

甾醇酰基转移酶基因高表达对酵母菌麦角甾醇合成的影响

何秀萍 郭雪娜 张博润* 谭华荣*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 通过 PCR 扩增克隆到含酵母菌甾醇酰基转移酶基因 *ARE2* 编码序列和上游调控序列的 DNA 片段 *ARE2-1* 及仅含编码序列的 DNA 片段 *ARE2-2*。分别以 *ARE2* 启动子、乙醇脱氢酶基因 *ADHI* 启动子和铜抗性基因 *CUP1* 启动子及 *ADHI* 终止子为调控元件构建了酵母菌表达质粒 *pHX2*、*pHXA2* 和 *pHXC2*。表达质粒分别转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58 和以前通过细胞杂交构建的麦角甾醇高产菌株 YEH56。通过营养缺陷互补和铜抗性筛选到转化子, 质粒上的 *ARE2* 基因在 YS58 和 YEH56 中都实现了活性表达, 使细胞内甾醇酯化水平升高, 并导致细胞麦角甾醇含量的提高。对转化菌株的培养条件进行了初步研究, 在优化条件下, 重组转化菌株 YEH56(*pHX2*)、YEH56(*pHXA2*) 和 YEH56(*pHXC2*) 的麦角甾醇含量分别是受体菌 YEH56 的 1.3、1.3 和 1.4 倍。

关键词 甾醇酰基转移酶, 基因表达, 麦角甾醇, 酵母工程菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)01-0067-05

麦角甾醇是真菌细胞膜中的重要甾醇组分, 与细胞膜的多种生物功能有关。作为维生素 D₂ 的前体和生产甾醇类药物的重要原料, 麦角甾醇具有很大的经济价值。酵母菌是生产麦角甾醇的重要菌种, 依据菌株和发酵条件的不同, 细胞麦角甾醇含量有很大的差异。麦角甾醇的生物合成是一个多酶催化的复杂过程, 属于甲羟戊酸途径的一个特定分支。已有的研究表明, 在酵母菌中麦角甾醇的生物合成至少涉及到 19 步反应^[1]。在酵母菌中, 麦角甾醇可以游离的形式存在于细胞膜中, 也可以甾醇酯的形式储存在脂肪滴中^[1]。研究发现在酵母菌中有两种酰基辅酶 A: 甾醇酰基转移酶可以催化甾醇酯的形成, 它们分别由 *ARE1* 和 *ARE2* 基因编码^[2]。这两种酶均位于细胞微体内, 它们具有不同的底物特异性, *Are1p* 在对数生长期的活性最高, 主要催化甾醇生物合成途径中中间产物的酯化, *Are2p* 则主要以麦角甾醇为底物, 在静止期活性达最高^[3]。甾醇的酯化可能是调节细胞甾醇含量的另一个环节^[1]。本研究构建了 *ARE2* 的重组表达质粒, 报道了 *ARE2* 基因高表达对细胞麦角甾醇生物合成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevi-*

siae) YS58(*MAT α leu2 his3 trp3 ura3*) 杂交菌株 YEH56、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、质粒 YEp352、pVCV727、pBluescript M13、pET23b, 以上均由本实验室保存。质粒 pDBLeu 由本所夏桂先研究员赠送。质粒 pCM1-1 由美国的 Winge 教授赠送。

1.1.2 培养基 酵母菌生长用基本培养基(SC) 完全培养基(YEPD) 培养大肠杆菌用 LB 培养基均按文献[4]配制。YPD4(10g 酵母粉, 10g 蛋白胨, 40g 葡萄糖, 用水定溶至 1L, 自然 pH, 使用前加入终浓度为 0.5mmol/L 的硫酸铜); YPD6(10g 酵母粉, 10g 蛋白胨, 60g 葡萄糖, 用水定溶至 1L, 自然 pH, 使用前加入终浓度为 0.5mmol/L 的硫酸铜); YPD8(10g 酵母粉, 10g 蛋白胨, 80g 葡萄糖, 用水定溶至 1L, 自然 pH, 使用前加入终浓度为 0.5mmol/L 的硫酸铜)。

1.1.3 酶、抗生素和化学试剂 实验所用的限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品。*Pfu* DNA polymerase 和 dNTP 购于北京鼎国生物技术的发展中心。麦角甾醇和油酰辅酶 A 均为 Sigma 公司产品。氨苄青霉素为华美生物工程公司产品。X-gal 和 IPTG 购于上海生工生物工程有限公司, 硫酸铜购于北京化学试剂公司。

1.2 酵母菌染色体 DNA 的制备和 PCR 扩增

按文献[4]方法提取酵母菌染色体 DNA。根据 GenBank 中酿酒酵母 *ARE2* 基因的核苷酸序列, 分别

* 通讯作者。Tel: 86-10-62637679; Fax: 86-10-62637679; E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn. Tel: 86-10-62654083; Fax: 86-10-62654083; E-mail: Tanhr@sun.im.ac.cn.

