

一种新型酿酒酵母附加型分泌表达载体的构建^{*}

赵颖怡^{1,2} 梁世中¹ 黄 鲲² 黄日波^{2**}

(¹ 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

(² 广西大学生物技术实验中心发酵与酶工程研究所 广西大学生物糖业学院 南宁 530005)

摘 要 :用化学法合成克鲁维酵母的菊粉酶基因的信号肽序列(INU), 将其嵌入酵母附加型表达质粒 pYES₂, 得到一套新型的分泌表达载体 pYES₂ I, pYES₂ II, pYES₂ III。然后用 PCR 方法分别扩增大肠杆菌的天冬酰胺酶基因(ASN)和短芽孢杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶(ALDC)基因, 连接到 INU 下游, 得到重组质粒 pASN 和 pALDC。分别将这两个重组质粒转化酿酒酵母菌株 INVSc1 中表达, 胞内和胞外的酶活分析表明 ASN 和 ALDC 基因都能在酿酒酵母中分泌表达, 表明菊粉酶信号肽序列能很好地将酿酒酵母中的重组蛋白分泌到胞外。稳定性分析表明, 重组酵母菌株在没有选择压力的条件下连续接种培养 100h, 未发现重组质粒的不稳定性。

关键词 :酿酒酵母, 信号肽, 分泌表达载体

中图分类号 :Q782 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2002) 04-0431-05

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种最简单的单细胞真核生物。它和人类关系密切, 没有内毒素, 无致病性, 长久以来被用于面包和制酒工业, 被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)确认为一种安全(GRAS)生物, 用它表达的药物不需要进行大量的宿主安全性实验。1981 年 Hitzeman 首次利用酿酒酵母表达人干扰素基因获得成功^[1], 此后又有多种外源基因在酿酒酵母中表达成功。随着对其遗传学和生理特点的深入了解, 特别是其基因组测序完成之后, 许多研究者对酿酒酵母表达系统的研究产生了兴趣。本文把来源于克鲁维酵母(*Kluyveromyces maxianus*)的菊粉酶基因的信号肽序列用于构建酿酒酵母附加型分泌表达载体, 得到一种高效的分泌表达系统, 目的是研究其在酿酒酵母中的分泌效果, 为理论研究和实际应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 :大肠杆菌菌株 DH5 α , 短芽孢杆菌, pGEM-3zf + 克隆载体由本实验室保存。

酿酒酵母菌株 INVSc1, pYES2 表达质粒购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基 :YPD 培养基和尿嘧啶缺陷型培养基均同文献^[2]。

1.1.3 试剂 :限制性内切酶、T4DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶购自大连宝生物公司, 其它试

^{*} 国家“863”资助项目(101-06-07-01)

^{**} 项目主持人, 通讯作者, email: riboh@public.nn.gx.cn

作者简介: 赵颖怡(1971 -), 女(壮族), 河北曲阳人, 广西大学讲师, 华南理工大学食品与生物工程学院博士生, 主要从事基因工程的研究。

收稿日期: 2001-11-16, 修回日期: 2002-02-21

剂购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的操作、重组、转化参考文献 [2, 3]

1.2.2 菊粉酶信号肽序列的设计与合成: 参考文献 [4] 设计并合成菊粉酶信号肽序列 (INU) 在 INU 序列两端设计 *Hind* III 和 *Bam* H I 两个酶切位点, 然后将其连接到克隆载体 pGEM-3zf+ 上进行测序分析。

INUA 5'-AGCTT ATG AAG TTA GCA TAC TCC CTC TTG CTT CCA TTG GCA GGA
3'-A TAC TTC AAT CGT ATG AGG GAG AAC GAA GGT AAC CGT CCT
CTC AGT GCT TCA GTT ATC AAT TAC AAG AGA G-3'
CAG TCA CGA AGT CAA TAG TTA ATG TTC TCT CCTAG-5'

1.2.3 酿酒酵母的转化: 按 Invitrogen 公司提供的说明书, 用乙酸锂法转化酿酒酵母。

1.2.4 ASN 和 ALDC 基因的引物设计及基因的 PCR 扩增: 从基因库获得序列后用计算机设计适合的引物, 并引入了 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点, 以使基因能正确插入表达载体。

ASN 基因扩增引物的设计如下:

上游引物 (SensePrimer): 5'-CTCG ↓ GATCCCTTACCCAATATCACCATT-3' 下游引物 (Anti-sense Primer): 5'-CTGG ↓ AATTCGTA CTGATFGAAGATCTG-3'

