

基因拷贝数与染色体位置对酵母表达乙肝病毒融合表面抗原 SA-28 基因的影响

潘 辉 高向东 王 飞 袁汉英 李育阳*

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 应用 FLP 重组酶介导的染色体定点整合技术,将带有不同拷贝数的乙肝病毒融合表面抗原 SA-28 基因表达单元的质粒整合在酵母不同的染色体位点,并测定了 SA-28 基因的表达情况,初步研究了基因拷贝数与染色体位置对酵母表达外源基因的影响。结果表明 SA-28 基因在 *HIS3* 位点整合时的表达水平随基因拷贝数的增加而提高,遵循基因剂量效应;在某些染色体位点整合时,插入方向对其表达有不同程度的影响,呈现出明显的染色体极性效应。

关键词 酵母,基因拷贝数,染色体位置效应,乙肝病毒表面抗原,FLP 重组酶

中图分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0124-05

酿酒酵母是一种用于基因工程产品生产的真核表达系统,为了使外源基因稳定表达,人们常常将外源基因整合到染色体上,但经常会被外源基因表达水平不高的问题所困扰。造成这一问题的原因是多方面的。一方面,与游离型载体相比整合型载体的拷贝数较低;另一方面,长期以来人们对酵母染色体位置效应的状态缺乏了解。如果能提高整合的拷贝数,同时选取一些有利于基因表达的染色体位点作为外源基因的整合位点,这对于提高外源基因表达水平将具有重要意义。

我们曾采用 FLP 重组酶介导的染色体定点整合技术,研究染色体位置对酵母内源的蔗糖酶基因(*SUC2*)表达的影响^[1]。该染色体定点整合技术具有整合位点准确和整合拷贝数均一(绝大部分为单拷贝)的特点。整合后的 DNA 位于两个顺向排列的 FRT 位点之间,可以被 FLP 重组酶切离,而保留在染色体上的 FRT 位点可以进行其他基因的整合表达,因而对我们研究基因拷贝数和染色体位置效应十分有利。本文以乙肝病毒融合表面抗原 SA-28 基因为报告基因^[2],构建了分别含有单、双和叁个 SA-28 基因表达单元的定点整合质粒,在我们选取的几个有代表性的染色体位点进行整合表达,研究

基因拷贝数与染色体位置对酵母表达 SA-28 基因的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *recA* 菌株 HB101 用于质粒扩增,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) FLP 重组酶表达株 XGY3 [*MATa leu2-3, 112 :: YIP204 (LEU2-GAL10-FLP) ura3-52 his3-Δ1trp1-289gal2cir⁰*]^[3],在酵母株 XGY3 不同的染色体位点引入一个 FRT 位点则形成其衍生菌株 XGY6-Del, JGY4c-Del, JGY19-Del, JGY25-Del, JGY30-Del 和 JGY47-Del^[1]。2.55kb 的 SA-28 基因表达单元^[2],质粒 pLBU112.1 和 pBAU111.1^[1,3]由本实验室构建。

1.2 培养基

大肠杆菌完全培养基 LB,氨苄抗性选择加入 100mg/L 氨苄青霉素。酵母基本培养基 SD(6.7 g/L yeast nitrogen base, 20 g/L glucose),营养缺陷型菌株另外补充 40mg/L 所需氨基酸等物质。酵母完全培养基 YEPD(10g/L yeast extract, 20g/L bacto-peptone, 20g/L glucose),酵母高糖完全培养基 YEPDH(10g/L yeast extract, 20g/L bacto-peptone, 80g/L glucose),酵母半乳糖诱导培养基 YPGR

收稿日期:1999-01-04,修回日期:1999-10-26。

基金项目:国家科委八六三高科技项目资助课题(863-102-07-01-021)。

* 联系作者。

(10g/L yeast extract, 20g/L bacto-peptone, 20g/L galactose, 20g/L raffinose)。

1.3 DNA 克隆及分析

质粒 DNA 的常规操作和 DNA 斑点杂交等均参考 Sambrook 等人方法^[4]。酿酒酵母完整细胞转化参照 Gietz 等人方法^[5]。酵母高分子量总 DNA 的制备参考 Ausubel 等人方法进行^[6]。

1.4 酵母染色体定点整合转化

从 YEPD 平板上刮取一定量的酵母菌体,接入 3mL YPGR 培养液中,30℃ 摇动培养 7~8h。取 1.4mL 菌液离心收集菌体,然后按 Gietz 等人的方法进行完整细胞转化^[5]。

