

# 絮凝基因(*FLO1G*)的序列测定及分析\*

何秀萍 郭文洁 张博润\*\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

张沛 梁刚 王成红 潘学启

(青岛啤酒集团公司科研中心 青岛 266101)

关键词:啤酒酵母, *FLO1G*, DNA 序列及分析

中图分类号:Q755 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)02-0242-04

虽然酵母细胞絮凝的确切机制至今尚无定论,但已克隆了多个与絮凝相关的基因,如 *FLO1*、*FLO5*、*FLO11* 等<sup>[1-3]</sup>。这些基因的表达可以赋予非絮凝酵母细胞以絮凝能力。酵母细胞的絮凝特性在酿造工业、固定化酶、精细化工和物生制药等领域具有广泛的应用价值<sup>[4,5]</sup>。从一株强絮凝酿酒酵母菌株中克隆到一个约 4.3kb 的 DNA 片段,酵母转化实验证明该 DNA 片段能够赋予非絮凝酵母菌株以絮凝能力<sup>[6]</sup>。本文简要报道对该 DNA 片段进行序列测定和分析的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	遗传型及性状	来源
<i>S. cerevisiae</i> FL189	<i>a/α, FLO</i>	本组保存
<i>S. cerevisiae</i> YS58	<i>MATαflol ura3-52 leu2-3 ,112 his4-519 trp1-789</i>	Rebecca C 教授赠送
<i>E. coli</i> DH5a	<i>pE44 ΔlacU169 hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	本组保存
YCp50	<i>amp<sup>R</sup> tet<sup>R</sup> URA</i>	本组保存
pCF-1	<i>YCp50:: FLO</i>	本研究构建
YE <sub>p</sub> 352	<i>amp<sup>R</sup> URA</i>	本组保存
pEF-1	<i>YE<sub>p</sub>352:: FLO</i>	本研究构建

### 1.2 培养基与培养条件

酵母菌及酵母转化子用 YEPD 培养基、麦芽汁培养基或 YNB 培养基<sup>[7]</sup>, 28℃ 静置或振荡培养;大肠杆菌及转化子用 LB 培养基<sup>[7]</sup>, 37℃ 静置或振荡培养。

\* 国家自然科学基金资助项目(39970010)

\*\* 联系人

作者简介:何秀萍(1966 - )女,河北省蔚县人,中国科学院微生物研究所助理研究员,博士生。主要从事酵母菌分子遗传与育种研究。

收稿日期:2001-06-13, 修回日期:2001-09-19

### 1.3 酶、抗生素及试剂

实验所用内切酶、抗生素为华美生物工程公司产品。所用化学试剂为分析纯。絮凝缓冲液为 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH4.0, 含 10mmol/L  $\text{CaCl}_2$ )。

### 1.4 酵母菌絮凝能力的测定

参照文献[8]。

### 1.5 酵母质粒 DNA 的提取

参照文献[9]。

### 1.6 酵母转化方法

参照文献[7]。

### 1.7 DNA 序列分析

由大连宝生物工程公司进行。通过国际互联网利用 blast 软件进行同源性比较<sup>[10]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 测序质粒的构建

起初试图将克隆片段与通用的测序载体 pUC18 相连接构建重组质粒,对克隆片段进行测序,但多次实验均未获得所期望的重组质粒。根据有关文献报道,其他研究人员也发现:带有 *FLO1* 的 DNA 片段与 pUC 系列的载体所构建的重组质粒在 *E. coli DH5a* 中很难稳定存在,但原因不明<sup>[1,11]</sup>。为解决这一问题,我们将克隆片段与经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切的 *E. coli-Yeast* 穿梭载体 YE<sub>p</sub>352 相连接构建重组质粒,不经过在大肠杆菌富集的步骤,直接转化带有 *ura leu tp his* 营养缺陷型标记的酿酒酵母菌 *S. cerevisiae* YS58。以 YE<sub>p</sub>352 上的 *URA3* 基因作为筛选标记,在添加有相应氨基酸的 YNB 培养基上筛选重组转化子,再将所得重组转化子接种于麦芽汁液体培养基中,用目测法从近 2000 个转化子中筛选出 5 株具有强絮凝特性的阳性转化子,如图 1 所示。用 YE<sub>p</sub>352 空载体转化 YS58 作为对照,将所得转化子也接种于麦芽汁培养基中进行测定发现所得转化子皆不絮凝。

