

光滑球拟酵母金属硫蛋白基因的亚克隆和表达研究

张博润 蔡向荣* 何秀萍 铁翠娟

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 用 BamHI 和 PstI 双酶切质粒 pMTIIa-91s, 获得光滑球拟酵母金属硫蛋白基因 (MTIIa) 片段, 将其亚克隆到 M13 载体, 扩增并回收 MTIIa 基因片段, 经 Southern 杂交验证插入片段正确后, 分别将 MTIIa 基因片段插入到大肠杆菌表达载体 pBV220 和大肠杆菌-酵母菌穿梭载体 YIp352 中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 使其对 CuSO $_4$ 的抗性提高 0.7mol/L 左右; 转化酿酒酵母受体菌 YS59, 使 YS59 对 CuSO $_4$ 的抗性提高 1.5mol/L 左右。结果证明光滑球拟酵母 MTIIa 基因在大肠杆菌和酿酒酵母中都获得高效表达。

关键词 光滑球拟酵母, 金属硫蛋白基因, 克隆和表达

分类号 Q93-3 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0159-162

THE SUBCLONING AND EXPRESSION OF THE METALLOTHIONEIN-IIa GENE OF *CANDIDA GLABRATA*

Zhang Borun Cai Xiangrong He Xiuping Tie Cuijuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The MTIIa gene of *Candida glabrata* was gained from plasmid pMTIIa-91s digested with restriction enzymes BamHI and PstI, then subcloning it into M13 vector. It was confirmed that the insert fragment was right by Southern blotting. Proliferating MTIIa gene and ligating it into *E. coli* expression vector pBV220 and *E. coli*-yeast shuttle vector YIp352. The ligation mixtures were transformed into *E. coli* DH5 α and *S. cerevisiae* YS59 respectively. The experiment of resistance to CuSO $_4$ proved that the DH5 α cells with the recombinant plasmids were 0.7mol/L higher than the cells without them, and the YS59 cells with the recombinant shuttle vectors were 1.5mol/L higher than the cells without them. According to these results, it proved that the MTIIa gene of *Candida glabrata* was expressed efficiently.

Key words *Candida glabrata*, metallothionein gene, cloning and expression

金属硫蛋白 (metallothionein, 简称 MT) 是一类广泛存在于生物体内的低分子量、富含 Cys、能被金属诱导的重金属结合蛋白, 它具有多种生物活性功能。自从 Margphshes 等人^[1]在肾脏中首次发现 MT 以来, 人们对不同动、植

物及微生物的 MT 的分离纯化、物理和化学特性、MT 基因的克隆与表达及其生物学功能等

* 现在青岛三生生物研究所工作

1998-08-20 收稿, 1998-12-17 修回

进行了研究^[2-6]。本文报道了光滑球拟酵母(*Candida glabrata*)MTIIa基因在大肠杆菌和酿酒酵母中的亚克隆及表达研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验中所用的菌株与质粒见表1。

表1 本研究使用的实验菌株

菌 株	表型和基因型	来 源
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)DH5 α	supE44, Δ lacU169(ϕ 80, lacZ, M15)hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1 relA1	本实验室
啤酒酵母(<i>S. cerevisiae</i>)YS59	a, ura 3-52, leu 2-3, his 4	本实验室

表2 本研究使用的质粒及构建的重组质粒的有关特性

质 粒	大小(kb)	选择标记	基本特性描述	来 源
BluescriptM13	2.96	amp ^R	高拷贝的克隆载体, lacZ插入失活	本实验室保存
pBV220	3.66	amp ^R	含P _{KL} 启动子的原核高效表达载体	侯云德教授惠赠
pZHC-8	3.47	amp ^R	含酵母MTIIa基因的载体	本研究构建
pMTIIa-91s	11.3	URA ⁺	含酵母MTIIa基因的载体	美国Winge实验室赠送
pCM1-1	6.9	LEU ⁺ amp ^R	含酵母CUP1+MTI基因的载体	美国Winge实验室赠送
Ylp352	4.3	URA ⁺	酵母整合型载体	本实验室保存

BamHI, PstI 购于 Promega 公司, T4DNA 连接酶购于华美公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 提取采用碱裂解法。

