

酿酒酵母海藻糖-6-磷酸合成酶基因克隆 及植物表达载体的构建^{*}

陈红漫 祝令香 董志扬^{**}

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从耐热性极强的酿酒酵母菌株 AS2.1416 中分离纯化出总 RNA 和 mRNA,以 AMV 逆转录酶合成 cDNA,采用保守引物,从该 cDNA 中扩增克隆出 *tps1* 基因,对该基因的全序列分析表明,该基因含有 1507 个核苷酸,与国外报道相关基因的同源性达 99.6%。利用 *Bam*HI 和 *Sac* I 切点将 *tps1* 基因插入植物表达载体 pBin438 多克隆位点上,得到 *tps1* 基因植物表达载体重组质粒。

关键词 海藻糖-6-磷酸合成酶,基因克隆,表达载体

中图分类号: Q344 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2001)01-0054-05

海藻糖(Trehalose)是一种非还原性二糖,它主要存在于一些生活在各种恶劣环境条件下的低等生物体内,如酵母、甲壳类昆虫及一些低等沙漠植物等^[1]。这些生物之所以能低抗高温干旱、冷冻及化学污染等逆境,主要是由于其体内海藻糖能有效地保护这些生物体的细胞在各种逆境下的生物活性^[2]。研究表明,海藻糖对高等动植物细胞同样具有较好的保护作用。而高等植物不产海藻糖,如果能将海藻糖合成酶的基因转入高等植物,使高等植物也具有合成海藻糖的能力,从而提高高等植物的抗逆特性,这对我国的农业生产将具有重要的意义。酿酒酵母是海藻糖产量最大的微生物之一,酿酒酵母海藻糖的生物合成是由海藻糖合成酶(TPS1)以 UDP-葡萄糖为底物催化而成。其中海藻糖-6-磷酸合成酶是关键酶^[3]。

本文报道从海藻糖高产酿酒酵母菌中,利用 PCR 法克隆 *tps1* 基因,并将该基因构建到植物表达载体上,为酿酒酵母 *tps1* 基因在高等植物细胞中表达奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AS2.1416 由中国科学院微生物菌种保藏中心提供,大肠杆菌 DH-5 α 、质粒 pSK II 由本室保存,植物表达载体 pBin438 由方荣祥教授惠赠。限制性内切酶、Taq 酶、T4 连接酶及 mRNA 纯化试剂盒、cDNA 反转录试剂盒购自 Promega 公司,1kb ladder 购自 Gibco 公司

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39570403)

^{**} 通讯作者

作者简介 陈红漫(1969-),女,辽宁沈阳市人,沈阳农业大学讲师,博士,1997 年在中国科学院微生物研究所完成博士论文工作,主要从事生物化学和分子生物学研究。

收稿日期 2000-01-10,修回日期 2000-08-15 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母 cDNA 的制备 将酿酒酵母接种于 200mL YEPD 培养基中 250r/min 振荡 20 h 至 $OD_{260} = 2.5$ 时 4℃ 4 000r/min 离心 ,收集菌体用热酚法提取酵母总 RNA。并按 Progema 公司提供的试剂盒说明所述方法操作 ,分离 mRNA 并以 mRNA 为模板 经反转录得到 cDNA。

1.2.2 *tps1* 基因扩增 用于 PCR 反应的 5'和 3'引物是根据 Wiemken^[4]报道的酿酒酵母 S288C 的 *tps1* 基因序列设计的。

5'-引物 AAAGGATCCATGATCACGGATAACGC

3'-引物 TTGGGACTCTCATCAGTTTTTGGTTGG

以酿酒酵母 AS 2.1416 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件如下 :92℃ 变性 30s 55℃ 复性 90s 72℃ 延伸 120s ;共 35 个循环。最后一轮反应在 72℃ 保温 15min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 ,用 1% 低熔点琼脂糖回收纯化 ,用于下一步反应。

1.2.3 *tps1* 基因克隆 :利用质粒 PSK II 多克隆位点上的 *Bam*H I ,*Sac* I 切点将经 *Bam*H I ,*Sac* I 双酶切的 PCR 产物连接 ,转化 *E. coli* DH-5α ,在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB/Amp 平板上筛选白色菌落 ,对重组子进行酶切鉴定 ,并对该基因片段进行测序。

