

粗糙脉孢霉 *arg* 13 cDNA 能互补 酿酒酵母 *arg* 11 突变株^{*}

刘秋云, 罗 樾, 蒋一帆, 何康泽, 李宝健

(中山大学基因工程教育部重点实验室 // 生物工程研究中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 以粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa arg* -13 基因作为探针筛选 λ gt10 cDNA 文库, 获得全长 *arg* -13 cDNA 并能表型拯救 *arg* -13 突变株. 进行了 *arg* -13 cDNA 测序. 为了进一步证实 *arg* -13 的功能. 构建了 GAL1 诱导表达的 *arg* -13 cDNA 的载体. 该载体能表型互补酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae arg* 11 突变株. 证实 *arg* -13 编码线粒体内膜鸟氨酸转氨酶. 并表明酵母线粒体膜易位蛋白复合物能定位粗糙脉孢霉线粒体内膜蛋白质.

关键词: *arg* -13; *arg* 11; 线粒体内膜鸟氨酸转氨酶; cDNA; 表型互补

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 05-0055-04

粗糙脉孢霉精氨酸合成代谢在线粒体和细胞质进行. 分解代谢在细胞质进行^[1, 4]. 鸟氨酸为合成代谢与分解代谢的共同中间产物. 在线粒体合成的鸟氨酸是瓜氨酸合成的前体. 亦可输出线粒体用于多胺合成. 细胞质精氨酸分解代谢产生的鸟氨酸也可进入线粒体.

arg 13 是粗糙脉孢霉精氨酸代谢途径的一个渗漏突变株. 我们已克隆了该基因^[3]. 序列分析表明其含有线粒体内膜转氨酶的特征序列. 即线粒体能量转移指纹. *arg* -13 能抑制 *pyr* - 3 ($\text{CPS}^- \text{ACT}^+$) 突变株^[4]. 在线粒体合成的氨甲酰磷酸与鸟氨酸用于瓜氨酸合成. 而在核合成的氨甲酰磷酸则最终用于嘧啶合成. *pyr* - 3 ($\text{CPS}^- \text{ACT}^+$) 突变株不能合成氨甲酰磷酸. 但如果线粒体能够积累氨甲酰磷酸. 则其能溢流入核抑制 *pyr* - 3 ($\text{CPS}^- \text{ACT}^+$) 突变. 凡是能够降低线粒体鸟氨酸库而减慢瓜氨酸合成. 导致氨甲酰磷酸积累的突变均能抑制 *pyr* - 3 ($\text{CPS}^- \text{ACT}^+$) 突变. *arg* -13 突变株对鸟氨酸的利用较差而对瓜氨酸和精氨酸的利用较好. 而且. 用于 *arg* 13 基因克隆的选择方法采用了鸟氨酸与赖氨酸. 省略了其它氮源^[3]. 这意味着存在亚细胞水平碱性氨基酸的区域化或过膜转运的相互抑

制. 所有这些数据提示 *arg* -13 可能编码线粒体碱性氨基酸转氨酶. 其缺陷可能导致线粒体鸟氨酸浓度降低.

arg -4 阻断了线粒体鸟氨酸合成. *arg* 4, *arg* -13 双突变株仍能利用鸟氨酸生长. 但受赖氨酸与刀豆氨酸强烈抑制^[3]. 这意味着还有另外的线粒体碱性氨基酸转氨酶系统运输鸟氨酸.

酿酒酵母 *arg* 11 基因的产物亦具有线粒体内膜转氨酶的特征序列. 并存在于线粒体内膜. 利用在大肠杆菌表达并纯化的蛋白质进行脂质体重组实验证明其编码线粒体鸟氨酸转氨酶^[6, 7]. 并能以较低的亲和力转运精氨酸与赖氨酸. 其功能主要是将酵母线粒体合成的鸟氨酸运出线粒体在细胞质合成瓜氨酸. *arg* 11 和 *arg* -13 蛋白有 39.3% 的同源性. 如果 *arg* -13 cDNA 能够表型互补酿酒酵母 *arg* 11 突变株. 这将给 *arg* -13 的功能提供一个有力的证据.

1 材料和方法

1.1 材 料

粗糙脉孢霉菌株 60-14 al-2, *arg* -13 a 为本实验室藏. 酿酒酵母双突变株 1c1636d *arg* 11, *ura* 3 和酵母载体 pFL4404^[8] 为比利时 Oriane

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070420); 教育部高等学校骨干教师计划资助项目 (2000-061-314301); 广东省自然科学基金资助项目 (980303)

收稿日期: 2001-03-27; 作者简介: 刘秋云 (1963-), 男, 副研究员.

