



# 基于壳聚糖结合模块构建新型酿酒酵母孢子表面展示系统

李婉杰<sup>1</sup>, 王亚森<sup>1</sup>, 陈洲<sup>1</sup>, 中西秀树<sup>1</sup>, 许向阳<sup>2</sup>, 高晓冬<sup>1</sup>, 李子杰<sup>1\*</sup>

1 江南大学生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 枣庄市杰诺生物酶有限公司, 山东 枣庄 277100

李婉杰, 王亚森, 陈洲, 中西秀树, 许向阳, 高晓冬, 李子杰. 基于壳聚糖结合模块构建新型酿酒酵母孢子表面展示系统. 微生物学报, 2022, 62(11): 4431–4446.

Li Wanjie, Wang Yasen, Chen Zhou, Nakanishi Hideki, Xu Xiangyang, Gao Xiaodong, Li Zijie. Construction of a novel *Saccharomyces cerevisiae* spore surface display system based on chitosan-binding module. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4431–4446.

**摘要:**【目的】基于当前细胞表面展示体系存在的问题, 旨在构建一个新型的普适性强、抗逆性好、高效稳定的酿酒酵母孢子表面展示系统。【方法】首先, 根据酵母孢子固定化酶的特性, 通过查阅文献寻找潜在的与孢子壁壳聚糖层高度亲和的壳聚糖结合模块; 其次, 利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)与结合模块融合表达, 在体外和孢子内分别验证结合模块与孢子壁的亲和能力; 之后, 选择 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 来源的  $\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -galactosidase, MEL1)评估新型展示体系的效能。【结果】首先, 选择 *Paenibacillus* sp. IK-5 来源壳聚糖酶的碳水化合物结合模块 32 (carbohydrate binding module 32, CBM32)作为壳聚糖结合模块。其次, 将大肠杆菌表达纯化后的融合蛋白 CBM32-GFP 与 *dit1* $\Delta$  孢子共孵育, 通过 GFP 荧光定位以及荧光强度验证 CBM32 在体外与孢子壁具有较好的亲和能力; CBM32-GFP 在 *dit1* $\Delta$  孢子内的荧光定位与结合能力证明了其在孢子内能够与孢子壁紧密结合; 最后, 以 MEL1 替换 GFP 应用到新型展示体系中, 与只表达 MEL1 的孢子相比, CBM32-MEL1 孢子酶活不仅提高了 68.65%, 最高酶比活力达到 460.59 U/g DCW (dry cell weight, 菌体干重), 重复使用能力也得到了显著提高; 此外, 该体

**基金项目:** 国家自然科学基金(32171475); 山东省重大科技创新工程(2019JZZY011006); 江苏省研究生实践创新计划(SJCX20\_0743)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32171475), by the Shandong Provincial Major Scientific and Technological Innovation Project (2019JZZY011006) and by the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX20\_0743)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197071; E-mail: lizijie@jiangnan.edu.cn

Received: 10 March 2022; Revised: 13 May 2022; Published online: 13 June 2022

系提高了 MEL1 的稳定性和可操作性。【结论】本研究首次提出利用结合模块来构建一个新型酿酒酵母孢子表面展示体系，为真核来源的多糖基化位点修饰以及多亚基结构蛋白提供了可靠的细胞表面展示平台，为实现工业化应用孢子固定化酶提供了理论依据。

**关键词：**酿酒酵母孢子；表面展示；壳聚糖结合模块； $\alpha$ -半乳糖苷酶

## Construction of a novel *Saccharomyces cerevisiae* spore surface display system based on chitosan-binding module

LI Wanjie<sup>1</sup>, WANG Yasen<sup>1</sup>, CHEN Zhou<sup>1</sup>, NAKANISHI Hideki<sup>1</sup>, XU Xiangyang<sup>2</sup>, GAO Xiaodong<sup>1</sup>, LI Zijie<sup>1\*</sup>

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Zaozhuang Jienuo Enzyme Co., Ltd., Zaozhuang 277100, Shandong, China

**Abstract:** [Objective] Based on the existing problems in the current cell surface display systems, we aimed to establish a novel *Saccharomyces cerevisiae* spore surface display system with strong universality, better stress resistance, and higher efficiency and stability. [Methods] Firstly, according to the characteristics of immobilized enzymes in *S. cerevisiae* spores, we searched the potential chitosan-binding modules with high affinity with the chitosan layer of spore wall by referring to literature. Then, the binding module was fused and expressed with green fluorescent protein (GFP) and the affinity ability of the binding module with the spore wall was verified *in vitro* and *in vivo*. Finally, we selected  $\alpha$ -galactosidase (MEL1) derived from *S. cerevisiae* AH109 to evaluate the efficacy of the novel display system. [Results] Firstly, we selected a carbohydrate binding module 32 (CBM32) derived from *Paenibacillus* sp. IK-5 chitosanase as the chitosan-binding module. Next, the fusion protein CBM32-GFP, which was expressed in *Escherichia coli* and purified, was co-incubated with *dit1* $\Delta$  spores, and the result showed that CBM32 exhibited good affinity ability with the spore wall *in vitro* by the localization and intensity of GFP fluorescence. Furthermore, the fluorescence localization and binding ability of CBM32-GFP in *dit1* $\Delta$  spores proved that CBM32 was tightly bound to the spore wall *in vivo*. Finally, we replaced GFP with MEL1 in this display system. Compared with those of spores only expressing MEL1, the activity of spores displaying CBM32-MEL1 was increased by 68.65%, with the highest specific activity reaching 460.59 U/g DCW (dry cell weight), and the reusability was also significantly improved. Moreover, the stability and operability of MEL1 were enhanced. [Conclusion] We constructed a novel *S. cerevisiae* spore surface display system based on the chitosan-binding module for the first time, which provided a reliable cell surface display platform for the eukaryotic proteins with multi-glycosylation sites and multi-subunit structures. It also provided the theoretical basis for the industrial application of immobilized enzymes in spores.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae* spores; surface display; chitosan-binding modules;  $\alpha$ -galactosidase

微生物细胞表面展示技术的基本原理是通过 DNA 重组技术将外源蛋白或多肽基因与宿主特定的锚定蛋白基因融合后导入宿主中, 利用该锚定蛋白的定位作用将外源蛋白或多肽表达在细胞表面<sup>[1]</sup>。酶作为在细胞表面展示体系中最常用的生物大分子, 其细胞展示与纯酶相比具有很多优势, 不仅具有固定化酶的特性, 省去了繁琐的分离纯化和固定化操作, 且展示在细胞表面的酶往往表现出优良的稳定性和环境胁迫耐受性<sup>[2-3]</sup>。当前, 细胞表面展示的宿主主要包括噬菌体、细菌、酵母和枯草芽孢杆菌芽孢, 然而上述体系都存在一些问题: 噬菌体不能展示分子量过大的蛋白, 否则影响装配和侵染; 细菌对于真核来源的蛋白缺乏翻译后修饰过程<sup>[4]</sup>; 酵母营养细胞的抗逆性能较弱, 且对大分子多亚基蛋白的跨膜转运较困难<sup>[5]</sup>; 芽孢通常通过衣壳蛋白展示<sup>[6]</sup>, 很可能导致被展示蛋白折叠在膜内<sup>[7]</sup>。根据上述存在的问题, 开发普适性强、抗逆性好、高效稳定的表面展示体系具有非常重要的研究意义。

酿酒酵母二倍体细胞在以醋酸盐为唯一碳源, 且缺乏氮源的情况下, 会进入减数分裂阶段形成 4 个单倍体的孢子<sup>[8]</sup>。孢子壁有 4 层结构, 从内到外依次为甘露糖层、葡聚糖层、壳聚糖层以及二酪氨酸层<sup>[9]</sup>。“酵母孢子固定化酶”基于孢子壁的特殊结构, 以孢子作为一种固定化的生物材料, 将酶表达或固定在孢子壁上。由于壳聚糖层对蛋白的交联作用及致密网状结构二酪氨酸层的拦截作用, 在酵母孢子中表达分泌蛋白或带有分泌型信号肽的非分泌蛋白时, 蛋白会被固定在壳聚糖层和二酪氨酸层之间<sup>[10]</sup>, 从而形成孢子“微胶囊”固定化酶。实验室前期构建了一系列研究孢子壁的缺陷型菌株, 本研究利用 *dit1Δ* 缺陷型菌株来构建新型孢子表面展示系统。由于 *DIT1* 基因参与二酪氨酸层合成途径中的第一步反应, 敲除该基因就