1.5 SA-28 基因表达酵母株的发酵条件

接种一环菌体于 2.5mL SD 培养液(补加 Trp),30℃ 振荡培养 20h 得种子液。按 4% 的量转接于 25mL YEPDH 培养液中,30℃ 振荡培养 30h。再按 4% 量转接 25mL YEPE 培养液中,30℃ 振荡培养 28h 后收获菌液。

1.6 SA-28 基因在酵母中的表达水平测定

酵母细胞破碎,蛋白浓度的测定以及 HBsAg 的 ELISA 分析参照文献^[2]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 含有 SA-28 基因表达单元的酵母定点整合质粒的构建

乙肝病毒表面抗原 S-preS1 融合基因 SA-28 的酵母表达单元已经由本实验室构建完成。SA-28 基因的转录受 *ADH2-SUC2* 酵母杂合启动子的控制。该融合启动子是一个高效调控型启动子,当培养基中含有葡萄糖时它处于阻遏状态,活性很低;当葡萄糖缺乏时,它处于去阻遏状态,此时由它所控制的外源基因的表达可以提高 100 倍以上^[2,7]。

定点整合载体 pLBU112.1 和 pBAU111.1 含有一个 *URA3* 选择标记和一个 FRT 位点,两者的 FRT 位点方向相反。我们将含有 SA-28 融合基因完整表达单元的 2.55kb *Bam*HI 片段分别插入 pLBU112.1 和 pBAU111.1 载体的 *Bam*HI 位点,经过酶切筛选分别得到含有 SA-28 基因表达单元以单拷贝、双拷贝及叁拷贝,以及两种方向插入的转化子。SA-28 基因表达单元的插入方向规定如下:将其与 FRT 位点的排列方向相反的情况定义为 a 方向,包括以 pLBU112.1 为载体的质粒 pSSF10、pSSF15 和 pSSF13,以及以 pBAU111.1 为载体的质粒 pSSF21、pSSF23 和 pSSF25;而将其与 FRT 位点

的排列方向相同的情况定义为 b 方向,包括以 pLBU112.1 为载体的质粒 pSSF11、pSSF16 和 pSSF12,以及以 pBAU111.1 为载体的质粒 pSSF20、pSSF22 和 pSSF24,质粒结构如图 1 所示。

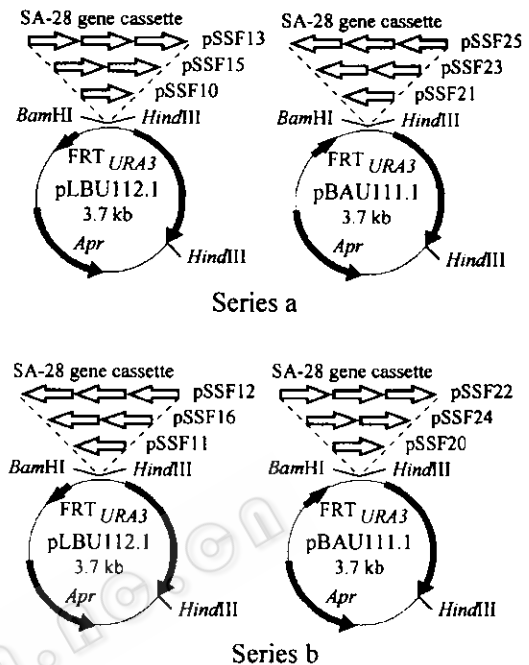


图 1 定点整合质粒的结构

Fig. 1 Construction of plasmids used for targeted integration. In series a, EC (expression cassette) and FRT are in reverse direction. In series b, EC and FRT are in the same direction.

2.2 SA-28 基因在 *HIS3* 位点的整合与表达

酵母株 XGY6-Del 的 *HIS3* 基因座位中含有一个 FRT 位点^[1],通过 FLP 重组酶介导的染色体定点整合转化,可将前面构建的 12 个含有不同拷贝数的 SA-28 基因表达单元及其不同插入方向的定点整合质粒 DNA 整合到 XGY6-Del 的 *HIS3* 位点。所得到 Ura⁺ 表型转化子分别命名为 XGY6-Int3a、XGY6-Int3b、XGY6-Int4a 和 XGY6-Int4b,如图 2 所示。其中菌株名称中的 Int3 表示质粒载体为 pLBU112.1,而 Int4 表示质粒载体为 pBAU111.1;菌株名称后的 a 和 b 表示质粒中 SA-28 基因表达单元的两种插入方向(见结果与讨论 2.1)。对这 12 个定点整合转化子进行发酵,测定 SA-28 融合基因的表达情况,结果见表 1。我们发现对于 XGY6-Int3 组,SA-28 基因单拷贝时的表达量为 ELISA 滴度 8 倍,双拷贝时为 32 倍,叁拷贝时为 128 倍,且 SA-28 基因以两种方向插入的表达水平完全相同。XGY6-Int4 组的情况与 XGY6-Int3 组完全相同。由此可见 SA-28 基因的表达呈现出明显的基因剂

