

泡盛曲霉抗 FOA 突变株的筛选与转化*

苟兴华 张义正¹

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

摘 要:根据泡盛曲霉 SG1 菌株分生孢子的紫外线致死曲线,选择死亡率为 85%~90% 的诱变时间诱变分生孢子,然后将其涂布于含 FOA(5-flouoro orotic acid)和尿嘧啶核苷的基本培养基上,选择抗 FOA 的突变株。经过纯化和回复突变检测后,获得了 5 株需要尿嘧啶或尿嘧啶核苷才能在基本培养基上生长的稳定突变株。进一步分析鉴定结果表明,这些突变株的 *URA3* 基因发生了突变。Northern 杂交及 RT-PCR 方法证明这些突变株中 *URA3* 基因突变均发生在转录水平上。选择突变株 SA5 作为受体菌,用含来自黑曲霉的野生型 *URA3* 基因的质粒转化该受体菌,结果获得了稳定的转化子。Southern 杂交证明野生型 *URA3* 基因取代了突变株的 *ura3* 基因。

关键词:泡盛曲霉,乳清酸核苷-5-磷酸脱羧酶基因(*URA3* 基因),基因突变

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0161-65

大肠杆菌作为宿主菌常被人们用于表达外源基因,这是因为它具有遗传背景清楚、分子克隆载体种类繁多、基因操作简单等优点。但由于大肠杆菌表达外源基因的产物不易分泌到胞外,这就使表达产物的分离纯化增加了难度。此外,大肠杆菌表达的有些外源基因产物缺乏生物学活性,因而人们把注意力集中到了真核生物。在过去的十年中,曲霉属中的米曲霉、黑曲霉以及其变种泡盛曲霉作为宿主菌已成功地表达了多种外源蛋白质,有的外源蛋白质的表达达到了较高水平^[1~4]。到目前为止,虽然许多研究结果表明黑曲霉及其变种泡盛曲霉是具有潜在商业价值的宿主菌,但如何从这些菌株中选出有发展潜力的菌株并建立起高频转化系统,这已成为该研究领域的热点。

当我们把几株来自泡盛曲霉的糖化酶高产菌株与实验室菌株进行相关分子生物学比较时,发现其中一株糖化酶高产菌 SG1 具备如下特点:一是该菌株生长速度快,糖化酶基因转录和翻译作用均具有高效性,且分泌功能强;二是该菌株不产生胞外水解蛋白酶,这就使外源蛋白质分泌到胞外时能稳定地保留于培养基中而不被降解,从而间接提高表达水平;三是该菌株的培养基可用廉价的淀粉物质,因而具有经济性。此外,该菌株还具有食用级安全性。根据以上特点,我们选择该 SG1 菌株作为出发菌,经过紫外线诱变获得了稳定的抗 FOA 突变株。以含野生型 *URA3* 基因的质粒对突变体作转化,选择 *Ura*⁺ 转化子获得成功。

* 国家自然科学基金资助项目(39430020)

1 通讯作者

作者简介:苟兴华(1962-),男,原四川大学生命科学院博士研究生,现在成都地奥公司工作,主要从事分子生物学研究

收稿日期:1998-09-23, **修回日期:**1999-04-05

1 材料和方法

1.1 酶和试剂

Novozyme234, 5-氟乳清酸(FOA)由 Dr. David Archer 赠送, 其它限制性内切酶以及随机引物均购自美国 BRL 公司和德国格尔蒙海姆中国有限公司。(α-³²P)-dCTP 购自北京福瑞生物工程公司。

1.2 菌种和质粒

黑曲霉变种泡盛曲霉 SG 来自于经过多次诱变筛选获得的糖化酶高产菌株。质粒载体 pIGPYRG 提供黑曲霉野生型 *URA3* 基因^[5]。

1.3 培养基

用于黑曲霉培养和转化的培养基有基本培养基和 YG 培养基^[6]。

1.4 DNA 常规操作

包括质粒的提取、大肠杆菌的转化、DNA 的凝胶电泳、Southern 杂交、Northern 杂交和黑曲霉变种泡盛曲霉的总 RNA 提取均参照分子克隆手册的标准方法进行^[7]。

1.5 尿嘧啶缺陷型突变体菌株的筛选^[8,9]

根据出发菌株分生孢子的紫外线致死曲线, 选择其死亡率为 85%~90% 的诱变时间诱变分生孢子, 然后把诱变的分生孢子涂布在含 FOA(1mg/L) 和尿嘧啶核苷(10mmol/L) 的基本培养基上, 在 30℃ 条件下培养 7~10d, 挑选出能够抗 FOA 的单菌落后, 进一步纯化抗 FOA 的单菌落。最后检测突变株的回复突变率。

