

# 毕赤酵母己糖运载体 *HXT1* 基因缺失菌株的构建

张文文 张平 宣姚吉 周祥山\* 张元兴

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘要:** 葡萄糖在酵母胞内的转运是依靠己糖运载体家族成员完成的。目前在酿酒酵母中已鉴定了 18 个己糖运载体基因, 各自功能也已得到深入的研究。然而在作为优良蛋白表达系统的毕赤酵母中, 目前国内外尚未有此类基因的相关报道。本文基于酵母同源重组率高的特性, 以 G418 作为抗性筛选标记, 分别在其 5' 和 3' 端连接缺失毕赤酵母基因 *HXT1* 开放阅读框 ORF 的上下游各 200 bp 作为同源重组区, 电转毕赤酵母 GS115 感受态, 通过不同浓度 G418 抗性平板筛选, 最终得到了 *HXT1* 基因缺失的毕赤酵母菌株 GS115  $\Delta$  *HXT1*。通过与野生株比较发现, *HXT1* 基因缺失株的生长状况及葡萄糖利用都有所下降。

**关键词:** 毕赤酵母, 己糖运载体, G418 抗性, 基因缺失

## Construction of Hexose Transporter-like *HXT1* Deletion Mutant in *Pichia pastoris*

ZHANG Wen-Wen ZHANG Ping XUAN Yao-Ji ZHOU Xiang-Shan\* ZHANG Yuan-Xing

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Glucose was transported by the large number of hexose transporters in yeast cells. There were 18 hexose transporter genes had been identified in *Saccharomyces cerevisiae*. However, as an excellent expression system, there was no information of these genes had been reported in *Pichia pastoris*. Based on high homologous recombination efficiency in yeast, we chose G418 resistance for screening, 200 bp were cloned from the up and down sequences of *HXT1* ORF respectively, then ligated to the 5' and 3' end of G418 resistance gene for recombination. After electroporation of GS115 spheroplast and screened through different G418 concentration plates, finally we obtained one *HXT1* gene deletion mutant named GS115  $\Delta$  *HXT1*. The growth rate and glucose consumption of this mutant were both lower than the wide type.

**Keywords:** *Pichia Pastoris*, Hexose transporter, G418 resistance, Gene deletion

细菌的二次生长现象揭示了微生物的碳源利用规律。葡萄糖作为自然界含量最丰富的单糖, 成为微生物最易利用并获得最大生长速率的碳源和能源。葡萄糖在胞内的转运及利用情况在模式生物酿酒酵母中已得到深入而广泛的研究。迄今为止, 在

酿酒酵母中已发现 18 个己糖运载体基因(Hexose transporters *HXT1-17* 和 *GAL2*)<sup>[1]</sup>。其中, *HXT* (1、2、3、4、6 和 7) 为葡萄糖的运载体, *GAL2* 为半乳糖运载体, *HXT* (5 和 8-17) 为其它与葡萄糖结构类似的己糖如果糖和甘露糖等的运载体。每种运载体对于葡

葡萄糖的亲亲和性和承载能力是有区别的, 例如 *HXT1* 是一个低亲和、高承载的己糖运载体, 在葡萄糖含量丰富时 (>~1%) 发挥主要作用; 而 *HXT2* 则是一个高亲和、低承载己糖运载体, 在葡萄糖稀少时 (~0.2%) 才进行转录; 其它运载体则针对不同胞外糖浓度适时发挥作用。酵母细胞就是利用己糖运载体家族的广大成员来应对各种不同的胞外糖浓度。缺失己糖运载体家族中的 8 个基因便可使酵母丧失对己糖的运输作用而无法在葡萄糖培养基上生长<sup>[2-4]</sup>。作为优良蛋白表达系统, 甲醇利用型酵母毕赤酵母已得到了广泛的应用。但目前没有毕赤酵母己糖运载体的报道, 有必要对此类基因进行研究。