ALDC 基因扩增引物的设计参考文献 [5] 如下:

上游引物 (Sense Primer): 5'-CTCG ↓ GATCCAAAAAATATCATCACTTC-3'

下游引物 (Antisense Primer): 5'-CFGG ↓ AATCTCGCATGAGGCTGATTTATTT-3'

1.2.5 转化及转化子的验证: 酿酒酵母 INVsc I 菌株为尿嘧啶缺陷型, 能在尿嘧啶缺陷型平板上生长的酵母菌即为含有重组质粒的酵母。参考文献 [6] 提取酵母中质粒重新转化到大肠杆菌, 然后小量提质粒, 用于酶切验证。

1.2.6 酿酒酵母中质粒的稳定性分析: 将含有重组质粒的酿酒酵母转化子接种于 50mLYPD 液体培养基中, 30℃ 过夜培养, 然后取 100μL 接种到 50mL 新鲜的 YPD 液体培养基中, 30℃ 培养过夜, 如此转接培养 50 和 100h 后 (分别为 2 次和 4 次转接), 分别取样稀释涂布于 YPD 平板, 待长出单菌落后, 将 100 个单菌落转接到尿嘧啶缺陷型平板上, 计算不能生长的菌落。

1.2.7 重组蛋白的表达: 重组蛋白表达的诱导参照 Invitrogen 使用说明书进行, 略有修改。

1.2.8 酶活力的测定: 天冬酰氨酶活力的测定按文献 [7] 方法进行。在 37℃, pH8.6 条件下 1 分钟释放 1μmol NH₃ 的酶量为一个酶活单位。α-乙酰乳酸脱羧酶活力的测定, 按文献 [8] 方法进行。一个酶单位定义为 30℃, pH6.0 条件下, 1 分钟产生 1μmol 乙偶姻的酶量。

1.2.9 酵母细胞内蛋白提取和酶活测定: 参考文献 [2], 取 1mL 培养液离心后, 上清液用于测定胞外酶活; 菌体加 1ml 破胞缓冲液, 用消解酶 (Zymolyase) 破胞后用于测定胞内酶活。

