

酿酒酵母超氧化物歧化酶 (SOD) 基因的克隆和表达

张博润 黄英* 田宇清 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 通过 PCR 扩增技术从酿酒酵母中得到了 Cu, Zn-SOD 的结构基因, 此基因被亚克隆到大肠杆菌质粒载体 pT7-7, 得到重组质粒 pT7-7::SOD。利用 EcoRI 和 PstI 酶切 pT7-7::SOD 质粒, 经琼脂糖凝胶电泳, DEAE-滤膜回收 Cu, Zn-SOD 结构基因片段, 将其亚克隆到 M13' 中, 并转化大肠杆菌, 得到了重组质粒 M13'::SOD, 酶切和纯化后的 SOD 基因, 定向克隆到酵母质粒载体 pHZ-8 的 SmaI 和 EcoRI 位点上, 构建成重组质粒 pHZ-8-1。经转化酵母受体菌 ZH-1 和 DP-1 后得到了转化子, 来自于 ZH-1 的转化子在非选择性条件下培养 40 世代后仍有 95% 以上细胞保留重组质粒。而来自于 DP-1 的转化子很不稳定。经蛋白提取、聚丙烯酰胺凝胶电泳和酶活性测定结果表明, 来自于 ZH-1 转化子中 SOD 的表达量约为细胞可溶性蛋白的 15%, 并具有生物活性。

关键词 SOD 基因, 克隆, 表达, 酿酒酵母

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, 简称 SOD) 是一种十分重要的生物体防止氧化损伤的酶类, 是生物体内超氧阴离子的清除剂。它使有氧代谢产物— O_2^- 歧化为 O_2 和 H_2O , 从而消除 O_2^- 对生物体的毒性。SOD 在临床治疗、食品及化妆品添加剂等方面有着广泛的应用前景。此外在植物抗低温、干旱等逆境方面也有重要作用, 因而是目前国际上一个十分活跃的研究课题^[1-3]。国内虽有不少单位在开展 SOD 的研究, 但主要偏重于应用^[4], 而对其基础理论方面的研究与国外相差较远, 鉴于此种原因, 我们开展了 SOD 的分子生物学研究。本文报道了酵母 SOD 基因在酵母中的克隆和表达的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 大肠杆菌 JM109, ZH-1, DP-1, 均为本实验室保藏菌株。

1.1.2 质粒: Bluescript M₁₃ 及 pT7-7::SOD 为本实验室收集和构建^[6]; pSC-7 为酵母-大肠杆菌穿梭质粒 (内含酵母 PGK 强启动子), 由意大利 Bruno Maresca 教授惠赠。

1.1.3 酶及生化试剂: 限制酶, T4 DNA 连接酶, DNA 多聚酶 klenow 片段, 4 种 dNTP, Taq 聚合酶购于华美公司和 Promega 公司。

1.1.4 培养基及培养条件: LB 培养基, YEPD 培养基, YNB 培养基, 见参考文献 [7]。大肠杆菌在 37℃ 培养, 酵母在 28℃ 培养。

1.2 方法

国际科学基金 (IFS) 资助项目。

* 四川大学生物工程系代培硕士研究生。

本文于 1993 年 8 月 21 日收到。

- 1.2.1 大肠杆菌质粒提取：按文献〔8〕进行。
- 1.2.2 酵母细胞总 DNA 及质粒 DNA 的提取：按文献〔9〕进行。
- 1.2.3 大肠杆菌的转化和酵母菌的转化：分别参照文献〔8〕和〔10〕。
- 1.2.4 酵母交配型和营养缺陷的鉴定：按文献〔11〕进行。
- 1.2.5 酵母质粒稳定性的测定：参照文献〔12〕。
- 1.2.6 酵母菌可溶性蛋白提取及蛋白浓度和酶活性测定：取活化的细胞一环于 3ml 选择培养基中，培养 20 小时，以 2% 的量接种于 YEPD 培养基中，振荡培养 20 小时，收集细胞、取 0.5g 菌体悬于 3ml 50mmol/L、pH8.3 的磷酸缓冲液中，超声波破碎细胞，离心得酵母菌可溶性蛋白溶液。蛋白浓度测定参照文献〔13〕，聚丙烯酰胺凝胶电泳参照文献〔14〕，SOD 酶活性测定参照文献〔15，16〕。

2 结果和讨论

2.1 酵母 SOD 基因的克隆

2.1.1 酵母受体系统的确定：本实验室分离诱变和保藏的酵母单倍体菌株中挑出 ZH-1 和 DP-1 两株菌作为酵母 SOD 基因克隆的受体菌，对其交配型、营养缺陷标记、内源质粒被等进行了测试，结果见表 1。