作者简介 何秀萍(1966-)女, 河北省蔚县人, 博士, 主要从事酵母菌分子遗传与育种研究。E-mail: zhzy9822@sina.com.cn.

收稿日期 2003-04-10, 修回日期 2003-08-18

设计了 3 个引物: P1: 5'-AAGGATCCAACCTTTATTTTC-CGCTCC-3'; P2: 5'-CAGGATCCATATGGACAAGAAG-AAGGATCT-3' 及 P3: 5'-CGAATTCCACAGAACAGTTG-CAGGAT-3'。引物 P1 和 P2 的 5'端加入 *Bam*H I 酶切位点, 引物 P3 的 5'端加入 *Eco*R I 酶切位点。以酿酒酵母 YEH56 的染色体 DNA 为模板, 用高保真的 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系中含 0.6 μ g 模板 DNA, 0.5 μ mol/L 引物对, 200 μ mol/L dNTP, 5 μ L 反应缓冲液 2 单位 *Pfu* DNA 聚合酶, 用去离子水补体积至 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C/4min; 94 $^{\circ}$ C/40s, 56 $^{\circ}$ C/1min, 72 $^{\circ}$ C/2min, 循环 29 次; 94 $^{\circ}$ C/40s, 56 $^{\circ}$ C/1min, 72 $^{\circ}$ C/15min, 循环 1 次。由引物对 P1/P3 扩增出含甾醇酰基转移酶结构基因和上游调控序列的 DNA 片段, 命名为 *ARE2-1*; 由引物对 P2/P3 只扩增出 *ARE2* 基因的编码序列, 命名为 *ARE2-2*。PCR 产物按文献 5 方法纯化回收。

1.3 带有显性筛选标记的质粒载体的构建

*Bam*H I 部分酶切质粒 pCM1-1^[6], 线性质粒经 Mung Bean Nuclease 处理后重新连接, 得到的正确质粒命名为 pCM3。 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切质粒 pVC727-6^[7], 回收约 1.9kb 的 *PGK1* 启动子片段, *Eco*R I 和 *Sac* I 酶切质粒 pCM3, 回收 0.9kb 的 *MTI* 片段, 两片段同时与经 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切的 YEp352 连接, 获重组质粒 pGM20。质粒 pGM20 含有 *PGK1*p-*MTI* 表达盒, 赋予酵母菌对硫酸铜的抗性。

1.4 酵母菌的转化和转化子的筛选

酵母菌的转化参照文献 4 进行。在添加亮氨酸、组氨酸和色氨酸的基本培养基上和含硫酸铜的 YEPD 培养基上筛选酵母转化子。

1.5 酰基辅酶 A: 甾醇酰基转移酶活性测定

含有重组质粒和空载体的酵母菌分别在选择培养基中培养至对数晚期, 离心收集细胞, 按文献 8 方法制备含甾醇酰基转移酶的粗酶液。按 Bardford 染色法^[9]测定蛋白浓度。酶反应体系由 1mg 微体蛋白, 1mg 牛血清白蛋白, 0.1 μ mol 油酯酰 CoA, 0.3 μ mol 麦角甾醇组成, 含 1mmol/L 谷胱甘肽的磷酸钾缓冲液补体积至 1mL, 37 $^{\circ}$ C 反应 5min, 加入 4mL 氯仿-甲醇 (2:1) 终止反应, 将氯仿层移出旋转蒸发干燥后, 重溶于 50 μ L 氯仿中, 薄层层析法分离和测定甾醇酯的含量^[10]。一个酶活力单位 (U) 为在上述反应条件下, 每分钟生成 1nmol 麦角甾醇酯所需要的酶量。

