

新的热带假丝酵母载体-宿主系统的建立

龚毅 蒋华 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是一种可以利用多种非糖碳源代谢的微生物,在石油发酵、石油化工生产领域已得到长期应用^[1]。随着分子生物学研究技术的发展,通过代谢工程技术改变热带假丝酵母的代谢途径和流向,发展出能够把石油中的烃类物质发酵转化成各种重要化工原料、中间体的新型生产菌株,已普遍受到国内外研究机构的重视。另一方面,热带假丝酵母具有细胞生长密度高,分泌蛋白能力强等特点,可以发展成一个重要的异源蛋白表达体系。建立稳定高效的热带假丝酵母载体-宿主系统是实现上述构想的前提和关键。

迄今为止,在热带假丝酵母细胞内尚未发现能游离于染色体外自主复制的天然质粒存在。目前已有20余种热带假丝酵母基因被克隆和鉴定,大部分与热带假丝酵母的氧化代谢过程有关,其中5个过氧化物酶蛋白基因的结构和2个细胞色素P450系统基因的表达调控规律已被阐明^[2~5],与DNA复制过程有关的基因或功能序列均未见报道。本文研究和探索 *Candida* 属其他微生物基因元件在热带假丝酵母中的功能作用,选用热带假丝酵母细胞色素P450单加氧酶基因的启动子和侧翼调控序列^[3],构建了一套新的热带假丝酵母载体-宿主系统,并成功地表达了小鼠CYP1A1基因。

1 材料与方 法

1.1 菌种、质粒和培养基

Candida tropicalis CT750:购自ATCC,野生型菌株;*C. tropicalis* DQ:ura3、*C. tropicalis* DZ:ura3,本工作报道。*S. cerevisiae* BWG1-7A;a,adel-100,his4-119,leu2-112,ura3-53。*C. albicans* 1184:ura3。

质粒:YRP124,酵母-大肠杆菌穿梭质粒,含酿酒酵母ARS序列,URA3筛选标记基因。质粒pCA1184:酵母-大肠杆菌穿梭质粒,含*C. albicans*ARS序列,URA3筛选标记基因。质粒pRC2313:酵母-大肠杆菌穿梭质粒,含*C. albicans*ARS序列,URA3筛选标记基因。质粒pRM1:酵母-大肠杆菌穿梭质粒,含*C. albicans*ARS序列,URA3筛选标记基因。质粒pYG88:从质粒pRM1衍生而来,含受CYP52A1基因启动子控制的小鼠CYP1A1基因。

YPD培养基:2% yeast extract, 1% polypeptone, 2% glucose。SD培养基:0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose。SFD培养基:0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose, uracil 100 μ g/ml, uridine 100 μ g/ml, 5'-fluoro-orotic acid 750 μ g/ml。SOS培养基:1mol/L sorbitol, 6.6mmol/L CaCl₂, 0.25% yeast extract, 0.5% polypeptone。SORB培养基:1mol/L sorbitol, 0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose。CSA培养基:0.2% yeast nitrogen base without amino acid, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 1% succinic acid, 0.6% NaOH, 1% tetradecane。

1.2 野生型热带假丝酵母的诱变及营养缺陷突变株的筛选

用100ml YPD培养基30℃振荡培养野生型热带假丝酵母CT750细胞至生长对数期($A_{600}=1.0\sim1.4$)。5000g,5min离心收集菌体,用10ml无菌水洗涤2次后将菌体悬浮于10ml的柠檬酸缓冲液中

所长基金研究项目。

本文于1996年7月8日收到。

(0.067 mol/L 柠檬酸钠, 0.03mol/L 柠檬酸, pH 5.5)。加入化学诱变剂亚硝基胍至最终浓度 100 μ l/ml。室温缓慢振荡 1h 后 5 000g, 5min 离心收集菌体, 用 10ml 无菌水洗涤 2 次后将菌体转入 100ml SD 培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 4h 后加入制霉菌素至最终浓度 25u/ml, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h, 5 000g, 5min 离心收集菌体, 用 10ml 无菌水洗涤菌体 2 次后悬浮取于 1ml 无菌水中, 取 10 μ l 菌体作等比梯度稀释, 取样涂布于 YPD 培养基确定菌体悬浮液中成活菌体的数目, 然后将菌体悬浮液的浓度稀释成 2000~2500 个/ml。按 200 μ l 菌液/平皿的涂布量将菌体悬浮液涂布于 SFD 固体培养基上。

