

ADK 基因在酿酒酵母中的表达和 ATP 合成研究^{*}

徐柏年, 张添元, 罗进贤, 吴青, 吴江雪

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 采用基因工程技术, 将催化 ATP 合成的酶—ADK 的基因克隆进表达载体 YE_pN181P2 获得重组质粒 YE_pN-ADK, 转化酿酒酵母 GRF18 后, ADK 基因获得表达. 用重组菌株 GRF18 (YE_pN-ADK) 发酵合成 ATP 其产率比对照菌株 GRF18 提高 75%.

关键词: ADK 基因表达; 酿酒酵母; ATP 合成

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

三磷酸腺苷(ATP)是生物通用的能量载体, 是一种重要的临床用药, 对治疗代谢混乱、肌肉萎缩有很好的疗效, 也是治疗急性和慢性肝炎、冠心病、肾炎和脑动脉硬化辅助药物. 国内从 20 世纪 70 年代开始用酿酒酵母发酵生产 ATP, 即利用其腺苷酸激酶(ADK)将一磷酸腺苷磷酸化生成 ATP 或以腺嘌呤为原料通过短路合成 AMP 后再磷酸化合成 ATP. 由于传统的方法工艺落后, 生产水平比日本用基因工程生产的低近 10 倍, 成本高, 无法与进口产品竞争. 波氏假丝酵母(*Candida boidinii*)有强大的氧化磷酸化系统, 是合成 ATP 的好材料, 但目前尚无波氏假丝酵母的表达系统. 本研究将 ADK 基因引入酿酒酵母, 探索通过增加 ADK 基因拷贝数提高 ATP 产量的可能性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α , 酿酒酵母 GRF18 及质粒 pBluescript-SK 为本室保存, 质粒 YE_pN181P2 为本室构建, pTE18R 含 ADK1 基因由 Konrad 博士惠赠, 表达质粒 pYPGE2 由 Branelli 博士提供.

1.1.2 培养基 大肠杆菌的培养和转化用 LB-肉汤; 酿酒酵母的培养和转化采用 YPD 培养基.

1.1.3 主要试剂 限制酶 *Eco*RI, *Sal*I, *Nde*I, *Xba*I 及 Klenow 酶购自 GIBCO-BRL 公司, T4 DNA 连接酶, 蜗牛酶为华美生物工程公司产品, Miniprep 质粒纯化试剂盒及 Sepha-glasTM 试剂盒分别购自 QIAGEN 公司和 Pharmacia 公司.

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌质粒的快速检测, DNA 的限制酶切反应, 去粘性末端反应、粘性末端的补齐, DNA 的连接, 大肠杆菌的转化, DNA 序列测定和 SDS-PAGE 参见文献 [1].

1.2.2 质粒的纯化 采用 QIAGEN 公司的试剂盒, 按该公司提供的操作方法进行.

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (970175)

收稿日期: 1999-11-02; 作者简介: 徐柏年 (1972~), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 罗进贤.

- 1.2.3 酶切片段的回收纯化 按 Pharmacia 公司 Sephaglas Band Prep 试剂盒的方法进行。
- 1.2.4 酵母的转化 采用 LiAc 完整细胞转化法^[2]。
- 1.2.5 PCR 反应用 Bohringer Mannheim 公司的试剂盒, 反应条件为模板先在 94 ℃变性 3 min 后进入循环, 以后每次循环 94 ℃变性 30 s, 50 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共 30 个循环。PCR 引物的设计如下, 划线部分为与 ADK 基因相匹配的序列。

ADK F: CCG GAATTCATGTCTAGCTCAGAATCCATT
EcoRI

ADK R: GGCC ATCGATCATTAATCCTTACCTAGCTT
ClaI

1.2.6 酵母发酵合成 ATP 将酵母单菌落接种于液体 YPD 中培养至对数末期, 离心收集细胞, 置-20 ℃保存。ATP 合成反应液含葡萄糖、KH₂PO₄、MgCl₂ 及水。将酵母用无菌水洗涤后投入培养液中加入 AMP, 在 pH 6.4, 32~34 ℃下培养 4~24 h, 离心分离上清, 检查 ATP 合成情况。