2 结果分析

2.1 分泌表达载体构建

pASN、pALDC 重组质粒的构建及主要结构如图 1 所示。

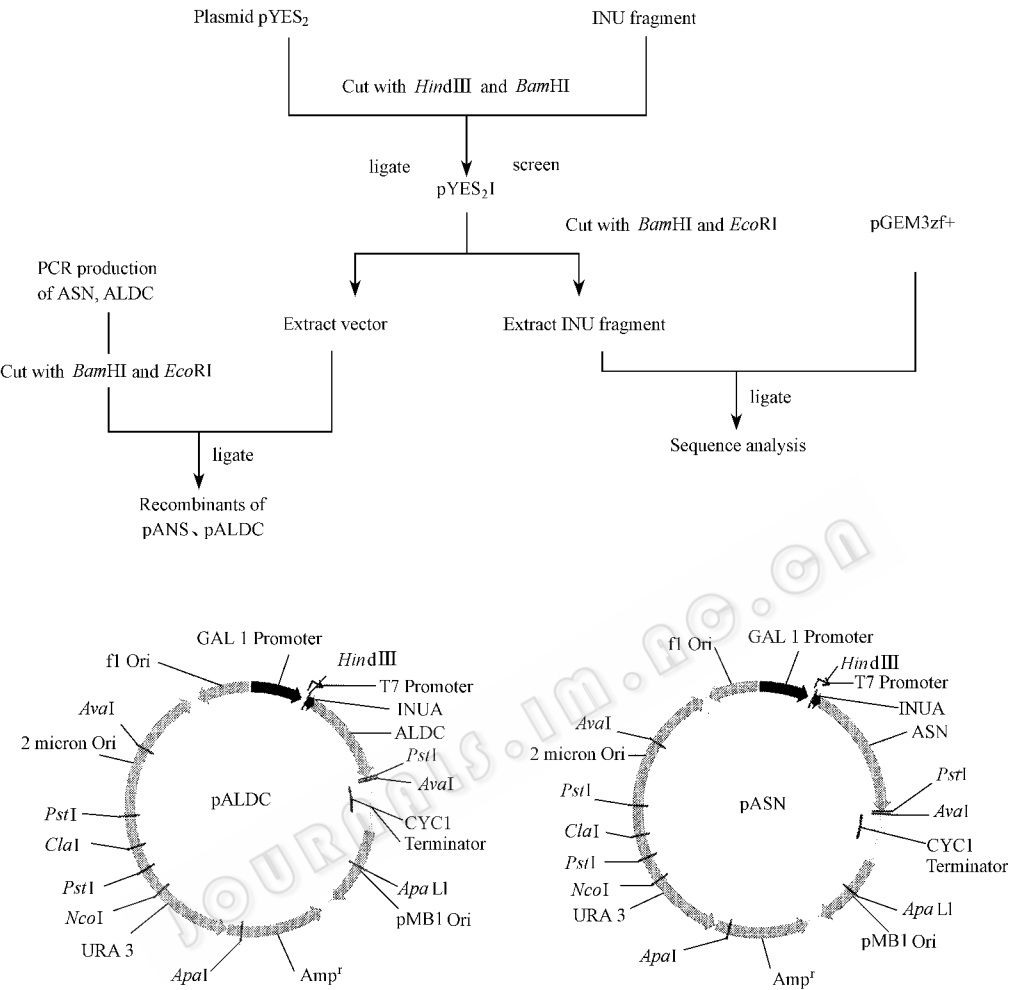


图 1 pASN、pALDC 分泌表达载体的构建

Fig.1 Construction of pASN and pALDC for secreting expression vector

用 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切 INU 及穿梭质粒 pYES₂ ,用 T4DNA 连接酶连接后得到质粒 pYES₂I ,转化大肠杆菌 DH5 α ,少量提取质粒 DNA 并进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切 ,电泳检测酶切产物 ,切下约 100bp 的片段 ,表明 INU 连上了表达质粒 pYES₂。同时回收 INU 片段 ,连接到克隆载体 PGEM-3zf + 上进行序列分析。结果与预期相符。用设计好的引物进行 PCR 扩增获得 ASN 和 ALDC 基因 ,电泳检测扩增结果 ,ASN 扩增的片段约 1.1kb ,ALDC 扩增的片段约 0.85kb ,与预期的大小相符。

ASN、ALDC 基因和载体 pYES₂ IDNA 均用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切 ,加入 T4DNA 连接酶连接后 ,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。少量提取质粒 DNA *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切筛选到重组子 pASN 和 pALDCDNA。结果证明提取质粒 DNA ,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 ,电泳检测 ,与预期的结果相符 ,表明 ASN 和 ALDC 基因均已连进了分泌表达质粒。

2.2 质粒转化酿酒酵母后的验证

提取酵母中质粒重新转化到大肠杆菌 ,小量提质粒 ,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切验证 ,电泳酶切产物结果与预期相符 ,表明质粒已转化到酿酒酵母。

2.3 酿酒酵母中质粒的稳定性分析

把含有重组质粒的酵母菌株在 YPD 培养基中连续接种培养 50、100h ,再转接到尿嘧啶缺陷型平板 ,计算不能生长的菌落 ,结果如表 1。

表 1 质粒稳定性分析

Table 1 The steady of the vectors

Strains/plasmids	Percentage of cells not growing in SC-uracil medium	
	50h	100h
INVsc1/pASN	2	2
INVsc1/pALDC	1	2

结果表明 ,质粒在酿酒酵母 INVsc1 中连续培养长达 4 天以上 ,仍有很好的稳定性。

2.4 胞外和胞内酶活力的测定

表 2 胞外与胞内的酶活

Table 2 Activities of exoenzyme and endoenzyme

Strains/plasmids	Extracellular(U/mL)	Intracellular(U/mL)
INVsc1/pASN	12	0
INVsc1/pALDC	48	1
INVsc1/pYES2I	0	0

按 Invitrogen 公司提供的方法将含有 pASN 和 pALDC 的酿酒酵母分别进行诱导表达并同时转化 pYES₂I 质粒到酿酒酵母中作对照 ,测定细胞内、细胞外的酶活 ,结果见表 2。

从表中可以看出两种酶活在胞外显著都高于胞内 ,而对照菌株中两种酶活都没有检测到 ,可见重组蛋白在 INU 信号肽引导下能较好地分泌细胞外。胞内的酶活很小 ,说明所构建的载体是一种高效的分泌表达载体。