本课题所研究的 *HXT1* 基因是在毕赤酵母中发现的第一个己糖运载体基因, 通过同源比对发现, 此基因与目前已发现的酿酒酵母和其它酵母中的己糖运载体家族某些成员具有很高的同源性, 尤其与汉逊酵母中的 *HXT1* 基因同源性最高<sup>[5]</sup>, 但该基因在毕赤酵母中的功能目前还不清楚, 需要进一步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 TOP10, 毕赤酵母 GS115, pUC18 质粒, pPIC3.5K 质粒均由本实验室保藏, pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 培养基及培养条件

**1.2.1 培养基:** LB (1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 0.5%氯化钠, 50 μg/mL Ampicilin, 50 μg/mL Kanamycin), 固体培养基为上述成分加入 1.5%琼脂粉制得。YPD (1%蛋白胨, 2%酵母提取物, 2%葡萄糖), 固体培养基为上述成分加入 2%琼脂粉, 1 mol/L 山梨醇和不同浓度梯度的 G418。MGY (1.34% YNB, 1%甘油, 4×10<sup>-5</sup>%生物素, 0.004%组氨酸)。MM (1.34% YNB, 4×10<sup>-5</sup>%生物素, 0.5%甲醇, 0.004%组氨酸)。

**1.2.2 培养条件:** 大肠杆菌 37°C LB-Ampicilin 平板培养或液体培养基 200 r/min 振荡培养; 毕赤酵母 30°C YPD-G418 平板培养或液体培养基 200 r/min 振荡培养。

### 1.3 主要仪器和试剂

PCR 仪购自 Bio-Rad 公司; 紫外/可见分光光度计 UV751GD 购自上海分析仪器总厂; 气相色谱购自上海分析仪器总厂。葡萄糖液体试剂盒购自上海

捷门生物技术公司。

## 1.4 方 法

**1.4.1 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化及常规的 DNA 克隆操作**参照文献[6], 毕赤酵母感受态细胞的制备和转化参照文献[7]。

**1.4.2 引物设计及 PCR 条件:** PCR 引物(表 1)为上海英俊公司合成。PCR 条件: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1000 bp/min, 30 个循环。

表 1 实验中使用的引物  
Table 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	序列 Sequences
Primer1	5'-CGGAAAAATTACCCCAAAAACCTGGTGAT-3'
Primer2	5'-GGCATAATGAGGACGAGAGCTCTGTG-3'
PrimerHXT1X	5'-ATGAGTTCAACAGATATCCAAGGTG-3'
PrimerHXT1Y	5'-CGGTTATAGGGCGCCCTTGTCTTTA-3'
PrimerHXT1A	5'-CCTTAAACCTAAAAGAAAAACGG-3'
PrimerHXT1B	5'-AGTAGGCATGGCATAATGAGGA-3'
Primer5	5'-CCGGAATCCGGAAAAATTACCCCAAAA-3'
Primer6	5'-CGCGATCCATTATATATGGGGAATAA-3'
Primer7	5'-ACGCGTCGACTTTGGAAGGGTTTGATGAT-3'
Primer8	5'-ACATGCATGCGGCATAATGAGGACGAGAG-3'
Primer13	5'-CGCGATCCAAGGAGATGGCGCCAAC-3'
Primer14	5'-ACGCGTCGACACTTGAAGTCGGACAGT-3'

**1.4.3 载体构建:** 以毕赤酵母 GS115 的基因组 DNA 为模板, 用引物 Primer1 和 Primer2 扩增出 1989 bp 的 *HXT1* 基因(其中包括完整开放阅读框 1617 bp), 克隆到 pUC18 质粒多克隆位点上, 作为后续实验的模板。用引物 Primer5 和 Primer6 扩增出 *HXT1* 基因的 5'同源序列(193 bp), 两端分别加上酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam*H I, 与 pUC18 质粒相连构成 pUC18(*HXT1*Up)。用引物 Primer7 和 Primer8 扩增出 *HXT1* 基因的 3'同源序列(203 bp), 两端分别加上酶切位点 *Sal* I 和 *Sph* I, 与 pUC18 质粒相连构成 pUC18(*HXT1*Down)。用引物 Primer13 和 Primer14 从 pPIC3.5K 质粒上扩增出自带启动子和终止子 *Kan* 抗性基因(1529 bp), 两端分别加上酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I。质粒 pUC18(*HXT1*Up) 和 *Kan* 抗性基因片段分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后连接, 构成质粒 pUC18(*HXT1*Up-*Kan*), 随后用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 胶回收片段 *HXT1*Up-*Kan*(1716 bp), 与同样 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的质粒 pUC18(*HXT1*Down)连接, 得到目标质粒 pUC18(*HXT1*Up-*Kan*-*HXT1*Down)(图 1)。

