

# 解脂耶氏酵母 *TSR1* 基因的定点诱变\*

罗玉萍 李思光

(南昌大学生物科学工程系 南昌 330047)

**摘要:** 对解脂耶氏酵母与蛋白质分泌有关的 *TSR1* 基因进行寡核苷酸介导的定点诱变, 限制性内切酶切割和拼接, 得到了该基因的一系列缺失突变体。这为进一步研究 *TSR1* 基因不同结构域的功能奠定了基础。

**关键词:** 解脂耶氏酵母, 缺失突变, *TSR1* 基因

中图分类号: Q344 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 05-0065-05

## SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF *TSR1* GENE IN YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*

LUO Yu-Ping LI Si-Guang

(Department of Biology, Nanchang University, Nanchang 330047)

**Abstract:** The *TSR1* (thermosensitive rescued) gene associated with the secretion of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* was site-directed mutagenesis, restricted and spliced to obtain a series of deletion mutants. These mutants would be useful for studying the function of different domains of *TSR1* gene in yeast *Yarrowia lipolytica*

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*, Deletion mutant, *TSR1* gene

在高等真核细胞中, 信号识别颗粒 (Signal recognition particle SRP) 是大多数分泌蛋白和膜蛋白穿越内质网膜的主要成分。与高等真核细胞一样, 解脂耶氏酵母的 SRP 也含一个典型的 7S RNA, 由 2 个基因 *SCR1* 和 *SCR2* 编码<sup>[1,2]</sup>。Feng He 等定点诱变 *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<sup>[3]</sup>。通过诱变获得 *tsr1* 突变可以使 *scr2 II-13* 突变的温度敏感特性和 SRP 的稳定性完全恢复正常。相应的抑制基因 *TSR1* 已通过互补 *tsr1* (*SCR2*) 突变的温度敏感表型从基因文库中克隆。DNA 序列分析表明 *TSR1* 含 1 个 1383 碱基对的开放阅读框, 编码 1 个 461 氨基酸的富含丝氨酸和苏氨酸的蛋白质<sup>[4]</sup>。已知 *TSR1* 基因编码的蛋白质是蛋白质分泌通道中的成分, 对它的研究有助于我们认识蛋白质分泌的机制。本文构建 *TSR1* 基因的一系列缺失突变体, 以深入了解 *TSR1* 基因的不同结构域的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株 [supE44,  $\Delta$ lacU 169 (Q80lac Z DM15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] 用于质粒扩增。大肠杆菌 CJ236 菌株 [*dut-1*, *ung-1*, *thi-1*, *relA-1*/PCJ105 (Cam<sup>R</sup>) 用于定点诱变。

\* 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: 2000-05-28, 修回日期: 2001-01-20

**1.1.2 质粒:** pCC1a1 (由法国国家农业研究中心 Beckerich J M 提供) 为 pBR322 的衍生质粒, 带有 *LEU2* 基因和 *TSR1* 基因, 是大肠杆菌和解脂耶氏酵母中的穿梭质粒, 用于一系列 *tsr1* 缺失突变体的构建。pBS-TSR1 (由作者构建) 用于定点诱变, 在 *TSR1* 基因中引入 *Sma*I 和 *Sna*BI 位点, pBS-TSR1 构建方法如下: 从 pCC1a1 质粒中分离 1.644 kb *Hind*III-*Eco*RI 片段, 将其克隆于 Bluescript KS (-) (stratagene) 中。

**1.1.3 酶和试剂:** 限制性内切酶 *Mlu*I、*Sca*I、*Sac*I、*Sac* II *Fsp*I、*Nco*I、*Bst*XI、*Bst*E2、*Sma*I、*Sna*BI、*T*<sub>4</sub>DNA 连接酶, *T*<sub>4</sub>DNA 聚合酶 I, Klenow 酶均为 New England Biolabs 公司产品。*T*<sub>7</sub>DNA 聚合酶序列测定试剂盒购于 Pharmacia, 定点诱变试剂盒由 BioRad 提供。

**1.1.4 培养基和培养条件:** 大肠杆菌完全培养基为 LB (1% 蛋白质, 1% 氯化钠, 0.5% 酵母提取物 pH7.5), 选择性培养基为 LBA (含 0.01% 氨苄青霉素的 LB), 在 37℃ 培养。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒的提取:** 感受态制备与转化按文献 [5] 进行。