1.6 原生质体的制备和转化

萌发分生孢子制备原生质体及 PEG 介导的原生质体转化法参照文献^[6]。

2 结果

2.1 抗 FOA 突变株的筛选及回复突变率测定

首先制作泡盛曲霉 SG1 分生孢子的死亡曲线, 然后按死亡率为 85%~90% 的诱变时间诱变分生孢子, 再将诱变的分生孢子涂布于含 FOA 和尿嘧啶核苷的基本培养基上避光培养。7~10d 后平板上只出现一些生长速度慢的小菌落, 把这些小菌落分别同时接种到基本培养基和含尿嘧啶的基本培养基上培养。结果有 13 个菌落在基本培养基上不生长, 而在含尿嘧啶的基本培养基上能生长, 再把这 13 个菌落的分生孢子分别接种于基本培养基和含尿嘧啶的基本培养基上培养, 用这种方法重复 3 次筛选, 最后获得了 13 个稳定的抗 FOA 突变株。为了进一步确定突变株的稳定性, 分别把这些突变株的孢子悬浮液经过无菌蒸馏水洗涤 5 次后, 再涂布于基本培养基上培养(每个平板有 10^9 ~ 10^{10} 个孢子), 观察其回复突变率。经过连续 5 次反复试验, 结果有 5 株菌的回复突变率小于 10^{-9} , 依次命名为 SA1、SA2、SA3、SA4 和 SA5。

2.2 抗 FOA 突变株的鉴定及 Northern 杂交分析

由于不同真菌的抗 FOA 突变株发生突变的基因可能是 *URA3* 基因, 也可能是 *URA5* 基因^[10], 为了确定所获得的抗 FOA 突变体是 *URA3* 或是 *URA5* 基因突变体, 把

这 5 株抗 FOA 突变株分别接种于含尿嘧啶和乳清酸的基本培养基中,30℃ 培养 5~6d。结果表明突变株只在含尿嘧啶的基本培养基中生长,这说明 5 株突变株均是 URA3 基因发生突变^[10]。

为了进一步研究这些突变株中 URA3 基因突变可能造成该基因不能进行正常转录或翻译,提取这些突变株的总 RNA,用 URA3 基因作探针进行 Northern 杂交。结果表明,这 5 株突变株的总 RNA 均不能与 URA3 基因发生杂交(图 1 第 1~5 道),只有出发菌株的总 RNA 能与 URA3 基因发生杂交(图 1 第 6 道)。为了证实上述结果的可靠性,我们以 URA3 基因编码区片段(外显子)核苷酸顺序作为设计引物的根据(引物顺序为:上游引物 5'-GTA CGC CTC CCA ACC TTC CT-3';下游引物 5'-ACT GCA GCA TCC TGC CTG GC-3'),然后做 RT-PCR 反应,结果也只有出发菌株及相关转化子的总 RNA 能扩增出大小为 456bp 大小的 DNA 片段。这说明 5 株突变株的 URA3 基因突变可能均发生在影响转录的相关位点。

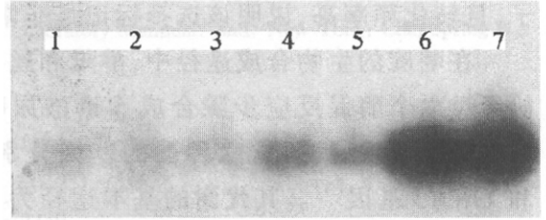


图 1 抗 FOA 突变株的 Northern 杂交
Fig.1 Northern blotting of anti-FOA mutant strains 1~5. Total RNA (20µg) from anti-FOA mutant strains SA1~SA5 respectively, 6~7. Total RNA (20µg)from SG1 and transformant(Ura⁺) of SA5.