1.6 麦角甾醇的提取和测定

麦角甾醇的提取和测定参见文献 11。总甾醇的提取和测定按文献 10 的氯仿-甲醇提取法进行。

生物量为每升培养物中的湿菌体重 (g/L), 麦角甾醇含量为每克干细胞中麦角甾醇的毫克数。

2 结果

2.1 甾醇酰基转移酶基因的克隆

PCR 扩增到的含甾醇酰基转移酶基因的 DNA 片段 *ARE2-1* (2.4kb) 和 *ARE2-2* (1.9kb), 与经 *Hinc* II 酶切的 pBluescript M13 载体进行连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 获得重组质粒 pARE2-1 和 pARE2-2。酶切分析表明克隆到的 *ARE2* 基因与 GenBank 中的序列具有相同的酶切图谱。

2.2 酵母菌表达质粒的构建

为了检测单纯提高基因拷贝数及解除基因本身转录调控对基因表达的影响, 分别以 *ARE2* 基因自身启动子、酵母菌组成型表达启动子 *ADHI*p 和诱导型表达启动子 *CUP1*p 为上游调控序列, 构建了 3 个不同的表达质粒 pHX2、pHXA2 和 pHXC2 (图 1)。分别用 *Sma* I 和 *Bam*H I 酶切质粒 pDBLeu, 回收约 0.56kb 含 *ADHI* 终止子的 DNA 片段, 插入到 YEp352 的 *Sma* I 和 *Bam*H I 之间, 获得的质粒命名为 pEA1。用 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切 pEA1, 回收 0.56kb DNA 片段, 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切 pARE2-1, 回收 2.4kb DNA 片段, 上述两片段一起插入到载体 pGM20 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点, 获得表达质粒 pHX2。将来源于质粒 pCM1-1 的约 0.43kb 的 *CUP1* 启动子片段和来源于质粒 pDBLeu 的约 1.5kb 的 *ADHI* 启动子插入到质粒 pET23b 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点及 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点, 分别获得质粒 pECUP1 和 pEADH1。用 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切上述两质粒, 与来源于 pARE2-2 的约 1.9kb 的 *ARE2-2* 和 0.56kb 的 *ADHI* 终止子片段一起插入到 pGM20 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点, 获得表达质粒 pHXC2 和 pHXA2。通过酶切分析验证了质粒的构建是正确的。

2.3 多拷贝 *ARE2* 基因在酵母菌单倍体中的表达

将载体 pGM20 及表达质粒 pHX2, pHXA2 和 pHXC2 分别导入酿酒酵母单倍体菌株 YS58 中, 转化子对硫酸铜的抗性比受体菌提高了 3mmol/L。对细胞麦角甾醇含量及甾醇酰基转移酶活性的测定表明在转化子 YS58 (pHX2) 和 YS58 (pHXA2) 中, 甾醇酰基转移酶活性和麦角甾醇含量均比对照菌 YS58 和 YS58 (pGM20) 升高, 而 YS58 (pHXC2) 的酶活性比对照稍高, 但麦角甾醇含量则没有明显的改变 (表 1)。在 pHXC2 中, *ARE2* 基因的表达受铜抗性基因

