蛋白。

[0015] 实验表明,马克斯克鲁维酵母FDHY23重组表达不同外源蛋白,表达水平提高了1.6~5.5倍,在高温下依然具有表达外源蛋白的能力。

[0016] 所述外源蛋白具体包括但不限于:阿魏酸酯酶(牦牛牛胃来源)、阿魏酸酯酶(黑曲霉来源),糖化酶(食腺嘌呤芽生葡萄孢酵母来源),猪圆环病毒样颗粒蛋白,传染性法氏囊病毒样颗粒蛋白,铁蛋白,豆血红蛋白。

附图说明

[0017] 图1马克斯克鲁维酵母耐高温突变株的筛选。其中,(a)24个Cre酶处理后的突变株在46℃下的生长比较。(b)突变株FDHY23和出发菌株LHP1044温度耐受性比较。

[0018] 图2马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23在不同温度下生长能力的分析。其中,(a)菌株FDHY23和菌株LHP1044在30℃、46℃和47℃下生长的最大生物量(OD_{600})。(b)菌株FDHY23和菌株LHP1044在30℃、46℃和47℃下的最大生长速率。

[0019] 图3马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23重组表达不同重组蛋白的相对表达水平。工程菌株摇瓶发酵72h后取样进行酶活测定或SDS-PAGE分析,灰度扫描SDS-PAGE蛋白条带进行蛋白相对定量分析,其中Control是出发菌株LHP1044表达不同重组蛋白的酶活或灰度扫

描值,并将其定义为1。EstE1:工程菌株FDHY23-Est1E相比LHP1044-Est1E摇瓶发酵上清的阿魏酸酯酶(牦牛牛胃来源)相对酶活。AnfaeA:工程菌株FDHY23-AnfaeA相比LHP1044-AnfaeA摇瓶发酵上清的阿魏酸酯酶(黑曲霉来源)相对酶活。Badgla:工程菌株FDHY23-Badgla相比LHP1044-Badgla摇瓶发酵上清的糖化酶相对酶活。PCV2:工程菌株FDHY23-PCV2相比LHP1044-PCV2摇瓶发酵重组表达猪圆环病毒样颗粒蛋白的相对表达水平(灰度扫描)。HVP2:工程菌株FDHY23-HVP2相比LHP1044-HVP2摇瓶发酵重组表达传染性法氏囊病毒样颗粒蛋白的相对表达水平(灰度扫描)。Fth1:工程菌株FDHY23-Fth1相比LHP1044-Fth1摇瓶发酵重组表达铁蛋白的相对表达水平(灰度扫描)。LBA:工程菌株FDHY23-LBA相比LHP1044-LBA摇瓶发酵重组表达血红蛋白的相对表达水平(灰度扫描)。

[0020] 图4出发菌株LHP1044和突变株FDHY23在高温46℃下重组表达血红蛋白的对比。高温46℃下,工程菌株FDHY23-LBA和LHP1044-LBA摇瓶发酵至不同时间点(24h,36h,48h,60h和72h)的蛋白表达水平SDS-PAGE分析。

[0021] 图5突变株FDHY23的腺苷酸环化酶基因CYR1相对于菌株LHP10444发生突变部分的序列比较。

[0022] 图6腺苷酸环化酶基因CYR1点突变提高了温度耐受性和重组蛋白表达量。LHP1044是出发菌株,FDHY23是通过筛选获得的突变菌株,LHP1044-CYR1^{N1546K}是利用基因组编辑技术将LHP1044的基因CYR1在1546位上的氨基酸由N替换为K,FDHY23-CYR1是利用基因组编辑技术将突变株FDHY23中的CYR1^{N1546K}的突变回复为野生型CYR1。其中,(a)点突变CYR1^{N1546K}对温度耐受性的影响。(b.)点突变CYR1^{N1546K}对重组表达蛋白的影响。左图:重组表达LBA蛋白的工程菌株LHP1044-LBA、LHP1044-CYR1^{N1546K}-LBA摇瓶发酵72h,用SDS-PAGE分析蛋白表达量,LHP1044发酵作为空白对照。右图:灰度扫描左图的SDS-PAGE的LBA蛋白条带,进行相对定量分析。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0024] 实施例1

[0025] 马克斯克鲁维酵母耐高温突变株的筛选

[0026] 以保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心、保藏编号为CGMCCNo.10621的菌株FIM1作为出发菌株,FIM1的参考基因组的版本号为GCA_001854445.2。利用常规的基因组编辑技术删除基因组上的基因URA3。在该URA3缺陷菌株中,利用常规的基因编辑技术,在马克斯克鲁维酵母8条染色体上,每条染色体上分别选择2个位点整合loxPsym序列,一共整合了16个loxPsym序列,获得的菌株命名为LHP1044。16个loxPsym序列在染色体上整合的具体位置为:1号染色体的80654bp和297580bp,2号染色体的706654bp和885427bp,3号染色体的327216bp和1226714bp,4号染色体的715829bp和1172907bp,5号染色体的340152bp和746775bp,6号染色体的130814bp和446862bp,7号染色体的392737bp和674407bp,8号染色体的435906bp和606918bp。利用常规的基因克隆技术,将Cre重组酶基因连接到载体pFA6a-PanARS-PLAC4(-1000)-KANMX6上,获得重组质粒LHZ893(SEQ ID No.1)。用酵母常规的醋酸锂转化方法,将重组质粒LHZ893转化到LHP1044,

