

基于筛选标记整合拷贝增加的酿酒酵母外源蛋白高效表达

张新杰¹, 贺鹏², 陶勇^{2*}, 杨毅^{1*}

¹四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都

²中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 【目的】利用酿酒酵母内部核糖体进入位点(IRES)介导构建外源蛋白高效表达系统, 构建酿酒酵母蛋白表达工程菌, 为酿酒酵母在代谢工程中的应用奠定基础。【方法】首先分别构建含启动子 *Pilv5*, *Padh2*, *Ptdh3* 的 Promoter-*mCherry*-*TIF4631 IRES-URA3* 共表达框, 利用同源重组的方法将共表达框整合到酿酒酵母 W303-1B-A 基因组中, 经 *URA3* 功能回复筛选转化子。然后比较转化子中 *mCherry* 荧光强度的差异, 以表征三种启动子在共表达框中的应用效果。利用荧光定量 PCR 测定并分析转化子中整合 DNA 片段在基因组中的拷贝数, 并在无选择压力的条件下连续传代培养转化子, 分析其遗传稳定性。最后以木糖还原酶基因 *XYLI*, β -半乳糖苷酶基因 *LACZ* 替换共表达框中的 *mCherry* 基因, 检测木糖还原酶(xylose reductase)和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)的酶活力、蛋白表达量等, 以验证该表达框的应用效果。【结果】整合 DNA 片段的拷贝数和 *mCherry* 的表达量受启动子影响。其中含 *Padh2* 的转化子最低, 含 *Ptdh3* 的转化子居中, 含 *Pilv5* 的转化子最高。含有 *Pilv5* 启动子且 *mCherry* 表达量最高的转化子, 整合 DNA 片段在基因组中的拷贝数为 47, 构建的工程菌株具有较好的遗传稳定性。在含 *Pilv5* 启动子和 *TIF4631 IRES* 的表达框中, 木糖还原酶成功表达, 其中活力最高的转化子 WIX-10 的酶活力为 0.209 U/mg 粗蛋白; β -半乳糖苷酶也成功表达, 其中酶活力最高的转化子 WIL-1 的酶活力为 12.58 U/mg 粗蛋白。【结论】在酿酒酵母中, 由 *Pilv5* 启动子和 *TIF4631 IRES* 介导的外源蛋白表达系统能够高效表达外源蛋白, 为外源蛋白在酿酒酵母中表达提供了新的策略, 也为该系统在酿酒酵母代谢工程中的应用提供了充分的实验依据。

关键词: IRES, 启动子, 酿酒酵母, 拷贝数, 稳定性

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1195-10

酿酒酵母 (*Saccharomyce cerevisiae*) 是一种单细胞的真核生物, 具有易培养、生长速度快、遗传操作性强和发酵工艺成熟等特点。对其遗传背景、代谢途径、蛋白质的分泌和转运过程也研究的比较清晰。

酿酒酵母是现在公认的比较安全的代谢工程出发菌株, 可以合成多种来源于真核生物(例如真菌, 哺乳动物等)的蛋白质, 拥有细菌类宿主不能比拟的优势。以上这些特点使酿酒酵母在实验室和工业生产

基金项目: 国家“973 计划”(2012CB72110)

* 通信作者。陶勇, Tel: +86-10-64807419, Fax: +86-10-64807478, E-mail: taoyong@im.ac.cn; 杨毅, Tel/Fax: +86-28-85410957, E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

作者简介: 张新杰(1988-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要研究酿酒酵母表达系统。E-mail: xinjie.zhang201009@gmail.com

收稿日期: 2013-03-28; 修回日期: 2013-07-05

中得到十分广泛的应用。1996年4月,酿酒酵母基因组测序完成,国际互联网公共数据库公布了酿酒酵母完整基因组序列,在短时间内建立起许多相应的技术,为酿酒酵母的应用奠定了更加坚实的基础^[1]。

真核生物的翻译起始过程可以分为5'端m⁷GpppN帽子依赖型和非依赖型,大多数细胞内的mRNA翻译起始是通过5'端m⁷GpppN帽子结构与核糖体的40S亚基和真核起始因子eIF4F复合物结合,即m⁷GpppN帽子依赖型。帽子结构非依赖型的翻译起始过程是由IRES与核糖体结合介导的^[2-3]。内部核糖体进入位点(Internal Ribosome Entry Site, IRES)是mRNA 5'端非编码区(Untranslated Region, UTR)的一段特殊的序列,核糖体可以直接与此序列结合并起始翻译。目前在病毒和真核细胞中均发现了IRES的存在,大多数病毒中IRES的二级结构有一定的相似性,含有GNRA基序(N代表任意核苷酸,R代表嘌呤),C富余基序(C-rich motif)等,为后续寻找病毒IRES提供了参照。与病毒IRES相比,细胞类IRES则复杂得多,目前通过实验认定的细胞IRES不像病毒IRES二级结构有一定的相似性,细胞IRES的结构多样,没有规律可循,但与病毒IRES的功能一样,均可与核糖体结合起始蛋白的翻译^[4]。

目前IRES以成功应用于很多方面,如:多基因表达,基因功能的研究和启动子的研究等诸多方面^[5]。现在常用的多基因表达方式主要是通过使用多启动子或重组表达融合蛋白,但由于多启动子之间或目的基因之间的相互影响,往往减弱甚至于丧失某些基因的表达^[6]。利用IRES进行多基因的表达不仅可以有效减弱目的基因的相互影响,而且对于提高目的基因的表达水平也有极大的帮助。此外,将不同的基因放置在同一个表达框中进行表达,可以减少DNA构建的长度。

迄今为止,在酿酒酵母中发现的IRES有4种,它们分别是:HAP4、TBPI、TIF4631、YAPI^[4]。本文以构建双顺反子的方法进行的研究,选取TIF4631 IRES介导共表达框中第二个基因的表达(即选择标记基因URA3),通过更换介导第一个基因表达(interested gene)的启动子,以实现目的基因表达水平的提高。同时不同表达水平的系统也可应用于酿酒酵母代谢工程的研究。为了提高结果的可信性,