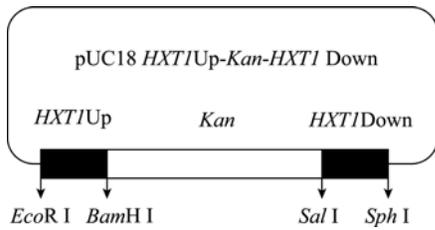


图1 质粒 pUC18HXTIUp-Kan-HXTIDown 构建  
Fig. 1 Construction of plasmid pUC18HXTIUp-Kan-HXTIDown

## 2 结果

### 2.1 毕赤酵母 GS115ΔHXTI 缺失菌株的构建

本实验以卡那霉素抗性基因作为筛选标记, 卡那霉素基因在毕赤酵母中为 G418 抗性。采用替换缺失(双交换)基因缺失法构建 HXTI 缺失菌株<sup>[8]</sup>(图2)。

将以上构建好的质粒 pUC18(HXTIUp-Kan-HXTIDown)用 EcoR I 和 Sph I 双酶切, 胶回收目的片段 HXTIUp-Kan-HXTIDown(1913 bp), 电转毕赤酵母 GS115 感受态。此片段的 5'和 3'端同源区 HXTIUp 和 HXTIDown 会和酵母染色体上的 HXTI 基因发生同源重组, 使卡那霉素抗性基因替换完整的 HXTI 阅读框 ORF。

### 2.2 GS115ΔHXTI 缺失菌株的筛选

鉴于 G418 的筛选浓度与卡那霉素抗性基因在毕赤酵母染色体上的拷贝数存在一定的比例关系, 将电转后的菌液取不同细胞数涂布于相应 G418 浓度的 YPD 抗性平板进行筛选(表2), 30°C 培养 4 d~5 d。8 块平板上共长出 6 个菌落, 全部抽提基因组, 分别用卡那霉素抗性基因的上下游引物

Primer13 和 Primer14、HXTI 基因的上游外围引物 PrimerHXT1A 和 Primer14、Primer13 和 HXTI 基因的下游外围引物 PrimerHXT1B 进行 PCR 验证。如果卡那霉素抗性基因整合到 HXTI 基因所在染色体位置并替换了 HXTI, 则以上 3 对引物能分别扩增出 1517 bp、1717 bp 和 1717 bp 大小的条带(图 3A), 而未发生缺失的菌株则全部扩增不出条带。结果在 6 株菌中, 有两株菌(1 号和 5 号)扩增出正确大小的条带(图 3B)。随后又以 1 号和 5 号菌的基因组为模板, 用 HXTI 基因的外围引物 PrimerHXT1A 和 PrimerHXT1B 可以扩增出 1913 bp 大小的条带。而用 HXTI 基因 ORF 的内部引物 PrimerHXT1X 和 PrimerHXT1Y 却扩增不出条带(图 3C), 这就说明 HXTI 基因的 ORF 在基因组上不存在了。将 1 号和 5 号菌株的用引物 PrimerHXT1A 和 PrimerHXT1B 扩增出的 1913 bp 大小条带胶回收后分别连接到 T 载体上送至英俊公司(上海)测序, 用 M13 通用引物

G418 concentration (mg/mL)	Cell numbers (cell/plate)
0.50	$1.0 \times 10^7$
0.50	$0.5 \times 10^7$
0.35	$3.5 \times 10^6$
0.35	$2.5 \times 10^6$
0.25	$2.0 \times 10^6$
0.25	$1.5 \times 10^6$
0.25	$1.0 \times 10^6$
0.25	$5.0 \times 10^5$

