

酵母启动基因在大肠杆菌中的克隆和表达*

敖世洲 王静英 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

利用启动基因克隆载体 pHE5, 研究了不同酵母的启动基因在大肠杆菌中的功能作用。酵母染色体DNA的Hind III 和EcoR I 片段与pHE5重组, 获得一批启动基因重组体, 并作了不同启动基因重组体的限制性图谱分析和抗四环素水平的测定。对这些启动基因用于组建表达质粒的意义进行了讨论。

关键词 酵母启动子; 基因克隆; 基因表达

酵母是真核生物, 具有使某些蛋白糖基化和分泌作用的功能, 已被发展成研究外源基因表达的有效系统。一些医用蛋白已在酵母中获得稳定和高效的表达^[1-4], 为基因工程的应用开辟了新的前景。酵母是一种低等真核生物, 有些功能又接近原核生物。某些酵母基因与大肠杆菌的相应突变株在功能上能够互补^[5,6]; 有些酵母基因可以在大肠杆菌中表达^[7,8]。这些研究表明, 酵母的基因序列能被大肠杆菌的酶系所识别和工作, 为了得到酵母启动基因片段, 组建酵母系统的表达载体, 我们利用大肠杆菌启动基因的克隆筛选系统对酵母启动基因进行了研究, 用启动基因克隆载体pHE5^[9], 从酵母染色体DNA中克隆酵母启动基因, 对所获得的不同启动基因片段作了限制性图谱和功能的分析。

材料和方法

(一) 酵母染色体DNA的分离纯化

酵母AH2(1eu2-3, 1eu2-112, his4-519, can 1~101) 接种于500ml YPD (1%酵母抽提物, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖) 培养液中, 在对数生长后期 (约 10^8 细胞/

ml) 离心收集细胞, 用 0.05M EDTA, pH7.5洗两次, 菌体悬于20ml 0.1M Tris-HCl pH9.3, 2ml 0.5M EDTA pH9.0, 0.5ml 巯基乙醇中, 30°C 振摇 20min, 离心后再悬于20ml 1M 山梨糖醇, 0.01M EDTA, 10mM pH5.8柠檬酸-磷酸缓冲液, 加 40mg 蜗牛酶 (中国科学院生物物理研究所生化试剂厂生产), 30°C 振摇 60min, 离心收集原生质体, 并用 1M 山梨糖醇, 40mM EDTA, pH7.5 洗两次。最后悬于20ml 0.15M NaCl, 0.1M EDTA pH7.5, 再加 SDS 使其浓度达 1%, 用氯仿:异戊醇 (24:1) 抽取 3 次, 水相用 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀。沉淀溶于 5ml TE 缓冲液, 离心除去不溶物, 再加 2 倍体积的乙醇, 用玻棒搅出 DNA 样品, 溶于 5ml TE 缓冲液, 上 Sepharose 2B 柱, 收集第一个紫外吸收峰, 合并样品后再用乙醇沉淀, 溶于 TE 缓冲液, 约 1mg/ml。

(二) 质粒DNA的分离纯化

见以前报道方法^[10]。

(三) 酶制剂及其反应条件

限制性内切酶及 T₄ DNA 连接酶由本

本文于 1984 年 10 月 24 日收到。

* 本室工具酶组提供限制性内切酶及 T₄ DNA 连接酶, 谨致谢意。

室工具酶组提供, 反应条件见前文^[11]。

(四) DNA 量迹转移杂交

按Southern方法进行^[14]。

(五) 重组和转化

取5 μ g 酵母染色体 DNA 和 1 μ g 质粒 pHE5, 分别经HindIII 或EcoRI 作用, 混合后在 T₄ DNA 连接酶作用下连接。以Ca²⁺处理的大肠杆菌C 600作受体, 按照Cohen等人^[12]方法转化, 在含氨基苄青霉素 (A.P. 25 μ g/ml) 和四环素 (Tc 20 μ g/ml) 营养平皿中筛选启动基因重组体。平皿上提高Tc浓度 (25~200 μ g/ml) 观察各个重组体的生长情况。

(六) 琼脂糖凝胶电泳

条件见前文^[11]。

(七) 不同菌株抗四环素水平的测定

含不同质粒的菌体约 10⁸ 细胞/ml, 分别以 1% 接种量接入含不同浓度 Tc 的 Lb 培养液中 (30ml), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 5h, 测 A_{600nm} 吸光度, 表示细菌的生长情况。