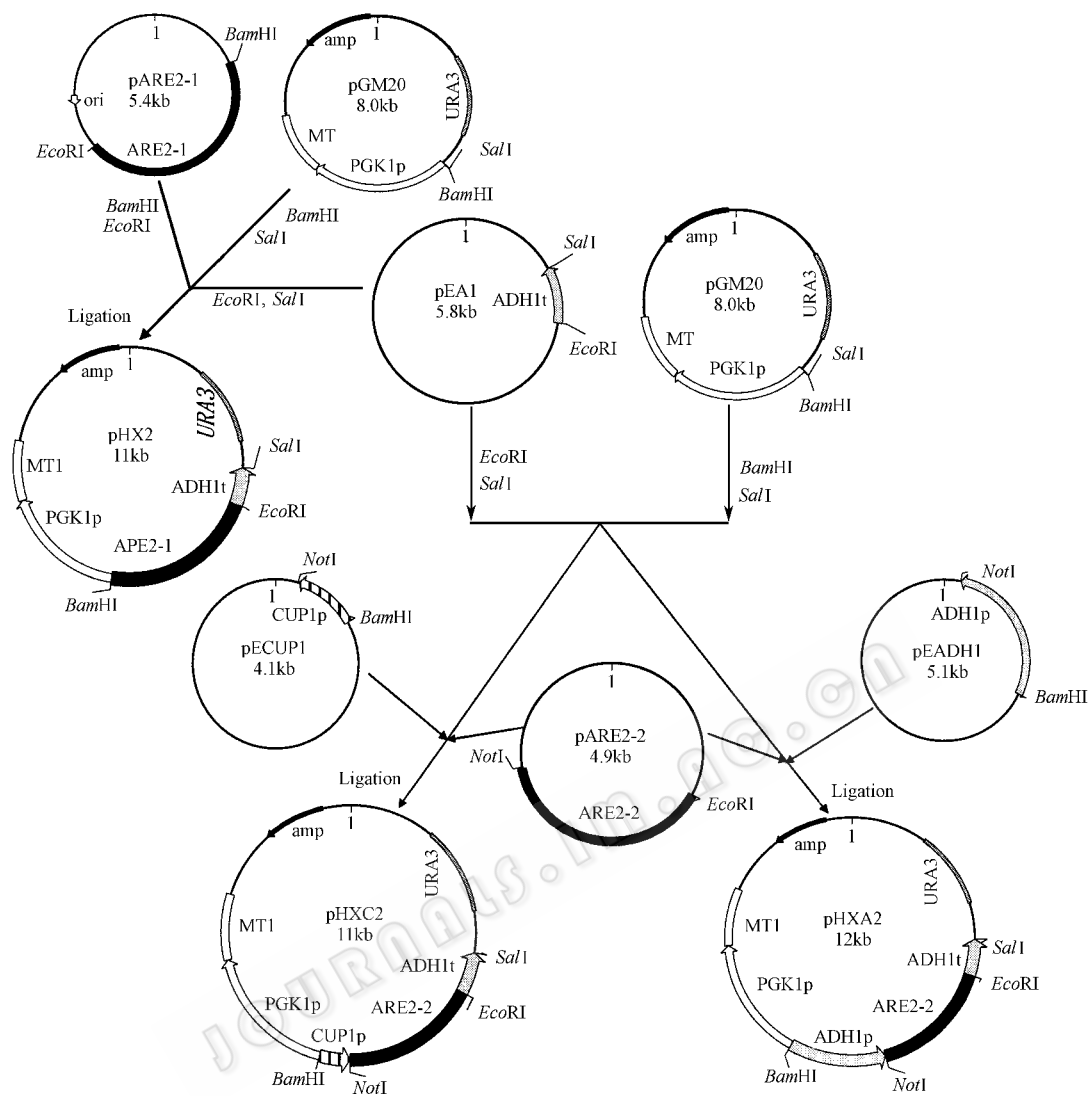


图 1 酵母菌重组表达质粒 pHX2、pHXA2 和 pHXC2 的构建
Fig.1 Construction of recombinant plasmids pHX2 , pHXA2 and pHXC2

CUP1 启动子的调控 ,该启动子受 Cu^{2+} 的诱导而激活 ,当 CuSO_4 浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 时 ,转录活性达最高。因此检测了硫酸铜浓度对 YS58(pHXC2)麦角甾醇合成的影响。结果发现当培养基中 CuSO_4 浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 时 ,YS58(pHXC2)麦角甾醇含量和胞内甾醇酰基转移酶活性均达最高 ,分别为 23.6mg/g 和 21.8U/mg 。上述结果表明质粒中的 *ARE2* 基因均得到了表达 ,而且在酵母菌强启动子的调控下 ,甾醇酰基转移酶活性比单纯提高基因拷贝数明显提高 ,同时酶活性的提高促进了麦角甾醇的生物合成。

2.4 *ARE2* 基因在杂交菌株中的高表达

载体及表达质粒分别转化已构建的麦角甾醇高产菌株 YEH56^[11]。由于受体菌 YEH56 在含 1.2mmol/L CuSO_4 的 YEPD 平板上能够微弱生长 ,当

硫酸铜浓度为 1.6mmol/L 时生长完全被抑制 ,因此在含 2.5mmol/L CuSO_4 的 YEPD 平板上筛选转化子。铜抗性测定表明转化子在含 4mmol/L CuSO_4 的 YEPD 平板上仍然生长良好。转化子 YEH56 (pGM20) YEH56(pHX2) YEH56(pHXA2)和 YEH56 (pHXC2)分别在含 1.8mmol/L 、 $100\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 YEPD 中培养 36h ,离心收集菌体 ,分别测定细胞总麦角甾醇和酯化甾醇的含量。重组转化子中麦角甾醇含量均比空载体对照高 ,而这主要是由于甾醇酯化水平的提高 (表 2)。与在单倍体菌株中的表达相同 ,解除基因本身转录调控 ,尤其在诱导型启动子 *CUP1p* 的调控下 ,基因表达活性进一步提高。转化子的细胞形态 ,生孢情况与受体菌相同 ,说明转化子来源于受体菌的转化。按文献 [11] 方法测定了转化

