

枯草芽孢杆菌 *bglS* 基因在酵母染色体上整合

张绍松* 陈永青** 郑伟军* 黄兴奇* 韩英

(复旦大学微生物和微生物工程系 上海 200433)

摘要 将枯草杆菌 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因 (*bglS*) 2.7kbEcoRI 片段和酵母染色体 rDNA 片段克隆到整合型不含酵母自主复制序列 (Autonomously replicating sequence) 的大肠杆菌/酵母菌穿梭质粒 YIP5 上, 构建成 YIP5-*bglS*-rDNA 的杂种质粒 PCZH, 转化 *S. cerevisiae* 并得到表达。稳定性测定表明, Y 33 (PCZH101) 和 Y 33 (PCZH104) 在无选择压力的 YEPD 培养基中繁殖 70 代以上, 两个转化子 90% 以上的酵母细胞仍含有质粒并且遗传特征与染色体行为相似。以 *bglS* 基因作探针, 与酵母染色体 DNA 的 Southern blot 分子杂交证实 *bglS* 基因已整合到酵母菌染色体上。

关键词 *bglS* 基因, 整合, 酵母染色体

编码枯草芽孢杆菌 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶的基因已在 *E. coli*⁽¹⁾ 和 *S. cerevisiae*⁽²⁾ 中克隆和表达。 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶在啤酒发酵过程中的作用也在前文中作了阐述。此外, 还对 *bglS* 基因亚克隆作了功能分析⁽³⁾。进一步对含该基因的酵母克隆子的研究发现, 携带 *bglS* 基因的 YCSH1 质粒在酵母菌中容易丢失, 原因在于该基因的载体大肠杆菌/酵母菌穿梭质粒 YFD 24 在酵母菌中稳定性差, YFD24 属于 YEP 类质粒, 含酵母菌的 ARS, 这类质粒既可在大肠杆菌中自主复制, 也可在酵母菌中自主复制。其优点是可高拷贝转化于酵母菌中, 转化频率高; 缺点是在无选择压力的条件下容易丢失, 稳定性差。

为克服质粒稳定性差的缺点, Teresa. S. Lopes⁽⁴⁾ 等利用转化频率低的整合型质粒 YIP5 作基因载体, 以酵母 rDNA 提高 YIP5 的整合频率, 将磷酸激酶同源基因和胸腺嘧啶异源基因整合到酵母菌染色体上。由于酵母 rDNA 连接在 YIP5 上, 既可克服稳定性差, 又可提高整合频率和拷贝数。

我们以 YIP5 为载体, 将枯草芽孢杆菌 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因 *bglS* 连接到携带酵母 rDNA 的 YIP5 上, 用构建的 YIP5-*bglS*-rDNA 杂种质粒 PCZH1 转化酵母菌, 本文报道了 *bglS* 基因整合在酵母染色体上的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *E. coli* MC1061; F⁻araD139, Δ (ara, leu) 7696, Δ lacY74, galU, galK, hsr⁻, hsm⁻, *E. coli* 质粒转化受体菌, 复旦大学遗传所提供。*S. cerevisiae* Y33; his⁻, ade⁻, ura⁻, leu⁻, 酵母质粒转化受体菌, 复旦大学遗传所提供。测定稳定性参照菌株

* 现在单位: 云南省农业科学院生物技术研究所

** 本文负责人。

本研究得到上海市科委资助和敖万远同志的协助。

本文于 1993 年 12 月 20 日收到。

S. cerevisiae Y33 (YCSH1): 本系保存。

1.1.2 质粒: 质粒 YCSH1 (YFD24+2.7kbEcoRI 片段), 含 *bglS* 基因, 本系保存。

YIP5: Ap^r, Tc^r, ura⁻。不含酵母菌的 ARS, 复旦大学遗传所提供。

pMG20: Ap^r, Leu2⁺, 含酵母菌染色体 rDNA 片段, 本系保存。

1.1.3 培养基: *E. coli* 的 LB 培养基等, 同文献 [1], 酵母菌培养基, 包括基本培养基和选择性培养基, 同文献 [5]。

1.1.4 试剂: DNA 重组所用试剂均购自上海华美生物工程公司, 地衣多糖, 大麦 β -1,3-1,4-葡聚糖及 Southern blot 所用试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 和目的片段的制备: 质粒 DNA 制备参照 Birnboim⁽⁶⁾的碱性抽提法, YCSH1 质粒 DNA 和 pMG20 质粒 DNA 分别经 EcoRI 完全酶切后, 依次电泳并在 DEAE 纤维素滤纸上分别收集 *bglS* 基因, 2.7kb EcoRI 片段和 rDNA 基因 EcoRI 片段。