结果和讨论

质粒 pHE5 上抗四环素 (Tc^r) 基因的启动基因已经缺失, 无 Tc^r 表型^[9]。如图 1 所示, 在 Tc^r 结构基因前插入启动基因可以使 Tc^r 表型再现。先前我们曾用这一载体系统研究了大肠杆菌的不同功能的启动基因片段, 酵母为低等真核生物, 它的一些基因序列能为大肠杆菌酶系识别和工作。我们利用 pHE5 系统对酵母启动基因的功能进行了研究。

5 μ g 酵母染色体 DNA 和 1 μ g pHE5 经 HindIII 作用后, 用 T₄ DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 C600, 在含 A.P. (25 μ g/ml) 和 Tc (20 μ g/ml) 平皿上获得 204 株转化株。这些转化株在平皿上进一步作抗四环素水平检查, 它们的抗 Tc 水平从 20 μ g/ml

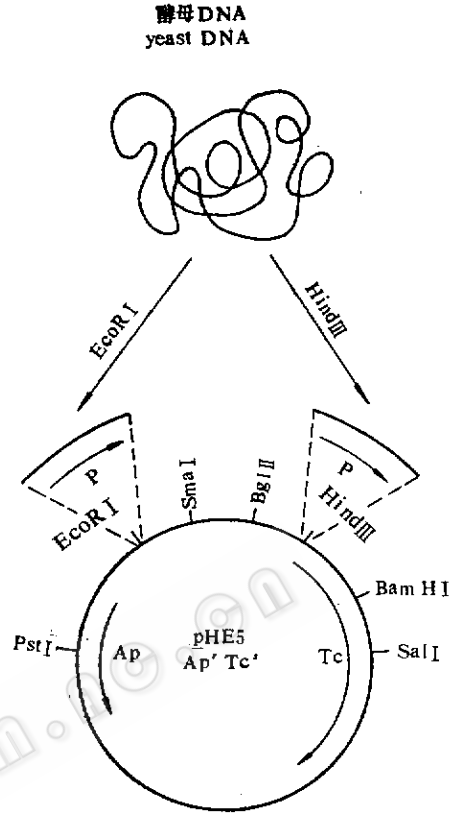


图 1 用质粒 pHE5 为载体克隆酵母启动基因片段
Fig.1 Cloning of yeast promoters using the plasmid pHE 5 as vehicle

Ap 表示抗氨基苄青霉素基因, Tc 表示抗四环素基因, P 表示启动基因, 箭头表示转录方向。

Ap, ampicillin resistance gene, Tc, tetracycline resistance gene, P, promoter, the arrow indicates the direction of transcription

到 200 μ g/ml 不等 (表 1), 这反映了不同转化株内 Tc^r 基因受强弱不同启动基因作用。

按上述条件, 从 EcoRI 切点接入酵母染色体 DNA EcoRI 片段, 转化大肠杆菌以后, 在含 A.P. (25 μ g/ml) 和 Tc (20 μ g/ml) 平皿上也获得 251 株转化体, 但提高 Tc 浓度 (50 μ g/ml) 以上, 这些转化体都不能生长 (表 1)。从 EcoRI 切点接入启动基因后, Tc^r 基因的表达都较低, 这可能由于插入的启动基因片段和

Tc' 基因之间相隔约20kb 距离的缘故。先前我们从pHE5 Tc' 基因前的 EcoRI 切点接入大肠杆菌的lac 启动基因和双lac启动基因, 抗四环素的活性也比较低^[13]。

用简易快速的质粒分离方法, 分离上述启动基因重组体的一部分, 作插入片段检查, 图版I-1—3为从HindIII 和 EcoRI切点接入外源启动基因重组体的琼脂糖凝胶

表 1 在不同四环素浓度下的菌落转化数
Table 1 Number of transformed colonies in different concentration of tetracycline

四环素浓度 ($\mu\text{g/ml}$) Concentration of tetracycline ($\mu\text{g/ml}$)	转化菌落数 Number of transformed colonies	
	EcoRI切点接入 启动基因 Insertion of promoters in EcoR I site	Hind III 切点接 入启动基因 Insertion of promoters in Hind III site
20	251	204
50	0	198
100	0	105
150	0	57
200	0	21

电泳图。从HindIII 切点接入外源片段, 平皿上抗四环素100 $\mu\text{g/ml}$ 的重组体(图版I-1), 抗Tc 200 $\mu\text{g/ml}$ 的重组体(图版I-2)和从EcoRI切点插入外源片段, 抗Tc 20 $\mu\text{g/ml}$ 的重组体(图版I-3)与pHE5比较都可以看到大小不同的插入片段的存

