

酵母绿色荧光蛋白报告载体的构建及其在过氧化物酶体研究中的应用

郑桂珍 赵颖 戴梦 刘静 王富强*

(华北制药集团新药研究开发有限责任公司 石家庄 050015)

摘要:以载体 pYES2 为基础,构建了酵母表达载体 pYES2G,该载体含有融合了过氧化物酶体定位信号 I(PTS1)的绿色荧光蛋白报告分子 GFP-SKL 编码基因,该基因以酵母 TEF1 启动子启动。pYES2 转化研究表明,在野生型酵母 INVSc1 中,GFP-SKL 蛋白在细胞中呈点状聚集,而在酵母 PEX5p 缺陷菌株 ATCC4003603 中,荧光为弥散状,证明报告分子 GFP-SKL 可通过 PEX5p 蛋白有效定位到过氧化物酶体。在载体 pYES2G 的多克隆位点分别连入酵母及产黄青霉 PEX5p 编码基因得到载体 pYES2G/ScPEX5 和 pYES2G/PcPEX5,转化酵母 ATCC4003603,荧光均呈聚集状,证明外源 PEX5p 基因的表达恢复了缺陷菌株的功能。pYES2G 载体为真菌过氧化物酶体相关基因的功能研究提供了直观有效的方法。

关键词:绿色荧光蛋白 过氧化物酶体 酵母

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)04-0702-04

过氧化物酶体(peroxisome,亦称微体)是由单层膜包被的异质性细胞器,存在于多数真核生物中,其中含有多种酶类,是进行脂肪酸 β -氧化,过氧化物分解等重要生理过程的细胞器。另外,过氧化物酶体还参与了众多的生理反应,包括哺乳动物中脂类及胆固醇的合成,发芽种子中的乙醛酸循环和叶子中的光呼吸作用,锥虫中的糖酵解途径;一些酵母中的甲醇及胺的氧化途径等等^[1]。在青霉素生产菌——产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)中,青霉素生物合成的最后一步在过氧化物酶体中完成^[2],而且细胞中过氧化物酶体的数量与青霉素的产量呈正相关^[3]。

过氧化物酶体生物合成(biogenesis)需要众多的蛋白,称为 peroxin,其编码基因以 *pex* 命名。大部分 peroxin 的作用是在细胞质中合成的,含有过氧化物酶体定位信号(peroxisomal targeting signal,PTS)的酶运入过氧化物酶体。已经鉴定的 PTS 有 2 种:PTS1,一般在蛋白的 C 端含有(S/C/A)(K/R/H)X(L/M)的保守三肽,其识别受体为 PEX5p;PTS2,识别信号为(R/K)X(L/V/I)X(XXXXX)X(H/Q)X(L/A/F),位于蛋白的 N 端,受体为 PEX7p^[1]。目前克隆的 *pex* 基因已经超过了 30 个^[4]。

过氧化物酶体的功能和生物合成在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的研究最为透彻,很多 *pex* 基因都存在酵母缺陷型,因此人们多利用酵母对其它生物过氧化物酶体相关蛋白的功能进行验证,但需要合适的报告分子。

来自水母(*Aequorea victoria*)的绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)具有在水母以外的生物体中发出荧光的能力,常被用做分子标记来确定细胞的生长情况、基因表

达和蛋白定位等,已被用于细菌、酵母、线虫、斑马鱼、植物及哺乳动物细胞等多种生物的研究^[5]。本研究利用 GFP 作为报告分子,在其 C 端融合了过氧化物酶体 PTS1 的识别序列 SKL,得到人造蛋白 GFP-SKL,并通过转化酵母 PEX5p 缺陷菌,验证了该报告分子在过氧化物酶体研究中作用,从而为过氧化物酶体相关蛋白深入研究提供了直观方便的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体:大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 为本实验室保存,酿酒酵母表达宿主 INVSc1(MATa *his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52/MAT α his 3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52*)购自美国 Invitrogen 公司,酿酒酵母 *pex5* 缺陷型菌株 ATCC4003603(MATa *pex5 Δ ::kanMX4 his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*)购自 ATCC^[6],载体 pYES2、pEGFPN1、pPICZA 为 Invitrogen 公司产品,克隆载体 pGEM-T EASY、pGEM-T 为 Promega 公司产品。