提取以上阳性转化子中的重组质粒电泳检测,结果表明:所得重组质粒均带有约 4.3kb 的插入片段,将重组质粒命名为 pEF-1。由于 YE<sub>p</sub>352 也属于 pUC 系列的载体,具有与 pUC18 完全相同的多克隆位点,可方便地利用通用测序引物起始序列测定,故以 pEF-1 为测序质粒,由宝生物工程有限公司进行序列测定。

### 2.2 序列测定及结果分析

用 Ampli Tag<sup>R</sup> DNA Polymerase 和 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377XL DNA 充列分析仪系统,由克隆片段两侧向中间进行序列测定。当两侧分别进行 4 次测序反应,共测定了 4179 个碱基后,由于已测出的序列两端为大段连续的重复序列,无法通过常规的方式找到单位点结合的引物继续进行序列测定。根据 PCR 扩增结果推测:克隆片段中间尚有约 200bp 的序列未测出。通过国际互连网在 GenBank 数据库中对已测出的两段序列(片段 F(包括 1914 个碱基)及片段 R(包括 2265 个碱基))进行同源性比较,结果如图 2 所示。

同源性比较发现:已测序的片段 F 中第 1 位到 1012 位的碱基与已报道的 *FLO1* 序列(全长 5340bp)中第-156 位到 856 位的 1012 个碱基具有 99% 的同源性;第 1012 位到 1914 位与已报道的 *FLO1* 序列中第 1532 位到 2434 位的 902 个碱基具有 100% 的同源性。已测序的片段 R 中第 2132 位到 4396 位的 2265 个

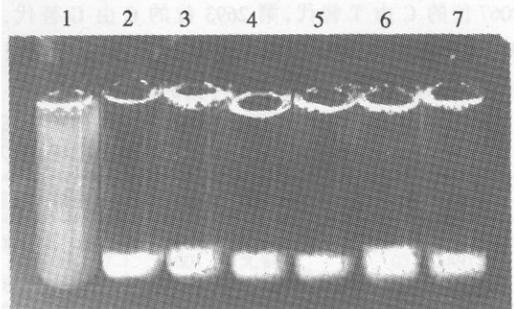


图 1 转化子絮凝能力的比较

1. YE<sub>p</sub>352 转化 YS58 所得的转化子;
2. 供体菌 FL189;
- 3 ~ 7. pEF-1 转化 YS58 所得的转化子。

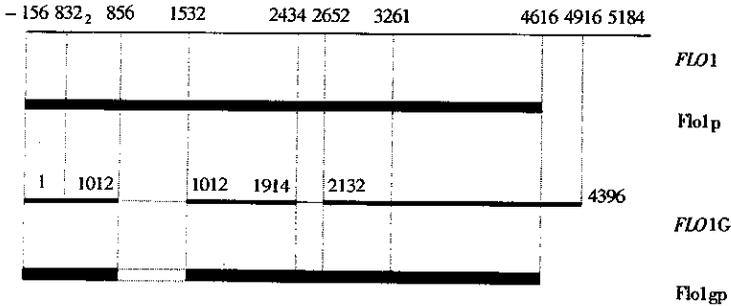


图 2 克隆片段与 *FLO1* 基因的比较

*FLO1G* 中:——部分从左至右依次为片段 F 中的两部分和片段 R;……部分为缺失部分;——部分为未测出的碱基。

碱基与已报道的 *FLO1* 序列中第 2652 位到 4916 位的 2265 个碱基具有 100% 的同源性。分段比较结果显示:在已报道的 *FLO1* 基因序列中:从第 832 到 3261 位碱基的序列为以 135 个碱基为一个重复单元的 18 次连续的高度重复序列。有关文献报道,在 *FLO1* 基因的克隆过程中经常出现中间重复序列丢失的现象<sup>[1,11]</sup>。

综合以上信息可以推知:我们所克隆的片段与 *FLO1* 基因相比缺失了 675 个碱基,该片段位于 *FLO1* 基因 ORF 中的 857 位到 1531 位,其中恰好包括 *FLO1* 基因片段中 18 个重复单元中的 5 个,但这一缺失并未造成阅读框的改变。剔除这段序列后我们所克隆到的 DNA 片段与 *FLO1* 基因的同源性为 99%。

