

一种新的酸性磷酸酯酶基因在酿酒酵母中的表达

林 影

(华南理工大学生物工程研究所, 广州)

高重焕 依田幸司 山崎真狩

(东京大学农芸化学学科微生物室, 日本)

脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)的酸性磷酸酯酶的基因曾被克隆到酿酒酵母(*S.cerevisiae*), 并进行核酸顺序测定和分析, 导出对应的氨基酸序列, 发现其与酿酒酵母的Ph03和Ph05酸性磷酸酯酶及 *E.coli*的碱性磷酸酯酶没有同源性, 而被认为属于一种新的基因系。

材料与 方法

(一) 材料

- 1. 菌种: *E.coli*菌株 JM109和 *S.cerevisiae* NA87-11A分别为不同质粒的受体细胞。
- 2. 材料: 寡核苷酸纯化分离柱系应用生物系统公司提供。pIKD50 质粒由日本东京大学农芸化学学科微生物室 Nagamatsu, T.构建, 包含pUC19和*S.cerevisiae*的 *trp I*-*ars I*片段, 以及 *K. fragilis* Y610 中的 2.8kb *Sau3A I*的基因。

(二) 方法

- 1. 寡核苷酸的制备: 寡核苷酸通过设计和化学合成, 用柱层析分离纯化, 再退火进行碱基配对成双链DNA。
- 2. 质粒的构建: 从pIKD50切下 4.5kb 的 *BamH I*-*Pvu I*限制片段, 加入 *tac* 启动子和 *Apm<sup>r</sup>* 标记的片段, 构成pLIN2, 其中*tac*启动子中的SD序列与起始密码子间距为 137bp(如图 1 所示)。改造pLIN2, 删除SD到起始密码子附近 163bp的DNA片段, 插入 40bp 的化学合成寡核苷酸, 构成pLIN4(如图 2 所示), 使 SD 至起始密码子间距减至16bp。

用*BamH I*和*Sal I*切割pLIN4, 取 2.7kb限

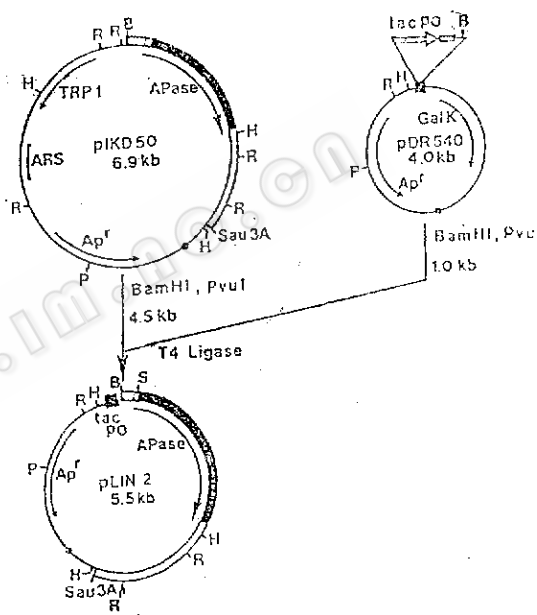


图 1 质粒 pLIN2的构建

制片段, 由含*S.cerevisiae*的GAL7启动子基因片段取代 pLIN4的*tac* 启动子, 再克隆到 YEP24 中, 形成质粒pLIN5, 如图 3。

- 3. 转化和培养: 使用  $\text{CaCl}_2$  转化法, 使 pLIN2和pLIN4转化入 *E.coli* JM109 中, 在含 *Apm<sup>r</sup>* 的琼脂培养基中生长和初选克隆子, 再根据平板染色分析和质粒图谱分析, 选出含目的基因的菌落。在营养肉汁液体培养基中接种, 生长至  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$ 时, 添加1.0 mmol/L异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 继续培养, 至  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.0$ 时 [2], 测定酶蛋白的生产。

细胞 *S.cerevisiae* NA87-11A 用  $\text{CaCl}_2$ -

本文于1990年11月24日收到。



用, 用分光光度法测量酶活力。一个酶活力单位表示为: 在酶促反应条件下, 每分钟产生  $1\mu\text{mole}$  硝基苯酚所需的酶量。

6. 蛋白质的分析: 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析蛋白质, 凝胶浓度为  $10\%$  [5]。

## 结果与讨论

### (一) *K. fragilis* 酸性磷酸酯酶基因的表达

质粒 pLIN2 和 pLIN4 被转化入 *E. coli* 后, 进行培养和诱导产酶, 分别检测了酸性磷酸酯酶的活力, 并分析了成熟细胞的蛋白质分泌情况, 结果没有发现酶蛋白的表达(图表略)。

因此, 用 *S. cerevisiae* 为受体, 把 GAL7 启动子作用下的质粒 pLIN5 转化入受体细胞中, 通过平板染色分析(如图 4 所示), 选择有分泌染