1.2.7 ATP 的定性分析和定量测定 参见文献 [5, 6]。

2 结果与讨论

2.1 ADK 基因的改造

2.1.1 PCR 反应与反应产物的克隆 以含酿酒酵母 ADK 基因的质粒 pTZ18R 为模板以合成的两段寡核苷酸 ADK F 和 ADK R 为引物, PCR 反应扩增 ADK 基因, 从图 1 的电泳结果看, PCR 产物是一段约 0.6 kb 的 DNA 片段, 与预期的大小基本相符。为了进行 DNA 序列分析, 将 PCR 产物用 *Eco*RI 和 *Cla*I 双酶切后克隆至质粒 pBluescript SK II 的 *Eco*RI, *Cla*I 位点, 获得重组质粒 pBlue-ADK (构建图略)。pBlue-ADK 用 *Eco*RI 和 *Cla*I 双酶切后走琼脂糖凝胶电泳可得到两条带, 其中的小带与 PCR 产物的大小相同 (图 1) 表示 PCR 产物已克隆进 pBluescript SK II。



```
ATGTCTAGCTCAGAATCCATTAGAATGGTCCTAATTGGCCACCTGGTGCCGGTAA 56
AGGTACTCAAGCTCCAAATTTGCAAGAGCGTTTCCATGCCGCTCACTTGGCCACTG 112
GTGACATGTTGAGATCTCAAATCGCAAAGGGCACTCAATTAGGTTTGGAAACAAAG 168
AAAATTATGGACCAAGGTGGTTTAGTCTCTGATGACATTATGGTTAAGATGATCAA 224
GGATGAATTGACCAACAATCGA8CTTGAAGAATGG8TTGATCTTGGACGGTTTCC 280
CAAGAACCATTCTCAGGCTGAAAAATTGGACCAAAATGTTGAAGAACAAGGAACT 336
CCTTTGGAAAAAGCCATCGAATTGAAGGTTGATGATGAATTGTTGGTTGCCAGAAT 392
TACCGGTAGATTAATTACCCAG8CTCTGGCAGATCCTACCACAAGATCTTTAACC 448
CACCAAAGGAAGACATGAAGGATGACGTACCGGTGAAGCTTTAGTTCAAAGATCT 504
GATGACAATGCAGACGCCCTTGAAGAAGAGATTAGCTGCTTACCATGCTCAAAACGA 560
ACCAATTGTTGACTTTTACAAAAAGACCGGTATCTGGGCTGGTGTGATGCTTCCC 616
AACCTCCTGCTACTGTTTGGGCTGACATCTTGAACAAGCTAGGTAAGGATTAA 669
```

图 1 PCR 产物和质粒 pBlue-ADK 的酶切电泳产物

Fig.1 Gel electrophoresis analysis of PCR product and restriction pattern of pBlue-ADK

1 pBlue-ADK/*Eco*RI + *Cla*I;
2 PCR product; 3 λDNA/*Hind*III

图 2 PCR 产物的序列分析

Fig.2 DNA sequencing analysis of PCR product

2.1.2 PCR 产物的 DNA 序列分析 采用 Sanger 的双脱氧终止法对克隆进 pBlue-ADK 的产物约 0.6 kb 片段进行 DNA 序列分析, 结果如图 2。

序列分析结果显示, PCR 产物的 DNA 序列与已报道的 ADK 基因序列相同, 包括起始

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

密码和终止密码共 669 个核苷酸，其 5'端及 3'端带 *Eco*RI 和 *Cla*I 位点. 这证明 PCR 产物是 ADK 基因.

2.2 含 ADK 基因的表达载体 YEpN-ADK 的构建

表达载体 YEpN-ADK 的构建如图 3 所示，首先用 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切质粒 pBlue-ADK，回收 0.66 kb 的 ADK 基因插入 pYPGE2 的 *Eco*RI 和 *Sal*I 之间，经酶切电泳分析正确后获得重组质粒 pYPGE-ADK. 由于 pYPGE-ADK 的标记基因 *TRP1* 不适合转化酿酒酵母 GRF18 (*leu*-)，因此用 *Nal*I 将 ADK 基因及其 5'端的 PGK 基因启动子及 3'端的 *CYC1* 终止位点切下，经 Klenow 酶补齐后克隆至质粒 YEpN181P2 (*LEU2*) 的 *Xba*I 位点上，经酶切分析后将构建的重组质粒命名为 YEpN-ADK.

2.3 ADK 基因在酿酒酵母中的表达

用 LiAc 完整细胞转化法将 YEpN-ADK 转化酿酒酵母 GRF18 在不含亮氨酸的 SC 平板上筛选 *LEU2*⁺ 的转化子. 将转化子在 YPD 平板上活化后，挑取单菌落接种于 YPD 液体培养基中培养过夜，第 2 天用 YPD 稀释至 *A*₆₅₀ ≈ 0.1，30 °C 快摇，至 *A*₆₅₀ ≈ 3.5 时离心收菌，破碎后走 SDS-PAGE 电泳. 图 4 的电泳结果显示在 29 000 附近有一条比对照菌浓的蛋白带，与 ADK 大小相符.