1.2.2 杂种穿梭质粒的构建和转化: 参照 Maniatis⁽⁶⁾和 Hisaoito⁽⁷⁾等方法。

1.2.3 酵母总 DNA 制备和 Southern blot 分子杂交: 参照文献 [8] 和 [6]。

1.2.4 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活性检测: 参照文献 [2]。

1.2.5 质粒在酵母菌中稳定性测定: 从斜面上挑一环酵母菌于 SD-ura⁻选择性培养基中, 振荡培养至细胞数 10^7 /ml, 收集菌体, 洗涤后转接于 YEPD 中 (约 10^4 /ml), 继续振荡培养至 10^7 /ml。收集菌体, 洗涤, 经稀释后涂于基本培养基和选择性培养基的平皿上测数。同时取收集的菌体转接于 YEPD 中。重复传代测数, 计算含 ura 基因的菌体数在每一次传代过程中总菌体的百分率。

2 结果

2.1 含 *bglS* 基因和酵母 rDNA 基因的 PCZH 质粒构建

2.1.1 含 *bglS* 基因的 PLH24 质粒构建: YCSH1 质粒经 EcoRI 酶切所得 2.7kb 片段, 与 YIP5 经同一限制酶剪切的线状质粒在体外连接, 转化 *E. coli* MC1061, 在含 Ap 的 LB 平皿上获得转化子, 进一步筛选能在地衣多糖培养基上产生水解圈的即为含 *bglS* 基因转化子。选择水解圈较大的 PLH24, 作为进一步构建 PCZH 的杂种穿梭质粒, 从 *E. coli* MC1061 (PLH24) 中抽提 PLH24 质粒, 经 EcoRI 不完全酶切, 电泳收集线状 8.2kb 条带 (YIP5+*bglS*), 并与 pMG20 经同一限制酶酶切所得的 2.6kb rDNA 在体外连接, 转化 *E. coli* MC1061, 在含 Ap 的 LB 平皿上获得转化子, 并在地衣多糖培养基上筛选能产生水解圈的转化子 (即含有 *bglS* 基因), 用快速小量抽提法抽提转化子的质粒, 在琼脂糖凝胶上电泳, 质粒条带滞后即含 2.6kb rDNA。进一步用 Hind III 酶切转化子的质粒, 确证 2.6kb rDNA 片段也在构建的 PCZH 质粒上, 将构建的 YIP5-*bglS*-rDNA 杂种穿梭质粒依次命名为 PCZH1, PCZH2 和 PCZH3。

2.1.2 杂种穿梭质粒 PLH24 和 PCZH1 的酶切分析: PLH24 经 Hind III 酶切后, 产生 7.9kb 和 0.3kb 两条带 (图 2), 从而推知离 *bglS* 基因 Hind III 酶切位点 0.3kb 一端与 YIP5 质粒上离 Hind III 酶切位点 32bp 一端相连。构建的 YIP5-*bglS*-rDNA 杂种质粒 PCZH1, 经 Hind III 完全酶切, 从琼脂糖凝胶电泳图 (图 2) 可知, Hind III 酶切 PCZH1 后

