

波氏假丝酵母启动子的克隆及新霉素基因的表达*

徐柏年, 吴江雪, 李文清, 罗进贤

(中山大学生命科学学院/生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要:报道了波氏假丝酵母(*Candida boidinii*)启动子的克隆, 将克隆的启动子与 Neo^r 基因重组构建了含 Neo^r 基因的表达载体 YEpNP181, 转化波氏假丝酵母, 实现了 Neo^r 基因在波氏假丝酵母中的表达, 使波氏假丝酵母转化子能在含 G418 的抗性培养基上生长从而建立了 Neo^r 基因——G418 选择系统, 为外源基因在波氏假丝酵母中表达创造了条件。

关键词: 启动子克隆; 假丝酵母; 新霉素抗性基因; 表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 01-0065-04

波氏假丝酵母(*Candida boidinii*)与汉逊酵母(*Hasenula*)、毕节酵母(*Pichia*)等是一类以甲醇为唯一碳源的酵母称为甲基营养酵母(*Methylotrophic yeast*)。这类酵母能将甲醇转化并积累各种代谢产物, 甲醇代谢的关键酶是催化甲醇氧化的醇氧化酶, 受甲醇的强烈诱导。甲醇是一种来源稳定、价格低廉的原料, 是一类很有发展前景的工业发酵菌种。90年代以来对汉逊酵母和毕节酵母做过较多的研究, 以醇氧化酶基因启动子构建表达载体并以甲醇诱导, 表达外源基因的水平可达细胞蛋白总量的30%^[1], 是一类比酿酒酵母更好的基因表达系统。波氏假丝酵母由于其强大的线粒体氧化磷酸化能力, 在甲醇培养基上积累柠檬酸, 产生ATP, 蛋氨酸, 甘油等的能力都优于其它甲基营养酵母^[2], 但作为基因表达系统的研究极少, 没有现成的突变菌株可供应用。通过诱变获得营养缺陷型菌株, 工作量大又很费时, 本研究首次通过波氏假丝酵母启动子的克隆, 实现新霉素抗性基因(Neo^r)在波氏假丝酵母中的表达, 用G418来筛选转化子, 探索用Neo^r作为波氏假丝酵母转化系统中的选择标记的可能性。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

野生型波氏假丝酵母由荷兰 Veenhuis 博士惠赠, 大肠杆菌 C600 为本室保存。启动子探针质粒 pHE5 由上海生化所提供。含 Neo^r 基因的质粒

YEpn181 为本室构建。

1.2 培养基

大肠杆菌的培养用 LB 培养基, 酵母培养和转化用的 YPD, YNB, SC 等培养基见文献 [3]。

1.3 主要的酶和试剂盒

各种限制酶, T4 DNA 连接酶, Klenow 酶等购自 GIBCO-BRL 公司, SephaglasTM Band Prep Kit 购自 Pharmacia 公司。

1.4 大肠杆菌质粒的提取

大肠杆菌质粒的提取, 酶切, 酶切片段的回收, DNA 的连接和转化均按文献 [4] 的方法。

1.5 假丝酵母质粒的提取

假丝酵母质粒提取参照 Sobanski 的方法^[5]。

1.6 假丝酵母染色体

提取按文献 [7] 的方法。

1.7 假丝酵母的转化

采用 LiAc 法^[6]。

1.8 新霉素磷酸转移酶活性测定

按 Platt 的方法^[8]。

2 结果

2.1 波氏假丝酵母对抗生素 G418 的敏感性分析

将波氏假丝酵母培养在含不同浓度 G418 的 YPD 液体培养基中定时取样, 在波长为 650 nm 处测定吸光度 (A_{650}), 绘出其生长曲线, 从图 1 可见, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 下, 波氏假丝酵母的生长受到完全抑制, 但在含 G418 的 YPD 平板上, 波氏假丝酵母的敏感的质量浓度达到 300 $\mu\text{g/mL}$ 。

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目资助项目 (970175)

收稿日期: 2000-05-16; 作者简介: 徐柏年 (1972-), 男, 硕士生; 通讯联系人: 罗进贤。

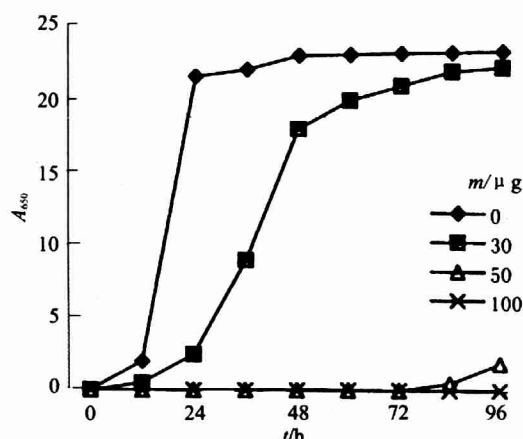


图 1 波氏假丝酵母在不同质量浓度的 G418 中的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *C. boidinii* in G418 culture