Soetens 馈赠。酵母载体 pYX133 从康乃尔大学曹维国处获得。

1.2 *arg-13* cDNA 克隆

粗糙脉孢霉 λ gt10 cDNA 文库的所有 cDNA 插入片段均加上了 *EcoR* I 接头并插入 λ gt10 *EcoR* I 位点。用含有 *arg-13* 基因的 2.0 kb *EcoR* I / *Kpn* I 片段作为探针。共筛选了 400 000 噬菌体。4 轮纯化之后筛选到 6 个 cDNA 克隆。

1.3 粗糙脉孢霉转化

见文献 [9, 10]。

1.4 *arg-13* cDNA 全自动测序

arg-13 cDNA 长 2.0 kb。将 *arg-13* cDNA 克隆进 SK⁺。全自动测序。

1.5 酵母表达载体构建

去掉 *arg-13* cDNA 转录起始端 0.2 kb 部分。能表型拯救 *arg-13* 突变株的 1.4 kb 最小基因组片段不包括该部分。将 1.9 kb *EcoR* I 片段克隆进酵母表达载体 pYX133 的 *EcoR* I 位点。置于 GAL1 启动子控制之下。用 cDNA 上的 *EcoR* V 与载体上的 *EcoR* V 位点之间切割片段的大小确定插入方向。获得两个正向插入克隆。

1.6 酵母转化^[11, 12]

酵母选择培养基为 SD 培养基 (含 0.1 mol/L (NH₄)₂SO₄)。在低氮源时 *arg11* 生长很差。加入质量终浓度为 100 mg/L 赖氨酸只在初期对 *arg11* 生长略有抑制。然后抑制消失。10 d 后反而略有促进作用。表型互补时用 $\omega=2\%$ 半乳糖作碳源并诱导 *arg-13* 表达。

转化程序如下: 接种 *arg11*, *ura3* 于 10 mL YPD 培养基。28 °C 生长 24 h。取 1 mL, 接种 50 mL YPD。生长 4~5 h。达 2×10^7 细胞/mL (约 $A_{600}=1$)。酵母转化见文献 [1, 2]。采用 42 °C 热激 15 min。离心 5 s。去上清。用 1 mL 水洗。离心。用水悬浮。涂 SD 选择培养基平板。28 °C 生长。

1.7 酵母质粒提取^[13]、PCR 扩增与指纹分析

PCR 引物为:

1. ATGGACTCCGTACCAG;

2. CTC AAGCCATAGGAAA。

扩增完整的 1.1 kb *arg-13* 读码框。扩增条件为: 94 °C 1 min。54 °C 1 min。72 °C 1.5 min。扩增产物用异丙醇沉淀。再用 *Sac* I、*Sau*3A I 等

酶做 DNA 指纹分析。

2 结 果

2.1 粗糙脉孢霉 *arg-13* cDNA 克隆与全自动测序

通过噬菌体噬斑原位杂交筛选粗糙脉孢霉 λ gt10 cDNA 文库, 获得 6 个 cDNA 克隆。其中四个克隆能与 0.83 kb *EcoR* I / *Bgl* II *arg-13* 片段杂交。只有一个能够表型拯救 *arg-13* 突变株。其长度为 2.0 kb。*arg-13* mRNA 长约 2.1 kb (含 polyA 尾巴)。将 *arg-13* cDNA 克隆进 SK⁺。全自动测序序列登录国际基因数据库 (GenBank 收录号 AF279268)。

通过与粗糙脉孢霉基因组克隆的序列^[3]比较。证实了一个 0.06 kb 的内含子的存在。基因克隆表明—1.4 kb 最小基因组片段能表型拯救 *arg-13* 突变株^[3]。与 mRNA 比较。该片段从基因的 5' 与 3' 均截短。

2.2 *arg-13* 的酿酒酵母表达载体构建

去掉 *arg-13* cDNA 转录起始端 0.2 kb 部分。将 1.9 kb 片段克隆进酵母表达载体 pYX133 的 *EcoR* I 位点。置于 GAL1 启动子控制之下。获得两个正向插入克隆 pYXA5 和 pYXA6 (图 1)。