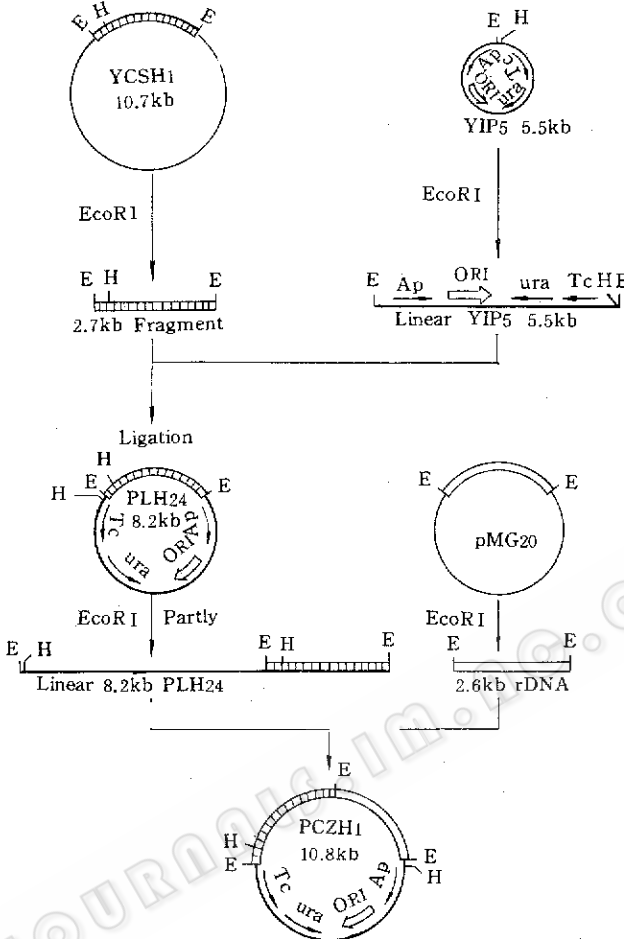


图 1 PLH24 和 PCZH1 质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of two *E. coli*/*S. cerevisiae* shuttle hybrid plasmids PLH 24 and PCZH1
 ■ 2.7kb EcoRI *bglS* gene fragment of *B. subtilis*, □ EcoRI *rDNA* gene fragment of yeast,
 Restriction sites for the enzyme, E. EcoRI, H. Hind III



图 2 杂种穿梭质粒 PLH24 和 PCZH1 的酶切分析
 Fig. 2 Analysis of digesting hybrid shuttle plasmid PCZH1 and PLH24
 1. λ DNA/Hind III, 2. PLH24/Hind III, 3. PCZH1/Hind III

产生分子量相近的两条带(约 5kb)。已知 YIP5 在离 EcoRI 酶切位点 32bp 处有一 Hind III 酶切位点, *bglS* 基因在离 EcoRI 酶切位点一端 0.3kb 处有一 Hind III 酶切位点, 故 *bglS* 基因在 YIP5 上是以两者的 Hind III 酶切位点相背方式而连接, *rDNA* 则从 YIP5 上邻近 Hind III 酶切位点端的 EcoRI 酶切位点上插入。Hind III 酶切 PCZH1 产生分子量相近的两片段 DNA 分子 (2.4 + 2.6 + 0.032 和 5.5 + 0.3), 说明 *bglS* 基因和 *rDNA* 已连接在 YIP5 上。

2.2 *bglS* 基因在酵母菌中克隆和表达

含有枯草芽孢杆菌 *bglS* 基因和酵母 *rDNA* 基因的杂种穿梭质粒 PCZH1, 从 *E. coli* MC1061 (PCZH1) 抽提出来, 利用 LiAc 完整细胞转化法, 转化 *S. cerevisiae* Y33。PCZH1 质粒上只含有大肠杆菌中表达的启动子, 不含酵母

菌的 ARS。此外 PCZH1 含 *ura* 基因, 受体酵母菌 Y33 是 *ura*⁻ 型, 利用 *ura*⁻ 选择性培养基筛选出携带 *ura* 基因的 PCZH1 整合到酵母染色体上并表达的转化子, 转化率为每 10 μ g 质粒 DNA 中有 3 个转化子。筛选到产 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶 6 个转化子, 依次命名为 PCZH 101-PCZH 106。

酵母转化子中经地衣多糖定性检测产酶较明显的 2 个转化子, 与 *E. coli* MC1061 (PLH 24), *E. coli* MC 1061 (YCSH1), *E. coli* MC 1061 (PCZH1) 和 Y33 (YCSH1) 同时用 β -1, 3-1, 4-葡聚糖定性测定产酶能力, 结果表明五种转化子产酶能力稍有不同, *E. coli* MC 1061 (PLH 24) 的水解透明圈较大, *E. coli* MC 1061 (YCSH1) 和 *E. coli* MC 1061 (PCZH1) 略小; Y 33 (YCSH1) 与 Y 33 (PCZH 101) 和 Y 33 (PCZH 104) 三者的水解圈相近, 均比三种质粒在 *E. coli* 中表达水平低。进一步定量测定六者的产酶能力 (见表 1), 与定性测定结果相符。

