

黑曲霉糖化酶基因在酿酒酵母基因组中的整合及其在整合子中的稳定表达

唐国敏 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 把黑曲霉糖化酶 cDNA 连同酵母 α 因子启动子及其分泌序列,通过转化整合到酿酒酵母染色体 DNA 上,获得了整合型的分解淀粉酵母转化子。Southern 印迹分析证明了糖化酶 cDNA 对酵母染色体 DNA 的整入。整合型转化子在以可溶性淀粉为碳源的培养基中分泌糖化酶活力达 2.5u/ml,在非选择性培养基中连续转移 10 次,糖化酶分泌活力稳定不变。

关键词 糖化酶,酿酒酵母,整合,稳定表达

我们已报道黑曲霉糖化酶 cDNA 通过 YEP 型载体引入酿酒酵母及在酿酒酵母中的表达和分泌^[1]。由于 YEP 型质粒是有丝分裂不稳定的,在转化子中丢失频率较高,导致酵母工程菌的不稳定。为此把糖化酶基因整入酿酒酵母染色体 DNA 以得到稳定的转化子,是构建有实用价值的分解淀粉酵母工程菌的重要环节。本文即报道黑曲霉糖化酶基因在酿酒酵母基因组中的整合及其在整合子中的稳定表达。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 为细菌宿主, Y33 (leu his ura ade) 为酵母宿主。质粒 YFD18HH6 是质粒 YFD18 插入黑曲霉糖化酶 cDNA 构成,由本组构建。YFD18 含有酵母 α 因子启动子及其分泌序列,系复旦大学遗传学研究所李育阳先生惠赠。质粒 pSAK068 是含有 1.8kb 的酵母 δ 序列的 YIP 型质粒,系 Dr. A. Sakai 惠赠。

1.2 培养基

YPD 培养基用于酵母菌的培养和酵母宿主菌保存; YPS 培养基是用 2% 可溶性淀粉代替 YPD 中 2% 葡萄糖组成,用于检测酵母转化子在以淀粉为碳源时的糖化酶分泌; 补加 Ade、His 和 Leu 的 YNB 培养基用作酵母转化的选择培养基; 上述选择培养基补加 1% 可溶性淀粉即为 HC 培养基,用于酵母转化子糖化酶分泌的平板检测。

1.3 试剂和酶

限制酶、T4DNA 连接酶,牛肠磷酸酯酶、切口平移试剂盒等系 Promega 产品; 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶试剂采用本所生产的试剂盒。反应条件均按产品说明书。

1.4 DNA 操作

酵母完整细胞转化按文献[2]的方法进行; 酵母染色体 DNA 提取按 Philippsen 等^[3]所述方法进行; Southern 印迹分析按 Maniatis 等^[4]所述方法进行,所用探针系 ³²P 标记的

本文于 1994 年 5 月 16 日收到。

糖化酶 cDNA 片段, 该片段由回收质粒 YFD18HH6 的 Hind III 片段获得。

1.5 糖化酶分泌活力测定

除文中特别指明的以外, 把酵母转化子的 YPD 过夜培养物 1ml 接种到 30ml YPD 或 30ml YPS 培养液中, 30℃ 振荡培养 3d, 离心取上清作用于 2% 可溶性淀粉, 37℃ 反应 1h, 煮沸灭酶终止反应。以 100℃ 5min 灭酶处理的上清液同样操作作为对照。用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶试剂测定样品和对照反应液中的葡萄糖量, 计算糖化酶活力。定义 37℃ 作用于可溶性淀粉, 1h 生成 1mg 葡萄糖的酶量为一个糖化酶活力单位 (u)。

2 结果和讨论

2.1 整合型的糖化酶表达分泌质粒的构建

如图 1 所示, 在糖化酶 cDNA 的 3' 端加上 EcoR I 切点后, 与含酵母 α 因子启动子、分泌信号序列和糖化酶 cDNA 的 5' 端片段一起连接到 pSAK068 的 EcoR I 位点, 便得到含糖化酶表达元件的 YIP 型质粒 YIP α G5。