会导致孢子二酪氨酸层的缺失<sup>[11]</sup>, 将壳聚糖层暴露在孢子表面, 形成天然的“孢子壳聚糖球”。

在前期研究中<sup>[12-13]</sup>, 利用壳聚糖层的静电吸附作用构建的 *dit1Δ* 孢子表面展示体系虽然与其他类型酿酒酵母孢子(*AN120*、*osw2Δ* 和 *chs3Δ*)固定化酶相比酶活较高, 但其重复使用能力较弱。为解决这一问题, 需要寻找能够有效结合 *dit1Δ* 孢子壁壳聚糖层的亲和蛋白, 将该亲和蛋白与展示在细胞表面的乘客蛋白通过柔性的接头(linker)进行串联, 再利用亲和蛋白与壳聚糖层的高亲和能力, 构建新型酿酒酵母孢子表面展示系统(图 1), 以达到高酶活和高重复使用能力的目的。酿酒酵母孢子作为一种新型蛋白展示载体, 其表面展示的蛋白不需要跨膜转运<sup>[14]</sup>, 且具有良好的抗逆性<sup>[15-16]</sup>, 因此为细胞表面展示真核来源的多糖基化位点修饰及多亚基结构蛋白提供了可靠的展示平台。

碳水化合物结合模块(carbohydrate binding module, CBM)是具有碳水化合物结合活性的糖酶中一段具有独特折叠结构的多肽, 参与其目标碳水化合物的结合和识别<sup>[17]</sup>。Qin 等和 Lin 等利用 CBM56 通过氢键与凝胶多糖的特异性结合能力, 将壳聚糖酶与 CBM56 融合表达, 实

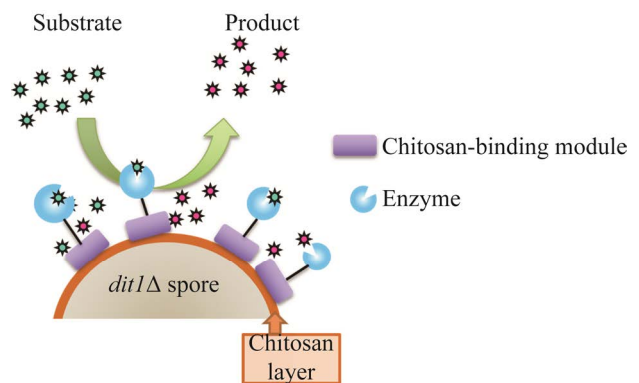


图 1 酿酒酵母孢子表面展示体系示意图  
Figure 1 Schematic of *Saccharomyces cerevisiae* spore surface display system.

现了壳聚糖酶在凝胶多糖上的固定化, 该固定化可直接应用于填充床反应器<sup>[18-19]</sup>。基于不同家族的 CBM 具有不同底物的特异性结合能力, 受到 Qin 等<sup>[18-19]</sup>研究的启发, 我们通过查阅文献, 寻找到目前仅报道的 2 个分别来源于 *Paenibacillus elgii* 和 *Paenibacillus* sp. IK-5 壳聚糖酶的壳聚糖结合区域<sup>[17,20]</sup>, 根据 CAZy 数据库, 这 2 个区域属于 CBM32 家族成员, 具有壳聚糖特异性结合能力, 且它们在氨基酸序列上具有一定相似性。其中 *Paenibacillus elgii* 来源的 CBM32 仅有一个结合模块, 而本研究选择的 *Paenibacillus* sp. IK-5 来源的 CBM32 包含 DD1 和 DD2 两个结合模块, 与壳聚糖的结合能力更强, 且是目前对其结合机制研究最为清楚的。DD2 的 Glu<sup>14</sup> 与非还原端氨基葡萄糖的氨基发生静电相互作用, 而 Arg<sup>31</sup>、Tyr<sup>36</sup> 和 Glu<sup>61</sup> 主要与非还原端氨基葡萄糖形成氢键, 解释了 CBM32 与底物壳聚糖的结合机制<sup>[20]</sup>, 而目前还没有关于 CBM32 应用于固定化酶的研究。

本研究基于 *Paenibacillus* sp. IK-5 来源的 CBM32 建立了一个新型酿酒酵母孢子表面展示系统。将酵母来源的多糖基化位点修饰的四聚体蛋白  $\alpha$ -半乳糖苷酶(MEL1)应用在展示体系中, 不仅明显提高了表面展示 MEL1 的孢子酶活, 其酶学性质以及重复使用能力也得到了显著改善, 弥补了以往孢子固定化酶的缺陷, 为实现工业化应用孢子固定化酶提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用到的菌株和质粒分别如表 1 和表 2 所示, 大肠杆菌蛋白表达采用 *Escherichia coli* BL21(DE3) 菌株, 质粒扩增采用 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株, 本研究中所用的 *S. cerevisiae* AN120 和 HW3 二倍体产孢菌株是快速产孢的 SK-1 背景菌株。本研究所用引物如表 3 所示, 引物由天霖生物科技(上海)有限公司合成。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> Omp Thsd ThsdS<sub>B</sub> (rB-mB-) gal dcm</i> (DE3)	Laboratory
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>lacZ<math>\Delta</math>M15 hsdR recA</i>	Laboratory
<i>E. coli</i> /GFP	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing plasmid pET28a-GFP	This study
<i>E. coli</i> /CBM32-GFP	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing plasmid pET28a-CBM32-GFP	This study
<i>S. cerevisiae</i> AN120 (wild-type)	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ARG4/arg4-NspI his3<math>\Delta</math>SK/his3<math>\Delta</math>SK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3</i>	Laboratory
<i>S. cerevisiae</i> HW3 ( <i>dit1</i> $\Delta$ )	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ARG4/arg4-NspI his3<math>\Delta</math>SK/his3<math>\Delta</math>SK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3 dit1<math>\Delta</math>::his5+ / dit1<math>\Delta</math>::his5+</i>	[10]
<i>S. cerevisiae</i> AH109	<i>MAT<math>\alpha</math> trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his-200 gal4<math>\Delta</math> gal80<math>\Delta</math> LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3 MEL1 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2 URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>	Laboratory
<i>dit1</i> $\Delta$ /CBM32-3HA	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-CBM32-3HA	This study
<i>dit1</i> $\Delta$ /GFP	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-GFP	This study
<i>dit1</i> $\Delta$ /CBM32-GFP	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-CBM32-GFP	This study
AN120/CBM32-GFP	<i>S. cerevisiae</i> AN120 containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-CBM32-GFP	This study
<i>dit1</i> $\Delta$ /MEL1	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-MEL1	This study
<i>dit1</i> $\Delta$ /MEL1-3HA	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-MEL1-3HA	This study
<i>dit1</i> $\Delta$ /CBM32-MEL1	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-CBM32-MEL1	This study
<i>dit1</i> $\Delta$ /CBM32-MEL1-3HA	<i>S. cerevisiae dit1</i> $\Delta$ containing plasmid pRS426-TEFpr-ss-CBM32-MEL1-3HA	This study

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
pET28a	pET28a empty vector harboring 6His tag	Laboratory
pET28a-GFP	pET28a harboring GFP gene	This study
pET28a-CBM32-GFP	pET28a harboring <i>CBM32</i> -GFP gene	This study
pRS426-TEFpr-ss-araA-3HA	pRS426 empty vector harboring TEF promoter and <i>CYC1</i> terminator	[15]
pRS426-TEFpr-ss-CBM32-3HA	pRS426-TEFpr harboring <i>CBM32</i> -3HA gene of N terminus fused ss	This study
pRS426-TEFpr-ss-GFP	pRS426-TEFpr harboring GFP gene of N terminus fused ss	This study
pRS426-TEFpr-ss-CBM32-GFP	pRS426-TEFpr-ss-GFP harboring <i>CBM32</i> gene	This study
pRS426-TEFpr-ss-MEL1	pRS426-TEFpr harboring <i>MEL1</i> gene of N terminus fused ss	This study
pRS426-TEFpr-ss-MEL1-3HA	pRS426-TEFpr-ss-MEL1 fused 3HA at the C terminus of <i>MEL1</i>	This study
pRS426-TEFpr-ss-CBM32-MEL1	pRS426-TEFpr-ss-MEL1 fused <i>CBM32</i> at the N terminus of <i>MEL1</i>	This study
pRS426-TEFpr-ss-CBM32-MEL1-3HA	pRS426-TEFpr-ss-CBM32-MEL1 fused 3HA at the C terminus of <i>MEL1</i>	This study