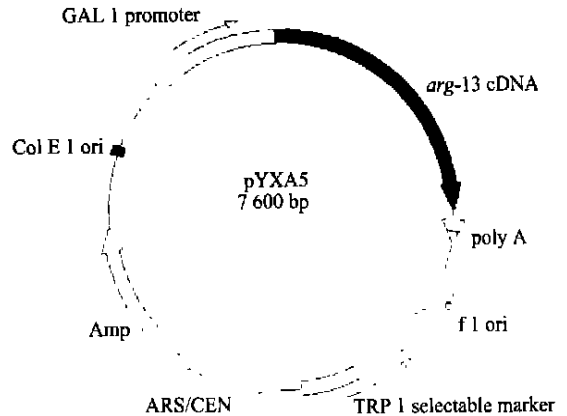


图 1 酵母表达载体 pYXA5 的示意图

Fig 1 The physical map of pYXA5

2.3 酿酒酵母 *arg11* 突变株表型互补

pYXA5 含有 TRP1 选择基因 (合成色氨酸) 而转化受体为 *arg11*, *ura3* 双突变株。故采用共转化策略进行表型互补 (表 1)。用于共转化的 pFL4404 含有 URA3 选择基因。双重筛选有利于去掉 *arg11* 的渗漏生长。第 1 次转化用 1.2 μ g pFL4404/1.0 μ g pYXA5。选择培养基另加了 100 mg/L 赖氨酸。生长 7~10 d 后。得到 2 个菌落

及许多小菌落。第 2 次转化用 1.5 μ g pFL4404/2.0 μ g pYXA5。选择培养基不加赖氨酸。生长 7~10 d 后, 得到 3 个菌落。第 1 次转化出现很多小菌落可能是因为加入的赖氨酸在后期有促进转化子生长的作用。将第 1 次转化一大一小两菌落分别稀释并涂布至诱导培养基半乳糖/SD 和非诱导培养基葡萄糖/SD 上。转化子均生长迅速。28 $^{\circ}$ C 4 d 即可见菌落。在半乳糖/SD 的菌落较非诱导培养基葡萄糖/SD 要略大一些。每个转化子在两种培养基的菌落数目相似。负对照 *arg*11, *ura*3 仅在葡萄糖/SD/尿嘧啶培养基上缓慢生长。在半乳糖/SD/尿嘧啶培养基上不生长。表明半乳糖为较葡萄糖差的碳源。单质粒每 μ g 的转化效率为: pFL4404, 5333 个; pYXA5, 210 个。

pYXA5 为 *cen* 型载体。拷贝数很低。提取酵母质粒后。PCR 扩增出 1.1 kb 的片段。用 *Sac* I、*Sau* 3A I 等酶做指纹分析。结果表明来源于转化子的质粒与对照质粒 pYXA5 的扩增产物的指纹完全一致。

表 1 *arg*-13 *cDNA* 对酿酒酵母 *arg* 11 突变株的表型互补¹⁾

Tab. 1 Phenotypic complementation of *arg*11 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* by *arg*-13 *cDNA* of *Neurospora crassa*

项目	菌落数 (第 1 次转化)	菌落数 (第 2 次转化)
—	0	0
pFL4404	0	0
PYXA5	0	0
pFL4404/pYX5	2+33 small colonies	3

1) 1.2 μ g pFL4404 和 1.0 μ g pYXA5 用于第 1 次转化;
1.5 μ g pFL4404 和 2.0 μ g pYXA5 用于第 2 次转化

3 讨 论

arg 13 *cDNA* 为全长 *cDNA*。通过与基因组 DNA 以及预测读码框比较。它有 0.36 kb 的 5' 不翻译区和达 0.52 kb 的 3' 不翻译区。

arg 11 与 *arg* 13 蛋白质有 39.3% 的同源性。*arg*11 编码酿酒酵母线粒体鸟氨酸转运酶。如果 *arg* 13 *cDNA* 能够表型互补 *arg*11 突变株。这将是对其功能的一个有力证明。*arg* 11 蛋白质有较精氨酸、赖氨酸为高的鸟氨酸亲和力。*arg* 11 突变株携带有额外的碱性氨基酸转运酶活力^[14]。由其它的碱性氨基酸转运酶介导。但其不足以完

全补偿 *arg* 11 突变所产生的鸟氨酸过膜转运缺陷。故 *arg*11 突变株表现为渗漏型。*arg*-13 *cDNA* 的酵母转化子能在诱导培养基半乳糖/SD 与非诱导培养基葡萄糖/SD 生长。只是在前一种培养基菌落略大一些。与葡萄糖相比。半乳糖能诱导 GAL 1 启动子表达几百倍之多。但转化子在两种培养基上生长差异不大。说明在非诱导培养基(葡萄糖/SD)低水平的基础表达能够提供足够的 *arg*-13 蛋白质补偿 *arg* 11 突变。这也表明 *arg* 13 蛋白应有较高的鸟氨酸亲和力。共转化时。由于有 *ura* 3 的额外选择。*arg*11, *ura* 3 双突变株基本没有渗漏生长。