涂布SD平板,在30℃静置培养2~3天。收集转化子,混合之后转接到YPD液体培养基中30℃培养10~15h,稀释至合适梯度涂布YPD固体平板,放置于46℃培养箱中培养,挑选出有生长优势的24个克隆(图1a)。将这24个克隆接种到96深孔板,30℃下培养4h之后利用钉板打点到YPD固体平板,在46℃培养条件下,24个克隆中23号克隆具有明显的生长优势(图1a),该菌株命名为FDHY23。对该菌株进行温度耐受性测试,菌株FDHY23在46℃、47℃和48℃下,相对于出发菌株LHP1044,对温度的耐受性都有提高(图1b)。

[0027] 实施例2

[0028] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23在高温下比出发菌株LHP1044的生长更优

[0029] 突变株FDHY23和出发菌株LHP1044分别接种于3mL YPD液体培养基中,30℃培养过夜,然后以0.1的初始OD₆₀₀转接到50mL YPD培养基中,分别在30℃、46℃和47℃下每隔6h或者12h取样测细胞密度OD₆₀₀值,取样到72小时,细胞已经进入衰亡期。对比FDHY23和LHP1044的生物量和最大生长速率。结果显示,在30℃下,菌株FDHY23和LHP1044在增长期的生长速率、生物量没有显著性差异(图2)。在46℃、47℃高温条件下,菌株FDHY23的最大生长速率明显高于出发菌株LHP1044(图2),表明突变菌株FDHY23在高温下的生长能力优于出发菌株,即FDHY23在高温条件下可以快速生长。

[0030] 实施例3

[0031] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了阿魏酸酯酶(牦牛牛胃来源)的表达量

[0032] 利用常规的分子克隆技术,将牦牛牛胃来源的阿魏酸酯酶(GenBank:AXK50449.1)的编码基因Est1E克隆到表达质粒PUKDN132上,获得重组表达质粒PUKDN132-Est1E,再分别转化到菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达阿魏酸酯酶(牦牛牛胃来源)的工程菌株,分别命名为FDHY23-Est1E和LHP1044-Est1E。菌株FDHY23-Est1E和LHP1044-Est1E分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72小时,测定阿魏酸酯酶(牦牛牛胃来源)的酶活。结果显示,工程菌株FDHY23-Est1E重组表达牦牛牛胃来源的阿魏酸酯酶的表达量是工程菌株LHP1044-Est1E的2.1倍(图3)。

[0033] 实施例4

[0034] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了阿魏酸酯酶(黑曲霉来源)的表达量

[0035] 利用常规的分子克隆技术,将黑曲霉来源的阿魏酸酯酶(UniProtKB:042807.1)的编码基因AnfaeA克隆到表达质粒PUKDN132上,获得重组表达质粒PUKDN132-AnfaeA,再分别转化到菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达阿魏酸酯酶(黑曲霉来源)的工程菌株,分别命名为FDHY23-AnfaeA和LHP1044-AnfaeA。菌株FDHY23-AnfaeA和LHP1044-AnfaeA分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h,测定外源蛋白阿魏酸酯酶AnfaeA(黑曲霉来源)的酶活。结果显示,工程菌株FDHY23-AnfaeA重组表达黑曲霉来源的阿魏酸酯酶的表达量是LHP1044-AnfaeA的1.7倍(图3)。

[0036] 实施例5

[0037] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了糖化酶(食腺嘌呤芽生葡萄孢酵母来源)的表达量

[0038] 利用常规的分子克隆技术,将食腺嘌呤芽生葡萄孢酵母来源的糖化酶(GenBank:CAA86997.1)的编码基因Badgla克隆到质粒PUKDN132上,获得重组表达质粒PUKDN132-Badgla,再分别转化菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达糖化酶(食腺嘌呤芽生葡萄

孢酵母来源)的工程菌株,分别命名为FDHY23-Badgla和LHP1044-Badgla。菌株FDHY23-Badgla和LHP1044-Badgla分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h测定糖化酶的酶活。结果显示,食腺嘌呤芽生葡萄孢酵母来源的糖化酶在FDHY23-Badgla中的重组表达量是HP1044-Badgla的5.5倍(图3)。

[0039] 实施例6

[0040] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了猪圆环病毒样颗粒蛋白的表达量

[0041] 利用常规的分子克隆技术,将猪圆环病毒衣壳蛋白(GenBank:ABV21950.1)的编码基因PCV2克隆到质粒PUKDN115上,获得重组质粒PUKDN115-PCV2,再分别转化菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达猪圆环病毒样颗粒蛋白的工程菌株,分别命名为FDHY23-PCV2和LHP1044-PCV2。菌株FDHY23-PCV2和LHP1044-PCV2分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h,利用SDS-PAGE表征蛋白表达水平,结果显示猪圆环病毒衣壳蛋白PCV2在FDHY23-PCV2表达水平明显高于LHP1044-PCV2,灰度扫描显示FDHY23-PCV2的猪圆环病毒样颗粒蛋白表达水平是LHP1044-PCV2的1.6倍(图3)。

