

扣囊拟内孢霉 α -淀粉酶基因的克隆和 在酿酒酵母中表达*

刘玉方 陈玉梅 蔡金科

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 以穿梭质粒 pCN60 为载体, 大肠杆菌 C600 为受体构建了扣囊拟内孢霉 (*Endomycopsis fibuligera*) G45 Sau 3A 基因文库。从基因文库中提取重组质粒 DNA 并转化酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) BJ1991, 选出四个具有 α -淀粉酶活性的转化子, 琼脂糖凝胶电泳结果证实插入的 DNA 片段为 7.0kb。对插入 DNA 片段亚克隆, 确定 α -淀粉酶基因位于 PstI-SalI 3.9kb 片段上, 启动子位于 PstI-EcoRI 的 1.3kb 片段上。用亚克隆 PGK1 1.9kb 片段置换 α -淀粉酶启动子区, 其转化子的 α -淀粉酶活性有明显提高。

关键词 扣囊拟内孢霉, α -淀粉酶, 亚克隆, 基因表达

酿酒酵母是发酵工业中的重要生产菌, 但它不具备合成淀粉水解酶的能力, 因此只能利用单糖和双糖生长和发酵。至今酵母发酵工业中若以淀粉为原料时, 都必需先进行液化、糖化, 然后才能用于酵母发酵。用微生物遗传操作技术, 将外源淀粉水解酶基因克隆到工业用酿酒酵母中, 选育出优异的水解淀粉酵母工程菌, 将对酵母发酵工业带来突破性进展。

将扣囊拟内孢霉的淀粉水解酶基因克隆到酿酒酵母中, 对基因酶切图谱进行了分析, 然后用酵母菌 PGK1 启动子区置换原淀粉水解酶基因的启动子区, 使淀粉水解酶基因的表达有明显的提高。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

E. coli C600, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1412-4D (a ade1 leu1 trp1 gal1), BJ1991 (α pep4-3 ura3 leu2 trp1 gal2); 扣囊拟内孢霉 (*Endomycopsis fibuligera*) G45, 以上菌株均为本组保藏。pCN60 和 pVC727(PGK) 质粒均为本组构建^[1,2]。

1.2 培养基

LB 培养基: 大肠杆菌完全培养基; YEPD 培养基: 酵母菌完全培养基; YNB 培养基: 酵母菌基本培养基, 可加必要的营养源供分离测定用; YPS 培养基: 发酵培养基; YPSB 培养基: YPS 培养基加上溴甲酚紫, 测定淀粉酶水解淀粉用。

1.3 酶和试剂

EcoRI, BamHI 和 T4 DNA 连接酶为中国科学院生物物理研究所生化试剂厂产品;

* 国家自然科学基金资助项目。
本文于 1994 年 9 月 13 日收到。

其余内切酶和 CIP 为 Promega 公司产品;氨基青霉素、四环素和氯霉素购自卫生部药品生物制品检定所。

1.4 DNA 提取和纯化

1.4.1 C600(pCN60)质粒提取和纯化: 按 Sambrook 等人^[3a]方法进行。

1.4.2 G45 染色体 DNA 制备: 基本按 Cryer^[4] 方法。

1.5 酵母菌基因文库的构建

1.5.1 载体 DNA 制备: 纯化的 pCN60 质粒 DNA, 用 BamHI 酶切, 为防止连接时的自身环化, 用 CIP 进行脱磷酸化处理^[3b]。

1.5.2 5~9kb 染色体 DNA 片段的分离: 纯化后的 G45 染色体 DNA 经 Sau3A 酶切, 5%~35% 蔗糖密度梯度离心, 分离富集所需 5~9kb 片段^[3c]。

1.5.3 DNA 片段连接: 按文献 [3d] 进行。

1.5.4 大肠杆菌转化: 按文献 [3e] 进行; 酵母菌转化按毛小洪^[5]报道的方法进行。

1.6 转化子筛选和鉴定

pCN60 在四环素抗性基因上有单一的 BamHI 酶切位点, 并且带有 trp1 基因, 经 BamHI 酶切后, 与自 G45 分离纯化的 5~9kb DNA 片段连接构建的 pCN60(G45) 杂种质粒具有 trp1 营养选择标记和 Ap^r Tet^r 抗性选择标记。提取 pCN60(G45) 质粒 DNA, 转化 *E. coli* C600 得到的转化子应具有 Amp^r Tet^r 的特性。琼脂糖凝胶电泳检测经 BamHI 酶切质粒 DNA, 其片段大小应与杂种质粒组成相一致。提取杂种质粒 DNA 转化酵母菌 BJ1991, 测定转化子的交配型和培养要求, 然后将菌落点于 YPSB 平板上, 于 28℃ 培养 6d 后, 将平板置于 4℃ 过夜, 分泌的胞外淀粉水解酶在菌落四周形成晕圈。无细胞培养液中胞外酶测定用杯碟法。