1.2.2 基因片断的分离、回收和连接: 参照文献方法 [8]。

1.2.3 转化及筛选^[8]。

1.2.4 探针的标记及 Southern 杂交: 参照 Sambrook 等人方法^[8]进行。

1.2.5 转化子对硫酸铜的抗性测定: 大肠杆菌转化子抗性的测定: 在 LB 培养基中加入不同浓度的 CuSO₄。酵母转化子抗性的测定: 在 YEPD 或 NEP 培养基中加入不同浓度的 CuSO₄。

2 结果

2.1 酵母 MTIIa 基因的大量扩增

用 BamHI 和 PstI 双酶切 pMTIIa-91s 质粒, 获得 509bp 的 MTIIa 基因, 与 BamHI 和 PstI 双酶切的 M13 载体连接, 转化受体菌, 蓝白菌落筛

1.1.2 培养基: YEPD 培养基^[7]。LB 培养基^[7]。YNB^[7]。NEP 培养基: MgSO₄ · 7H₂O 0.02g, (NH₄)₂SO₄ 0.02g, K₂HPO₄ 0.03g, CaCl₂ · 2H₂O 0.0025g, 酵母粉 0.02g, 胰蛋白胨 0.03g, 葡萄糖 4g, 用蒸馏水定容至 100mL, pH6.0。0.55 × 10⁵pa 灭菌 30min。

1.1.3 试剂盒和酶: 地高辛(digoxigenin)标记盒购于德国 Boehringer Mannheim 公司, EcoRI,

选, 挑取白色菌落提质粒, 确定有插入片断, BamHI 和 PstI 双酶切转化子质粒, 与用随机引物法标记的 MTIIa 探针进行 Southern 杂交(图1), 证明插入的片断为 MTIIa 基因片断, 将此重组质粒命名为 pZHC-8, 通过培养含有 pZHC-8 的转化子, 大量提取 pZHC-8 质粒, 供下一步研究用。

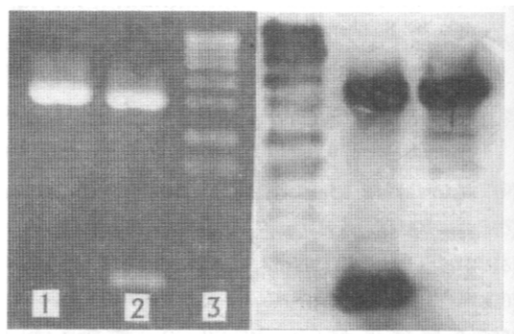


图1 pZHC-8质粒的酶切电泳图及Southern杂交图

1. M13/BamHI, 2. pZHC-8/BamHI+PstI, 3. SppI/EcoRI

2.2 MTIIa 基因在大肠杆菌中的亚克隆和表达

大量酶切 pZHC-8 质粒, 用透析法回收

509bp的MTIIa基因片断,与用BamHI和PstI双酶切的高效表达载体pBV220连接,转化大肠杆菌DH5 α 。碱法提取质粒,证明有插入片断如图(2)。对有插入片断的9个转化子测定其对CuSO $_4$ 的抗性(图3),抗性测定结果表明受体菌DH5 α 在含5.0mmol/L CuSO $_4$ 的培养基上生长,在含5.1mmol/L CuSO $_4$ 的培养基上不长;而转化子在含5.8mmol/L CuSO $_4$ 的培养基上都能生长,抗性比受体至少提高0.7mmol/L。

