

酵母SUC2基因的克隆

李育阳 李谐勋 彭秀玲

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

本文以酵母-大肠杆菌穿梭质粒YEP51为载体构建了酿酒酵母 *S. cerevisiae* 2,1168 的基因文库, 并用DNA分子杂交技术从这个基因文库取得了包括 SUC2 基因的克隆YFD6。本文还对YFD6中的SUC2基因在酵母细胞中的表达、YFD6的物理图谱以及SUC2基因在YFD6上的位置作了初步分析。

关键词 基因克隆; 蔗糖酶基因; 酵母

一些酵母可以利用蔗糖作为碳源和能源, 它们有分解蔗糖的蔗糖酶(或称转化酶)。在酿酒酵母中编码蔗糖酶的基因称为SUC基因。每个单倍体菌株可以有一个或几个SUC基因。有些菌株也可能没有SUC基因, 这种菌株就不能发酵利用蔗糖。从不同的酵母菌株中至今已有八个不同的SUC基因(SUC1—8)^[1,2], 它们在染色体上的位置各不一样。

酵母产生的蔗糖酶有两种^[3-5]: 一种是糖基化了的酶, 此酶可分泌至细胞的周质空间(Periplasmic space)。被称为外酶。另一种是非糖基化的酶, 此酶存在于细胞内, 所以被称为内酶。两种蔗糖酶由共同的DNA片段编码, 但是在转录时从不同的位置开始, 因而有两种mRNA, 长度分别为1.8kb和1.9kb^[6]。有关两种蔗糖酶基因的表达调控机制还不十分清楚。

鉴于可分泌的蔗糖酶具有信号肽, 并在分泌过程中能使蛋白完成糖基化。用这个酶研究信号肽结构与酶蛋白分泌之间的关系是一个很好的模型。

另外, 在遗传工程中迫切需要能使表达产物分泌的载体受体系统。蔗糖酶的启

动子和信号肽可以用来构建这类载体受体系统。

1982年Carlson和Botstein已经用互补法克隆了SUC2基因^[6], 后来又做了这个基因的核苷酸顺序分析^[7]。我们试图从一株有SUC2基因的酿酒酵母, 以分子杂交方法克隆这个基因, 为进一步研究SUC2基因的表达调控、构建分泌型表达载体建立基础。

材料与方法

(一) 菌株和质粒

Saccharomyces cerevisiae 2,1168由杭州大学生物系赠送。这是一株带SUC2基因的酿酒酵母, 在本研究中作为SUC2基因的供体。

Saccharomyces cerevisiae ho27B是一株不产蔗糖酶、不能以蔗糖为唯一碳源生长的菌株。还带有ade8、leu2、his4三重营养缺陷标记。

E. coli C600作为大肠杆菌质粒转化的受体菌。

本文于1985年4月17日收到。

孙健、赵家刚两同志参加部分实验工作。

YEP51 是一个既可以在酵母细胞内又可以在大肠杆菌内复制的穿梭质粒载体^[8]。

(二) 酵母总DNA的提取

按照Cryer 等的方法^[9]，每500ml YEPD培养物可得约5mg酵母DNA。

(三) 酵母DNA用内切酶Mbo I 的部分酶解

按文献[10]进行。先做部分酶切用酶量的预备试验，然后进行放大。放大反应中用酵母DNA 300 μ g，Mbo I (Biolabs 产品) 100 单位，总体积 1.5ml。酶切后DNA经10—40%蔗糖梯度离心分离不同长度的组分。取5—10kb的组分进行透析和沉淀，最后溶解于90 μ l TE (10mM Tris-HCl/1mM EDTA) 中待用。

