

## 酵母菌基因工程载体——pCN 系杂种质粒的构建及其特性的研究

倪 津\* 刘玉方 蔡金科

(中国科学院微生物研究所, 北京)

pCN 系质粒是利用 DNA 重组技术, 以 YRp7 和 pAT153 为原始质粒所构建的酵母菌基因工程载体。pCN 系质粒由酵母菌 TRP1 基因的 1.4 kb DNA 片段和完整的 pAT153 分子组成。根据 pAT153 质粒中所插入的 TRP1 DNA 片段的方向性, pCN 质粒有两种不同的构型。在性质上, pCN 系质粒保留了 YRp7 高转化能力和 pAT153 高拷贝水平, 同时它在酵母受体中的稳定性比 YRp7 明显提高。pCN 质粒中尤以 pCN60 可作为酵母基因工程的载体。

**关键词** DNA 重组; 穿梭质粒; pCN 质粒

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为真核生物基因表达的体系, 在生产高等动植物的活性物质方面有着原核生物体系无法比拟的优点, 以遗传工程的方法构建工程菌株, 充分开发利用这一体系有着诱人的前景。目前通用的四类酵母基因载体都存在一些缺点, 难于直接用作酵母菌基因工程的载体, 为此, 我们进行了改良酵母遗传载体的尝试。本文选用目前在酵母遗传工程中使用最广泛的质粒 YRp7<sup>[1]</sup> 和具有高拷贝水平的 pAT153<sup>[2]</sup> 为原始质粒, 利用 DNA 重组技术构建新运载体。对新载体的性质研究表明, 新构建的 pCN 载体在保留了原质粒优点的同时, 明显提高了在酵母细胞中的稳定性, 使其优于 YRp7 的酵母运载体, 为改良酵母遗传载体提供了条件。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株

*E. coli* C800 ( $F^-$ , *thi1*, *thr1*, *leuB6*, *lacY*, *tanA24*, *pro*<sup>-</sup>, *r*<sup>-</sup>, *m*<sup>-</sup>) 本所陆德如赠; *E. coli* C600 (pAT153) 本所陈玉梅赠; *E. coli* HB101 (YRp7) 中国农业科学院范云六赠; *E. coli* AS

1.1047 ( $F^-$ , *trpE*, *thi*) 本所保藏组; 酿酒酵母: DP1 ( $\alpha$ , *his1*, *trp1*) 法国 P. P. Slonimski 教授赠; H802-1B ( $\alpha$ , *lys2*); H802-5D ( $\alpha$ , *ade*, *ura1*) 本组保藏菌株。

#### (二) 培养基

1. LB 培养基: 大肠杆菌的完全培养基。
2. M9 培养基: 大肠杆菌的基本培养基。
3. YEPD 培养基: 酵母菌的完全培养基。
4. YNB 培养基: 酵母菌的基本培养基。

#### (三) 酶

限制性核酸内切酶 *EcoRI*, *BamHI*, T4 DNA 连接酶, 溶菌酶均为生物物理所生化厂产品; *BglII* 为本所制备; 蜗牛酶系本组制备。

#### (四) 抗生素

氯霉素: 浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ ; 四环素: 浓度为 20  $\mu\text{g/ml}$ ; 氯霉素: 浓度为 170  $\mu\text{g/ml}$ ; 均来自卫生部药品生物制品检定所。