2.2 整入糖化酶 cDNA 的酿酒酵母转化子的分离

为提高转化效率, 把质粒 YIP α G5 用 Sma I 酶切成线性片段后转化酿酒酵母 Y33, 在 YNB/AdeHisLeu 培养基平板上选择 URA⁺ 转化子, 同时以线性化的 pSAK068 进行转化作对照。从转化平板上随机挑取 34 个转化子点接在 HC 培养基平板上, 30℃ 培养 3d 后用碘蒸汽熏染, 结果如图 2。22 个 (65%) 转化子菌落周围都出现了大小不等的透明圈, 证明这些转化子已分泌有功能的糖化酶至细胞外, 12 个 (35%) 转化子不形成透明圈, 推测整合型转化子中糖化酶分泌能力的差异与整入染色体 DNA 的糖化酶基因拷贝数、整入的位置及方向等均有关, 有待进一步研究。对

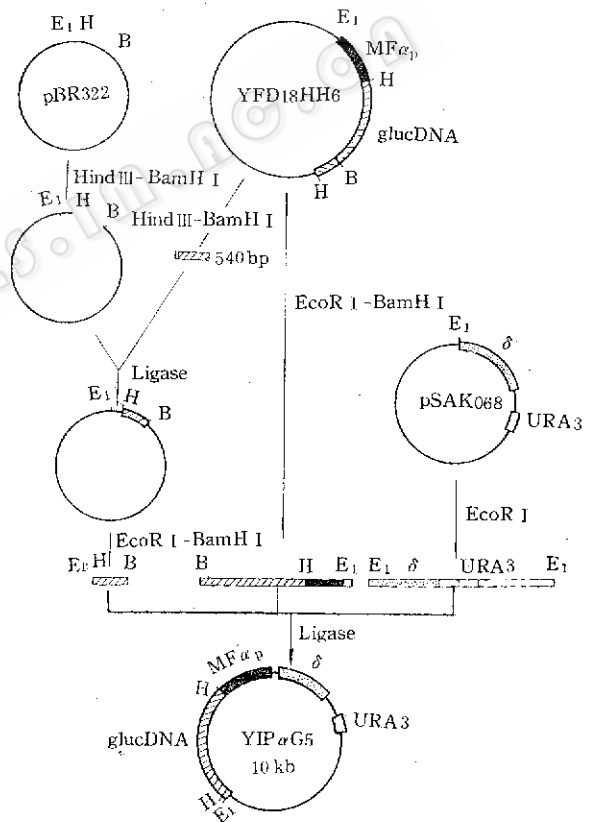


图 1 整合型糖化酶表达分泌质粒的构建
Fig. 1 Construction of integrative plasmid for expression and secretion of glucoamylase

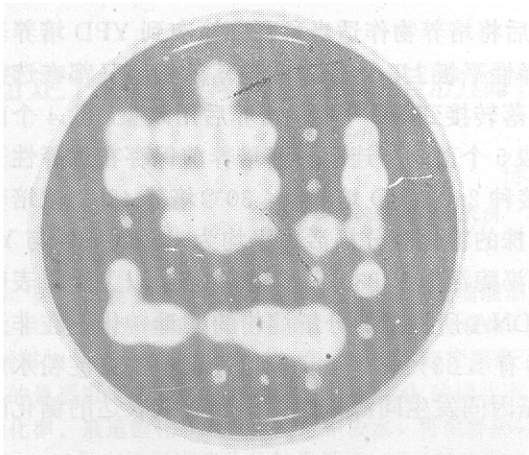


图2 整合型转化子在淀粉平板上形成的透明圈

Fig. 2 Halos formed on starch plate by integrative transformants

照转化平板上的转化子无一产生淀粉透明圈。

2.3 酵母转化子的 Southern 印迹分析

取产生淀粉透明圈的转化子 Y33/YIPαG5-6 和对照转化子 Y33/pSAK068 作染色体 DNA 提取,用在 YIPαG5 的序列中没有切点的 Bgl I 酶切后作 Southern 印迹试验,结果示于图 3。

以完整糖化酶 cDNA 片段为探针时,对照染色体 DNA 未显示任何杂交带,而 Y33/YIPαG5-6 显示明显的两个杂交带,证明糖化酶 cDNA 已整入转化子 Y33/YIPαG5-6 的染色体 DNA 中,质粒 YIPαG5 对 Y33 染色体 DNA 的同源整合可发生在 δ 序列,也可发生在 α 因子序列和 URA 基因等各同源序列间,预期在 δ 序列发生同源整合的频率最高,因已知酿酒酵母染色体 DNA 上含有数十个非随机分布的 δ 序列,这样使用含 δ 序列的 YIP 质粒进行转化就有可能获得多拷贝整合⁽⁵⁾,有利于提高目的基因的表达水平。从 Southern 试验结果 Y33/YIPαG5-6 染色体 DNA 中可能整入了两个拷贝的目的基因。

