

酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶基因 (PGK1) 启动子片段的亚克隆*

刘玉方 朱邦民 蔡金科

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 含有3-磷酸甘油酸激酶基因 (PGK1) 的酿酒酵母染色体3.1 kb Hind III 片段, 已被克隆到大肠杆菌-酵母菌穿梭载体 pCN60 上, Kpn I 核酸内切酶在 pCN60 上没有酶切位点, 而在 pCN60 (PGK1) 上仅有一个酶切位点。用此酶将 pCN60 (PGK1) 质粒完全酶切, 再用 Bal31 从两端逐步消解碱基对, 使反应终止于每端消解500bp 左右, 加上 EcoR I linker, 用 EcoR I、BamH I 酶切, 分离1.9kb 的 DNA 片段, 插入用同样双酶切的酵母启动子探针载体 pVC727 上, 转化 *E. coli* C600, 再从转化子中提取重组质粒转化酵母受体菌 NA87-11A。用菌落染色法筛选出 PHO5 基因高效表达转化子, 这个转化子质粒含有1.9kb 的 BamH I、EcoR I 酶切片段, 它具有强启动子功能, 并测定其3' 末端序列。

关键词 PGK1 基因, 启动子, 亚克隆

外源基因在酿酒酵母受体中高效表达、糖苷化和分泌, 需有相应的载体、受体系统, 而构建载体就需要有强的启动子, 因为酿酒酵母蛋白表达水平的调控主要发生在转录水平上。酿酒酵母糖酵解过程中, 磷酸甘油醛脱氢酶的3个等位基因 (PGD) 和单拷贝的磷酸甘油酸激酶基因 (PGK) 蛋白产物最高分别占总蛋白的8%和4%, 这说明它们的启动子有很强的启动功能, 因此现在酵母工程菌的高效表达载体系统多由这两类启动子所构建^[1-5]。

我们已将 PGK1 基因完整地克隆到大肠杆菌-酵母菌穿梭质粒 pCN60 上^[6]。本文报道用 DNA 外切酶逐步消解 PGK1 基因的蛋白编码顺序, 分离不同长度的启动子片段, 再用酿酒酵母的启动子探针载体筛选出具有强启动功能的 DNA 片段, 构建具有强启动子的表达载体。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 实验所用菌株见表1。

1.1.2 质粒和噬菌体: pCN60 (PGK1) 为本组杨艳卿等构建^[6]; pVC727 为日本大阪大学原岛俊教授赠给^[7]; M13mp19 BRL M13 Cloning kit 附带。

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于1993年9月14日收到。

表1 实验用菌株
Table 1 List of strains

菌 株 Strain		基 因 型 Genotype	来 源 Source
<i>E. coli</i>	C600	F ⁻ thi1 leuB6 lacY tanA24 supE44 λ ⁻ r ⁻ m ⁻	本组保藏 This study
	JM101	supE Δ (lac-proAB) F ⁻ traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15	BRL M13 Cloning Kit
<i>S. cerevisiae</i>	DP-1	α his1 trp1	本组保藏 This study
	NA87-11A	a trp1 his3 leu2-3 112pho3-1 pho5-1	Yasuji Oshima ^[7]

1.1.3 培养基: LB 培养基: 大肠杆菌完全培养基; M9 培养基: 大肠杆菌基本培养基; YEPD 培养基: 酵母菌完全培养基; YNB 培养基: 酵母菌基本培养基, 并按实验不同需要加入不同碳源和营养源。

1.1.4 酶和试剂: DNA 内切酶 BamH I、EcoR I、KpnI 及 DNA 外切酶 Bal31, T4DNA 连接酶为 Boehringer mannheim 公司产品; X-gal IPTG 为 Sigma 公司产品; 核糖核酸酶、溶菌酶为中国科学院上海生物化学研究所生产; EcoR I linker d (CGGAATTCCG) 为 Biolabs 公司产品; 蜗牛酶为本组自制; Fast blue B salt 为 Fluka AG 公司产品; 4-Nitrophenyl disodium orthophosphate 为 Anala R Biochemica 产品; 1-Naphthyl phosphate monosodium salt 为 Aldrich chemical 产品。氨苄青霉素、四环素、氯霉素均购自卫生部北京药品生物制品检定所。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的制备与纯化: 大肠杆菌质粒 DNA 的制备按 Miniatis 等人^[8a]方法进行。微量、快速提取细菌转化子质粒 DNA 按文献^[8b]方法进行。酵母菌质粒 DNA 提取按文献^[9]方法进行。