1.1.2 试剂和仪器:各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶及牛小肠碱性磷酸酶均为 Promega 公司产品。无氨基酸酵母氮源(yeast nitrogen base)为 Difco 公司产品。DNA 凝胶回收试剂盒和连接试剂盒分别购自 BIOBASIC 和 TaKaRa 公司。PCR 仪为 ABI 9600。电转仪 Gene Pusler II 为美国 Bio-Rad 公司产品。Olympus BX50 显微镜用于荧光观察。

1.2 引物设计

根据 pEGFPN1、pPICZA 质粒序列及酵母、产黄青霉相应的基因序列分别设计下列引物,由上海生工生物工程技术服务

基金项目:国家科技攻关计划(2002BA711A16),国家“863 计划”(2003AA001005)

* 通讯作者。Tel:86-311-85992744 Fax:86-311-86676507 E-mail: wangfuqiang@ncpcrd.com.cn

作者简介:郑桂珍(1975-),女,河北人,工程师,硕士,研究方向为微生物功能基因组学及基因工程育种。E-mail: zhenggz@yaho.com.cn

收稿日期:2006-11-20 接受日期:2006-12-21 修回日期:2007-02-01

务有限公司合成。引物序列分别为, P1: 5'-ATCGATCCCCACACACCATAGCTT-3'(引入 *Cla* I 酶切位点), P2 5'-GTCGACGCCATGGTTTATGTTCTCAG-3'(引入 *Sal* I 酶切位点), P3: 5'-GTCGACCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'(引入 *Sal* I 酶切位点), P4: 5'-CCGCGGTTATAATTTGGACTTGTACAGCTCGTCC-3'(引入 *Sac* II 位点和 SKL 编码序列), P5 5'-CCGCGGCTGACAGTCCGACGG-3'(引入 *Sac* II 酶切位点), P6: 5'-ATCGATTCAGCTTGCAAATTTAAA-3'(引入 *Cla* I 酶切位点), P7: 5'-ATGGACGTAGGAAGTTGCTCAG-3', P8: 5'-TCAAAAACGAAAATTCTCTTTAAATC-3', P9: 5'-TCAAATGATACATGTTGCCACTTG-3', P10: 5'-CTAGAATTCGAACTCCTTCCGGAAG-3'。

1.3 含有启动子和终止子的 GFP-SKL 的克隆

酵母 TEF1 启动子和 CYC1 基因终止子 *cyc1TT*, 分别以 P1/P2、P3/P4 为引物, 从质粒 pPICZA 中 PCR 克隆。反应条件 95°C 5min; 94°C 1min; 60°C 1min; 72°C 2min, 30 个循环; 72°C 7min。含过氧化物酶体 PTS1 识别序列 SKL 的 GFP-SKL, 以 pEGFPN1 为模板, 以 P5/P6 为引物 PCR 扩增得到, 反应条件同上。PCR 产物分别连接到 pGEM-T 载体上, 利用引物两端引入的限制性内切酶位点将 3 个片段分别切下、回收, T4 连接酶连接过夜, 然后以连接产物为模板, 以 P1/P6 为引物进行 PCR, 扩增得到片段 PGT, 克隆于 pGEM-T EASY。PCR 反应条件 94°C 5min; 94°C 1min; 60°C 1min; 72°C 1.5min, 进行 35 个循环, 72°C 7min。

1.4 含有报告基因 GFP-SKL 的酵母表达载体的构建

将克隆到 pGEM-T EASY 上的 PGT 用 *Cla* I 酶切下, 回收, 补平; 同时 pYES2 载体用 *Swa* I 酶切, 去磷酸化, 然后连接 PGT 和 pYES2, 得到载体 pYES2G。