#### (五) DNA 样品制备

1. 细菌质粒 DNA 制备: 参照 Maniatis<sup>[3a]</sup> 等人方法进行。

2. 酵母质粒 DNA 的检测: 接活化的实验菌一环于 5 ml YNB 培养基 (补加相应的营养成分),

本文于 1985 年 5 月 8 日收到。

本文由国家科学技术委员会资助。

\* 中国科学院微生物所 81 届研究生, 现在南开大学生物系工作。

28℃ 振荡培养过夜, 3000 r/min 离心 2 分钟收集菌体, 将其悬浮于 200  $\mu$ l 的 PCS 缓冲液中 (0.05 M 磷酸柠檬酸缓冲液, 1 M 山梨醇, pH 5.8), 加入蜗牛酶终浓度为 5 mg/ml, 37℃ 保温 40 分钟。5000 r/min 离心 5 分钟, 收集酵母原生质体, 并将其悬浮于 100  $\mu$ l 的 PC 缓冲液中 (0.05 M 磷酸柠檬酸缓冲液, pH 5.8), 加入 20% SDS 溶液 10  $\mu$ l, 37℃ 保温 2 小时, 然后 14,000 r/min 离心 5 分钟 (高速台式离心机 TGL 16), 所得上清液即为待测样品。

#### (六) DNA 的酶切和连接

参照文献 [3b] 方法进行, 但改用 TA 缓冲液作为酶切反应的缓冲体系<sup>[4]</sup>。

#### (七) 转化

1. 大肠杆菌转化: 以 *E. coli* C600 菌株为受体, 参照文献 [3c] 的方法进行。

2. 酵母菌转化: 以酵母菌 DP1 为受体转化, 分别用两种方法进行。原生质体转化基本按照 Sherman<sup>[5]</sup> 方法; 完整细胞转化则按 Ito<sup>[6]</sup> 等人的方法。

#### (八) 大肠杆菌中质粒拷贝数测定

将含质粒的大肠杆菌活化, 予培养, 并经氯霉素扩增质粒后, 按 Projan<sup>[7]</sup> 等人方法提取大肠杆菌全 DNA。经琼脂糖凝胶电泳将各组分分开, 经 EB 染色后, 在紫外检测灯下可见三条带, 即染色体带、质粒 OC 带和 CCC 带。然后用荧光分光光度计 (HITACHI Fluorescence Spectrophotometer 850) 测得扫描图谱, 从图谱上不同 DNA 组分对应的峰面积求出不同 DNA 组分在样品中的含量, 按公式求出质粒的拷贝数。

#### (九) 酵母细胞内质粒稳定性的检测

将含质粒的酵母转化子活化后接入 YEPD 培养基, 同时另一组实验则接入基本培养基 (YNB+his), 分别在 28℃ 振荡培养十个世代, 收集菌体, 洗涤 2 次, 再经一定稀释倍数分别涂布于 YEPD 和 YNB+his 平板上, 培养后计菌落数, 计算出在受体中质粒的稳定性。

## 结 果

### (一) pCN 质粒的构建

用 *Eco*RI 切出 YRp7 所含 1.4 kb 酵母

DNA 片段, 为阻止 YRp7 分子中 pBR322 在连接时的自身环化, 同时用 *Bam*HI 酶切 YRp7 质粒 DNA, pAT 153 DNA 也用 *Eco*RI 酶切成线性分子。将酶切后的 DNA 以 1:1 混合, 用冷乙醇沉淀, 离心后将沉淀溶于连接酶缓冲液中, 加入 T4 DNA 连接酶连接, 用此连接混合物转化 *E. coli* C 600 菌株, 从得到的 T<sub>2</sub> 表型菌株中进行质粒的分离检测, 结果得到 5 株菌, 所含质粒的分子量介于两个原始质粒之间, 构成系列杂合质粒 (图 1)。

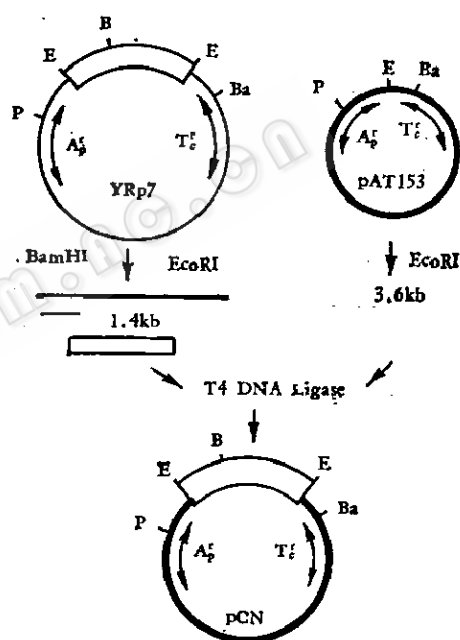


图 1 pCN 质粒载体的构建

Fig. 1 Construction of pCN plasmid vector  
YRp7: 5.8kb; pAT153: 3.6kb; pCN: 5.0kb

