

解脂耶氏酵母 *tsr1* 突变体的构建*

罗玉萍 李思光 洪一江

(南昌大学生物系 南昌 330047)

摘要:将解脂耶氏酵母与蛋白质分泌有关的 *TSR1* 基因编码区部分缺失的 DNA 片段转化一株解脂耶氏酵母。通过体内同源重组,部分缺失的外源 *tsr1* 片段取代了酵母染色体上的正常的 *TSR1* 基因,从而获得 *tsr1* 的转化子。Southern 杂交结果表明,用该法成功地构建了 *tsr1* 突变体,这为进一步研究解脂耶氏酵母 *TSR1* 基因的功能奠定了基础。

关键词:解脂耶氏酵母, *TSR1* 基因, 突变

中图分类号:Q344 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0060-04

CONSTRUCTION OF *YARROWIA LIPOLYTICA tsr1* MUTANTS BY GENE DELETION

LUO Yu-Ping LI Si-Guang HONG Yi-Jiang

(Department of Biology Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: This *TSR1* gene associated with the secretion of Proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* was deleted. Transformation of a *Y. lipolytica* strain with the disrupted *tsr1* fragment resulted in the substitution of partially deleted *TSR1* gene for the wild-type *TSR1* gene on the chromosome. The result of southern hybridization show that the *tsr1* mutants have been constructed. The isolation of these mutants would be useful for studying the function of *TSR1* gene in yeast *Y. lipolytica*.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, *TSR1* gene, Mutation

解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 不仅是重要的工业微生物,还因其能大量地分泌蛋白质至胞外培养基中^[1]而成为研究蛋白质分泌的模式菌株。Cheon S. P. 已用它作为宿主来表达和分泌水稻 α -淀粉酶^[2]。要使 *Y. lipolytica* 不仅能有效地表达外源基因,也能高效地分泌基因产物,就需研究其蛋白质分泌的调控机制,鉴定其分泌通道主要时期的遗传标记。

解脂耶氏酵母的蛋白质分泌依赖于信号识别颗粒(Signal Recognition Particle SRP)。其 SRP 含有一个典型的 7S RNA,该 7S RNA 由 2 个基因 *SCR1* 和 *SCR2* 编码。通过定点诱变 *SCR2* 基因的 128,130 位置获得了温度敏感的突变型 *Scr2* II-13。该突变影响 SRP 的稳定性并影响蛋白质的分泌^[3,4]。我们获得了 *Scr2* II-13 的抑制突变,该抑制突变使 *Scr2* II-13 突变株的蛋白质分泌恢复正常,相应的抑制基因 *TSR1* 已被克隆并已测序,进一步的工作就是了解该基因的功能,而要研究其功能首先需改变染色体上这一基因。本文报道的是通过同源重组构建解脂耶氏酵母 *tsr1* 突变体的结果。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39860037)

Project Granted by chinese National Natural Science Fund (No. 39860037)

收稿日期:1999-12-21,修回日期:2000-02-24

1 材料与方法

1.1 菌株

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*), INAG 1236463(Δ SCR1, TCR2⁺, his-1, ura3, leu2) 作为酵母转化的受体菌。

1.2 质粒

ppop-out-TSR1: 带有 URA3 基因和缺失 0.7kb BssHII-MluI 片段的 TSR1 基因, pCCla 1: 带有 LEU2 基因和 TSR1 基因。

1.3 酶和试剂

限制性内切酶 *Nsi* I, *Nco* I, *Xho* I 和 Klenow 酶均购自 Bio-Labs 公司。其它试剂购自 Sangon 公司。

1.4 培养基及培养条件

酵母完全培养基为 YPD(1% 酵母提取物, 1% 蛋白胨, 1% 葡萄糖)。选择性培养基 YNB N₀ (0.17% Yeast Nitrogen Base W/O Amino Acids, 1% 葡萄糖, 0.1% 嘌呤, 根据需要加入 0.2% 组氨酸, 亮氨酸或 0.05% 尿嘧啶)。Ura⁻选择培养基 5-FOA(在 YNB N₀ 培养基中加入 0.0015% 尿嘧啶, 0.125% 5-Fluoroorotic Acid)。酵母在 28°C 培养。