量效应,而且 SA-28 基因在 *HIS3* 位点上以两种方向整合的表达水平没有差别。

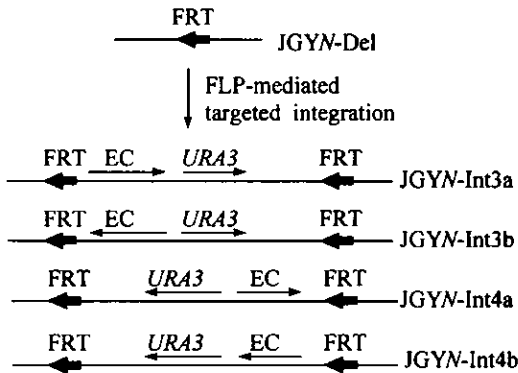


图 2 FLP 重组酶介导的染色体定点整合

Fig. 2 FLP recombinase-mediated targeted integration

The anticipated chromosome structures after targeted integration of pSSF series plasmids at the pre-placed FRT sites are depicted. Legend: EC stands for SA-28 gene expression cassette. JGYN-Int3a stands for integration of pSSF10/pSSF15/pSSF13, JGYN-Int3b = pSSF11/pSSF16/pSSF12, JGYN-Int4a = pSSF21/pSSF23/pSSF25, JGYN-Int4b = pSSF20/pSSF24/pSSF22 (see also Fig. 1).

表 1 SA-28 基因在 *HIS3* 位点整合的表达水平

Table 1 The expression level of SA-28 gene integrated at *HIS3* locus

| Strain | EC copy number | EC orientation | HBsAg titer |
|------------|----------------|----------------|-------------|
| XGY6-Int3a | 1 | a | 8 |
| | 2 | a | 32 |
| | 3 | a | 128 |
| XGY6-Int3b | 1 | b | 8 |
| | 2 | b | 32 |
| | 3 | b | 128 |
| XGY6-Int4a | 1 | a | 8 |
| | 2 | a | 32 |
| | 3 | a | 128 |
| XGY6-Int4b | 1 | b | 8 |
| | 2 | b | 32 |
| | 3 | b | 128 |

Notes: The crude yeast extracts were diluted to 1.0mg/mL total soluble protein, and then were diluted by two folds consecutively with Phosphate Buffer Saline (PBS, pH = 7.4). The HBsAg titer was determined as the largest dilution titer with a positive result by ELISA assay. EC stands for SA-28 gene expression cassette. EC orientation "a" stands for EC and FRT are in reverse direction, while EC orientation "b" stands for EC and FRT are in the same direction (see Fig. 1 and Fig. 2).

2.3 SA-28 基因在几个选定染色体位点的整合与表达

在染色体位置对酵母蔗糖酶基因 (*SUC2*) 表达影响的研究中,我们发现 *SUC2* 基因定点整合在酵

母株 JGY19-Del、JGY25-Del 和 JGY47-Del 的染色体上的 FRT 位点时, *SUC2* 基因表达水平较高; 而当其定点整合在酵母株 JGY4c-Del 和 JGY30-Del 的染色体上的 FRT 位点时, *SUC2* 基因表达水平较低^[1]。这些酵母株中的 FRT 位点是以随机克隆的酵母染色体 DNA 片段作为引导序列, 通过同源重组整合到染色体不同位置上的。因此我们以酵母总 DNA 制备探针, 对含有这些染色体 DNA 片段的质粒进行斑点杂交, 分析 FRT 位点所在的染色体片段的拷贝数特征。酵母株 XGY6-Del、JGY19-Del、JGY25-Del 和 JGY4c-Del 的 FRT 所在染色体片段呈现出很弱杂交信号, 表明它们很可能与 *HIS3* 基因一样, 是单拷贝的染色体片段。而酵母株 JGY30-Del 和 JGY47-Del 的 FRT 所在染色体片段与作为对照的 rDNA 片段的杂交信号相当, 远远强于单拷贝片段的杂交信号, 表明它们是多拷贝片段 (结果未显示)。与此同时, 我们还对酵母株 JGY19-Del 和 JGY4c-Del 的 FRT 所在的染色体片段进行了部分序列测定。所获得的两个 DNA 序列在美国斯坦福大学酿酒酵母基因组全序列库^[8]中进行同源性比较, 从而确定出这两个染色体片段的完整序列及其在酵母基因组中的位置, 结果见图 3。这一结果进一步证实了这两个染色体片段是单拷贝片段。酵母株 JGY19-Del 的 FRT 所在染色体片段位于 XI 号染色体左臂距端粒 220kb 处, 这个近 4.0kb 的 *EcoRI* 片段包含有一个 tRNA^{Ala} 基因、两个完整的开放阅读框 YKL516 和 YKL518, 以及开放阅读框 YKL520 的 5' 端残留的 42 个核苷酸。YKL516 推测是一个蛋白质激酶, 而 YKL518 和 YKL520 功能未知^[9,10]。酵母株 JGY4c-Del 的 FRT 所在染色体