为确证这些质粒是由 YRp7 中的 1.4 kb DNA 片段和 pAT 153 分子构成, 进一步检测是由 *Eco*RI 将上述 5 个菌株质粒 DNA 完全酶解, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳比较表明: 除 42 号菌株质粒分子量与 pBR322 相一致外, 其余 4 个质粒则由 YRp7 中 1.4 kb DNA 片段和 pAT 153 分子构成 (图 2), 定名为 pCN 系质粒。

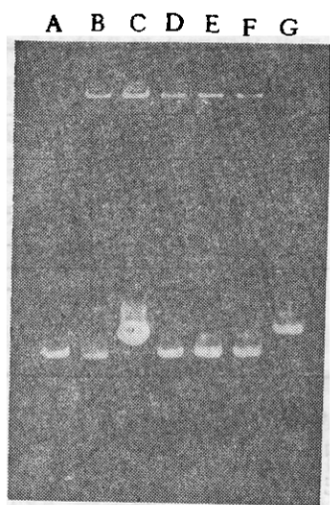


图 2 pCN 质粒组成检定

Fig. 2 Detection of pCN plasmid component

A. pAT153; B. pCN25; C. 42 号菌质粒 plasmid in the 42 strain; D. pCN56; E. pCN60; F. pCN 67 G. YRp 7 质粒 DNA *EcoRI* 酶切图 pCN67 and YRp 7 by *EcoRI*

重组是一随机过程,为确定 TRP1 DNA 片段插入 pCN 质粒中的方向性,用 *Bam*HI、*Bgl*II 对它们进行混合酶切,其产物和 YRp 7 DNA 的双酶酶切产物比较,发现 4 种质粒中有两种 (pCN60, pCN56) 重组的方向性和 YRp7 相同,另两种 (pCN25, pCN 67) 则相反。pCN 系质粒 DNA 的酶切图谱如图 3 所示。

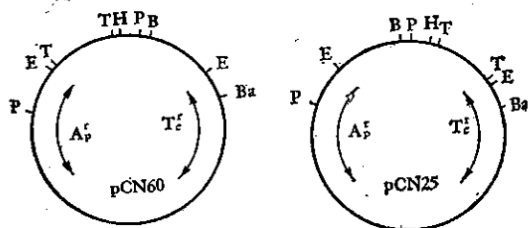


图 3 pCN 质粒 DNA 酶切图谱

Fig. 3 Restriction map of pCN plasmids

Ba = *Bam*HI, B = *Bgl*III, E = *Eco*RI, H = *Hind*III, P = *Pst*I, T = *Taq*I.

为确定 pCN 质粒的生物学性质,首先

要获得含有 pCN 质粒的大肠杆菌和酵母菌菌株。分别以 pCN25 和 pCN 60 质粒转化 C 600 和 DP 1 菌株,对 C 600 获得的  $T_c^r$  表型菌株进行了  $A_p^r$  抗性和革兰氏染色的检测,结果表明  $T_c^r$  菌株皆为  $A_p^r$  的革兰氏阴性杆菌,即初步证明获得了含 pCN 的 C 600 菌株;对 DP 1 获得色氨酸原养型的菌株进行了下列检测:镜检观察形态、交配型、营养要求,重提质粒和再转化,随机挑 40 株转化子进行检测发现细胞的形态、交配型与 DP 1 菌株相同,没有发现 DP 1 以外的遗传标记 (表 1),质粒的提取也表明确实含有 pCN 质粒 (图 4),再转化也得到了同前转化同样的结果,由此确证所获