本研究阴性对照是用URA3本身的启动子替换TIF4631 IRES,以介导选择标记基因URA3的表达^[7]。

本文所采用的表达策略是目的基因和筛选标记基因位于同一个表达框中,共同整合在染色体上;同时转录为一条串联的RNA,其结构是5'帽子—目的基因—IRES—筛选标记基因—polyA尾;串联的RNA分别翻译,5'帽子激活目的基因的翻译,IRES激活筛选标记基因的翻译。由于IRES的翻译能力远低于在正常启动子转录后用5'帽子翻译能力,IRES翻译所得蛋白质远低于原始的5'帽子所得的蛋白,因此本策略中筛选标记基因RNA的量必须大于野生型该基因RNA的量。由于IRES只有翻译功能,无启动子功能,筛选标记基因RNA量的提高只能通过增加全长RNA(串联的RNA)来实现。如果位于表达框前的启动子无法转录出所需的全长RNA的量,细胞只能进一步通过提高该表达框在染色体上的拷贝数来满足最终全长RNA(含筛选标记基因RNA)的量。与对照组相比,实验组的结果表明该表达框在染色体上的拷贝数因启动子的不同分别得到了不同程度的提高,而对照组的结果与野生型细胞相吻合。全长RNA量的增加满足筛选标记(必须蛋白)合成的需求,同时大量的全长RNA也使目的基因(由5'帽子激活)翻译合成大量的目的蛋白,可实现目的蛋白的高表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与工具酶:本实验中所用到的限制性内切酶和T4 DNA连接酶购自NEB公司;LA Taq酶、荧光定量RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京三博远志生物技术有限公司;质粒小提试剂盒(美国OMEGA公司)购自北京江晨宏伟生物科技有限公司;其余试剂均为进口生化纯或国产分析纯产品。

1.1.2 菌株、质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 用于质粒构建和保存,酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisiae*) W303-1B-A(MATa; URA3-52; trp1 Δ 2; leu2-3, 112; his3-11; ade2-1; can1-100)作为表达目的基因的宿主菌。TA克隆载体EZ-T购自GenStar公司。质粒pBlu2SK(-)是实验中载体

构建的出发质粒。本实验所构建的载体见表 1。

1.1.3 培养基:本实验中培养酿酒酵母的 YPD 培养基和培养大肠杆菌的 LB 培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素)均按常规配方配制;用于酿酒酵母电转化的 YPDS 培养基:YPD 培养基中加入 0.5% 的

山梨醇(D-Sorbitol);用于酿酒酵母重组菌株筛选的 YGM 培养基(1 L):YGM(Ura⁻, Trp⁻, Leu⁻) 8 g, 葡萄糖(Glucose) 20 g, 亮氨酸(Leu) 100 mg, 色氨酸(Trp) 100 mg。

表 1. 本研究中用到的载体

Table 1. Vectors used in this study

Vectors	Promoters	Comments	Selection markers
pZ-1	None	18S-UP	Amp ⁺
pZ-2	Pilv5	18S-UP, Pilv5	Amp ⁺
pZ-3	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>mCherry</i>	Amp ⁺
pZ-4	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>mCherry</i> , <i>TIF4631 IRES</i>	Amp ⁺
pZ-5	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>mCherry</i> , <i>TIF4631 IRES</i> , <i>URA3</i>	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZI-O	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>mCherry</i> , <i>Pura3</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZA-O	Padh2	18S-UP, Padh2, <i>mCherry</i> , <i>Pura3</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZI-M	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>mCherry</i> , <i>TIF4631 IRES</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZT-M	Ptdh3	18S-UP, Ptdh3, <i>mCherry</i> , <i>TIF4631 IRES</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZA-M	Padh2	18S-UP, Padh2, <i>mCherry</i> , <i>TIF4631 IRES</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZI-X	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>XYL1</i> , <i>TIF4631 IRES</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺
pZI-L	Pilv5	18S-UP, Pilv5, <i>LACZ</i> , <i>TIF4631 IRES</i> , <i>URA3</i> , 18S-DOWN	<i>URA3</i> , Amp ⁺