子的遗传稳定性,在非选择条件下连续传代培养 96h 后,约 83% 的细胞中仍然含有质粒。

表 1 单倍体重转化子及对照菌株中甾醇酰基转移酶活性及麦角甾醇含量

Table 1 Sterol acyltransferase specific activities and ergosterol levels in haploid control strains and recombinant transformants

Strains	Specific activity/(U/mg)	Ergosterol content/(mg/g)
YS58	2.6	8.7
YS58(pGM20)	2.3	8.3
YS58(pHX2)	8.3	13.1
YS58(pHXA2)	11.7	17.1
YS58(pHXC2)	4.3	9.5

Yeast strain YS58 was cultured in YEPD medium and transformants were cultured in YEPD containing 5 mmol/L copper sulfate at 28℃ for 36 h. Values are means of three replicated experiments.

表 2 二倍体转化菌株中游离及酯化麦角甾醇含量的测定

Table 2 Free and esterified ergosterol content in diploid yeast transformants

Strains	Total ergosterol/(mg/g)	Esterified ergosterol/(mg/g)
YEH56(pGM20)	34.4	10.6
YEH56(pHX2)	40.2	16.1
YEH56(pHXA2)	43.6	21.1
YEH56(pHXC2)	46.7	24.4

Transformants YEH56(pGM20), YEH56(pHX2), YEH56(pHXA2) were cultured in YEPD containing 1.8 mmol/L copper sulfate and YEH56(pHXC2) was cultured in YEPD containing 100μmol/L copper sulfate at 28℃ for 36 h. Values are means of three replicated experiments.

2.5 培养条件对转化子麦角甾醇形成的影响

分别检测了培养基中糖浓度、硫酸铜浓度及培养时间对不同转化子生长和麦角甾醇形成的影响。在检测范围内硫酸铜浓度对 YEH56(pGM20), YEH56(pHX2), YEH56(pHXA2)的细胞生长和麦角甾醇含量没有很明显的影 响,在 0.5mmol/L 时甾醇含量达最高。而对 YEH56(pHXC2)来说,硫酸铜浓度的影响则比较明显,在 100μmol/L 时,麦角甾醇含量达最高,随浓度的继续升高,甾醇含量又逐渐降低,这与 ARE2 基因高表达所使用的 CUP1 启动子密切相关。其他被检测的条件对转化子麦角甾醇的合成均有不同程度的影响。当转化子 YEH56(pHX2)、YEH56(pHXA2) 和 YEH56(pHXC2)分别在培养基 YPD8、YPD4 和 YPD6 中培养 60h 时,细胞生长和麦角甾醇含量均达最高值,而 YEH56(pGM20)的麦角甾醇形成最适条件与 YEH56 相同^[1]。在不同菌株的优化培养条件下,转化子 YEH56(pHX2)、YEH56

(pHXA2) 和 YEH56(pHXC2)的麦角甾醇含量分别达 52.6mg/g、53.3mg/g 和 56.9mg/g,是受体菌 YEH56 的 1.3、1.3 和 1.4 倍。

3 讨论

麦角甾醇是重要的医药工业原料,酵母菌发酵是生产麦角甾醇的主要方法,但目前所用酵母菌种麦角甾醇含量普遍较低,因此提高酵母细胞麦角甾醇含量是发酵法生产麦角甾醇亟待解决的问题。已有的研究虽然在一定程度上提高了酵母菌合成麦角甾醇的能力,但还不能满足发酵生产的需要,这主要是由于酵母菌中麦角甾醇的生物合成受到严格的调控,并且调控作用主要在基因的转录水平^[1],传统的细胞水平的育种技术很难突破这种调控,而通过基因工程技术解除转录水平的调控使催化麦角甾醇生物合成的酶高效表达,是改变细胞内甾醇生物合成的有效途径,但这方面的研究开展的还很少。尤其在国内外未见此方面的报道。