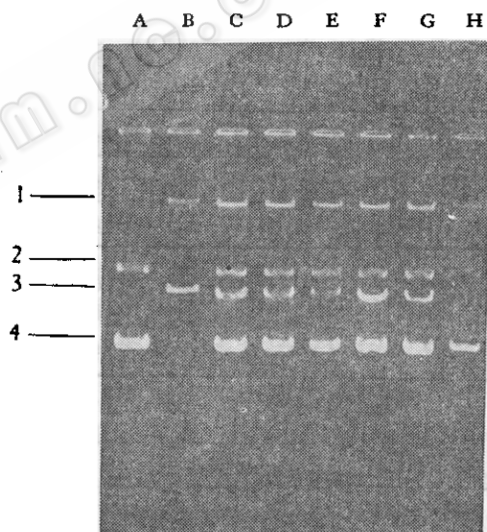


图 4 酵母菌转化子中 pCN 质粒的分离

Fig. 4 Isolation of pCN plasmids from transformants

A. pCN 质粒对照; B. 受体 DP1 全 DNA; C—H. 6 株随机挑取的酵母转化子中分离的 DNA 样品。1. 酵母染色体 DNA; 2. pCN 质粒带; 3. 酵母内源质粒; 4. 质粒 CCC 带

A. Control of pCN plasmid; B. Total DNA sample of DP1; C—H. DNA samples isolated from yeast transformants

1. Yeast chromosome DNA; 2. OC band of pCN plasmids; 3. Yeast plasmid; 4. CCC band of plasmids

表 1 酵母转化子的特性

Table 1 Characterization of yeast transformants

菌株 Strain	交配型 Mating type	转化子营养缺陷型 Auxotroph of transformant			
		YNB	YNB + his	YNB + trp	YNB + <sup>his</sup> trp
检测菌株 Detected strain DP1( $\alpha$ ) H802-5D (a)	-	-	-	-	+
	+	-	-	-	-
转化子 ( $\alpha$ ) Transformants (40 strains)	+	-	+	-	+

表 2 pCN 与 YRp 7 质粒的转化效率

Table 2 Efficiency of transformation by pCN and YRp7 plasmids

A. 酿酒酵母 DP1 的转化(选择标记 TRP1)

A. Transformation of *S. cerevisiae* DP1 by pCN and YRp 7 plasmids (selected marker TRP1)

质粒 Plasmid	转化子/ $\mu$ g DNA Transformant/ $\mu$ g DNA	
	原生质体转化 Protoplast transformation	完整细胞转化 Intact cell transformation
YRp 7	~1,000	~70
pCN25	~1,200	~60
pCN60	~1,200	~70

B. 大肠杆菌 C 600 为受体的转化(选择标记为  $T_c^r$ ,  $A_p^r$ )

B. Transformation of *E. coli* C600 by pCN, pAT153 and YRp7 plasmids  
(selected marker  $T_c^r$ ,  $A_p^r$ )

受体 Recipient	转化子/ $\mu$ g DNA Transformant/ $\mu$ g DNA			
	pAT 153	pCN 25	pCN 60	YRp 7
C600	~3,000	~2,000	~2,000	<2,000
AS 1.1047	~2,000	~2,000	~2,000	~2,000

得转化子内含 pCN 质粒。

(二) pCN 质粒生物学特性

构建的 pCN 杂种质粒能否作为酵母菌基因工程的载体,这取决于它对受体菌的转化频率、稳定性、拷贝数以及功能表达等因素,因此随机挑选了 pCN25 和 pCN60 一组构型不同的 pCN 质粒对其特性进行研究。

1. pCN 质粒对大肠杆菌和酿酒酵母的转化: pCN 系质粒是一种穿梭质粒,能在两种受体细胞中进行复制和功能表达。对大肠杆菌转化的选择标记是四环素和氨苄青霉素抗性,对酵母转化的选择标记是色氨酸原养型要求。定量取质粒 DNA,按上述操作方法进行转化,得到的结果指出: pCN 质粒对大肠杆菌 C 600 与大肠杆菌