表 2. 本研究中用到的引物

Table 2. Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Restriction site	Usage
18SUP-F	CGGCTCGAGAAGGACTCAAGGTTAGCCAGAAG	<i>Xho</i> I	Cloning of 18S rDNA Homologous region 3' End
18SUP-R	ACGCGTTCGACAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC	<i>Sal</i> I	Cloning of 18S rDNA Homologous region 3' End
Pilv5-F	ACGCGTTCGACCCCTATCTGTTCTTCCGCTCTACC	<i>Sal</i> I	Cloning promoter region of <i>ILV5</i>
Pilv5-R	CCATCGATGTTTTATTTTTACTTATATTGCTGGTAGG	<i>Cla</i> I	Cloning promoter region of <i>ILV5</i>
Padh2-F	ACGCGTTCGACGCCAAGAAGCTCTAACCAGCTTATC	<i>Sal</i> I	Cloning promoter region of <i>ADH2</i>
Padh2-R	CCATCGATTGTGTATTACGATATAGTTAATAGTTGATAG	<i>Cla</i> I	Cloning promoter region of <i>ADH2</i>
Ptdh3-F	ACGCGTTCGACATAAAAAACAGCCTTTTTCAGTTCG	<i>Sal</i> I	Cloning promoter region of <i>TDH3</i>
Ptdh3-R	GAATTCATATGTTTGTGTTTATGTGTGTTTATTCG	<i>Nde</i> I	Cloning promoter region of <i>TDH3</i>
Pura3-F	GGAATTCGAGTATTTCAATAAATTTGTAGAGGACTCAG	<i>EcoR</i> I	Cloning promoter region of <i>URA3</i>
Pura3-R	CGGGATCCGATTTATCTTCGTTCCCTGCAGGTTTTTG	<i>BamH</i> I	Cloning promoter region of <i>URA3</i>
<i>mCherry</i> -F	CCATCGATCATATGATGGTGAGCAAGGCGAGGAGGAC	<i>Cla</i> I - <i>Nde</i> I	Cloning ORF of <i>mCherry</i>
<i>mCherry</i> -R	GGAATTCCTAGCCGGCCCTGTACAGCTCGTCCATG	<i>EcoR</i> I	Cloning ORF of <i>mCherry</i>
<i>TIF4631</i> -IRES-F	GGAATTCCTCCCGGGGACTCGATAACGACGTGAGAAAC	<i>EcoR</i> I - <i>Sma</i> I	Cloning core region of <i>TIF4631</i> IRES
<i>TIF4631</i> -IRES-R	CGGGATCCCTATTGTAATAGGTAATTACAGTTGTCCTCTTAC	<i>BamH</i> I	Cloning core region of <i>TIF4631</i> IRES
<i>URA3</i> -F	CGGGATCCGACTAGTATGTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCT	<i>BamH</i> I - <i>Spe</i> I	Cloning ORF of <i>URA3</i>
<i>URA3</i> -R	GCTCTAGATAAATAACTGATATAATTAATGAAGCTCTAAT	<i>Xba</i> I	Cloning ORF of <i>URA3</i>
18SDOWN-F	GCTCTAGACGTAAGGTCCCGAGTGGGCTC	<i>Xba</i> I	Cloning of 18S rDNA Homologous region 5' End
18SDOWN-R	CTGCAGAACCAATGCATTGGGCTGCTCTTGGCGAACCAGGAC	<i>BstX</i> I	Cloning of 18S rDNA Homologous region 5' End
<i>XYL1</i> -F	GAATTCATATGATGCTCTTCTATTAAGTTGAAGTCTG	<i>Nde</i> I	Cloning ORF of <i>XYL1</i>
<i>XYL1</i> -R	TCCCGGGGTTAACCGGTACGGACGAAGATAGGAATCTTG	<i>Xma</i> I	Cloning ORF of <i>XYL1</i>
<i>LACZ</i> -F	AAGCTTATGATAGATCCCGTCTGTTTAC	<i>Hind</i> III	Cloning ORF of <i>LACZ</i>
<i>LACZ</i> -HIS-R	GAATTCATTTTTGACACCAGACCAACTG	<i>EcoR</i> I	Cloning ORF of <i>LACZ</i>
RT- <i>URA3</i> -F	GTGGGTTAGATGACAAGGGAGACG	None	Real-time PCR for <i>URA3</i>
RT- <i>URA3</i> -R	ACGTTCCACCTCTACCTTAGCATCC	None	Real-time PCR for <i>URA3</i>
RT- <i>ACT1</i> -F	ATGTTTAGAGGTTGCTGCTTTGGTT	None	Real-time PCR for β -actin
RT- <i>ACT1</i> -R	TAGATGGGAAGACAGCAGGAGA	None	Real-time PCR for β -actin

Restriction sites used for cloning purposes are shown by underline.

1.2 分子操作与序列分析

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备、转化方法均按《分子克隆实验指南》中的常规方法进行。酿酒酵母感受态细胞的制备、转化方法及基因组 DNA 的提取方法参见文献 [8]。DNA 片段的 PCR 扩增、酶切、连接、及插入片段大小和方向的酶切鉴定等均按《分子克隆实验指南》中的常规方法进行。PCR 引物(见表 2)由上海生工生物工程有限公司合成。DNA 序列测序由华大基因完成,并应用 Vector NTI advance 10 (Invitrogen Corporation) 软件进行序列的分析比较。

1.2.1 mCherry 的荧光检测:细胞在 5 mL YGM 培养基中 30 $^{\circ}$ C 摇床(225 r/min) 培养过夜;离心收集菌体,用 0.9% NaCl 洗 1 次;将菌体悬浮在 0.9% NaCl 中,混匀,稀释 10 倍后取 200 μ L 于 96 孔板中,用酶标仪测定样品的 OD_{600} ,以 583 nm 为激发波长,用荧光酶标仪测定 610 nm 处样品中 mCherry 的发射光强度,计算样品单位 OD_{600} 的 mCherry 荧光值^[7]。

1.2.2 基因组中目的基因拷贝数的测定:利用实时荧光定量 PCR 技术测定目的基因在基因组中的拷贝数。根据 GenBank 上酿酒酵母基因组中 β -actin 和 URA3 的基因序列,分别设计 RT- β -actin 内参基因引物和 RT-URA3 基因特异引物用于 RT-PCR,相关引物(见表 2)。在光学 PCR 管中,配制 PCR 反应液:(20 μ L 体系) SYBR premix ExTaqTM (2 \times) 10 μ L,上游引物(10 μ mol/L) 0.2 μ L,下游引物(10 μ mol/L) 0.2 μ L,酿酒酵母基因组 1 μ L, ddH₂O 8.6 μ L。PCR 反应程序为(三步法):95 $^{\circ}$ C 2 min, (95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s) 40 个循环。之后进入溶解曲线程序:以每秒 0.2 $^{\circ}$ C 的速度,温度从 50 $^{\circ}$ C 升至 95 $^{\circ}$ C^[9]。

1.2.3 基因组拷贝数相对定量的数据分析:计算公式为 Copy Number = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,以酿酒酵母的 β -actin 基因 ACT1 为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量目的基因的拷贝数。其中, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_t - \Delta Ct_c$, $\Delta Ct = Ct_x - Ctr$ 。其中 t 为目标实验组, c 为校准实验组; Ct_x 为目标基因或校准基因的 Ct 值, Ct_t 为内参基因的 Ct 值。本实验以原始菌株 W303-1B-A 基因组中的 URA3 为校准基因,其拷贝数为 1^[10]。

1.2.4 粗酶液的提取:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 转化子在 YGM 营养缺陷型培养基中 30 $^{\circ}$ C

摇床培养至对数生长期;离心收集菌体,用 100 mmol/L Tris/HCl buffer (pH7.4) 洗 2 次,然后溶于新配制的裂解缓冲液(100 mmol/L Tris/HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, pH7.4);在菌悬液中加入适量玻璃珠(直径 0.5 mm),用漩涡振荡器振荡 20 s,冰浴 20 s,共计 5 min;4 $^{\circ}$ C 离心(12000 $\times g$, 30 min) 收集上清,即为粗酶液,用于后续的酶活测定分析。