[0042] 实施例7

[0043] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了传染性法氏囊病毒样颗粒蛋白的表达量

[0044] 利用常规的分子克隆技术,将法氏囊病毒衣壳蛋白(GenBank:OK167034)的编码基因HVP2克隆到质粒PUKDN115上,获得重组质粒PUKDN115-HVP2,再分别转化到菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达传染性法氏囊病毒样颗粒蛋白的工程菌株,分别命名为FDHY23-HVP2和LHP1044-HVP2。菌株FDHY23-HVP2和LHP1044-HVP2分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h,利用SDS-PAGE表征蛋白表达量,结果显示FDHY23-HVP2表达水平明显高于LHP1044-HVP2,灰度扫描显示FDHY23-HVP2的传染性法氏囊病毒样颗粒蛋白表达量是LHP1044-HVP2的1.7倍(图3)。

[0045] 实施例8

[0046] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了铁蛋白的表达量

[0047] 利用常规的分子克隆技术,将铁蛋白(GenBank:NP_002023.2)的编码基因FTH1克隆到质粒PUKDN115上,获得重组质粒PUKDN115-Fth1,再分别转化到菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达铁蛋白的工程菌株,分别命名为FDHY23-Fth1和LHP1044-Fth1。工程菌株FDHY23-Fth1和LHP1044-Fth1分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h,利用SDS-PAGE表征蛋白表达量,结果显示FDHY23-Fth1表达水平明显高于LHP1044-Fth1,灰度扫描显示FDHY23-Fth1的铁蛋白表达水平是LHP1044-Fth1的2.9倍(图3)。

[0048] 实施例9

[0049] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23提高了血红蛋白的表达量

[0050] 利用常规的分子克隆技术,将豆血红蛋白(NCBI Reference Sequence:NP_001235928.1)的编码基因LBA克隆到质粒PUKDN115上,获得重组质粒PUKDN115-LBA,再分别转化到菌株FDHY23和菌株LHP1044,获得重组表达血红蛋白的工程菌株,分别命名为FDHY23-LBA和LHP1044-LBA。菌株FDHY23-LBA和LHP1044-LBA分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h,利用SDS-PAGE表征蛋白表达水平,结果显示FDHY23-LBA表达水平明显高于LHP1044-LBA,灰度扫描显示FDHY23-LBA的血红蛋白表达水平是LHP1044-LBA的2.6倍(图3)。

[0051] 实施例10

[0052] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23在高温下表达蛋白的能力优于出发菌株LHP1044

[0053] 重组表达血红蛋白的工程菌株FDHY23-LBA和LHP1044-LBA分别接种到50mL YD培养基中,高温46℃发酵,培养到不同时间点(24h,36h,48h,60h和72h)取样,利用SDS-PAGE表征蛋白表达水平。结果显示在高温46℃条件下,FDHY23-LBA仍然可以表达血红蛋白,而对照组LHP1044-LBA几乎检测不到血红蛋白的表达(图4)。

[0054] 实施例11

[0055] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23携带了CYR1^{N1546K}突变

[0056] 对菌株FDHY23和LHP1044的基因组分别进行二代DNA测序和对比分析,发现突变株FDHY23的腺苷酸环化酶CYR1基因相对于菌株LHP1044的腺苷酸环化酶CYR1基因发生了一个点突变,就是第1546位的氨基酸由天冬酰胺(N)变成了赖氨酸(K)(图5)。

[0057] 实施例12

[0058] CYR1突变提高了高温耐受能力和外源蛋白表达量

[0059] 利用常规的CRISPR技术在出发菌株LHP1044中制造基因CYR1的点突变(N1546K),构建获得的菌株命名为LHP1044-CYR1^{N1546K};同时,利用常规CRISPR技术将耐高温突变株FDHY23中的CYR1的点突变N1546K进行了回复突变,构建获得的菌株命名为FDHY23-CYR1。通过打点实验,可以看到LHP1044-CYR1^{N1546K}对高温的耐受性明显高于LHP1044,且在30℃下两者的生长没有明显差异。而当耐高温菌株FDHY23的CYR1基因进行回复突变后,FDHY23-CYR1在46℃高温条件下生长能力明显下降(图6a),该结果表明含有CYR1突变的菌株,其高温耐受能力明显高于野生型菌株LHP1044。

[0060] 含有CYR1突变的菌株FDHY23能够提高血红蛋白、阿魏酸酯酶、病毒样颗粒等蛋白的表达量。在含有CYR1^{N1546K}突变的菌株中,转化重组质粒PUKDN115-LBA,获得工程菌株LHP1044-CYR1^{N1546K}-LBA;同时野生型菌株LHP1044也转化重组质粒PUKDN115-LBA,获得工程菌株LHP1044-LBA。对比分析野生型和含有CYR1突变的突变株对蛋白表达水平的影响。两个工程菌株分别接种到50mL YD培养基中,30℃下发酵培养72h,利用SDS-PAGE表征蛋白表达水平,结果显示含有CYR1突变的菌株,其表达外源蛋白的能力明显高于野生菌株LHP1044-LBA(图6b)