AS 1.1047 的转化效率和 YRp 7 相当,而对酿酒酵母的转化没有明显的差异 (表 2)。原生质体转化法较完整细胞转化效率要高,这与已报道的结果是一致的<sup>[8]</sup>,证明 pCN 系质粒获得如 YRp 7 质粒一样有高效转化效率。

2. 质粒的分子长度比较: 由于 pAT 153 较 pBR 322 分子长度约小 700 bp, 所以从理论上 pCN 质粒的长度应较 YRp 7 小 700 bp, 这对质粒的制备与外源基因的亚克隆很有意义。分别提取 YRp 7、pAT 153 和 pCN 系质粒,并用 *Bam* HI 酶切成线性 DNA 分子进行琼脂糖凝胶电泳(图 5),电泳图谱证明 pCN 系质粒的分子小于 YRp 7, 约为 5kb, 其确切的分子长度要待序列分析之后才能精确得出。

3. 质粒拷贝数的测定: 我们在大肠杆菌扩增下对 pCN 质粒的拷贝数水平按 Projan 等人方法进行测定, 结果如表 3 所示。pCN 60 基本上和 pAT 153 具有同样的拷贝水平,而 pCN 25 和 YRp 7 质粒拷贝数在同一水平,但后者较前者低,只有其半数,说明 pCN 60 质粒作为遗传工程载体较 pCN 25 和 YRp 7 更有意义。至于 pCN 系质粒拷贝数间的差异的原因尚待进一步研究。

4. pCN 质粒在酵母受体中稳定性的测定: 载体在受体中的稳定性对酵母基因工程的应用至关重要。一般认为 YRp 系载体在酵母受体中最易被消除。YE<sub>p</sub> 系载体的稳定性较 YRp 强,但由于其分子量大,容纳外源 DNA 片段长度受到限制,同时

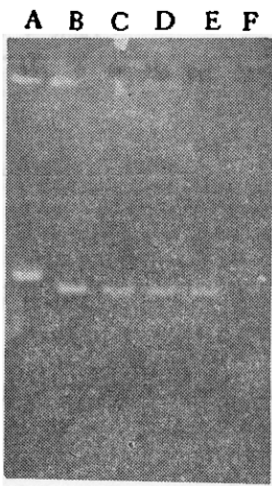


图 5 pCN 质粒与原始质粒分子长度比较  
Fig. 5 Comparison of molecular length of pCN and original plasmids  
A. YRp7; B. pCN25; C. pCN56; D. pCN60; E. pCN 67; F. pAT 153

制备、纯化 DNA 也较困难。YC<sub>p</sub> 载体最稳定,但只有一个拷贝。所以改造 YRp 系质粒,提高它在酵母受体中的稳定性是很有意义的。我们将 pCN 系质粒和 YRp 7 质粒的酵母转化子在完全培养基与保持选择压力的基本培养基中 (YNB + his) 培养,测定质粒细胞在克隆条件下的稳定性。

将细胞接于 YEPD 和 YNB + his 培养基中,经过 10 个世代的连续培养,适当稀释后,涂布在不同培养基上,DP 1 原始菌和转化子在 YEPD 培养基中都能生长,而在 YNB + his 培养基上只有转化子或 Trp 1 自发回复突变体才能生长,已知 DP1 的 trp 1 自发回复突变为 10<sup>-8</sup>,可略而不计。从而比较不同平板上生长菌落数即可

表 3 质粒拷贝数测定  
Table 3 Determination of plasmid copy number

质 粒 Plasmid	pAT 153	pCN 25	pCN 60	YRp 7
拷贝数/细胞 Copy number/cell	~1,300	~600	~1,200	~750

表 4 pCN 和 YRp7 质粒的稳定性  
Table 4 Stability of pCN and YRp7 plasmids

转化子培养基 Medium for transformant	质粒 Plasmid	培养基 Medium		有丝分裂的丢失率 Mitotic loss%
		YEFD	YNB + his	
YEFD	pCN 25	$2.0 \times 10^8$	$9.2 \times 10^7$	54
	pCN 60	$1.5 \times 10^8$	$9.0 \times 10^7$	40
	YRp 7	$5.5 \times 10^7$	$8.0 \times 10^5$	85.5
YNB	pCN 25	$6.7 \times 10^4$	$5.9 \times 10^4$	11.9
	pCN 60	$5.8 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	10.3
	YRp 7	$1.2 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	66.7