**1.2.2 寡核苷酸介导的定点诱变:** 采用 Kunkel<sup>[6]</sup> 的方法, 利用 BioRad 提供的试剂盒制备替换突变体, 操作过程如下: 用 Bjosearch DNA 合成仪合成与 *TSR1* 基因相应区域互补的寡核苷酸, 大小为 32 碱基和 30 碱基, 其序列为 CACCATCCATTTA\*CGTA\*CTCACAGTGGTGGGC 和 CCACGTTAGACCCCG\*G\*GTCGAAACACAAGG (带星号的碱基为替换碱基)。从 *E. Coli* CJ236 菌株制备和分离含尿嘧啶单链模板 DNA pBS-TSR1, 将 10pmol 磷酸化的寡核苷酸与 0.3pmol 模板在 helper phage M13K07 存在时退火, 使引物与模板的比率为 30:1, 用 *T*<sub>4</sub> 噬菌体 DNA 聚合酶体外合成第二条链。合成的双链 DNA 用于转化 *E. Coli* DH5 $\alpha$  菌株, 挑选氨苄青霉素抗性菌落提取质粒 DNA。定点诱变后, 含 *tsr1* 突变基因的 1.644kb *Hind*III-*Eco*RI 片段亚克隆于质粒 pCC1a1 中。

**1.2.3 DNA 的酶切、纯化和连接:** 以 pCC1a1 质粒为基础, 利用 *TSR1* 基因内部存在的 *Mlu*I、*Sca*I、*Sac*I、*Sac* II *Fsp*I、*Nco*I、*Bst*XI、*Bst*E2、*Eco*RI 位点和定点诱变得到的 *Sna*BI 和 *Sma*I 位点对整个基因进行酶切, 用 0.8% 琼脂糖凝胶纯化酶切后的 DNA 片段, 切下含所需 DNA 片段的凝胶块, 采用 "GeneClean III" (promega) 试剂盒回收纯化片段, 纯化片段通过 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶在室温下连接过夜, 拼接后得到 8 个缺失突变体通过酶切和测序鉴定。

**1.2.4 DNA 序列的测定:** 用 *T*<sub>7</sub> DNA 聚合酶序列测定试剂盒进行自动测序, 按试剂盒中提供的程序进行反应。

## 2 结果

### 2.1 *TSR1* 基因中 *Sna*BI 和 *Sma*I 酶切位点的获得和鉴定

将含 *TSR1* 基因的 1644bp 片段克隆于 Bluescript KS (-) 中, 定点诱变后挑选单个菌落抽提质粒进行酶切验证。图 1 为诱变质粒酶切鉴定结果。诱变前质粒中只含一个 *Sma*I 位点, 一个 *Hind*III 位点, 没有 *Sna*BI 位点。诱变后质粒中含 2 个 *Sma*I 位点, 一个 *Sna*BI 位点, 用相应的限制酶双酶切后获得 DNA 片段的数目和大小与预期一致。*Hind*III 和 *Sma*I 双酶切获得 2851bp, 1035bp 和 607bp 3 个片段, *Hind*III 和 *Sna*BI 酶切获得 3674bp 和 917bp 2 个片段。表明在 *TSR1* 基因的相应区域引入了 *Sna*BI 和 *Sma*I 位点。

### 2.2 *tsr1* 一系列缺失突变的构建

*TSR1* 基因中的若干有用的酶切位点和构建的几个酶切缺失突变体如图 2 所示, 碱

基位置以基因的第1个ATG为1.

8个酶切缺失突变体的构建如下:

MS: 用 *Mlu*I 及 *Sca*I 酶切除去 225 bp 片段。

SS1: 用 *Sca*I 及 *Sna*BI 酶切除去 255bp 片段。

SS2: 用 *Sna*BI 及 *Sma*I 酶切除去 117bp 片段。

SS3: 用 *Sma*I 及 *Sac* II 酶切除去 220bp 片段。

SF: 用 *Sac*I 及 *Fsp*I 酶切除去 171bp 片段。

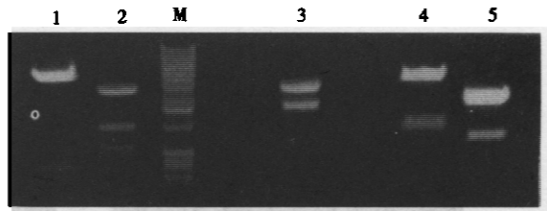


图1 诱变质粒酶切鉴定

M 1kb ladder marker, 1 *Pst*I/*Sac*II 双酶切, 2 *Hind*III/*Sma*I 双酶切, 3 *Hind*III/*Pst*I 双酶切, 4 *Hind*III/*Sna*BI 双酶切, 5 *Hind*III/*Sac*I 双酶切