[0061] 综上,马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23能提高外源蛋白表达量以及提高高温下的生长能力。腺苷酸环化酶基因CYR1的突变株,例如点突变CYR1^{N1546K},提高了高温耐受能力,提高了外源蛋白表达量。

[0062] 实施例13

[0063] 马克斯克鲁维酵母突变株FDHY23携带的突变

[0064] 对菌株FDHY23和LHP1044的基因组分别进行二代DNA测序和对比分析,菌株FDHY23相对于出发菌株LHP1044一共有38个SNP,56个InDel,具体详见列表1。

[0065] 表1.FDHY23相对于LHP1044存在的突变

[0066]

染色体	染色体位置	LHP1044	FDHY23	TYPE	基因 ID	基因名
1	1405227	T	A	SNP	FIM1_698-FIM1_699	
1	1405232	T	A	SNP	FIM1_698-FIM1_699	
2	5228	G	A	SNP	FIM1_850-FIM1_851	
2	1218266	T	A	SNP	FIM1_1452	
2	1646723	T	A	SNP	FIM1_1675	
3	3206	T	A	SNP	FIM1_1700-FIM1_1701	
3	3210	A	T	SNP	FIM1_1700-FIM1_1701	
3	3212	T	C	SNP	FIM1_1700-FIM1_1701	
3	497889	C	G	SNP	FIM1_1925	CYRI
4	313159	T	A,C	SNP	FIM1_2589,FIM1_2589	
4	313166	A	T	SNP	FIM1_2589	
4	583838	A	T	SNP	FIM1_2700	
5	900070	T	A	SNP	FIM1_3515	
5	1061287	C	A	SNP	FIM1_3589	
5	1073886	A	T	SNP	FIM1_3596	
6	567895	C	A	SNP	FIM1_3990-FIM1_3991	
6	1209049	T	C	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209069	A	T	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209070	C	T	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209087	C	G	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209107	G	A	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209108	A	T	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209258	C	T	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
6	1209259	A	T	SNP	FIM1_4315-CHR_END	
7	1095	C	T	SNP	CHR_START-FIM1_4316	
7	1098	A	G	SNP	CHR_START-FIM1_4316	
7	1114	C	T	SNP	CHR_START-FIM1_4316	
7	489216	T	A	SNP	FIM1_4548-FIM1_4549	
7	615463	T	A	SNP	FIM1_4611	
7	615464	T	A	SNP	FIM1_4611	
7	615469	T	G	SNP	FIM1_4611	
7	615472	T	G	SNP	FIM1_4611	
7	615473	T	G	SNP	FIM1_4611	
7	765817	G	T	SNP	FIM1_4685-FIM1_4686	
8	323349	C	G	SNP	FIM1_4931	
8	469311	C	A	SNP	FIM1_4990	

[0067]

8	852794	T	G	SNP	FIM1_5178-FIM1_5179
8	852795	T	G	SNP	FIM1_5178-FIM1_5179
		TAAAAAAA			
1	570350	AAAAAAA AAAAAAA AC	TC,T	INDEL	FIM1_284-FIM1_285,FI M1_284-FIM1_285
1	767007	AT TAAAAAAA AAAAAAA	A	INDEL	FIM1_378-FIM1_379
1	852332	AAAAAAA AAAAAAA AAA	T	INDEL	FIM1_416-FIM1_417
1	918535	A	ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT, ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT T	INDEL	FIM1_453-FIM1_454,FI M1_453-FIM1_454
1	1077979	T	TCAAGTC	INDEL	FIM1_536-FIM1_537
1	1239925	C	CT	INDEL	FIM1_618-FIM1_619
1	1422870	C	CA	INDEL	FIM1_704-FIM1_705
1	1720070	C	CT	INDEL	FIM1_842-FIM1_843
2	5234	C	CGACTTATG TTTGCAA	INDEL	FIM1_850-FIM1_851
2	226002	G	GA	INDEL	FIM1_tRNA32-FIM1_95 7
		GTTTTTTTT			
2	286960	TTTTTTTTT TT	G	INDEL	FIM1_988-FIM1_989
2	457209	C	CTTTTTTT	INDEL	FIM1_1068-FIM1_tRNA 38
2	516147	GT	G	INDEL	FIM1_1097-FIM1_1098
2	907356	C	CAA	INDEL	FIM1_1296-FIM1_1297
2	1118607	G	GT	INDEL	FIM1_1401-FIM1_1402
2	1218269	T	TCCAG	INDEL	FIM1_1452
		CTTTTTTTT			
2	1465739	TTTTTTTTT TT	C	INDEL	FIM1_1578-FIM1_1579
2	1679077	TAAAAAA	T	INDEL	FIM1_1689-FIM1_1690
2	1679085	A	AC	INDEL	FIM1_1689-FIM1_1690
2	1679086	A	AGTGC	INDEL	FIM1_1689-FIM1_1690
3	461835	CT	C	INDEL	FIM1_1909-FIM1_1910
3	1474578	A	AT TAAGGTGAA GCCAAAATG TAAACAAAA GGAATCGG	INDEL	FIM1_2382-FIM1_2383 FIM1_2589

[0068]

