

酵母菌色氨酸合成酶基因的克隆与表达

恽定方* 刘玉方 蔡金科

(中国科学院微生物研究所,北京)

用 *Bam*H1 酶切酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1412-4D 染色体 DNA, 通过蔗糖梯度分离 2—4kb DNA 片段并插入穿梭质粒 pCN60, 构成 1412-4D 基因文库。从基因文库中提取重组质粒, 转化受体菌 C9 (α , trp5, ade1, ade6), 用直接功能互补法, 分离到 9 株重组质粒, 它们都含有 3.2kb 的 TRP5 DNA 片段, 分别命名为 pCN60(trp5)₁₋₉。

转化体中色氨酸合成酶的酶活水平比原始菌株 1412-4D 高 3 倍。

关键词 色氨酸合成酶; 基因文库; TRP5 基因克隆

酵母菌色氨酸合成酶能催化用吲哚和 L-丝氨酸为底物一步酶促合成 L-色氨酸^[1]。根据这一酶促反应, 利用重组 DNA 技术, 来提高酵母细胞中色氨酸合成酶的活性, 以吲哚和 L-丝氨酸为前体, 就有可能通过一步催化法工业化生产色氨酸, 为此我们首先克隆了酵母菌色氨酸合成酶基因 (TRP5), 同时对克隆的 TRP5 基因在 C9 细胞中的表达以及 Triton-X100 处理的酵母转化体 C9/pCN 60 (TRP5) 为色氨酸合成酶的酶源, 对一步酶促法合成色氨酸的可能性进行了初步的研究。

材料和方法

(一) 菌株

大肠杆菌 (*E. coli*)

C600 (F^- , thi, thr1, leuB6, lacY, tanA24, pro⁺, supE44, r⁺, m⁻)。

HB101 (F^- , pro⁻, leu⁻, V_{B1}, lay, Str^r, r_k⁻, M_k⁻, IndoI⁻, racA⁻, sup⁺)。

HB 101 (pCN60) 由本组构建^[2]。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1412-4D (α , ade)。

C9 (α , trp5, ade1, ade6) 由 R. W. Mortimer 教授赠送。

DP1 (α , his1, trp1) 由 P. P. Slonimski 教授

赠送。

(二) 培养基

1. LB 培养基: 细菌完全培养基。
2. M9CA 培养基: 细菌基本培养基。
3. YEPD 培养基: 酵母菌完全培养基。
4. YNB 培养基: 酵母菌基本培养基^[3]。

(三) 主要试剂

*Bam*H1、*Hind*III 为 Boehringer mannheim 公司产品; 碱性磷酸酯酶、T₄ DNA 连接酶、 λ DNA 为中国科学院生物物理研究所生化试剂厂产品; PEG 4000 日本进口分装; 溶菌酶为 Sigman 公司产品; 蜗牛酶本组自制。

(四) 抗生素

氨基青霉素、四环素和氯霉素均来自卫生部北京药品生物制品检定所。

(五) DNA 样品制备

1. 酵母菌染色体 DNA 的提取及 2—4kb DNA 片段的制备: 酵母菌染色体 DNA 的提取按 Cryer 等人^[4]的方法进行。2—4kb DNA 片段分离制备按文献^[5a]方法进行。

2. 载体 DNA 的制备按文献^[5b]方法进行, 再经 Sephadex-G50 柱层析进一步纯化。为了防止酶切的线性 pCN 60 DNA 在 T₄DNA 连接酶作用时的自身环化, 再按 Perbal^[6]的方法进行。

本文于 1987 年 9 月 29 日收到。

国家科委资助课题。

* 现在中国科学院上海植物生理研究所。

去磷酸化反应。

3. 酵母转化子总 DNA 制备: 按 Ferguson^[7] 等人的方法进行。

(六) 连接反应和质粒 DNA 的转化

连接反应按文献[5c]方法进行。大肠杆菌转化按文献[5d]进行。酵母菌转化按文献[8]进行。

(七) 酵母菌转化子的检测

1. 营养要求测定: 按常规方法将新培养的酵母菌转化子细胞分别点在 YNB+ade+trp、YNB+ade 和 YNB+trp 平皿上, 28°C 培养 4 天后, 以生长情况确定转化子的营养要求。

