

酵母与大肠杆菌穿梭定点突变载体系统的构建及应用

敖万远 李育阳

(复旦大学遗传所, 上海 200433)

利用可以在大肠杆菌中形成单链又可以在大肠杆菌和酵母中穿梭的质粒BFD19作为寡聚核苷酸介导的定点突变载体, 分别在大肠杆菌和酵母中获得了预定的TRP1基因突变体, 再利用这个带TRP1突变的质粒BFD25和BFD19, 建立了一个在酵母系统中进行定点突变时可以富集突变体的筛选方法。借助这种方法我们在酵母系统中完成了人表皮生长因子基因表达单元的寡聚核苷酸介导的缺失突变, 此突变载体系统在酵母与大肠杆菌中都适用, 而且可以直接在酵母细胞中进行突变表型的研究。

关键词 定点突变载体; 缺失突变; 酵母菌; 大肠杆菌

体外突变是进行分子遗传学研究的基本技术之一。近年来这方面的技术发展很快, 特别是寡聚核苷酸介导的定点突变技术发展更迅速, 现已发展多种寡聚核苷酸介导的定点突变技术^[1-5]。本研究试图以一个克隆容量较大的phagemid Bluescript为基础, 构建在大肠杆菌和酵母中穿梭的突变载体, 并建立了一个在酵母系统中进行突变时可以富集突变体的筛选方法, 利用这个筛选方法, 我们在酵母系统中对人的表皮生长因子基因表达单元进行了缺失突变。

材料与方 法

(一) 菌种与质粒

实验所用的菌株与质粒见表1和表2。

(二) 培养基

(1) LB培养基: 每升中含10g polypeptone (日本产品), 5g yeast extract (DIFCO), 10g NaCl, 20g glucose,

pH 7.4—7.6; LBA为LB中加入50μg/ml的ampicillin。(2) 2×YT培养基: 每升中含16g Bacto-tryptone(DIFCO), 10g yeast extract(DIFCO), 10g NaCl, pH 7.2—7.4。(3) YEPD培养基: 每升中含20g polypeptone(日本产品), 10g yeast extract(DIFCO), 20g glucose。(4) SD培养基: SD-ura, 每升中含6.7g yeast nitrogen base(DIFCO), 20g glucose, 20mg leucine, 20mg tryptophane; SD-ura-trp, 6.7g yeast nitrogen base(DIFCO), 20g glucose, 20mg leucine。以上的所有固体培养基均加1.8%的琼脂粉, 半固体培养基加0.9%的琼脂粉。

(三) 酶及其它试剂

限制酶为New England Biolabs或Boehringer Mannheim公司产品; T4 DNA ligase, Klenow enzyme, T4 Polynucleotide Kinase为BRL公司产品;

本文于1991年6月25日收到。

表 1 实验用菌株
Table 1 List of strains

Strains		Genotype	Source
<i>E. coli</i>	TG1	supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB ⁺ lacI ⁻ lacZA M15)	This lab.
	JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F' (traD36 proAB ⁺ lacI ⁻ lacZA M15)	This lab.
<i>S. cerevisiae</i>	BJ1991	leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3	This lab.

表 2 实验用质粒
Table 2 List of plasmids

Plasmid	Cloning site	Selection marker	Source
BFD18	Sal I, EcoR I	Ap ^r , TRP1	This lab.
BFD19	Sal I, EcoR I, Hind III, BamH I	Ap ^r , TRP1, LEU2	This lab.
BFD25	EcoR I, Hind III, BamH I, Sac I	Ap ^r , trp1, LEU2	This lab.
YFD104	BamH I, Hind III	Ap ^r , URA3	This lab.
pAWY1	EcoR I, Sal I, BamH I	Ap ^r , trp1, LEU2	This lab.
pAWY2	EcoR I, Sal I, BamH I	Ap ^r , TRP1, LEU2	This lab.