2.3 URA3 基因突变株的转化及杂交分析

为了进一步证明上述突变株是 URA3 基因而不是 URA5 基因突变,我们用来自含黑曲霉的野生型 URA3 基因的质粒 pIGPYRG 转化突变株 SA5。结果是含野生型 URA5 基因质粒不仅能转化泡盛曲霉 SA5 突变株为原养型,而且其转化频率为 50 个转化子/µg DNA。

用黑曲霉 URA3 基因的 XbaI 片段(3.8kb)作探针分别与出发菌株 SG1、突变株 SA5 以及 SA5 Ura⁺ 转化子的染色体 DNA(XbaI 酶切)作 Southern 杂交,结果显示(图 2),该探针能与出发菌株 SG1 突变株 SA5 发生杂交,且只出现 3.4kb 大小的杂交带,说明该 3.4kb XbaI 片段含有完整的 URA3 基因。该探针也能与 SA5 转化子 Ura⁺ 的总 DNA(XbaI 酶切)发生杂交,出现了 3.8kb 大小的杂交带。这说明黑曲霉野生型 URA3 基因可能取代了发生突变的 ura3 基因。

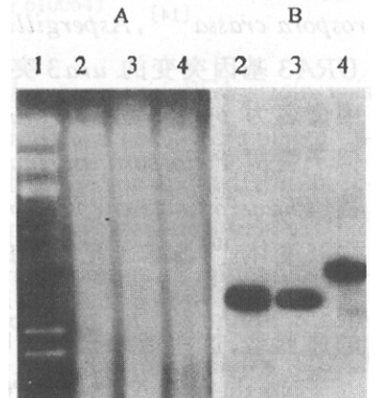


图 2 Ura⁺ 转化子的 Southern 杂交分析

Fig.2 Southern blotting of the transformant(Ura⁺) of SA5
A. Agarose gel electrophoresis, B. Southern blotting.
1. DNA Standard(λDNA/Hind III), 2~4. Genomic DNA(10µg XbaI Cut) from SG1, SA5, Ura⁺ transformant of SA5, respectively.

用 URA3 基因作探针与突变株 SA5 的 Ura⁺ 转化子的总 RNA 杂交也获得了一条与出发菌 SG1 相同大小的 RNA 杂交带(图 1 第 7 道)。

3 讨论

采用营养缺陷型作为转化的选择标记比采用抗生素作为选择标记的表达系统在生产上更具优越性,因为大规模生产外源蛋白质若用抗生素作为选择标记则增加成本和带来

安全性问题,若用营养缺陷型作为选择标记,可克服上述缺点。选择 *URA3* 基因作为选择标记基因可以使外源基因整合在 *URA3* 基因位点处^[5,11],以便于研究整合位点对外源基因表达的影响;用野生型 *URA3* 基因转化相应基因突变体获得了稳定的原养型转化子,且转化频率高,说明该选择标记是非常成功的。

在嘧啶的生物合成途径中,酵母和丝状真菌以及高等动物细胞通常是从谷氨酰胺开始经过六个酶促反应步骤合成 5-磷酸尿嘧啶核苷(UMP)后,再转化生成 UTP 和 CTP。在酵母细胞中,编码这六种酶的基因分别为 *URA2-C*、*URA3-B*、*URA4*、*URA1*、*URA5* 和 *URA3* 基因^[3]。其代谢的基本途径为:谷氨酰胺-*URA2-C* 基因编码的氨甲酰磷酸合成酶催化形成氨甲酰磷酸-*URA2-B* 基因编码的天冬氨酸转氨甲酰酶催化形成脲基琥珀酸-*URA4* 基因编码二氢乳清酸酶催化形成二氢乳清酸-*URA1* 基因编码二氢乳清酸脱氢酶催化形成乳清酸-*URA5* 基因编码乳清酸核苷-5-磷酸焦磷酸化酶催化形成乳清酸核苷-5-磷酸-*URA3* 基因编码乳清酸核苷-5-磷酸脱羧酶催化形成尿嘧啶核苷-5-磷酸,(UMP)—UTP—CTP^[8]。培养基中含一定浓度的嘧啶类似物 5-氟乳清酸(5-flouro oritic acid)能转化成为 5-氟尿嘧啶掺入到宿主的 RNA 中,最终抑制野生酵母及其它多种微生物的生长^[9]。把紫外线诱变处理后的微生物培养在含 FOA 和尿嘧啶或尿嘧啶核苷的培养基上能以 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 频率筛选到抗 FOA 的突变株^[6,8]。研究表明酵母中抗 FOA 突变株是 *URA3* 或 *URA5* 基因发生突变引起的,而 *URA1*、*URA2*、*URA4* 基因发生突变不对 FOA 产生抗性(*URA5* 基因突变只有部分抗性)^[9]。在丝状真菌中的子囊菌 *Neurospora crassa*^[14], *Aspergillus nidulans*^[6], *A. niger*^[12,13] 中筛选到的抗 FOA 突变株均是 *URA3* 基因突变的 *ura3* 突变体,并分别克隆了 *URA3* 基因,其中 *N. crassa* 的 *URA3* 基因命名为 *pyr-4* 基因, *A. nidulans* 和 *A. niger* 的 *URA3* 基因命名为 *PyrG* 基因^[5,12,13]。但子囊菌 *Podospora aserina* 抗 FOA 突变株完全是 *URA5* 基因突变体^[15],而担子菌白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*)抗 FOA 突变体既有 *URA3* 基因突变体又有 *URA5* 基因突变体^[10]。本研究获得的 5 个突变体仅在含尿嘧啶的基本培养基上生长,而不在含乳清酸的基本培养基上生长;用来自黑曲霉野生型 *URA3* 基因能将突变株 SA5 转化成稳定的原养型,这些结果充分证明这 5 株突变株是 *URA3* 基因发生了突变。