2. 交配型测定: 以 DP1(α) 和 1412-4 D(α) 为标准菌株, 测定酵母菌转化子细胞的交配型。

(八) 色氨酸合成酶活性测定

色氨酸合成酶活性的测定按文献 [9,10] 进行。

(九) 一步酶法合成色氨酸

酶法合成色氨酸按文献[9,10]方法进行。

结果和讨论

(一) 酵母菌基因文库的构建

1. 酵母菌染色体 DNA 的提取及 2—

4kb DNA 片段的制备: 按照 Cryer 等人方法提取的染色体 DNA 分子较完整, 纯度也较高, 可直接进行酶切。用 5%—40% 的蔗糖密度梯度离心, 将经 *Bam*HI 酶切的不同长度 DNA 片段分开, 用琼脂糖凝胶电泳(图 1)确定 2—4 kb DNA 片段组分。

2. pCN60 DNA 的制备及脱磷酸化: 用碱法大规模制备并经柱层析纯化后的 pCN60 DNA, *Bam*HI 酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测为一条带(图 2)。说明用此方法制备的 pCN60 的 DNA 纯度已达到要求。

为防止在连接过程中质粒 DNA 自身环化, 用细菌碱性磷酸单脂酶 (BAP) 处理经过 *Bam* HI 酶切的线性 pCN 60 DNA, 用 T4 DNA 连接酶连接, 电泳结果没有发现明显的连接现象(图 2)。用连接产物转化 C600, 仅出现极少量的转化子, 证明脱磷后的 pCN 60 DNA 分子的自身环化明显下降。

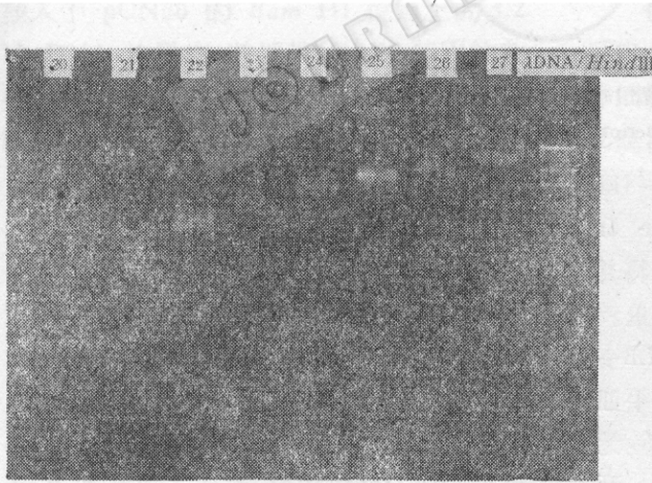


图1 酵母菌染色体 DNA *Bam*HI 片段的蔗糖密度梯度离心分部
20—27 为收集时管号

Fig. 1 Fractionation of *Bam*HI restriction fragments of yeast chromosomal DNA by sucrose density gradient centrifugation
20—27 are the No. of fraction tube

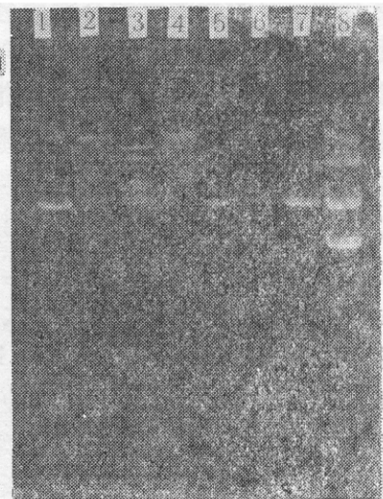


图2 pCN60 DNA 的脱磷酸化

Fig. 2 Dephosphorylation of pCN60 DNA
1. pCN60/*Bam*HI; 2. pCN60/*Bam*HI + T4-DNA ligase; 3. Dephosphorylated pCN60 + λ DNA/*Bam*HI; 4. Dephosphorylated pCN60 + λ DNA/*Bam*HI + T4-DNA ligase; 5. Dephosphorylated pCN60; 6. Dephosphorylated pCN 60 + T4 DNA ligase; 7. pCN60/*Bam*HI; 8. pCN60