表 1 *bglS* 基因在不同质粒及其宿主中产酶比较

Table 1 Comprision of *bglS* gene in different plasmids and strains

Plasmids and strains	<i>E. coli</i> MC 1061			<i>S. cerevisiae</i> Y 33		
	YCSH1	PLH24	PCZH1	YCSH1	PCZH101	PCZH104
Consist of plasmids	YFD24+ <i>bglS</i>	YIP5- <i>bglS</i>	YIP5+ <i>bglS</i> +rDNA	YFD24+ <i>bglS</i>	YIP5+ <i>bglS</i> +rDNA	YIP5+ <i>bglS</i> +rDNA
Enzyme activity (u/ml)	80.2	91.4	62.4	2.2	2.1	1.8

2.3 PCZH1 质粒在酵母 Y 33 染色体上整合的鉴定

2.3.1 PCZH1 质粒在酵母菌中稳定性: 以 *ura*⁻ 选择性固体培养基检测含质粒的菌体数, YEPD 固体培养基测定菌体总数和繁殖的世代数。测定菌体在 YEPD 液体培养基中

繁殖若干世代后, 含质粒菌体的百分率 (见图 3)。从图 3 可知, 测试的 3 个转化子中, 以游离型质粒 YFD 24 作载体的 Y 33 (YCSH1) 稳定性最差。繁殖 10 代后, 质粒保持率为 60% 左右, 繁殖 70 代后, 质粒保持率已很低 (约 10%)。相反, Y 33 (PCZH 101) 和 Y 33 (PCZH 104) 的质粒稳定性相近, 而且在繁殖 70 代后质粒保持率在 90% 以上。说明不同类型载体的 YCSH1 与 PCZH1 两种质粒在其宿主中存在方式不同。而且 PCZH 质粒的保持率与染色体遗传性质相近, 表明 PCZH1 整合在染色体上随染色体而遗传。我们以 *bglS* 基因为探

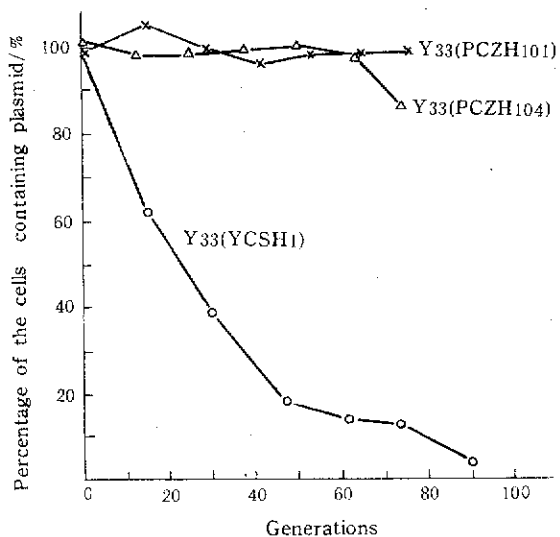


图 3 转化子中质粒的稳定性

Fig. 3 stability of plasmids in transformants

* The generation be estimated as $A \times 2^n = B$

A. Inoculating cells, B. Total cells, n. Generation

针,进行了分子杂交,结果也证实了这一点。

3 讨论

载体质粒及其宿主不同, *bglS* 基因产物表达水平也不同, *bglS* 基因产物表达水平在酵母中比在大肠杆菌中低(见表1)。在 *E. coli* MC 1061中, *bglS* 的载体为 YIP5, 其表达水平比 YFD 24作载体高, 但同是 YIP5 作载体, 连接上 *bglS* 和 rDNA 两个基因时, 表达水平却比前两者都低, 表明载体质粒荷基因数与基因表达水平有关。此外, 基因在质粒上的插入方向与表达水平也有一定关系^(2,9,10)。在酵母菌中, *bglS* 基因在两种类型质粒载体上表达水平相近, Teresa S. Lopes 等⁽⁴⁾报道了同源基因和异源基因通过 YIP5-rDNA 载体整合到酵母染色体上后, 表达水平与 YEP 类质粒载体相近。

