

# 解脂耶氏酵母新型表达载体构建及 癌基因 *rho* 在其中的表达

赵鹤云 汪小锋 潘小幸 刘云 徐莉 闫云君\*

(华中科技大学 生命科学与技术学院 分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 为了简化解脂耶氏酵母表达载体构建过程、消除抗生素污染, 将 *mel* 基因(编码酪氨酸酶)作为新型报告基因用于构建新型酵母表达载体, 利用组装 PCR 人工合成基因 *mel*, 并用重叠 PCR 将其与同源组成型强启动子 *pTEF*、分泌性信号肽 *XPR2pre* 及强终止区 *LIP2t* 融合, 构建新型胞外及胞内表达载体, 并利用其在解脂耶氏酵母野生菌株中表达人源癌基因 *rho*。成功获得 *mel* 全基因并将其与启动子、信号肽和终止区融合, 得到融合片段 TXML, 用其替换原有表达载体的筛选标记基因 *ura3d4*, 构建得到新型胞外及胞内表达载体 pINA1297-M 和 pINA1297-a-M, 转化后的酵母阳性转化子性状明显, 随后利用此新型表达系统获得可溶性异源蛋白 Rho。首次实现了将 *mel* 作为一种便捷、价廉、无污染的新型筛选标记基因运用于非常规酵母表达系统中, 更为 *mel* 在其它真核表达系统中的运用奠定了技术基础; 获得的可溶性 Rho 蛋白可为研究其性质、结构、功能及与 Rho 癌基因家族其它成员的相互作用提供条件。

**关键词:** 解脂耶氏酵母, 抗生素污染, 基因 *mel*, 基因 *rho*

## Construction of a new secretion/expression system of *Yarrowia lipolytica* and successfully expressing oncogene *rho* with it

ZHAO He-Yun WANG Xiao-Feng PAN Xiao-Xing LIU Yun XU Li YAN Yun-Jun\*

(Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

**Abstract:** To simplify the construction procedure of *Yarrowia lipolytica* secretion/expression system, eliminate the antibiotic contamination, and use gene *mel* (encoding tyrosinase) as a new type reporter for constructing *Y. lipolytica* secretion/expression vectors. Gene *mel* was synthesized by assembly PCR,

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2009AA03Z232, 2010AA101501); 教育部新世纪优秀人才基金(No. NCET-07-0336); 湖北省自然科学基金项目(No. 2009CDA046)

\* 通讯作者: Tel: 86-27-87792214; Fax: 86-27-87792213; ✉: yanyunjun@tom.com

收稿日期: 2011-06-27; 接受日期: 2011-09-21

and fused with homologous promoter *pTEF*, signal sequence *XPR2pre* and terminator *LIP2t* by overlap PCR. The resulted fragment was used to construct new type of secretion/expression plasmids of *Yarrowia lipolytica* expression system, with which human gene *rho* was expressed. The synthesized *mel* and *pTEF*, *XPR2pre*, *LIP2t* were successfully fused into gene fragment TXML, which was substituted for the reporter gene *ura3d4* of *Y. lipolytica* plasmids pINA1297 and pINA1297-a, resulting in new type plasmids pINA1297-M and pINA1297-a-M. This new system could screen the yeast recombinant transformants by phenotype, with which the soluble protein Rho was successfully expressed. In this research, *mel* gene was used as a new reporter for the first time in non-conventional yeast expression system, and it also lends a basis for applying *mel* in other eukaryotic expression systems. Additionally, the resulted soluble Rho can be used for further study of its character, structure, functions and the correlation between other members of Rho oncogene family.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, Antibiotic contamination, *mel*, *rho*

目前, 微生物表达系统筛选重组转化子常用抗生素和营养缺陷型两种方法。尽管上述筛选方法已被广泛使用, 但均存在一定的缺陷性, 如: 过多使用抗生素会产生“超级细菌”, 最终危害人类健康; 而多数野生菌本身不是营养缺陷型, 故需要对原始菌株进行一系列基因操作, 致使新系统的开发过程变得复杂而费力。近年来, 人们又发展出荧光蛋白筛选标记基因方法<sup>[1]</sup>, 克服了上述缺陷, 但仍需用荧光显微镜筛选重组子, 操作不便。*mel* 编码的酪氨酸酶是参与合成黑色素的关键酶, 它能催化 L-酪氨酸最终形成黑色素<sup>[2]</sup>, 在脊椎动物、植物及微生物中发挥着生物学功能<sup>[3]</sup>, 且其在生物工程、生物技术<sup>[4]</sup>和动物胚胎发育<sup>[5]</sup>等方面亦有广泛应用。因其产生的黑色素无污染, 无需特殊仪器即可通过表型观察实验结果, 且底物价廉(酪氨酸), 因此可作为新型报告基因。

