生物工程学报 4 (1): 38—43, 1988
Chinese Journal of Biotechnology

酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GPD）基因及其启动子的分离和鉴定

肖　蕾*　郎文华　何葆光

（卫生部上海生物制品研究所，上海）

以大肠杆菌质粒pBR322为载体进行了野生型酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的基因组克隆。以人工合成的寡聚核苷酸（3′GTGCGTACATAGATAGAGTA5′）为探针进行分子杂交，分离到的阳性克隆经限制性内切酶酶谱、Southern杂交分析证实，插入序列中的 2.1kb HindⅢ片段含有GPD基因。其中 650bp TaqⅠ 片段的部分序列分析结果初步表明，该区域可能包含了高表达GPD基因的启动子。

关键词　基因克隆，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GPD）基因，真核启动子，酵母

甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GPD）是一种在酵母中含量丰富的蛋白质，它的含量占面包酵母干重的 5%[1]。在酵母单倍体基因组中有三种编码 GPD 的结构基因[2]，这三种基因在无性繁殖的酵母细胞中均被转录[3,4]。而且编码 GPD 的 mRNA占总的酵母多聚腺苷酸mRNA的2-5%[5]。在酵母的三种GPD基因中，有一基因编码的酶占细胞中 GPD 含量的绝大部分[3,6]。因此，很可能这种基因是由一个高效率的启动子控制。对这种GPD基因启动子区域的结构、功能分析表明，在此GPD结构基因的5′旁侧序列中有一个限制性内切酶 TaqⅠ的片段(650bp长)，它开始于GPD基因翻译起始密码ATG上游－24bp处。此片段包含了在体内实现调控和启动子功能所必需的全部DNA顺序。应用这个GPD启动子 650bp TaqⅠ片段构建的酵母克隆表达载体能够高水平地表达干扰素（ⅠFN-αCon1）和乙型肝炎表面抗原[7]。

本文从克隆的酵母基因中筛选并分离了GPD基因及其启动子，为今后构建酵母表达载体提供条件。

材料和方法

（一）菌株和质粒

大肠杆菌 DH-1 株（黎志豪教授赠送）；K12 JM103株购自美国PL Pharmacia 公司；酿酒酵母野生型菌株（上海啤酒厂赠送）。

质粒：pBR322，M13mp8RFDNA 购自美国BioLabs公司。

（二）酶和试剂

Zymolyase-100T 为日本 Seikagaku Kogyo 公司产品，限制性内切酶MboⅠ，BamHⅠ、EcoRⅠ，HindⅢ，BglⅡ，SalⅠ，TaqⅠ，AluⅠ，AvaⅡ，HaeⅢ，HhaⅠ，HinfⅠ，XhoⅠ，SmaⅠ，HpaⅠ，XbaⅠ，HpaⅡ，ClaⅠ，T4 多核苷酸激酶，蛋白水解酶均为美国 BRL 公司产品，T4DNA 连接酶为美国New England BioLabs公司产品；碱性磷酸酯酶为美国 Sigma公司产品。

酵母转移核糖核酸（tRNA），核糖

本文于1986年11月24日收到。
* 现地址：中国医学科学院肿瘤研究所

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

核酸酶（RNase）为中国科学院生物化学所东风生化试剂厂产品。

〔γ-^{32}P〕ATP（3000Ci/mmol）为美国New England Nuclear公司产品；〔α-^{35}S〕dATP（660Ci/mmol）为中国科学院原子核所产品。

（三）酵母总DNA的提取

按略加修改的Cryer等的方法进行[8]。每1000ml YEPD培养物可得约10mg酵母DNA。

（四）酵母DNA用内切酶MboⅠ的部分酶解

按文献〔9〕进行。酶切后的DNA，应用电透析法分出6—9kb的组分待用。

（五）载体DNA的制备

载体pBR322用BamHⅠ完全酶解，碱性磷酸酶处理去除5′端磷酸。

（六）连接反应和质粒DNA的转化

0.6μg 6—9kb长度的酵母DNA，2μg处理后的载体DNA（摩尔数之比为Yeast:pBR322＝1:5），在连接反应缓冲液中，用T4DNA连接酶，12℃连接过夜。连接反应产物转化大肠杆菌DH-1感受态细胞（$CaCl_2$沉淀法[10]）。