在。从上述不同类型的启动基因重组体中, 分离纯化pYPH105(图版I-1中d), pY-PH 203(图版I-2中e)和pYPE 23(图I-3中C), 进一步研究插入片段的性质。分别用 HindIII, EcoRI, BamHI, PstI Sell, XhoI, Bgl II 作用, 进行琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图版I-4—6。与pHE5限制性图谱比较, pYPH 105(图版I-4)的

HindIII 插入启动基因片段为1.9kb, 插入片断上分别有一个BamHI, pstI及XhoI的切点(载体pHE5上没有XhoI 切点呈一条带)。pYPH203(图版I-5)的HindIII 插入片段为2.3kb, 其上分别有一个 BamHI 和SalI的切点。pYPE 23(图版I-6)的EcoRI插入片段为1.6kb。上述几种限制性内切酶都未见有切点。

用液体培养的方法检查 pYPH 203, pYPH 105, 和pYPE 23 抗四环素水平, 并与pHE5 比较。图2结果显示, 含有插入片段的重组体抗四环素水平都比 pHE5 高, 若以生长抑制50%, Tc浓度表示抗药水平, 则pYPH 203为80 $\mu\text{g/ml}$, pYPH 105为30 $\mu\text{g/ml}$, pYPE23为10 $\mu\text{g/ml}$, 而pHE5则为3 $\mu\text{g/ml}$ 。不同的插入片段引起了不同的抗药水平, 这反映了启动基因的强弱。另外, 启动基因和Tc' 基因间的距离对抗药水平也会有一定的影响。用液体培养测定抗药水平比固体培养要敏感。

以上所得到的启动基因片段都是从酵母染色体 DNA 的限制性内切酶 HindIII 及EcoRI水解片段中克隆的。为了排除这些片段是由载体 pHE5 中 污染有大肠杆菌染色体 DNA 造成的可能性, 我们又作了酵母染色体DNA及其限制性片段的Southern杂交^[14]。酵母染色体 DNA 及其 HindIII 酶解产物进行琼脂糖凝胶电泳, 再转移到硝酸纤维膜上, 用缺口转移方法^[15]以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 及 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 标记的启动基因重组体pYPH 203 作为探针进行杂交, 结果见图版I-7。酵母染色体DNA及其2.3kb HindIII 片段都可以与pYPH 203 杂交, 这就直接证明了 pYPH 203上的2.3kb启动基因片段确实来自酵母染色体DNA, 而不是其它 DNA 污染造成的。其他启动基因重组体也能用同样的方法加以证实。