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Nucleotide sequence (5'→3')
GFP-F	GCGC <u>GGATCC</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA ( <i>Bam</i> H I)
GFP-R1	GCGC <u>CTCGAGCTT</u> GTACAGCTCGTCCATGCC ( <i>Xho</i> I)
<i>CBM32</i> -F1	GTGGACAGCAAATGGGTGCGCAATCTTGCATTAATAAGAC
<i>CBM32</i> -R1	TCCTCGCCCTTGCTCACCATAGAACCACCACCACCGGATCCGCCATAGACTTCAAATTCCC
<i>CBM32</i> -F2	GCGC <u>GGATCCA</u> ATCTTGCATTAATAAGAC ( <i>Bam</i> H I)
<i>CBM32</i> -R2	GCGC <u>CTCGAGGCC</u> ATAGACTTCAAATTCCC ( <i>Xho</i> I)
GFP-R2	GCGC <u>CTCGAGTT</u> ACTTGTACAGCTCGTCCATGCC ( <i>Xho</i> I)
<i>MEL1</i> -F	GCGC <u>GGATCCTT</u> TGGGGTGTCTCCGAGTTACA ( <i>Bam</i> H I)
<i>MEL1</i> -R1	GCGC <u>CTCGAGTT</u> AATAAGCTCAAGAAGAGGGTCTC ( <i>Xho</i> I)
<i>MEL1</i> -R2	GCGC <u>CTCGAGAGA</u> AAGAGGGTCTCAACCTAT ( <i>Xho</i> I)
<i>CBM32-MEL1</i> -F	GGGAATTTGAAGTCTATGGCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTTTTGGGGTGTCTCCGAGTTAC
<i>CBM32-MEL1</i> -R1	AGTCAGGAACATCGTATGGGTATCAAGAAGAGGGTCTCAACCTATA
<i>CBM32-MEL1</i> -R2	CAGGAACATCGTATGGGTATTAAGTAGAATCCAGACCAAGTAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCAGAACACCACCACCAGAAGAGGGTCTCAACCTAT

The underlined are restriction enzyme cutting sites.

### 1.1.2 主要试剂、仪器及培养基

PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶、2×*Taq* 聚合酶、限制性核酸内切酶和 Ligation-Mix 连接酶等购自 TaKaRa 公司; Multi Quick Cloning Mix 同源重组酶购自天霖生物科技(上海)有限公司; PCR 产物纯化、胶回收和质粒抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒、Blue Plus II 蛋白标准

品、Anti-HA Mouse 一抗和 Goat anti-mouse IgG HRP 二抗购自北京全式金生物技术有限公司; Anti-GAPDH Mouse 一抗购自 Proteintech 公司; Clarity™ Western ECL Substrate 显色剂购自 Bio-Rad 公司; 藤黄节杆菌溶壁酶(*Arthrobacter luteus* lyticase)和对硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷(pNPG)购自 Sigma-Aldrich 公司; PNGase F 酶购自北京生夏蛋白技术有限公司; 蛋白酶抑

制剂购自 MedChemExpress 公司。超声破碎仪(南京新辰生物科技有限公司); SDS-PAGE 凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司); 多功能酶标仪(BioTek 公司); ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare 公司); 荧光倒置显微镜(Nikon 公司); 冷冻干燥机(EYELA 公司)。

(1) LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5, 琼脂粉 20 (固体培养基); (2) TB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 12, 酵母粉 24, 甘油 4 mL/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.31,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12.53; (3) SD-Ura 缺陷型培养基(g/L): 无氨基酸酵母氮源(YNB) 6.7, 只缺 Ura 的氨基酸混合物粉末 2, 葡萄糖 20, 琼脂粉 20 (固体培养基); (4) YPAce 培养基(g/L): 酵母粉 20, 蛋白胨 10, 腺嘌呤 0.03, 乙酸钾 20; (5) 产孢培养基(g/L): 乙酸钾 20。

## 1.2 质粒构建

CBM32 来源于类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp. IK-5, 原名 *Paenibacillus fukuinensis* D2)壳聚糖酶(GenBank: BAB64835.1), 基因序列(801 bp)由天霖生物科技(上海)有限公司合成并根据酿酒酵母密码子偏好性进行优化,  $\alpha$ -半乳糖苷酶(MEL1, GenBank: LN997416.1)基因从 *S. cerevisiae* AH109 中克隆, 并去除自身分泌信号肽(氨基酸序列为: MFAFYFLTACISLKGVFG)。在前期研究中, 通过将 Spr1(产孢特异性的外切  $\beta$ -葡聚糖酶, 并参与孢子壁的组装)的分泌信号肽与可溶性蛋白融合, 已成功将几种可溶性酶分泌到孢子壁的二酪氨酸层和壳聚糖层之间<sup>[12,15]</sup>。故本研究为了在 *dit1* $\Delta$  孢子壁表面展示目的蛋白, 将 Spr1 蛋白的信号肽(Spr1 signal peptide, SS)序列(氨基酸序列为: MVSFRGLTLLTLLFTKLVCN)与酿酒酵母中表达目的蛋白的 N 端融合。

重组质粒构建过程如下: 以实验室保存的 GFP 基因为模板, 利用引物 GFP-F/R1 扩增得到 GFP 基因, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接

到 pET-28a 载体上, 得到重组质粒 pET28a-GFP。以 *CBM32* 基因序列为模板, 利用引物 *CBM32*-F1/R1 扩增得到的 *CBM32* 基因同源重组到经 *Bam*H I 酶切后的线性化质粒 pET28a-GFP 上, 得到重组质粒 pET28a-*CBM32*-GFP。以 *CBM32* 和 GFP 基因序列为模板, 利用引物 *CBM32*-F2/R2 和 GFP-F/R2 分别经过 PCR 扩增出 *CBM32* 和 GFP 基因片段, 分别连接到 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的质粒 pRS426-TEFpr-*ss-araA*-3HA 上, 获得重组质粒 pRS426-TEFpr-*ss-CBM32*-3HA 和 pRS426-TEFpr-*ss-GFP*。*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pET28a-*CBM32*-GFP 得到 *CBM32*-GFP 融合基因片段, 替换 pRS426-TEFpr-*ss-GFP* 中的 GFP 基因, 得到质粒 pRS426-TEFpr-*ss-CBM32*-GFP。以 *S. cerevisiae* AH109 菌株基因组 DNA 为模板, 分别利用引物 *MEL1*-F/R1、*MEL1*-F/R2 经过 PCR 扩增得到 *MEL1* 基因, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后替换载体 pRS426-TEFpr-*ss-GFP* 的 GFP 基因, 分别得到重组质粒 pRS426-TEFpr-*ss-MEL1* 和 pRS426-TEFpr-*ss-MEL1*-3HA。以 *MEL1* 基因序列为模板, 分别利用引物 *CBM32-MEL1*-F/R1、*CBM32-MEL1*-F/R2 经过 PCR 扩增得到的不同 *MEL1* 片段分别同源重组到经 *Xho* I 酶切后的线性化质粒 pRS426-TEFpr-*ss-CBM32*-3HA 上, 得到重组质粒 pRS426-TEFpr-*ss-CBM32-MEL1* 和 pRS426-TEFpr-*ss-CBM32-MEL1*-3HA。其中, GFP 和 MEL1 使用接头 (GGGGS)<sub>3</sub><sup>[21]</sup> 分别与 CBM32 的 C 端融合。将上述构建的 pET28a 载体质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)中进行诱导表达; pRS426 载体质粒通过化学转化法导入 *dit1* $\Delta$  二倍体酵母菌株中诱导产孢。

## 1.3 *CBM32*-GFP 和 GFP 基因的表达和重组蛋白的纯化

将含有重组质粒的单菌落接种到 5 mL 含

有卡那霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养 12 h, 然后将 1 mL 种子培养物转移到含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 100 mL TB 培养基中。当细胞  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基  $\beta$ -D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG), 16  $^{\circ}\text{C}$  诱导表达重组蛋白 20 h 后, 9 000 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞, 并重新悬浮在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中, 在冰上进行超声处理。之后, 12 000 $\times$ g 离心 30 min 获得粗酶液并用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱对重组蛋白进行纯化, 用含有 500 mmol/L 咪唑的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)洗脱重组蛋白。最后, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)在超滤管中对纯化的蛋白进行浓缩和脱盐。纯化的重组蛋白在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存在甘油(10%,  $V/V$ )中。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析检测所有重组蛋白的表达水平和纯度。

#### 1.4 CBM32 的表面展示和荧光定位

为了在体外评估 CBM32 与 *dit1 $\Delta$  孢子壁的结合能力, 将终浓度为 0.1 mg/mL 纯化的重组蛋白 CBM32-GFP/GFP 加入到 200  $\mu\text{L}$  乙酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 5.5)中, 再加入 1 mg 纯化冻干的 *dit1 $\Delta$  孢子, 将反应混合物在室温 800 r/min 下孵育 1 h。反应结束后, 使用 PBS 缓冲液(200 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 35 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.74 mol/L NaCl, 53 mmol/L KCl; pH 7.2–7.6)将孢子振荡洗涤 3 次, 每次 10 min, 使用荧光倒置显微镜定性检测 CBM32 的体外结合能力。最后, 将孢子重悬于 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液, 并转移到 96 孔板中, 使用多功能酶标仪检测绿色荧光强度, 其中, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 528 nm<sup>[22]</sup>。为确保可靠性, 将荧光值标准化为孢子的  $OD_{660}$ <sup>[15]</sup>。**