YFD24 和 YIP5 是两种不同类型的质粒, 转化于酵母菌时, YEP 类质粒拷贝数在 50~200 之间, 而 YIP 类质粒拷贝数要少得多⁽¹¹⁾, 其实质乃由于 YEP 类质粒具有 ARS, 可游离由染色体外而自主复制; 而 YIP 类质粒由于无 ARS, 只能整合在染色体上后, 依赖酵母染色体上的 ARS 而复制。因此, 在酵母菌中表达水平 YIP 类质粒比 YEP 类质粒要低得多。我们曾以 YIP5-*bglS* 转化于酵母菌, 尽管 YIP5 可发生多位点整合⁽¹²⁾, 但 *bglS* 基因产物表达水平低至难以检测。从 YIP5-*bglS*-rDNA 转化酵母菌时, 其表达水平与 YC-SH1 相近, 可见 PCZH1 中的酵母 rDNA 片段已提高了整合的拷贝数。

我们筛选 *bglS* 基因整合到酵母染色体上的转化子是以 *ura* 基因作选择性标记, 由于 *ura* 基因是 PCZH1 质粒上基因之一, *ura* 基因整合到酵母染色体上表明 PCZH1 质粒与酵母染色体已发生整合。此外, PCZH1 上无 ARS, 在酵母菌中不能自主复制, 在酵母菌中有 *bglS* 基因的产物表达, 表明 *bglS* 基因已整合在染色体上借宿主 ARS 而表达。稳定性测定和 Southern blot 分子杂交进一步证实了 *bglS* 基因已整合在染色体上。酵母染色体 rDNA 2.6kb EcoRI 片段是位于酵母菌 XI 染色体上⁽¹³⁾, 由于我们所用的 PCZH1 质粒上具有酵母菌染色体的 *ura* 和 rDNA 两个基因, *bglS* 基因除在酵母菌 XI 染色体上整合外, 是否在其他染色体上整合, 有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 宋大新, 张胜妹, 黄兴奇等. 复旦学报(自然科学版), 1989, 28(4): 394~400.
- [2] Chen YQ, Huang XQ, Song D X *et al.* Current Microbiology, 1992, 25: 279~282.
- [3] 陈永青, 宋大新, 黄兴奇等. 生物工程学报, 1991, 7(4): 323~327.
- [4] Teresa S Lopes Jacobus K, Annemahie K *et al.* Gene, 1989, 79: 199~206.
- [5] Birnboim H. C. Methods in Enzymol. 1983, 100: 243~255.
- [6] Maniatis T Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning, p. 104, 259, Cold Spring Harbor Laboratory 1982.
- [7] Hisao I, Yasuki F, Kousaku M. J Bacteriology, 1983, 153: 163~168.
- [8] Seehaus T, Rodicio R, James B *et al.* Current Genetics, 1985, 10: 103~110.
- [9] Hinchliffe E. Current Genetics, 1984, 8: 471~475.
- [10] Cantwell, B A, Mc Connell Ds. Gene, 1983, 23: 216.
- [11] Walmsley, R M Gardner, D C J, Dilver S G. Mol Gen Genet. 1983, 191: 361~365.
- [12] Drr-Weaver. Mol Cell Biol 1983, 3: 747~749.
- [13] Petes T D. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 410~414.

Bacillus Subtilis *bglS* Gene Integrated into Chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*

Zhang Shaosong Chen Yongqing Zheng Weijun Huang Xinqi Han Yin

(Department of Microbiology and Microbial Engineering, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract YIP5 without automomusly replicating sequence of yeast was employed for an *E. coli/S. cerevisiae* shuttle vector. A rDNA fragment of yeast and a 2.7kb EcoRI DNA fragment carrying a *Bacillus subtilis* endo- β -1, 3-1, 4-glucanase gene (*bglS*) from *E. coli* plasmid YCSH1 was cloned into the vector to construct a hybrid plasmid PCZH1 with YIP5-*bglS*-rDNA genes. The hybrid plasmid was used to transform the *S. cerevisiae* and express the β -1, 3-1, 4-glucanase gene. The stability tests of Y33 (YCSH1), Y33 (PCZH101) and Y33 (PCZH104) showed that the two integrated transformants were stabler than the episomid transformant in yeast cells. The cells of the two integrated transformants retained their plasmids more than 90 percent over a period of 70 generations of growth in batch culture under non-selective conditions. At the same time the genetic character of the hybrid plasmid seemed as the yeast chromosome. The Southern blot hybridization between the yeast DNA and the *bglS* gene probe with ^{32}P indicated that the *bglS* gene was integrated into the chromosomes of yeast.

Key words *bglS* gene, integration, yeast chromosome