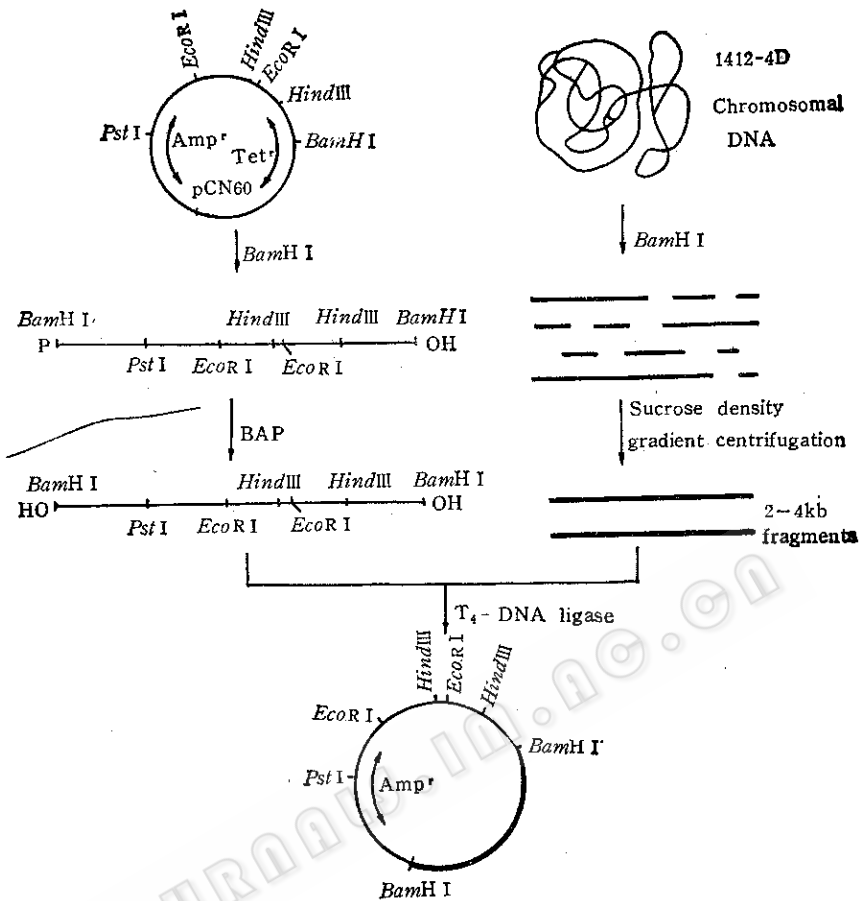


图3 酵母菌 1412-4D 基因文库的构建

Fig. 3 Construction of 1412-4D gene library

将经过蔗糖梯度离心制备的 2—4kb 酵母 DNA 片段与脱磷酸化的 pCN 60 DNA 混合,用 T4DNA 连接酶连接,将其产物用于转化大肠杆菌 C600,出现大量转化子,随机挑取 110 个菌落,分别在 LB+Tet 和 LB 平皿上,培养后根据两种平皿生长的菌落数,测得脱磷频率为 92.8%。为了检测在 LB + Tet 平皿上不能生长,而在 LB 平皿上生长的菌落是否在 pCN 60 的 BamHI 位点上插入外源 DNA 片段,我们用电泳法比较了杂种质粒与 pCN 60 分子量的大小,结果发现杂种质粒都比 pCN60 大,即杂种质粒都有外源 DNA 片段插入。

3. 酵母菌基因文库的构建: 酵母菌基因文库的构建如图 3 所示。将脱磷酸化的 pCN60 DNA 与制备 2—4kb DNA 片段混合,连接酶连接后,转化 C600,共获得 5 万个菌落,并测得脱磷频率为 91%,即基因文库中约有 4.5 万个菌落中所含的杂种质粒,在 pCN 60 的 BamHI 切点插入了外源 DNA 片段。按公式计算^[5e]基因文库中的菌落数只要达 1.7×10^4 — 3.5×10^4 即可包含酵母菌的整个基因组。