以酵母 *INVScl* 基因组为模板, 以 P7/P8 为引物, PCR 克隆酵母 *pex5* 基因的 ORF。反应条件 95°C 5min; 94°C 1min, 62°C 1min; 72°C 2.5min, 30 个循环, 72°C 10min。将 *Scpex5* 克隆到 pGEM-T EASY 载体上, 测序验证后, 用 *Not* I 切下, 连接到上述 pYES2G 载体的 *Not* I 位点, 得到载体 pYES2G/*ScPEX5*。

同上, 根据报道的产黄青霉 *pex5* 基因编码序列^[7], 以产黄青霉 cDNA 为模版, 以 P9/P10 为引物, PCR 克隆得到产黄青霉 *Pcpex5* 基因的 ORF, 连接到 pYES2G *Not* I 位点, 得到载体 pYES2G/*PcPEX5*。

1.5 酵母转化

酵母转化采用电转法。接种酵母菌株于 40mL YPD 培养基中, 30°C 培养至 OD_{600} 1.0 左右, 离心收集菌体。20mL 水洗一次, 加入 4mL 电转缓冲液 [0.3mmol/L Na_2HPO_4 , 10% (W/V) 甘油], 冰上放置 5min, 离心, 细胞重悬于 0.4mL 电转缓冲液, 取 25 μ L 转移至 0.2cm 电转杯中, 加入 1 μ g 质粒 DNA, 冰上放置 20min, 转化条件为 0.4kV、10 μ F、200 Ω 。转化细胞加入电转缓冲液稀释, 涂布于 SC 选择培养基平板 (0.67% 酵母氮源, 2% 葡萄糖, 2% 琼脂, 添加除尿嘧啶外各种氨基酸), 30°C 培养至菌落长出。

1.6 绿色荧光蛋白的检测

从平板上挑取单菌落到液体 SC 选择培养基中, 30°C 培

养过夜, 取 1/2 菌液, 水洗 3 次, 转到 SC 诱导培养基 (以 2% 的半乳糖代替葡萄糖为唯一碳源) 中, 继续培养 20h。收集诱导和未诱导的菌体, 水洗 3 次, 加入等体积 2% 的低熔点琼脂糖, 混匀, 加到 50°C 预热的载玻片上, 封片, 暗处放置 5min, 在荧光显微镜下镜检, 拍照。

2 结果

2.1 含报告基因 GFP-SKL 的酵母表达载体的构建

本研究中, GFP 基因来自于哺乳动物表达载体 pEGFPN1。通过 PCR, 在 C 末端引入 PEX5p 识别信号 SKL 的编码序列, 得到 GFP-SKL。在其 5' 端连接酵母 TEF1 (*Transcription elongation factor1*) 启动子, 在 3' 端连接了酵母 CYC1 基因的终止子 *cyc1TT*, 得到 GFP-SKL 表达盒 PGT。

将 PGT 连接到酵母表达载体 pYES2 的 *Swa* I 位点, 得到酵母绿色荧光蛋白报告载体, 定名为 pYES2G, 该载体的大小为 7437bp (图 1)。在该载体中, 需要验证功能的外源基因可以方便地连到多克隆位点, 在 GAL 启动子作用下进行有效表达, 2 μ 复制子可保证载体在酵母中正常复制。

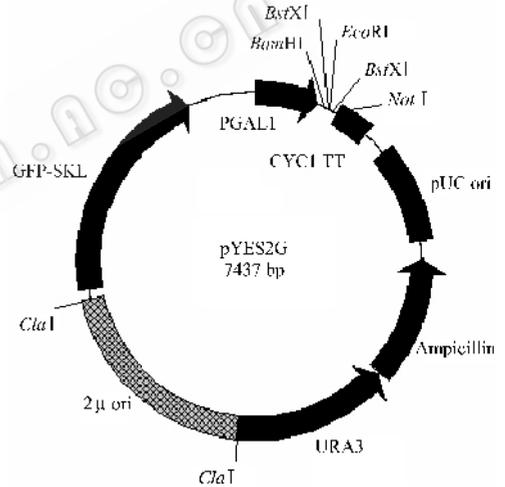


图 1 载体 pYES2G 结构图

Fig. 1 Structure of vector pYES2G.