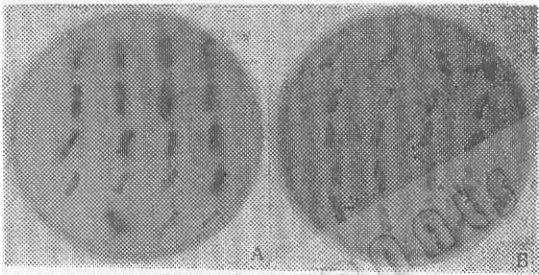


图 4 平板染色分析

A. 加半乳糖 B. 不加半乳糖

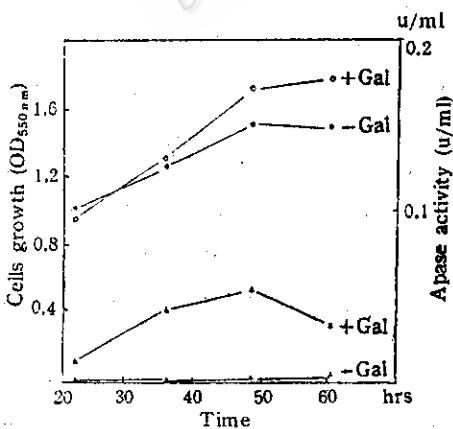


图 5 半乳糖诱导下酸性磷酸酯酶产生

色的即紫红色对应的菌落进行诱导产酶实验。结果表明: 在半乳糖的诱导下, *K. fragilis* 的酸性磷酸酯酶的基因在 *S. cerevisiae* 中有显著分泌(如图 5)。

### (二) *K. fragilis* 酸性磷酸酯酶基因产物的分析

在 *S. cerevisiae* 中, 酸性磷酸酯酶主要分泌在细胞周质间(如图 6), 酶的最适 pH5.5 没有改变(如图 7)。

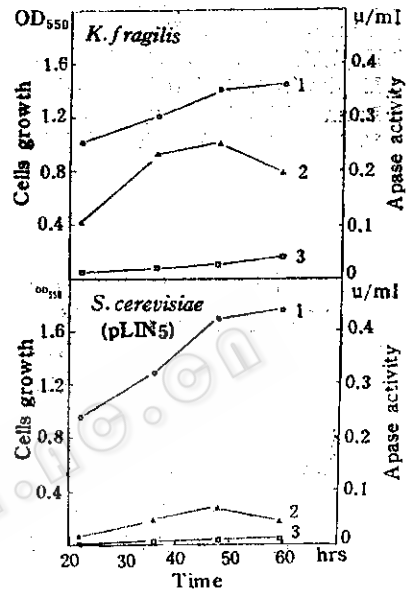


图 6 *K. fragilis* 和 *S. cerevisiae* 产酶比较

1. 细胞产生 2. 细胞周质间产酶 3. 胞外酶

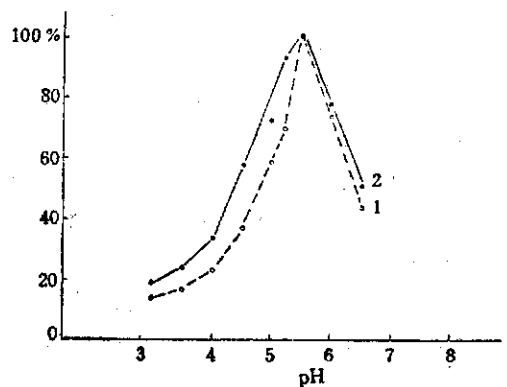


图 7 pH 对 *K. fragilis* (2) 和 *S. cerevisiae* (1) 产酶的影响

同时, 对细胞周质间的蛋白质进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 观察到添加了半乳糖诱导培养的细胞周质间蛋白质分析区带中, 对应出现一条独立的蛋白质色带, 分子量约为

58kd, 与 *K. fragilis* 周质间产生的酸性磷酸酯酶的蛋白质区带相同(图略), 其分子量与估算的

部分核糖基化形式的预测值相符, 从核酸顺序分析发现, 此酶有 13 个糖基化的潜在位置。

## 参 考 文 献

- [1] Nagamatsu, T., *Nippon Nogeikagaku*, *Kaishi*, 32:514—516, 1929.
- [2] Miuer, J.H. et al., *Experiments in Mol. Genet.*, Cold Spring Harbor Lab., N.Y., 1972.
- [3] Nogi, Y. and Fukasawa, T., *Nucl. Acids Res.*, 11:8555—8559, 1983.
- [4] Meyhack, B. et al., *EMBO J.*, 1:675—677, 1982.
- [5] Laemmli, U.K., *Nature*, 227:680—688, 1970.
- [6] Yoda, K. et al., *American Sci. for Microb.*, Washington D.C. 9:19—23, 1987.

# Expression of A New Acid Phosphatase Gene of *Kluveromyces fragilis* in *Saccharomyces cerevisiae*

Lin Ying

(Institute of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou)

JungHwan Ko Koji Yoda Makari Yamasaki

(Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Japan)

In our previous work, we cloned an acid phosphatase gene of *Kluveromyces fragilis* in *S. cerevisiae*. The amino acid sequence had no homology to those of acid phosphatase of a closely related *S. cerevisiae*. To know the substrate specificity of the *K. fragilis* acid phosphatase, several efficient expression systems for the cloned gene in *E. coli* and *S. cerevisiae* were tested. In *E. coli* system, the acid phosphatase gene cloned on a multicopy plasmid was tried to be expressed under the control of *tac* or *phoA* promoter with varied distance between SD and the initiation codon or the sequence of signal peptide. Expected proteins and activities, however, were not detected in any trial. Then we tested an expression system of *S. cerevisiae*. The acid phosphatase gene was placed downstream of GAL7 promoter and subcloned on a YEpl24 derived plasmid. *S. cerevisiae* (pho3, pho5) transformed with the plasmid secreted a distinct amount of acid phosphatase in the periplasm only when galactose was added as an inducer.

## Key words

Acid phosphatase, recombinant DNA, GAL7 promoter