1.2.2 质粒 DNA 酶切、片段回收、连接与转化: 质粒 DNA 酶切按厂方产品说明书进行; Bal31 酶切缺失反应按文献^[8c]进行, 取 20μl pCN60 (PGK) 质粒, 用 KpnI 酶切, 乙醇沉淀, 进行 Bal31 缺失反应。反应体积为 100μl, 含有 7.1μg pCN60 (PGK1) DNA, 0.3u Bal31 酶, 反应温度为 30℃, 酶切速度约为 60bp/min/DNA 末端, 8 分钟后终止反应, 再进行 BamH I 酶切, 用琼脂糖凝胶电泳检测缺失片段大小。

DNA 酶切片段的回收按文献^[8d]方法回收。

大肠杆菌转化按文献^[8e]进行; 酵母菌转化按文献^[10]进行。

1.3 受体酵母菌营养缺陷型及 trp 缺陷自发恢复突变率的测定

将 NA87-11A 斜面活化后接一环于 50ml YEPD 培养基中, 30℃ 振荡培养 16 小时,

离心收集菌体, 无菌水洗涤二次, 悬浮于生理盐水中, 取 0.1ml 菌液涂布于 YNB (+trp +his+leu)、YNB (+trp+his)、YNB (+trp+leu) 及 YNB (+his+leu) 平板上, 28℃ 培养 4 天, 用 n-1 生长图型法测定出菌落的营养要求。

将检验过营养要求的单菌落接种于低 Pi 的 YNB (+trp+his+leu) 平板上, 30℃ 培养 3 天后, 用菌落染色法证明其无抑制酸性磷酸酶活性。将此菌扩大培养, 涂布于低 Pi YNB (+trp+his+leu) 和 YNB (+his+leu) 平板上, 30℃ 培养 4 天后, 计算菌落数和 trp 基因自发恢复突变率。

1.4 酵母菌转化子可抑制酸性磷酸酶 (rAPase) 活性的定性、定量检测

参见文献 [11]。

1.5 DNA 片段测序

参见文献 [12]。将重组质粒 DNA 用 EcoR I、BamH I 双酶切, 将 EcoR I-BamH I 片段与同样双酶切的 M13mp19 DNA 连接, 转化 *E. coli* JM101, 在含 X-gal、IPTG 的平板上挑出无色的噬菌斑, 提取单链 DNA, 由 ABI370A 自动测序仪测序。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒的构建

构建的重组质粒见图 1, 其中含有 PGK1 基因的启动子片段。

2.2 受体酵母菌的检测

受体菌 NA87-11A 经单菌落纯化后, 在 YNB 选择培养基上测定其营养要求; 用菌落染色法测定其可抑制酸性磷酸酶活性, 证明 NA87-11A 为 trp、his、leu、pho5 缺陷型。trp 基因自发恢复突变率为 $0.5-1.0 \times 10^{-7}$, 证明此菌适于作为受体。

2.3 酵母菌 PGK 基因 5' 端非编码区片段的亚克隆

2.3.1 pCN60(PGK1) 上有关酶切位点的确定: 已知 pCN60(PGK1) 上具有一个 BamH I 和 Kpn I 位点; 3 个 EcoR I 和 Hind III 位点, 它们在质粒上位置如图 1 所示。

用碱法制备 pCN60 (PGK1) 质粒 DNA, 经 CsCl 密度梯度离心纯化后, 用 BamH I、Kpn I、EcoR I、Hind III 单酶切、双酶切及多酶切, 检验其酶切位点, 结果见图版 I-A 和 B。除证实上述酶切位点外, 还证实 pCN60 (PGK1) 由 EcoR I 酶切产生 0.5, 1.4 和 6.2kb 3 个片段; 由 BamH I + EcoR I 酶切产生 0.5, 1.4, 2.9 和 3.3kb 4 个片段; 由 BamH I + EcoR I + Kpn I 酶切产生 0.5、0.5、1.4、2.4 和 3.3kb 5 个片段, 其中 2.4kb 片段中含有 PGK 基因的启动子片段, 两头分别为 BamH I 和 Kpn I 酶切位点。

2.3.2 Bal31 酶缺失作用: pCN60 (PGK1) DNA 用 Kpn I 酶切, 然后进行 Bal31 缺失反应, 再经 BamH I 酶切, 观察到 pCN60 (PGK) 上原 2.4kb 的 BamH I-Kpn I 片段已降解为 1.9kb 左右 (图版 I-C)。这样 PGK1 基因由 Kpn I 酶切位点大约缺失 500bp。两端加上 EcoR I linker 后, 用 EcoR I 酶切, 分离 1.9kb 左右缺失片段, 即为具有启动子活性的片段。