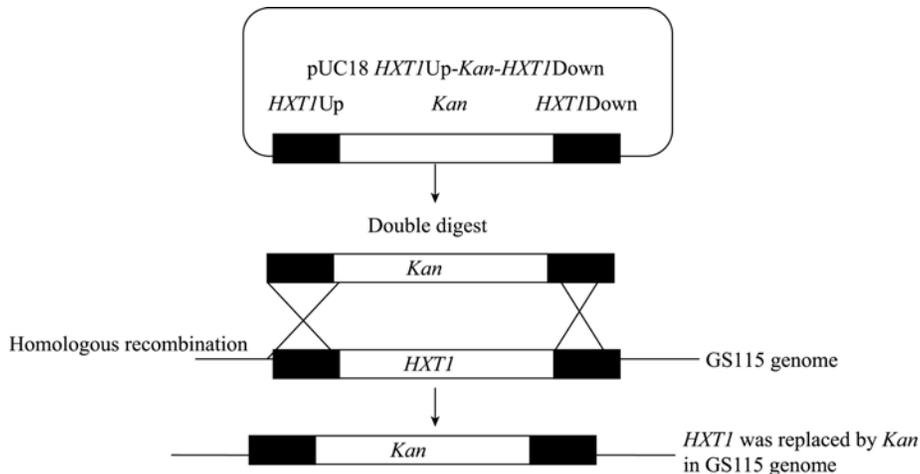


图2 基因替换缺失方法  
Fig. 2 Gene replacement deletion method

注: 右侧黑框代表 HXTI 基因的 3'端序列, 左侧黑框代表 HXTI 基因的 5'端序列。  
Note: The right black box is 3' sequence, the left is 5' sequence.