（七）探针的人工合成、纯化和标记

探针的人工合成应用亚磷酸酰胺法[11]，使用美国Applied Biosystems公司的380A型DNA自动合成仪由王启松、王胜龙同志合成。去载体分子和保护基团的粗产物用20%聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。纯化的探针用γ-^{32}PATP、T4多核苷酸激酶对其5′端进行标记。醋酸胺终止反应，游离的γ-^{32}PATP通过二次酒精沉淀除去[12]。

（八）菌落的原位杂交

按Berent等的方法进行[13]。^{32}P标记的寡核苷酸探针的比活为3×10^8cpm/μg DNA，用量2ng/ml杂交液。

杂交温度：$T_H = T_D - 5℃ = (2\times12 + 4\times8) - 5 = 51℃$，$T_D = 2℃\times$（A-T碱基对数目）$+ 4℃\times$（G－C碱基对数目）

（九）Southern转移分析

按Southern的方法[14]，将DNA转至硝酸纤维素膜上，用标记的合成探针（比活性1.1×10^9cpm/μgDNA，10^5—10^6cpm/ml杂交液）进行杂交[13]。

（十）DNA序列分析

将限制性内切酶HindⅢ酶解产生的2.1Kb DNA片段克隆到M13mp8RFDNA载体上，以人工合成的寡核苷酸作为引物，用α-^{35}SdATP，按照Sanger的双脱氧核苷酸终止法对克隆的DNA片段进行序列分析[15]。

结　果　和　讨　论

（一）酵母基因组DNA的克隆

为了获得最大比例的重组克隆，在保持连接反应中DNA总浓度基本不变的情况，研究了载体DNA和酵母DNA插入片段之间反应摩尔数的改变对重组克隆比例的影响。实验结果表明（表1），当载体

表1　反应摩尔数之比与重组克隆效率的关系

Table 1　Relationship between molar ratio of reactants and transformation efficiency of recombinant clones

反应摩尔数之比 Molar ratio of reactants	重组克隆所占百分比 Percentage of recombinant clones(%)
pBR322(10):Yeast DNA(1)	47.50
pBR322(7):Yeast DNA(1)	58.18
pBR322(5):Yeast DNA(1)	74.70
pBR322(2):Yeast DNA(1)	65.38

DNA浓度：34μg/ml

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

DNA和 DNA 插入片段之间的反应摩尔数之比为5:1时，可以得到最多的重组克隆。

载体DNA 和经部分酶解的酵母 DNA 连接、转化大肠杆菌DH-1感受态细胞后，得到近万个克隆。其中重组克隆在全部转化克隆中所占的比例在75%—98%之间。插入酵母基因片段的重组质粒，具有Ampicillin(Amp) 抗性，但对四环素(T_c) 敏感。随机挑取部分 Amp抗性、T_c 敏感的克隆，用快速细胞破碎法[16]检查所含质粒 DNA 的分子大小。从结果可知，质粒中确实插入了大小不等的酵母基因片段（图版Ⅰ-1）。

（二）菌落的原位杂交

根据 Bitter，Egan 提供[7]的高表达GPD基因5′启动子的 DNA 顺序，选择了一长度为20个核苷酸的 DNA序列3′-GTGCGTACATAGATAGAGTA-5′作为筛选GPD基因及其启动子的探针。对约4000个克隆进行菌落原位杂交，得到二个阳性菌落。将这二个菌落进行单菌落分离，分离出的单菌落再以同样的探针进行复证，所有菌落均为杂交阳性（图版Ⅰ-4）。表明初次杂交所得克隆为纯克隆。