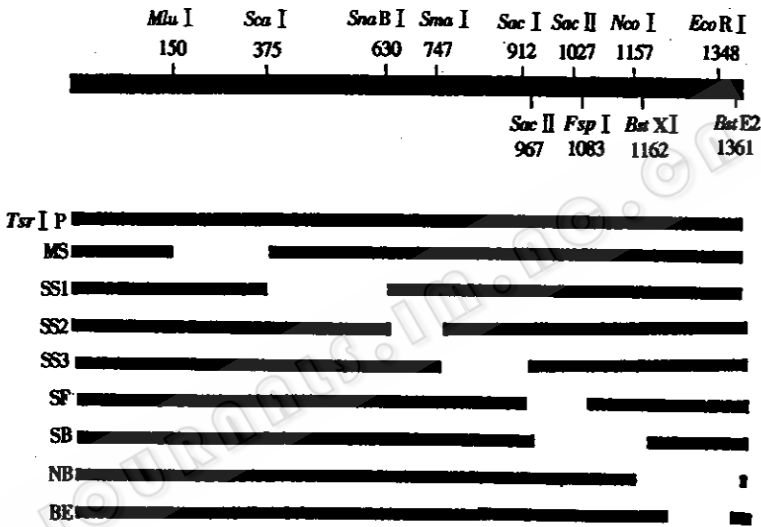


图2 *TSR*I 基因酶切位点及酶切缺失突变体的缺失区段示意图

SB: 用 *Sac* II 及 *Bst*xI 酶切除去 195bp 片段。

NB: 用 *Nco*I 及 *Bst*E2 酶切除去 204bp 片段。

BE: 用 *Bst*xI 及 *Eco*RI 酶切除去 198bp 片段。

上述缺失突变点后的阅读框没有改变。全长基因及 8 个缺失突变体缺失区段见图 2。由于这些突变体由 2~4 个片段拼接而成, 为了排除错误拼接, 采用相应位置的限制酶双酶切后获得 DNA 片段的数目与大小与预期一致。用 *Nhe*I 和 *Sph*I 对位于 pCCL1 的 MS、SF、SB、NB、BE 双酶切后获得约 500, 2500, 8000 3 个片段 (图 3A), 用 *Eco*RI 和 *Hind*III 对位于 pBS 的 SS1、SS2、SS3 双酶切后获得约 2960, 1500 两个片段 (图 3B), 表明这些缺失突变体连接无误。此外, 拼接前, 限制酶切时已对 5' 端伸出的粘性末端用 Klenow 酶补平, 对 3' 端伸出的粘性末端用 *T*<sub>4</sub> DNA Pol II 切平, 拼接后缺失突变体的拼接点的 DNA 序列应为  $\Delta$  *Mlu*I/*Sca*I: ACGCGACT,  $\Delta$  *Sca*I/*Sna*BI: AGTGTA,  $\Delta$  *Sna*BI/*Sma*I: TACGGG,  $\Delta$  *Sma*I/*Sac*II: CCCGG,  $\Delta$  *Sac*I/*Fsp*I: GGCA,  $\Delta$  *Sac*II/*Bst*XI: CCATGG,  $\Delta$  *Nco*I/*Bst*E2: CCATGGTCACC,  $\Delta$  *Bst*XI/*Eco*RI: CCATAATTC。DNA 序列测