1.2.5 整合 DNA 片段在酵母基因组中遗传稳定性的研究:挑取单克隆接种于 YPD 液体培养基中在 30 $^{\circ}$ C 摇床(220 r/min) 培养,每 24 h 转接一次进行连续传代培养,共连续传代培养 9 天,并分别在 1、2、3、4、6、9 天时取样;取 1 mL 培养液离心(12000 $\times g$, 2 min) 收集菌体,用 PBS 洗 1 次菌;加入 1 mL PBS 重悬菌体,稀释 15 倍后取 200 μ L 加于 96 孔板中,按照 1.2.2 所述方法测定 mCherry 的表达量;按照 1.2.3 所述方法测定样品基因组中目的基因的拷贝数。

1.2.6 木糖还原酶(XR)的酶活测定:1 mL 反应液中含 100 mmol/L Tris/HCl buffer (pH8.0), 0.2 mol/L xylose, 6 mmol/L NADH 及适量稀释后的酶液,混匀后在 $\lambda = 340$ nm 处检测 NADH 氧化过程的动力学变化,测定间隔时间为 5 s,共记录 5 min,每个样品做 3 个平行。酶活单位定义:在 25 $^{\circ}$ C, pH8.0 的反应条件下,1 min 内能转化 1 μ mol 底物所需的酶量^[11]。

1.2.7 β -半乳糖苷酶的酶活测定:在微量离心试管中加入:400 μ L 100 mmol/L Tris/HCl buffer (pH7.4), 133 μ L 0.004% ONPG 溶液, 6 μ L 100 mmol/L Mg²⁺ 溶液,混匀后将反应混合物置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中充分预热。加入 60 μ L 粗酶液,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,加入 500 μ L 400 mmol/L 碳酸钠终止反应,在 $\lambda = 420$ nm 处测定吸光值,计算酶活。酶活单位定义:在 37 $^{\circ}$ C, pH7.4 时,1 min 可催化产生 1 μ mol o-硝基酚所需的酶量。

2 结果和分析

2.1 质粒构建与鉴定

利用表 2 所示的相关引物进行 PCR 扩增,获得两端带有相应酶切位点的 DNA 片段用于载体构建,分别为:18S-UP(同源序列), Pilv5, Padh2, Ptdh3,

Pura3, *mCherry*, *TIF4631 IRES*, *URA3*, 18S-DOWN (同源序列), *XYL1*, *LACZ*。将上述片段分别与 EZ-T 载体连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 用含有氨苄青霉素的 LB 平板筛选, 经菌落 PCR 验证后, 提取质粒进行 DNA 测序。所得质粒命名为 T-X, X 为各 DNA 片段的名称。共表达框的构建策略见图 1-A。

首先构建质粒 pZ-1: 分别用 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切载体 pBlu2SK (-) 和 T-18S-UP, 回收相应片段后连接, 以上述同样方法进行转化、筛选、验证。在质粒 pZ-1 的基础上用同样的方法构建质粒 pZ-2 (连入 *Pilv5*), 以此类推在 pZ-2 的基础上构建 pZ-3 (连入 *mCherry*), 在 pZ-3 的基础上构建 pZ-4 (连入 *TIF4631 IRES*), 在 pZ-4 的基础上构建 pZ-5 (连入 *URA3*), 在 pZ-5 的基础上构建 pZI-M (连入 18S-DOWN), 质粒的详细信息见表 1。构建过程中所用

到的酶切位点具体见 pZI-M 的质粒图谱 (图 1-B)。

质粒 pZT-M 和 pZA-M 的构建: 分别用 *Sal* I 和 *Cla* I 双酶切载体 pZI-M, T-Padh2 和 T-Ptdh3, 回收相应的 DNA 片段后连接, 经转化、筛选、酶切验证, 最终获得质粒 pZA-M 和 pZT-M。

质粒 pZI-O 和 pZA-O 的构建: 即用 *Pura3* 分别替换载体 pZI-M 和 pZA-M 中的 *TIF4631 IRES*, 首先分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切载体 pZI-M, pZA-M 和 T-Pura3, 回收相应的 DNA 片段后连接, 然后经转化、筛选、酶切验证, 最终获得质粒 pZI-O 和 pZA-O。

上述质粒中, pZI-O 和 pZA-O 为阴性对照组, pZI-M、pZT-M 和 pZA-M 为实验组。两组质粒中共表达框的关键区别在于图 1-A 中的 X, 其中实验组为 *TIF4631 IRES*, 阴性对照组为 *Pura3*。

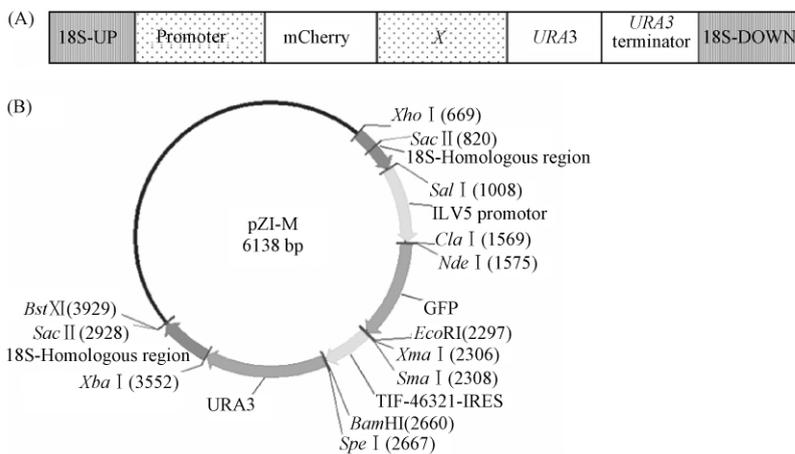


图 1. 共表达框的结构 (A) 和 pZI-M 的质粒图谱 (B)

Figure 1. The element about the bicistronic DNA. A: Schematic of the bicistronic DNA construct. The *mCherry* gene is in the 5' position, driven by one of three promoters: ILV5 promoter, ADHI promoter, TDH3 promoter. X, one of two elements (*Pura3* and *TIF4631 IRES*). *Pura3* is the promoter of *URA3* gene. *TIF4631 IRES* is to start the translation of *URA3* selection marker. 18S-UP and 18S-DOWN are homologous regions of recombination into chromosome. B: Vector map of pZI-M. The vector contains 18S-UP, *Pilv5*, *mCherry*, *TIF4631 IRES*, *URA3*, 18S-DOWN. The *mCherry* has been expressed in the highest-level in transformants with this co-expression cassette.