(四) 载体DNA的制备

载体YEP51 DNA用氯化铯密度梯度离心制备。DNA经Sephrose 2B柱进一步纯化。DNA用BamHI (Biolabs 产品) 酶切，反应采用中盐缓冲液系统^[10]。酶切反应完全后，DNA用酚、氯仿、异戊醇抽提一次，氯仿、异戊醇抽提一次，然后用两倍体积无水乙醇沉淀，沉淀经洗涤和干燥后溶解于80 μ l水中。为了防止载体在T₄DNA连接酶作用时的自身环化，载体DNA再按文献[10]所述进行去磷反应，反应中所用的牛肠磷酸酯酶(CIP)为德国Bohringer mannheim 产品。70 μ g DNA加30 单位CIP，反应体积为83 μ l，37 $^{\circ}$ C反应30min。

(五) 连接反应

反应系统里有载体DNA 2 μ g，长度为5—10kb的酵母DNA 2 μ g，T₄DNA连接酶5 单位，反应总体积为30 μ l。缓冲液中有66mM Tris-HCl (pH7.5)/5mM MgCl₂/5mM β 巯基乙醇/1mMATP。

(六) 质粒DNA的转化

大肠杆菌的转化按略加修改的Mandel和Higa法进行^[11]。酵母转化按略有修改的Beggs方法进行^[12]。

(七) 菌落原位杂交

按文献[10]进行。

(八) 基因文库的保存

每个长有500个左右转化菌落的平板加3ml LB (内含100 μ g/ml的氨苄青霉素)，轻轻刮下，共收集约4.5万个独立的克隆。混合均匀后，分装于菌种小管，并和等体积的甘油混合，保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱。

(九) 蔗糖酶活力的测定

菌种先在10ml SD-1eu培养液中生长至A₆₀₀约为0.5，改换只含有0.05%葡萄糖的SD-1eu培养基，进行蔗糖酶的诱导。诱导时间为2.5h，诱导结束后以离心收集菌体，细胞被悬浮在6ml 250mM Tris磷酸缓冲液中，再用超声波破碎细胞。取0.1ml无细胞制剂按Hackel法^[4]测定样品的蔗糖酶活力，以每分钟每毫升A₆₀₀为0.5的发酵液菌体水解产生1nM葡萄糖的酶活力定为1单位。

结果与讨论

(一) 酵母基因库的构建

1. 酵母DNA用Mbo I 部分酶切，酶切后的DNA经蔗糖梯度离心，分部收集，各分部DNA片段的大小见图版I-2。从图中可知第10管及第11管的DNA片段大小在5—10kb之间。

2. 载体DNA经BamHI酶切后，为了防止在连接反应中自身环化，我们用了小牛小肠磷酸酯酶(CIP)去末端磷。实验证明去磷后载体DNA分子的自身环化明显下降。实验结果见表1。

从结果看转化系统的转化效率在

>10⁶转化子/μg DNA。质粒载体DNA的BamH I酶切片段经 CIP 处理,再用 T₄ DNA 连接酶连接,其自身环化的比例仅为 3%左右。

3. 载体 DNA 和 经部分酶切的酵母 DNA 连接,转化后共得到约 4.5 × 10⁴ 个独立的克隆。随机挑取部分克隆,用快速细胞破碎法^[13]检查所含质粒 DNA 的分子大小。从结果可知约有 80% 以上克隆具有插入片段,见图版 I-4。

(二) 菌落原位杂交

将包含 SUC2 基因部分序列的 DNA 片段用 ³²P 标记,对约 1.2 × 10⁴ 个克隆按文献[10]所述方法进行菌落原位杂交,得到上百个杂交强度不一的菌落。选取其中 12 个杂交较强的菌落进行单菌落分离,对分离出的单菌落再以同样的探针进行复证,共选出 6 个表现强杂交的克隆(编号为 1—6)。图版 I-5 为部分单菌落的放射自显影图。