由于解脂耶氏酵母(非常规酵母之一)的独特性, 故被开发为新的酵母表达系统, 但其构建过程相当复杂。因该酵母对除博莱霉素/腐草霉素类和潮霉素 B 以外的其它所有抗生素均具抗性, 故 Gaillardin<sup>[6]</sup>和 Cordero<sup>[7]</sup>分别采用上述抗生素抗性基因作为筛选标记构建表达载体, 但得到的重组子回复突变率较高, 且抗性基因影响 DNA 重组效率。此外, 由于野生型解脂耶氏酵母菌株不能利用蔗糖作为唯一碳源生长, Nicaud<sup>[8]</sup>将编码酿酒酵母蔗糖水解酶的基因 *suc2* 用于构建其营养缺陷性表达载体, 但重组子

的稳定性不高。因此, 虽然研究者最后利用基因工程手段得到尿嘧啶缺陷型酵母菌株, 并构建出表达载体<sup>[9]</sup>, 但此过程复杂、费时费力, 且得到的表达载体不能于野生型酵母菌株中使用; 而利用 *mel* 作为新的报告基因构建解脂耶氏酵母新型表达载体则不存在上述问题。2011 年, Rao 等<sup>[10]</sup>将源于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的 *mel* 在解脂耶氏酵母基因工程菌 Polg 中进行了胞内表达(利用商品化质粒 pYLEX1), 为酪氨酸酶在该酵母中的应用提供了依据。

源于嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*) 的酪氨酸酶编码基因 *mel*<sup>[11]</sup> (510 bp) 是目前已知最小的 *mel* 结构基因(一般 *mel* 大于 1 500 bp), 且王玉洁等<sup>[2]</sup>曾将 *mel* 克隆入酿酒酵母(一种常规酵母)表达载体, 成功进行了功能性表达, 探索了 *mel* 作为酵母新型报告基因的可行性, 但他们尚未完成将 *mel* 作为报告基因构建表达载体工作。组装 PCR 是目前广泛使用的 DNA 序列合成方法, 本实验室已成功利用改进的组装 PCR 自主合成黑曲霉脂肪酶基因 *lipA*, 并将此法进一步用于密码子优化改造<sup>[12]</sup>。因此, 本文选用组装 PCR 自主合成 *mel*。

人源 Rhobtb3 是 Rho 癌基因家族(此家族被证实与多种癌症相关<sup>[13]</sup>)中独特的一员, 因绝大多数 Rho 癌基因家族成员是 GTPase, 而 RhoBTB3 是 ATPase, 且其在高尔基体和内体(Endosome)间的物质转运中也发挥重要作用<sup>[14]</sup>。因此, 研究 RhoBTB3 功能结构

域 Rho 的性质及功能有着重要的理论意义和应用价值, 而得到可溶性 Rho 蛋白是对其结构和功能进行研究的前提和基础。

为此, 本文采用组装 PCR 自主合成 *mel*, 同时利用重叠 PCR 将其置于启动子 *pTEF* (409 bp) 和信号肽 *XPR2pre* (45 bp) 下游, 终止区 *LIP2t* (200 bp) 的上游, 构建得到以 *mel* 作为筛选标记基因的解脂耶氏酵母新型表达载体; 并利用此新型表达系统表达人源基因 *rho* (1 836 bp), 不仅证实此表达系统可用于表达源于高等真核生物蛋白, 且为研究 Rho 的性质、结构、功能及与 Rho 癌基因家族其它成员的相互作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 质粒 pINA1297 和解脂耶氏酵母 W29 菌株分别由法国 Catherine Madzak 和 Jean-Marc Nicaud 教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存; 含编码 Rho 蛋白 cDNA 的质粒由华中科技大学晶体结构实验室张后今教授馈赠。

**1.1.2 培养基和培养条件:** 解脂耶氏酵母生长于 YPD 培养基, 最佳生长及发酵温度为 28  $^{\circ}\text{C}$ 。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  生长于 37  $^{\circ}\text{C}$  LB 培养基中, 在需要时添加终浓度为 50 mg/L 的卡那霉素作为抗性选择。解脂耶氏酵母重组子筛选固体培养基为: YPD+酪氨酸(1 g/L)+2% 琼脂<sup>[11]</sup>。

