

啤酒酵母 AS2.1416 海藻糖合成酶基因 *tps1* 的 cDNA 克隆及序列分析

董志扬 段瑜侃 陈红漫 金城 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 海藻糖 6-磷酸海藻糖合成酶 PCR

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0408-03

海藻糖(Trehalose, α -glucopyranosyl- α -1,1-D-glucopyranose)是一种非还原性二糖,广泛存在于藻类、细菌、昆虫、无脊椎动物及酵母等许多生物体内。海藻糖除了作为一种储存性碳源外,业已被证明在许多逆境,诸如高温、高盐、干旱、重金属离子污染、冷冻、辐射等情况下,可以有效地保护生物的细胞膜、蛋白质及核酸^[1-6]。

海藻糖合成酶为一多酶体系。在酵母细胞中,其合成分为两步进行。第一步,在 6-磷酸海藻糖合成酶(Tps1)的作用下,由 UDP-葡萄糖和葡萄糖-6-磷酸合成海藻糖-6-磷酸;第二步,在海藻糖磷酸酯酶(Tps2)的催化下,海藻糖-6-磷酸脱去磷酸生成海藻糖。此两基因已于 1992 年和 1993 年分别由荷兰、瑞士及芬兰学者从啤酒酵母中分离得到^[7-9],最近又有多种不同来源的海藻糖合成酶基因被克隆,对其分子生物学及酶学性质等作了进一步的研究^[10-19]。

高等植物缺乏海藻糖合成的相关酶基因,通过转基因技术,可望使某些高等植物中合成一定量的海藻糖,从而提高它们在逆境下的生存能力。

本文以国内筛选出的海藻糖高产菌株啤酒酵母 AS2.1416 为材料,构建 cDNA 文库,从中成功克隆到 6-磷酸海藻糖合成酶基因,并对其序列进行了分析。

1 材 料

1.1 菌株与质粒

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) AS2.1416,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 及 Hfl-600 mRNA 反转录试剂盒(RiboClone[®] cDNA Synthesis Systems AMV RT Kit),克隆载体 pGEM[®] T-Easy Vector 及测序试剂盒购自 Promega 公司;PCR 反应引物由微生物所技术室合成。

1.2 主要生化试剂

DNA 限制酶、T4DNA 连接酶、低熔点琼脂糖购自 Promega 公司;Taq DNA 多聚酶为高真度聚合酶。DNA 测序试剂盒购自 Promega 公司。

2 方 法

2.1 啤酒酵母 cDNA 文库的构建

将在 30 $^{\circ}$ C 培养的生长旺盛的啤酒酵母迅速转移到 40 $^{\circ}$ C 培养 2 h(Heat Shock),提取其总 mRNA,按照试剂盒的说明进行反转录。cDNA 与大肠杆菌噬菌体 λ gt-11 连接,测定其滴度,并在大肠杆菌 Hfl-600 中扩增,提取 DNA 作为 PCR 反应的模板。

2.2 *tps1* 基因的 PCR 扩增

根据已报道的 *tps1* 基因的序列,设计 PCR 反应的引物:

5'-端引物 CTCTGCAGAT GACTACGGAT AACGCTAA
PstI
3'-端引物 GCGGATCCTC ATCAGTTTTT GGTGG
BamHI

以酵母 cDNA 文库 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为 92 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 30 个循环,最后一轮反应 72 $^{\circ}$ C 保温 15 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖检查,用 1.5% 低熔点琼脂糖纯化。

2.3 基因克隆及序列测定

按照试剂盒说明,将 PCR 产物与 T-Vector 进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α 在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB/Amp 平板上筛选白色菌落,对重组子进行酶切鉴定,得到 3 个阳性克隆,分别命名为 I-11、I-15、I-32。分别测定 3 个重组质粒克隆基因的序列。

2.4 序列分析和同源性比较

采用 DNASIS 软件进行分析,并与国外学者所报道的序列进行比较。

3 结 果

3.1 啤酒酵母 cDNA 文库的构建

采用前文所述之方法构建啤酒酵母 cDNA 文库,所得文库滴度为 10⁸。经扩增,提取噬菌体总 DNA 作为 PCR 反应的模板。

3.2 *tps1* 基因的 PCR 扩增

实验中,经过 PCR 反应,我们得到了单一的条带,大小约 1.5 kb(图 1),与预期结果一致。经 1.5% 低熔点琼脂糖纯化检测,用于下一步的连接反应。

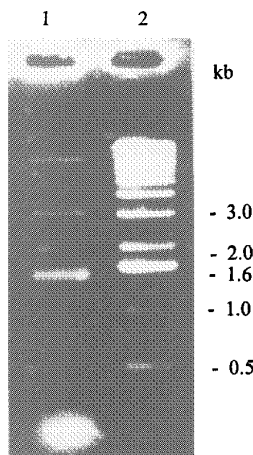


图 1 *tps1* 基因 PCR 产物分析

1. PCR product; 2. 1kb ladder

3.3 扩增产物的克隆和分析

将经低熔点琼脂糖纯化的 PCR 扩增产物与 T-Vector 连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 将所筛到的阳性菌(白斑)的质粒进行限制性酶切鉴定和 PCR 检测,与报道的完全一致。结果见图 2。

3.4 *tps1* 基因的序列测定结果

对 3 个阳性克隆 I-11, I-15 和 I-32 进行全序列测定,其序列完全相同,测定结果显示,克隆片段全长 1507 bp,含有一个 1485 bp 的 ORF 编码一个由 495 个氨基酸组成的蛋白质,该基因序列已为国际核酸数据库收录, DDBJ 号为 AF061037。与所报道的相比,其核苷酸序列同源性大于 99%,其中第 224、302、649、862 存在 4 个差异,推测其所编码的蛋白质的氨基酸序列亦有 4 个不同,氨基酸序列同源性为 99%。