表 1 酵母菌受体的遗传特性

Table 1 Genetic characters of the yeast receptors

Strain	Mating-type	Internal plasmid	Auxotroph
DP-1	α	$2\mu\text{m}, \text{cir}^-$	<i>his1, trp1</i>
ZH-1	a	$2\mu\text{m}, \text{cir}^+$	<i>ade1, trp1</i>

2.1.2 酵母载体质粒的改建：用 SalI 酶切 pSC-7，得到了 1.45kb 和 5.95kb 两个片段。取适当浓度的 DNA 片段经自身连接，转化 JM109，在含氨苄青霉素的平皿上随机挑选转化子，采用快速法提取质粒，电泳检测，结果 90% 的转化子都含有自身连接的大片段。用 EcoRI 或 SalI 单切转化子质粒 DNA，均得到大小约 5.95kb 的单一带。结果证明原质粒 pSC-7 确实被切去了一段 1.5kb 的 SalI 片段，改建的载体定名为 pHZ-8（它含有 SalI 和 EcoRI 单切位点）（酶切电泳结果见图版 I-A）。

2.1.3 酵母 SOD 基因在大肠杆菌中的亚克隆：为获得 SOD 基因 3'-末端为平头的片段，先将其从 pT7-7⁺ : SOD 克隆到载体 BluescriptM13⁻ 上。具体操作为：用 EcoRI 和 PstI 酶切 pT7-7⁺ : SOD，琼脂糖凝胶电泳、DEAE-滤膜回收 SOD 基因片段；再与经 EcoRI 和 PstI 酶切的 Bluescript M13 载体连接，转化 JM109，在含 Amp、X-gal、IPTG 的平皿上挑选白色转化子；提取转化子的质粒 DNA，先用 PstI 酶切补平头，再用 EcoRI 酶切、分离 600bp 的 3'末端为平头的 SOD 基因片段（图版 I-B）。

2.1.4 SOD 基因在酵母菌中的克隆：用 SalI 酶切酵母质粒载体 pHZ-8，补平头，再用 EcoRI 酶切，回收约为 5.86kb 的大片段，与上述回收的 SOD 基因片段连接，转化 JM109，随机挑取抗 Amp 的转化子，快速提取重组质粒 DNA 进行酶切验证。重组质粒经 EcoRI 酶切得大小约 6.46kb 的单一带；经 PstI 和 EcoRI 完全酶切得 5 条带，比载体 pHZ-8 经同样酶切多一条大小约为 600bp 的带，它与 SOD 基因 DNA 带在同一位置上，结果表明

SOD 基因已克隆到酵母载体 pHZ-8 中, 重组质粒被定名为 pHZ-8-1 (pHZ-8 : : SOD) (图版 I-A)。按参考文献 [10] 的方法, 用重组质粒 pHZ-8-1 转化酵母受体 ZH-1 和 DP-1, 分别在 YNB+ade 和 YNB+his 平皿上筛选转化子。

2.2 转化子的鉴定

2.2.1 转化子的营养缺陷标记测定: 由于受体菌 ZH-1 和 DP-1 分别为 *ade1*、*trp1* 和 *his1*、*trp1* 缺陷, 重组质粒 pHZ-8-1 含有 TRP1 标记, 根据营养互补原理, 获得的转化子应为 TRP 原养型。我们对所获得的转化子进行了营养标记测定, 结果见表 2。

2.2.2 转化子的交配型测定: 作为受体菌的 ZH-1 为 α 交配型, DP-1 为 α 交配型, 转化获得的转化子的交配型不会改变。参照文献 [11] 进行了转化子的交配型测定, 结果见表 2。

2.2.3 转化子的质粒提取: 按常规法提取酵母转化子的质粒 DNA, 在琼脂糖凝胶电泳上未见到明显的质粒带, 这可能是由于该质粒在酵母菌中拷贝数较低的原因; 也可能是提取方法所致, 为了证实酵母转化子是否含有重组质粒 pHZ-8-1, 我们用从酵母转化子提取的 DNA 来转化大肠杆菌 JM109, 在含 Amp 的 LB 平皿上却得到了转化子, 随机挑转化子提取质粒经电泳和酶切分析, JM109 的转化子均含有重组质粒 pHZ-8-1 (图版 I-C)。这证明重组质粒 pHZ-8-1 确实被转入酵母受体菌 ZH-1 和 DP-1 中。

2.2.4 重组质粒 pHZ-8-1 在酵母转化子中的稳定性: 参照文献 [12], 分别测定了含重组质粒 pHZ-8-1 的 ZH-1 和 DP-1 的转化子的稳定性, 结果表明 ZH-1 转化子的质粒稳定性很高, 在非选择性条件下培养 40 代后, 仍有 95% 以上细胞保留重组质粒; 而 DP-1 转化子的质粒稳定性却很低, 30 代后质粒丢失率达 80%。