**1.1.3 主要试剂:** 引物由上海生物工程技术有限公司合成; dNTP、*Pfu* 高保真酶购自 Fermentas 公司; 质粒抽提及琼脂糖胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司; 酵母基础氮源(含硫酸铵且无氨基酸)购自 BD 公司; D-生物素、鲑鱼精 DNA、PEG4000 购自 Sigma 公司; 其他化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司; 均为分析纯。质粒序列均由北京天一辉远公司进行测定。

### 1.2 全基因合成 *mel*

利用在线软件 Gene2Oligo 设计合成 *mel* 所需的寡核苷酸引物<sup>[15]</sup>。50  $\mu\text{L}$  组装 PCR 反应体系<sup>[16]</sup>: 4  $\mu\text{L}$  2.5 mmol/L dNTPs, 1 U *Pfu*, 0.3  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{mol/L}$  外引物

I (R0), 0.3  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{mol/L}$  外引物 II (F515), 0.5  $\mu\text{L}$  3  $\mu\text{mol/L}$  内引物混合物(其余引物)。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 25 个循环。胶纯化得到目的基因 *mel* PCR 产物。

### 1.3 新型表达载体的构建

**1.3.1 *pTEF*、*XPR2pre* 及 *LIP2t* 的克隆:** 根据 AF054508<sup>[17]</sup>、AJ012632<sup>[18]</sup> (GenBank accession No.) 和质粒 pINA1297 序列分别设计引物 pTEF-5'/pTEF-3', LIP2-5'/LIP2-3', XPR2-5'-1/XPR2-5'-2/XPR2-3' (表 1)。解脂耶氏酵母基因组 DNA 的抽提参照文献[19]进行; 以解脂耶氏酵母基因组 DNA 为模板并分别以 pTEF-5'/pTEF-3' 及 LIP2-5'/LIP2-3' 为引物克隆到启动子基因 *pTEF* (3' 端含部分信号肽 *XPR2pre* 序列) 及终止区 *LIP2t*; 以 *mel* 为模板, XPR2-5'-1/XPR2-3' 为引物克隆到含 *XPR2pre* 部分序列的 *mel*'-1; 以此作为底物, 再以 XPR2-5'-2/XPR2-3' 为引物 PCR 得到 5' 端含全部 *XPR2pre* 序列的 *mel*', 用胶纯化后的 *pTEF*、*mel*'、*LIP2t* 为混合底物, pTEF-5'/LIP2-3' 为引物, 经重叠 PCR 得到基因融合片段 TXML。

**1.3.2 胞内表达载体 pINA1297-a 的构建:** 根据 pINA1297 多克隆位点上游序列设计引物 pINA1297-a-5'/pINA1297-a-3'-1 或 pINA1297-a-3'-2 (表 1), 以 pINA1297 质粒为模板, 以 pINA1297-a-5'/pINA1297-a-3'-1 为引物进行 PCR, 以得到的目的片段为模板, 用引物 pINA1297-a-5'/pINA1297-a-3'-2 再次进行 PCR, 得到去除信号肽 *XPR2pre* 的 pINA1297 多克隆位点上游的片段 hp4d'。以 *Cal I* 和 *Sfi I* 分别双酶切 hp4d' 和质粒 pINA1297, 纯化后进行酶连, 得到不含信号肽 *XPR2pre* 的胞内表达载体 pINA1297-a。

**1.3.3 解脂耶氏酵母胞外及胞内新型表达载体的构建:** 将基因片段 TXML 用 *Sal I* 和 *Sac I* 双酶切, 分别与经过同样双酶切的质粒 pINA1297 和 pINA1297-a 进行连接, 得到中间质粒 pINA1297-TXML 和 pINA1297-a-TXML。因上述质粒改造使得原有多克隆位点已不可用, 故设计引物 MCS-5'/MCS-3' (表 1) 将多克隆位点依次改为: *Avr II*、*Sac II*、*Aat II*、*Afl II*、*Nde I*。具体步骤为: 以