(二) 酵母菌色氨酸合成酶基因的克隆

从酵母菌基因文库中提取杂种质粒并转化酵母菌 C9,选出 11 株转化子,其交配



图4 pCN60 (TRP5) 质粒与 pCN60 的比较

Fig. 4 Comparison of molecular length of pCN60 (TRP5) and pCN60
1-7 were pCN60 (TRP5)₁-pCN60 (TRP5)₇, respectively; 8 was pCN60

型和营养要求均为 α , ade。从这些转化子中提取总 DNA, 转化 C600, 得到 Amp^r Tet^r 转化子, 用琼脂糖凝胶电泳测定其中 9 株转化子提取的杂种质粒, 其分子量比 pCN60 大(图 4)。当用 Bam HI 酶切时, 均可得到 3.2kb DNA 片段(图 5)。因此可以断定酵母菌 TRP5 基因已被克隆在插入于 pCN60 的 Bam HI 位点上的 3.2 kb DNA 片段中, 并把带 TRP5 基因的杂种质粒命名为 pCN 60 (TRP5), 把相应的酵母转化子命名为 C9/pCN 60 (TRP5)。

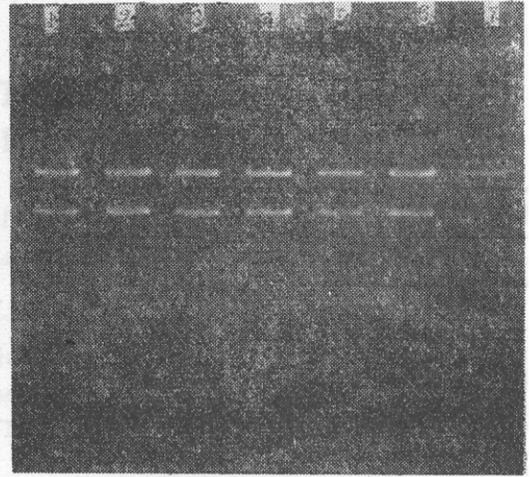


图5 pCN 60(TRP5) 和 pCN60 的 Bam HI 酶切电泳

Fig. 5 Restriction endonuclease Bam HI mapping of pCN 60 (TRP5) and pCN 60
1-6 were pCN60 (TRP5)₁-pCN 60 (TRP5)₆, respectively; 7 was pCN60

(三) 酵母菌色氨酸合成酶基因的表达

色氨酸合成酶能够催化吲哚与丝氨酸反应合成色氨酸, 克隆的 TRP5 基因在受体细胞 C9 中表达水平的高低是通过测定反应液中吲哚剩余多少来表达的, 结果列

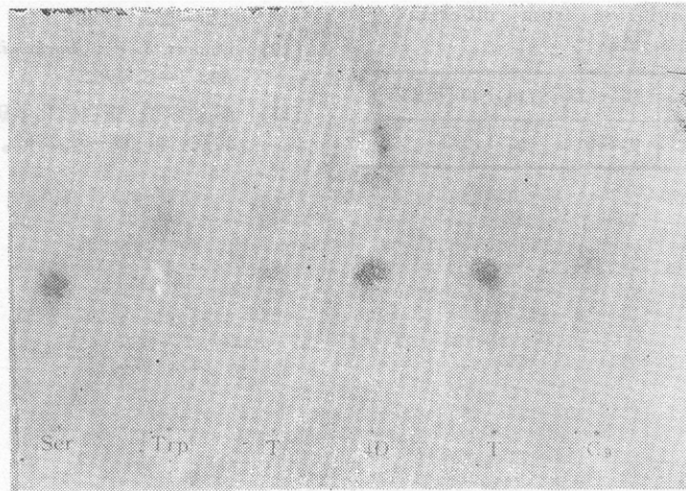


图6 酵母菌转化子 (T)、C9 和 1412-4D 产生色氨酸的纸层析比较

Fig. 6 Comparison of paper chromatograph of tryptophan produced by yeast transformant(T), C9 and 1412-4D(4D)