2.2.5 SOD 的表达及酶活性测定: 将转化子菌株活化后接种 YEPD 培养基, 摇床培养 20 小时, 收集细胞, 超声波处理破碎细胞, 离心取上清液, 按材料和方法中所述进行可溶性蛋白浓度、聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色、酶活性负染等测定, 结果见图版 I-D、E。结果表明转化子, ZH-1/pHZ-8-1-1 和 ZH-1/pHZ-8-1-3 的 SOD 含量均比受体菌 ZH-1 高, 约占细胞可溶性蛋白的 15% 左右, 负染结果证明有酶活性, 经邻苯三酚法测定 SOD 酶活性, 受体菌 ZH-1 的酶活为 140u/ml, 转化子 ZH-1/pHZ-8-1 和 ZH-1/pHZ-8-1-3 的酶活分别为 390u/ml 和 400u/ml。而 DP-1/pSH1 转化子无明显的 SOD 富集带 (资料未列出), 这也许与重组质粒 pHZ-8-1 在 DP-1 中不稳定有关。此外, 从聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白染色 (图版 I-D) 中看到转化子与受体菌的一些蛋白带不一样, 有的蛋白带受体菌有而转化子没有; 而有的蛋白带转化子有受体菌却没有, 这可能是重组质粒的转入和 SOD 基因的表达干扰了受体菌本身的一些蛋白质合成。

表 2 酵母转化子的交配型和营养缺陷标记
Table 2 Mating-type and auxotroph of the transformants

Strains	Mating-type	Auxotroph
Receptor		
ZH-1	α	<i>ade1</i> , <i>trp1</i>
DP-1	α	<i>his1</i> , <i>trp1</i>
Transformants		
ZH-1/pHZ-8-1	α	<i>ade1</i>
DP-1/pHZ-8-1	α	<i>his1</i>

参 考 文 献

- [1] Gralls E B *et al.* Pro Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8558—8562.
- [2] Heinzen R A *et al.* Infect Immun, 1992, 60 (9): 3814—3823.
- [3] Brehm J K *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36: 358—363.
- [4] Nedeva T S *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1993, 107: 49—52.
- [5] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, 19 (6): 352—356.
- [6] 田宇清等. 中国生物工程学会成立大会论文摘要, 北京: 1993, p. 342.
- [7] 贾盘兴、蔡金科等主编. 微生物遗传学实验技术, 北京: 科学出版社, 1992, pp. 407—408.
- [8] Sambrook J *et al.* Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [9] Sherman F *et al.* Methods In Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986, p. 125—128.
- [10] Gietz D *et al.* Nuclie Acids Research; 1992, 20 (6): 1425.
- [11] 张博润等. 生物工程学报, 1986, 2 (4): 29—34.
- [12] 霍克克等. 中国科学 (B辑), 1992, 9: 922—929.
- [13] Lowry O *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265—275.
- [14] 莽克强等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 北京: 科学出版社, 1975, pp. 52—54.
- [15] 杨唐斌、梅尚筠. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (6): 468—470.
- [16] 邓碧玉等. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (2): 163.