表 1 PCR 引物序列表  
Table 1 Primer sequences of PCR

引物 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
pTEF-5'	ATAGAGCTCAGAGACCGGGTTGGCGGC
pTEF-3'	GTAAAGGCGGTAGCGAGCTTCATCATTTTGAATGATTCTTATACTCAG
XPR2pre-5'-1	CTCACGGCCGTTCTGGCCATGGATCGTGGCGTCAACG
XPR2pre-5'-2	ATGAAGCTCGCTACCGCCTTACTATTCTCACGGCCGTTCTGGCCATGGATC
XPR2pre-3'	GGTGGTCTGCATCCCGGCCTGAGCTATTTATCACTCTTTACAACCTTC
LIP2t-5'	GGTGGTCTGCATCCCGGCCTGAGCTATTTATCACTCTTTACAACCTTC
LIP2t-3'	GCTCGTCGACTCCACCTGTGTCAATCTTC
pINA1297-a-5'	ATTATCGATACGCGTGCATGCTG
pINA1297-a-3'-1	GCTGTGGATGTGTGTGGTTGTATG
pINA1297-a-3'-2	ATGGCCAGAACGGCCTGTGGATGTGTGTGGTTGTATG
MCS-5'	AAACCTAGGCCGCGGGACGTCCTAAGCATATGTCCATGGCCTGTCCCCACGTTGCCGG
MCS-3'	ATGGAATTCGGACACGGGCATCTCAC
YL-rho-5'	ATACCTAGGATGTCCATCCACATCGTGGCGC
YL-rho-3'	AAACATATGTTAGTGGTGATGATGGTGGTGCATTACTAAGCAACGACATTTCC

pINA1297 质粒为模板, 用 MCS-5'/MCS-3' PCR 得到目的片段 MCS, 并经过 *Avr* II 和 *Eco* R I 双酶切后分别与经同样双酶切的 pINA1297-TXML 和 pINA1297-a-TXML 酶连, 得到新型胞外及胞内表达载体 pINA1297-M 和 pINA1297-a-M, 经双酶切和测序验证。

#### 1.4 解脂耶氏酵母的转化及新型表达质粒稳定性检测

用醋酸锂法将经 *Not* I 线性化后的胞外和胞内表达载体 pINA1297-M 和 pINA1297-a-M 转化入解脂耶氏酵母<sup>[20]</sup>。将转化后菌体稀释不同梯度后涂布于筛选平板。2-3 d 后挑选周围有黑色变色圈的转化子并抽取其基因组 DNA, 用 PCR 再次验证, 引物为 pTEF-5'/LIP2-3'。得到胞外及胞内表达重组子 YL-M 和 YL-a-M。随机挑选 3 个阳性重组子, 接种于 5 mL 的 YPD 液中, 培养约 60 代后, 取出适量培养液进行梯度稀释, 涂布于筛选平板, 计算有变色圈的重组子比率。

#### 1.5 rho 在解脂耶氏酵母新型表达系统中的表达

**1.5.1 重组表达载体构建及解脂耶氏酵母的转化:** 根据 BC041337 (GenBank accession No.) 设计引物 YL-rho-5'/YL-rho-3', 经 PCR 得到的基因 rho 经

*Avr* II 和 *Nde* I 双酶切后分别与经同样双酶切的质粒 pINA1297-M 和 pINA1297-a-M 酶连, 得到胞外及胞内表达载体 pINA1297-M-rho 和 pINA1297-a-M-rho, 经双酶切和测序验证。

参照 1.4.1 节将表达质粒 pINA1297-M-rho 和 pINA1297-a-M-rho 转化入解脂耶氏酵母中, 阳性转化子进行基因组 PCR 验证, 引物为 YL-rho-5'/YL-rho-3'。分别得到胞外及胞内表达重组子 YL-M-rho 和 YL-a-M-rho。

**1.5.2 目的蛋白质的分离纯化及检测:** 对解脂耶氏酵母重组转化子发酵 3 d 后, 将 YL-a-M-rho 的发酵液离心, 得到的酵母细胞经高压细胞破碎仪破碎(20 kPi)后, 13 000 r/min 离心 10 min, 得上清液; 将 YL-M-rho 发酵液离心, 收集发酵上清液。分别将两种上清液流经 Ni-NTA 层析柱, 纯化参照 QIAexpression<sup>TM</sup> 操作手册。将洗脱液透析后超滤浓缩至 0.5 mL。纯化后的目的蛋白经 SDS-PAGE 检测, 蛋白质浓度测定见文献[21], 以牛血清蛋白为标准蛋白。根据所用载体和所表达基因, 将所表达的蛋白分别命名 pINA-Rho (胞外表达) 和 pINA-a-Rho (胞内表达)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 全基因合成 *mel*

Gene2Oligo<sup>[15]</sup>软件可用于设计全基因合成时所需寡核苷酸片段,它使得各寡核苷酸片段之间的特异性最佳,并达到相对统一的退火温度,避免在随后组装 PCR 时寡核苷酸片段错配,从而得到更具特异性的条带。利用 Gene2Oligo 设计的引物见表 2。经组装 PCR 得到目的基因片段 *mel* (图 1)。测序结