1.5 质粒的制备

参照 Birnboim 等的方法进行^[5]。

1.6 解脂耶氏酵母的转化

解脂耶氏酵母的整合转化采用醋酸锂方法进行^[6]。

1.7 酵母总 DNA 的提取

解脂耶氏酵母总 DNA 根据 Barth 方法提取^[7]。

1.8 探针的制备及 Southern 杂交

用 *Xho* I 和 *Nco* I 酶切 pCCla 1 质粒, 回收 TSR1 编码区 719bp 的 *Xho* I / *Nco* I 片段制探针。探针制法如下, 在 Eppendorf 管中加入 1 μ L 入 DNA, 5 μ L *Xho* I / *Nco* I DNA 片段, 补水至 50 μ L, 煮沸 5min 后加入 33 μ L 水, 10 μ L 核苷酸混合物, 2 μ L Klenow 酶, 5 μ L ³²p-dCTP, 37°C 温育 15min, 加入 5 μ L 0.5mol EDTA pH8.0 中止反应。酵母总 DNA 用 *Nco* I 酶切后在 0.7% 琼脂糖凝胶中分析, 然后真空转移至 Hybond-N-membrane (Amersham corp.), 用探针与之杂交过液, 洗膜后进行放射自显影分析。

2 结果与讨论

2.1 部分缺失的外源 *tsr1* 片段在酵母体内与野生型 TSR1 基因的同源重组与取代

我们采用 Scherer 和 Davis 的方法^[8]来改变酵母染色体上的 TSR1 基因。pop-out-TSR1 质粒上含有完整的 URA3 基因和缺失 0.7kb BssH II / Mlu I 片段的 TSR1 基因。将该质粒用 *Nsi* I 酶切后转化解脂耶氏酵母 INAG 1236463 菌株。利用插入的 URA3 基因为选择标记, 在含亮氨酸和组氨酸 YNB N₀ 平板上选择转化子。共获得 22 个转化子。纯化后, 挑取 1~10 号至 YPD 培养液中 28°C 培养过夜, 当菌液浓度至 1.0 \times 10⁷ cell/mL 时, 涂布于 5-FOA 平板, 使每平板为 1.0 \times 10⁷ 和 1.0 \times 10⁶ 个细胞。培养 5d 后从中挑取 60 个菌落点植于 YNB No+his+leu+ura 平板和 YNB No+his+leu 平板, 找出在前者生长而在后者不生长的转化子。共获得 21 株, 这其中可能含有我们所需的转化子, 即, 部分缺失的外源 *tsr1* 片段与染色体上正常的 TSR1 基因在同源区内发生双交换, 结果导致部分缺失的 *tsr1* 片段取代了原来染色体上野生

型的 *TSR1* 基因,形成部分缺失的突变体(图 1)。

2.2 酵母 *tsr1* 突变体的鉴定

将 21 株在 YNB No+his+Leu+ura 培养基上生长而在 YNB No+his+leu 培养基上不生长的酵母转化子和转化受体菌在 YPD 培养基中 28°C 培养过夜。分别提取总 DNA,用 *Nco I* 酶切,然后在 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳过夜。第 2d 进行 Southern 转移,并用从 pCCLaI 质粒中获得 *TSR1* 基因的 0.7kb *Nco I/Xho I* DNA 片段作为探针与酵母总 DNA 杂交,放射自显影后即可鉴定 *tsr1* 突变体。由于外源 *tsr1* 片段缺失 0.7kb,如果部分缺失的 *tsr1* 片段取代了原来染色体上野生型的 *TSR1* 基因,就会形成 1040bp 的 DNA 片段,反之则形成 1723bp 的 DNA 片段。结果共获得 3 株 *tsr1* 突变体,分别命名为 *Y₄*、*Y₁₅*、*Y₄₆*。为了进一步验证,我们又向 *Y₄₆* 中转化带有 *LEU2* 基因和 *TSR1* 基因的质粒 pC-Clal。选择 *Leu⁺* 转化子,提取其总 DNA 后,与 *tsr1* 突变体及受体菌总 DNA 一起进行杂交分析。实验结果:转化受体菌杂交后出现 1723bp DNA 片段;携带 pCCLaI 质粒的 *Y₄₆* 菌株杂交后出现 1040bp 和 1723bp 的 DNA 片段;*Y₄*、*Y₁₅* 和 *Y₄₆* 菌株杂交后均出现 1040bp 的 DNA 片段。表明转化受体菌染色体上含野生型的 *TSR1* 基因。携带 pCCLaI 质粒的 *Y₄₆* 菌株其染色体上含部分缺失的 *tsr1* DNA 片段而其所携带的质粒上含野生型的 *TSR1* 基因,所以与特异探针杂交后会出现二条带。*Y₄*、*Y₁₅* 和 *Y₄₆* 菌株均出现 1040bp 的 DNA 片段是由于部分缺失的 *tsr1* 片段取代了原来染色体上野生型 *TSR1* 基因的结果,说明已成功构建了 *tsr1* 突变体。