计算出质粒在细胞内的存留率。结果列于表 4。

表 4 明显指出: pCN 质粒比 YRp7 质粒在 DP1 受体中更稳定。在完全培养基中 pCN 转化子只有 40—54% 的细胞丢失质粒,而 YRp7 转化子则有 66.7% 的细胞失去质粒。在基本培养基 (YNB + his) 中的细胞,两者稳定性显著差异, pCN 转化子 90% 的细胞保留质粒,而 YRp7 转化子只有 33%, pCN60 比 pCN 25 更高些。

综上所述,新构建的 pCN 系质粒具有如下性质: (1) 对大肠杆菌和酵母菌均具有较高的转化能力,并能在此两种细胞内进行功能表达,从而构成大肠杆菌和酵母菌之间的穿梭载体。(2) 分子量小,和原始质粒 YRp7 相比,分子量小 700bp,约为 5kb,可以增加外源 DNA 的容量,同时给操作带来很大方便。(3) 拷贝数高,在大肠杆菌中的拷贝数明显高于 YRp7,为克隆操作和 DNA 制备、纯化创造了方便条件。(4) 稳定性高,与 YRp7 相比,具有较高稳定性,其稳定性与 YE<sub>p</sub> 系载体相当,但分子量小,尤其是 pCN 60 质粒适于作为酵母基因工程的运载体。

## 讨 论

pCN 系质粒从构建过程中并未引入

特殊的结构来保证它在酵母细胞中的稳定性,但实验结果表明, pCN 质粒的稳定性远远高于同属 YRp 系载体的 YRp 7, 可能在重组过程中使得 pCN 质粒的分子结构发生变化,导致功能和性质的改变。对 pCN 质粒稳定性增加的机制尚需进一步试验才能明确,但 pCN 质粒结构上的差异对其性质确有很大影响,这从 pCN 25 和 pCN 60 拷贝数的差别得到证实。若能证实此种稳定性增加是由何种结构改变所引起的,将对酵母基因工程载体的进一步改良无疑是重要的。

## 参 考 文 献

- [1] Boliver, R. et al.: *Gene*, 2: 95—113, 1977.
- [2] Twigg, A. J. et al.: *Nature*, 283: 216, 1980.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, CSH, (a) p. 86—91, (b) p. 104—106, (c) p. 250—251, 1982.
- [4] O'Farrell, P. H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 179: 421—435, 1980.
- [5] Sherman, F. et al.: *Methods in Yeast Genetics*, CSH, p. 106—111c, 1983.
- [6] Ito, H. et al.: *J. Bacteriology*, 153: 163—168, 1983.
- [7] Projan, S. T. et al.: *Plasmid*, 9: 182—190, 1983.

## CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE pCN HYBRID PLASMID FOR YEAST GENETIC ENGINEERING VECTOR

Ni Jin Liu Yufang Cai Jinke

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

By means of the DNA recombinant technology, pCN plasmids were constructed from plasmids YRp7 and pAT153 for yeast genetic engineering vector. The pCN plasmids consist of 1.4 Kb DNA segment of yeast TRP1 gene and the intact plasmid pAT153 molecule. There are two different configuration of pCN plasmids, according to the orientation of inserted TRP1 DNA segment in pAT153 plasmid. The pCN vector obtains the properties of

high transformation efficiency of YRp7 and high copy level of pAT153, furthermore, the stability of the pCN plasmid in yeast recipient is more than that of the YRp7. As a shuttle plasmid between yeast and *E. coli*, especially pCN60 from pCN plasmids can be used as yeast genetic engineering vector.

### Key words

Recombinant DNA; Shuttle vector; pCN vector