Sequenase及成套序列分析试剂为Biochemicals公司产品, Klenow酶及成套序列分析试剂为New England Biolabs公司产品; Phosphatase alkaline为Boehringer Mannheim公司产品; Zymolyase-20T为Seikagaku Kogyo公司产品, α -³²P-dATP和 γ -³²P-ATP为Amersham公司产品; 低熔点琼脂糖为Sigma公司产品; Nitrocellulose filter为Schleicher & Schuell公司产品。

(四) 突变引物的合成

TRP1基因的突变引物为28聚体, 由本校王启松研究小组合成。hEGF基因表达单元的突变引物为21聚体, 由中国科学院细胞生物学所合成。

(五) 质粒DNA的制备、酶切及载体5'端去磷酸化反应

参照“分子克隆手册”^[7]进行。

(六) 酵母总DNA的制备、酵母菌及大肠杆菌的转化

酵母总DNA的制备参照Sherman

F.^[8]的方法, 酵母菌的转化按Ito H.^[9]的方法, 大肠杆菌的转化参照Mandel M.^[10]的方法。

(七) 单链DNA的制备, 单链DNA的杂交及菌落的原位杂交

单链DNA的制备参照Bluescript DNA测序系统手册上推荐的方法, 单链DNA的杂交及菌落原位杂交参照文献(7)进行。

(八) DNA的序列分析

采用美国Biochemicals公司介绍Sequenase的手册上推荐的方法并同时参考了文献(7)上的方法。

结 果

(一) 突变载体BFD19的构建及突变引物的设计

BFD18, BFD19是我们实验室构建的两个从Phagemid Bluescript衍生来的酵母与大肠杆菌的穿梭质粒。BFD18是

phagemid Bluescript的EcoR I 位点插入了酵母的包含自主复制序列(ARS1)在内的TRP1基因^[11]。BFD19则是在BFD18的Sal I 位点插入了酵母的LEU2 基因。BFD19在辅助噬菌体M13K07的存在下,形成噬菌体颗粒,取得单链DNA。因此可用来作为突变载体。由于BFD19有两

个酵母选择性标记,只要保留一个标记供转化时作选择用,另一个标记就可以作为突变的靶基因。我们设计了一个使TRP1基因在其5'端引起移码突变,并新生一个Hind III 位点的突变引物(见图1)。按照这个引物介导产生的突变体很容易通过营养互补试验及限制酶图谱分析得到鉴定。

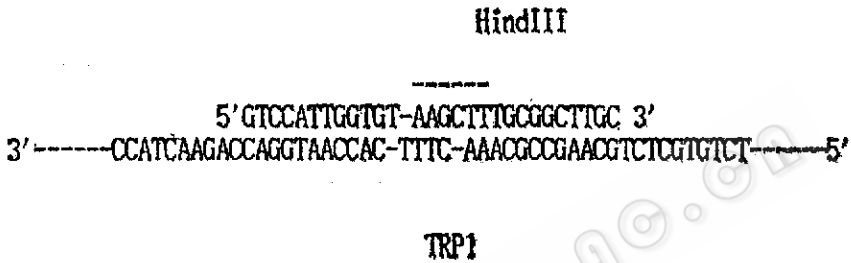


图1 TRP1基因与突变引物的核苷酸顺序

Fig.1 The nucleotide sequence of the TRP1 gene and mutation primer

(二)TRP1基因的定点突变

突变实验步骤如图2所示,用BFD19的单链DNA,加入5'端磷酸化的突变引物及BFD19 Hind III 酶切产生的大片段双链DNA(按1:20:2的分子数比例),100℃煮沸5min让双链DNA变性,慢慢冷却至室温使其退火。然后用大约0.2μg的突变混合物转化大肠杆菌TG1。取24个转化子抽提质粒DNA,经Hind III 酶切后未能鉴定到预定的突变体。另外,我们用约1μg的突变混合物转化了酵母菌BJ1991。转化子在SD-leu平板上长出,然后再分别点种SD-leu-trp及SD-leu平板。在SD-leu-trp平板上不能生长而在SD-leu平板上能生长的转化子可能就是所需的突变体。因为我们设计的引物在TRP1结构基因5'端引入移码突变,这样的突变体在缺

少色氨酸的培养基上是不能生长的。我们点种了200个转化子,其中15个不能在SD-leu-trp培养基上生长。抽提这些酵母转化子的总DNA,用于转化大肠杆菌TG1。再从大肠杆菌中抽提质粒DNA,Hind III 酶切这些质粒DNA,结果表明其中三分之一的质粒增加了一个Hind III 酶切位点,产生了500bp和150bp的两个Hind III 片段。我们在制备突变混合物时,最后增加了以Klenow酶进行DNA修补合成这一步,然后再转化大肠杆菌。从12个转化子中通过Hind III 酶切图谱分析选到一个突变体,我们把这些突变体统称为BFD25。