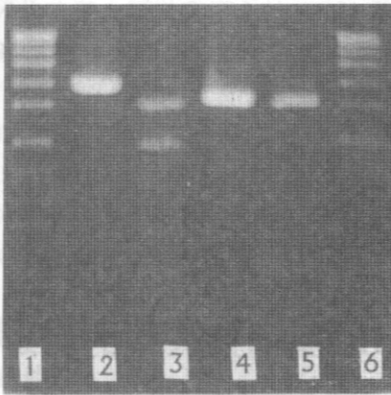


图2 带有MTIIa基因的M13载体和pBV220载体及其酶切电泳照片

1. SppI/EcoRI, 2. pBV220::MTIIa/EcoRI,
3. pBV220::MTIIa/BamHI+PstI, 4. M13/EcoRI,
5. pZHC-8/BamHI+PstI, 6. SppI/EcoRI

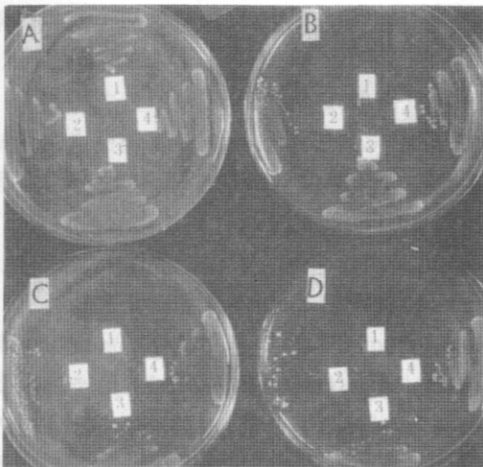


图3 受体菌和转化子对CuSO $_4$ 的抗性测定结果

1. 受体 DH5 α , 2~4: 转化子, A: 5.0mmol/L,
- B: 5.1mmol/L, C: 5.5mmol/L, D: 5.8mmol/L

2.3 MT 基因在酵母中的表达

将回收的MTIIa基因片断与双酶切的大肠杆菌-酵母菌穿梭载体YIp352连接,采用完整细胞转化法转化酵母受体菌YS59,在加有Leu和His的YNB培养基上筛选转化子,获得3个酵母转化子,测定受体YS59及转化子对CuSO $_4$ 的抗性(图4)。测定结果表明受体菌YS59在含1.5mmol/L CuSO $_4$ 的培养基上不生长,而转化子在含3.0mmol/L CuSO $_4$ 的培养基上也生长,转化子的抗性比受体至少提高1.5mmol/L。



图4 受体菌和转化子对CuSO $_4$ 的抗性测定结果

1. 受体 YS59, 2~4. 带MTIIa基因的酵母转化子
- A: 0.5mmol/L, B: 1.0mmol/L, C: 1.5mmol/L,
- D: 3.0mmol/L

3 讨论

3.1 光滑型酵母MTIIa基因在大肠杆菌中的表达

外源基因在原核细胞中表达必须考虑表达载体,通常的原核表达载体要求有强的原核启动子及其两侧的调控序列;应有S-D序列,而S-D序列与起始密码子ATG之间要有合适的距离;在克隆基因与启动子之间有正确的阅读框架等;外源基因下游应加入不依靠P因子的转录终止区。Z. Sayers等把MT基因连接到表达载体pET-3a,获得表达^[9]。本研究选择的表达载体为pBV220高效表达载体,它带有 λ 噬菌体强启动子P $_R$ P $_L$,把光滑型酵母MTIIa基因插入到pBV220后,转化大肠杆菌DH5 α 后,获得

高效表达,使受体 DII5 α 对 CuSO₄的抗性提高至少 0.7mmol/L。

3.2 光滑型酵母 MTHa 基因在酿酒酵母中的表达

外源基因在酵母中的表达,受多种因素的影响,如基因启动子的强弱,基因剂量,信号序列的特性,质粒的稳定性,受体菌的遗传背景和培养特点等。本研究选择的大肠杆菌-酵母菌穿梭载体为整合型穿梭载体 YIp352,转化酿酒酵母受体 YS59,使 YS59 对 CuSO₄的抗性至少提高 1.5mmol/L。

参 考 文 献

[1] Margoshes M, Vallee B L, Amer J. *Chem. Soc.*, 1957, 79:4813~4814.

- [2] Thorvaldsen J, Mehra R, Yu W *et al.* *Yeast*, 1995, 11:1501~1511.
- [3] Schott EJ, Gardner RC. M.G.G., 1997, 254(1):63~66.
- [4] Kambe HH, Sugawara K, Yoda K. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(3):373~379.
- [5] Tohyama H, Inouhe M, Joho M *et al.* *J Indust Microbiol*, 1995, 14:126~131.
- [6] Fischer EH, Davie EW. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7):3333~3334.
- [7] 张博润,田宇清,黄英等. *微生物学报*, 1994, 34(4): 279~284.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1989.
- [9] Sayers Z, Brouillon P, Vorias CE *et al.* *Eur J Biochem*, 1993, 212:521~528.