

# 酿酒酵母磷酸甘油酸激酶基因 (PGK1)

## 的分子克隆和特性研究

杨艳卿 刘玉方 郭子剑\* 蔡金科

(中国科学院微生物所, 北京)

以大肠杆菌和酵母菌穿梭质粒pCN60为载体, 大肠杆菌C600或HB101为受体构建酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Hind III 基因文库。从基因文库中提取重组DNA转化酵母受体XSB44-35D(a, pgk1, leu1, ade1, trp1, gal1), 选出转化体Pgk1<sup>+</sup>。琼脂糖凝胶电泳指出所插入的DNA片段长度为3.1kb。

PGK1 DNA片段插入的方向性是此基因的5'-侧翼区靠近pCN60的 BamH I 位点, 而3'-侧翼区接近Bgl II 位点。Cla I, EcoRV, Kpn I, Xba I, Pst I, Hind III, BamH I 及Pvu I 等核酸内切酶制作的酶切图谱的结果表明, 除报道的PGK酶切位点外, 还发现一个新的Kpn I 及一个新的Cla I 位点。

**关键词** PGK1基因克隆; DNA插入的方向性; 酶切图谱

外源基因要在酵母受体中高效表达、糖苷化和分泌, 必需构建适应的载体与受体系统, 而载体的构建, 需要强的启动子。从现有资料来看最优选择是参与酵母的糖酵解过程中一些基因, 它们不管从mRNA水平还是基因产物都是较高的, 其中磷酸甘油醛脱氢酶的3个等位基因(GPD)和单拷贝的磷酸甘油酸激酶基因(PGK)产物分别占总蛋白的8%和4%<sup>[1]</sup>, 因此现今酵母工程菌的高效表达载体多由这两类启动子所构建的, 这引起了生物工程工作者极大重视, 关于这两类基因的克隆工作报道不少<sup>[2-9]</sup>。

我们以酿酒酵母的标准pgk1突变株为受体, 采用互补法直接克隆了酵母菌的PGK1基因, 进行了此基因DNA片段插入pCN60质粒的方向性及其酶切图谱的研究。

## 材料和方 法

### (一) 材料

1. 菌株和质粒: 大肠杆菌 C600 (F<sup>-</sup> thi1, thr1, leuB6, lacY, tanA24, pro<sup>-</sup>, r<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>,); 酿酒酵母 1412-4D (a, ade2), DP1 (α, his1, trp1) 本组保藏。酿酒酵母 XSB44-35D (a, gal1, ade1, leu1, trp1, pgk1) 来自美国加州大学Mortimer教授; pCN60质粒为本组构建, 详见文献[10]。

2. 培养基: LB培养基: 大肠杆菌完全培养基; M9CA培养基: 大肠杆菌基本培养基; YEPD培养基: 酵母菌完全培养基; YNB培养基: 酵母菌基本培养基, 加必要的营养源供分离与测定用。

3. 酶和试剂: 核酸内切酶EcoR I, Bgl II, T4 DNA连接酶及溶菌酶均为中科院生物物理所生化试剂厂产品; 其余核酸内切酶及碱性磷酸酯酶(CIP)为Boehringer mannheim公司产品; 蜗牛酶为本组制备; 氨苄青霉素、四环素、氯霉素均来源于卫生部药品生物制品检定所。

本文于1988年10月31日收到。

国家科委资助课题; \* 北京大学88届毕业生。

## (二) 方法

### 1. DNA 的提取和纯化

(1) C600 (pCN60) 质粒 DNA 的提取和纯化: 按 Maniatis 等人<sup>[11a]</sup>方法进行。

(2) 1412-4D 染色体 DNA 的制备: 首先按 Cryer<sup>[12]</sup>法提取总 DNA, 再经氯化铯密度梯度离心<sup>[11b]</sup>纯化备用。

### 2. 酵母菌基因文库的构建

(1) 载体 DNA 的制备: 纯化后的 pCN60 质粒 DNA 用 Hind III 部分酶切, 为防止其自身环化, 用 CIP 进行脱磷酸处理<sup>[11c]</sup>, 再经 Sephadex G50 纯化。

(2) 2—4 kb 染色体 DNA 片段的分离: 纯化后的染色体 DNA 经 Hind III 酶切后, 通过蔗糖密度梯度离心分离获得<sup>[11d]</sup>。