为了最后肯定突变体的结构,我们对突变区段的DNA进行了核苷酸顺序的分析。无论是在大肠杆菌中还是在酵母中产生的突变体,它们在突变位点上的核苷酸

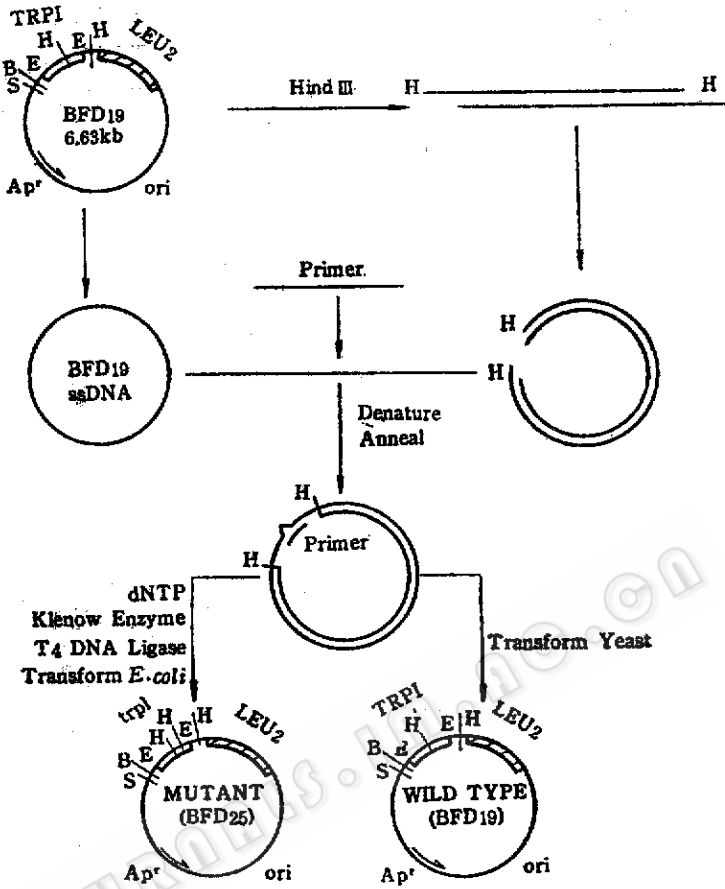


图2 TRP1基因定点突变示意图

Fig.2 The scheme of mutagenesis for TRP1 gene
E, EcoRI; H, HindIII; B, BamHI; S, SacI

顺序都和原设计的一致。

(三) 利用BFD25在酵母和大肠杆菌中进行hEGF基因表达单元的缺失改造

质粒BFD25带有一个突变的trp1基因和一个正常的LEU2基因, 而BFD19则带有都正常的TRP1和LEU2基因。如果将需要进行突变的DNA片段插入BFD25, 制备重组体的单链DNA, 然后再与突变引物及适当酶切成线状的BFD19双链DNA退火形成缺口双链突变混合物, 再转化酵母细胞。由于突变引物总是与野生型的TRP1基因相联系。所以筛选LEU2⁺TRP1⁺转化子就可以富集突变体。为了试验这个设想, 我们进行了人表皮生长因子

(hEGF)基因表达单元的缺失突变。

1. 待突变的hEGF基因表达单元在载体BFD25中的插入: 质粒YFD104上的BamHI片段是hEGF基因的表达分泌单元, 其上有PGK启动子、酵母 α 因子基因前导顺序^[12]、hEGF基因和ADHI终止子。由于在克隆hEGF基因时在前导顺序加工位点与hEGF成熟蛋白的第一个密码子之间多了15个核苷酸顺序, 这就使表达产物的N端多5个氨基酸残基, 必须去掉。由于在这15个核苷酸顺序中包含一个HindIII位点, 所以缺失这15个核苷酸后, 这个质粒同时也少掉了一个HindIII位点。利用这一点可以作为突变体酶切分析的依

据之一。我们将 YFD104 上的 hEGF 基因表达单元克隆到载体 BFD25 上, 建成重组质粒 pAWY1。从带重组质粒 pAWY1 的转化子中抽提单链 DNA。合成的突变引

物与此单链 DNA 配对情况如图 3 所示。

2. hEGF 基因表达单元突变体的筛选: 为了在大肠杆菌中筛选 hEGF 基因表达单元的突变体, 我们把 pAWY1 的单

合成的突变引物

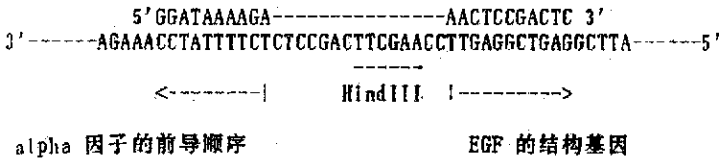


图 3 hEGF 基因表达单元与突变引物的核苷酸顺序

Fig.3 The nucleotide sequence of the hEGF gene expression cassette and mutation primer