2.2 pYES2G 载体的转化研究

为研究 pYES2G 载体中 GFP-SKL 的表达及定位情况, 对该载体进行了酵母的转化研究。因为 GFP 报告基因融合了酵母过氧化物酶体 PEX5p 蛋白的识别信号 SKL, 所以转入酵母后 GFP-SKL 蛋白应该定位到过氧化物酶体中。将 pYES2G 载体转入酿酒酵母 *INVScl* 菌株, 荧光显微镜观察, 荧光呈点状聚集 (图 2-A), 显示 GFP-SKL 蛋白在细胞中能够定位。

为了进一步验证这一功能, 我们选择了酵母 PEX5p 缺陷菌株 ATCC4003603 作为转化的受体菌。同时, 在 pYES2G 载体多克隆位点分别连入酵母和产黄青霉的 *pex5* 基因, 得到载体 pYES2G/*ScPEX5* 及 pYES2G/*PcPEX5*。将质粒 pYES2G、pYES2G/*ScPEX5*、pYES2G/*PcPEX5* 分别转入 ATCC4003603, 结果与预期相同, 由于 ATCC4003603 缺失了 PEX5p 蛋白的功能, 使得 GFP-SKL 蛋白不能运输到过氧化物酶体中, 而是存在于细胞质中, 从而在 pYES2G 的转化菌株中出现弥散的绿色荧光 (图 2-B), 而转入 pYES2G/*ScPEX5* 和 pYES2G/*PcPEX5*

的菌株, 荧光呈点状的聚集(图 2-C, D), 表明外源的 PEX5p 蛋白使缺陷菌株的功能得到恢复, GFP-SKL 蛋白定位到过氧化物酶体。

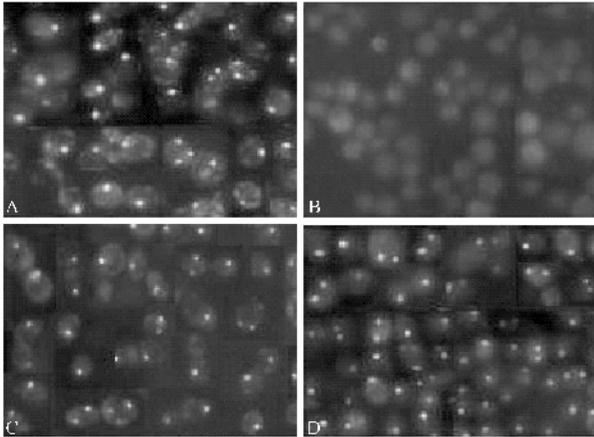


图 2 转化酵母细胞中绿色荧光蛋白的检测

Fig. 2 Observation of GFPs in yeast transformants. (A) Cells of INVSc1 transformed with vector pYES2G display a punctate fluorescence pattern, showing transport of GFP-SKL to peroxisome; (B) Cells of ATCC4003603 transformed with vector pYES2G show a diffuse fluorescence pattern because of cytosolic localization of GFP-SKL; (C, D) Cells of ATCC4003603 transformed with vector pYES2G/ScPEX5 and pYES2G/PcPEX5, respectively. The fluorescence pattern is similar to that observed in A, suggesting ATCC4003603 was complemented by ScPEX5p and PcPEX5p.

3 讨论

绿色荧光蛋白作为报告分子得到广泛的应用。在蛋白的定位研究中, 以 GFP 为融合蛋白的载体许多已商品化(如 Clontech 公司的系列载体), 但这些载体多为哺乳动物细胞专用。在过氧化物酶体的研究中, 研究者构建了多种融合了过氧化物酶体定位识别信号 PTS1 或 PTS2 的 GFP 人造蛋白, 用于动物、植物、微生物的过氧化物酶体研究。如在哺乳动物过氧化物酶体研究方面, 利用 GFP-PTS1 的过氧化物酶体定位功能来筛选过氧化物酶体合成缺陷细胞株^[8, 9]及考察过氧化物酶体在细胞周期中的动态变化^[10]、空间分布及过氧化物酶体与微管的关系^[11]。在植物细胞过氧化物酶体多态性、运动及增殖机制研究中 GFP-PTS 标记分子也起了很大的作用^[12-14]。酵母作为最简单的真核生物, GFP-PTS 也最早用来对其过氧化物酶体进行标记^[15, 16]。