果表明,获得的 *mel* 全长基因序列与 NCBI 上的完全相同。

### 2.2 解脂耶氏酵母新型表达载体的构建

**2.2.1 TXML 的重叠 PCR:** 解脂耶氏酵母研究最早、应用最久的启动子为 XPR2 (胞外碱性蛋白酶)的诱导型启动子 *pXPR2*,但其复杂的调控条件限制其在工业上的应用<sup>[22]</sup>,而 TEF (转录延伸因子)的启动子 *pTEF* 为强组成型,能稳定启动外源基因的表达<sup>[17]</sup>。*XPR2pre* (胞外碱性蛋白

表 2 *mel* 的各寡核苷酸片段  
Table 2 Oligonucleotides for the synthesis of *mel*

引物 Primer	序列 Primer sequences (5'→3')
R0	ACGTTGACGCCACGATCCAT
F0	ATGGATCGTGCGTCAACGTGGCCAAGCAGATGAAGTTCAC
R20	CGAGAAGTCCGGTGC GTTGGTGA ACTTCATCTGCTTGGCC
F41	CAACGCACCGGACTTCTCGGGCGCGCTGAACGTTG
R60	CCAGCTCGGTGCGGTATTAACGTT CAGCGCGCC
F76	AATACCGCACCGAGCTGGCCAGTGC GGGCAACCT
R94	GCTCACCCGCGCGGACAGGTTGCCCGCACTGG
F110	GTCCGCGCGGTTGAGCTACAGCTATCAGAGCGAGGTGT
R126	TCAGATCGGTGGTTGGCCACACCTCGCTCTGATAGCTGTA
F148	GGCCAACCACCGATCTGAGCCCGGTGATCCGCCA
R166	CCAGTCCGTAGCCGTCCTGGCGGATCACCGGGC
F182	GGACGGCTACGGACTGGTCAACGCCGGCGTGAT
R199	GCGTCGTCGAGCTTCCAGATCACGCCGGCGTTGA
F215	CTGGAAGCTCGACGACGCTGGACCTTCTCGCTGCA
R233	GGCCAGGTTGGTGCCTGCAGCGAGAAGGTCCAG
F251	GGGCACCAACCTGGCCGACAAGGAATACCGCACCACC
R267	CCGCCGGAATGTTGTAACCGTGGTGC GGTATTCCTTGTG
F288	GGTTACAACATTCCGGCGGTCCGGCACGCTGATTGGC
R307	GCGGCGGCCATAGAAGCCAATCAGCGTGCCGA
F324	TTCTATGGGCGCCGCGCCAATATACCTCAGCGTCCG
R340	GCAGACGGTTCTTAGAAATCGTAACGGACGCTGAGGTATATTGGC
F361	TTACGATTTCTAGGAACCGTCTGCATGACACCGTCTTACGATTGATCT
R385	AGACCATCGTCACTTTTCCAGTACAGATCAATCGTAAGACGGTGTGAT
F409	GTACTGGAAAAGTGACGATGGTCTGCGCCTGCATGCGCGC
R433	GCGCCTGGGGCATGATCGCGCGCATGCAGGGCGC
F449	GATCATGCCCCAGGCGCGGGACAGCCACCCCGT
R466	TGCAGACCACCGTGCCACGGGGTGGCTGTCCC
F482	GGCACGGTGGTCTGCATCCCGGGCCTGAATCAG
F498	CGTATGGGATGCCGCCCTGATTCAGGCCCGGGA
F515	GCGATAAGGCCTGTCCA

酶的分泌性信号肽)是研究最早最常用的信号肽,已成功用于多种异源蛋白的分泌表达<sup>[23]</sup>。终止区 *LIP2t* 是解脂耶氏酵母主要的胞外分泌性脂肪酶 LIP2 的终止区,能有效终止基因表达<sup>[18]</sup>。图 2A 显示得到的基因 *pTEF*、*mel'*、*LIP2t* 片段与目的基因大小相同,将三者作为混合底物进行重叠 PCR,得到融合片段 TXML,图 2B 显示,得到的特异性片段与目的片段大小相符,测序结果表明,获得的 TXML 中的 *pTEF*、*mel'*、*LIP2t* 碱基序列与 NCBI 上的一致,并正确排列。