关于本文构建的 pRS426 质粒转化到二倍

体酿酒酵母中的方法, 具体步骤如下: 离心收集培养 12 h 左右的酵母细胞, 加入 50  $\mu\text{L}$  的一步转化液[50% PEG (80%  $V/V$ ); 2 mol/L LiAc (10%  $V/V$ ); 1 mol/L DTT (10%  $V/V$ )]重悬菌体, 加入 200 ng 质粒混匀, 于 45  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min, 之后涂布于 SD-Ura 平板, 于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 3 d。关于二倍体酵母诱导产孢及纯化方法: 依据之前所述方法<sup>[23]</sup>, 采用 2% KAc 诱导产孢之后, 按照说明书加入藤黄节杆菌溶壁酶溶解子囊壳, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 酶解 3 h 左右, 之后采用超声破碎 10–15 min (破碎 5 s, 停 5 s), 获得游离的单个孢子, 再用 0.5% Triton X-100 清洗 2 次后, 冷冻干燥即得冻干纯化孢子,  $-20^{\circ}\text{C}$  储存待用, 用天平称取冻干孢子粉末进行定量分析。

为了评估 CBM32 在 *dit1 $\Delta$  孢子中的定位, 将重组质粒 pRS426-TEFpr-ss-GFP 和 pRS426-TEFpr-ss-CBM32-GFP 分别转化到 *dit1 $\Delta$  酵母中诱导产孢, 并离心收集孢子, 用 PBS 缓冲液重悬孢子在荧光倒置显微镜下进行荧光定位观察。对于检测 CBM32 与 *dit1 $\Delta$  孢子壁结合能力的研究, 以 pRS426-TEFpr-ss-CBM32-GFP 转化 AN120 野生型酵母孢子为阳性对照, 取 2 mg 冻干纯化孢子用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液在 500 r/min 振荡条件下, 洗涤 3 次, 每次 8–10 min。关于所有用荧光显微镜拍摄的图片, 每组图片都保证在相同荧光强度以及相同曝光时间下进行拍摄。对于荧光定量的数据化分析, 我们统计了 3 组以上不同视野拍摄的荧光图, 采用 NIS-Elements AR Analysis 软件对相同大小区域范围内平均单个孢子的荧光强度进行定量分析。***

#### 1.5 蛋白免疫印迹分析

将 10 mg 纯化冻干的孢子悬浮于 300  $\mu\text{L}$  蛋白提取缓冲液[0.2 mol/L 山梨醇, 50 mmol/L

Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/L EDTA]中, 加入玻璃珠和蛋白酶抑制剂, 用样品冷冻研磨机破碎 40 min。4 000×g 离心 15 min 后获得的含有 100 μg 总蛋白的上清液用于 Western blotting 检测(5% 浓缩胶和 10% 分离胶)。PNGase F 去糖基化处理过程: 将已加 loading buffer 变性的蛋白样品取 16 μL, 加入 10% NP 40 和 glyco buffer 各 2 μL, 最后加入 0.2 μL PNGase F, 在 37 °C 静置处理 2 h 左右, 处理结束后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。研究中所用一抗是小鼠抗 HA 抗体, 二抗为辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗小鼠 IgG, Anti-GAPDH 抗体用作内参, 所用抗体均用 5% 脱脂奶粉稀释, 且稀释比例为 1:5 000, 最后, 用 ImageQuant™ LAS 4000 显影。

### 1.6 MEL1 酶活测定

$\alpha$ -半乳糖苷酶活性测定方法: 以 *pNPG* 为底物通过酶标仪检测水解产物对硝基苯酚(*pNP*)的产生来确定。标准反应体系如下: 2 mg 冻干纯化孢子悬浮于 150 μL 柠檬酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH 4.0)中, 40 °C 预处理 5 min, 然后加入 50 μL 20 mmol/L *pNPG*, 40 °C 孵育 10 min, 最后加入 800 μL 250 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。通过离心收集上清液, 并用酶标仪在 405 nm 处测量从 *pNPG* 释放的 *pNP* 的量。一个酶活力单位(U)定义为 1 min 从其底物 *pNPG* 产生 1.0 μmol *pNP* 的酶量<sup>[24]</sup>。为检测培养上清液中游离 MEL1 的活性, 将上清液用 Amicon-Ultra 超滤管浓缩 100 倍, 取 10 μL 用于检测活性<sup>[23]</sup>。

### 1.7 温度和 pH 对孢子表面展示 CBM32-MEL1 酶活的影响

使用上述标准反应体系在 25–60 °C 不同温度下检测温度对孢子表面展示 MEL1 活性的影响。对于温度稳定性分析, 将孢子置于 25–60 °C 不同温度下静置孵育 10 h 之后, 使用标准反应

体系检测残余相对活性。在 100 mmol/L 缓冲液中检测 pH 对 MEL1 活性的影响, pH 范围为 1.0–10.0 [柠檬酸盐缓冲液(pH 1.0–5.0); 磷酸盐缓冲液(pH 6.0–7.0); Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–10.0)]。对于 pH 稳定性分析, 将孢子置于上述不同 100 mmol/L pH (2.0–10.0)缓冲液中, 在 4 °C 条件下静置孵育 8 h 之后, 使用标准反应体系检测残余相对活性。上述研究均以游离 MEL1 为对照, 误差线来自 3 个独立实验, 温度和 pH 影响以最高活性定义为 100%, 温度稳定性和 pH 稳定性研究均以未处理样品的酶活定义为 100%, 计算相对活性。

### 1.8 孢子表面展示 CBM32-MEL1 重复使用能力检测

对于孢子表面展示 CBM32-MEL1 可重复使用能力测定, 取 5 mg 冻干纯化孢子悬浮于 300 μL 柠檬酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH 4.0)中, 每轮与 100 μL 20 mmol/L *pNPG* 在 40 °C 反应 15 min 后, 通过在 7 000×g 离心 5 min 从溶液中回收孢子, 并在下一轮反应之前用 100 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)充分洗涤 2–3 次。第 1 次反应的酶活定义为 100%<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 CBM32-GFP 的表达以及 CBM32 体外结合能力分析

为了构建基于天然“壳聚糖球”的高效表面展示系统, 寻找能够有效结合 *dit1Δ* 孢子最外层壳聚糖层的亲和蛋白是最重要的先决条件。本研究中, 我们选择了属于 CBM32 家族的壳聚糖结合模块作为亲和蛋白, 类芽孢杆菌来源的 CBM32 包含 DD1 和 DD2 两个在 C 端串联连接的壳聚糖结合模块, 这种协同作用增强了对底物壳聚糖的亲和能力<sup>[20]</sup>。为了检测 CBM32 与 *dit1Δ* 孢子壳聚糖层的体外结合能力, 首先, 我



他们将 CBM32 融合在 GFP 的 N 端, 构建到含有 His 标签的 pET28a 载体上, 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中进行诱导表达, 并用 SDS-PAGE 进行分析。结果如图 2A 所示, 融合基因大小为 1 539 bp, 与诱导前样品相比, 在 50–70 kDa 之间有明显的蛋白表达条带出现, 与理论蛋白大小为 60.8 kDa 相符, 并且大多数以可溶性蛋白形式存在于上清液中, 经过  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱得到纯化蛋白 CBM32-GFP。

将纯化的 CBM32-GFP/GFP 蛋白与 *dit1Δ* 孢子共孵育, 体外验证 CBM32 的结合能力。显微镜观察以及荧光强度检测结果表明 (图 2B–2C), 与 *dit1Δ* 孢子壁结合的 CBM32-GFP 的荧光强度远高于 GFP 的荧光强度。值得注意的是, 即使使用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液多次洗涤, CBM32-GFP 的荧光强度也没有显著降低, 其荧光强度是 GFP 的 4.6 倍 (图 2C)。研究表明, CBM32 通过静电相互作用和

氢键作用与壳聚糖特异性结合<sup>[20]</sup>, 而未融合 CBM32 的 GFP 则以弱静电相互作用与壳聚糖的结合能力较弱。以上研究结果表明, CBM32 在体外与 *dit1Δ* 孢子壁具有较强的亲和能力。

## 2.2 CBM32 在酵母孢子内的表达和定位

为了确定 CBM32 在 *dit1Δ* 孢子中的表达情况, 在 CBM32 的 C 端融合 3HA 标签, 用蛋白提取缓冲液提取酵母孢子蛋白, 进行 Western blotting 检测。结果如图 3A 所示, 理论蛋白大小为 35.5 kDa, 但在 40.0 kDa 左右检测到 2 条蛋白条带。通过对类枯草芽孢杆菌 CBM32 的氨基酸序列分析, 发现含有 5 个潜在的 N-糖基化位点 (分别是 CBM32 氨基酸序列中的第 5、74、81、210 和 218 位天冬酰胺), 用去糖基化酶 PNGase F 处理蛋白样品, 发现处理之后的单一蛋白特异性条带在 35.5 kDa 左右, 因此表明 CBM32 因在酵母孢子中发生糖基化使得蛋白分子量变大。