甾醇类化合物在真核细胞中具有多方面的生理功能^[1],因此细胞内必须保持适宜的甾醇水平,既保证其生理功能的正常发挥,又不会因过量而对细胞产生毒害。细胞内甾醇水平的调节主要有两个方面,首先通过甾醇调控元件结合蛋白介导的转录调节控制细胞内甾醇的生物合成,另外在甾醇酰基转移酶的催化下,过量的甾醇被酯化成甾醇酯而贮存在胞液内,因此提高甾醇的酯化水平将促进细胞内甾醇的生物合成。本研究通过高保真 PCR 的方法分别克隆了含酯酰辅酶 A:甾醇酰基转移酶编码序列的 DNA 片段 ARE2-2 及含编码序列和上游调控元件的 DNA 片段 ARE2-1,构建了 3 个不同的表达质粒 pHX2、pHXA2 和 pHXC2,使 ARE2 基因的表达分别受到自身启动子、乙醇脱氢酶基因 ADHI 启动子和受铜离子诱导的 CUP1 基因启动子的调控。表达质粒中的 ARE2 基因在以前构建的麦角甾醇高产菌株 YEH56 中得到了功能性表达,导致细胞内麦角甾醇生物合成能力的提高,尤其在受铜离子诱导的 CUP1 基因启动子作用下效果更为明显。获得的重组菌株麦角甾醇含量比对照菌株明显提高,是具有一定应用价值的酵母工程菌。

参 考 文 献

[1] Lees N D , Bard M , Kirsch D R . Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* . *Crit Rev Biochem Mol Biol* . 1999 , 34 : 33 - 47
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Yu C J , Kennedy N J , Chang C C Y , *et al.* . Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA : sterol acyltransferase. *J Biol Chem* , 1996 , **271** : 24157 – 24163 .
- [3] Jensen-Pergakes K , Guo Z , Giattina M , *et al.* . Transcriptional regulation of the two sterol esterification genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . *J Bacteriol* , 2001 , **183** : 4950 – 4957 .
- [4] 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 .
- [5] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [6] Thorvaldsen J L , Mehra R K , Yu W , *et al.* . Analysis of copper-induced metallothionein expression using autonomously replicating plasmids in *Candida glabratae* . *Yeast* , 1995 , **11** : 1505 – 1511 .
- [7] 刘玉方 , 朱邦民 , 蔡金科 . 酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶基因 (*PGKI*) 启动子片段的亚克隆 . 微生物学报 , 1995 , **35** (1) : 21 – 27 .
- [8] Yang H , Cromley D , Wang H , *et al.* . Functional expression of a cDNA to human acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase in yeast . *J Biol Chem* , 1997 , **272** : 3980 – 3985 .
- [9] Bardford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding . *Anal Biochem* , 1976 , **72** : 248 – 254 .
- [10] Parks L W , Bottema C D K , Rodriguez R J , *et al.* . Yeast sterols : yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism . *Methods Enzymology* , 1985 , **111** : 333 – 346 .
- [11] He X , Huai W , Tie C , *et al.* . Breeding of high ergosterol-producing yeast strains . *J Indust Microbiol & Biotechnol* , 2000 , **25** : 39 – 44 .

Effect of Overexpression of Sterol-acyl Transferase on Ergosterol Production in Yeast Strains

HE Xiu-Ping GUO Xue-Na ZHANG Bo-Run* TAN Hua-Rong*

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

Abstract : DNA fragment *ARE2-1* containing the coding sequence and the 5' regulatory sequence of *ARE2* gene and fragment *ARE2-2* containing only the coding sequence of *ARE2* were amplified from the chromosomal DNA of yeast strain YEH56 by PCR . Three plasmids , pHX2 , pHXA2 and pHXC2 , containing sterol acyltransferase gene (*ARE2*) under the control of *ARE2* , *ADH1* or *CUP1* promoters respectively and the copper resistance gene as the selection marker were constructed , and they were then introduced into yeast strain YS58 and YEH56 . *ARE2* gene on plasmids expressed functionally in transformants . Ergosterol production in recombinant strains was enhanced , which is mainly due to the increase of sterol esterification . Under the optimal culture condition , ergosterol content in recombinant strains YEH56(pHX2) , YEH56(pHXA2) and YEH56(pHXC2) was 1.3 , 1.3 and 1.4 fold of that in strain YEH56 as control .

Key words Sterol acyltransferase , Gene expression , Ergosterol , Yeast engineered strain

* Corresponding author . Tel : 86-10-62637679 ; Fax : 86-10-62637679 ; E-mail : zhangbr@sun.im.ac.cn . Tel : 86-10-62654083 ; Fax : 86-10-62654083 ;

E-mail : Tanhr@sun.im.ac.cn .

Received date : 04-10-2003