2.2 波氏假丝酵母启动子的克隆

为了弄清 G418 抗性基因 (Neo^r) 能否在波氏假丝酵母中表达, 曾将 Neo^r 克隆至大肠杆菌—酵母穿梭质粒 YEplac181 获得重组质粒 YEpN181 (构建图略), 分别转化酿酒酵母 GRF18 及波氏假丝酵母, 在含 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 YPD 平板上筛选转化子, 发现只在涂布了 GRF18 (YEpN181) 的平板上出现转化子, 表明带有本身启动子和终止位点的 Neo^r 基因可以在 GRF18 中表达而在波氏假丝酵母 (YEpN181) 的平板上不出现转化子, 显示 Neo^r 基因不能在波氏假丝酵母中表达. 因此, 本文试图克隆波氏假丝酵母本身的启动子以实现 Neo^r 基因的表达.

启动子探针质粒 pHE5 来源于质粒 pBR322, 其上的四环素抗性基因启动子被切除, 基因不能表达, 表现为四环素敏感, 若在其上游插入启动子, 则可恢复四环素抗性. 波氏假丝酵母启动子的克隆如图 2 所示, 用 *Hind* III 部分酶切波氏假丝酵母染色体, Sephaglas™ Band Prep Kit 回收 2~5 kb 片段, 与经 *Hind* III 酶切的质粒 pHE5 以 3:1 的比例混合, 用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 C600, 在含 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 和 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ Tc 的抗性平板上筛选 Amp^r 及 Tc^r 的转化子, 然后将这些转化子依次点于 Tc 的质量浓度为 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 平板上, 在含 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ Tc 的平板上随机挑出四环素抗性的转化子, 提取质粒并将之命名为 pHE982. 用 *Hind* III 酶切 pHE982, 可以得到 6.75 及 1.2 kb 两条带, 大带为 pHE5, 小带为克隆的波氏假丝酵母 DNA (图 3). 正是这个片段启动了 Tc^r 基因的表

达, 使转化子可以在含 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ Tc 的平板上生长, 故此片段即为波氏假丝酵母的启动子.