(3) DNA 酶切和连接: 按文献<sup>[11e]</sup>方法进行。

(4) 大肠杆菌转化: 按文献<sup>[11f]</sup>进行; 酵母菌转化按 Ito<sup>[13]</sup>等人方法进行。

3. P<sub>gk1</sub><sup>+</sup> 转化体的筛选和鉴定: 从构建的基因文库无性繁殖系中提取重组质粒 DNA, 转化受体菌 XSB44-35D, 选择在 YEPD 选择培养基上生长的菌落, 测定其交配型和营养要求, 快速法提取无性繁殖系的总 DNA, 再转化 *E. coli* C600, 得到 Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup> 转化体。提取质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳测定其分子量大小。将重组质粒 DNA 经 Hind III 酶切并测定其片段的数量和大小。

4. 插入片段方向性确定和酶切图谱分析: 用核酸内切酶 Hind III, EcoR V, BamH I, Xba I, Bgl II, Kpn I, Cla I, 及 Pvu I 酶切转化体质粒 DNA, 测定各片段大小, 确定插入片段的定向性并绘制酶切图谱。

## 结 果 和 讨 论

### (一) 酵母菌基因文库的构建

1. 载体 DNA 制备: pCN60 具有两个 Hind III 酶切位点, 而且 TRP1 DNA 片段的大部分位于这两个位点之间, 如果完全酶切则会失去包括 TRP1 的部分, 从而失去选择标记。故只有找出以单切为主的最适条件进行部分酶解, 同时样品经 CIP 处理使 5' 末端脱磷酸化, 加入 T4 DNA 连接酶后, 未发现明显的自我环化现象。

2. 2—4kb 染色体 DNA 片段的分离: 按材料和方法所述进行酵母染色体 DNA 的提取, 纯化后的染色体基本完整, 并用 EcoR I 和 Hind III 内切酶酶切, 结果良好 (图版 I-A)。将 Hind III 酶切的染色体 DNA 样品通过 10—38% 蔗糖密度梯度离心, 使 DNA 片段按分子量大小分开、收集, 以 Hind III 酶切的已知长度 DNA 片段为对照, 通过琼脂糖凝胶电泳确定 2—4kb 的 DNA 片段, 浓缩备用。

3. 基因文库的构建: 基因文库的构建如图 1 所示。测得最高片段插入频率为 90%, 共获得 5 万个转化子。

### (二) P<sub>gk1</sub><sup>+</sup> 转化体的筛选及鉴定

从构建的基因文库无性繁殖系中提取重组质粒 DNA, 转化受体菌 XSB44-35D, 在 YEPD 选择培养基上共出现 12 个菌落。已测定出 XSB44-35D 的自发恢复突变率小于  $1.25 \times 10^{-9}$ , 而实验中受体细胞总数小于  $10^9$ , 故自发恢复突变的可能性很小。

为了确切证实转化体的可能性, 进一步测定 12 株转化体的交配型和营养要求以及插入 DNA 片段的定向性, 结果表明所有转化体均为 (a, ade, leu, Trp<sup>+</sup>) 基因型。

