

非随机方法构建酿酒酵母基因工程菌

龚 毅 陈 燕 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

酿酒酵母是基因工程产品研究和生产的一个重要表达系统,表达载体和宿主细胞是构成表达系统的两大要素,虽然外源基因表达的方式、强度主要由表达载体控制,但宿主细胞的选择对最终获取产品的质量和数量也具有十分关键的作用。酿酒酵母基因工程宿主菌除要求具有高的 DNA 转化效率、细胞生长密度和稳定性、低的内源蛋白水解酶活性外,还必须具备与表达载体相对应的营养缺陷筛选标记,用传统随机诱变方法得到的营养缺陷变异株,因含有本底和隐性突变,在细胞生长密度和稳定性方面往往不能满足基因工程产品研究和生产的要求,甚至不能有效地表达外源基因。本文报道用重组技术,通过非随机方法构建了酿酒酵母基因工程宿主菌。研究表明用该方法得到的宿主菌在细胞生长密度、稳定性和表达外源基因方面优于用传统随机诱变方法得到的宿主菌。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基

JL82 *S. cerevisiae*, 野生型; GJ10 *S. cerevisiae*, *ura3⁻*, 本工作构建; GJ20 *S. cerevisiae*, *leu2⁻*, 本工作构建; GJ30 *S. cerevisiae*, *leu2⁻*, *ura3⁻*, 本工作构建; BWG1-7a *S. cerevisiae*, *leu2⁻*, *ura3⁻*, *his4⁻*, Dr. J. C. Loper 惠赠; AH22 *S. cerevisiae*, *leu2⁻*, *his4⁻*, *can1*, 见文献[1]; YPH499 *S. cerevisiae*, *leu2⁻*, *his4⁻*, *ura3⁻*, *lys3⁻*, *ade2⁻*, *trp1⁻*, 见文献[2]。

YPD 培养基: 2% yeast extract, 1% polypeptone, 2% glucose; SGlu 培养基: 0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose; SGal 培养基: 0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% galactose; 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。

1.2 重组质粒

pMG40: 从质粒 pJJ242^[3] 衍生而来, 其 *Ura3* 基因编码区的 0.2kb *ApaI*-*EcoRV* 片段被 λ DNA 的 2.1kb *ApaI*-*SnaBI* 片段替换。

pMG50: 从质粒 pJJ250^[3] 衍生而来, 其 *Leu2* 基因编码区 0.6kb 的 *ClaI*-*EcoRV* 片段被 *Ura3* 基因替换, *Ura3* 基因两端分别含有同向重组酶识别序列。

pHM154: 受 *GAL1* 启动子调控的 *Z. rouxii* 重组酶表达质粒^[4]。

pBE1400: 受 *PHO11* 启动子调控的 *PHO11*-*LacZ* 融合基因表达质粒^[5]。

1.3 寡聚核苷酸引物

按文献报道的酿酒酵母(*S. cerevisiae*) *URA3*^[6] 和 *LEU2*^[7] 基因的序列, 化学合成以下 PCR 反应的引物。

Primer1: *URA3* 基因 246-265 位序列: 5'-AGGAACGTGCTGCTACTCAT-3'

Primer2: *URA3* 基因 989-1008 位互补序列: 5'-CTCAAATATGCTTCCCAGCC-3'

Primer3: *LEU2* 基因 797-815 位序列: 5'-ATCGATGCTACAGGTGTCC-3'