(三) 阳性克隆中的质粒 DNA 被转化进酵母株 ho27B 后转化子产生蔗糖酶情况

表 1 大肠杆菌转化的效率

Table 1 The efficiency of *E. coli* transformation

| DNA 样品 DNA sample for transformation | 转化子/皿* Number of transformants per plate |
|--|---|
| 0.8 微克 YEP51 DNA, BamH I 酶切 0.8 μg YEP51 DNA, BamH I digestion | 108 |
| 0.5 微克 YEP51 DNA, BamH I 酶切, 连接 0.5 μg YEP51 DNA, BamH I digestion, ligation | 5600 |
| 0.5 微克 YEP51 DNA, BamH I 酶切, CIP 去磷, 连接 0.5 μg YEP51 DNA, BamH I digestion, CIP dephosphorylation, ligation | 293 |
| 0.25 μg YEP51 DNA 0.25 μg YEP51 DNA | 10000 |
| 0.25 μg pBR322 DNA 0.25 μg pBR322 DNA | 10000 |
| 不加 DNA No DNA | 0 |

* 每皿加 1/30 转化混合物。

* 1/30 of transformation mixture was added in a plate.

表 2 酵母转化子蔗糖酶活力的测定

Table 2 Invertase activity of the transformants

| 菌株 Strain | ho27B | 2.1168 | ho27B (YFD1) | ho27B (YFD2) | ho27B (YFD3) | ho27B (YFD4) | ho27B (YFD5) | ho27B (YFD6) | ho27B (YED6 ⁻) |
|--------------------------------|-------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| 酶活力(单位) Activity (units) | 0 | 192 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 434 | 0 |

* ho27B(YFD6⁻) is the strain in which plasmid YFD6 has been eliminated from ho27B (YFD6).

从 6 个表现强杂交的克隆株分离相应的质粒 DNA (YFD1-6), 这些质粒的酵母转化子产生蔗糖酶的情况如表 2 所示。从表 2 中可以看出只有 YFD6 的转化子产生蔗糖酶, 其产酶能力要比供体 *S. cerevisiae* 2.1168 的高一倍半左右。

YFD6 的酵母转化子在非选择培养基 (YEFD) 上生长, 质粒在细胞内的存在是不稳定的。因此可以很容易地取得消除了质粒的菌株。对这种菌株进行蔗糖酶活力的测定, 结果表明消除了质粒的酵母又不产生蔗糖酶了, 见表 2。由此证明质粒 YFD6 上确实带有 SUC2 基因。

我们从 6 个强阳性克隆中只得到 1 个带有 SUC2 基因的克隆。其余克隆虽然能同探针 DNA 杂交, 但当把它的质粒 DNA 转化进不产生蔗糖酶的受体菌 ho27B 时, 并不能改变其不产蔗糖酶的性质。其原因可能是因为这些克隆的插入片段中只有不完整的 SUC2 基因, 也可能是因为这些克隆中包含的是一个不表达的所谓“沉默基因” (Silent gene) [14]。

(四) 质粒 YFD6 的物理图谱

质粒 YFD6 经各种限制性内切酶单切或双切后的电泳图见图版 I-1, 3

1. 质粒 YFD6 的大小: 从图版 I-1, 3 的分子量标准可以估计出电泳图中各酶切片段的大小。每一种酶切各片段的总和就是 YFD6 的大小。从 13 种不同酶切图测得的 YFD6 分子大小的平均值为 12.7 ± 0.41 kb。因为载体 YFD51 大小为 7.3 kb, 所以在 YFD6 中插入片段应为 5.4 kb, 见表 3。

2. 质粒 YFD6 中 SUC2 基因位置的估计: 由于质粒 YFD6 上只有一个 BamH I 切点 (图版 I-1 中的 a), 已知载体上并没有 BamH I 切点, 所以这个切点一定位于插入片段内。又因为 BamH I 和 Sal I

双切产生 2.8 kb 片段, 所以 BamH I 的位置就可以确定了。

质粒 YFD6 有两个 Hpa I 切点, 酶切后得到 7.6 kb 和 5.3 kb 两个片段 (图版 I-1 中 h)。已知载体上有一个 Hpa I 切点, 所以另一个切点应当在插入片段上。又因用 Sal I 和 Hpa I 双切, 7.6 kb 的 Hpa I 片段变为 5.2 kb 和 2.4 kb, 可见 Hpa I 在插入片段中的切点位于离 Sal I 切点 2.4 kb 处。