1.7 α -淀粉酶活性测定

α -淀粉酶活性测定按文献[6]方法进行。

1.8 α -淀粉酶基因片段的酶切图谱

将水解酶基因 DNA 分别用 EcoRI、HindIII、KpnI、PstI 和 Sall 进行单酶切和复合酶切, 琼脂糖凝胶电泳测定各片段大小, 然后确定其连接顺序, 将各大片段进行亚克隆, 确定 α -淀粉酶基因的位置和长度。

1.9 用 PGK1 启动子区置换原启动子区

将 pVC727(PGK1) 质粒 DNA 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切, 分离 1.9kb PGK1 基因片段, 与用相同双酶切的 pCN60(G45) 质粒 DNA 连接, 构建成具有 PGK1 启动子和 α -淀粉酶基因片段的杂种质粒 pGA。

2 结果和讨论

2.1 酵母菌基因文库的构建

pCN60 DNA 的 BamHI 酶切位点插入 5~9kb G45 染色体片段, 构建 pCN60(G45) 杂种质粒, 它具有 Amp^r Tet^r 的抗性选择标记和 trp1 营养选择标记。基因文库的构建如图 1 所示。用 pCN60(G45) 质粒 DNA 转化 *E. coli* C600, 共得到 Amp^r Tet^r 转化子约 4 万个, 测得片段插入频率为 85%。从文库中提取总质粒 DNA 转化酿酒酵母 BJ

1991,得到了约 3.5 万个转化子,转化频率最高为 $3.0 \times 10^3/\mu\text{gDNA}$ 。

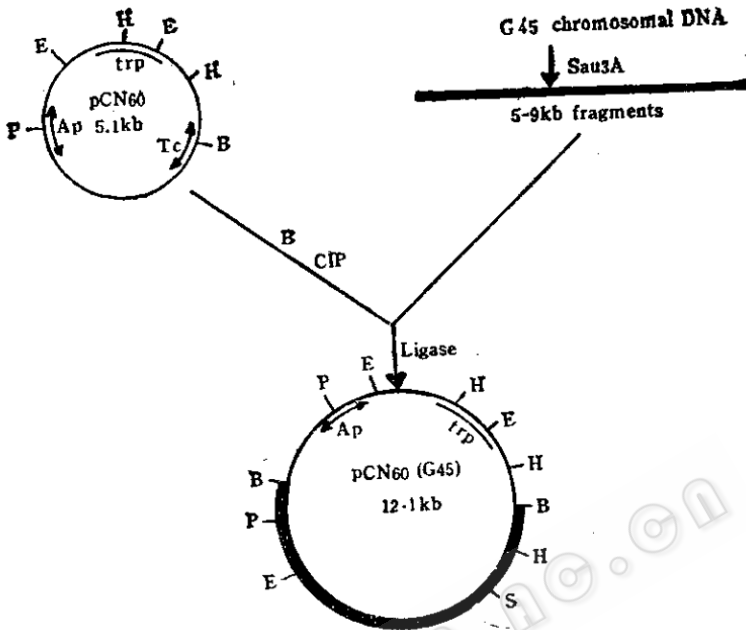


图 1 扣囊拟内孢霉 G45 基因文库的构建

Fig. 1 Construction of genomic library of *Endomyces fibuliger* G45
H = HindIII, B = BamHI, E = EcoRI, K = KpnI, P = PstI, S = Sall.

2.2 α -淀粉酶基因转化子的筛选和鉴定

用淀粉水解圈法测得 4 个 α -淀粉酶基因的阳性转化子(图 2)。对 4 个转化子进行交配型和营养要求检测,表明转化子均为 (α ura leu gal Trp⁺) 基因型。提取 pCN60(G45) 质粒 DNA, 经 BamHI 酶切,琼脂糖凝胶电泳测定其片段大小,证实 pCN60(G45) 是

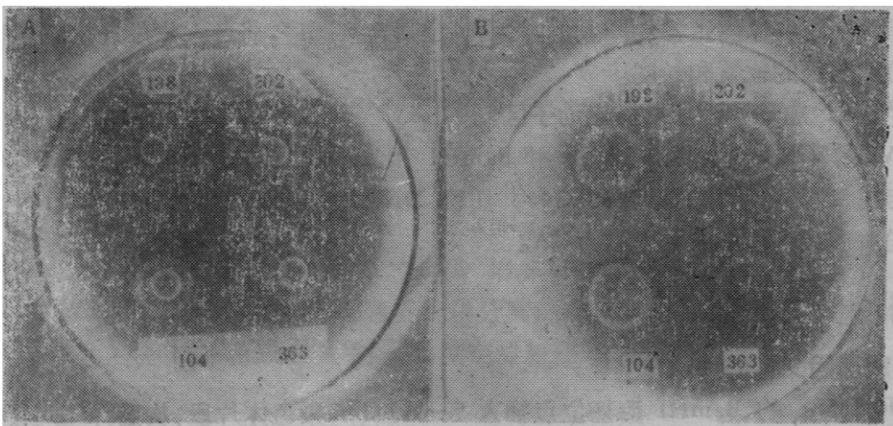


图 2 酵母菌转化子 α -淀粉酶活性

A: 转化子; B: 转化子无细胞培养液。

Fig. 2 α -amylase activity of yeast transformants
A: Transformants; B: Cell-free culture fluid.