收稿日期: 1997-04-14, 修回日期: 1997-12-08。

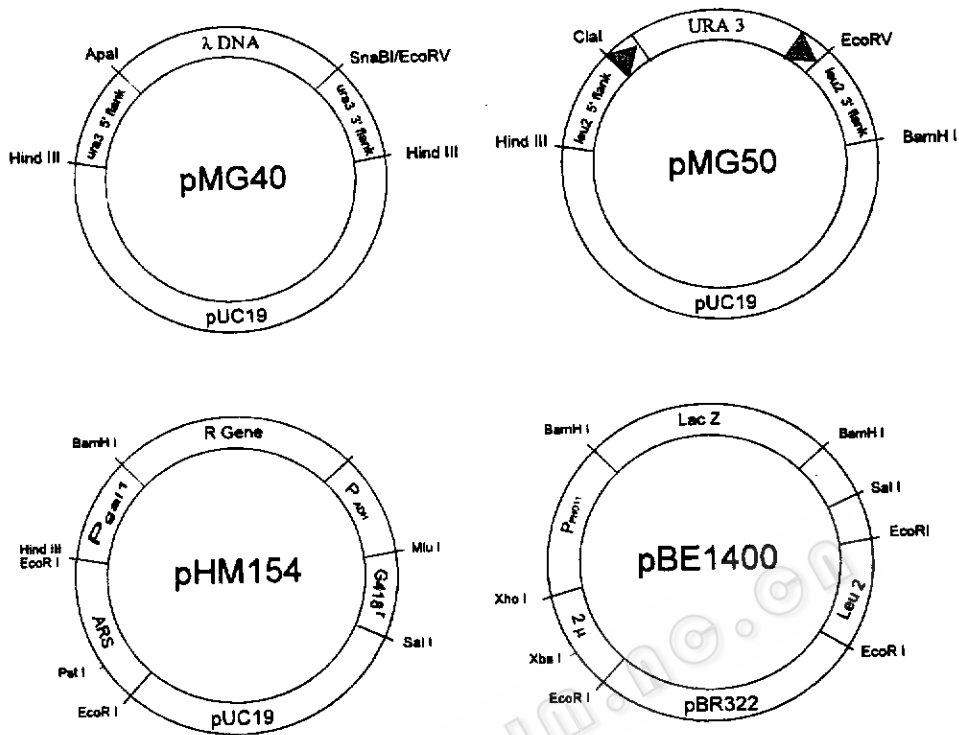


图 1 质粒 pMG40, pMG50, pHM154 和 pBE1400 构造示意图

Primer4 : LEU2 基因 1682-1700 位互补序列:5'-CGACTTCGGTGGTACTGTT-3'

2 结 果

2.1 营养缺陷型基因工程宿主菌的构建

在各种酵母营养缺陷株中, *ura3⁻* 营养缺陷株能在含 5'-FOA(5'-氟乳清酸)的培养基上生长, 这是一个显性筛选过程^[8]。本研究首先通过同源重组得到 *ura3⁻* 营养缺陷株, 再以两端带有同向的 *Z. rouxii* 重组酶识别序列的 URA3 基因为标记基因, 通过同源重组得到其它营养缺陷株, 在 *Z. rouxii* 重组酶的作用下, URA3 基因片段重组缺失, 得到双营养缺陷型宿主菌。构建过程如下:

质粒 pMG40 的 3.1kb Hind III 片段含失活的 URA3 基因, 利用 *ura3⁻* 营养缺陷株具有 5'-FOA⁺ 表型的性质, 通过同源重组可得到 *ura3⁻* 营养缺陷株。质粒 pMG40 用限制酶 Hind III 酶解, 琼脂糖凝胶电泳分离回收 3.1kb Hind III 片段, 定量后取 5μg 上述 DNA 片段转化野生型酿酒酵母 J182, 在 SFD 营养平板上共得到 7 个 5'-FOA⁺ 转化子, 经转化含完整 URA3 基因的质粒 pJJ242 验证, 确认其中 6 个转化子为 *ura3⁻* 表型, 选取其中之一命名为 GJ10。

为得到双营养缺陷型宿主细胞, 质粒 pMG50 用限制酶 Hind III、BamHI 酶解, 琼脂糖凝胶电泳分离回收 2.6kb Hind III、BamHI 片段, 定量后取 5μg 上述 DNA 片段转化上述 *ura3⁻* 表型酿酒酵母 GJ10, 在 *ura⁻* 的 SGlu 选择性营养平板上共得到 12 个 URA⁺ 表型的转化子。在无选择压力条件下这些转化子都稳定地保持 URA⁺, *leu⁻* 表型, 选取其中之一命名为 GJ20。将质粒 pHM154 转化 GJ20, 在含 0.5mg/ml G418 的 YPD 营养平板得到 G418⁺ 表型转化子后, 选取一转化子在含 20mg/L 尿苷、亮氨酸的 SGal 液体培养基中培养 48h。稀释涂布于 YPD 营养平板, 再分别复制于 *ura⁻*、*leu⁻* 选择性营养平板和含 G418 的 YPD 营养平板, 从中得到了 *ura3⁻*, *Leu2⁻*, G418⁺ 的双营养缺陷型宿主菌 GL30。