用快速法提取每株转化体质粒 DNA, 再转化 *E. coli* C600, 从 Amp<sup>r</sup> Tet<sup>r</sup> 转化体

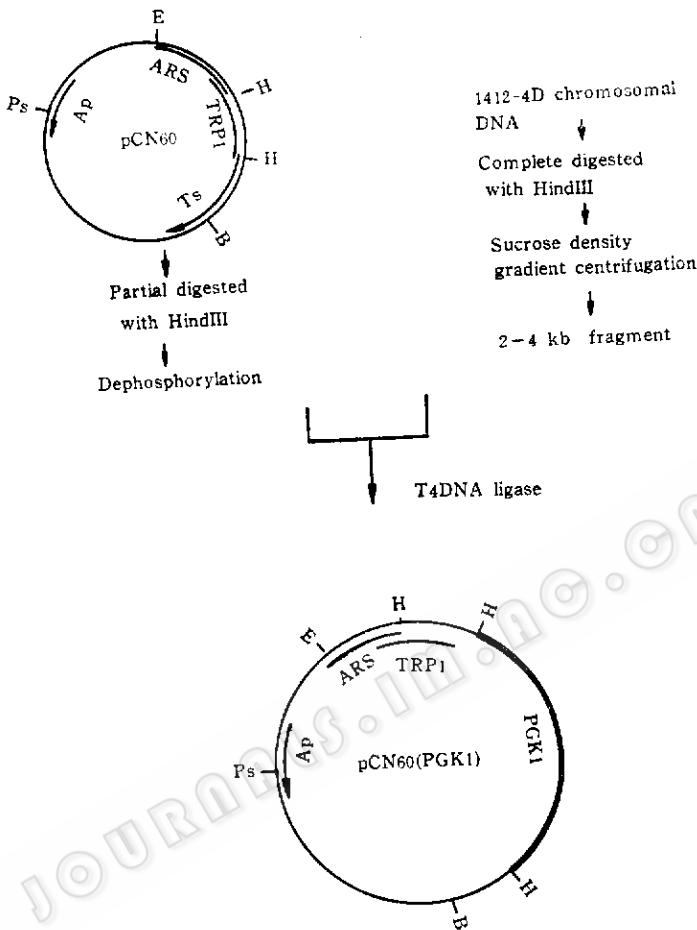


图 1 酿酒酵母 1412-4D 基因文库的构建

Fig. 1 Construction of genomic library of *S. cerevisiae* 1412-4D

H: HindIII; E: EcoRI; B: BamHI; Ps: PstI

中提取质粒 DNA，用琼脂糖凝胶电泳测定其分子大小，结果表明其分子均大于 pCN60 (图版 I -B)。这证明在 pCN60 质粒的 Tet<sup>r</sup> 基因内插入了外源 DNA 片段。

为证明外源 DNA 片段插入的位点和长度，将 pCN60 和重组质粒分别用 Hind III 酶切，测定其片段大小 (图版 I -C)。由于质粒 pCN60 有两个 Hind III 酶切位点，所以出现两条 DNA 带，而重组质粒除具有与 pCN60 相同大小的两条带外，还有一条约 3.1kb 的 DNA 带，即插入 DNA 片段。

由于酵母转化子表型为 Trp<sup>+</sup>，而大肠杆菌的转化子为 Tet<sup>r</sup> 型，所以外源 DNA 片段插入的位点是在第二个 Hind III 酶切位点上，此重组质粒命名为 pCN60(PGK1)。

### (三) 插入片段的方向性和酶切图谱

质粒 pCN60 仅有一个 Bgl II 切点，距第二个 Hind III 切点 (Tet<sup>r</sup>) 基因约为 0.8kb。Hitzman 等人指出酵母 PGK 基因片段中也只有一个 Bgl II 切点，它靠近 3' 侧翼区 [14]。当用 Bgl II 酶切 pCN60 (PGK1) 时，得到 1.2 和 7.0kb 的两个片段，显然，在 PGK1

基因中也只带有一个 Bgl II 切点, 因而, 只有一种可能的排列方向, 即 PGK1 基因插入 pCN60 的 Hind III 位点呈反向顺序 (逆时针走向)。其 3' 侧翼区靠近 pCN60 的 Bgl II 位点, 而 5' 侧翼区靠近 pCN60 的 BamH I 位点 (图 2)。

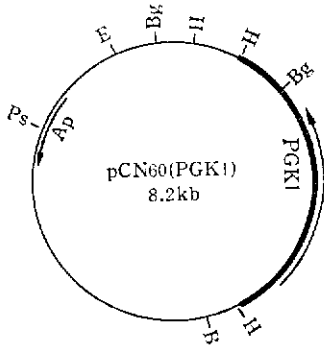


图 2 PGK1 基因片段的插入方向性  
Fig. 2 Orientation of inserted fragment of PGK1 gene

用多种内切酶解质粒 pCN60 (PGK1), 经琼脂糖凝胶电泳测得其各 DNA 片段的长度 (表 1), 从而推测 pCN60 (PGK1) 的相应酶切位点 (图 3)。