一般经典的突变方法往往存在不定点,机制不清、不稳定等方面的问题,本实验利用体外改造过的基因片段与染色体上正常基因进行同源重组,具有突变机制清楚,突变位点明确等优点。我们成功地建了解脂耶氏酵母 *tsr1* 突变体。这一新的突变体将有利于研究与蛋白质分泌有关的 *TSR1* 基因的功能,从而为进一步揭示解脂耶氏酵母蛋白质分泌的机制提供依据。

致谢 本工作得到法国国家农业研究中心 Beckerich J M 研究员的帮助,在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] Barth G, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*. In: Worf C (ed) Nonconventional yeast in Biotechnology, Berlin Heidelberg: Springer-verlag publishers, 1996, 313~315.
 [2] Cheon S P. J Biol Chem, 1997, 272(11):6875~6881.
 [3] Poritz M A. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:4315~4319.

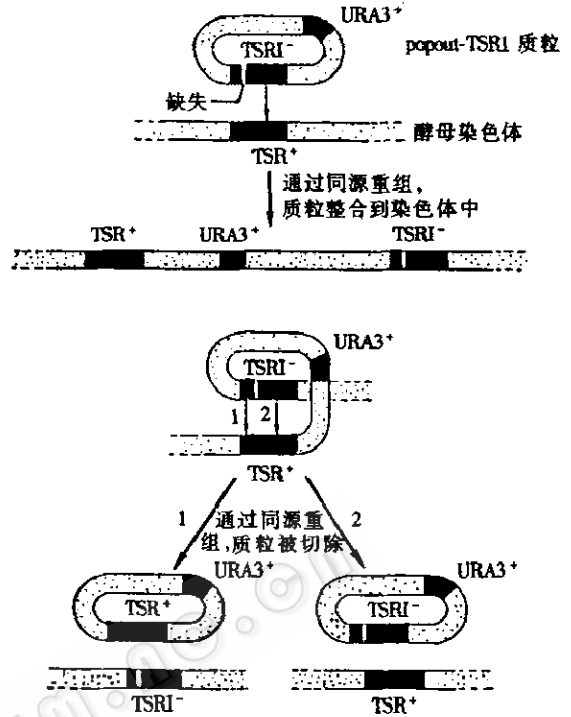


图 1 酵母体内的同源重组示意图

- [4] He F, Beckerich J M, Gaillardin C. J Biol Chem, 1992, **267**(3):1932~1937.
- [5] Birnboim H C, Doly J. Nucl Acid Res, 1979, **72**:1513~1522.
- [6] Barth G, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*. In: Worf C(ed) *Nonconventional yeast in Biotechnology*, Berlin Heidelberg: Springer-verlag publishers, 1996, 369~370.
- [7] Barth G, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*. In: Worf C(ed) *Nonconventional yeast in Biotechnology*, Berlin Heidelberg: Springer-verlag publishers, 1996, 373~374.
- [8] Scherer S, Davis R W. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, **76**:4951~4955.