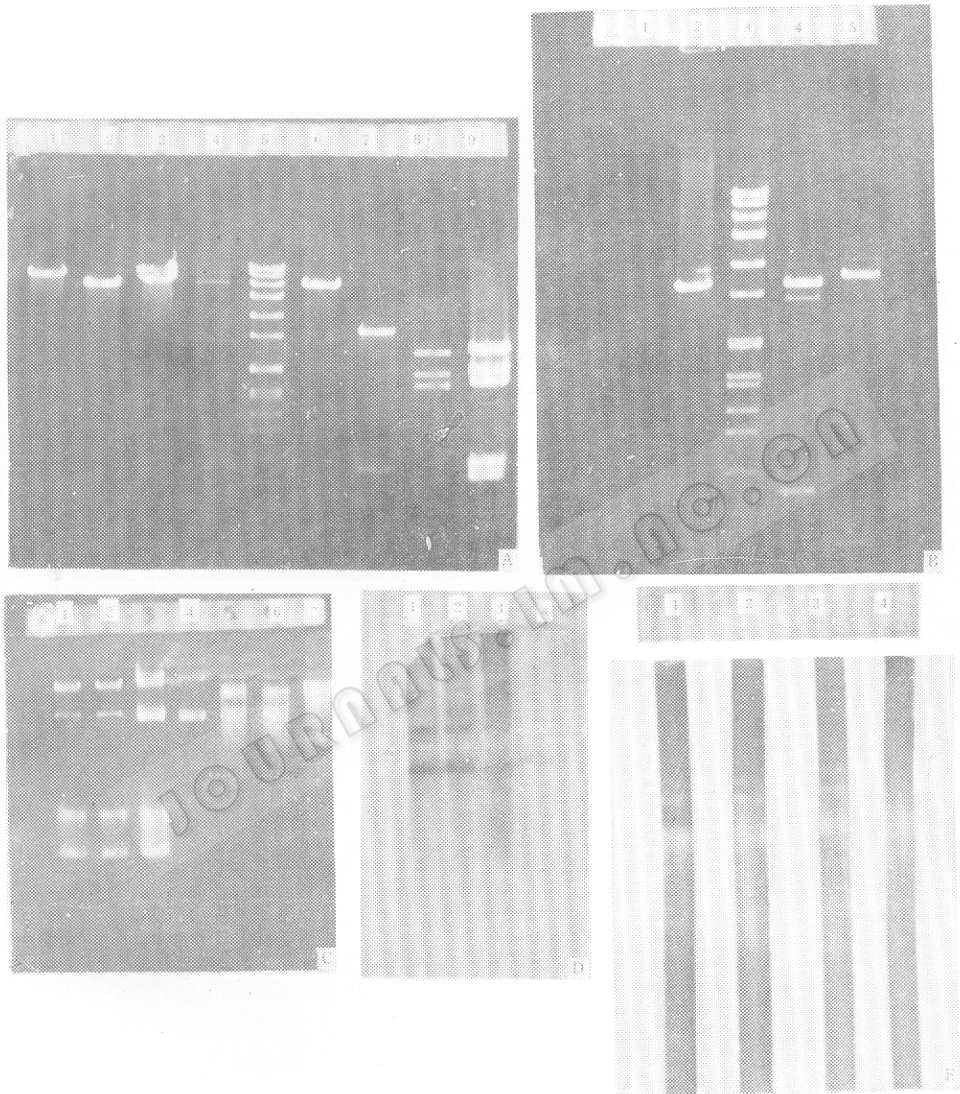
Cloning and Expression of Cu, Zn-SOD of *Saccharomyces cerevisiae*

Zhang Borun Huang Ying Tian Yuqing Tan Huarong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The Cu, Zn-SOD structure-gene from *Saccharomyces cerevisiae* was amplified with PCR method, and the recombinant plasmid pT7-7::SOD was obtained when SOD gene was inserted into pT7-7. SOD gene was then isolated from pT7-7::SOD after EcoRI and PstI digestion, Bluescript M13::SOD was constructed by inserting SOD gene into BluescriptM13, the digested and purified SOD gene was then directly subcloned into SmaI and EcoRI sites of yeast plasmid pHZ-8 containing PGK strong promoter, the constructed recombinant plasmid was designated as pHZ-8-1, and it was introduced into yeast host ZH-1 and DP-1 respectively. The result indicated that the transformants from ZH-1 are stable after 40 generations, and 95% of them still contain plasmid pSH1::SOD. Whereas transformants from DP-1 are very unstable. The results of SDS-PAGE and enzyme active test indicated that the field of SOD expression is about 15% of soluble proteins in transformants from ZH-1, and it also has biological activity.

Key words SOD gene, cloning, expression, *Saccharomyces cerevisiae*



A. Agarose gel electrophoresis of pSC-7, pHZ-8, pHZ-8-1 and Bluescript M13 : : SOD
 1. pSC-7/EcoRI, 2. pHZ-8/EcoRI, 3. pHZ-8-1/EcoRI, 4. pSC-7/SalI, 5. MW marker, 6. pHZ-8/SalI, 7. Bluescript M13 : : SOD/EcoRI+SmaI, 8. pHZ-8/EcoRI+PstI, 9. pHZ-8-1/EcoRI+PstI.
 B. Agarose gel electrophoresis of pT7-7 : : SOD and Bluescript M13 : : SOD
 1. pT7-7 : : SOD/EcoRI + PstI, 2. Bluescript M13 : : EcoRI+PstI, 3. MW marker, 4. Bluescript M13 : : SOD/EcoRI+PstI, 5. Bluescript M13 : :

SOD/HindIII.
 C. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids 1. and 2. JM109/ZH-1/pHZ-8-1, 3. JM109/DP-1/pHZ-8-1, 4. ZH-1, 5. ZH-1/pHZ-8-1, 6. DP-1/pHZ-8-1, 7. DP-1.
 D. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
 1. ZH-1/pHZ-8-1, 2. ZH-1/pHZ-8-1-3, 3. ZH-1, 4. Standard SOD.
 E. Negative staining of polyacrylamide gel electrophoresis
 1-4 Lanes as same as those in I-4.