4	313162	AT	A	INDEL	FIM1_2589
4	495476	A	ATTTTTT	INDEL	FIM1_2662-FIM1_2663
4	583840	G	GGTC	INDEL	FIM1_2700
4	583842	A	AATCCAT	INDEL	FIM1_2700
4	605062	A	AGACGCCC	INDEL	FIM1_2707
4	831601	TAAAAA	T	INDEL	FIM1_2809-FIM1_2810
4	903300	CA	C	INDEL	FIM1_2846-FIM1_2847
5	638754	CT	C	INDEL	FIM1_3389-FIM1_tRNA 121
		CGGGGGG			
5	966008	GGGGGGG GG	C	INDEL	FIM1_3545-FIM1_3546
			TAAAAA AAAAA A,TAAAAA AAAAA AAA	INDEL	FIM1_3609-FIM1_3610, FIM1_3609-FIM1_3610
6	155868	G	GT	INDEL	FIM1_tRNA136-FIM1_3 794
6	239206	A	AT	INDEL	FIM1_3835-FIM1_3836
		TAAAAA AAAAA AAAAA AACC	T	INDEL	FIM1_3958-FIM1_3959
6	567859	A	ATT	INDEL	FIM1_3990-FIM1_3991
		ATTTTTTT			
6	652623	TTTTTTTT TT	A	INDEL	FIM1_4033-FIM1_4034
			TAAAAA AAAAA AAA,TAAAA AAAAA AAAAA	INDEL	FIM1_4033-FIM1_4034, FIM1_4033-FIM1_4034
6	736871	CT	C	INDEL	FIM1_4076
6	1076829	A	AG	INDEL	FIM1_4253-FIM1_tRNA 148
			TTACCATGTT GAAACCCCA GAAGTTCAA CAAAAGACT ACTGTATTC ACTCCATGG ACTGGTACT ACTACTGCC ACTATTGCC ACTGAGTTG	INDEL	FIM1_4298

			TCCACAACT ACTGGTGCT GACGGTATC GAAACTGTG AAGACGATC		
	6	1209255	AG	A	INDEL FIM1_4315-CHR_END
	7	1215	CCCTCT	C	INDEL CHR_START-FIM1_4316
	7	34251	A	ATTG	INDEL FIM1_4329-FIM1_4330
				ATTCTGGGC	
	7	34258	A	AGGGTGGTA	INDEL FIM1_4329-FIM1_4330
				CGCC	
	7	147960	T	TTTTGAAGA	INDEL FIM1_4386-FIM1_4387
				AAAAAAA	
	7	147966	G	GAAGGAAAC	INDEL FIM1_4386-FIM1_4387
				A	
[0069]			CTTTTTTTT		
	7	209687	TTTTTTTTT	C	INDEL FIM1_4415-FIM1_4416
			TTTT		
			GTTTTTTTT		
	7	314918	TTTTTTTTT	G	INDEL FIM1_4463-FIM1_4464
			TTT		
			ATTTTTTTTT		
	7	350134	TTTTTTTTT	A	INDEL FIM1_tRNA152-FIM1_4484
			TTTTTTT		
	7	713548	T	TC	INDEL FIM1_4659
			TAAAAAAA		
	7	720751	AAAAAAA	T	INDEL FIM1_4664-FIM1_4665
			AAAAAAA		
			AAAA		
			ATTTTTTTTT		
	7	720777	A	TTTTTTTTT	INDEL FIM1_4664-FIM1_4665,
				TT,ATTTTTTT	FIM1_4664-FIM1_4665
				TTTTTTTTTT	
				TTTTT	
	7	957564	CA	C	INDEL FIM1_4776-CHR_END
	8	52315	T	TAGCAAAGC	INDEL FIM1_4794-FIM1_4795
				AAAGCAA	

[0070] 实施例中涉及到材料与方法

[0071] 发酵培养

[0072] 马克斯克鲁维酵母基本生长用的培养基,选用YPD培养基:2%多聚蛋白胨,2%葡萄糖,1%酵母提取物,培养条件是30℃、220rpm。重组表达菌株在摇瓶中的培养,选用YD培养基:2%酵母提取物,4%葡萄糖,培养条件是30℃、220rpm下培养72h,检测外源蛋白在

K.marxianus中的表达。转化涂布用SD固体培养基:6.7g/L不含氨基酸的酵母氮源,20g/L葡萄糖,20g/L琼脂粉。

[0073] 质粒转化马克斯克鲁维酵母菌株

[0074] 挑菌到3mL YPD小试管,30℃摇床培养18-19h;取1mL菌液,8000rpm离心,去上清,用1mL无菌水洗涤,8000rpm离心,去上清;用1mL 1×TE/LiAc(0.1M/L LiAc,10mM/L Tris,1mM/L EDTA)洗涤,8000rpm离心,去上清,重复一次;加连接产物10μL(或者质粒3~4μL),600μL PEG溶液(0.1M/L LiAc,10mM/L Tris,1mM/L EDTA,40%PEG 4000)和DTT(终浓度是10mmol);30℃下水浴15min,47℃下培养15min;瞬离,去上清,加100μL无菌水,重悬后涂板,30℃烘箱培养。