2.4 具有强启动子功能片段的筛选和鉴定

将分离到的 1.9kb 片段插入到 pVC727 的 BamH I、EcoR I 酶切位点, 连接产物转化 *E. coli* C600, 检测证明片段插入频率为 95%。提取重组质粒 DNA, BamH I + EcoR

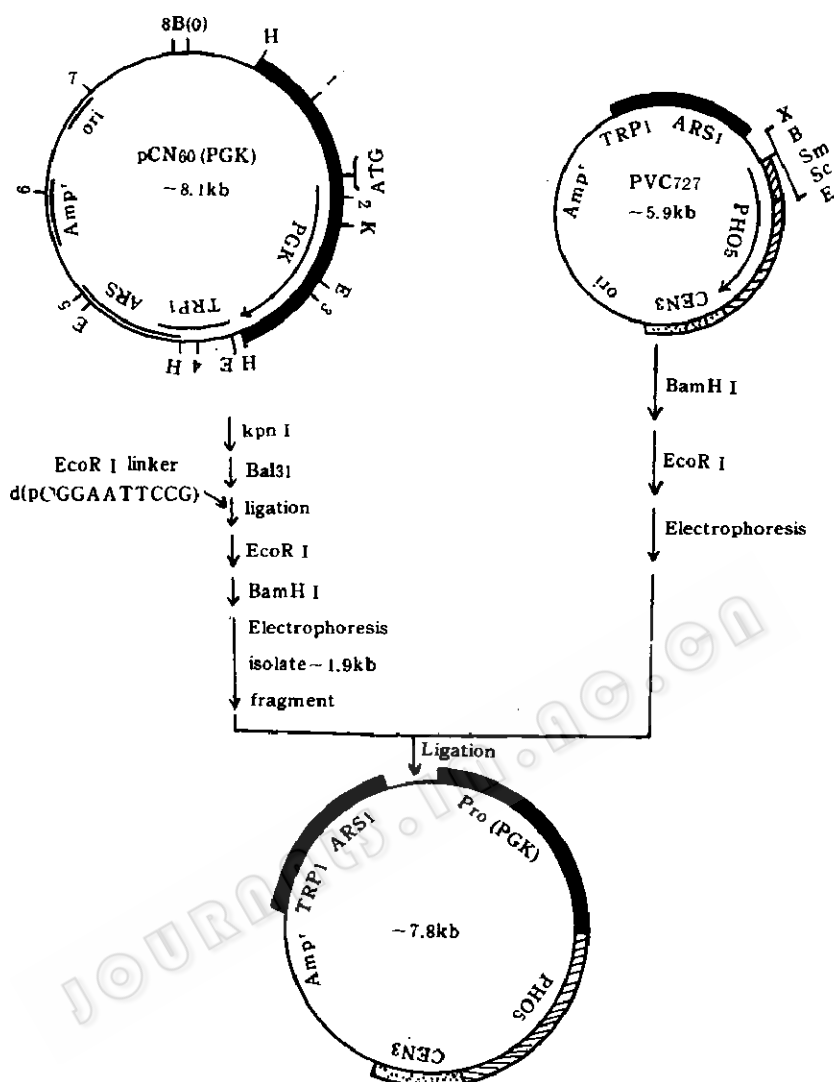


图1 含有 PGK1 基因启动子片段的重组质粒的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmids

which contain the promoter fragment of PGK gene

B=BamH I ; E=EcoR I ; H=Hind II ; K=Kpn I ;

X=Xho I ; Sm=Sma I ; Sc=Sca I .

I 酶切, 产生 5.9 和 1.9kb 2 个片段 (图版 I -D)。用此重组质粒转化受体菌 NA87-11A, 在低 Pi 的 YNB (+his+leu) 选择培养基筛选出转化子, 用菌落染色法定性检测它们可抑制酸性磷酸酶活性, 共选出 6 个活性较强转化子 (图版 I -E)。选择酶活最强的 pVC727-6 进行质粒 DNA 提取、酶切反应, 证实质粒约 7.8kb, 对 BamH I、EcoR I 均为单切点, BamH I +EcoR I 双酶切时, 同样产生 5.9 和 1.9kb 左右两个片段。

在起始细胞浓度相同情况下进行培养, 同时定量测定 rAPase 活性, 结果见图 2。各转化子酶活性差距较大, pVC727-6 最高, 这与用菌落染色法比较其相对酶活强度是一致的。