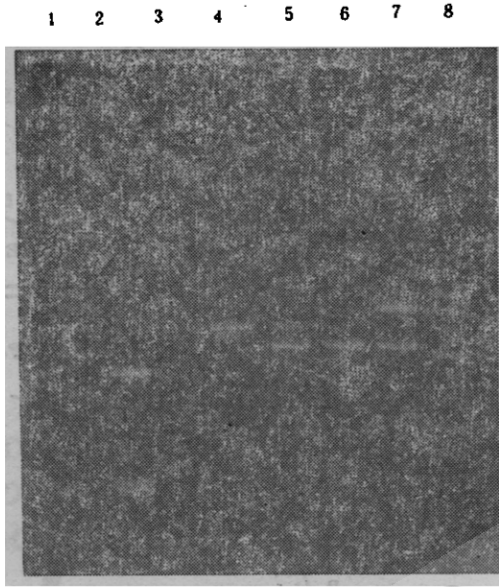
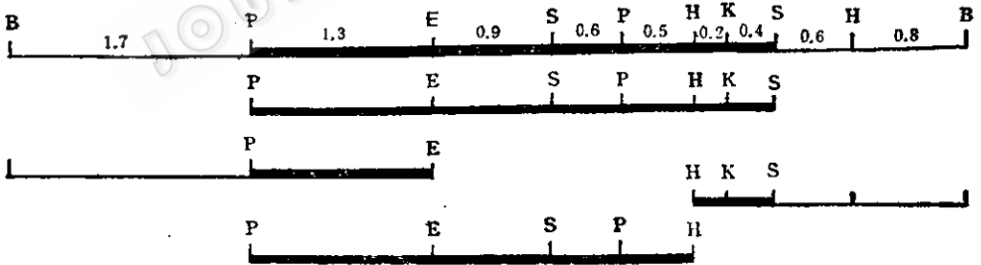


图 3 质粒 DNA 的酶切分析

Fig. 3 Analysis of plasmids DNA digestion

1,8. *sppl*/EcoRI; 2. pCA/BamHI + EcoRI; 3. pCA/BamHI; 4. pCA/EcoRI.
5. pGA/BamHI; 6. pCN60/BamHI; 7. pCN60(G45)/BamHI.

由 pCN60 插入了一个 7.0kb 的 DNA 片段 (图 3)。再提取这 4 个阳性转化子质粒 DNA, 转化 BJ1991, 得到的转化子全为阳性。

图 4 插入的 α -淀粉酶基因片段的酶切图Fig. 4 Restriction maps of the inserted DNA segments of α -amylase gene

2.3 α -淀粉酶基因 DNA 片段的酶切图谱和启动子区置换

带有 α -淀粉酶基因 DNA 片段酶切图谱见图 4。

亚克隆证实基因位于 PstI-SalI 的 3.9kb 片段上, 去掉 PstI-EcoRI 的 1.3kb 片段后淀粉酶不能表达, 而将 PGK1 亚克隆的 1.9kb 片段置换 PstI-EcoRI 片段后, 具有 α -淀粉酶活性, 证明 α -淀粉酶基因的启动子区位于 PstI-EcoRI 片段上。置换后的杂种质粒 pGA 带有 PGK1 启动子和 α -淀粉酶基因 (图 5)。