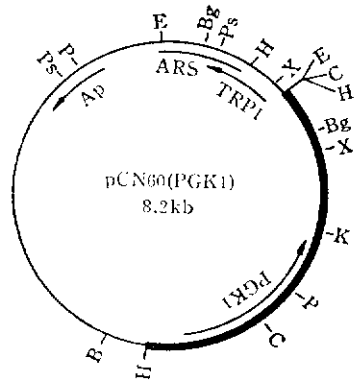


图 3 PGK1 基因的酶切图谱  
Fig. 3 Restriction map of PGK1 gene

综上所述, 可知 3.1kb 片段有单个 KpnI、xbaI Pvu I 和 Bgl II 酶切位点, 两个 Cla I 酶切位点, 比前人报道的多了一个 Kpn I 和 Cla I 酶切位点<sup>[14]</sup>。可能没有 Pst I 和 EcoR V 位点, 如果有也一定靠近片段的两端, 不是本方法能够测出的。

采用直接互补法克隆酿酒酵母 1412-4D 的 PGK1 基因, 这种方法工作量大, 但程序简便、经济、可靠性高, 对分离酵母基因是行之有效的。

表 1 pCN60 (PGK1) 各种酶切片段的长度  
Table 1 Size of restriction fragments with endonucleases

Number of fragments	Size of fragment	Endonuclease								
		B+X	B+K	B+Ec	B+Ps	Ps	C	P	B	Bg
1		0.65	2.34	3.71	1.37	1.46	2.16	3.80	8.20	1.20
2		2.82	5.89	4.59	2.51	6.76	6.03	4.27		7.0
3		4.79			4.27					
Total		8.26	8.23	8.30	8.15	8.22	8.19	8.07	8.20	8.20

B: BamH I; X: Xba I; K: Kpn I; Ec: EcoRV; Ps: Rst I; C: Cla I; P: Pvu I; Bg: Bgl II

参 考 文 献

[1] Hitzman, R.A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10:7791-7808, 1982.  
 [2] Bitter, G.A. et al.: *Gene*, 32:263-274, 1984.  
 [3] Brint, J.V.: *Biotechnology*, 4:1057-1062, 1986.  
 [4] Urdea, M.S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:7461-7465, 1983.  
 [5] Mellor, J. et al.: *Gene*, 24:1-14, 1983.  
 [6] Tuite, M.F. et al.: *EMBO. J.*, 1:603-608, 1982.  
 [7] Derynck, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11:1819-1837, 1983.  
 [8] Hitzman, R.A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11:2745, 1983.

- [9] Dosbon, M.J. et al.; *Nucleic Acids Res.*, 10:2625—2637, 1982.
- [10] 倪 津等; *微生物学报*, 26:127—133, 1986.
- [11] Maniatis, T. et al.; *Molecular Cloning*, CSH, 1982.  
(a) p.88—95, (b) p.282—285, (c)p.133—134, (d)p.282—284, (e)p.104—105, 289, (f)p.250—251.
- [12] Cryer, D.R. et al.; *Methods in Cell Biology*, XII, Prescott, D. M. (Ed.), Academic Press, New York, p39—44, 1975.
- [13] Ito, H. et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 48:344—347, 1984.
- [14] Hitzman, R.A. et al.; *J. Biol. Chem.*, 255:12073—12080, 1980.

## MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF PGK1 GENE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Yang Yanqing Liu Yufang Guo Zijian Cai Jinke  
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