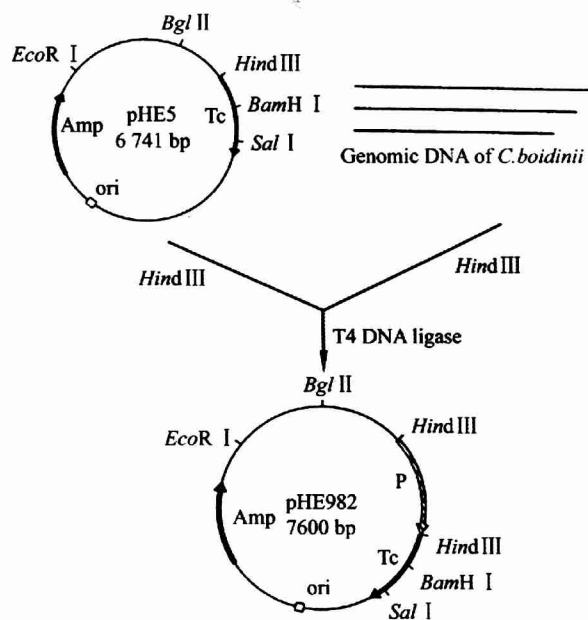


图 2 假丝酵母启动基因的克隆

Fig.2 Cloning of promoter from *C. boidinii*

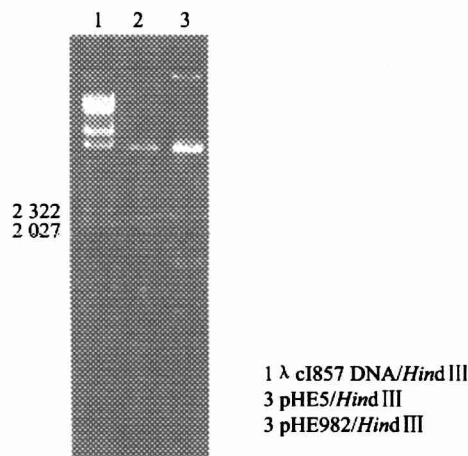


图 3 质粒 pHE982 的酶切电泳分析

Fig.3. Gel electrophoresis of restriction analysis of pHE982

2.3 含 Neo^r 基因的表达载体的构建

为了实现 Neo^r 基因在波氏假丝酵母中的表达, 将克隆的启动子与 Neo^r 基因连接, 构建含假丝酵母启动子和 Neo^r 基因的表达载体. 如图 4a 所示, 用 *Hind* III 酶切质粒 pHE982, 回收含波氏假丝酵母启动子的 1.2 kb 片段与经 *Hind* III 酶切的含 Neo^r 基因的质粒 YEpN181 以适当比例混合, T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆

菌 C600, 在含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 平板上筛选抗性转化子, 从转化子中提取质粒, 经 *Hind* III 酶切分析 (图 4b), 证明重组质粒含 1.2 kb 的假丝酵母启动子基因片段, 将该质粒命名为 YEpNP181.

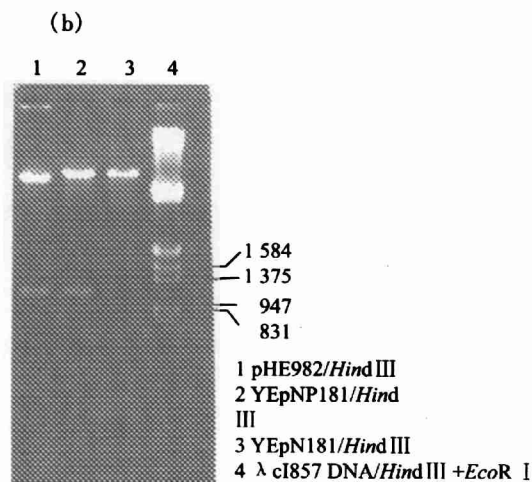
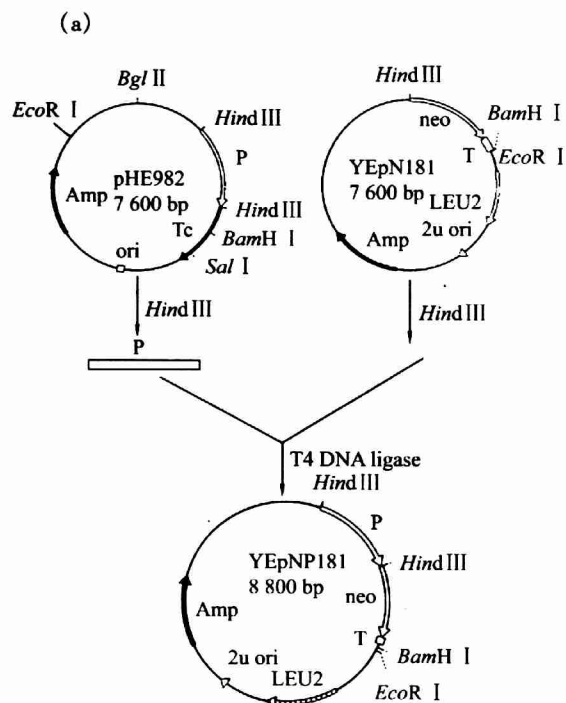


图 4 质粒 YEpNP181 的构建 (a) 和酶切电泳图 (b)

Fig.4 Construction (a) and restriction analysis (b) of plasmid YEpNP181

2.4 *Neo*^r 基因在波氏假丝酵母中的表达

采用 LiAc 完整细胞转化法将 YEpNP181 转化波氏假丝酵母, 在含 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 YPD 平板上筛选出转化子, 从转化子中提取质粒, 经酶

切分析证实转化子中含 YEpNP181 (电泳图略), 显示转化子能在含 G418 的抗性平板上生长可能是由于 *Neo*^r 基因表达引起的. 为此, 进一步研究分析了 *Neo*^r 基因的表达产物. *Neo*^r 基因编码的蛋白质是新霉素磷酸转移酶 (Neomycin phosphotransferase, NPT). 我们测定新霉素磷酸转移酶活性.

首先用蜗牛酶将酵母菌处理成原生质体, 冻融三次使细胞裂解, 然后参照文献 [10] 的方法对得到的细胞提取物进行斑点印迹分析和激光扫描, 测出斑点的放射强度和面积, 从而估算新霉素磷酸转移酶的相对活性, 结果如表 1. 表 1 的结果显示: 转化子的新霉素磷酸转移酶活性比宿主波氏假丝酵母高 40%, 证明 *Neo*^r 基因已在波氏假丝酵母中获得表达.