2.4 α -淀粉酶活性的测定

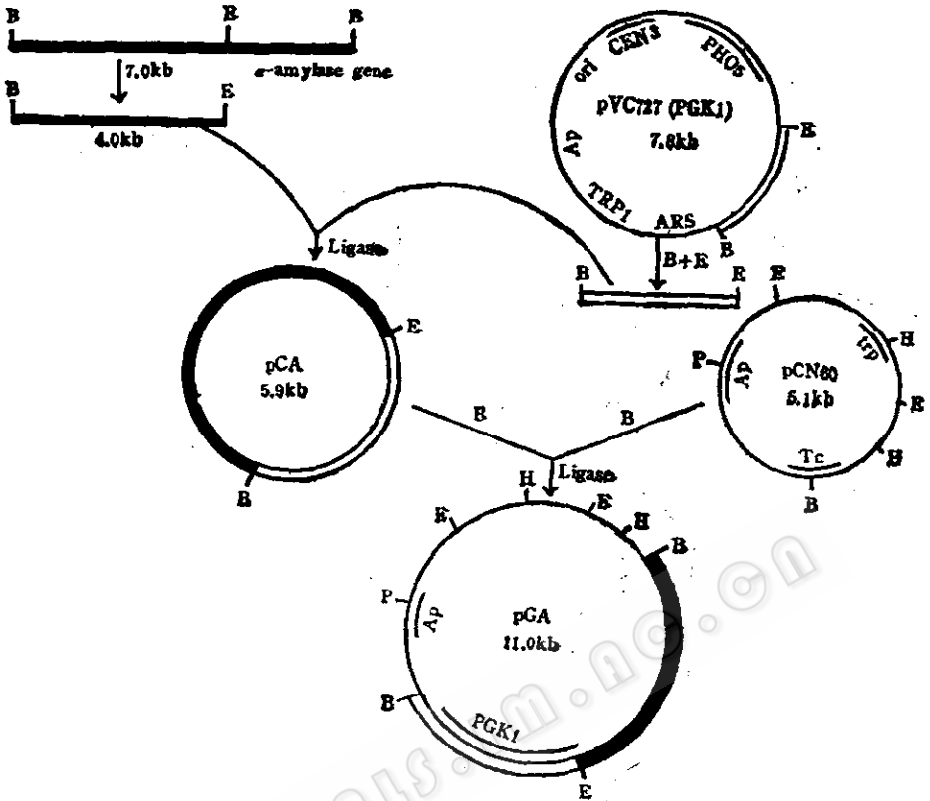


图 5 pGA 表达载体的构建

Fig. 5 Construction of pGA expression vector

用文献[6]方法在同样条件下测定了 pCN60(G45)、G45 及 pGA198 三株菌 α -淀粉酶活性(表 1)。用强启动子 PGK1 置换 α -淀粉酶基因的原启动子后, α -淀粉酶基因的表达有较大提高。

表 1 不同菌株 α -淀粉酶的活性

Table 1 α -amylase relative activity of strains

菌株 Strains	G45	pCN60(G45)	pGA198
相对活性(%) Relative activity	100	82	292

α -淀粉酶基因表达产物中不是单一的 α -淀粉酶,同时也有少量糖化酶。用杯碟法在 YBPS 平板上测定酶活时,由于表达主要产物是 α -淀粉酶,因此所形成的晕圈清晰透明,而糖化酶形成的晕圈有点浑浊,表现不出来。当用标准的 Somogyi-Nelson 法^[7]测定糖化酶的活性时,证明基因表达产物中确实有糖化酶的存在。

外源基因在酵母中的表达和调控是复杂的生物工程系统,影响其表达的因素很多,而选择一个强的启动子构建高效表达载体是提高外源基因产物产量的最重要因素之一,我

们的上述研究已清楚地证明了这一点。

参 考 文 献

- [1] 倪 津, 刘玉方, 蔡金科. 微生物学报, 1986, 26(2): 127~133.
- [2] 刘玉方, 朱邦民, 蔡金科. 微生物学报, 1995, 35(1): 21~27.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed. CSH; CSH Lab Press, 1989. (a) 1.38~1.39; (b) 3.38~3.39; (c) 2.85~2.89; (d) 1.68~1.69; (e) 1.76~1.81.
- [4] Cryer D R, Eccleshall R, Marmur J. *Methods in Cell Biology*, 1975, 12:39~44.
- [5] 毛小洪, 蔡金科. 生物工程学报, 1990, 6(2): 102~107.
- [6] Fuwa H. *J Biochem*, 1954, 41:583~603.
- [7] Tamaki H. *Ann Rep Studies, Doshisha Women's College*, 1980, 31:166.

CLONING AND EXPRESSION OF THE α -AMYLASE GENE OF *ENDOMYCOPSIS FIBULIGERA* G45 IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Liu Yufang Chen Yumei Cai Jinke

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract *Endomycopsis fibuligera* G45 genomic library was established in *E. coli* C600 with *E. coli*-yeast shuttle plasmid vector pCN60. Four transformants with amylolytic enzyme activity were screened by transforming recipient strain *S. cerevisiae* BJ1991 with the hybrid plasmid from the genomic library. Gel electrophoresis results showed that the size of the inserted DNA fragments was 7.0kb. Subcloning of the inserted DNA fragments showed that the cloning gene was located in the PstI-SalI 3.9kb fragments, the promoter region was in the PstI-EcoRI 1.3 kb fragments. By replacement of the promoter of the amylolytic enzyme with a strong promoter PGK1 (1.9kb) fragment, the amylolytic enzyme activity was higher than that of the original transformants (pCN60(G45)).

Key words *Endomycopsis fibuligera*, α -amylase, Subcloning, Gene expression