1.3 热带假丝酵母 *ura⁻* 突变株表型稳定性测定

用 YPD 培养基 30 $^{\circ}$ C 振荡培养热带假丝酵母至 A_{600} = 1.2~1.4 ($\sim 1.0 \times 10^7$ cells/ml), 取 1ml 菌液离心收集菌体, 用 10ml 无菌水洗涤 2 次后再悬浮于 100 μ l 无菌水中, 涂布于 SD 固体培养基平皿上。

1.4 质粒在热带假丝酵母细胞中的稳定性测试

从选择性培养基平皿上挑一单菌落用 YPD 培养基 30 $^{\circ}$ C 振荡培养, 每 3h 取样一次, 测 A_{600} 值。所有样品用无菌水稀释至菌体浓度为 $1.0 \sim 2.0 \times 10^3$ cells/ml。分别取 100 μ l 涂布于 YPD 和 SD 固体培养基平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养至菌落形成, 计算 URA 表型菌落数于总菌落数的比率。

2 结 果

2.1 热带假丝酵母 ATCC750 菌株对抗生素的敏感性试验

一些常用的酵母如 *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Yarrowia lipolytica* 对 G418 等抗生素有一定的敏感性。用抗性基因作为显性筛选标记基因已成功地应用于这些酵母表达系统的载体构建中^[6]。为探索用抗性标记基因构建热带假丝酵母载体的可能性, 首先测定了热带假丝酵母 ATCC750 菌株对 4 种抗生素的敏感性, 用 YPD 培养基将热带假丝酵母 CT750 菌株 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 测定菌液在 600nm 处的吸光度, 再用 YPD 培养基稀释至 A_{600} = 0.5。取 10 μ l 菌体稀释液分别接种于 6 瓶 100ml 含不同浓度抗生素的 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养, 从接种开始计时, 24h 后每隔 12h 取样 1 次, 测定菌液在 600nm 处的吸光度, 作出生长曲线。实验结果表明 CT750 菌株对 G418, Puromycin, Hygromycin, Phleomycin 等抗生素敏感性均较差。在较高浓度的抗生素存在的条件下只能抑制其生长速率而不能完全抑制生长, 由于使用高浓度抗生素将导致抗性选择的灵敏度降低, 在实际使用上有很大的限制。因此我们认为热带假丝酵母载体不能选用这些抗生素的抗性基因作为显性筛选标记基因。

2.2 筛选具有稳定 *ura⁻* 表型的热带假丝酵母营养缺陷突变株

经亚硝基胍处理的热带假丝酵母 ATCC750 菌株涂布于 FU 平板培养基, 共得到 12 个 5'FOA'抗性的突变株, 对这些菌株保持 *ura⁻* 表型的稳定性进行测定, 结果见表 1:

表 1 12 株热带假丝酵母 *ura⁻* 突变株表型稳定性测试结果

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
菌株代号	AT	BC	JQ	DQ	AR	KH	DN	HE	GA	GC	DZ	PR
URA 菌落数	-	+	++	-	+	+	+++	-	+	+	-	+

涂布菌体数: $\sim 1.0 \times 10^7$ 个/平皿; - 表示选择性平皿未见 URA 表型菌落; + 表示每块选择性平皿有 1~10 个 URA 表型菌落; ++ 10~50 个/平皿; +++ 50 个以上/平皿

根据上表数据, 选取回复突变率较低的 *ura⁻* 菌株 AT, DQ, HE 和 DZ 进行进一步分析鉴定。

2.3 *S. cerevisiae*, *C. albicans* 的 URA3 基因和 ARS 片段在 AT, DQ, HE 和 DZ 菌株中的功能作用检测

将质粒 pRM1, pCA1184, pRC2312 和 YRP124 分别转化 *C. tropicalis* 菌株 AT, DQ, HE, DZ, *S. cerevisiae* 菌株 BWG1-7A, *C. albicans* 菌株 CA1184, 结果见表 2。