定结果与预期的一致(图4),表明已成功地获得一系列 *tsr1* 定点缺失突变体。

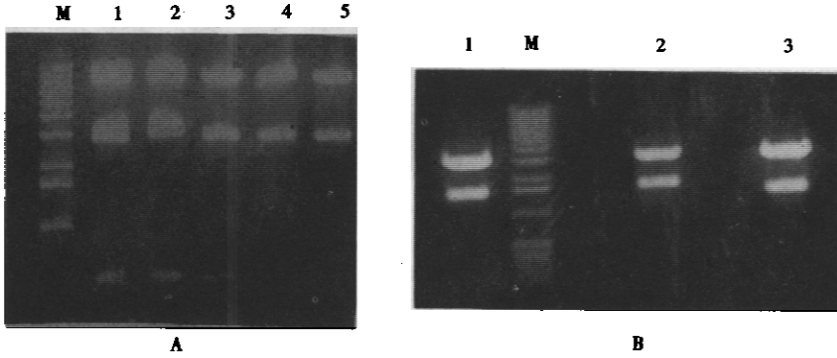


图3 突变体酶切鉴定

A: 1 BE, 2 SF, 3 MS, 4 SB, 5 NB

B: 1 SS1, 2 SS2, 3 SS3

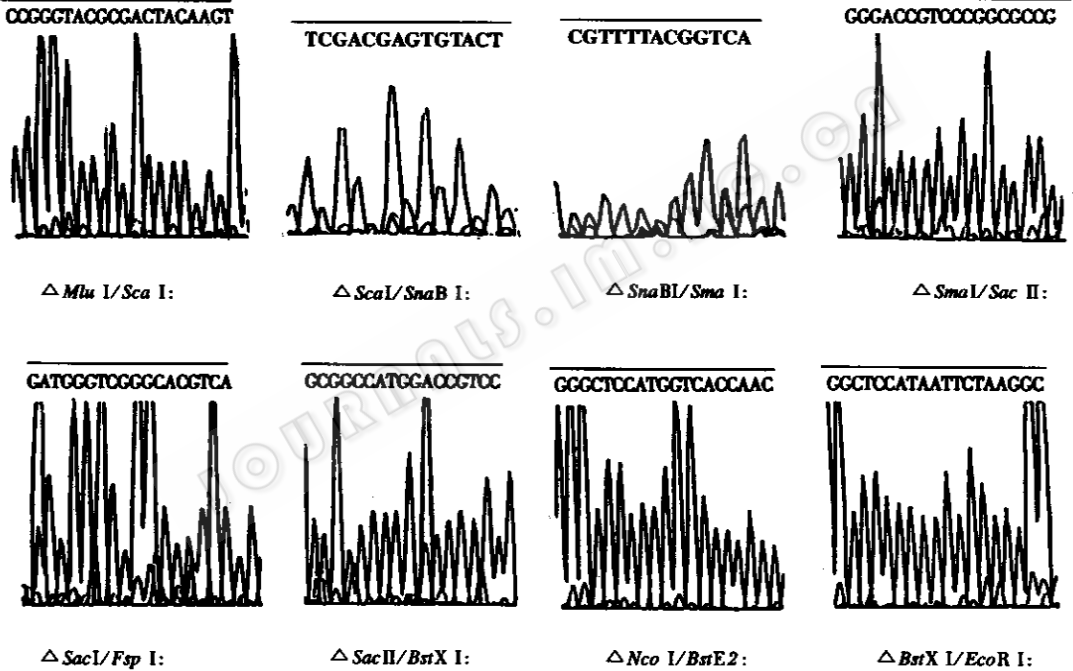


图4 突变体拼接点的DNA序列测定

### 3 讨论

解脂耶氏酵母 *Y. lipolytica* 因能大量地分泌碱性磷酸酶至胞外培养基中而成为研究蛋白质分泌的模式菌株<sup>[7]</sup>。要深入了解 *Y. lipolytica* 蛋白质分泌的调控机制,就必需鉴定其分泌通道主要时期的遗传标记。近几年,国外有些学者相继鉴定了 *Y. lipolytica* 一些与蛋白质分泌有关的基因<sup>[8-10]</sup>。

*TSR1* 就是一种与蛋白质分泌有关的基因。*tsr1* 突变能够抑制 *scr2II-13* 突变的效应,使SRP稳定性和蛋白质分泌恢复正常。那么 *TSR1* 基因产物是如何与SRP相互作用,如何稳定SRP的结构,从而促进蛋白质分泌的呢?要解决这一问题,进一步的工作就是利用酵母的双杂交系统来了解 *TSR1* 基因产物与SRP的相互作用, *TSR1* 基因的哪个结

构域起主要作用。鉴于此,我们构建了 *TSRI* 基因的一系列缺失突变体,以了解 *TSRI* 基因不同结构域的功能。

致谢 承蒙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] Poritz M A, Siegel V, Hansen W, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988, **85**: 4315 ~ 4319.
- [2] He F, yaver D, Beckerich J M, *et al.* Curr Genet, 1990, **17**: 289 ~ 292.
- [3] He F, Beckerich J M, Gaillardin C. J Biol Chem, 1992, **267**: 1932 ~ 1937.
- [4] Mamount C B, Beckerich J M, Gaillardin C. J Biol Chem, 1996, **271**: 23895 ~ 23901.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Manatis T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
- [6] Kunkel T A, Roberts J D, Zakour R A. Meth Enzymol, 1987, **154**: 367 ~ 382.
- [7] Barth G, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica* In: worf C (ed) Nonconventional Yeast in Bio technology. springer-verlag publishers. 1996.
- [8] pertuiset B, Beckerich J M, Gaillardin C. Curr Genet, 1994, **27**: 123 ~ 130.
- [9] Swennen D, Joyet P, Gaillardin C. Curr Genet, 1997, **31**: 128 ~ 132.
- [10] Doisrame A, Beckerich J M, Gaillardin C. J Biol Chem, 1996, **271**: 11668 ~ 11675.