（三）质粒pgap3的物理图谱

二个阳性克隆之一的重组质粒 pgap3 使用 9 种不同的限制性内切酶（EcoRⅠ，HindⅢ，BamHⅠ，BglⅡ，XbaⅠ，XhoⅠ，HpaⅠ，SalⅠ，SmaⅠ）进行单酶解和双酶解（图版Ⅰ-3）。从单酶解产生的 DNA 片段数目可知此酶的酶切位点数；以双酶解产生的 DNA 片段大小与单酶解时的DNA 片段大小的比较，可推出各种酶的酶切位点在DNA片段上的分布（表2）。质粒pgap3 的物理图谱如图1所示。

BamHⅠ，BglⅡ 单酶解时产生大小一样的一条DNA带。由于质粒载体 pBR322 的BamHⅠ位点已被破坏，且pBR322不具

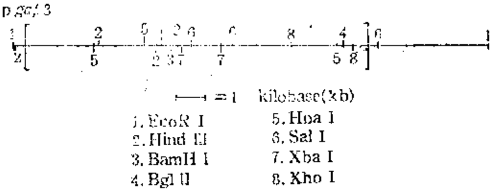

图 1 质粒pgap3的物理图谱*
Fig.1 Physical map of plasmid pgap3

备BglⅡ 位点，由此可知 BamHⅠ、BglⅡ 位点均在克隆的酵母基因片段上。再由 BamHⅠ、BglⅡ联合酶解的结果，可以知道BamHⅠ、BglⅡ的相对位置，但还不能确切地知道这二个酶切位点的具体位置。EcoRⅠ单酶解时产生二条DNA 带。因为载体pBR322上有一个EcoRⅠ 位点，所以在克隆的酵母基因片段上只有一个此酶的酶切位点。EcoRⅠ 位点在载体上的位置

表 2 pgap3限制性内切酶酶切片段分子量
Table 2 Molecular weight of restriction endonuclease cleavage fragmaents of pgap3

限制性内切酶 Endonuclease	片段分子量 (kb)				
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
BamHⅠ	15.49				
BglⅡ	15.49				
BglⅡ-BamHⅠ	10.00	5.75			
EcoRⅠ	10.72	4.68			
EcoRⅠ-BamHⅠ	10.47	4.68	0.25		
EcoRⅠ-BglⅡ	6.16	4.68	4.60		
HindⅢ	10.23	2.45	2.09	0.71	
HindⅢ-BamHⅠ	10.23	2.45	2.09	0.46	0.25
HpaⅠ	7.24	6.55	1.66		
HpaⅠ-BamHⅠ	7.24	5.48	1.66	1.07	
HpaⅠ-BglⅡ	6.55	4.55	2.69	1.66	
SalⅠ	9.36	4.68	1.41		
SalⅠ-BamHⅠ	8.71	4.68	1.41	0.66	
XbaⅠ	14.13	1.32			
XbaⅠ-BamHⅠ	13.80	1.32	0.33		
XbaⅠ-BglⅡ	10.00	4.17	1.32		
XbaⅠ-EcoRⅠ	9.12	4.68	1.32	0.40	
XhoⅠ	13.22	2.04			
XhoⅠ-BamHⅠ	9.59	3.63	2.04		
XhoⅠ-BglⅡ	13.22	1.78	0.26		

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

是确定的，因此，从 EcoR Ⅰ/BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ/Bgl Ⅱ 的各自双酶解产物，就可确定 EcoR Ⅰ、BamH Ⅰ、Bgl Ⅱ 在酵母基因克隆片段上的位置。以此类推，可以知道其他 5 种内切酶（Sal Ⅰ，Xho Ⅰ，Xba Ⅰ，Hpa Ⅰ，Hind Ⅲ）位点在重组质粒上的分布。Sma Ⅰ 的单酶解产物不同于其他酶，类似于完整的环状质粒DNA；Sma Ⅰ 与其他几种酶的双酶解产物又与这几种酶单酶解时的结果一致。说明在质粒 pgap3 上没有Sma Ⅰ 位点。