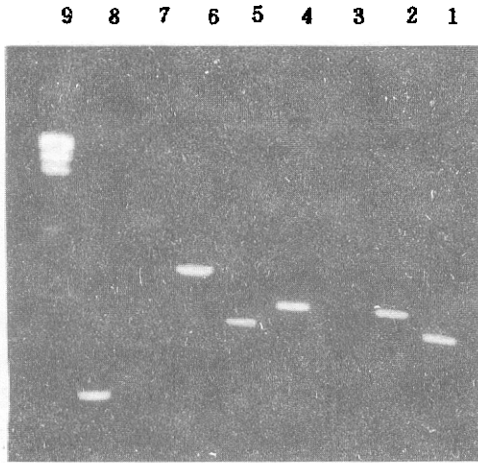


图2 菌株 JL82, GJ10, GJ20 和 GJ30 染色体 DNA 的 PCR 检测

1. 模板为 JL82 染色体 DNA, 引物为 primer 1 和 primer 2
2. 模板为 JL82 染色体 DNA, 引物为 primer 3 和 primer 4
3. 模板为 GJ10 染色体 DNA, 引物为 primer 1 和 primer 2
4. 模板为 GJ10 染色体 DNA, 引物为 primer 3 和 primer 4
5. 模板为 GJ20 染色体 DNA, 引物为 primer 1 和 primer 2
6. 模板为 GJ20 染色体 DNA, 引物为 primer 3 和 primer 4
7. 模板为 GJ30 染色体 DNA, 引物为 primer 1 和 primer 2
8. 模板为 GJ30 染色体 DNA, 引物为 primer 3 和 primer 4
9. 经 HindIII 酶解的 λ DNA, 分子量标准。

7a, YPH499 和 GJ30。每隔 2h 取样测定菌密度 A_{600} , 以菌密度 A_{600} 为纵座标, 时间为横座标作出生长曲线见图 3。通过比较, 表明 GJ30 在细胞生长速率和密度上优于 AH22, BWG1-7a 和 YPH499。

2.3.2 质粒在酵母菌中的稳定性:

将含 LEU2 基因的复制型质粒 YEP13 分别转化 AH22, BWG1-7a, YPH499 和 GJ30, 再从各自的选择性培养基平皿上挑一单菌落用 YPD 培养基 30℃ 振荡培养, 每 12h 取样一次, 测 A_{600} 值。所有样品用无菌水稀释至菌体浓度为 $1.0 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^3$ cells/ml。分别取 100 μ l 涂布于 YPD 固体培养基平板上, 再影印至各自的选择性培养基平板上, 30℃ 培养至菌落形成, 计算 Leu2⁻ 表型菌落数与总菌落数的比率。结果表明质粒 YEP13 在 GJ30, BWG1-7a 和 AH22 中的稳定性基本相同, 在 YPH499 中稳定性较差(见图 4)。

2.3.3 对外源基因表达: 质粒 pBE1400 含有 PHO5-LacZ 融合基因, 其表达受低无机磷浓度诱导, 将质粒 pBE1400 分别转化 AH22, BWG1-7a, YPH499 和 GJ30, 按文献报道的方法^[5]测定 PHO5-LacZ 融合基因表达的水平, 结果表明 PHO5-LacZ 融合基因在 GJ30 中比在 BWG1-7a, AH22 中高 2~3 倍, 比在

2.2 同源重组结果的 PCR 检测

为验证同源重组结果, 以 JL82、GJ10、GJ20 和 GJ30 的染色体 DNA 为模板进行 PCR 检测, 琼脂糖凝胶电泳证明了同源重组、缺失的发生, 以 JL82 和 GJ30 为例分析如下: 用 URA3 基因编码区的引物 A 和 B, JL82 和 GJ30 的 PCR 产物长度分别为 0.76kb 和 2.7kb, 用 LEU2 基因编码区的引物 C 和 D, JL82 和 GJ30 的 PCR 产物长度分别为 0.88kb 和 0.38kb。表明 GJ30 菌株的 URA3 基因内部有片段插入, LEU2 基因内部有缺失。上述结果从分子水平上验证了 GJ30 菌株遗传表型。

2.3 宿主细胞的生物学功能比较

细胞生长速率和密度, 附加载体在细胞内的稳定性和对外源基因表达水平的高低是判定基因工程宿主菌生物学功能的重要指标, 现选用常用的酿酒酵母宿主菌 AH22, BWG1-7a 和 YPH499 与 GJ30 相比较。