由以上分析可以推知:克隆片段中有 217 个碱基未测出,相当于 *FLO1* 基因序列中的第 2435 位到 2651 位碱基的一段序列。

所克隆的片段与 *FLO1* 相比共有五个碱基的差异,其碱基在片段中所在位置及相关密码子所编码的氨基酸之间的比较如表 2 所示。*FLO1* 基因中第 2025 位的 T 由 C 替代,第 2058 位的 C 由 T 替代,第 2067 位的 C 由 T 替代,第 2693 位的 C 由 G 替代,但这四个碱基的变化均未引起相应氨基酸的变化。*FLO1* 基因中第 2936 位的 T 由 G 替代,这一变化使其所在密码子编码的氨基酸由缬氨酸变为甘氨酸,这一改变并未造成絮凝表型上可见的差异。

表 2 克隆片段与 *FLO1* 基因序列之间差异比较

基因	碱基位置	/氨基酸													
<i>FLO1</i>	2055	T	Phe	2058	C	Thr	2067	C	Ser	2693	C	Gly	2936	T	Val
<i>FLO1G</i>	861	C	Phe	864	T	Thr	873	T	Ser	1502	G	Gly	1742	G	Gly

综上所述,我们自强絮凝型酿酒酵母 FL189 中克隆到一段与 *FLO1* 基因序列同源性为 99% 的 DNA 片段,全长 4396bp,其中最大的一个 ORF 为 3936bp,编码 1312 个氨基酸的蛋白产物,我们将该基因称为 *FLO1G*,其起始密码子、终止密码子及上游调控序列,下游转录终止序列均与 *FLO1* 基因相同。

### 参 考 文 献

- [1] Watari J, Takata Y, Ogawa M, et al. *Yeast*, 1994, 10:211 ~ 225.
- [2] Bidard F, Blondin B, Dequin S, et al. *Curr Genet* 1994, 25:196 ~ 201.
- [3] Lo Wan-sheng, Dranginis A M. *J Bacteriol*, 1996, 178(24):7144 ~ 7151.
- [4] Frenken L G, De G P, Klis F M, et al. *Patent*: WO 9418330-A 14 18-08-1994.
- [5] Klis F M, Schreuder M P. *Patent*: WO 9401567-A 25 20-JAN-1994.

- [ 6 ] 何秀萍, 郭文洁, 张博润, 等. 微生物学报, 2002 ( 已接受 ).
- [ 7 ] 贾盘兴, 蔡金科, 马德钦, 等. 微生物遗传学实验技术, 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 8 ] 张博润, 陈蔚, 铁翠娟, 等. 微生物学报, 1999, 39( 5 ): 67 ~ 72.
- [ 9 ] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, *et al.* Methods in Yeast Genetics :A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997.
- [ 10 ] Alstchul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Nucleic Acids Res, 1997, 25( 17 ): 3389 ~ 3402.
- [ 11 ] Teunissen A W R H, Berg J A V D, Steensma Y, *et al.* Yeast, 1993, 9( ): 1 ~ 10.

## Sequencing and Analysis of Flocculation Gene (*FLO1G*)<sup>\*</sup>

He Xiuping Guo Wenjie Zhang Borun<sup>\*\*</sup>

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

Zhang Pei Lian Gang Wang Chenghong Pan Xueqi

( The Research Center of Tsingtao Brewery Group Co. Ltd, Tsingtao 266101, China )

**Abstract :** The sequence of the flocculation gene (*FLO1G*) was determined. The result of sequencing showed that the cloned gene contains a large open reading frame (ORF) of 3936 bp and encodes for a protein of 1312 amino acid. According to the result of homologous analysis, the cloned gene is homologous to *FLO1* but with 675 bp deletion in the ORF region. The missing part belongs to one of the four repeated sequence family of *FLO1*. Since the cloned DNA fragment can trigger strong flocculence to non-flocculent strain *S. cerevisiae* YS58, we concluded that the missing part is not the crucial part for the flocculent ability of the gene.

**Key words :** *Saccharomyces cerevisiae*, *FLO1G*, DNA sequencing and analysis

\* Project of Chinese National Natural Science Fund ( 39970010 ).

## 2002 中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人	电话
生化过程模型化及控制学术交流会	中国微生物学会生化过程模型化及控制专业委员会	5月15~17	100	无锡	潘丰 须文波	0510-5801285
生物高新技术开发及产业化会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	5月21~24	100	肇庆	黎高翔	010-62554677
第13届全国干扰素与细胞因子学术讨论会	中国微生物学干扰素专业委员会	8月	120	贵阳	焦炳华	021-65493936
医学微生物学与免疫学新进展	中国微生物学会真菌专业委员会与医学微生物学与免疫学专业委员会	9月	100	天津	李若瑜 关显智	010-66171122-2350 0431-5645911-6574
第七届中日国际酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	9月21~26	150	西安	黎高翔	010-62554677