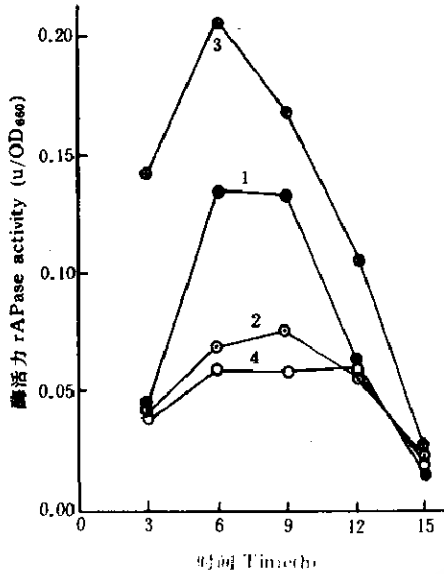


图2 DP-1 和转化子 rAPase 活性比较

Fig. 2 Comparison of rAPase activity of DP-1 and transformants

1. pVC727-1; 2. pVC727-2; 3. pVC727-6; 4. DP-1.

2.5 启动子片段的测序

pVC727-6 上启动子片段用 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 插入相应酶切的 M13mp19 DNA 中, 由 ABI370A DNA 自动分析仪读出序列 (图3)。序列前四个碱基“TCCG”为

```

*--5' TCCG  GAAAAAGAAA  GCATCTAAGA  ACTTGAAAAA  CTACGAATTA
GAAAAAGACCA  AATATGTATT  TCTTGCAATTG  ACCAATTTAT  GCAAGTTTAT
ATATATGTAA  ATGTAAGTTT  CACGAGGTTC  TACTAAACTA  AACCACCCCC
TTGGTTAGAA  GAAAAGAGTG  TGTGAGAACA  GGCTGTTGTT  GTCACACGAT
TCGGACAATT  CTGTTTGAAA  GAGAGAGAGT  AACAGTACGA  TCGAACGAAC
TTTGCTCTGG  AGATCACAGT  GGGCATCATA  GCATGTGGTA  CTAAACCCCT
TCCCGCCATT  CCAGAACCTT  CGATTGCTTG  TTACAAAACC  TGTGAGCCGT
CGCTAGGACC  TTGTTGTGTG  ACGAAATTGG  AAGCTGCAAT  CAATAGGAAG
ACAGGAAGTC  GAGCGTGTCT  GGGTTTTTTC  AGTTTTGTTC  TTTTTGGCAA
ACAAATCAG  AGCGACGGTA  ATTTCTTTCT  CGATAAGAGG  CCTCGTGCTT
T-3'--*

```

图3 pVC727 具有高启动子功能亚克隆 DNA 片段的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the subcloned DNA fragment conferring the high promoter function on pVC727.

下面划线可能是 TATA 序列, 两箭头之间区域为 PGK 上游激活序列。

Potential TATA sequences are underlined, the region between the two arrows is UAS_{PGK}.

所加 EcoR I linker 末端序列, 后边序列与文献 [13] 所报道的 PGK 5' 非编码区序列 -60—-551 区相吻合, 进一步证明 pVC727-6 所含片段确系 PGK 启动子片段。

实验设计用 Bal31 酶缺失法分离 PGK 基因启动子片段, 方法经济简便, 同时还能产生大量不同长度缺失片段以供精细遗传分析。此法缺点为 PGK 基因 ATG 上游缺失一定数目碱基对时, 对基因表达没有影响。采用 pVC727 质粒作为酵母基因启动子探针载体, 它运用编码酵母本身的 rAPase 的 PHO5 基因作为探测基因, 具有简便和基因表达对受体细胞没有毒害作用的优点。

筛选得到的 pVC727-6 所含 PGK 基因启动子片段, 其缺失点大约在 ATG 上游 -60 位碱基外, 在这种情况下, 似乎应对片段的启动子功能有较大影响。pVC727 的 PHO5 基因周围序列为 5'-GAATTCACCC ATG-3', 而添加的 EcoR I linker 和 PHO5 基因以 EcoR I 粘末端相连后, 缺失点与 ATG 间就等于加了 12 个碱基, 且 ATG 上游 -3 位保证为 A, 这样缺失片段的高启动子功能就可得以保证。因而猜想 PGK 基因中 ATG 上游几十个核苷酸序列对表达可能具有空间位置效应, 而碱基特异效应则不太强。