2.4 重组酿酒酵母 GRF18 (YEpN-ADK) 的 ATP 合成

将冰冻菌体用无菌水洗涤后取 0.1 g 溶于 100 μL 反应液中，32 °C 保温 30 min，加入 AMP 5 mg，发酵 24 h 后，离心取上清走醋酸纤维膜电泳，在紫外灯下检视，将相应的 ATP 斑点剪下，置试管中，加入 5 mL 0.01 mol/L HCl，42 °C 保温 1 h，离心后，测 *A*₂₅₇ 并按 1.2.6 中公式计算 ATP 百分含量，结果是重组酵母 GRF18 (YEpN-ADK) 发酵液中 ATP

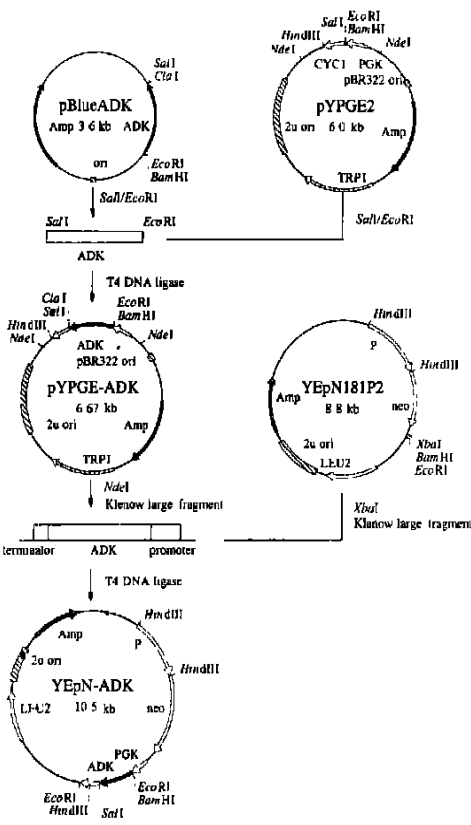


图 3 表达载体 YEpN-ADK 的构建

Fig. 3 Construction of expression vector YEpN-ADK

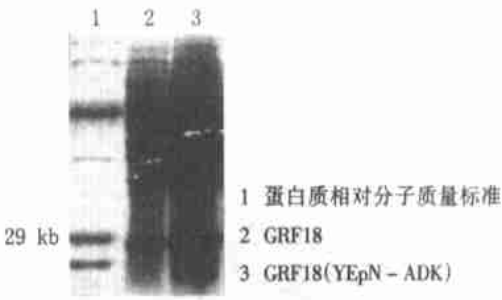


图 4 ADK 基因表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of ADK gene expression

含量为 2.73% 而对照株的含量为 1.5%,

提高了 75%。以上结果说明通过引入外原基因的方法增加 ADK 基因的拷贝数可以提高 ATP 的产量。

参考文献:

- [1] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS J T. Mol cloning a laboratory manual[M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1994.
- [2] 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(2): 102 ~ 107.
- [3] KONRAD M. Analysis and *in vivo* disruption of the gene coding for adenylate kinase(ADK1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J] . J B C. 1988, 263: 19468 ~ 19474.
- [4] BRUNELLI J P, PAIL M L. A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences [J] . Yeast, 1993(9): 1299 ~ 1308.
- [5] 查尔鲍特. 酶法分析手册[M] . 缪辉南, 等译. 上海: 上海科技出版社, 1982.
- [6] 中山大学生化微生物教研室编. 生化技术导论[M] . 北京: 人民教育出版社, 1979.

Expression of ADK Gene and ATP Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

XU Bai-nian^{*}, ZHANG Tian-yuan, LUO Jin-xian, WU Qing, WU Jiang-xue

Abstract: ATP is an important energy carrier in organisms and widely used in clinics. But the backward production method leads to the low productivity and poor competitiveness in the market. This report describes the cloning of adenylate kinase, the enzyme catalyzing the AMP phosphorylation into ATP, gene into expression vector YEpN181P2 giving rise to recombinant plasmid YEpN-ADK, transformation of YEpN-ADK into *S. cerevisiae* GRF18 and the expressing of ADK gene in GRF18 (YEpN-ADK). The results of fermentation show that the recombinant strain GRF18 (YEpN-ADK) produced 75% more ATP than the control strain GRF18.

Keywords: ADK gene expression; *S. cerevisiae*; ATP synthesis

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China