质粒 YFD6 上经 Xba I 酶切得到 9.1 和 4.1 kb 两个片段 (图版 I-1 中 f)。已知载体上有一个 Xba I 切点, 又因用 Sal I 和 Xba I 双切时 9.1 kb Xba I 片段变为 5.4 kb 和 2.7 kb 两个片段, 可见 Xba I 在插入片段中的切点位于离 Sal I 切点 2.7 kb 处。按文献 [7] 报道, 在 SUC2 编码区有一个 BamH I、一个 Xba I 和一个 Hpa I 切点, 分别在从编码区开始的第 787、829 和 1190

表 3 质粒 YFD6 的大小

Table 3 The size of plasmid YFD6

| 酶切类型 Type of digestion | 片段大小 Size of fragments(kb) | 总和 Total (kb) |
|---------------------------|-------------------------------|------------------|
| BamH I | 12.1 | 12.1 |
| BamH I, Sal I | 9.2 2.8 | 12.0 |
| Sal I | 12.3 | 12.3 |
| Sal I, Xba I | 5.8 4.0 2.7 | 12.5 |
| Xba I | 9.1 4.1 | 13.2 |
| Hpa I, Sal I | 5.3 5.3 2.4 | 13.0 |
| Hpa I | 7.6 5.3 | 12.9 |
| EcoR I | 4.0 3.3 2.0 1.7 1.5 | 12.5 |
| Hind III | 7.0 2.0 1.4 1.2 1.0 | 12.6 |
| Hind III, EcoR I | 3.3 2.0 2.0 1.7 1.4 1.2 0.8 | 12.4 |
| Hind III, BamH I | 7.3 1.5 1.3 1.3 1.0 0.8 | 13.2 |
| EcoR I, Sal I | 4.1 3.3 2.2 1.6 1.4 0.5 | 13.1 |
| EcoR I, BamH I | 3.3 2.3 2.2 1.8 1.6 1.6 | 12.8 |

平均值

Average 12.7 ± 0.4

个核苷酸上。在 YFD6 上的 BamH I、Xba I 和 Hpa I 三个切点的相对位置与此

顺序基本相同。又因为 BamH I 分别在 EcoR I 酶切的 4.0kb 及 Hind III 酶切的 2.0kb 片段上 (图版 I-3 中 d,f), 因此 YFD6 上的 SUC2 基因估计就在 4.0kb 的 EcoR I 片段上, 而 2.0kb 的 Hind III 片段上则应包括 SUC2 基因编码区的主要部分。证明这一点的亚克隆工作正在进行之中。

3. 按照文献报道有关 SUC2 基因的邻接顺序及 Hind III、EcoR I 酶切所得的片段大小, 可以定出 Hind III 及 EcoR I 切点的位置, 从而可以初步确定 YFD6 的物理图谱 (见图 1)。