于表 1。

表 1 不同菌株色氨酸合成酶反应液中吲哚含量的比较

Table 1 The comparison of quantity of indole in the reaction solution by tryptophan synthetase from different strains

菌株 Strain	C9	1412-4D	C9/pCN60 (TRP5)
OD ₂₄₀	0.054	0.016	0.006

从表 1 可见, 反应后吲哚含量 C9/pCN 60 (TRP5) 仅为 1412-4D 的 37.5%, 说明转化子细胞中色氨酸合成酶的活性比供体菌 1412-4D 提高了近 3 倍, 即 TRP5 基因的表达水平提高近 3 倍。由于 C9 细胞中色氨酸的反馈抑制没有被解除, 推测是由于基因拷贝数的增加, 导致了 TRP5 基因在 C9 细胞中表达水平的提高。

(四) 一步酶法合成色氨酸

按材料和方法所述的方法, 以 C9 洗脱液为对照, 在 279nm 处测定 1412-4D 和 C9/pCN60 (TRP5) 洗脱液吸收值, 列于表 2。

表 2 不同菌株色氨酸合成酶洗脱液中色氨酸含量的比较

Table 2 The comparison of quantity of tryptophan in the elution solution by tryptophan synthetase from different strains

菌株 Strain	C9	1412-4D	C9/pCN60 (TRP5)
OD ₂₇₉	0	0.386	1.090

由表 2 可见 C9/pCN 60 (TRP5) 所催化合成的色氨酸量为 1412-4D 两倍多, 即色氨酸合成酶酶活提高了近 3 倍, 这与酶活测定的结果相一致。

快速纸层析法^[11]检测丝氨酸转化成色氨酸的能力实验也得到同样的结果 (图 6)。

酵母菌 TRP5 基因克隆、转化并成功地在酵母菌中得到表达, 为酶促一步法生产色氨酸奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Smith, O. H. et al.: *Methods in Enzymology*, 5: 794—806, 1962.
- [2] 倪 津等: *微生物学报*, 26(2): 127—133, 1986.
- [3] Phaff, H. J. et al.: *The life of yeasts*, Harvard university press, p. 166—167, 1978.
- [4] Cryer, D. R. et al.: *Methods in Cell Biology*, XII, Prescott, D. M. (Ed.), Academic press, New York, p. 39—44, 1975.
- [5] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, CSH, (a) p. 275—277; (b) p. 89—91; (c) p. 289; (d) p. 249—251; (e) p. 271, 1982.
- [6] Perbal, B.: *A Practical Guide to Molecular Cloning*, A Wiley Interscience Publication, New York, p. 259—263, 1984.
- [7] Ferguson, J. et al.: *Gene*, 16: 191—197, 1981.
- [8] Ito, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 48(2): 341—347, 1984.
- [9] Miozzri, G. F.: *Analytical Biochemistry*, 90: 220—233, 1978.
- [10] Demors, J. A.: *Biochimica. ET Biophysica. Acta*, 62: 1—3, 1962.
- [11] 潘家秀等: *蛋白质化学研究技术*, 科学出版社, 北京, p. 59—61, 1962.

CLONING AND EXPRESSION OF TRYPTOPHAN SYNTHETASE GENE (TRP5) IN YEAST

Yun Dingfang Liu Yufang Cai Jinke

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

TRP5, one of five genes required for tryptophan synthetase in *S. cerevisiae*, has been isolated on recombinant plasmids. A genomic DNA bank, containing the entire yeast genome was constructed by complete digestion of yeast 1412-4D DNA with restriction endonuclease *Bam*HI, size fractionated by sucrose gradient (2-4kb), and insertion of the fragments into the yeast shuttle vector pCN60. 9 recombinants plasmids capable of complementing *trp5* mutations were isolated by transformation of yeast cell C9 (α , *trp5*, *ade1*, *ade6*). The recom-

binant plasmids, containing 3.2 kb DNA fragments located TRP5 gene, were named pCN60 (TRP5)₁₋₉.

Tryptophan synthetase activity of transformants was 3-fold higher than that of original strain 1412-4D.

Key words

Tryptophan synthetase; Gene library; TRP5 gene cloning