1.2.4 重组表达质粒的构建 pBin438 为带有 35S 启动子非特异性植物表达载体 ,在 35S 启动子及 Ω 增强子下游有 *Bam*H I 、*Sac* I 多克隆位点 ,可供外源基因插入并使其在植物细胞中表达。将 *tps1* 基因克隆及植物表达载体 *pBin*438 经酶切 ,连接并转化 *E. coli* DH-5α ,在 LB/Amp 平板上筛选重组子后进行 PCR、酶切鉴定及部分序列分析。

2 结果

2.1 酿酒酵母 cDNA 的制备

通过苯酚法提取的酵母总 RNA ,经电泳分析(图 1)其 18sRNA 和 28sRNA 特征谱带清晰 ,说明提取的总 RNA 是完整的。从完整的总 RNA 分离得到的 mRNA 如图 1 所示 :mRNA 是一条弥散条带 ,大小不均一 ,但已经去掉大部分 18sRNA 和 28sRNA ,可用作合成 cDNA 的模板。

采用 Progema 公司 cDNA 试剂盒 ,以 2μg mRNA 作模板 ,加入 olig(dT)引物 ,在 15u/μg RNA 的 AMV 逆转录酶作用下 ,合成 cDNA。合成后的 cDNA 经电泳分析 ,如图 1 - 3 所示 :合成的 cNDA大小在 100bp 至 8 000bp 之间 ,据国外已有的资料报道 ,酿酒酵母 *tps1* 基因的大小为 1.5kb ,因此合成的 cDNA 是有希望获得完整的 *tps1* 基因的 cDNA。

2.2 *tps1* 基因的 PCR 扩增

经 PCR 反应 ,得到单一条带 ,大小约在 1.5kb 左右(图 2) ,与预期结果一致。经 1% 低熔点琼脂糖凝胶纯化 ,用于下一步连接反应。

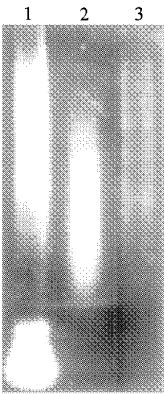


图 1 酵母总 RNA、mRNA、cNDA 凝胶电泳分析
Fig. 1 Analysis of total RNA mRNA and cDNA
1. Total RNA ; 2. mRNA ;
3. cDNA.

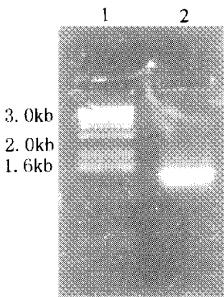


图 2 PCR 产物分析
Fig. 2 Analysis of
PCR products
1. 1kb ladder; 2. PCR
products of cDNA.

2.3 *tps1* 基因克隆

将纯化后的 PCR 产物与 pSK II 连接, 转化 *E. coli* DH-5 α , 筛选到阳性菌落(克隆过程见图 3)。提取质粒, 进行限制性内切酶酶切鉴定和 PCR 检测, 见图 4。结果表明在载体上插入了 1.5kb 的 DNA 片段, 酶切鉴定分析, 该片段的酶切位点与发表的酿酒酵母 *tps1* 基因酶切位点完全一致。对该基因全序列分析表明, 克隆片段全长 1507bp, 含有一个 1485bp 的 ORF, 编码一个由 495 个氨基酸组成的蛋白质, 该基因序列已为国际核酸数据库收录, DDBJ 号为 AF061037。根据此序列与酿酒酵母 S288C 的 *tps1* 进行了比较, 其核苷酸序列同源性大于 99%, 其中第 224、302、649、862 存在 4 个差异, 推测其所编码的蛋白质的氨基酸序列亦有 4 个不同, 氨基酸序列同源性为 99%。将该重组质粒命名为 pTPS-6。