2.2 酿酒酵母转化子的分析

用 *Bst*X I 和 *Xho* I 双酶切载体 pZI-O、pZA-O、pZI-M、pZT-M 和 pZA-M, 得到 5 种含不同共表达框的 DNA 片段 (图 1-A), 胶回收纯化后, 电转化酿酒酵母 W303-1B-A, 用 YPDS 孵育过夜, 分别涂于 YGM (Ura⁻) 平板, 30 $^{\circ}$ C 温箱中培养 3-7 天, 得到转化子 WIO-X、WAO-X、WIM-X、WTM-X、WAM-X。同

等条件下得到 5 种转化子的培养时间、转化子数量、菌落颜色 (即 *mCherry* 的颜色) 等有明显的差异, 具体见表 3。与阴性对照 WIO-X 相比, WIM-X 转化子的培养时间延长了一倍, 数量减少为 1/5。与阴性对照 WAO-X 相比, WAM-X 转化子的培养时间延长了 0.5 天, 数量没有明显减少。

表 3. 酿酒酵母转化子分析

Table 3. Analysis of transformants of *Saccharomyces cerevisiae*

Strains*	Promoters	Time to appear transformants (day)	Transformants number	Color of colony**
WIO-X	Pilv5	2	> 150	-
WAO-X	Padh2	2	> 150	-
WIM-X	Pilv5	4	20 ~ 30	+ + +
WTM-X	Ptdh3	3	50 ~ 70	+
WAM-X	Padh2	2.5	> 100	-

* : WIO-X, WAO-X, WIM-X, WTA-X and WAM-X are transformants driven by Pilv5, Ptdh3 and Padh2 respectively. "X" refers to number of strains. X = 1, 2, ……**. **: "+" refers to the level of colony's color. The more "+" indicates the color is deeper. "-" shows the color of colony is white.

2.3 含不同启动子的转化子中 mCherry 的表达分析

按照 1.2.1 的方法测定 mCherry 在五种种转化子 WIO-X、WAO-X、WIM-X、WTM-X、WAM-X 中的表达。结果显示:mCherry 在五种种转化子中成功表达;阴性对照 WIO-X, WAO-X 中 mCherry 的表达量差异不大(图 2-A),各转化子中 mCherry 荧光值小于 400;实验组转化子 WIM-X、WTM-X、WAM-X 中, mCherry 的表达量由不同的启动子介导时差异较大。由启动子 Pilv5 和 IRES 介导的转化子 WIM-X 的菌落可见明显红色,测得 mCherry 的表达量最高;由启动子 Ptdh3 和 IRES 介导时,转化子 WTM-X 的

菌落能够看到较弱的红色, mCherry 的表达量居中;含启动子 Padh2 时,转化子 WAM-X 的菌落没有肉眼可见的红色, mCherry 的表达量最低。图 2-B 为实验组各转化子的 mCherry 荧光值。如图所示,在所有筛选的菌株中转化子 WIM-3 的 mCherry 表达量最高,其荧光值为 6938。利用 SDS-PAGE 检测 WIM-X 粗酶液中 mCherry 的表达(图 2-C),图中清晰可见 WIM-X (lane2-7) 的粗酶液中在 26 - 34 kDa 间的一条蛋白条带比空白对照明显,即蛋白含量高。其中 WIM-3 (lane4) 的相应条带最明显,与其荧光值最高相符合。

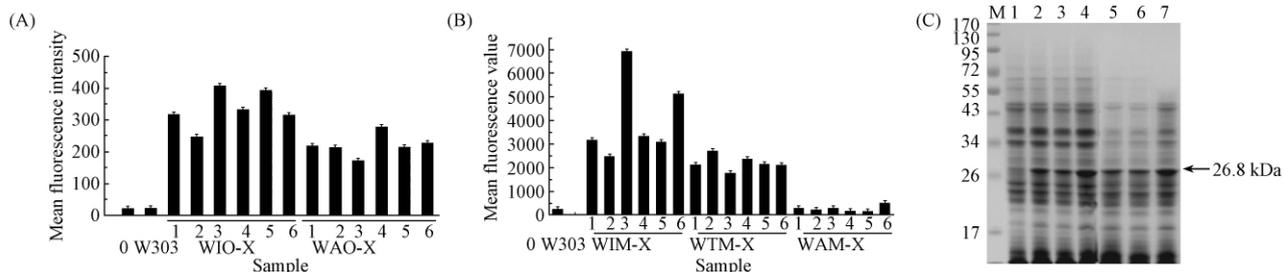


图 2. 不同转化子中 mCherry 荧光量 (A, B) 和 mCherry 的 SDS-PAGE (C)

Figure 2. Mean fluorescence value of mCherry in the negative control: WIO-X and WAO-X (A) and in WIM-X, WTM-X and WAM-X (B), SDS-PAGE of mCherry (C). 0: blank control, W303: mean fluorescence value of W303-1B-A. M: Marker; Lane1: W303-1B-A; Lane 2: WIM-1; Lane 3: WIM-2; Lane 4: WIM-3; Lane 5: WIM-4; Lane 6: WIM-5; Lane 7: WIM-6. mCherry is 26.8 kDa.