（四）GPD基因的分离和鉴定

对二个杂交阳性克隆的质粒 pgap3，pgap10用Hind Ⅲ，Xho Ⅰ，Hpa Ⅰ 酶解，然后进行Southern 杂交分析。从电泳图上可以看到，这二个质粒的Hind Ⅲ 酶切，均产生大小各为2.1kb 2.45kb的两条DNA带，而且2.1kb条带在 Southern 杂交分析中呈阳性结果（图片Ⅱ-1）。对来自两个不同质粒的2.1kb Hind Ⅲ 片段的进一步分析表明，二者具有完全一致的内切酶谱，且这一内切酶谱与文献〔17〕报道的2.1kb Hind Ⅲ 片段（GPD基因）的内切酶谱一致（图版Ⅱ-3）。

（五）GPD基因启动子（650bp Taq Ⅰ 片段）的分离和次级克隆

上述分离到的2.1kb Hind Ⅲ 片段除含有编码GPD的结构基因外，还包括基因的5′端、3′端的非编码区。在GPD结构基因起始密码ATG上游 −24bp 和 −674bp处各有一Taq Ⅰ 酶切位点，由此产生的 650bp Taq Ⅰ 片段就是 GPD 基因的功能性启动子。我们所使用的寡核苷酸探针恰好位于此启动子的中部（−245bp——−264bp）。

2.1kb Hind Ⅲ 片段的Southern杂交分析结果（图版Ⅱ-4）表明，在内切酶Taq Ⅰ 的酶解产物中，大小为650bp的DNA片段呈杂交阳性。对650bp Taq Ⅰ 片段的DNA序列分析（图版Ⅱ-2和图 2）证明，由上述2.1kb Hind Ⅲ 片段中分离得到的 GPD 基因启动子具有与文献报道的高表达GPD基因启动子完全一致的DNA顺序。

```
         -400
5'  TTTTCTT CACCAACCAT CAGTTCATAG GTCCATTCTC TTAGCGCAAC
    AAAAGAA GTGGTTGGTA GTCAAGTATC CAGGTAAGAG AATCGCGTTG

               -350
    TACACAGAAC AGGGCACAAA CAGGCAAAAA ACGGGCACAA CCTCAATGGA GT  3'
    ATGTGTCTTG TCCCGTGTTT GTCCGTTTTT TGCCCGTGTT GGAGTTACCT CA
```

图 2　650bp Taq Ⅰ 片段的部分核苷酸顺序

Fig.2　Partial nucleotide sequence of 650bp Taq Ⅰ fragment

以pBR322 为载体，对分离到的 GPD 基因启动子进行次级克隆。转化大肠杆菌后得到的转化子进行杂交筛选。阳性克隆的快速质粒分析如图版Ⅰ-2所示，其中插有650bp片段。

通过 DNA分子杂交，酶谱分析，Southern转移分析，以及 DNA 序列测定，已初步确定了一个 GPD 高表达基因的启动子。但由于酵母中沉默基因（Silent gene）的存在，因此，对这一GPD基因启动子的进一步确证有待于其功能的研究。

参 考 文 献

［1］Krebs E.G., *J.Biol.Chem.*, 200:471, 1953.

［2］Holland, J.P.& Holland, M.J., *J. Biol. Chem.*, 254:5466, 1979.

［3］Holland, J.P.et al., *J.Biol. Chem.*, 258:5291, 1983.

［4］Musti, A.M. et al., *Gene*, 25:133, 1983.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

[5] Holland, M.J.& Holland, J.P.: *Biochemistry*, 17:4900, 1978.

[6] Jones, G.M.T.& Harris, J.I.: *FEBS Lett.*, 22:185, 1972.

[7] Bitter, G.A.& Egan, K.M.: *Gene*, 32:263, 1984.

[8] Cryer, D.R. et al.: *Methods Cell Biol.*, 12:39, 1975.

[9] Maniatis, T. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, New York,Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

[10] Bolivar, F. & Backman, K.: Methods Enzymol., Vol.66, p245, Academic Press, New York, 1979.

[11] Matteucci, M.D. & Caruthers, M.H.: *J. Am. Chem.Soc.*, 103:3185, 1981.

[12] Maxam, A.M. & Gilbert, W.: Methods Enzymol.,Vol.65, p499, Academic Press, New York, 1980.

[13] Berent, S.L.et al.: *Biotechniques*, p.208, 1985.