2.3.1 生长曲线: 用 YPD 培养基以 1% 的接种量 30℃ 振荡培养酵母 AH22, BWG1-

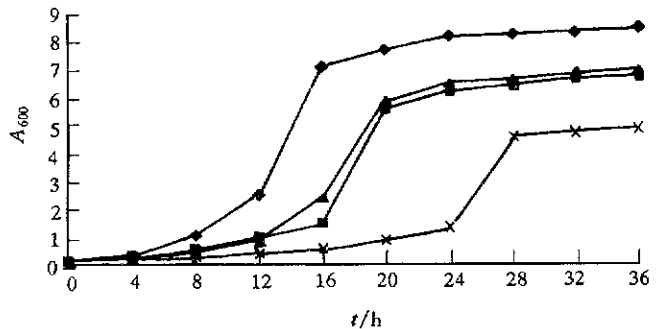


图3 酿酒酵母宿主菌 AH22, BWG1-7a, YPH499 和 GJ30 的生长曲线比较

◆GJ30 ■BWG1-7a ▲AH22 *YPH499

YPH499 中高近 10 倍(见表 1)。

3 讨 论

本研究工作的特点之一是用作标记的 URA3 基因两端带有同方向的 *Z. rouxii* 重组酶识别序列。当 *Z. rouxii* 重组酶在 GAL1 启动子调控下表达时,URA3 基因片段很快缺失,因此作为标记基因的 URA3 基因能够多次反复使用,重复类似步骤不仅可以构建含多种营养缺陷标记的宿主菌,而且还可以根据需要缺失其它基因片段。

因此这一技术可为分子生物学的研究提供新的手段。

菌株 YPH499 是酵母遗传学研究的常用菌株,含有 6 个氨基酸缺陷遗传标记,由于本底突变较多,因此菌体生长缓慢,对质粒的稳定性差,外源基因在其细胞内表达水平低。这也证明了用于遗传分析菌株的生物学特性不完全适合作为基因工程宿主菌。GJ30 由野生型定向突变而来,无本底和隐性突变,其生物学特性能达到基因工程宿主菌的要求。

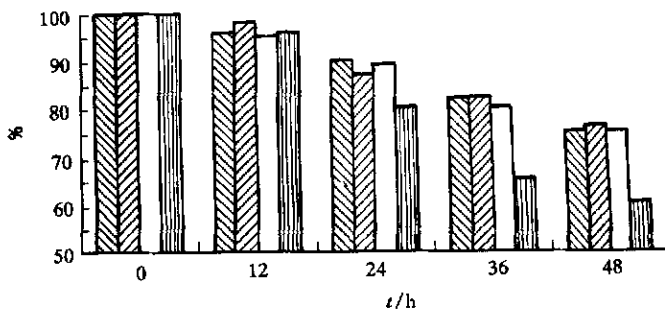


图 4 质粒 YEP13 在不同酵母菌株内稳定性比较

■ GJ30 ▨ BWG1 □ AH22 ▩ YPH49

表 1 PHO5-LacZ 融合基因在不同宿主中的表达量

菌株	β -半乳糖苷酶活力/(μ ·ml ⁻¹)	
	高磷培养基	低磷培养基
GJ30(pBE1400)	6.5	236
BWG1-7a(pBE1400)	4.1	87
AH22(pBE1400)	4.3	101
YPH499(pBE1400)	4.6	25

参 考 文 献

- 1 Miyahara A, Toh E A, Nozaki C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80:1
- 2 Sikorski R S, Hieter P. Genetics, 1989, 122:19
- 3 Jones J S, Prakash L. Yeast, 1990, 6:363
- 4 Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J. *et al.* J of Bacteriology, 1990, 172:610
- 5 龚 毅, 陈江野, 敖世洲, 生物物理与生物化学学报, 1989, 21(5):414
- 6 Rose M, Grisafi P, Botstein D. Gene, 1984, 29:113
- 7 Andreadis A, Hsu Y P, Kohliaw G B *et al.* Cell 1982, 31:319
- 8 Boeke J D, Xu H, Fink G R. Mol Gen Genet. 1984, 197:345~346

Construction of Engineering Host by Non-random Method in *Sacchomyces cerevisiae*

Gong Yi Chen Yan Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract A yeast engineering host, GJ30, was constructed by nonrandom method. GJ30 derived from wild type yeast have *leu2*⁻ and *ura3*⁻ deficiencies which can be used as selecting markers. The PCR analysis showed that the homologous recombinations were happened in the *leu2* and *ura3* locus of GJ30 respectively. The biological properties (cell growth density, stability and efficiency for gene expression) of GJ30 were compared with other several yeast strains. The results showed that GJ30 is a suitable host strain for expression of foreign genes.

Key words Yeast, host strain, recombination