Northern 杂交及 RT-PCR 分析表明 *URA3* 基因突变导致该基因转录功能丢失,这可能是由于 *URA3* 基因转录所必需的某些位点发生突变造成的。在真核生物细胞中结构基因转录成 mRNA 通常是由 RNA 聚合酶 II 完成的^[16]。RNA 聚合酶 II 识别的各种结构基因启动子中含有顺式作用成份(一小段 DNA 顺序),而这些顺式作用成份又可能与细胞内各种反式作用因子(如各种转录因子等)相结合形成被 RNA 聚合酶 II 启动转录所必需的转录起始复合物^[16]。因此可能是 *URA3* 基因启动子中的顺式作用序列发生了突变,从而造成各种转录因子不能识别发生突变的顺式作用序列,导致不能形成转录起始复合物,最终使 *URA3* 基因不能转录,但这种推测需要进一步的实验证实。

参 考 文 献

- [1] Jeeves D J, Mackenzie D A, Roberts I N, et al. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1991, 9: 327~367.
- [2] Jeeves D J, Mackenzie D A, Archer D B. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 107: 267~272.

- [3] Dunn-Coleman N S, Bloebaum P, Berka R M, *et al.* *Bio/Technology*, 1991, 9: 976~982.
- [4] Pauline P W, Christopher S P, Grainne A C, *et al.* *Bio/Technology*, 1995, 13: 498~503.
- [5] Robet F M, van Gorcom, van den Hondel A M J J, *Nucl Acids Res*, 198, 16: 9052.
- [6] Oakley B R, Rinehart J E, Mitchell B L, *et al.* *Gene*, 1987, 61: 385~399.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 16~56.
- [8] Jund R, Lacroute F. *J Bacteriol*, 1972, 109: 196~202.
- [9] Boeke J D, La Croute F, Fink G R. *Mol Gen Genet*, 1984, 197: 345~346.
- [10] Lakami A, Margaret A, Dith K, *et al.* *Curr Genet*, 1993, 23: 251~356.
- [11] Hamer E, Jimberlake W E. *Mol Cell Biol*, 1987, 7: 2352~2359.
- [12] van Hartingsveldt W, Ineke E M, Cora M J, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1987, 206: 71~75
- [13] Wilson L J, Carmona C L, Ward M. *Nucl Acids Res*, 1988, 16: 2339.
- [14] Newbury S F, Glazebrook J A, Radford A. *Gene*, 1986, 43: 51~58.
- [15] Razanamparany V, Begueret J. *Curr Genet*, 1986, 10: 811~817.
- [16] Lewin B. *Genes VI*. New York: Oxford University Press, 1997. 811~846.

CHARACTERIZATION AND TRANSFORMATION OF ANTI-FOA STRAIN OF *ASPERGILLUS AWAMORI**

Gou Xinghua Zhang Yizheng

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: A suspension of freshly harvested spores of *Aspergillus awamori* SG1 strain was exposed to UV light. The irradiated spores with survival rate of 10%~15% were plated directly on minimal medium (MM) agar plates containing 10mmol/L uridine and 5-fluoro-orotic acid (FOA 1mg/mL). Five stable anti-FOA colonies with the reversed rate below 10^{-9} were obtained. All anti-FOA strains, can grow on uridine or uricil-containing minimal medium agar plate but not on orotic acid-containing MM plate, indicating that the mutation happened in the *URA3* gene. Northern blotting analysis showed that the mutation of *URA3* gene could not be transcribed and it was confirmed by RT-PCR. With modified PEG-mediated protoplast transformation method the wild *URA3* gene could complement the *ura3* mutant strain SA5 to wild type. Southern blotting of the transformant indicated the wild *RUA3* gene replaced the mutated *ura3* gene.

Key words: *Aspergillus awamori*, *URA3* gene, Gene mutation

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39430020)