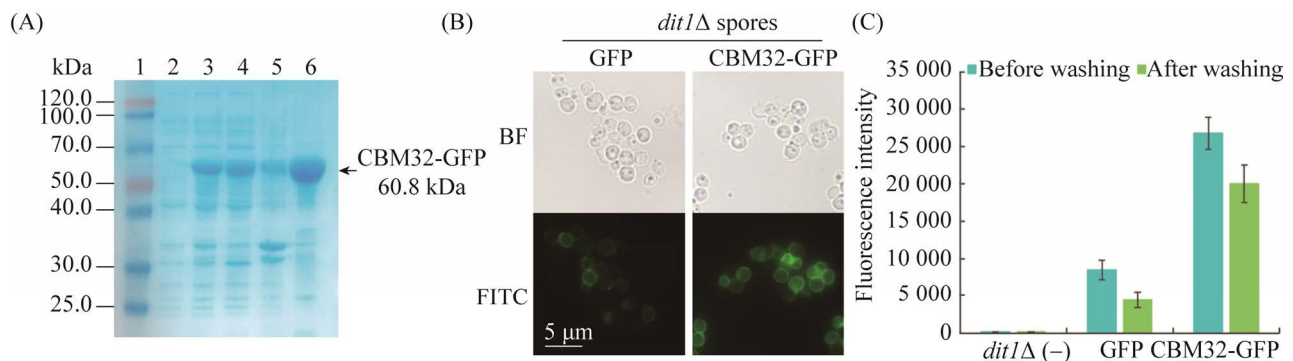
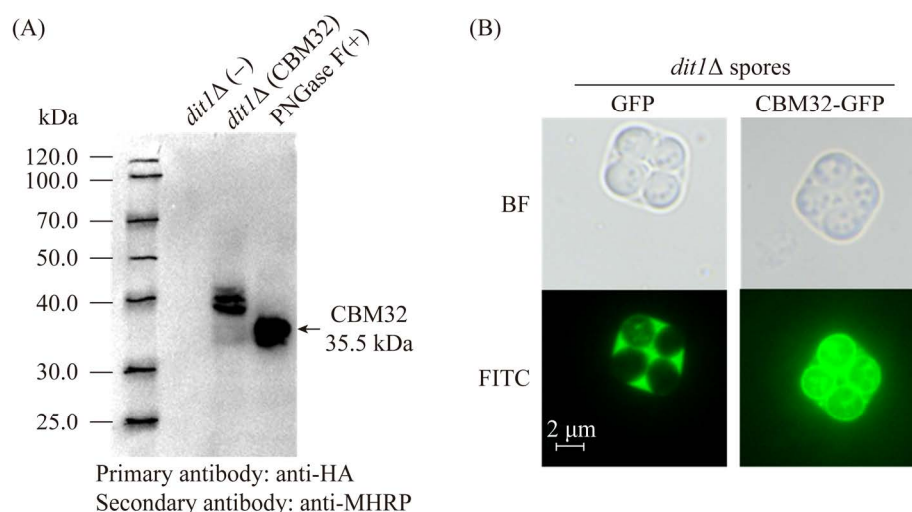


图 2 CBM32-GFP 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达以及 CBM32 与 *dit1Δ* 孢子壁的体外结合能力

Figure 2 CBM32-GFP expressed in *E. coli* BL21(DE3) and binding ability of CBM32 with *dit1Δ* spore wall *in vitro*. A: SDS-PAGE analysis of CBM32-GFP expression and purification. lane 1: protein marker; lane 2: the whole cells extraction before induction; lane 3: the whole cells extraction after induction; lane 4: the supernatant; lane 5: the precipitation after cell disruption; lane 6: the purified protein of CBM32-GFP. B: the fluorescence images analysis of the binding strength of the CBM32-GFP fusion protein with the *dit1Δ* spore wall after washing. Spores were observed under a bright-field (BF) or fluorescein isothiocyanate (FITC) microscope. Bar, 5  $\mu\text{m}$ . C: quantitative detection of the fluorescence intensity of CBM32-GFP bound to *dit1Δ* spore wall; Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.



**图3 CBM32 在 *dit1Δ* 酵母孢子体内的表达(A)和定位(B)**

Figure 3 Expression (A) and localization (B) of CBM32 in *dit1Δ* yeast spores *in vivo*. Bar: 2  $\mu$ m. A: Western blotting detection of CBM32 expression; PNGase F(+): CBM32 was treated by PNGase F enzyme.

将 N 端融合 Spr1 分泌信号肽(SS)的融合蛋白 CBM32-GFP 表达在 *dit1Δ* 孢子中,并以表达 N 端融合 SS 的 GFP 孢子为对照,通过荧光显微镜检测 CBM32 在 *dit1Δ* 孢子中的定位。结果如图 3B 所示,表达 GFP 的荧光定位在子囊胞质中,绿色荧光泄漏在孢子与子囊壁之间;而表达 CBM32-GFP 的孢子,其绿色荧光大多存在于 *dit1Δ* 孢子壁上,未发现泄露在子囊胞质中,说明 CBM32 主要表达且定位在 *dit1Δ* 孢子壁上,证明 CBM32 能在 *dit1Δ* 孢子内与壳聚糖层结合,而少量分布在孢子内部的荧光具体原因尚不清楚。

### 2.3 CBM32 与 *dit1Δ* 孢子壁结合能力评估

基于 CBM32 在 *dit1Δ* 酵母孢子体内成功定位于孢子壁上,接下来研究 CBM32 在体内与 *dit1Δ* 孢子壁的结合能力。将上述荧光定位成功的孢子进行纯化,去除子囊壁,并以表达 CBM32-GFP 融合蛋白的野生型 AN120 菌株的孢子作为阳性对照,AN120 孢子的最外层为二酪氨酸层。前期研究表明,该孢子表达的固定化酶存在于二酪氨酸层和壳聚糖层之间,而二

酪氨酸层能有效阻挡蛋白的泄漏,且孢子经含有去污剂的溶液洗涤之后对蛋白没有影响<sup>[15]</sup>。本研究将上述纯化后的孢子经含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 缓冲液洗涤数次后用于荧光显微镜观察。结果如图 4A 所示,表达 GFP 的 *dit1Δ* 孢子由于 GFP 与 *dit1Δ* 孢子结合能力较弱,故经洗涤后大部分荧光蛋白被洗掉;而表达 CBM32-GFP 的 *dit1Δ* 孢子经洗涤之后保留了大部分的荧光,与表达在 AN120 孢子中的荧光蛋白结合效果类似。

通过对洗涤后的孢子荧光图进一步定量分析并数据化可知,表达 CBM32-GFP 的 *dit1Δ* 孢子的荧光强度是表达 GFP 的 2.4 倍,荧光强度差别明显,而表达 CBM32-GFP 的 AN120 野生型孢子仅比其高 1.3 倍(图 4B),两者差别不大。因此,表明 CBM32 与 *dit1Δ* 孢子壁具有较好的体内结合能力,能将蛋白较好地“固定”在 *dit1Δ* 孢子表面。综上所述,CBM32 作为壳聚糖结合模块,其较强的底物亲和能力与 *dit1Δ* 孢子壁壳聚糖层紧密结合,可以作为 *dit1Δ* 孢子表面展示蛋白的有效“桥梁”。