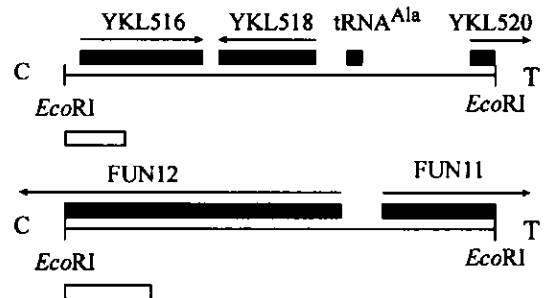


图 3 JGY19-Del(上方)JGY4c-Del(下方)中定点整合位点染色体片段的结构

Fig. 3 Components in the chromosomal fragments as targeted loci in JGY19-Del (upper) and JGY4c-Del (lower)

The parts having been sequenced are indicated by the frames under each fragment. Legend: C: centromere proximal, T: telomere distal.

片段位于 1 号染色体左臂距端粒 74kb 处,这个近 2.8kb 的 *EcoRI* 片段包含开放阅读框 FUN11 (YAL036C) 和 FUN12 (YAL035W) 的 5' 端大部分 DNA 序列,它们分别与爪蟾的 GTP-结合蛋白和枯草杆菌 IF2 蛋白具有同源性,FUN12 被中断后可致死,但它们的生理功能尚不清楚^[11,12]。

为了研究 SA-28 融合基因整合在不同的染色体位点的表达情况,我们选取含有 3 个拷贝 SA-28 基因表达单元及其不同插入方向的定点整合质粒 pSSF13 和 pSSF22,对酵母株 JGY19-Del、JGY25-Del、JGY47-Del、JGY4c-Del 以及 JGY30-Del 进行定点整合转化,得到 Ura⁺ 表型转化子。各选取若干个转化子进行发酵培养并测定 SA-28 基因表达产物的 ELISA 滴度,结果见表 2。与 SA-28 基因在

表 2 叁拷贝 SA-28 基因在几个选定的染色体位点整合的表达水平

Table 2 The expression level of 3 copies SA-28 gene integrated at several selected chromosomal loci

| Host strain | Chromosomal locus | EC orientation | HbsAg titer | Invertase activity |
|-------------|-------------------|----------------|-------------|--------------------|
| XGY6-Del | HIS3 | a | 128 | 1.82 |
| | | b | 128 | 1.50 |
| XGY19-Del | YKL516—YKL520 | a | 64 | 2.84 |
| | | b | 32 | 3.23 |
| JGY25-Del | unidentified | a | 64 | 2.70 |
| | | b | 32 | 3.13 |
| JGY4c-Del | FUN11—FUN12 | a | 64 | 1.02 |
| | | b | 8 | 0.42 |
| JGY30-Del | unidentified | a | 128 | 1.52 |
| | | b | 16 | 0.20 |
| JGY47-Del | unidentified | a | 256 | 0.64 |
| | | b | 16 | 2.87 |

Notes: The chromosomal loci were identified by DNA sequencing. For every yeast host strain, the 3 copies of SA-28 gene expression cassette (EC) were integrated into chromosome at the pre-placed FRT site by using plasmid pSSF13(a) and pSSF22(b) respectively. EC and FRT are in reverse direction in "a", while they are in the same direction in "b" (see also Fig. 1 and Fig. 2). HbsAg titer was determined by ELISA. The data of invertase (*SUC2*) activity was cited from reference [1].