在含有报告分子 GFP-PTS 的酵母载体构建过程中, 各研究者不尽相同, 使用了不同的载体骨架和启动子, 如在 PEX11、PEX13 的研究中, 以载体 pRS316 为基础, 以 PGK1 作为 GFP-SKL 的启动子^[17], 载体 Yep352 中, 启动子 MLS1 被用于酵母 PEX14p^[18]及烟草(*Nicotiana tabacum*) PEX5p^[19]的研究。我们构建的载体以 pYES2 为基础, 使用强启动子 TEF1 和终止子 *cycTT1*, 使 GFP-SKL 有较强的表达, 易于检测。通过转化 pYES2G、pYES2G/ScPEX5 和 pYES2G/PcPEX5 到酵母 PEX5p 缺陷菌, 证明该载体表达的 GFP-SKL 确有过氧化物酶体定位功能。

在产黄青霉中, 过氧化物酶体是青霉素生物合成场所, 催化侧链交换形成青霉素的酰基辅酶 A: 异青霉素 N 酰基转移酶定位于过氧化物酶体, 其 C 端具有保守的 PTS1 序列 A-R-L。另一些与青霉素生物合成有关的酶, 如参与青霉素侧链前体苯乙酸活化的苯乙酸 CoA 连接酶 Phl 同样含有过氧化物酶体定位信号序列 S-K^[20]。进一步的研究证明, 产黄青霉细胞中过氧化物酶体的数量与青霉素的产量呈正相关^[3]。因此, 过氧化物酶体成为影响青霉素产量的重要因素。但在产黄青霉中, 过氧化物酶体合成相关基因研究的还很少, 迄今只有 4 个 peroxin 编码基因被克隆^[21, 22]。随着分子生物学的发展, 深入研究产黄青霉过氧化物酶体合成相关基因, 将为菌种改良提供新的思路。

pYES2G 载体为产黄青霉等真菌过氧化物酶体合成及相关转运蛋白的研究提供一种简便直观的方法, 为从过氧化物酶体出发对菌种进行优化打下良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Purdue PE, Lazarow PB. Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, **17**: 701 - 752.
- [2] Brakhage AA. Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3): 547 - 585.
- [3] Muller WH, Bovenberg RA, Groothuis MH, *et al.* Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1116**(2): 210 - 213.
- [4] Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, *et al.* Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal integral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**(2): 665 - 677.
- [5] Cubitt AB, Heim R, Adams SR, *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**(11): 448 - 455.
- [6] Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, *et al.* Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, **285**(5429): 901 - 906.
- [7] Kiel JA, van den Berg M, Bovenberg RA, *et al.* *Penicillium chrysogenum* Pex5p mediates differential sorting of PTS1 proteins to microbodies of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Fungal Genet Biol*, 2004, **41**(7): 708 - 720.
- [8] Ghaedi K, Kawai A, Okumoto K, *et al.* Isolation and characterization of novel peroxisome biogenesis-defective Chinese hamster ovary cell mutants using green fluorescent protein. *Exp Cell Res*, 1999, **248**(2): 489 - 497.
- [9] Ito M, Ito R, Miura S, *et al.* Isolation of peroxisome-defective CHO mutant cells using green fluorescent protein. *Cell Biochem Biophys*, 2000, **32** Spring: 253 - 257.
- [10] Arai K, Ohkuma S, Matsukawa T, *et al.* A simple estimation of peroxisomal degradation with green fluorescent protein - an application for cell cycle analysis. *FEBS Lett*, 2001, **507**(2): 181 - 186.
- [11] Wiemer EA, Wenzel T, Deerinc TJ, *et al.* Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol*, 1997, **136**