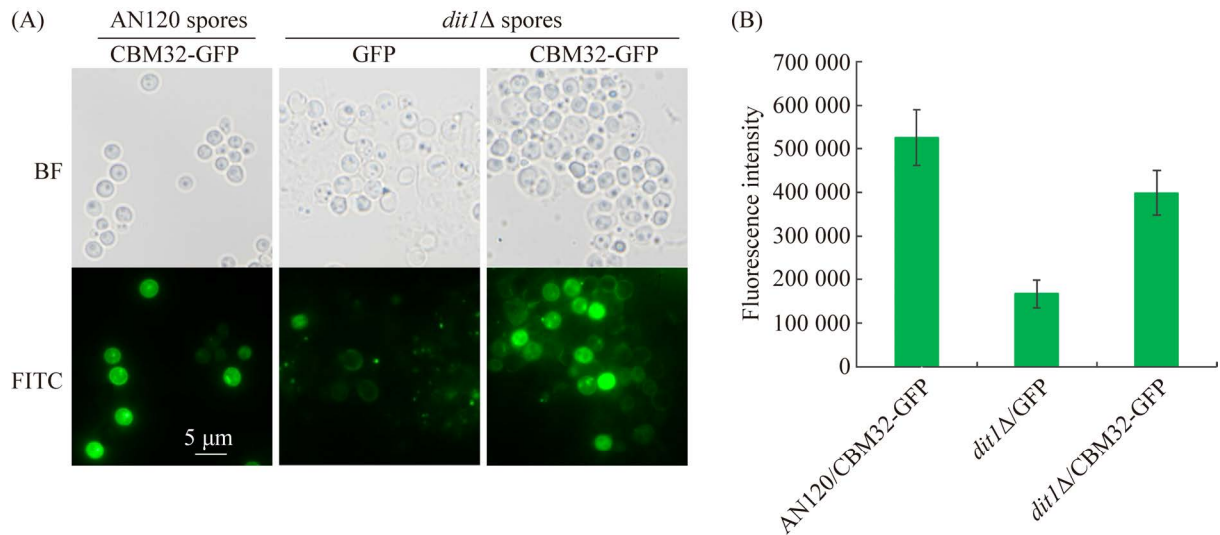


图 4 CBM32 与 *dit1Δ* 酵母孢子壁的体内结合能力

Figure 4 Binding ability of CBM32 to *dit1Δ* yeast spore wall *in vivo*. Bar: 5  $\mu$ m. A: the fluorescence images analysis of the binding strength of the CBM32-GFP fusion protein with the *dit1Δ* spore wall after PBS washed. Spores were observed under a bright-field (BF) or fluorescein isothiocyanate (FITC) microscope. Bar: 5  $\mu$ m. B: quantitative detection of the fluorescence intensity of CBM32-GFP binding to the *dit1Δ* spore wall after PBS washed; Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

#### 2.4 验证 CBM32-MEL1 在孢子表面展示体系中的表达

CBM32 经过体外和孢子内验证之后, 我们将酿酒酵母来源的多糖基化位点修饰的四聚体

$\alpha$ -半乳糖苷酶替换 GFP, 研究 CBM32 表面展示酶的应用价值。同样地, 我们在 MEL1 的 C 端融合 3HA 标签, Western blotting 检测 CBM32-MEL1 在表面展示体系中的表达。结果如图 5A 所示,

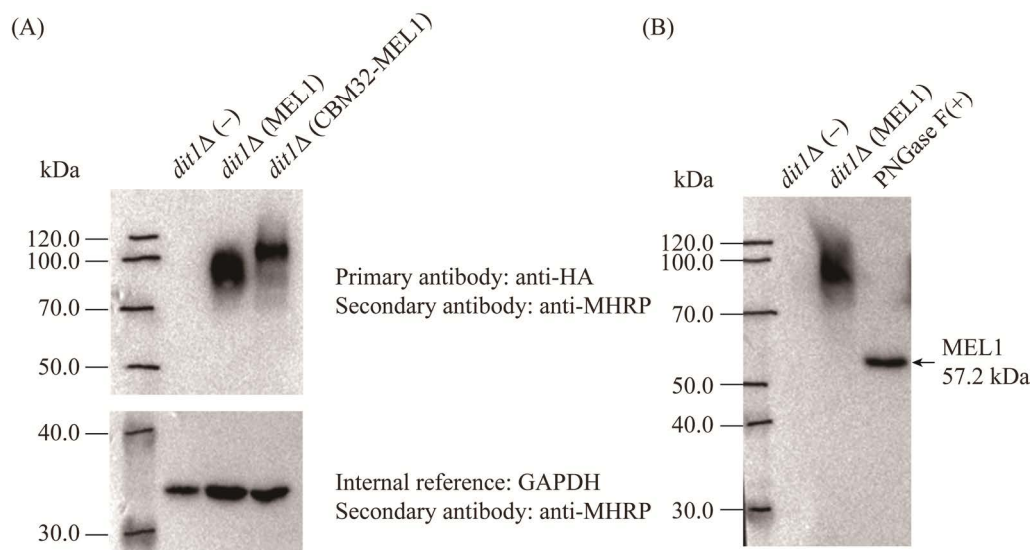


图 5 *dit1Δ* 孢子表面展示 MEL1 和 CBM32-MEL1

Figure 5 Surface display of MEL1 and CBM32-MEL1 in *dit1Δ* spore. A: Western blotting detection of MEL1 (57.2 kDa) and CBM32-MEL1 (86.8 kDa) expression; B: MEL1 was treated by PNGase F enzyme.

在 70–100 kDa 之间检测到 MEL1 的表达, 在 100–120 kDa 之间检测到 CBM32-MEL1 融合蛋白的表达。*GAPDH* 作为一个管家基因, 是常用的内参之一, 本文利用 *GAPDH* 将蛋白上样量均一化。根据 *MEL1* 的基因长度预测其蛋白条带大小为 57.2 kDa, 而检测到的特异性蛋白大小远远大于其理论的条带。对 MEL1 的氨基酸序列进行分析, 发现含有 9 个潜在的 N-糖基化位点(分别是 MEL1 氨基酸序列中的第 105、175、270、370、403、413、422、435 和 454 位天冬酰胺), 因此推断该蛋白在酵母孢子中发生了糖基化。图 5B 的结果验证了该猜想, 用去糖基化酶 PNGase F 处理蛋白样品, 发现处理之后的蛋白特异性条带在 50–70 kDa 之间, 条带单一, 与糖基化的目的条带相比差别较大, 发生糖基化的条带由于糖基化程度不同发生弥散。

## 2.5 孢子表面展示 CBM32-MEL1 的酶活测定

基于 MEL1 和 CBM32-MEL1 在孢子表面展示体系中成功表达, 以 *pNPG* 为底物检测其酶活。结果如图 6A 所示, 表面展示

CBM32-MEL1 的孢子是 MEL1 孢子酶活的 1.7 倍。通过富集产孢培养基里的游离酶, 检测并计算了整个产孢体系的总酶活, 结果如图 6B 所示, 表面展示 CBM32-MEL1 的总酶活虽然略低于表面展示 MEL1 的总酶活, 但表面展示 CBM32-MEL1 泄漏在培养基中的酶仅为总酶活的 2.91%, 大多数酶被固定在孢子表面; 而没有融合 CBM32 的孢子酶活与泄漏在培养基中的酶活相当, 上述结果表明 CBM32 通过将体系中更多的酶固定在孢子表面, 从而提高了孢子表面展示酶的活性, 最高酶比活力达到 460.59 U/g DCW。

## 2.6 温度和 pH 对孢子表面展示 CBM32-MEL1 酶活的影响

以游离 MEL1 为对照, 首先检测了不同温度(25–60 °C)对孢子表面展示 CBM32-MEL1 酶活的影响。结果如图 7A 所示, 孢子表面展示 CBM32-MEL1 和游离 MEL1 的最适温度都为 40 °C。此外, 孢子表面展示 CBM32-MEL1 在 40–60 °C 表现出更高的相对酶活, 结合图 7C 的温度稳定性分析结果, 将孢子置于不同温度下孵育 10 h 之后, 在 60 °C 高温条件下, 孢子

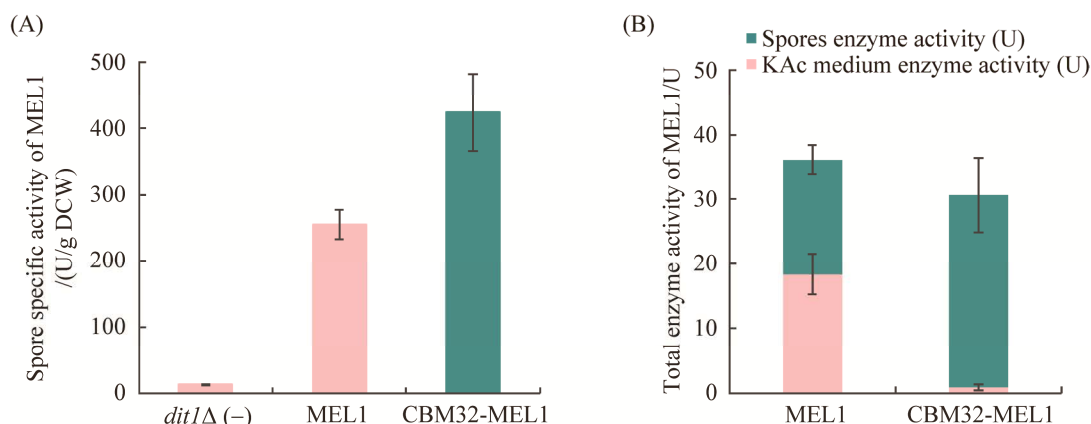


图 6 *dit1Δ* 孢子表面展示 MEL1 和 CBM32-MEL1 的活性

Figure 6 Activity of MEL1 and CBM32-MEL1 displayed on the *dit1Δ* spore surface. A: spores activity; B: total activity of during sporulation; Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