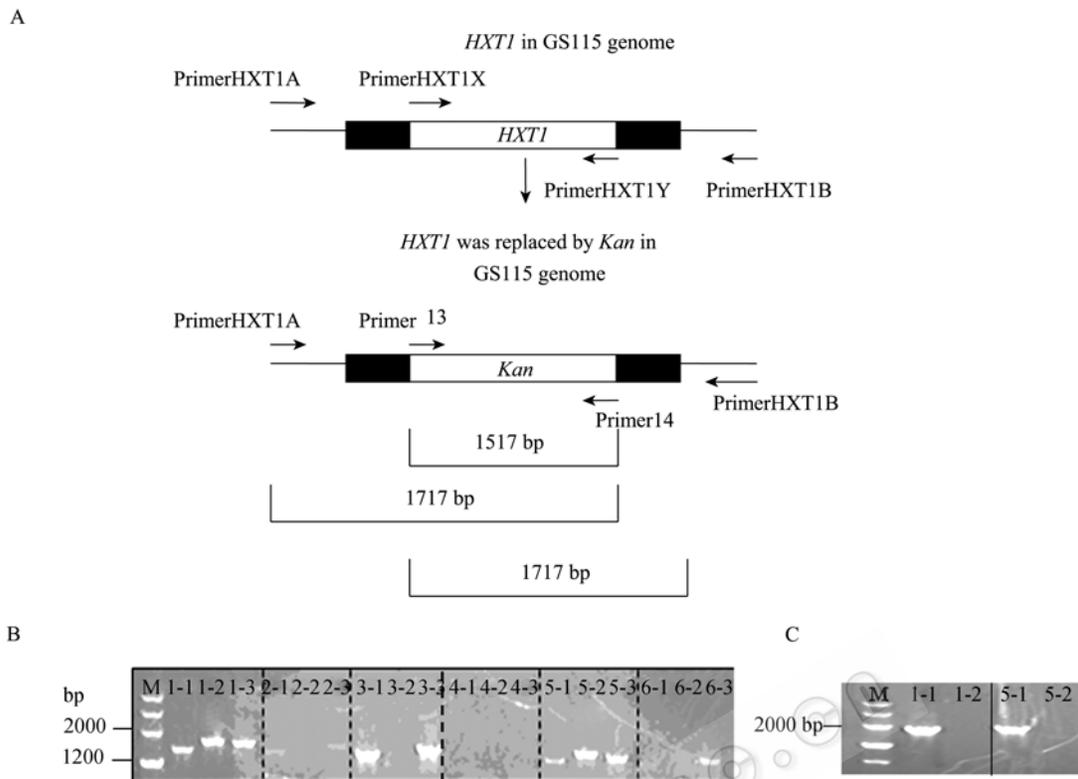


图3 Kanamycin 抗性克隆的 PCR 验证

Fig. 3 PCR identification of kanamycin resistance clones

注: A: 验证引物及扩增片段长度说明; B: Kanamycin 抗性克隆 1~6 号的 PCR 验证, 1~6: 1~6<sup>#</sup> 克隆; M: Marker; 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 6-1: PCR primer13 和 14; 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2: PCR primer13 和 HXT1B; 1-3, 2-3, 3-3, 4-3, 5-3, 6-3: PCR primerHXT1A 和 14; C: 1 号和 5 号的 PCR 验证, M: Marker; 1-1, 5-1: PCR PrimerHXT1A 和 B; 1-2, 5-2: PCR PrimerHXT1X 和 Y.

Note: A: PCR primer and DNA fragment length illustration; B: PCR identification of kanamycin resistance clones 1~6<sup>#</sup>, 1~6: 1~6<sup>#</sup> clones; M: Marker; 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 6-1: PCR primer13 and 14; 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2: PCR primer13 and HXT1B; 1-3, 2-3, 3-3, 4-3, 5-3, 6-3: PCR primerHXT1A and 14; C: PCR identification of clones 1 and 5. M: Marker; 1-1 and 5-1: PCR PrimerHXT1A and B; 1-2 and 5-2: PCR primerHXT1X and Y.

测序, 结果显示 1 号和 5 号菌株扩增出来的序列正是当初构建的片段序列 *HXT1*Up-Kan-Down, 说明在 1 号和 5 号菌株中, *HXT1* 基因的 ORF 确实被 *Kan* 所替换。选用 1 号菌株, 将该菌株命名为 *GS115ΔHXT1*, 作为后续实验的出发菌株。

### 2.3 毕赤酵母 *GS115ΔHXT1* 缺失菌株在葡萄糖培养基中的生长情况

考察 *GS115 HXT1* 缺失株在葡萄糖中的生长情况发现, 缺失株的生长与野生株大致相仿, 仅在初期和对数生长期阶段略滞后于野生株, 到达稳定期后则与野生株大致相仿(图 4)。这与跟它同源关系极为接近的汉逊酵母中的 *HXT1* 基因缺失株的情况是一致的<sup>[7]</sup>。由此推测, *HXT1* 作为毕赤酵母己糖运载体家族成员之一, 其对于葡萄糖的转运并未起到关键作用, 或是其它的一个或几个运载体发挥作用弥补了 *HXT1* 的缺失。

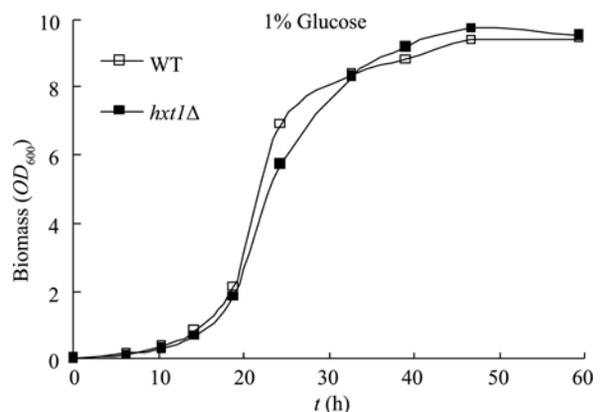


图4 *GS115ΔHXT1* 菌株在葡萄糖中的生长曲线  
Fig. 4 *GS115ΔHXT1* kinetics of growth in glucose

此外, 对缺失株在葡萄糖/甲醇混合培养基中的生长情况以及葡萄糖和甲醇的利用情况进行考察发现, 野生株和 *HXT1* 缺失株都出现了明显的二次生长现象。但是缺失株的葡萄糖摄取速度明显滞后于