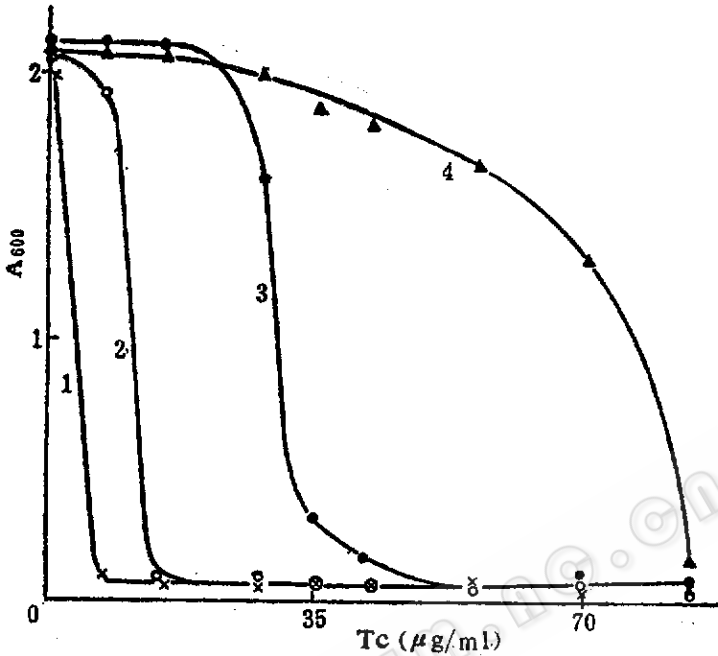


图 2 不同启动基因重组体抗四环素的水平

Fig.2 Levels of tetracycline resistance

- 1 pHE 5 2 pYPE23
3 pYPH105 4 pYPH203

我们利用四环素抗性启动基因筛选系统,研究了带有酵母启动基因的 DNA 片段,方法比较简便,能显示作用的强弱。这些启动基因属于何种基因还需作进一步鉴定。这些启动基因片段作适当的加工,有可能提高它的功能作用,用这些启动基因带动外源基因有可能在大肠杆菌和酵母细胞中都实现表达,其在实际应用上的前景我们将进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Hitzeman, R.A., et al.: *Nature*, 293:717—722, 1981.
 [2] Valenzuela, P., et al.: *Nature*, 298:347—350, 1982.
 [3] Miyahara, A., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80:1—5, 1983.
 [4] Hitzeman, R.A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11: 2745—2763, 1983.
 [5] Struhl, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1471—1475, 1976.
 [6] Ratzkin, B. and Carbon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74:487—491, 1977.
 [7] Struhl, K. and Davis, R.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74:5255—5259, 1977.
 [8] Hitzeman, R.A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 255: 12073—12080, 1980.
 [9] 吴祥甫等: 遗传学报, 10:175—179, 1983.
 [10] 敖世洲等: 遗传学报, 10:85—90, 1983.
 [11] 敖世洲, 高美华: 生物化学与生物物理学报, 14:121—126, 1982.
 [12] Cohen, S.N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110—2114, 1972.
 [13] 高美华等: 生物化学与生物物理学报, 17:56—61, 1985.
 [14] Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, 98:503—517, 1975.
 [15] Mariatis, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:1184—1188, 1975.

THE CLONING AND EXPRESSION OF YEAST PROMOTERS IN *ESCHERICHIA COLI*

Ao Shizhou Wang Jingying Li Zaiping

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica*)

The plasmid pHE5 could be used to study the promoter activities of inserted foreign fragments through restoring of the tetracycline resistance. We have cloned the HindIII fragments and EcoRI fragments of yeast chromosomal DNA and have obtained a number of hybrid plasmids carrying yeast promoters. The levels of tetracycline resistan-

ce of these hybrid plasmids were determined and some restriction patterns were analyzed. The possibility of using these plasmids containing yeast promoters as vectors favoring expression of foreign genes in yeast was discussed.

key words

Yeast promoter; gene cloning; gene expression

图 版 说 明

1—3 启动基因片段的琼脂糖凝胶电泳筛选

1. Hind III 切点插入, 平皿上抗四环素 100 μg/ml

2. Hind III 切点插入, 平皿上抗四环素 200 μg/ml

3. EcoRI 切点插入, 平皿上抗四环素 20 μg/ml

1a, 2g, 3h 为 pHE5, 其它均为启动基因重组体

1—3 Agarose gel electrophoresis of selection of promoter fragments from yeast chromosomal DNA promoter fragments were cloned in HindIII site(1 and 2) or EcoRI site(3) and were selected in the plates containing Tc 100 μg/ml(1), 200 μg/ml (2) or 20 μg/ml(3). 1a, 2g and 3h, Vector pHE5.

4—6 重组体, pYPH 105(4), pYPH 203(5)和 pYPE23(6)的限制性片段的琼脂糖凝胶电泳

4a 为 pHE5 用 Hind III 水解; 4b—h 为 pYPH105 分别用 Bgl II, XhoI, SalI, PstI, Hind III, BamHI 和 EcoRI 水解, 4i 为 λDNA 用 Hind III 水解。

5a 为 λDNA 用 EcoRI 水解。5b—c 为 pHE5 分别用 Hind III 和 EcoRI 水解, 5d—i 为 pYPH203 分别用 EcoRI, BamHI, PstI, Hind III, SalI 和 Bgl II 水解。

6a—f, 为 pYPE23 分别用 EcoRI, BamHI, Hind III, PstI, SalI 和 Bgl II 水解; 6g 为 pHE5 用 EcoRI 水解; 6h 为 λDNA 用 EcoRI 水解。

4—6 Agarose gel electrophoresis of restricted pYPH105(4), pYPH203(5) and pYPE23(6) DNA

4a, pHE5 digested with HindIII. 4b—h, pYPH105 digested with BglII, XhoI, SalI, PstI, HindIII, BamHI and EcoRI respectively. 4i, λDNA digested with Hind III.

5a, λDNA digested with EcoRI. 5b—c, pHE5 digested with HindIII and EcoRI. 5d—i, pYPH203, digested with EcoRI, BamHI, PstI, HindIII, SalI and BglII respectively.

6a—f, pYPE23 digested with EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, SalI and BglII respectively. 6g, pHE5 digested with EcoRI.

6h, λDNA digested with EcoRI.

7 酵母染色体DNA及其Hind III片段与pYPH 203 探针Southern杂交图

7a 酵母染色体DNA。

7b 酵母染色体DNA用Hind III水解

7 Southern hybridization pattern of yeast chromosomal DNA and its HindIII fragment with pYPH 203 probe

7a, Yeast chromosomal DNA. 7b, yeast chromosomal DNA digested with Hind III.