表面展示 CBM32-MEL1 仍保留 90%以上的相对酶活, 而游离 MEL1 保留约 75%的酶活, 表明孢子表面展示 CBM32-MEL1 比游离 MEL1 具有更好的温度稳定性。接着, 研究了不同 pH (1.0–10.0)对孢子表面展示 CBM32-MEL1 的影响。从图 7B 可以看出, 孢子表面展示 CBM32-MEL1 出现了 pH 偏移, 其最适 pH 为 4.0, 而游离 MEL1 最适 pH 为 3.0, 孢子表面展示 CBM32-MEL1 最适 pH 向中性偏移, 且在 pH 4.0–8.0 之间表现出更高的相对活性。为了进一步检测其

pH 稳定性, 将表面展示 CBM32-MEL1 的孢子和游离酶在不同 pH (2.0–10.0)下孵育 8 h, 结果如图 7D 所示, 两者的最适储存 pH 都为 4.0, 而孢子表面展示 CBM32-MEL1 表现出更高的 pH 稳定性, 且剩余酶活都能保持在 65%以上, 而游离 MEL1 在 pH 10.0 时, 仅剩约 40%的相对酶活。从以上结果可以得出结论, 本研究构建的新型表面展示体系不仅能提高孢子固定化酶的活性, 使更多的酶展示在孢子表面, 还能提高酶的温度稳定性和 pH 稳定性。

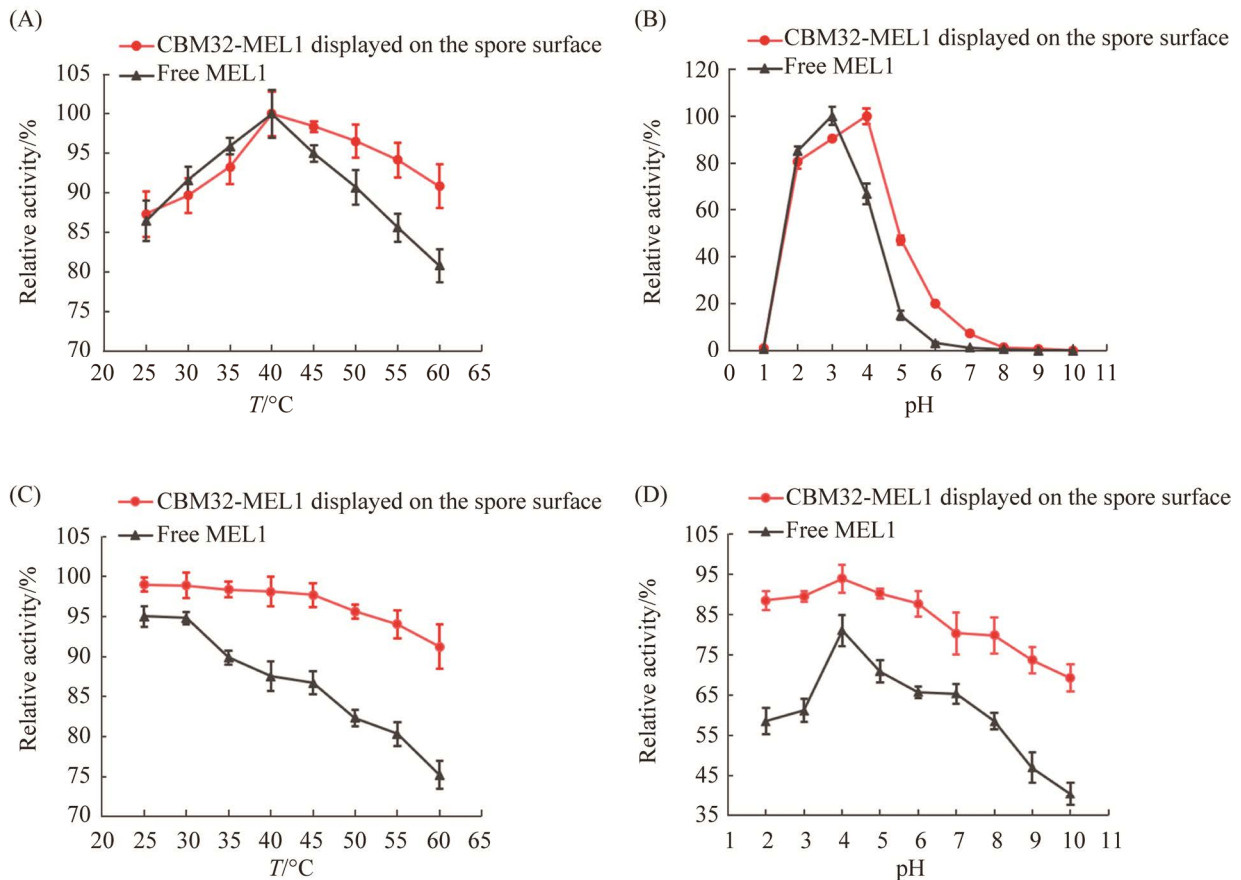


图 7 温度和 pH 对 *dit1Δ* 孢子表面展示 CBM32-MEL1 和游离 MEL1 活性的影响

Figure 7 Effect of temperature and pH on the activity of displayed CBM32-MEL1 on the *dit1Δ* spore surface and free MEL1. A: effect of temperature; B: effect of pH; C: thermostability; D: pH stability. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

## 2.7 表面展示 CBM32-MEL1 的孢子重复使用能力研究

在工业生产中,可重复使用性能是评估固定化酶的重要指标。本研究中,孢子表面展示 CBM32-MEL1 的重复使用性能被评估,并以未融合 CBM32 的表面展示 MEL1 为对照,经过 7 轮使用检测每轮残留的活性。结果如图 8 所示,表面展示 MEL1 的孢子经过 7 轮使用之后,其剩余酶活低于初始酶活的 40%,而表面展示 CBM32-MEL1 的孢子在相同条件处理之后,其酶活还保留 60%以上,这一结果表明,CBM32 结合模块将酶有效地结合在孢子壁上,显著提高了重复使用效率,为酵母孢子表面展示酶工业化应用提供了保障。

## 3 讨论与结论

我们基于 CBM32 建立了一个新型酿酒酵母孢子表面展示系统。首先,将 GFP 融合在 CBM32 的 C 端,在 *E. coli* BL21(DE3) 体系中表达纯化,体外初步验证了 CBM32 与 *dit1Δ* 孢子

壁的亲和能力;将 CBM32 在 *dit1Δ* 孢子中表达,通过 Western blotting 以及荧光定位证实了 CBM32 在体内具有与孢子壁壳聚糖层紧密结合的能力。将 *S. cerevisiae* AN109 来源的多糖基化位点修饰的四聚体 MEL1 应用到孢子表面展示体系中,与以往通过静电吸附作用展示在孢子表面的 MEL1 相比,本研究建立的孢子表面展示 CBM32-MEL1 体系将孢子酶活提高了 68.65%,最高酶比活力达到 460.59 U/g DCW。产孢体系中的总酶活结果表明,更多的酶被固定在孢子表面,这和 CBM32 与孢子壁的高亲和能力有关。孢子表面展示 CBM32-MEL1 最适反应条件为 40 °C, pH 4.0 (100 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液),与游离酶相比,孢子表面展示 CBM32-MEL1 具有更高的温度稳定性以及更广泛的 pH 稳定性。此外,表面展示 CBM32-MEL1 的孢子重复使用性能显著高于通过静电吸附所展示 MEL1 孢子的性能。总之,本研究建立的孢子表面展示系统解决了以往酵母孢子固定化酶活性低,重复使用能力差的问题<sup>[12,15]</sup>。

此外,酵母孢子表面展示体系与芽孢表面展示体系以及酶固定化纳米材料相比具有优势。目前,大多数枯草芽孢杆菌芽孢展示体系是利用芽孢壁的衣壳蛋白作为锚定蛋白,将目标蛋白与锚定蛋白进行融合以实现目标蛋白展示在芽孢表面<sup>[2,6-7]</sup>,而该方法不仅容易使被展示蛋白因折叠在膜内或嵌入膜上导致活性降低,而且对于真核来源的多糖基化位点修饰的复杂蛋白在原核细胞展示体系中不匹配,可能会失活。本研究利用 CBM32 与酿酒酵母孢子壁壳聚糖层的特异性高亲和能力,实现将目标蛋白展示在酵母孢子表面,这样避免了展示蛋白嵌入膜内或在胞内折叠,不破坏蛋白的空间构象,提高了蛋白的完整性和催化效率;此外,酿酒酵母孢子为真核来源的蛋白提供了翻译后