野生株。野生株在第 25 小时培养基中的葡萄糖就已经耗尽,同时达到第一个对数期的高峰;而缺失株在第 25 小时才刚刚开始消耗葡萄糖,到第 40 小时耗尽。此外,缺失株开始利用甲醇的时间则较野生株有所提前,野生株是在葡萄糖耗尽后,经过一段适应期开始消耗甲醇(第 35 小时);而缺失株在利用葡萄糖的过程中(25 h~45 h)甲醇就已经有消耗了(图 5)。说明 *HXT1* 基因与葡萄糖阻遏(或分解代谢阻遏)之间可能具有一定的关系。

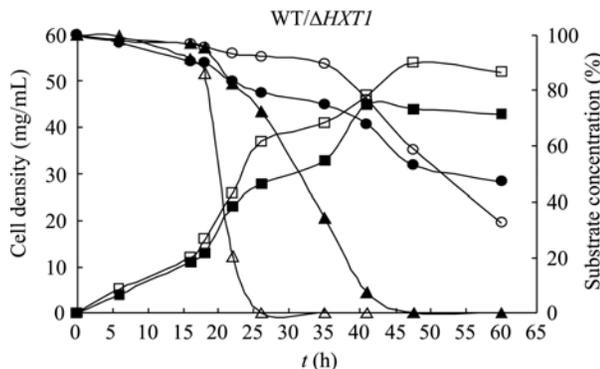


图 5 葡萄糖和甲醇混合培养基中生长和碳源利用情况  
Fig. 5 Growth and carbon substrate consumption in glucose and methanol medium mixture

注: GS115 野生株 WT(空心)和  $\Delta HXT1$  基因缺失株(实心)的生长曲线(方形),葡萄糖(三角形)消耗和甲醇(圆圈)消耗。培养基中起始葡萄糖和甲醇浓度分别为 55 mmol/L 和 1% (V/V)。

Note: Kinetics of growth (squares), glucose (triangles) and methanol (circles) consumption in GS115 wild-type (open symbols) and *HXT1* deletion mutant (solid symbols) strains grown in batch culture. Initial glucose and methanol concentrations were 55 mmol/L and 1% (V/V) respectively.

### 3 讨论

通过双交换基因缺失法我们成功构建了一株己糖运载体 *HXT1* 基因的缺失菌株。在毕赤酵母中, G418 抗性浓度因与 G418 抗性基因的拷贝数存在一定的比例关系,因而一般都作为高拷贝菌株的筛选手段而不用基因缺失菌株的构建筛选<sup>[9]</sup>。本论文尝试通过不同 G418 浓度对应不同涂布细胞数进行抗性平板筛选的方法,最终得到两株 *HXT1* 基因的缺失菌株。通过对 *HXT1* 基因缺失株在葡萄糖中的

生长状况考察发现,与野生株相比差距不是很明显,但对葡萄糖利用速度造成较大影响,这与已经鉴定的酿酒酵母的 *HXT1* 基因<sup>[10]</sup>、汉逊酵母的 *HXT1* 基因的情况都是比较相似的。此外,此基因与葡萄糖阻遏是否存在一定的关系还有待进一步的研究。

### 参考文献

- [1] Reifenger E, Freidel K, Ciriacy M. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol*, 1995, **16**(1): 157-167.
- [2] Wiczorke R, Krampe S, Weierstall K, et al. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1999, **464**: 123-128.
- [3] Kim JH, Johnston M. Two Glucose-sensing pathways converge on *Rgt1* to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2006, **281**(36): 26144-26149.
- [4] Tschopp JF, Emr SD, Field C, et al. *GAL2* codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1986, **166**(1): 313-318.
- [5] Stasyk OG, Maidan MM, Stasyk OV, et al. Identification of hexose transporter-like sensor *HXS1* and functional hexose transporter *HXT1* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryotic Cell*, 2008, **7**(4): 735-746.
- [6] Sambrook J, Fritseh E, Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- [7] Cregg J, Russell K. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 1998, p.103.
- [8] 倪振华, 周祥山, 张元兴. 毕赤酵母重组菌株直接基因缺失方法的研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(6): 1198-1201.
- [9] Scorer C, Clare J, McCombie W, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio/Technology*, 1994, **12**: 181-184.
- [10] Johnston M, Kim JH. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans*, 2005, **33**: 247-252.