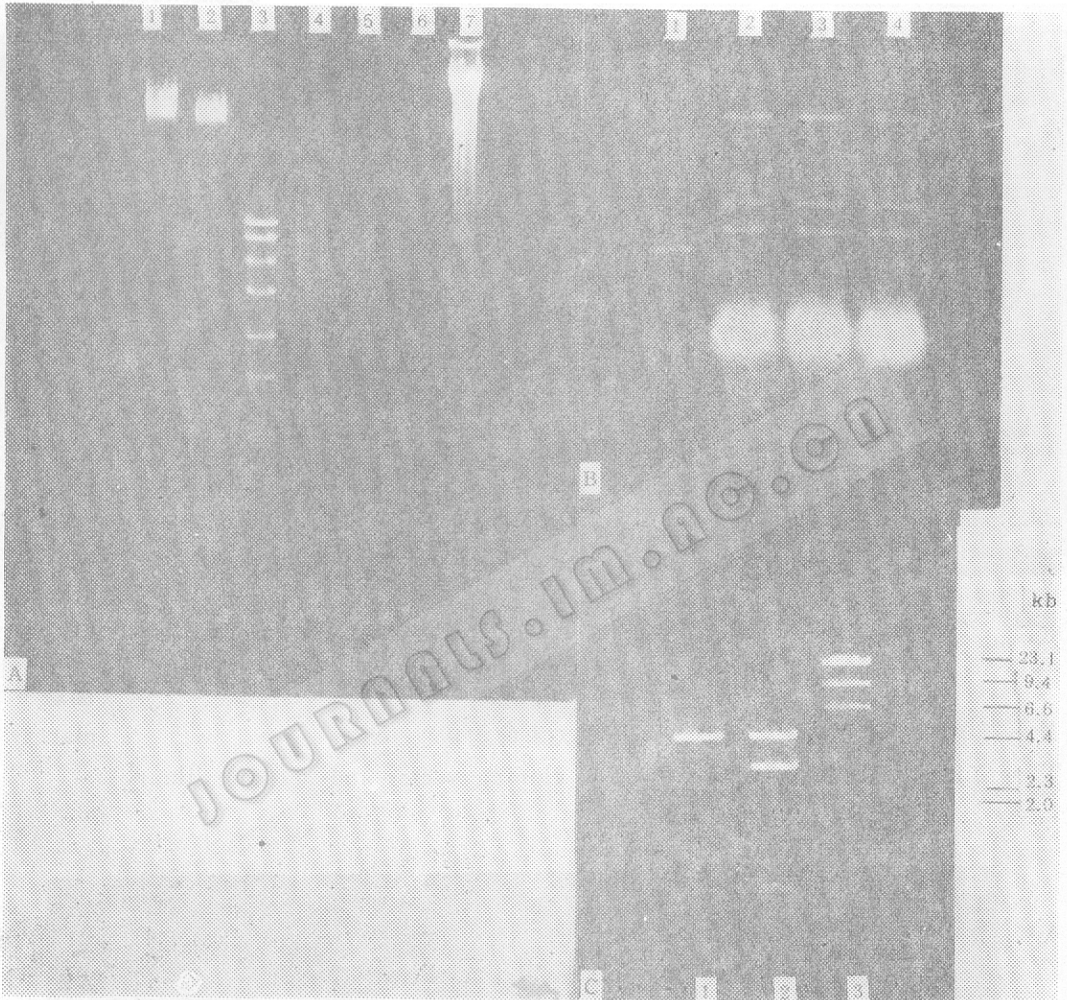
*S. cerevisiae* 1412-4D genomic library was established in *E. coli* C600 or HB101 with *E. coli*-yeast shuttle vector pCN60. P<sub>gk1</sub><sup>+</sup> transformants were screened by transforming recipient strain XSB44-35D with hybrid plasmid from the genomic library. Gel electrophoresis result showed that the size of the inserted DNA fragment was 3.1kb.

The orientation of the PGK1 DNA fragment is that its 5' flanking region is beside the BamHI site of pCN60, and 3'-flanking region is near BglII site of pCN60. The restriction map of PGK1 gene was constructed with endonucleases such as ClaI, EcoRV, KpnI, XbaI, PstI, HindIII, BamHI and PvuI and so on. It indicated that in addition to the sites reported by Hitzman et al., a new KpnI site and a new ClaI site were discovered.

### Key words

PGK1 gene cloning; genomic library, orientation of inserted fragment; restriction map

Yang Yanqing et al.: Molecular cloning and characterization of  
pKG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*



A. 染色体DNA酶切分析

Analysis of chromosomal DNA digestion 1. sPPI DNA 2.  $\lambda$ DNA 3. sPPI DNA/EcoRI, 4. Chromosomal DNA/EcoRI 5. Chromosomal DNA/Hind III 6.  $\lambda$ DNA/Hind III 7. Chromosomal DNA

B. pCN60质粒与重组质粒大小比较

Comparison of molecular weight of plasmid pCN60 and recombinant plasmid 1. pCN60 2-4. Recombinant plasmid

C. pCN60和pCN60 (PGK1) DNA的Hind III 酶切图

Restriction map of plasmid pCN60 and pCN60(PGK1) with Hind III 1. pCN60/Hind III 2. pCN60 (PGK1)/Hind III 3.  $\lambda$ DNA/Hind III