- [12] Jedd G , Chua NH. Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant Cell Physiol* , 2002 , **43**(4) : 384 – 392.
- [13] Mano S , Nakamori C , Hayashi M , *et al.* Distribution and characterization of peroxisomes in Arabidopsis by visualization with GFP : dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant Cell Physiol* , 2002 , **43**(3) : 331 – 341.
- [14] Mathur J , Mathur N , Hulskamp M. Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiol* , 2002 , **128**(3) : 1031 – 1045.
- [15] Kalish JE , Keller GA , Morrell JC , *et al.* Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins. *Embo J* , 1996 , **15**(13) : 3275 – 3285.
- [16] Monosov EZ , Wenzel TJ , Luers GH , *et al.* Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells. *J Histochem Cytochem* , 1996 , **44**(6) : 581 – 589.
- [17] Li X , Gould SJ. PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol* , 2002 , **156**(4) : 643 – 651.
- [18] Brocard C , Lametschwandtner G , Koudelka R , *et al.* Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. *Embo J* , 1997 , **16**(18) : 5491 – 5500.
- [19] Kragler F , Lametschwandtner G , Christmann J , *et al.* Identification and analysis of the plant peroxisomal targeting signal 1 receptor NiPEX5. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1998 , **95**(22) : 13336 – 13341.
- [20] Lamas-Maceiras M , Vaca I , Rodriguez E , *et al.* Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. *Biochem J* , 2006 , **395**(1) : 147 – 155.
- [21] Kiel JA , Hilbrands RE , Bovenberg RA , *et al.* Isolation of *Penicillium chrysogenum* PEX1 and PEX6 encoding AAA proteins involved in peroxisome biogenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2000 , **54**(2) : 238 – 242.
- [22] Kiel JA , van der Klei IJ , van den Berg MA , *et al.* Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* , 2005 , **42**(2) : 154-164.

Construction of yeast expression vector containing GFP-SKL reporter gene and its function in study of peroxisome

ZHENG Gui-zhen , ZHAO Ying , DAI Meng , LIU Jing , WANG Fu-qiang *

(New Drug Reserch and Development Center , North China Pharmaceutical Group Corporation , Shijiazhuang , 050015 , China)

Abstract : Peroxisomes are important subcellular organelles that are present in almost all eukaryotic cells. They are involved in a variety of metabolic functions include fatty acid β -oxidation , H_2O_2 -based respiration and so on. The last step of penicillin biosynthetic is also located in peroxisome in *Penicillium chrysogenum* . Peroxisome biogenesis has been well elucidated in *Saccharomyces cerevisiae* and a lot of yeast peroxisome-deficient strains were available to validate the functions of peroxisome genes from other organisms. On the base of vector pYES2 , the yeast expression vector pYES2G was constructed , which containing GFP-SKL reporter gene that fused the peroxisomal targeting signal 1 (PTS1) and used TEF1 as a promotor. Cells of INVSc1 transformed with vector pYES2G displayed a punctate fluorescence pattern ; while transformants of ATCC4003603 (a pex5-deficient yeast strain) with pYES2G showed a diffuse fluorescence pattern , which indicated that GFP-SKL can be localized in peroxisome effectively by PEX5p. Furthermore , the plasmids of pYES2G/ScPEX5 and pYES2G/PcPEX5 were created by cloning PEX5p encoding genes of *S. cerevisiae* and *P. chrysogenum* into the multiple cloning site of pYES2G , and then transformed into the yeast strain ATCC4003603 , respectively. Both transformants showed punctate fluorescence patterns , which suggested ATCC4003603 was complemented by the foreign ScPEX5p and PcPEX5p. The plasmid pYES2G provides a visible and effective method for studying the functions of fungal peroxisome related genes.

Keywords : green fluorescent protein ; peroxisome ; yeast

Foundation item : Chinese National Programs for Science and Technology Development (2002BA711A16) ; National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA001005)

* Corresponding author. Tel : 86-311-85992744 ; Fax : 86-311-86676507 ; E-mail : wangfuqiang@ncpcrd.com.cn

Received : 20 November 2006 / Accepted : 21 December 2006 / Revised : 1 February 2007