3 讨论

重组蛋白的分泌表达 ,不仅能使重组蛋白得到正确修饰和防止外源蛋白在胞内被蛋白酶分解 ,而且有助于宿主菌的生长和质粒的稳定性 ,能够提高表达产量^[9] ,同时也可简化表达产物的分离纯化 ,提高目标产物收率 ,因而重组蛋白分泌路线的应用倍受重视。将克鲁维酵母菊粉酶基因重组到酿酒酵母中表达 ,70% ~ 90% 的菊粉酶被分泌到胞外培养基 ,其先导肽序列在酿酒酵母中能将表达的外源蛋白绝大部分分泌到胞外(95% 以上) ,而目前运用得最广泛的 MF α 1 ,仅对分泌小分子量的多肽和蛋白质效果显著 ,如 β -内啡肽(3kD) ,降钙素(3.5kD) 和表皮生长因子(5.5kD) ,对于大分子的蛋白质分泌效果不太显著^[10] 。因此利用菊粉酶的信号肽序列来构建酿酒酵母高效的分泌载体具有很大的应用潜力。而且 INU 信号肽的 C 端是 Lys-Arg ,在目的蛋白分泌到胞外时 ,酵母的内切蛋白酶(endoprotease)能够识别 Lys-Arg 并切除信号肽。本文利用 ASN 和 ALDC 两个基因检验用菊粉酶信号肽构建的酿酒酵母分泌表达载体的分泌效果 ,细胞外的酶活都显著大于胞内 ,表明克鲁维酵母的菊粉酶基因信号肽序列能够很好地将重组蛋白引导分泌到细胞外 ,也表明所构建的酿酒酵母表达系统是一种高效分泌表达系统。

本表达系统所表达的酶活较低,这主要的原因可能是原核与真核宿主对密码子的偏好性有一定的差异,从而影响了目的蛋白的高效表达,不能完全真实地反映分泌表达载体的效果。应考虑对基因的密码子进行优化,或用真核生物的基因和同一供体的不同基因对分泌表达载体的分泌效果作进一步的分析研究。此外,在研究中尚未对表达条件进行优化,也是影响酶活的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Hitzeman R A ,Leung D W ,Perry L J ,et al . *Science* ,1983 **219** 620 ~ 625 .
- [2] F 奥斯伯 ,R 布伦特 ,R E 金斯顿 ,等 . 精编分子生物学实验指南 . 北京 :科学出版社 ,1998 .
- [3] J 萨姆布鲁克 ,E F 弗里奇 ,T 曼尼阿蒂斯著(金冬雁等译) . 分子克隆实验指南 . 第二版 . 北京 :科学出版社 ,1992 .
- [4] Bong Hyun Chung ,Soo Wan Nam . *Biotechnol Bioeng* . 1996 **49** (4) 47 ~ 479 .
- [5] 陈 炜 ,何秉旺 ,张建华 ,等 . 微生物学报 ,1997 **4** 270 ~ 275 .
- [6] 李永明 ,赵玉琪 . 实用分子生物学方法手册 . 北京 :科学出版社 ,1998 . 162 ~ 163 .
- [7] Von Worthington . *Worthing Enzyme Manual* . Freehold , New Jersey ,USA :Worthington Biochemical Corporation Press ,1993 . 48 ~ 49 .
- [8] 陈 炜 ,何秉旺 . 微生物学通报 ,1994 **21** (2) 82 ~ 85 .
- [9] Parker C ,Dibiasio D . *Biotechnol Bioeng* . 1986 **29** 215 ~ 221 .
- [10] 瞿礼嘉 ,顾红雅 ,胡 苹 ,等 . 现代生物技术导论 . 北京 :高等教育出版社 ,1998 .

Construction of A Set of Secreting Expression Vectors for *Saccharomyces cerevisiae*

Zhao Yingyi^{1 2} Liang Shizhong¹ Huang Kun² Huang Ribo²

(¹ Institute of Food and Biology Engineering ,South China Science and Technology University ,Guangzhou 510640 ,China)

(² Institute of Fermentation and Enzyme Engineering ,Institute of Biotechnology and Food Engineering ,
Guangxi University ,Nanning 530005 ,China)

Abstract : The DNA fragment encoding the Signal peptide of inulinase of *Kluyveromyces marxianu* was synthesized chemically . This fragment was cloned in-frame in the expression vector pYES₂ of *Saccharomyces cerevisiae* , resulting in a set of new secreting expression vectors pYES₂ I , pYES₂ II , pYES₂ III . The L-Asparaginase gene (*ASN*) of *E. coli* and α -acetylactate decarboxylase gene (*ALDC*) of *B. brevis* which were amplified by PCR and cloned into the new vectors respectively were transformed into *Saccharomyces cerevisia* , and most of enzyme activities were secreted into the medium . The new secreting expression vectors still have excellent segregational stability even after growth for 100h in the absence of selective pressure .

Key words : *Saccharomyces cerevisiae* , Signal peptide , Secreting expression vector

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (863-101-06-07-01)

** Corresponding author