表 1 斑点扫描结果

Tab.1 Spot scanning

样 品	放射强度	面积 cm^2	相对酶活性 U
1 波氏假丝酵母	0.46	0.31	26.51
2 转化子 I	0.55	0.43	37.37
3 转化子 II	0.55	0.42	36.13

3 讨 论

波氏假丝酵母、汉逊酵母与毕节酵母都是很有发展和应用前景的工业发酵菌株. 汉逊酵母和毕节酵母的转化系统已经建立并证明是比目前使用的酿酒酵母更好的基因表达系统. 波氏假丝酵母由于其强大的线粒体氧化磷酸化活性, 在甲醇培养基上积累柠檬酸, ATP, 蛋氨酸等医药和化工产品的能力都优于其它甲基营养酵母, 但由于研究工作起步较迟, 没有建立完整的转化和表达系统, 影响了其作为基因克隆和表达宿主的优势. 本文首次克隆了波氏假丝酵母的启动子, 把细菌 *Neo*^r 抗性基因引入假丝酵母, 在克隆启动子的调控下获得表达, 建立了 *Neo*^r 基因-G418 的选择系统, 使外源基因引入波氏假丝酵母的筛选成为可能, 省去了用常规诱变方法获得营养缺陷型菌株的繁杂程序和工作量.

(下转第 76 页)

Cycloheximide Induced Promoter Activity of SV40 Enhancer

WANG Jin-fa, WANG Hong-bin, HE Hai-qiong, LIU Bing, FENG Dong-ru
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The promoter activity of SV40 enhancer in the reporter vector of pCAT-Enhancer was induced by cycloheximide (CHX), a common protein synthesis inhibitor. This induced promoter activity can promote the CAT gene expression. The promoter activity of pCAT-Enhancer can be induced after treating 5 min and 30 ng/mL with CHX. In order to study whether the induced promoter activity of the pCAT-E by CHX is position-dependent. Two recombinant DNA has been constructed: pCAT-Bas-Enh (-) and pCAT-Bas-Enh (+), in which the position of SV40 enhancer element was changed. The pCAT-Bas-Enh (+)/(-) plasmids were used to transfect the CHO cell treated with CHX, no CAT activity detected. This result suggests that the CHX induced promoter activity of SV40 enhancer in pCAT-E is position-dependent.

Keywords: cycloheximide; SV40 enhancer; promoter; CHO cell

(上接第 67 页)

参考文献:

- [1] FABER K, HARDER W, VEENHUIS M, et al. Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign protein[J]. Yeast, 1995, 11: 1331 - 1344.
- [2] TANI Y, SAKAI Y. Production of citric acid from methanol by a fluoroacetate-resistant mutant of *Candida* sp. Y-1[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34: 5 - 9.
- [3] 罗进贤, 李政海, 李文清. 大麦 α -淀粉酶和黑曲酶糖化酶在酿酒酵母中的表达[J]. 中国科学(C 辑), 1998, 28: 50 - 55.
- [4] MANIATIS T, FRITSCH E, SAMBROOK J. Molecular Cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [5] SHERMAN F, FINK G R, LUKINS H B. Methods in yeast genetics p51 - 53[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1970.
- [6] 毛小洪, 蔡金科. 酵母完整细胞快速高效转化法[J]. 生物工程学报, 1990, 6: 102 - 107.
- [7] PHILIPPSEN P, STOTZ A, SHERF C. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Methods in Enzymology, 1991, 194: 169 - 181.
- [8] PLATT S T, YANG N S. Dot assay for neomycin phosphotransferase activity in crude cell extracts[J]. Annal Biochem, 1987, 162: 529 - 535.

Cloning of Promoter from *Candida boidinii* and the Expression of Neomycin Resistant Gene

XU Bai-nian, WU Jiang-xue, LI Wen-qing, LUO Jin-xian
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *Candida boidinii* is one of the methylotrophic yeast with good development and application perspective but very little study has been done as a gene expression system. The *C. boidinii* promoter was cloned and the expression vector YEpnP181 was constructed by recombining the cloned promoter and Neo^r gene onto an *E. coli*-yeast shuttle vector. YEpnP181 was then transformed into *C. boidinii* and Neo^r gene on YEpnP181 expressed. The transformants grow on YPD plate containing 300 μ g/mL G418 and Neo^r-G418 selection system was thus established, which facilitates the foreign gene expression in *C. boidinii*.

Keywords: promoter cloning; *Candida boidinii*; Neo^r gene expression