2.4 转化子中目的基因在基因组中拷贝数的测定与分析

如 2.3 所述各类转化子的 mCherry 表达量存在差异,其原因可能是表达框在基因组中拷贝数的不同,因此需要通过 Real-Time PCR 实验测定不同蛋白表达水平菌株的基因组内整合片段拷贝数的差异。实验按照 1.2.2 的方法,以 *ACT1* 为内参基因,用受体菌 W303-1B-A 基因组的 *ACT1* 和 *URA3* 基因做校准实验,通过测定基因组内 *URA3* 基因的拷贝

数来反映整合片段的拷贝数,测定结果如图 3 所示。各转化子中整合片段拷贝数的变化趋势与 2.3 中 mCherry 的表达量相吻合:对照组转化子 WIO-X 和 WAO-X 中整合片段的拷贝数均小于 3(图 3-A);转化子 WIM-X 的基因组中整合片段拷贝数最高,其中转化子 WIM-3 的拷贝数为 47,是所有转化子中最高的;转化子 WTM-X 的基因组中整合片段拷贝数居中,且各转化子中的拷贝数十分稳定,平均拷贝数为 11;转化子 WAM-X 的基因组中整合片段拷贝数

最低,大部分只有 2-4 个拷贝,与其 mCherry 的表达量相对应(图 3-B)。

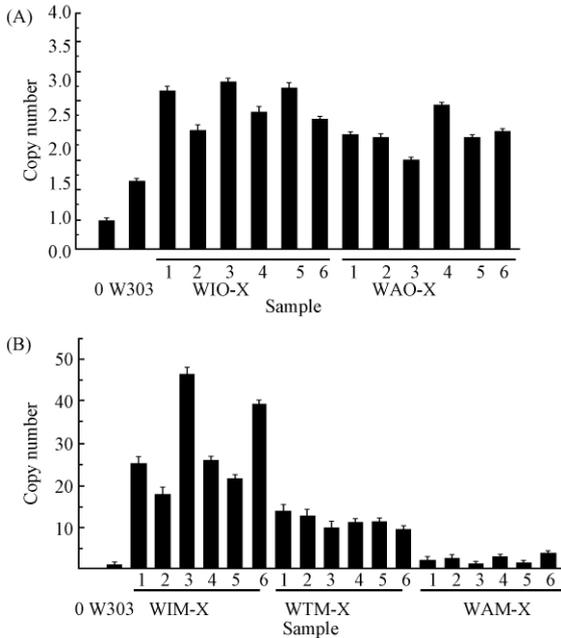


图 3. 不同转化子中目的 DNA 片段的拷贝数

Figure 3. Copy number of target gene. A: Copy number of target gene in the negative control: WIO-X and WAO-X. 0: blank control, W303: mean fluorescence value of W303-4B-A. B: Copy number of target gene in WIM-X, WTM-X and WAM-X. There are six samples respectively driven by Pilv5, Ptdh3 and Padh2. 0: blank, W303: copy number of target gene in W303-4B-A.

2.5 整合 DNA 片段在酵母基因组中的遗传稳定性

基因工程菌的遗传稳定性是菌株是否成功构建的指标之一,本研究选取整合片段拷贝数较高的重组菌株 WIM-1,3 考察遗传稳定性。按照 1.2.6 的方法进行实验。实验结果显示(图 4):随着传代数的增加,两个菌株中 mCherry 的表达量和整合片段在基因组中拷贝数都相应地减少,连续培养 9 天即 9 代后,两个指标都减少了 30% - 32%。但是随着传代次数的增加,两项指标的变化有变缓的趋势。这表明在 WIM-1 和 WIM-3 菌株中 mCherry 的表达和整合片段具有一定的遗传稳定性。

2.6 木糖还原酶在酿酒酵母 W303-4B-A 中的表达与活性分析

在 pZI-M 的基础上构建质粒 pZI-X,以 XYLI 的 ORF 替换 mCherry 的 ORF。由于在 XYLI 的 ORF 中含有 EcoR I 的酶切位点,所以扩增 XYLI 的下游引

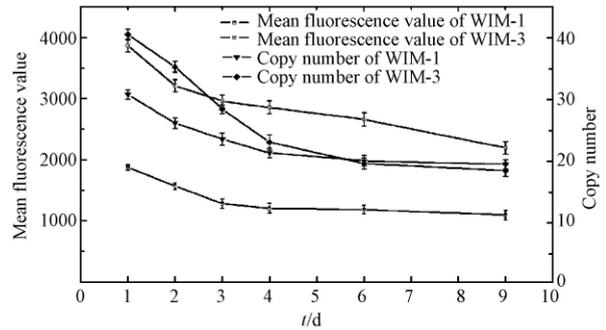


图 4. 传代培养条件下 WIM-1,3 中 mCherry 的荧光量 and 目的基因拷贝数的变化

Figure 4. The changes of mCherry fluorescence value and copy number of interested gene in WIM-1, 3.

物以 Xma I 为酶切位点。利用 Nde I 酶切质粒。pZI-M, 4 - 6 h 后在酶切反应液中加入 1 μ L 10 mmol/L dNTP, 1 μ L T4 DNA polymerase, 37 $^{\circ}$ C 处理 15 min, 将酶切产生的粘性末端补平, 乙醇沉淀 DNA 片段; 利用 Xma I 酶切回收的 DNA 片段。利用 Xma I、Nde I 酶切质粒 T-XYL1, 获得 XYLI 片段, 连接两片段后按照上述的转化、验证方法最终获得质粒 pZI-X。

用 Sac II 酶切载体 pZI-X 获得用于整合的 DNA 片段, 转化受体菌 W303-4B-A, 得到转化子 WIX-X, 随机挑取 10 个转化子(编号为 1 - 10 号)经液体培养后, 测定粗酶液中木糖还原酶的活力。

其中酶活最高的转化子是 WIX-10, 酶活力为 0.209 U/mg 粗蛋白。选取酶活较高的 WIX-1, 6, 8, 9, 10 转化子通过 SDS-PAGE 检测粗酶液中目的蛋白的表达, 结果见图 5。图中清晰可见 WIX-10 (lane5) 的粗酶液中在 26 - 34 kDa 之间的一条蛋白条带比空白对照和其他阳性菌明显, 即蛋白含量高。但是根据 XR 的氨基酸序列计算的蛋白分子量为 35.9 kDa 的, 比图中所示的蛋白要大。为了确定该条带是否为 XR, 对该条带切割后进行质谱检测, 检测结果证实该条带为 XR。由此筛选到一株 XR 高表达的菌株 WIX-10, 验证了含启动子 Pilv5 和 TIF4631 IRES 的表达框用于构建蛋白表达酿酒酵母工程菌的效果。

2.7 β -半乳糖苷酶在酿酒酵母 W303-4B-A 中的表达与活性分析

在 pZI-M 的基础上构建质粒 pZI-L, 以 LACZ 的 ORF 替换 mCherry 的 ORF。由于在 LACZ 的 ORF 中

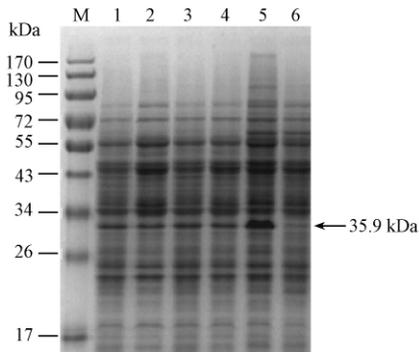


图 5. 转化子粗酶液的 SDS-PAGE

Figure 5. SDS-PAGE of crude extract from transformants. lane M: Marker; lane 1: WIL-1; lane 2: WIL-6; lane 3: WIL-8; lane 4: WIL-9; lane 5: WIL-10. lane 6: Negative control. XR is 35.9 kDa. In the lane 5, obvious protein band can be seen comparing to other lanes-lane 1, 2, 3, 4, 6. This band is confirmed to be XR which is detected by mass Spectrometry.

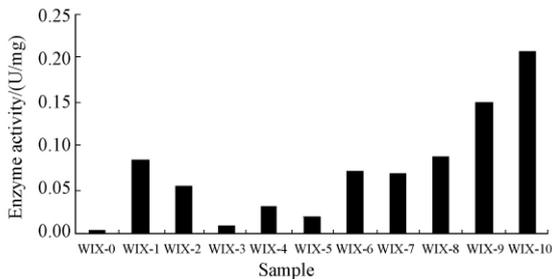


图 6. 转化子的酶活力

Figure 6. Enzyme activities of transformants. WIL-0: Negative control; WIL-1-10 are enzyme activities of transformants.

含有构建质粒时需要的酶切位点。所以扩增 *LACZ* 的上游引物以 *Hind* III 为酶切位点。利用构建 pZI-X 的方法,经 T4 DNA polymerase 对片段末端处理后,经连接转化等步骤获得质粒 pZI-L。

用 *Sac* II 酶切载体 pZI-L 获得用于整合的 DNA 片段,转化受体菌 W303-1B-A,得到转化子 WIL-X,随机挑取 12 个转化子(编号为 1-12 号)经液体培养后,测定全细胞粗酶液中 β -半乳糖苷酶的活力。其中活力最高的转化子是 WIL-1,酶活力为 12.58 U/mg 粗蛋白。

β -半乳糖苷酶的表达进一步证实含启动子 *Pilv5* 和 *TIF4631 IRES* 的表达框可以用于构建蛋白表达酿酒酵母工程菌,而且该表达框还可以用于代谢工程的其他应用。

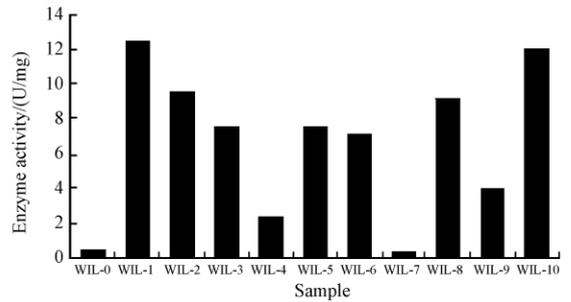


图 7. WIL-X 转化子的酶活力

Figure 7. Enzyme activities of transformants. WIL-0: Negative control; WIL-1-10: enzyme activities of transformants.

3 讨论

酿酒酵母表达系统有质粒型和整合型两种,其中质粒型的目的基因拷贝数较高,但由于质粒的不稳定等原因,质粒型表达系统在酿酒酵母代谢工程研究中的应用有很大局限性^[12]。而整合型的表达系统由于具有可控性强,目的基因的拷贝数稳定等原因被广泛应用于各类代谢工程研究中^[13-14]。众所周知,在代谢工程的研究中对各类蛋白表达量的要求不同,目的蛋白的高表达策略在代谢工程的研究中不一定适用,更加关注的是各关键蛋白表达量的配比,相互之间生理功能的协调。这就需要提供不同表达水平的系统以满足需求^[15]。

在酿酒酵母双顺反子表达系统的研究中,在同一片段中以转录相关的形式分别表达两个蛋白的研究还不是很多。本文是利用 IRES 介导前后两个 ORF 构成双顺反子(位于一个表达框中)在真核细胞(酿酒酵母)中使两个 ORF 同时得到表达,但两个 ORF 的表达目的不同。IRES 后(远离启动子)的 ORF 是转化子筛选标记,同时也是构成筛选压力,提高整合拷贝数的动力。IRES 前(靠近启动子)的 ORF 是真正要高表达的目的基因。

酿酒酵母中通常的标记基因和要表达的目的基因,分别由两个独立的表达框(分别带有各自的启动子和转录终止区)构成,缺点是筛选压力低,不易得到高拷贝转化子。原因如下:对于营养缺陷型类的筛选,选择压力是互补某个缺陷基因对应蛋白的量(必须蛋白)是否达到细胞生长所需的最小量。不满足最小量的需求,细胞则无法生长,必须提高互补基因蛋白表达量,如提高拷贝数等。如果筛选标

记位于独立的表达框中,类似于对照组的情况,带有自身的启动子,此时细胞中只需一个拷贝的互补基因即可满足生长所需的必须蛋白的量,因为在野生型细胞中该基因就是一个拷贝,两个对照组的实验也证实这一结果。