线粒体鸟氨酸转运酶基因属线粒体代谢物转运酶超家族。它们具有共同的结构特征。即具有长度约为 100 氨基酸的结构相关的三重重复结构^[16]。每个蛋白质有 6 个过膜 α 螺旋。功能复合物为同源二聚体。在线粒体膜易位系统作用下内膜蛋白质能正确定位^[17]。*arg*-13 蛋白质能被正确定位在酿酒酵母线粒体内膜上。说明粗糙脉孢霉的线粒体膜易位复合物与酿酒酵母具有相当同源性。这将有助于分离相应的粗糙脉孢霉基因。研究线粒体内膜蛋白易位与定位过程。

参考文献:

[1] DAVIS R H, WEISS R L. Novel mechanisms controlling arginine metabolism in *Neurospora* [J]. Trends Biochem Sci, 1988, 13: 101—104.

[2] DAVIS R H. Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathway of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiol Revs, 1986, 50(3): 280—313.

[3] LIU Q, DUNLAP J C. Isolation and analysis of the *arg*-13 gene of *Neurospora crassa* [J]. Genetics, 1996, 143: 1163—1174.

[4] MCDOUGALL K J, WOODWARD V W. Suppression of arginine and pyrimidine requiring mutants of *Neurospora crassa* [J]. Genetics, 1965, 52: 397—406.

[5] 刘秋云, DUNLAP J C. *arg*-13 is implicated in mitochondrial ornithine transport in *Neurospora crassa* [J]. 实验生物学报. 1998, 31(4): 347—352.

[6] CRADEEL M, SOETENS O, RIJCKE M D et al. The ARG 11 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial integral membrane protein required for arginine biosynthesis [J]. J Biol Chem, 1996, 271(40): 25011—25018.

- [7] PALNIERI L, MARCO V D, IACOBACCI V, et al. Identification of the yeast *arg11* gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis[J]. FEBS Letters, 1997, 410: 447—451.
- [8] BONNEAUD N, OZIER—KALOGEROPOULOS O, LI G, et al. A family of low and high copy replicative integrative and single stranded *Saccharomyces cerevisiae*/*E. coli* shuttle vector[J]. Yeast, 1991, 7: 609—615.
- [9] VOLLMER S J, YANOFSKY C. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 4869—4873.
- [10] LIU Q, DUNLAP J C. A rapid and efficient approach for *Neurospora crassa* transformation[J]. Fungal Genetics Newsletter, 1988, 35: 24—25.
- [11] ITO H, FUKUDA Y, MURATA K, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations[J]. J Bacteriol, 1983, 153(1): 163—168.
- [12] TRANSY C, LEGRAIN P. The two-hybrid: an *in vivo* protein-protein interaction assay[J]. Molecular Biology Reports, 1995, 21: 119—127.
- [13] 倪津, 刘玉方, 蔡金科. 酵母菌基因工程载体—pCN 系杂种质粒的构建及其特性的研究[J]. 微生物学报, 1986, 26(2): 127—133.
- [14] SOETENS O, CRADEEL M, MOUALIJ B E L, et al. Transport of arginine and ornithine into isolated mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Eur J Biochem, 1998, 258: 702—709.
- [15] CAMACHO J A, Obie C, BIERY B, et al. Hypoorthinaemia-hyperammonaemia-homocitullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter[J]. Nature Genetics, 1999, 22: 151—158.
- [16] NELSON D R, FELIX C M, SWANSON J M. Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family[J]. J Mol Biol, 1998, 277: 285—308.
- [17] ENDRES M, NEUPERT W, BRUNNER M. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22—24 complex[J]. The EMBO J, 1999, 18(12): 3214—3221.

Phenotypic Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* *arg* 11 Mutant by *arg*-13 cDNA of *Neurospora crassa*

LIU Qiu-yun, LUO Xi, JIANG Yi-fan, HE Kang ze, LI Bao-jian

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of

Education // Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: Full length *arg* -13 cDNA has been cloned after screening a cDNA library with *arg* -13 gene as probe, and is capable of phenotypic rescuing *arg* -13 mutant. To further confirm *arg* -13's function, an inducible vector of *arg* -13 cDNA driven by GAL 1 promoter has been constructed, and phenotypic complement *arg* 11 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, indicating that *arg* -13 encodes mitochondrial inner membrane ornithine carrier. The data also indicates that yeast mitochondrial translocation machinery can target mitochondrial inner membrane proteins of *Neurospora*.

Keywords: *arg* -13; *arg* 11; mitochondrial ornithine carrier; cDNA; phenotypic complementation