2.4 重组表达质粒的构建

由图 4 所示, 将上述重组质粒 pTPS-6 经 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切, 得到 *tps1* 基因, 回收该片段, 定向连接在 pBin438 质粒多克隆位点 *Bam*H I 和 *Sac* I 之间。转化感受态 DH-5 α , 挑选并得到 5 个重组质粒, 分别命名为 pb-1, pb-5, pb-36, pb-48, pb-52。进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切分析, 表明有 1.5kb 大小的插入片段(图 5)。为进一步确定 *tps1* 基因正确连接到 pBin438 表达载体上, 我们通过用 *tps1* PCR 引物对上述阳性重组质粒进行 PCR 反应, 结果均得到与 *tps1* 大小相同的 PCR 产物。以 pBin438 测序引物对重组质粒 3' 下游进行部分序列分析(图 6), 结果表明酿酒酵母 *tps1* 基因已构建在植物表达载体

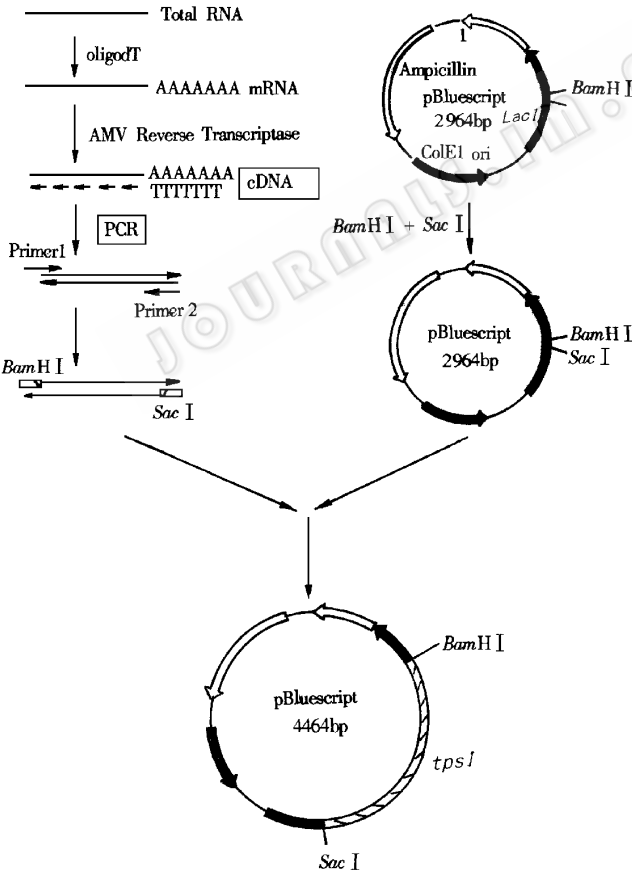


图 3 酵母 *tps1* 基因克隆示意图

Fig. 3 The cloning of *S. cerevisiae tps1* gene

pBin438 的正确位置上 ,可转化植物 进行表达。

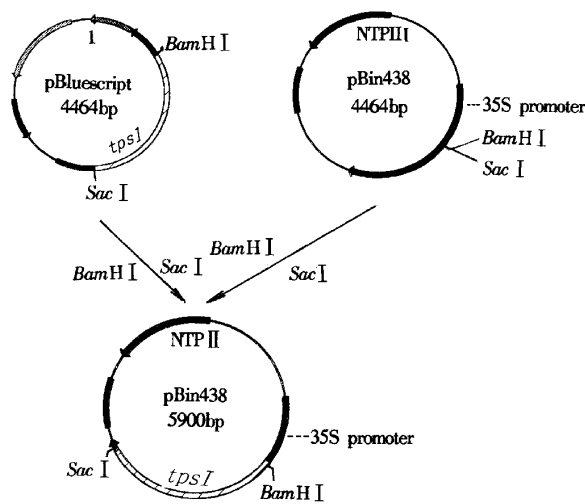


图 4 植物表达载体构建示意图

Fig. 4 Recombination of the plant expression vector

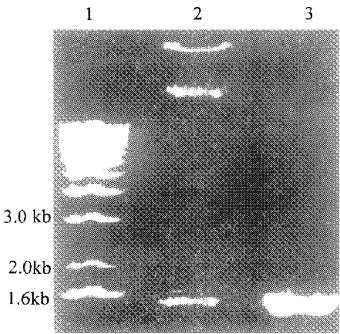


图 5 重组表达载体酶切分析

Fig. 5 Analysis of recombinant expression vector with restriction enzyme 1. 1.1kb ladder ;2. Recombinant plasmid/ BamHI / Sac I 3. tps1.