参 考 文 献

- [1] Bitter G A, Egan K M, *Gene*, 1984, 32 (3): 263—274.
- [2] Brint J V. *Bio/technology*, 1986, 4 (2): 1057—1062.
- [3] Barr P J, Power M D, Gibson H L *et al.* *Bio/technology*, 1987, 5 (5): 486—488.
- [4] Hitzeman R A, Leung D W, Parry L T *et al.* *Rec Adv Yeast Mol Biol*, 1982, 1: 173—190.
- [5] Fieschko J C, Egan K M, Ritch T *et al.* *Biotech Bioeng*, 1987, 29 (9): 1113—1121.
- [6] 杨艳卿, 刘玉方, 郭子剑, 等. *生物工程学报*, 1989, 5 (4): 279—283.
- [7] Hwang Y I, Harashima S, Oshima Y. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1989, 67 (1): 1—7.
- [8] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*. CSH, 1987, (a) 86—96; (b) 368—369; (c) 135—139; (d) 170; (e) 104—105, 289.
- [9] Ferguson J, Groppe J C, Reed S I. *Gene*, 1981, 16 (1): 191—197.
- [10] 毛小洪, 蔡金科. *生物工程学报*, 1990, 6 (2): 102—107.
- [11] Hwang Y I, Harashima S, Oshima Y, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 28 (1): 155—159.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning CSH*, 1989, 4: 1—4, 43.
- [13] Ogden J E, Stanway C, Kim S *et al.* *Mol Cell Biol*, 1986, 6: 4335—4343.

SUBCLONING OF THE PROMOTOR FRAGMENT OF THE YEAST 3-PHOSPHOGLYCERATE KINASE GENE (PGK1)

Liu Yufang Zhu Bangmin Cai Jinke

(Institute of Microbiology, Academia sinica, Beijing 100080)

Abstract The *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal 3.1 kb Hind III fragment, containing 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK), had been inserted into pCN60, an *E. coli*-yeast shuttle vector. The pCN60 (PGK) was digested with restriction endonuclease

Kpn I. There is no Kpn I recognition site on pCN60 and an unique recognition site on the PGK1 gene fragment, which was treated with nuclease Bal31 to remove the nucleotides from the both end, the reaction was stopped when about 500bp nucleotides are deleted from each end. The EcoR I linker (dCGGAATTCCG) was added to the ends. After digestion of the product with EcoR I + BamH I, about 1.9kb fragments were isolated and ligated to the plasmid pVC727, a promotor probe vector, which had been digested with the same enzymes. The mixture of ligation was used to transform *E. coli* C600. The recombinant plasmids were isolated from transformants and were used to transform the yeast *S. cerevisiae* NA87-11A. The yeast transformants which had the high expression of PHO5 gene were selected by the colony stain method. The recombinant plasmid in the transformant contains an about 1.9kb fragment which has the function of strong promotor and can be cut off by digestion with BamH I + EcoR I, the 3'-flanking sequence of this fragment was analysed.

Key words PGK1 gene, Promotor, Subcloning

图版说明

Explanation of plate

- A. pCN60 (PGK) 内切酶酶切; B. pCN60 (PGK) 内切酶酶切;
 C. 线性 pCN60 (PGK) Bal31 酶解; D. 重组质粒 DNA 酶切;
 E. 酿酒酵母 DP1 与转化子 rAPase 活性比较, 中间为 DP1, 其余是转化子。
- A. Digestion of pCN60 (PGK) with restriction endonucleases.
 1, 6. SPP I /EcoR I; 2. pCN60 (PGK) /Kpn I; 3. pCN60 (PGK) /Kpn I + BamH I;
 4. pCN60 (PGK) /Kpn I + Hind II; 5. pCN60 (PGK) /BamH I.
- B. Digestion of pCN60 (PGK) with restriction endonucleases.
 1, 6. SPP I /EcoR I; 2. pCN60 (PGK) /Kpn I; 3. pCN60 (PGK) /Kpn I + Hind II;
 4. pCN60 (PGK) /BamH I + EcoR I; 5. pCN60 (PGK) /EcoR I + Kpn I.
- C. Digestion of linear pCN60 (PGK) with Bal31.
 1, 5. SPP I /EcoR I; 2. 8min; 3. 7 min and 30 sec. 4. 7 min.
- D. Digestion of pVC727-6 with restriction endonucleases.
 1, 5. SPP I /EcoR I; 2. pVC727-6/BamH I; 3. pVC727-6/BamH I + EcoR I. 4. pVC727-6/EcoR I.
- E. Contrast the transformants with *S. cerevisiae* DP1 for their rAPase activity. The central one is DP1, others are transformants.