HIS3 位点整合时的表达水平相比,SA-28 基因在几个选定的染色体位点整合时的表达水平有不同程度的改变。SA-28 基因在酵母株 JGY19-Del 和 JGY25-Del 中以两种不同方向整合时的表达水平很接近,并都稍低于其在 *HIS3* 位点整合时的表达水平,表明这两个染色体位点对于 SA-28 基因的表达都没有造成较大的影响,这与 *SUC2* 基因在这两个染色体位点整合时的表达情况较为一致。在酵母株 JGY4c-Del、JGY30-Del 和 JGY47-Del 中,SA-28 基因以其中一个方向整合时的表达水平接近于其在 *HIS3* 位点整合时的表达水平,而 SA-28 基因以另一个方向整合时的表达水平却显著低于其在 *HIS3* 位点整合时的表达水平,表明这两个染色体位点对于 SA-28 基因表达的影响表现出染色体极性,即随着 SA-28 基因整合方向的不同而有所不同(相差 8~16 倍)。*SUC2* 基因在这 3 个染色体位点的整合表达也表现出类似的染色体极性,但有趣的是 2 种基因在酵母株 JGY47-Del 中表达所呈现的染色体极性正好相反。这表明对于不同的基因或者启动子,染色体位置效应的情况可能会有所不同。

从以上各项结果分析表明:SA-28 基因在酵母 *HIS3* 位点整合的表达水平随基因拷贝数的增加而显著提高,即遵循基因剂量效应,因而有望通过进一步提高基因拷贝数而获得更高的表达水平;另一方面,SA-28 基因在某些染色体位点整合时的表达呈现出染色体位置效应,具体表现为以某一方向整合的表达水平显著下降的极性效应,造成这种极性效应机制我们还不清楚。在酵母中已经发现了能够对基因表达造成沉默(Silencing)的染色体位点,如酵母接合型转变基因位点 *HMR-E*、染色体端粒、着丝粒、*rDNA* 中的一段以及调控酵母衰老的染色体位点(Silenced loci which are hypothesized to regulate aging in yeast)等^[13~16]。本文涉及的几个具有染色体极性的位点是否属于上述沉默位点还有待进一步证实。如果仅就酵母整合表达外源基因而言,在选择有利于高表达的染色体位点的同时,基因在染色体上的整合方向也是一个必须考虑的问题。

参 考 文 献

- [1] 高向东,李育阳. 复旦学报(自然科学版),1998,37:555~558
- [2] 袁汉英,潘辉,刘铁婷等. 高技术通讯,1997,7(10):35~39
- [3] 高向东,李育阳. 生物化学与生物物理学报,1998,30:339~444
- [4] Sambrook J et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- [5] Gietz R D, Schiestl R H, Willems A R et al. Yeast, 1995, 11: 355~360

- [6] Ausubel F M *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. John Wiley & Sons, 1995
- [7] 李 蔚, 李育阳. 遗传学报, 1997, 24(6): 561~568
- [8] *Saccharomyces* Genome Database at <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
- [9] Dujon B, Alexandrakl D, Andre B *et al.* *Nature*, 1994, 369: 371~378
- [10] Jacquier A, Legrain P, Dujon B. *Yeast*, 1992, 8(2): 121~132
- [11] Bussey H, Kaback D B, Wu W Z *et al.* *PNAS*, 1995, 92: 3809~3813
- [12] Sutrave P, Shafer B K. *Gene*, 1994, 146(2): 209~213
- [13] Brand A, Breeden L, Abraham J *et al.* *Cell*, 1985, 41: 41~48
- [14] Gottschling D E, Aparicio O M, Billington B L *et al.* *Cell*, 1990, 63: 751~762
- [15] Allshire R C, Javerzat J P, Redhead N J *et al.* *Cell*, 1994, 76: 157~169
- [16] Gottlieb S, Esposito R E. *Cell*, 1989, 56: 771~776

Effects of Gene Copy Number and Chromosomal Position on the Expression of a Modified HBsAg Gene SA-28 in Yeast

PAN Hui GAO Xiang-Dong WANG Fei YUAN Hang-Ying LI Yu-Yang

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract The effect of gene copy number and chromosomal position on heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* has been tentatively investigated using a modified hepatitis B virus surface antigen SA-28 gene. The plasmids containing different copies of SA-28 gene expression cassette were integrated into different chromosomal loci via FLP recombinase mediated targeted integration. The expression of SA-28 gene in the resultant transformants was then measured. The result indicated that the expression of SA-28 gene was positively related to the gene dosage at *HIS3* locus and had chromosomal polarity at several chromosomal loci.

Key words Yeast, gene copy number, chromosomal position effect, hepatitis B virus surface antigen, FLP recombinase