TATTTTACA ACAATTGCCA ACAACAACAA CAAACAACAA CAACATTATT
CTGGATCATG ACTACGGATA AACGCTAAGG CGCAACTGAC CTCGTCCTCA
GGGGTAACA TTATTGTGGT GTCCAACAGG CTTCCCGTGA CAATCACTAA
AAACAGCAGT ACGGGACAGT ACGAGTACGC AATGTCGTCC GGAGGGCTGG

图 6 重组质粒部分序列分析结果(部分序列)

Fig. 6 Partial sequence of the recombinant expression vector

3 讨论

海藻糖对高等动植物细胞及大分子的保护作用日益受到生物界重视^[5] ,酿酒酵母是海藻糖产量较高的菌种 ,其海藻糖合成途径及关键酶基因都已明了^[6]。海藻糖合成的底物为 UDP-葡萄糖 ,这在植物细胞内广泛存在 ,由于在植物细胞内存在有大量非特异性磷酸化酶 ,在植物细胞内由酵母 TPS1 合成的 6-磷酸海藻糖可被去磷酸化 ,得到最终产物海藻糖^[7]。因此通过酵母 TPS1 在高等植物中的表达 ,合成海藻糖 ,从而达到提高植物细胞抗逆能力 ,这在理论上是完全可行的。

酿酒酵母 AS2.1416 具有较强的抗热能力。能在 40℃ 的环境中生长 ,且能合成大量海藻糖。本实验通过 PCR 技术 ,成功地从其 cDNA 中得到海藻糖合成的关键酶基因 tps1。

将 tps1 基因构建到植物表达载体 pBin438 上 ,该表达载体带有 35S 启动子 ,为非特异性表达组成型启动子。该启动子表达具有持续性 ,RNA 和蛋白质表达量也是相对恒定 ,不表现时空特异性 ,也不受外界因素诱导。特别是 35S 启动子后带有一个 O 增强子 ,

可增强与相连锁基因的转录活性,位于增强子后的 Nos3'调节序列可用于外源基因的克隆和表达^[8]。该基因已在模式植物烟草中得到表达,并在烟草细胞中合成较大量海藻糖。我们将作进一步报道。

致谢 本工作得到中国科学院微生物研究所方荣祥教授、张国华副教授的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢!

参 考 文 献

[1] John H , Crowe L , Crow M. *Anhydrobiosis* ,1992 **54** :579~599.
[2] 戴秀玉 程 萍.微生物学通报 ,1995 **22** (2):102~104.
[3] Klaus M , Helmut H. *The Journal of Biological Chemistory* ,1988 **263** (17) 8537~8543.
[4] Walter B , Paul K , Martin O *et al.* *Eur J Biochem* ,1992 **209** :951~959.
[5] 董志扬 张树政,方宣钧,等.海藻糖的生物合成及抗逆机理.见:华 珞 梁 劬主编.核农学研究进展.北京:中国农业科技出版社,1996. 115~120.
[6] 张红缨,刘 洋,张 今.微生物学通报,1998 **25** (4) 235~238.
[7] Oscar J ,Goddijn M , Theo C V *et al.* *Plant Physiol* ,1997 **113** :181~190.
[8] 王关林,方宏钧.外源基因的表达、检测及遗传特性.见:王关林,方宏钧主编.植物基因工程原理与技术.北京:科学出版社,1998. 134~143.

CLONING OF TREHALOSE -6-PHOSPHATE SYNTHASE GENE FROM
S. CEREVISIAE AND ITS PLANT EXPRESSION
VECTOR CONSTRUCTION*

Chen Hongman Zhu Lingxiang Dong Zhiyang

(Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ,China)

Abstract : Total RNA ,mRNA were isolated from baker 's yeast *S. cerevisiae* , the cDNA was prepared with AMV Reverse Transcriptase from the total mRNA. The gene of trehalose -6-phosphate synthase was cloned form the cDNA with PCR amplification. The gene was sequenced and the results showed that the tps1 gene contains 1507 nucleotides and 99.6 % identity with *S. cerevisiae*. The *tps1* gene was constructed on the plant expression vector pBin438.

Key words : Trehalose -6-phosphate synthase , Gene cloning , Expression vector

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39570493) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>