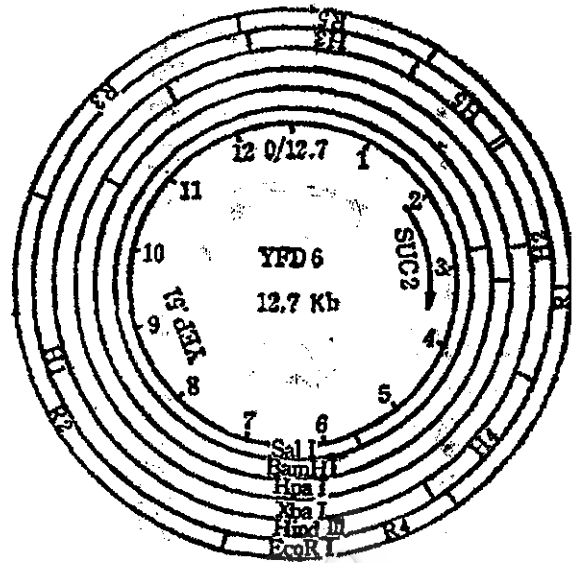


图 1 质粒 YFD6 的物理图谱
Fig. 1 Physical map of plasmid YFD6

参 考 文 献

- (1) Carlson, M. et al.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45:799-803, 1980.
- (2) Broach, J.R.: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* Metabolism and Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory p.704, 1982.
- (3) Carlson, M. et al.: *Genetics*, 98:25-41, 1981.
- (4) Hackel, R.A.: *Mol. Gen. Genet.*, 140:361-370, 1975.
- (5) Grossman, M.K. and Zimmermann, F.K.: *Mol. Gen. Genet.*, 175:223-229, 1979.
- (6) Carlson, M. and Botstein, D.: *Cell*, 28:145-154, 1982.
- (7) Taussig, R. and Carlson, M.: *Nucleic Acids Research*, 11:1943-1954, 1983.
- (8) Broach, J.R. et al.: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Masayori Inouye, ed, New York, Academic Press, pp.83-117, 1983.
- (9) Cryer, D.R. et al.: *Method in Cell Biology*, Vol. VII Precott, ed, New York, Academic Press, pp.39-44.
- (10) Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- (11) Mandel, M. and Higa, A.: *J. Mol. Biol.*, 53:159, 1970.
- (12) Beggs, J.D.: *Nature*, 275:104-109, 1978.
- (13) Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Research*, 7:1513-1523, 1979.
- (14) Carlson, M. et al.: *Genetics*, 98:41-54, 1981.

THE CLONING OF YEAST SUC2 GENE

Li Yuyang Li Xiexun Pen Xiuling
(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai)

By using the yeast-*E. coli* shuttle vector YEP51, a gene library of *S. cerevisiae* 2,1168 was constructed. By means of DNA hybridization technique a SUC2 gene containing clone was fished out from the library. The expression of SUC2 gene of YFD6 in yeast, the physical map of YFD6 and the localization of SUC2 gene on YFD6 were preliminarily studied.

Key words

Gene cloning; invertase gene; yeast

图版说明

1. 质粒YFD6 DNA酶切样品电泳图 (1)
2. Mbo I 部分酶切的酵母DNA经蔗糖梯度离心后分部的电泳图
a. 第16管, b. 第14管, c. 第12管, d. λ DNA Bam H I, e. 第10管, f. 第8管
3. 质粒YFD6 DNA酶切样品的电泳图 (2)
4. 转化子质粒DNA分子的大小
1-5, 7-12为不同的转化子, 6. 为YEP51 (对照) 0.8%琼脂糖凝胶
5. 菌落杂交放射自显影图, 箭头所指系阳性对照菌落
1. Restriction endonuclease mapping of plasmid YFD6 (1)

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| a. YFD6 DNA BamH I | e. λ DNA Hind III |
| b. YFD6 DNA BamH I, Sal I | f. YFD6 DNA Xba I |
| c. YFD6 DNA Sal I | g. YFD6 DNA Hpa I, Sal I |
| d. YFD6 DNA Xba I, Sal I | h. YFD6 DNA Hpa I |

 1.0% agarose gel.
2. The sizing of Mbo I partially digested yeast DNA by sucrose gradient centrifugation.
a. Tube No.16, b. No.14, c. No.12, d. λ DNA BamH I e. No.10, f. No.8
3. Restriction endonuclease mapping of plasmid YFD(2)

| | |
|------------------------------|------------------------------|
| a. YFD6 DNA EcoR I | e. λ DNA Hind III |
| b. YFD6 DNA Hind III | f. YFD6 DNA Hind III, BamH I |
| c. YFD6 DNA Hind III, EcoR I | g. YFD6 DNA EcoR I, Sal I |
| d. YFD6 DNA BamH I, EcoR I | h. YFD6 DNA Xba I |

 1.0% agarose gel.
4. The size of plasmid DNA in the transformants 1-5, 7-12 are from different transformants.
6 is YEP51 as a control. 0.8% agarose gel
5. Radioautograph of colony hybridization, arrow points to the positive control.