表 2 URA3 基因和 ARS 片段在异种酵母中的兼容性试验结果

菌株	质粒			
	pRM1	pCA1184	pRC2313	YRP124
<i>C. tropicalis</i> AT	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> DQ	++	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> DZ	++	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> HE	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> BWG1-7A	-	-	-	+++
<i>C. albicans</i> 1184	+++	++	++	-

++ 表示转化率为 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3 / \mu\text{g DNA}$; +++ 表示转化率为 1.0×10^3 以上/ μgDNA

质粒 pRM1 带有 *C. balicans* 的 URA3 基因和自主复制序列(ARS)。该质粒转化 *C. tropicalis* 变异株 DQ 和 DZ 能给出较高的转化率,表明它们为 *ura3⁻* 营养缺陷型突变菌株。同时也证明了 *C. albicans* 的 URA3 基因和自主复制序列 ARS 在 *C. tropicalis* 中仍有功能作用。这种异源功能元件相互通用的现象普遍存在于各类微生物中,给基因分离和鉴定,构建各种用途的载体提供了方便。质粒 pCA1184, pRC3212 转化 *C. tropicalis* 变异株 DQ 和 DZ 不能给出转化子,可能是因为它们携带与 pRM1 不同的 *C. albicans* 自主复制序列。而这些自主复制序列不能被 *C. tropicalis* 所识别的缘故。三种 *C. albicans* 质粒转化 *C. tropicalis* 突变株 AT 和 HE 均不能给出转化子,有二种可能,一是由于诱变导致菌株的转化率很低,二是 AT 和 HE 可能是 *ura5⁻* 突变株,因为 *C. tropicalis ura5⁻* 突变株也具有 5'-FOA 抗性。

质粒 pRM1 转化 *C. tropicalis* DQ,DZ 突变株在选择性平皿上能得到转化子,分别随机挑取 5 个菌落在基本培养基中继续培养后破碎菌体,回收细胞内的质粒 DNA,限制性酶切图谱鉴定表明回收的质粒确为 pRM1。在无选择压力培养条件下,含 pRM1 质粒的 DQ,DZ 菌株的稳定性研究结果见表 3。

表 3 含 pRM1 质粒的 DQ,DZ 菌株的稳定性

菌 株	URA ₃ 表型菌落数 / 总菌落数							
	3h	6h	9h	12h	15h	18h	21h	24h
<i>C. tropicalis</i> DQ/ %	93	69	30	14	2	<1	<1	<1
<i>C. tropicalis</i> DZ/ %	87	70	33	10	3	2	<1	<1

2.4 小鼠 CYP1A1 基因在热带假丝酵母中表达

前文报道了小鼠 CYP1A1 基因, *C. tropicalis* P450alk 基因的克隆,以质粒 pRM1 为基础,用 *C. tropicalis* P450alk 基因的启动子和终止信号、小鼠 CYP1A1 基因构建了一个表达质粒 pYG88。P450alk 基因的启动子为长链烷烃诱导型,含表达质粒 pYG88 的热带假丝酵母菌株 DZ(pYG88),DQ(pYG88)在诱导条件下,用一氧化碳还原分光光谱分析能检测到 P450 蛋白(CYP1A1 基因产物),见表 4。

3 讨 论

利用 *ura⁻* 表型的酵母具有 5'-FOA 抗性的性质,通过诱变筛选 *ura⁻* 突变株的研究工作已有成功报道^[9,10]。热带假丝酵母是一种在细胞周期中不能形成孢子的二倍体酵母菌。虽然用化学突变的方法筛选营养缺陷型突变株较单倍体酵母困难,但由于是二倍体细胞,一些单拷贝的本底突变不会严重影响细胞本身的生物学特性。DNA 转化进入酵母细胞的过程涉及多种因子的协同作用,经诱变的单倍体酵母往往转化率很低,需要通过反复的接合,四分体分析,回交等过程筛选转化率高的突变株。本文报道的热带假丝酵母突变株 DQ 和 DZ 具有较高的转化率,在生长速率、生长密度、形态发生上与野生型菌株 CT750 无明显差别,表明 DQ 和 DZ 突变株基本维持了热带假丝酵母原有的性质。