[14] Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, 98:503, 1975.

[15] Biggin, M.D.et al: *Proc.Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, 80:3963, 1983.

[16] Birnobim, H.C. et al.: *Nucl.Acids Res.*, 7:1513, 1979.

[17] Holland, J.P.& Holland, M.J.: *J.Biol. Chem.*, 254:9839, 1979.

THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CLONED GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE(GPD)GENE AND ITS PROMOTER FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Xiao Lei Long Wenhua Ho Baoguang

(*Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Shanghai*)

A wild type genomic DNA from *S. cerevisiae* has been cloned into *E. coli* vector pBR322. Positive clones have been selected by using a synthetic oligodeoxynucleotide probe, 3′-GTGCGTACAT AGATAGAGTA-5′. By means of restriction endonuclease mapping and Southern hybridization, a 2.1kb HindⅢ fragment among them has been identified to contain the GPD gene sequence. The promoter (650bp TaqⅠ fragment)from the 2.1kb HindⅢ fragment showed a complete sequence homology with that of the promoter of the high expression GPD gene.

Key words

Gene cloning; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GPD)gene; eukaryotic promoter; yeast

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

图　版　Ⅰ　说　明

1. 转化子中质粒DNA的大小（HindⅢ酶切）

   The size of plasmid DNA in transformants(HindⅢ digestion) a—o:Tc sensitive transformants; *:λ DNA, p,q:pBR322; 1% agarose gel

2. 快速质粒分析（5%聚丙烯酰胺胶）

   Minilysis of plasmids

   a. pBR322/HpaⅡ; b. pBR322/TaqⅠ; c. Recombinant plasmid/TaqⅠ.

   (5% polyacrylamide gel)

3. 质粒pgap3 的限制内切酶电泳图谱（部分）

   Restriction endonuclease mapping of plasmid pgap3 (partial)a.λ/HindⅢ; b.SalⅠ; c. BamHⅠ; d. HindⅢ; e. HindⅢ-EcoRⅠ; f. HindⅢ-BamHⅠ; g. HindⅢ-BglⅡ; h. HindⅢ-XhoⅠ; i.HpaⅠ; j. HpaⅠ-BglII; k. HpaⅠ-BamHⅠ; l. HpaⅠ-EcoRⅠ; m. HpaⅠ-XhoⅠ; n. XhoⅠ; o.XhoⅠ-BamHI; p.XhoⅠ-EcoRⅠ; q.XhoⅠ-SalⅠI; r. XhoⅠ-BglⅡ.1% agarose gel

4. 克隆杂交的放射自显影（第二次）

   The radioautograph of colony hybridization (second time)

图　版　Ⅱ　说　明

1. 质粒pgap3，pgap10的Southern杂交分析

   Southern hybridization of plasmids pgap3, pgap10 a. λ/HindⅢ; b—d: pgap3; e—g: pgap10; b,e: HindⅢ; c,f: HpaⅠ; d,g: XhoⅠ; 1% agarose gel

2. 650bp TaqⅠ 片段的DNA序列分析——放射自显影（部分）

   DNA sequencing of 650bp TaqⅠ fragment——Radioautograph(partial)(8% polyacrylamide gel)

3. 2.1kb HindⅢ 片段的限制内切酶电泳图谱

   Restriction endonucleotide mapping of 2.1kb-HindⅢ fragment a. HinfⅠ; b. TaqⅠ; c. HpaⅡ; d. AvaⅡ; e. HaeⅢ; f. HpaⅠ; g. pBR322/HpaⅡ; h. AluⅠ; i. HhaⅠ. 5% polyacrylamide gel

4. 2.1kb HindⅢ 片段的Southern杂交分析

   Southern hybridization of 2.1kb HindⅢ fragment

   a. λ/HindⅢ; b. HhaⅠ; c. AluⅠ; d. HpaⅠ; e. HaeⅢ; f.AvaⅡ; g. HpaⅡ; h. TaqⅠ; i. HinfⅠ; j. λ/HindⅢ-EcoRⅠ.

   1.5% agarose gel

journal.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn