

pSH-CUP 重组质粒的构建及面包酵母酸性海藻糖酶基因的敲除

和东芹^{1,2}, 肖冬光^{1*}, 吕焯¹

(¹天津科技大学天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

(²邯郸职业技术学院, 邯郸 056001)

摘要: 设计含有与面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae* BY-6)编码酸性海藻糖酶 ATH 基因内部部分序列同源的长引物, 以质粒 pUG6 为模板进行 PCR 构建带有 Cre/loxP 系统的敲除单元, 转化面包酵母获得 G418 阳性克隆。将铜抗性基因(*CUP1-MT1*)导入 Cre 重组酶表达质粒 pSH47, 得到重组质粒 pSH-CUP, 并转化阳性克隆, 以铜抗性筛选面包酵母转化子。半乳糖诱导表达 Cre 酶切除 Kan^r 基因。重组质粒 pSH-CUP 的构建, 不仅解决了酵母转化子筛选标记问题和非酵母基因的引入, 而且使 *LoxP-kanMX-loxP* 基因敲除体系在进行真核生物基因敲除时更加方便可行。

关键词: 面包酵母; 基因敲除; 铜抗性; pSH-CUP 重组质粒构建; 酸性海藻糖酶

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0000-00

冷冻面团技术是 20 世纪 50 年代发展起来的面包生产新工艺^[1~2], 在我国有很大的开发潜力。耐冷冻面包酵母是冷冻面团技术的关键, 是制约冷冻面团技术发展的瓶颈。海藻糖作为面包酵母的典型应激代谢产物, 是决定面包酵母耐冷冻性能的关键因素, 胞内海藻糖含量成了筛选耐冷冻面包酵母的重要参数。酸性海藻糖酶(ATH1)是面包酵母利用胞外海藻糖的主要途径^[3~5], 但 Beltran 等^[6]认为酸性海藻糖酶(ATH1)也可以参与胞内海藻糖的代谢, John kim 等^[7]认为实验条件下, 敲除酸性海藻糖基因对酵母海藻糖积累和抗逆性提高比敲除中性海藻糖更有效。因此建立切实可行的基因敲除方法, 对于研究酸性海藻糖酶在面包酵母海藻糖代谢及耐冷冻机理中的作用、耐冷冻面包酵母的筛选都有着重要意义。

本文利用改进的 Cre/loxP 系统建立了 ATH1 基因敲除的技术方法, 获得了 ATH1 基因缺失的面包酵母突变株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: pUG6, pSH47 质粒由德国 J.H. Hegemann 教授惠赠; pCM1-1 质粒由中国科学院微生物研究所张博润教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 和面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae* BY-6)单倍体由本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂: *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒及生化试剂等均购自宝生物工程(大连)有限公司, 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 培养基与 DNA 操作技术

LB、YEPD 等培养基按常规配制, 使用前根据需要添加抗性物质。质粒 DNA 的提取、纯化、酶切、连接、感受态细胞的制备、质粒的转化、重组菌的筛选、鉴定等参考文献[8]所述。

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20050057001)

*通讯作者。Tel: +86-22-60601397; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xiao99@tust.edu.cn

作者简介: 和东芹(1973-), 女, 河北人, 讲师, 在读博士研究生, 从事生物发酵、分子生物学教学及研究。

E-mail: handanxingtai@126.com

收稿日期: 2007-05-17; 修回日期: 2007-09-14

1.3 引物设计

1.3.1 kan^r 扩增引物: 根据 pUG6 的基因序列设计引物 P1 和 P2。P1: 5'-CGCGGATCCCTCTGGGTGTGATATCGCCGTCATTGGGAAATCATACGTTGAACTACGATCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3; P2: 5'-CGCGGATCCAACTTTGAGAAGAAGAGCCGTGATTCAGCAGACC-AGCAGCTGCGGCCACA[△]GCATAGGCCACTAGTGGATC-3 (下划线部分为 *Bam*H 的酶切位点, 框内部分是 50bp 与拟敲除基因即面包酵母的酸性海藻糖酶 ATH1 基因的同源区)。

1.3.2 铜抗性基因片段扩增引物: 根据 *CUP1-MT1* 的基因序列设计引物 P3 和 P4。P3: 5'-CGGGIACCTCTAGAGGATCCCATTACCG-3 (下划线部分为 *Kpn*I 的酶切位点); P4: 5'-CATGCCATGGCTCCCAGAGCTGTTTCGTC-3 (下划线部分为 *Nco*I 的酶切位点)。

1.3.3 鉴定引物: P5: 5'-TAAATGGGCTCGCGATAATG-3, 位于 kan^r 基因内部 543bp 处, 用于 kan^r 基因敲入后酵母转化子的鉴定。根据面包酵母酸性海藻糖酶(ATH1)的基因上下游序列设计引物 P6 和 P7, 用于 kan^r 基因去除后酵母转化子的鉴定。P6: 5'-GATCGCTTTGGTTCAATGCG-3; P7: 5'-CATCATACTCCTTGACTGCC-3。

1.4 kan^r 抗性基因片段的扩增与克隆

以 pUG6 模板, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 条件: P1、P2 各 10mmol/L 及 1/10 体积的 10×PCR 缓冲溶液, 0.2mmol/L 的 dNTP 和 2U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 以 20μL 体系进行扩增。扩增条件: 95℃ 5min; 95℃ 40s, 58℃ 60s, 72℃ 2min, 25 个循环; 72℃ 8min。PCR 产物连接在 pMD18-T 载体上, 构成 pMD-A1 质粒, 通过蓝白斑反应筛选阳性克隆, 进行琼脂糖电泳及酶切进行验证。

1.5 面包酵母酸性海藻糖酶基因的敲除及转化子的验证[△]

提取质粒 pMD-A1, *Bam*H 酶切、回收 1600bp 的目的片段, 电转化面包酵母感受态细胞, 涂布含有 200mg/L G418 的 YEPD 平板, 30℃ 培养 4~5d, 挑取转化子。提取转化子总 DNA 分别以 P1 和 P2、P5 和 P2 为引物进行 PCR 验证反应。PCR 条件见 1.5 方法。

酵母 DNA、质粒的提取见^[9], 酸性海藻糖酶活性的测定参考文献^[10]。

1.6 *CUP1-MT1* 片段的扩增及质粒 pSH-CUP 的构建 以 pCM1-1 为模板, P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增。PCR 条件: 95℃ 5min; 94℃ 40s, 54℃ 60s, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃ 10min。

将纯化后的 PCR 产物和 pSH47 同时用 *Nco*I 和 *Kpn*I 进行双酶切, 割胶回收。将酶切后的载体与目的基因片段用 T4DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 电转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 涂布在含有氨苄青霉素的 LA 平板上。提取阳性克隆的质粒 DNA, 琼脂糖电泳验证、双酶切验证。

1.7 kan^r 基因的去除及面包酵母转化子的验证

将重组质粒 pSH-CUP 电转化[△]感受态的面包酵母单倍体细胞, 涂布含有 8.0mmol/L CuSO₄ 的 YEPD 平板筛选转化子, 将所得到的转化子挑到无菌水中饥饿培养 3h 后, 重新验证转化子的铜抗性表型。挑选在铜抗性平板上生长较好的转化子, 接种含有半乳糖的液体 YEPD 培养基, 30℃ 诱导培养 4h, 取适量培养液涂在 YEPD 平板上 30℃ 培养 2d。将得到的单菌落影印到含有 G418(200mg/L)的 YEPD 平板上, 筛选 Kan 抗性标记丢失的菌株。液体培养提取亲本及转化子的基因组 DNA, 分别用引物 P6、P7 和 P1、P2, 进行 PCR 验证。PCR 条件: 95℃ 5min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 kan^r 基因片段的扩增与质粒 pMD-A1 的构建

以质粒 pUG6 为模板, 通过 PCR 将 *LoxP-KanMX-LoxP* 片段扩增出来, 琼脂糖电泳可以看到 1600bp 清晰的目的带。纯化后的 PCR 产物在 T4 连接酶的作用下连到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α, 在氨苄青霉素抗性平板上通过蓝白斑反应筛选阳性转化子, 少量碱裂解法提取质粒 pMD-A1, 经 *Bam*H I 酶切释放出 2600bp 和 1600bp 的目的条带; 经 *Sal*I 酶切则为线状的 pMD-A1 质粒 DNA, 约 4200bp, 结果见图 1, 与预期大小一致。

2.2 面包酵母 ATH1 的敲除及转化子验证

将两侧带有与 ATH1 部分基因序列同源的外源基因片段 *loxP-kanMX-loxP* 电转化酵母感受态细胞, 根据方法 1.6 得到 G418 阳性克隆, 提取其总 DNA, 以此作为模板, 分别以 P1、P2 和 P5、P2 为引物进行

[△] 陈叶福. 利用木糖醇酿酒酵母基因工程菌的改造. 江南大学博士论文. 2003

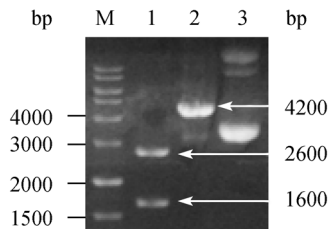


图 1 重组质粒 pMD-A1 及酶切分析

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pMD-A1.

PCR 扩增, 产物进行琼脂糖电泳分析(图 2)。以 P1 和 P2 为引物, 可以扩增出敲入的 1600bp 左右的外源基因片段。引物 P5 位于 kan^r 基因的内部 543bp 处以 P5、P2 为引物可以扩增出约 900bp 的基因序列。结果表明以 P1、P2 和 P5、P2 两对引物进行 PCR 扩增出的目的带与预计的目的产物一致, 可见面包酵母 *S.cerevisiae* BY-6 的 *ATH1* 基因已经 *loxP*-*kanMX*-*loxP* 基因片段替换。

此外, 在面包酵母 *S.cerevisiae* BY-6(*ATH*, *G418^r*) 的生长过程中检测不到酸性海藻糖酶的活性。

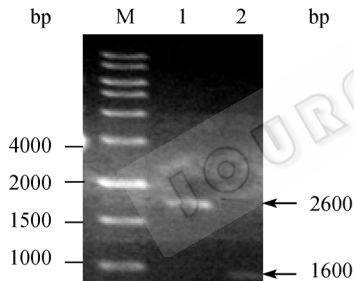
图 2 亲本株和 Δath 的 PCR 验证

Fig. 2 PCR confirmation of wild type and *ath*(*G418^r*).

1.wild type; 2. *ath*(*G418^r*); M. 1kb plus DNA ladder.

2.3 重组质粒 pSH-CUP 的构建及酶切验证

重组质粒 pSH-CUP 的构建(图 3), 用 PCR 方法扩增出 *CUP1-MT1* 基因片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳表明在 1400bp 左右有一明显条带, 与预计的目的产物大小相符(图 4)。将 PCR 产物用 *Nco* I/*Kpn* I 双酶切, 胶回收纯化后与同样经 *Nco* I/*Kpn* I 酶切、回收的 pSH47 质粒用 T4DNA 连接酶连接, 电转化大肠杆菌 DH5 α , 在氨苄青霉素抗性平板上筛选阳性转化子。碱裂解法从转化子中提取重组质粒 pSH-CUP, 经 *Nco* I/*Kpn* I 双酶切释放出 1400bp 和 5400bp 的目的条带(图 5), 表明质粒构建成功。

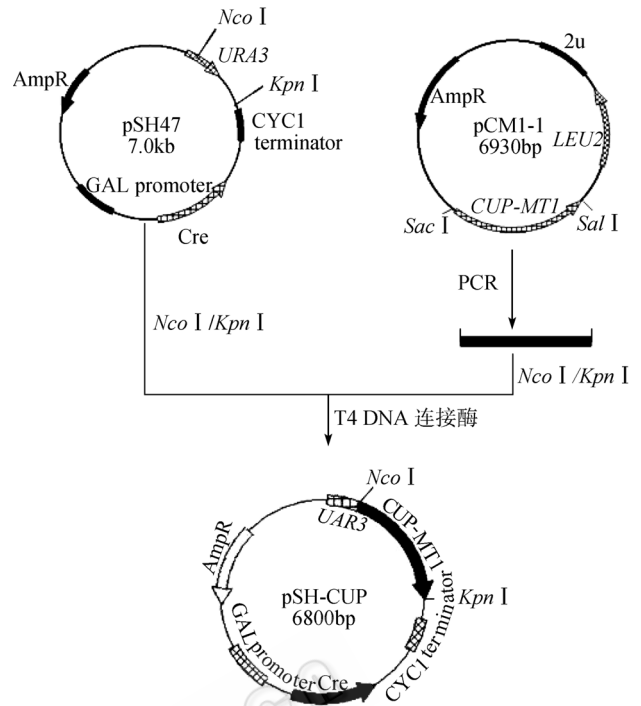


图 3 重组质粒 pSH-CUP 的构建

Fig. 3 Construction of the recombinant plasmid pSH-CUP.

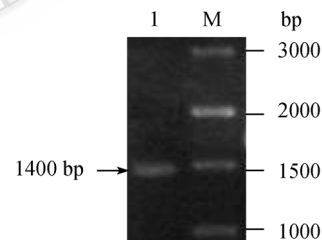
图 4 *Cu-MT1* 片段(1400bp)PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplified product of *Cu-MT1*. M.1kb plus DNA ladder; 1.PCR products.

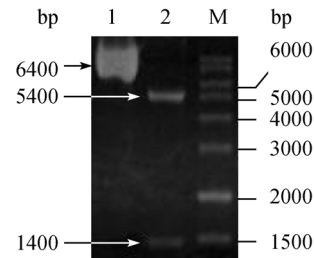


图 5 重组质粒 pSH-CUP 及酶切分析

Fig. 5 Restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmid pSH-CUP. 1.pSH-CUP; 2. pSH-CUP(*Nco* I/*Kpn* I) M.1kb plus DNA ladder.

2.4 面包酵母 *S.cerevisiae* BY-6 转化子的获得及鉴定
采用电转化法将重组质粒 pSH-CUP 转化面包酵母 *S.cerevisiae* BY-6(*ATH*, *G418^r*) 转化子中, *S.cerevisiae* BY-6 在含 7.5mmol/L $CuSO_4$ 的 YEPD 平板上不能生长, 因此选择含 8.0mmol/L $CuSO_4$ 的 YEPD 平板用于转化子的筛选。从 8.0mmol/L $CuSO_4$ 的 YEPD 平

板上随机挑选 5 个转化子, 测定其铜抗性(图 6)。转化子均可以在 9.0mmol/LCuSO₄ 的 YEPD 平板上生长, 而亲本 *S. cerevisiae* BY-6 不能在此 CuSO₄ 浓度平板上生长, 初步证明重组质粒 pSH-CUP 成功转入到 *S. cerevisiae* BY-6(ATH, G418^r) 菌株中。过夜培养酵母转化子, 从中提取质粒并进行酶切分析(图 7), 再次证实了质粒 pSH-CUP 的确转到 *S. cerevisiae* BY-6(ATH, G418^r) 菌株中。

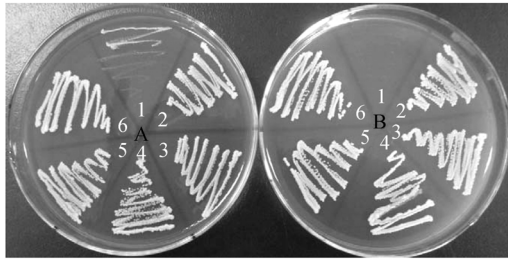


图 6 面包酵母及转化子铜抗性的测定

Fig. 6 The test of copper resistance of baker's yeast (*S. cerevisiae* strain BY-6) and transformants. A: YEPD(CuSO₄, 7.5mmol/L); B: YEPD (CuSO₄, 9.0 mmol/L) 1. Control; 2-6. Transformants.

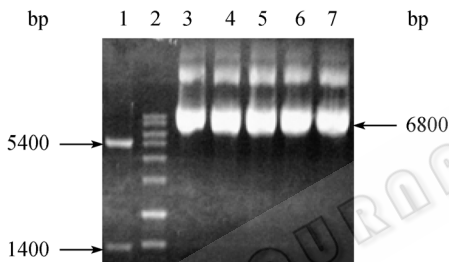


图 7 重组质粒 pSH-CUP 及其酶切分析

Fig. 7 Restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmid pSH-CUP. 1. pSH-CUP/(*Nco* I / *Kpn* I); 2. 1kb plus DNA ladder; 3-7. pSH-CUP.

2.5 kan^r 基因的去 除

根据方法 1.8 筛选 Kan^r 抗性标记丢失的菌株, 提取面包酵母 *S. cerevisiae* BY-6, *S. cerevisiae* strain BY-6(ATH, G418^r), *S. cerevisiae* strain BY-6(ATH, G418⁻) 的基因组, 并以此为模板, 分别以 P6、P7、P1、P2 和 P6、P7 为引物进行 PCR 扩增(图 8)。P6、P7 位于 ATH1 基因(3638bp)的上下游, 以亲本基因组为模板可以扩增出约 3600bp 的 ATH1 基因(1 号泳道)。外源 Kan^r 抗性片断(约 1600bp)进入酵母后同源替换 ATH1 基因内部约 2000bp 的序列, 因此以 *S. cerevisiae* strain BY-6(ATH, G418^r) 基因组为模板、以 P1、P2 为引物可以扩增出约 1600bp 的序列; 以 *S. cerevisiae* strain BY-6(ATH, G418⁻) 基因组为模板, 以 P6、P7 为引物进行 PCR 反应可以得到约 1600bp 的目的带(2 号和 3 号泳道)。由图 8 可知, PCR 扩增结果与预期大小一致。

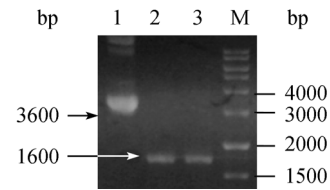


图 8 面包酵母 Kan^r 基因去除的 PCR 验证

Fig. 8 PCR confirmation of Kan^r gene removal of baker's yeast M. 1kb plus DNA ladder; 1. *S. cerevisiae* BY-6; 2. *S. cerevisiae* strain BY-6(ΔATH, G418^r) 3. *S. cerevisiae* strain BY-6(ΔATH, G418⁻).

3 讨论

本研究利用改进的 Cre/loxP 系统敲除了面包酵母 BY-6 的 ATH1 基因, 获得了面包酵母酸性海藻糖酶(ATH1)突变株, 实验证明此法可以用于野生型酵母基因的敲除。在本研究中, 将铜抗性基因片段 CUP-MTI 导入 Cre 重组酶的表达质粒 pSH47, 构建了重组质粒 pSH-CUP, 建立了以铜抗性作为筛选标记的基因敲除方法。相对于其他基因敲除方法, 本法具有操作简单、方便易行的特点。传统的基因敲除涉及多步重组, 步骤比较繁琐^[11]。Rothstein^[12]于 1983 年最早提出的一步基因中断法(one-step gene disruption), 只涉及外源基因片段与染色体上特定基因间一步重组, 即能产生一个基因破坏, 此法在酿酒酵母中已广泛应用。

PCR 介导的基因中断法^[13](PCR-mediated gene disruption)是 20 世纪 90 年代新发展起来的缺失突变株的制作方法, 该技术以一种酵母细菌的穿梭质粒为模板, 然后根据所要破坏的染色体 DNA 序列设计 PCR 引物, PCR 产物直接用于基因置换操作。1996 年, Ulrich GÜldener 等^[14]建立了 Cre 重组酶介导的 loxP-kanMX-loxP 基因敲除体系, 用于裂殖酵母基因组功能的研究。目前此法广泛应用于高等真核生物基因的敲除、基因功能的研究和人工抗体文库的构建等^[15-17]。

无论是一步基因中断法还是 PCR 介导的基因敲除, 都是利用营养缺陷型作为酵母转化子的筛选标记。对于大部分生产用的酿酒酵母, 其染色体具有多倍性, 很难获得营养缺陷型。此外, 面包酵母如果是营养缺陷型, 很有可能会影响发酵性能和面包的风味, 同时以营养缺陷型菌株对培养基要求苛刻, 而实际生产中天然的生产原料及粗放的生长条件也是不利于营养缺陷型菌株的培养, 因此利用营养缺陷型筛选酵母转化子是不合适的。本研究中改进的

loxP-kanMX-loxP 基因敲除体系, 铜抗性基因 *CUP-MTI* 来源于酵母, 以铜抗性基因作为筛选标记不仅避免了非酵母基因的引入、解决了酵母转化子筛选标记问题, 而且可用于野生型酵母基因的敲除。这对于耐冷冻工业面包酵母的筛选、海藻糖代谢机制及耐冷机理的研究, 具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Lorenz K, *et al.* Frozen dough-present trend and future outlook. *Bakers Digest*, 1974, 48: 14–22.
- [2] Attfield PV, *et al.* Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15: 1351–1357.
- [3] Fillinger S, Chaverroche MK, van Dijck P, *et al.* Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-Sgm*, 2001, 147: 1851–1862.
- [4] Nwaka S, Mechler B, Holzer H, Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett*, 1996, 386: 235–38.
- [5] Jules M, *et al.* Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2771–2778.
- [6] Beltran FF, *et al.* Role for trehalase during germination of spores in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Fems Microbiology Letters*, 2000, 193(1): 117–121.
- [7] John K, Parvaneh A, Tanya H, *et al.* Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration freezing and ethanol shock: potential commercial applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(5): 1563–1569.
- [8] Sambrook J, Russell D. 分子克隆试验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Adatns A, Gottschling D E, Kaiser C A, *et al.* 酵母遗传学方法实验指南, 刘子铎, 等译. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] 肖冬光, 邹静, 和东芹. 面包酵母酸性海藻糖酶活性测定. 食品与发酵工业 *Industries Food and Fermentation*, 2006, 32(9): 75–77.
- [11] Scherer S, Davis RD. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 72 (10): 4951–4955.
- [12] Rothstein R J. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 202 – 211.
- [13] Wach A. PC R-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *Saccharomyces*. *Yeast*, 1996, 12: 259–265.
- [14] Hegemann JH, Güldener U, Heck S, *et al.* A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(13): 2519–2524.
- [15] 李卫, 郭光沁, 郑国辑. Cre/loxP 系统介导的位点特异性重组技术及其应用生物技术通报 *Biotechnology Bulletin*, 2000, (1): 33–37.
- [16] Sauer B. Site-specific recombination: development and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, 5(5): 521–527.
- [17] Puchta H, Dujon B, Hohn B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 9(10): 5055–5056.

Constructing Recombinant Plasmid pSH-CUP and Knockout of Acid Trehalase Gene in Baker's Yeast

Dongqin He^{1,2}, Dongguang Xiao^{1*}, Ye Lv¹

⁽¹⁾ Industrial Microbiology Key Laboratory, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

⁽²⁾ Handan Vocation and Technology College, Handan 056001, China)

Abstract: The *ATH1* gene encoded acid trehalase in *Saccharomyces cerevisiae*. The gene disruption cassette combined the heterologous dominant *kan^r* resistance marker with a Cre/loxP-mediated marker removal procedure. The gene disruption cassette was produced by PCR using the same long oligonucleotides comprising 50 nucleotides that annealed to sites upstream or downstream of the genomic target sequence to be deleted. After transformation of the linear disruption cassettes with a Cre/loxP-mediated marker into the cells of *Saccharomyces cerevisiae* BY-6, selected transformants were checked by PCR for correct the integration of the cassette and concurrent deletion of the chromosomal target sequence. The copper-resistance gene (*CUP1-MTI*) was cloned into pSH47, which yielded pSH-CUP. The recombinant plasmid pSH-CUP was transformed into the cells of *Saccharomyces cerevisiae* BY-6(*ATH1*, G418^r), and transformants were selected for copper resistance. Upon expression of the Cre recombinase results in removal of the *kan^r* gene, leaving behind a single loxP site at the chromosomal locus. Construction of the recombinant plasmid pSH-CUP avoided inserting non-yeast gene and made the *loxP - kanMX - loxP* gene disruption cassette more conventional for eukaryotic organism gene disruption.

Keywords: baker's yeast; gene disruption; copper-resistance; constructing the recombinant plasmid pSH-CUP; acid trehalase

Supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20050057001)

*Corresponding Author. Tel: +86-22-60601397; Fax: +86-22-60602298; Email: xiao99@tust.edu.cn

Received: 17 May 2007/ Revised: 14 September 2007