[0075] 马克斯克鲁维酵母细胞破碎

[0076] 8000rpm离心5min收集1mL新鲜的重组酵母细胞,然后用PBS缓冲液(137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄,pH 7.4)清洗一次,最终重悬于500μL的PBS缓冲液中。向其中加入大约400μL玻璃珠。使用Bead-beater(FastPrep-24,MP,California,USA)以6m/s的速度破碎细胞2min。

[0077] SDS-PAGE分析外源蛋白的表达量

[0078] 取发酵液上清或者细胞破碎上清液进行SDS-PAGE,同时以不同浓度的乳球蛋白作为标准进行外源蛋白的定量。将乳球蛋白配置成500、400、300、200、100mg/L的浓度,制样后进行SDS-PAGE分析。使用GenoSens分析软件对SDS-PAGE凝胶上分离的乳球蛋白的条带强弱进行灰度扫描分析,制作标准曲线。同时利用GenoSens分析软件对SDS-PAGE凝胶上分离的外源蛋白的条带强弱进行灰度扫描分析,根据标准曲线计算外源蛋白的表达量。

[0079] 阿魏酸酯酶酶活的测定

[0080] 取发酵液上清,用1×PBST(8g/L NaCl,1.42g/L Na₂HPO₄,0.2g/L KCl,0.27g/L KH₂PO₄,2.5%Triton-X-100,pH=6.4)将样品稀释到合适浓度,取20μL待测酶液转移至96孔平底板,随后每个反应体系中补加180μL CNPF混合反应液(10μL CNPF(MB7591,美伦生物)和170μL 1×PBST),混合均匀。将反应体系放置于37℃培养箱中静置反应20min,迅速通过BioTek Eon酶标仪在410nm条件下检测样品的吸光值。根据酶活换算公式计算出酶活:

[0081] 酶活(U/mL) = $((A_{410} - 0.0521) \times V_1 \times d \times 1000 \times \text{稀释倍数}) / (6.6764 \times T \times V_2)$

[0082] 注:V₁表示总体积(L),V₂表示反应体系中加入的酶液体积(mL),d表示酶液稀释倍数,T表示反应时间(min)。

[0083] 阿魏酸酯酶酶活定义:在37℃,pH=6.4的反应条件下,反应体系中每分钟分解1nmol底物CNPF或者释放出1nmol有色基团CNP所需要的酶量即为一个酶活单位(U)。

[0084] 糖化酶酶活的测定

[0085] 取发酵液上清,用20mM NaAc溶液将样品稀释到合适浓度,取50μL待测酶液加入500μL1%可溶性淀粉和450μL 20mM NaAc溶液,混合均匀。将反应体系放置于60℃培养箱中静置反应5min,反应结束后迅速加入1mL DNS溶液于沸水中反应5min,取100μL最终反应液转移至96孔平底板,迅速通过BioTek Eon酶标仪在540nm条件下检测样品的吸光值。根据酶活换算公式计算出酶活:

[0086] 水解产生的还原糖浓度(mg/mL) = $(A_{540} - 0.0002) / 1.7853$

[0087] 酶活(U/mL) = (水解产生的还原糖量 × 1000 × 稀释倍数) / 45

[0088] 糖化酶酶活的定义为:在60℃,pH5.5反应条件下,每分钟水解1 μ mol可溶性淀粉底物或释放1 μ mol还原糖所需的酶量即为一个酶活力单位(U)。

[0089] 参考文献:

[0090] 1.Liu Y,Mo WJ,Shi TF,Wang MZ,Zhou JG,Yu Y,Yew WS,Lu H.Mutational Mtc6p attenuates autophagy and improves secretory expression of heterologous proteins in *Kluyveromyces marxianus*.*Microb Cell Fact*.2018 14;17(1):144.

[0091] 2.Huang CJ,Lu MY,Chang YW,Li WH.Experimental Evolution of Yeast for High-Temperature Tolerance.*Mol Biol Evol*.2018 1;35(8):1823-1839.

[0092] Wu L,Lyu Y,Wu P,Luo T,Zeng J,Shi T,Zhou J,Yu Y,Lu H.Meiosis-Based Laboratory Evolution of the Thermal Tolerance in *Kluyveromyces marxianus*.*Front Bioeng Biotechnol*.2022 11;9:799756.

[0093] 3.Gowers GF,Chee SM,Bell D,Suckling L,Kern M,Tew D,McClymont DW,Ellis T.Improved betulinic acid biosynthesis using synthetic yeast chromosome recombination and semi-automated rapid LC-MS screening.*Nat Commun*.2020 13;11(1):868.

[0094] 4.Sternberg N,Hamilton D.Bacteriophage P1 site-specific recombination.I.Recombination between loxP sites.*J Mol Biol*.1981 25;150(4):467-86.

[0095] 5.Hoess RH,Wierzbicki A,Abremski K.The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination.*Nucleic Acids Res*.1986 11;14(5):2287-300.

[0096] 6.Raschmanová H,Weninger A,Knejzlík Z,Melzoch K,Kovar K.Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*:enhancing production of secreted recombinant proteins.*Appl Microbiol Biotechnol*.2021;105(11):4397-4414.