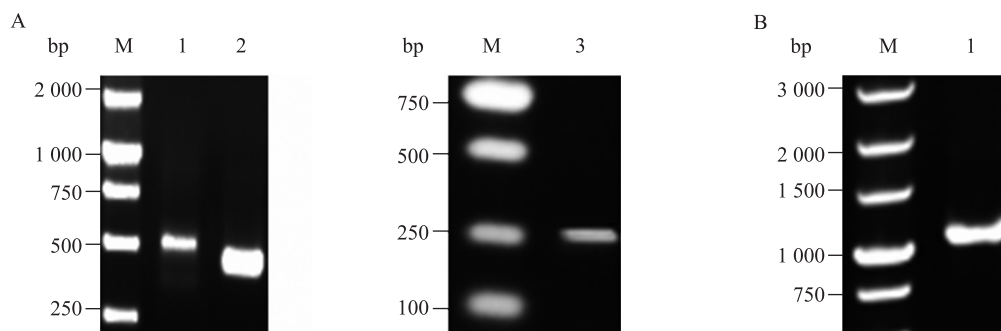


图 2 基因片段 *mel'*、*pTEF* 和 *LIP2t* 的克隆及片段 TXML 的重叠 PCR

Fig. 2 Cloning of *mel'*, *pTEF*, *LIP2t* and the overlap PCR of TXML

注: M: DNA 标准分子量; A: 基因片段 *mel'*、*pTEF* 和 *LIP2t* 的克隆; 1: *mel'* PCR 产物; 2: *pTEF* PCR 产物; 3: *LIP2t* PCR 产物. B: 1: 组装 PCR 产物 TXML.

Note: M: DNA marker; A: PCR products of fragments of *mel'*, *pTEF* and *LIP2t*; 1: PCR product of *mel'*; 2: PCR product of *pTEF*; 3: PCR product of *LIP2t*. B: 1: Overlap PCR product of TXML.

**2.2.2 胞内表达载体 pINA1297-a 的构建:** 由于有些蛋白质难以进行分泌表达<sup>[24]</sup>,故一般酵母表达系统都会提供胞内及胞外两种表达载体供选择。因此,本研究将原始胞外表达载体改造为胞内表达载体,继而进行后续两种新型载体构建工作。图 3 显示胞内表达载体的构建过程,将 hp4d 替代 pINA1297 质粒的 hp4d 和 *XPR2pre* 后,得到胞内表达载体 pINA1297-a,经双酶切及测序验证正确。

**2.2.3 解脂耶氏酵母胞外及胞内新型表达载体构建:** 用 TXML 片段替代质粒 pINA1297 和 pINA1297-a 中的筛选标记基因 *ur3d4* 后得到中间质粒 pINA1297-TXML 和 pINA1297-a-TXML。双酶切后分别在 1.0–1.5 kb 间和约 5.0 kb 处各有一条清晰条带,证实两者均构建成功。随后用新的 MCS 替换原有 MCS 后得到新型胞外和胞内表达载体

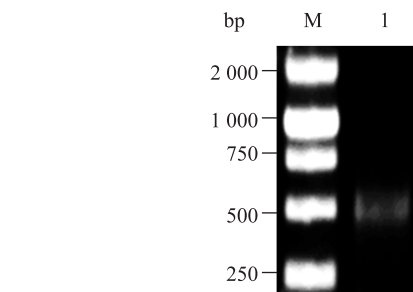


图 1 *mel* 的全基因合成

Fig. 1 Cloning of *mel* by assembly PCR

注: M: DNA 标准分子量; 1: 组装 PCR 产物 *mel*.

Note: M: DNA marker; 1: Assembly PCR product of *mel*.

pINA1297-M 和 pINA1297-a-M (图 3)。测序结果表明质粒构建成功。

### 2.3 解脂耶氏酵母的转化及新型表达质粒稳定性检测

两种新型表达载体转化入解脂耶氏酵母后得到的阳性重组子菌落周围的黑色变色圈清晰可见,与未整合 *mel* 的菌落对比明显,所分泌黑色素的量可能与重组子中质粒的拷贝数呈正相关,故用此表达系统表达异源蛋白时可通过此性状筛选高拷贝重组子。基因组 PCR 结果表明质粒已成功整合入解脂耶氏酵母基因组。阳性酵母重组子约培养 60 代后,在筛选平板上均观察到变色圈,证实新型质粒能稳定存在于酵母基因组中,且重组子无任何突变,能用于原始菌株,不需任何基因操作。以上结果表明解脂耶氏酵母新型表达载体构建成功。