本文所构建的 *Pilv5-IRES* 系统, *Ptdh3-IRES* 系统和 *Padh2-IRES* 系统中第一个基因的表达量依次降低,其中 *Pilv5-IRES* 系统的最高。而且 *IRES* 系统中第一个基因的表达量要远高于阴性对照(即由酵母本身的常规启动子 *Pura3* 介导的表达系统)。

在野生型中 *URA3* 是单拷贝基因,所以推测在不施加任何压力的情况下(即阴性对照组 *Pura3*),通过重组方式回补的 *URA3* 的拷贝数也是单拷贝的(测定的拷贝数减去基因组中原有的一个拷贝)。启动子 *Pilv5* 共表达框对应的阴性对照已经成功的证实了此种推测。通过 *Padh2* 共表达框对应的阴性对照进一步证实了我们的推测—即 *URA3* 基因在阴性对照中是单拷贝的。在实际的应用中,很多情况下需要构建含单拷贝目的基因的工程菌,由酵母本身的常规启动子 *Pura3* 介导的表达系统即可满足此要求。

Pilv5-IRES 系统经过 *mCherry*, 木糖还原酶和 β -半乳糖苷酶的表达验证,充分证实了该系统的应用效果。实验中对其稳定性的研究显示拷贝数的提高虽然在传代初期影响了遗传稳定性,但其下降趋势最终趋于稳定,体现了整合型系统优于质粒型系统的特点,证实该系统可以满足应用的需求。另外 *Padh2-IRES* 系统和 *Ptdh3-IRES* 系统可用于不同表达量需求的研究目的,在代谢工程研究中同样具有广泛的应用前景。以上研究构建的表达系统及相关研究为该系统应用于更广泛的代谢工程研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Liu Q, Yu L. Yeast: A Model Organism. *Chemistry of Life*, 2000, 20(02):61-65. (in chinese)
刘擎, 余龙. 酵母: 一种模式生物. 生命的化学 (*Chemistry of Life*), 2000, 20(02):61-65.
- [2] Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N. Translational Control. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996:31-119.
- [3] Komar AA, Mazumder B, Merrick WC. A new framework for understanding IRES-mediated translation. *Gene*, 2012, 502(2):75-86.
- [4] Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M. Searching for IRES. *RNA*, 2006, 12(10):1755-1785.
- [5] Bouabe H, Fassler R, Heesemann J. Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(5):e28.
- [6] Tahara H, Zitvogol L, Storkus WJ, Herbert JZ, McKinney TG, Schreiber RD, Gubler U, Robbins PD, Lotze MT. Effective eradication of established murine tumor with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *The Journal of Immunology*, 1995, 154(12):6466-6474.
- [7] Edwards SR, Wandless TJ. Dicistronic regulation of fluorescent proteins in the budding yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast*, 2010, 27(4):229-236.
- [8] Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *pichia pastoris*. *Biotechniques*, 2005, 38(1):44-48.
- [9] Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 2002, 30(6):503-512.
- [10] Abad S, Kitz K, Hörmann A, Schreiner U, Hartner FS, Glieder A. Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(4):413-420.
- [11] Bengtsson O, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2:9.
- [12] Fitcher B, Toxic CJ. Effects of excess cloned centromeres. *Molecular and Cellular Biology*, 1986, 6(6):2213-2222.
- [13] Gibson DG, BeNders GA, Axelrod KC. On-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2008, 105(51):20404-20409.
- [14] Schaerer-Brodbeck C, Barberis A. Coupling homologous recombination with growth selection in yeast: a tool for construction of random DNA sequence libraries. *BioTechniques*, 2004, 37(2):202-206.
- [15] Da Silva NA, Srikrishnan S. Introduction and expression

of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(2):197-214.

High-level expression of heterologous protein based on increased copy number in *Saccharomyces cerevisiae*

Xinjie Zhang¹, Peng He², Yong Tao^{2*}, Yi Yang^{1*}

¹College of life science, Sichuan university, Chengdu 610041, China

²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] High-level expression system of heterologous protein mediated by internal ribosome entry site (IRES) in *Saccharomyces cerevisiae* was constructed, which could be used for other applications of *S. cerevisiae* in metabolic engineering. [Method] We constructed co-expression cassette (promoter-mCherry-TIF4631 IRES-URA3) containing promoters Pilv5, Padh2 and Ptdh3 and recombined the co-expression cassette into the genome of W303-1B-A. The URA3⁺ transformants were selected. By comparing the difference in the mean fluorescence value of mCherry in transformants, the effect of three promoters was detected in the co-expression cassette. The copy numbers of the interested genes in the genome were determined by Real-Time PCR. We analyzed genetic stability by continuous subculturing transformants in the absence of selection pressure. To verify the application of co-expression cassette, the ORF of *mCherry* was replaced by β -galactosidase (*LACZ*) and xylose reductase (*XYLI*). The enzyme activities and production of β -galactosidase and xylose reductase were detected. [Result] mCherry has been expressed in the highest-level in transformants with co-expression cassette containing Pilv5 promoter. The highest copy number of DNA fragment integrating in the genome was 47 in transformants containing Pilv5. The engineering strains showed good genetic stability. Xylose reductase was successfully expressed in the co-expression cassette containing Pilv5 promoter and *TIF4631* IRES. The highest enzyme activity was 0.209 U/mg crude protein in the transformants WIX-10. β -galactosidase was also expressed successfully. The transformants that had the highest enzyme activity was WIL-1 and the enzyme activity was 12.58 U/mg crude protein. [Conclusion] The system mediated by Pilv5 promoter and *TIF4631* IRES could express heterologous protein efficiently in *S. cerevisiae*. This study offered a new strategy for expression of heterologous protein in *S. cerevisiae* and provided sufficient experimental evidence for metabolic engineering application of this system in yeast.

Keywords: Promoter, *Saccharomyces cerevisiae*, Copy number, Genetic stability

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB72110)

* Corresponding authors. Yong Tao, Tel: +86-10-64807419, Fax: +86-10-64807478, E-mail: taoyong@im.ac.cn; Yi Yang, Tel/Fax: +86-28-85410957, E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

Received:28 March 2013 / Revised: 5 July 2013