4 讨论

在正常生长条件下,啤酒酵母海藻糖含量极少,其

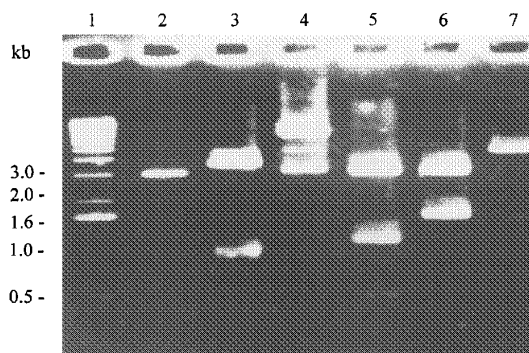


图 2 *tps1* 基因重组子的酶切鉴定

1. 1kb ladder; 2. plasmid I-32; 3. *Nco*I;
4. *Sac*I; 5. *Eco*RI; 6. *Pst*I; 7. *Bam*HI

相关的合成酶基因表达也处于较低水平,通过热激作用啤酒酵母海藻糖合成酶基因迅速表达,同时胞内海藻糖大量积累,以提高啤酒酵母在逆境中的生存能力反应^[20],因此根据此特点利用热处理,可使啤酒酵母 *tps1* 基因得到大量表达,以获得尽可能高丰度的 mRNA,经反转录得到 cDNA 后,有利于从此 cDNA 文库中得到 *tps1* 基因,这种方法尤其适用于真核生物受诱导基因的克隆,使我们比较容易得到完整的所需目的基因。

Promega 公司的新产品 pGEM[®] T-Easy Vector 用于直接克隆 PCR 片段比较容易操作,也比较有效。但我们实验中发现,对不同大小的片段需要不同的连接条件,否则很难达到说明书上所述的连接效率。

啤酒酵母 AS2.1416 具有较强的抗热能力,能在 40℃ 生长,并具有较高的海藻糖合成能力,本实验通过 PCR 技术,成功地从其 cDNA 文库中得到海藻糖合成酶基因 *tps1*,由于基因较大,为防止 Taq 酶的错配,在 PCR 过程中使用高保真 Taq 酶,并对所得到的 3 个阳性克隆进行了限制性酶切鉴定和全序列分析,3 个阳性克隆序列完全相同,与国外报道的啤酒酵母 SC288C 菌株 *tps1* 基因确实存在 4 个碱基差异,并导致 4 个氨基酸的不同,但整个基因具有 99.6% 的同源性,说明得到的确实是我们的目的基因 *tps1*。目前该基因在模式植物烟草中得到表达,我们将作进一步报道。

参 考 文 献

- [1] Van Laere A. *FEMS Microbiol Rev*, 1989, **63**: 201~210
- [2] Caffrey M, Victoria F, Carl L A et al. *Plant Physiol*, 1988, **86**: 754~758
- [3] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D et al. *Science*, 1984, **17**: 701~703
- [4] 董志扬, 方宣钧, 林敏. 核农学研究进展. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, 115~120
- [5] 戴秀玉, 程萍, 周坚等. 微生物学通报, 1996, **22**(2): 102~104
- [6] Koichi Yoshinaga, Hiroe Yoshioka, Hiromu Kurosaki et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61**(1): 160~161
- [7] Walter Bell, Klaassen P, Ohnacker M et al. *Eur J Biochem*, 1992, **209**: 951~959
- [8] Claudio D V, Burekert N, Bell W et al. *Eur J Biochem*, 1992, **212**: 315~323
- [9] Outi E B, Kalkkinen N, Londesborough J et al. *Eur J Biochem*, 1993, **216**: 849~861
- [10] Wolfgang K, Horlacher R, Boos W et al. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(14): 4043~4052
- [11] Hideki K, Miyazaki J, Yokata A et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **69**(12): 2152~2157

- [12] Kazuhiko M ,Nakada T ,Kubota M *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1995 **59** (10) :1829~1834
- [13] Testuya nakada *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1995 **59** (12) 2210~2214
- [14] Masaru K ,Miura Y ,Kettoku M *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** (3) :546~550
- [15] Kazuhiko M ,Hattori K ,Nakada T *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** (4) :717~720
- [16] Tomoyuki N ,Nakada T ,Chaen H *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** (4) :640~644
- [17] Tomoyuki N ,Nakada T ,Chaen H *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** (5) :835~839
- [18] Kazuo K ,Kato M ,Miura Y *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** (10) :1720~1723
- [19] Kazuo K ,Kato M ,Miura Y *et al.* *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** (11) :1882~1885
- [20] Maria-Jose Neves Jean Francois. *Biochem. J* 1992 **288** :859~864

cDNA Cloning Sequence Analysis of Trehalose-6-phosphatase Synthase Gene from *Sacchomyces cerevisiae* AS2.1416

DONG Zhi-Yang DUAN Yu-Kan CHEN Hong-Man JIN Cheng ZHANG Shu-Zheng
(*Enzymology Department ,Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080*)

Abstract The trehalose-6-phosphate synthase gene *tps1* was amplified from yeast *S. cerevisiae* AS2.1416 cDNA library by polymerase chain reaction. This 1.5 kb fragment was cloned into *Pst*I and *Bam*HI sites of pGEM-T easy vector and the sequence of the gene indicated the cloned *tps1* gene contained 1485 nucleotides encoding for 495 amino acid and shared a sequence homology of 99.6% with that from *S. cerevisiae* S288C.

Key words Trehalose , trehalose-6-phosphatase synthase ,PCR