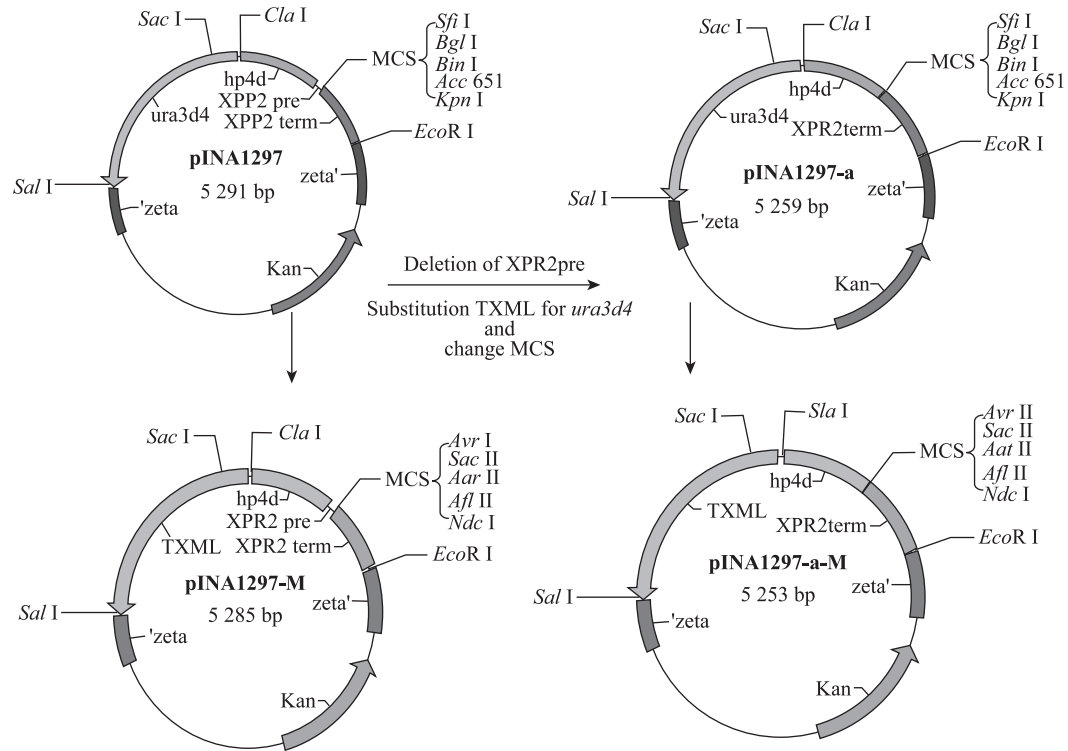


图3 解脂耶氏酵母新型表达质粒构建过程图

Fig. 3 Construction map of new secretion/expression plasmids of *Y. lipolytica*

将已在解脂耶氏酵母中应用的米曲霉酪氨酸酶与其它微生物酪氨酸酶进行比较,发现嗜麦芽假单胞菌酪氨酸酶与其它酪氨酸酶的同源性非常低(低于9%)。其编码基因只有510 bp,故更适用于人工合成及载体构建,而阳性重组子菌落周围的黑色变色圈则进一步证实本文利用此基因构建的表达质粒可应用于解脂耶氏酵母野生菌株。

#### 2.4 *rho* 在解脂耶氏酵母新型表达系统中的表达

将 *rho* 分别克隆至新型载体 pINA1297-M 和 pINA1297-a-M 中,得到重组表达载体 pINA1297-M-*rho* 和 pINA1297-a-M-*rho*, 双酶切后分别在1.5–2.0 kb 间有一条清晰条带与目的基因大小相同,测序证实正确。转化后挑选筛选平板上变色圈较大的重组子进行发酵(1 L/重组子),3 d 后,依照1.5.2 进行纯化、透析、超浓缩,进行 SDS-PAGE 分析,结果见图4。图中显示从胞外重组转化子的发酵上清及胞内重组转化子的细胞破碎液中均纯化出目的蛋白,两种蛋白均在66–116 kD 之间,约为70 kD。癌基因 *rho* 在此表达系统中的成功表达说明解脂耶氏

酵母新型表达系统的蛋白翻译后加工过程可能更接近于高等真核生物。

### 3 结论

解脂耶氏酵母是非常规酵母中独特的一种<sup>[20]</sup>,本身具有较高科学研究价值及工业应用潜力。由于其具有如下表达异源蛋白的优势,如:表达量大、蛋白糖基化程度低、能表达各种来源的蛋白且本身亦为 GRAS (Generally regarded as safe),因此该表达系统在工业、医药、食品上的应用越来越广泛。本文首次成功将源于嗜麦芽假单胞菌的 *mel* 作为酵母新型筛选标记基因,不仅现实了王玉洁等<sup>[2]</sup> 的期望,且成功实现了其在非常规酵母——解脂耶氏酵母野生型菌株中的应用,更为 *mel* 在其它类似微生物(不能用抗生素和天然营养缺陷型进行筛选)表达系统中的应用提供了借鉴。该筛选系统具有以下优点:(1) 筛选方法直观、简便;(2) 重组子性状稳定、无突变;(3) 最为重要的是无需对宿主菌进行任何改造操作,可适用于野生菌株。