链 DNA 与 5' 端磷酸化的突变引物及 BFD-19 双链 DNA 由 BamHI - Sac I 双酶切成线状的大片段 DNA (按 1:40:2 的分子数比) 变性并退火后, 由 Klenow 酶填补缺口后再用 T4 DNA 连接酶连接, 然后转化大肠杆菌。转化子用 γ - ^{32}P -ATP 标记的探针做菌落原位杂交。我们点种了 300 个菌落做原位杂交, 当洗脱温度升到 47°C 时, 有 10 个菌落有杂交信号。这些有杂交信号的转化子经 BamHI, HindIII 酶切分析证实它们都是突变体。

为了在酵母中进行 hEGF 基因表达单元突变体的筛选, 我们将 pAWY1 的单链 DNA 与 5' 端磷酸化的突变引物及 BFD19 双链 DNA 由 BamHI - Sac I 双酶切成线状的大片段 DNA (也按 1:40:2 的分子数比) 变性退火后直接转化酵母菌 BJ1991。转化子由 SD-leu 培养基筛选, 再把转化子分别点种于 SD-leu-trp 及 SD-leu 的平板上, 在 SD-leu-trp 培养基上能生长的可能就是突变体。我们共点种了 200 个转化子, 其中 6 个能在 SD-leu-trp 的培养基上生长。用这些转化子的总 DNA 转化

大肠杆菌, 然后从大肠杆菌中抽出质粒 DNA, 经 BamHI - HindIII 酶切分析进一步鉴定突变体。在这 6 个能在 SD-leu-trp 培养基上生长的转化子中有 5 个是突变体。

(3) hEGF 基因表达单元突变位点的顺序分析: 我们把包含突变位点的 DNA 区段进行了 DNA 顺序分析。突变位点的核苷酸顺序与设计的是完全一致。

讨 论

按照我们在进行 hEGF 基因表达单元的突变步骤, 突变体总是和正常的 TRP1 基因相联系, 因此和野生型相比增加了 TRP1 的功能。在酵母中应用时, 只要选择 TRP1⁺LEU2⁺ 转化子就可以有效地富集突变体。由于 BFD19/BFD25 定点突变载体系统可以方便地用于酵母系统, 因此得到的突变体就可以在酵母中直接分析表型特性。这为酵母的分子遗传学和酵母的基因工程研究带来了很大的方便。

参 考 文 献

- [1] Zoller, M. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10:6487,1982.
[2] Schold, M. et al.: *DNA* 3: 469,(1984).
[3] Zagursky, R. J. et al.: *Gene* 27, 183, 1984.
[4] Levison, A. et al.: *J. Mol. Appl. Genet.*, 2:507,1984.
[5] Singh, H. et al.: *Gene*, 20:441,1982.
[6] Walder, R. Y. et al.: *Gene* 42:133,1986.
[7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
[8] Sherman, F. et al.: *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
[9] Ito, H. et al.: *J. Bacteriology*,153:2521,1983.
[10] Mandel, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 53:159,1970.
[11] Tschumper, C. H. et al.:*Gene*, 10:157,1980.
[12] Kurjan, J. et al.: *Cell* 30:933,1982.

Construction and Application of A Dual Vector System for Site-specific Mutagenesis in Yeast and *Escherichia coli*

Ao Wanyuan Li Yuyang

(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*)

The desired mutated *trp1* gene was obtained in both yeast and *E. coli* using the oligonucleotide-directed mutation vector BFD19, which was a shuttle plasmid between yeast and *E. coli* and could produce single-stranded plasmid DNA in *E. coli*. With the plasmid BFD25 bearing the mutated *trp1* gene and BFD19, we established an efficient screen method which could enrich the mutants when the mutagenesis was carried out in yeast. By this method, we made an oligonucleotide-directed deletion mutation at the human EGF gene expression cassette in yeast. This mutagenesis system could be used in both yeast and *E. coli*, and the phenotype after mutation could be directly studied in yeast.

Key words Site-specific mutagenesis vector; deletion mutation; yeast; *E. coli*