2.4 整合型转化子的糖化酶分泌

整合型转化子在以葡萄糖或可溶性淀粉为碳源时分泌的糖化酶活力见表 1。

表 1 整合型转化子分泌的糖化酶活力

Table 1 Activity of glucoamylase secreted by integrative transformants

Strains	Activity of glucoamylase secreted in/u · ml ⁻¹ ·	
	YPD medium	YPS medium
Y33/YIPαG5-5	2.97	2.52
Y33/YIPαG5-6	2.31	2.38

* Values represent averages of two experiments

2.5 整合型转化子的稳定性

接种保存在选择性培养基中上 Y33/YIPαG5-6 至 2ml YPD 培养基中, 30℃ 振荡培养过夜, 再从这过夜培养物接种 40μl 到新鲜的 2ml YPD 培养基中, 30℃ 振荡培养过夜, 如

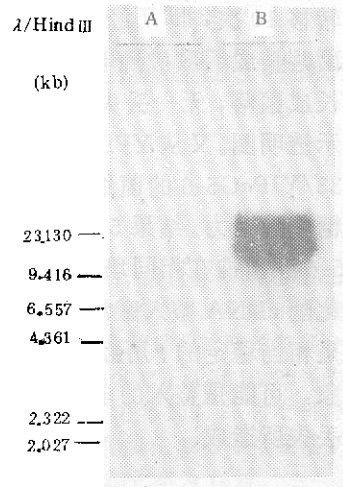


图3 整合型转化子的 Southern 印迹分析

Fig. 3 Southern blot analysis of integration type transformants

A. Y33/pSAK068, B. Y33/YIPα G5

此连续转移 10 次, 即历经约 500 个世代后将培养物作适当稀释, 涂布到 YPD 培养基平板上。菌落长成后随机挑取 300 个到选择性平板上, 结果所有菌落的细胞又都在选择性平板上长成菌落, 无一丢失标记。再把菌落转接到 HC 平板, 培养后用碘染, 除 4 个菌落外均显示透明圈。又从 YPD 平板随机选取 5 个菌落与连续转移培养前保存在选择性平板上的 Y33/YIP α G5-6 的菌细胞同时分别接种 2ml YPD 培养液, 30℃ 培养 48h, 取培养滤液测定糖化酶活力。结果 5 个随机选取菌株的糖化酶分泌活力平均为 1.76u/ml, 与 Y33/YIP α G5-6 原菌株在相同培养条件下的分泌酶活力 1.83u/ml 基本相当。以上结果表明黑曲霉糖化酶 cDNA 整入酿酒酵母染色体 DNA 所构建的分解淀粉的酵母转化子在非选择条件下是相当稳定的。历经 500 个世代后有 1.33% 菌落虽仍保留标记但失去淀粉水解能力的现象, 可能是整入的多拷贝糖化酶基因间发生同源重组, 引起有效表达的糖化酶基因拷贝丢失所造成。

参 考 文 献

- [1] 唐国敏, 龚 辉, 钟丽婵等. 生物工程学报, 1994, 10: 213~217.
- [2] 毛小洪, 蔡金科. 生物工程学报, 1990, 6: 102~107.
- [3] Philippsen P, Stotz A, Scherf C. Methods in Enzymology, 1991, 194: p. 169.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold spring Harbor Laboratory, 1989.
- [5] Sakai A, Shimizu Y, Hishinuma F. Appl Microbiol. Biotechnol, 1990, 33: 302~306.

Integration of Glucoamylase Gene from *Aspergillus niger* to the *Saccharomyces cerevisiae* Genome and Its Stable Expression

Tang Guomin Yang Kaiyu

(Institute of Microbiology, Academia sinica, Beijing 100080, China)

Abstract Starch digestible δ -integrants were constructed by integrative transformation of a linear YIP plasmid carrying *A. niger* glucoamylase cDNA under the control of the MF α 1 promoter and its prepro signal and the δ sequence of the Ty element from yeast. The integration of glucoamylase cDNA to *Saccharomyces cerevisiae* genome was identified by Southern analysis. The secreted glucoamylase activity of integrants in the medium with soluble starch as carbon source reached 2.5u/ml. After ten times successive transfers in nonselective medium the activity of secreted glucoamylase of integrant was approximately at its original level.

Key words Glucoamylase, *Saccharomyces cerevisiae*, integration, stable expression