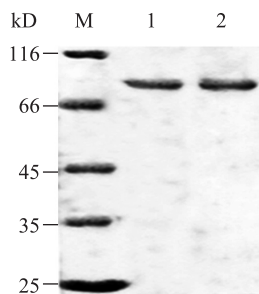


图4 纯化后脂肪酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified Rho protein

注: M: 蛋白质标准分子量; 1: 经 Ni 柱纯化的蛋白质 pINA-Rho;

2: 经 Ni 柱纯化的蛋白质 pINA-a-Rho.

Note: M: Protein marker; 1: Purification of pINA-Rho by His-Bind;

2: Purification of pINA-a-Rho by His-Bind.

## 参 考 文 献

- [1] Kawasaki M, Inagaki F. Random PCR-based screening for soluble domains using green fluorescent protein[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 280(3): 842-844.
- [2] 王玉洁, 黄玉屏, 阮丽芳, 等. *mel* 基因在酿酒酵母菌中的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 43-47.
- [3] van Gelder CWG, Flurkey WH, Wichers HJ. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases[J]. Phytochemistry, 1997, 45(7): 1309-1323.
- [4] Halaoui S, Asther M, Sigoillot JC, et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(2): 219-232.
- [5] Camp E, Lardelli M. Tyrosinase gene expression in zebrafish embryos[J]. Development Genes and Evolution, 2001, 211(3): 150-153.
- [6] Gaillardin C, Ribet AM. LEU2 directed expression of  $\beta$ -galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*[J]. Current Genetics, 1987, 11(5): 369-375.
- [7] Cordero Otero R, Gaillardin C. Efficient selection of hygromycin-B-resistant *Yarrowia lipolytica* transformants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46(2): 143-148.
- [8] Nicaud JM, Fabre E, Gaillardin C. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker[J]. Current Genetics, 1989, 16(4): 253-260.
- [9] Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 109(1/2): 63-81.
- [10] Rao A, Pimprikar P, Bendigiri C, et al. Cloning and expression of a tyrosinase from *Aspergillus oryzae* in *Yarrowia lipolytica*: application in L-DOPA biotransformation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, DOI: 10.1007/s00253-011-3400-6.
- [11] Wang GL, Aazaz A, Peng ZR, et al. Cloning and overexpression of a tyrosinase gene *mel* from *Pseudomonas maltophilia*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 185(1): 23-27.
- [12] 杨江科, 严翔翔, 张正平, 等. 二步法黑曲霉脂肪酶基因 *lipA* 的全基因合成及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 生物工程学报, 2009, 25(3): 381-387.
- [13] Berthold J, Schenková K, Rivero F. Rho GTPases of the RhoBTB subfamily and tumorigenesis[J]. Acta Pharmacologica Scinica, 2008, 29(3): 285-295.
- [14] Espinosa EJ, Calero M, Sridevi K, et al. RhoBTB3: a Rho GTPase-family ATPase required for endosome to Golgi transport[J]. Cell, 2009, 137(5): 938-948.
- [15] Rouillard JM, Lee W, Truan G, et al. Gene2Oligo: oligonucleotide design for *in vitro* gene synthesis[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32: W176-W180.
- [16] Stemmer WPC, Cramer A, Ha KD, et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides[J]. Gene, 1995, 164(1): 49-53.
- [17] Muller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, et al. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*[J]. Yeast, 1998, 14(14): 1267-1283.
- [18] Pignède G, Wang HJ, Fudalej F, et al. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*[J]. The Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2802-2810.
- [19] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 黄培堂, 等译. 分子克隆操作指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 359-361.
- [20] Gerold B, Claude G. Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1996: 313-388.
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [22] Madzak C, Blanchin-Roland S, Cordero Otero RR, et al. Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter[J]. Microbiology, 1999, 145(Pt1): 75-87.
- [23] Nicaud JM, Madzak C, van der Broek P, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. FEMS Yeast Research, 2002, 2(3): 371-379.
- [24] 李明春, 孙颖, 张琦, 等. 高山被孢霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的胞内表达[J]. 生物工程学报, 2004, 20(1): 34-38.