质粒 pRM1 在 *C. tropicalis* 细胞中稳定性较差,是因为其 ARS 功能序列 *C. tropicalis* 本身的 ARS 序列功能作用有限。我们曾试图从 *C. tropicalis* 基因库中分离 *C. tropicalis* 本身的 ARS 序列,但未获成功,至今国内外也无分离获得 *C. tropicalis* 本身 ARS 序列的研究报道。Sanglard 等人报道构建的一个 *C. tropicalis* 复制型载体 pMK16^[11],也选用了 *C. albicans* 的 ARS 序列,其特性也与我们的研究结果相近。

对比 DQ, DQ(pYG88), DZ, DZ(pYG88) 菌株的一氧化碳还原分光光谱图,可以判定 450nm 处的吸收峰为表达的小鼠 P450 蛋白,光谱图还显示 DQ、DZ 菌株在 420 nm 处有吸收峰,这一菌株专一的光谱特征在 *S. cerevisiae* 的一些变异株中也有报道^[12],其形成原因尚不明朗,一种比较普遍的假说认为当 P450 蛋白的空间构象变得松散时其在一氧化碳还原分光光谱中的吸收峰位于 420nm 处。已有一些结果支持这一假说,但还有待于进一步研究加以阐明。

表 4 小鼠 CYP1A1 基因在 DQ、DZ 中的表达结果

菌 株	表达量/nmol·g ⁻¹
DQ	N
DQ(pRM1)	N
DQ(pYG88)	4.7
DZ	N
DZ(pRM1)	N
DZ(pYG88)	8.2

测定方法:在 100ml CSA 培养基中加入所需的补充氨基酸,30℃ 振荡培养酵母至生长对数期后期($A_{600} = 2.0 \sim 2.5$)。5 000g, 5min 离心收集菌体,对湿菌体称重后用 10ml 无菌水洗涤 1 次,按 0.1g 湿菌体/ml 的浓度将菌体悬浮于 0.2mol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液中,加入少量(10~20mg)过硫酸钠,混匀,将菌体悬浮液分装在 2 个比色杯中,其中之一作为对照,在分光光度计上从 400~500nm 进行基线扫描,然后在样品杯中通入一氧化碳气体 1min。再放入分光光度计从 400~500nm 进行吸光度扫描。按 Omura^[7]和 Guengerich^[8]的方法对 450nm 处的吸收峰进行分析。

参 考 文 献

- [1] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K *et al.* Bio/Technology, 1992, 10:894.
- [2] Sanglard D, Chen C, Loper J C. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 114(1):251.
- [3] Sanglard D, Loper J C. Gene, 1989, 76:121.
- [4] Seghezzi W, Sanglard D, Fiechter A. Gene, 1991, 106:51.
- [5] Chen C, Turi T G, Sanglard D. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 146:1311.
- [6] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Yeast, 1992, 8:423.
- [7] Omura t, Sato R. J Biol Chem. 1964, 239:2379.
- [8] Guengerich F P. In: Hayes, A. W. (Ed.), Principles and Methods of Toxicology, Raven Press, N Y, 1982, 609.
- [9] Boeke J D, Truchheart J, Fink G R. Methods of Enzymology, 1984, 154:164.
- [10] Gleeson M G, Haas L C, Cregg J M. Applied and Environment Microbiology, 1990, 56(8):2562.
- [11] Sanglard D, Fiechter A. DNA Yeast, 1992, 8:1065.
- [12] Callen D F, Philpot R M C S. Mutation Res, 1977, 45:39.

Construction of a New Vector-host System in *Candida tropicalis*

Gong Yi Jiang Hua Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

Abstract Two stable *ura3⁻* mutants of *Candida tropicalis* (DQ and DZ) were isolated by chemical mutagenic. The results indicated that plasmid pRM1, which contains a ARS fragment from *Candida albicans*, can work efficiently in these mutants. A vector-host system in *C. tropicalis* was developed and the mouse CYP1A1 gene has been expressed under the control of P450alk promoter.

Key words *Candida tropicalis*, vector, gene expression