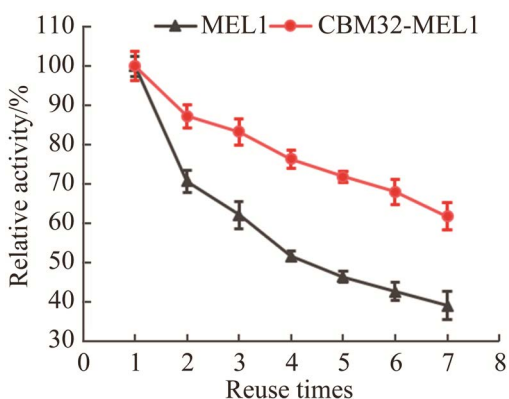


图 8 *dit1Δ* 孢子表面展示 MEL1 和 CBM32-MEL1 的重复使用能力

Figure 8 Reusability of MEL1 and CBM32-MEL1 displayed on the *dit1Δ* spore surface. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

修饰过程(糖基化和二硫键异构化等),保证了真核来源蛋白的生物活性;酿酒酵母孢子比枯草芽孢的细胞外表面积大,其表面能展示更多的蛋白,提高了展示效率,可用于多酶组装体系的构建。与普通酵母营养细胞表面展示系统相比,酿酒酵母孢子表面展示体系抗逆性好,增强了表面展示蛋白的稳定性以及可操作性,使其能耐受高温、酸碱、蛋白酶 K 以及有机试剂等<sup>[15-16]</sup>。此外,休眠的酵母孢子代谢不活跃,重复使用能力较好,在生物催化反应过程中不会出现副产物等,是一种生命活性材料;酿酒酵母孢子表面展示的蛋白不需要跨膜转运,提高了蛋白的展示效率。与大多数固定化酶纳米材料相比<sup>[25-26]</sup>,我们建立的展示体系是一种潜在的工程生命材料,在产孢的同时实现了蛋白的表达和固定化。除了不需要购买商品酶、不需要单独表达和纯化蛋白等优势外,酵母孢子作为休眠体,在一定条件下可以萌发形成单倍体的营养细胞,经过融合可再次产孢,是一种潜在的生命材料,可实现材料的再生和循环。

酿酒酵母作为公认的安全菌株,因此本研究建立的展示体系不仅可用于生物催化,还能广泛应用于食品、生物医药、材料以及环境治理等领域。后续我们会将 MEL1 替换成其他多亚基真核来源的复杂蛋白,如 LXYL-P1-2,该酶来源于香菇,用于酶法合成紫杉醇,是一个含有多糖基化位点修饰的四聚体复杂蛋白,在之前的研究中,由于该蛋白分子量过大,未能实现在毕赤酵母中的分泌表达<sup>[27]</sup>,且目前还没有关于该酶在细胞表面展示的成功案例。此外,也可将该展示体系与支架蛋白联合起来用于酶的级联反应,开发生物活性材料。

## 参考文献

- [1] Lee SY, Choi JH, Xu ZH. Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(1): 45-52.
- [2] Liu HL, Yang SJ, Wang XH, Wang TF. Production of trehalose with trehalose synthase expressed and displayed on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 100.
- [3] 张莉. 毕赤酵母 GPI 型细胞壁蛋白基因的挖掘及功能研究. 华南理工大学博士学位论文, 2014.
- [4] 蔡锷, 储引娣, 黄丕英, 韦良婉, 范恩国. 基于蛋白质跨外膜自转运系统的细菌细胞表面蛋白展示技术研究进展. *微生物学报*, 2022, 62(2): 458-475. Cai K, Chu YD, Huang PY, Wei LW, Fan EG. Trend of bacterial cell surface display: the autodisplay technology. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 458-475. (in Chinese)
- [5] Yang XY, Tang HT, Song MH, Shen Y, Hou J, Bao XM. Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 85.
- [6] 李威杰, 刘明刚, 李建臻, 潘康成. 枯草芽孢杆菌表面展示技术用于黏膜疫苗的研究进展. *微生物学报*, 2022, 62(1): 65-76. Li WJ, Liu MG, Li JZ, Pan KC. Research progress on *Bacillus subtilis* surface display technology for mucosal vaccine. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 65-76. (in Chinese)
- [7] Zhang XP, Al-Dossary A, Hussain M, Setlow P, Li JH. Applications of *Bacillus subtilis* spores in biotechnology and advanced materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(17): 01096-20.
- [8] Pickarska I, Rytka J, Rempola B. Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochimica Polonica*, 2010, 57(3): 241-250.
- [9] Briza P, Ellinger A, Winkler G, Breitenbach M. Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(23): 11569-11574.
- [10] Zhang HN, Tachikawa H, Gao XD, Nakanishi H. Applied usage of yeast spores as chitosan beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 5098-5105.
- [11] Lin CP, Kim C, Smith SO, Neiman AM. A highly redundant gene network controls assembly of the outer spore wall in *S. cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 2013, 9(8): e1003700.
- [12] Li ZJ, Li Y, Duan SL, Liu J, Yuan P, Nakanishi H, Gao XD. Bioconversion of D-glucose to D-psicose with immobilized D-xylose isomerase and D-psicose 3-epimerase on *Saccharomyces cerevisiae* spores.

[1] Lee SY, Choi JH, Xu ZH. Microbial cell-surface

- Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42(8): 1117–1128.
- [13] 乔颖鑫, 李子杰, 中西秀树, 高晓冬. 酿酒酵母孢子表面展示系统的构建及应用. *食品与发酵工业*, 2017, 43(6): 8–14.  
Qiao YX, Li ZJ, Nakanishi H, Gao XD. Construction and application of a novel surface display system on yeast spore. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(6): 8–14. (in Chinese)
- [14] Chen L, Holmes M, Schaefer E, Mulchandani A, Ge X. Highly active spore biocatalyst by self-assembly of co-expressed anchoring scaffoldin and multimeric enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(3): 557–564.
- [15] Liu XX, Li ZJ, Chen Z, Wang N, Gao YH, Nakanishi H, Gao XD. Production of L-ribulose using an encapsulated L-arabinose isomerase in yeast spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(17): 4868–4875.
- [16] Rao J, Zhang RZ, Liang HB, Gao XD, Nakanishi H, Xu Y. Efficient chiral synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* spore encapsulation of *Candida parapsilosis* Glu228Ser(S)-carbonyl reductase II and *Bacillus* sp. YX-1 glucose dehydrogenase in organic solvents. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 87.
- [17] Das SN, Wagenknecht M, Nareddy PK, Bhuvanachandra B, Niddana R, Balamurugan R, Swamy MJ, Moerschbacher BM, Podile AR. Amino groups of chitosan are crucial for binding to a family 32 carbohydrate binding module of a chitosanase from *Paenibacillus elgii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(36): 18977–18990.
- [18] Qin Z, Lin S, Qiu YJ, Chen QM, Zhang Y, Zhou JC, Zhao LM. One-step immobilization-purification of enzymes by carbohydrate-binding module family 56 tag fusion. *Food Chemistry*, 2019, 299: 125037.
- [19] Lin S, Qin Z, Chen QM, Fan LQ, Zhou JC, Zhao LM. Efficient immobilization of bacterial GH family 46 chitosanase by carbohydrate-binding module fusion for the controllable preparation of chitooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(24): 6847–6855.
- [20] Shinya S, Nishimura S, Kitaoku Y, Numata T, Kimoto H, Kusaoke H, Ohnuma T, Fukamizo T. Mechanism of chitosan recognition by CBM32 carbohydrate-binding modules from a *Paenibacillus* sp. IK-5 chitosanase/glucanase. *The Biochemical Journal*, 2016, 473(8): 1085–1095.
- [21] Lv XQ, Wu YK, Tian RZ, Gu Y, Liu YF, Li JH, Du GC, Ledesma-Amaro R, Liu L. Synthetic metabolic channel by functional membrane microdomains for compartmentalized flux control. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 106–118.
- [22] Yang XY, Liu JH, Zhang J, Shen Y, Qi QS, Bao XM, Hou J. Quorum sensing-mediated protein degradation for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 85–94.
- [23] Shi LB, Li ZJ, Tachikawa H, Gao XD, Nakanishi H. Use of yeast spores for microencapsulation of enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4502–4510.
- [24] Álvarez-Cao ME, Cerdán ME, González-Siso MI, Becerra M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -galactosidase production and application in the degradation of raffinose family oligosaccharides. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 172.
- [25] Bayramoglu G, Celikbicak O, Kilic M, Yakup Arica M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130699.
- [26] Yu XX, Zhang ZY, Li JZ, Su YJ, Gao MY, Jin TW, Chen G. Co-immobilization of multi-enzyme on reversibly soluble polymers in cascade catalysis for the one-pot conversion of gluconic acid from corn straw. *Bioresource Technology*, 2021, 321: 124509.
- [27] Cheng HL, Zhao RY, Chen TJ, Yu WB, Wang F, Cheng KD, Zhu P. Cloning and characterization of the glycoside hydrolases that remove xylosyl groups from 7- $\beta$ -xylosyl-10-deacetyltaxol and its analogues. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(8): 2236–2248.