[0097] 7.Chen X,Li X, Ji B,Wang Y,Ishchuk OP,Vorontsov E,Petranovic D,Siewers V,Engqvist MKM.Suppressors of amyloid- β toxicity improve recombinant protein production in yeast by reducing oxidative stress and tuning cellular metabolism.*Metab Eng*.2022 72:311-324.

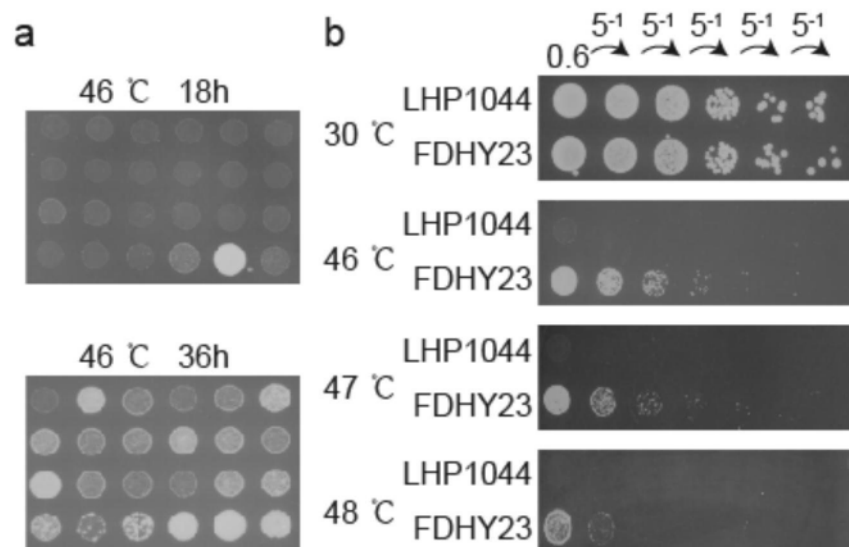


图1

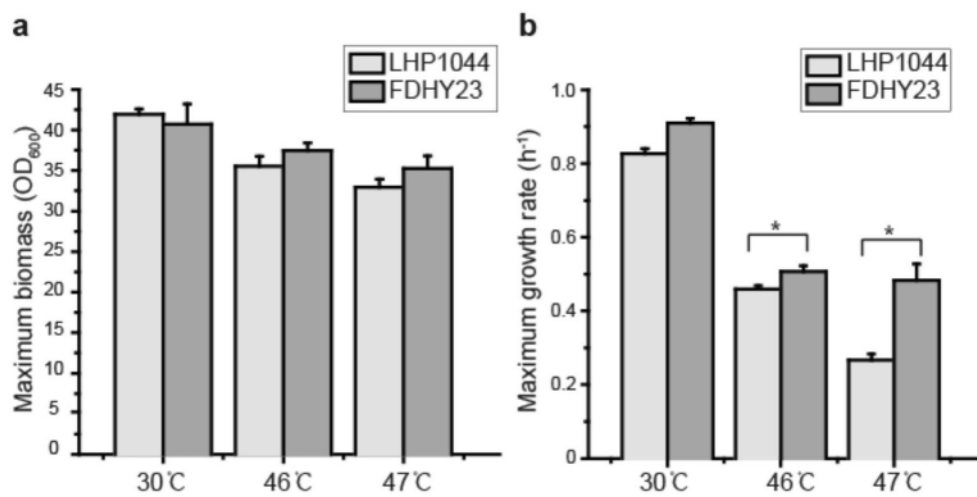


图2

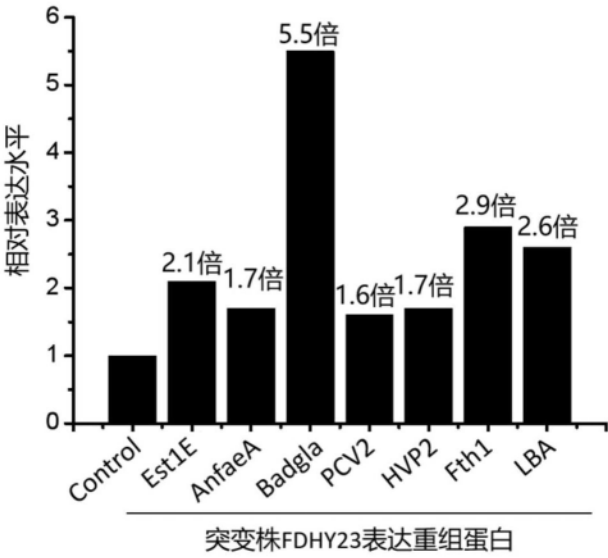


图3

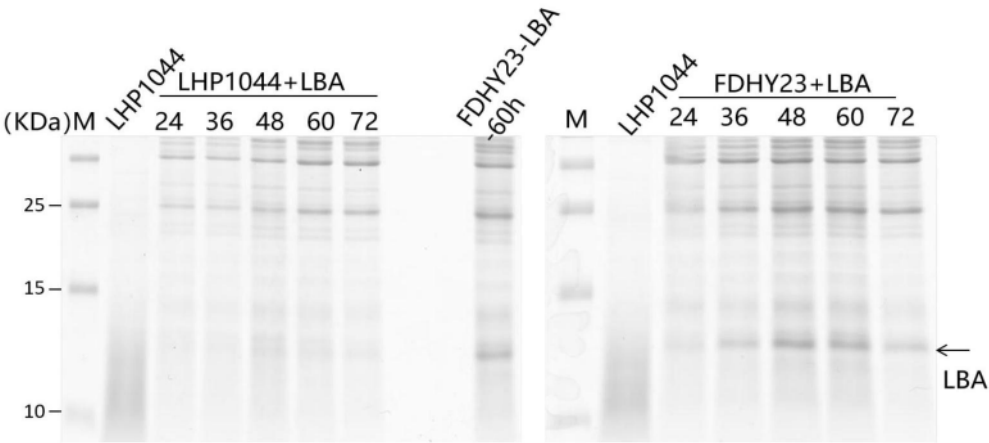


图4

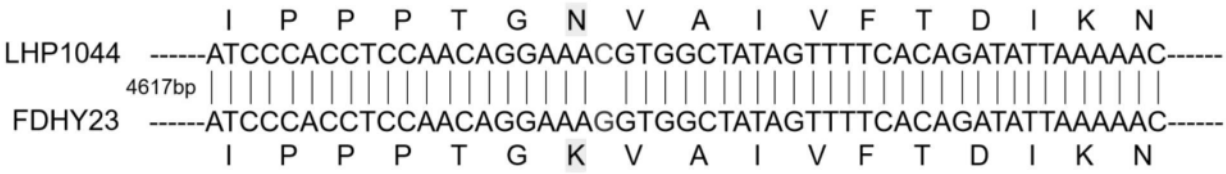


图5

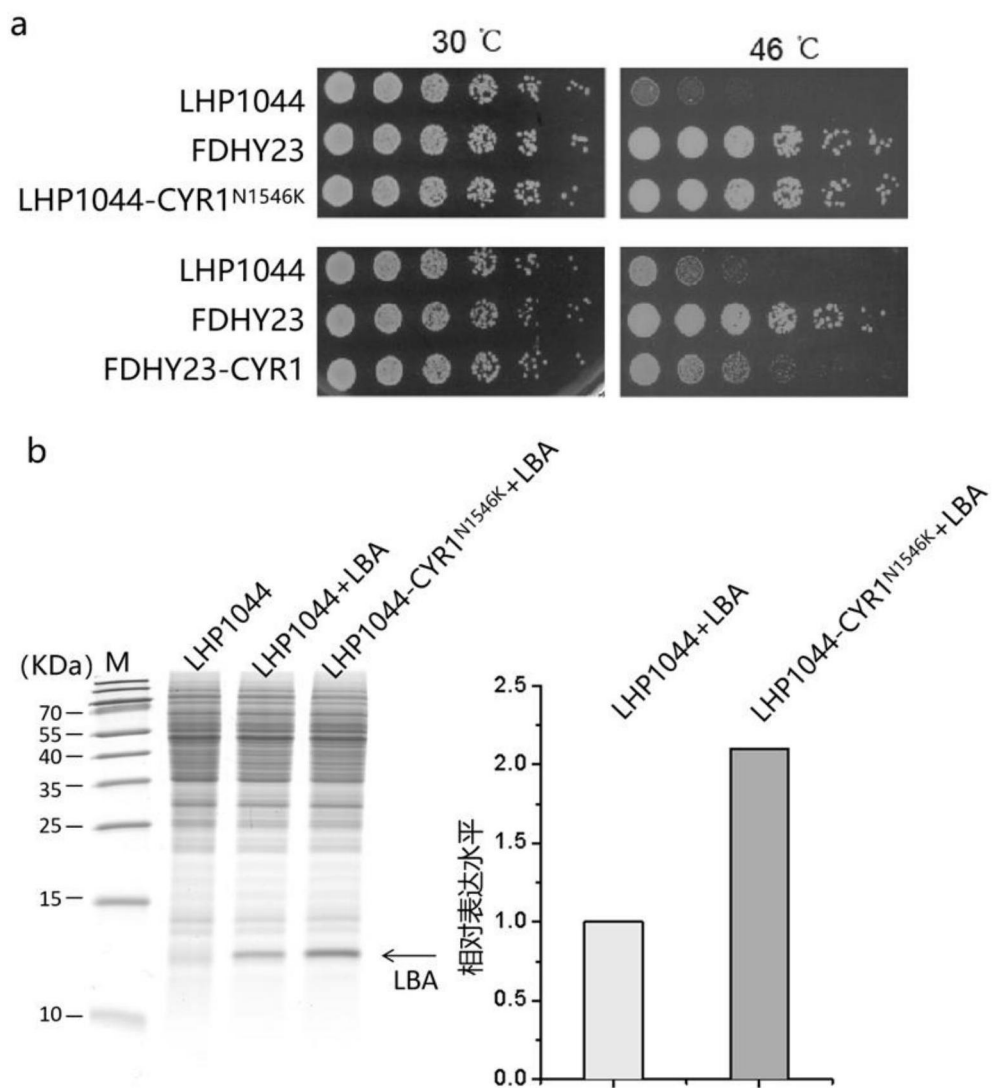


图6