

REMI 介导电转化产甘油假丝酵母*

张永光 沈 微 饶志明** 方慧英 诸葛健**

(江南大学生物工程学院工业微生物研究中心 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要 为了分离耐高渗和甘油代谢相关基因,以 Zeocin 为选择标记,利用 REMI 技术电转化产甘油假丝酵母 *Candida glycerinogenes*。考察了 7 种限制性内切酶对转化的影响,选择 *Hind* III 进一步优化了转化的几个条件。结果表明,在 $OD_{600} \approx 1.3$ 时收集细胞,在 1.5 kV 电压下,感受态细胞浓度为 2.0×10^9 个细胞/mL,100U *Hind* III 时,能获得 129 个转化子/ μ g DNA 的较高转化率,58% 的转化子稳定,表明 REMI 技术适合于产甘油假丝酵母的转化。

关键词 产甘油假丝酵母,遗传转化,REMI

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0848-04

Genetic Transformation of *Candida glycerinogenes* by REMI and Electroporation*

ZHANG Yong-Guang SHEN Wei RAO Zhi-Ming** FANG Hui-Ying ZHUGE Jian**

(Research Center of Industrial Microbiology, School of Biotechnology, the Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract In order to isolate genes related with the osmoadaptation and glycerol metabolism of *Candida glycerinogenes*, a transformation system based on the dominant selectable marker Zeocin and restriction enzyme-mediated integration (REMI) was established. Effects of seven restriction enzymes on transformation efficiency of *C. glycerinogenes* were tested. Transformation conditions were optimized in the presence of *Hind* III. Under the optimal conditions of $OD_{600} \approx 1.3$, voltage of 1.5 kV, 2.0×10^9 competent cells/mL, 100 units of *Hind* III added, the transformation efficiency was up to 129 transformants/ μ g DNA. 58% of transformants were stable on nonselective medium. These results suggest that REMI technique would be beneficial to the genetic transformation of *C. glycerinogenes*.

Key words *Candida glycerinogenes*, Genetic transformation, REMI

产甘油假丝酵母 *Candida glycerinogenes* 是目前我国用于发酵甘油生产的优良菌株之一,发酵生产甘油具有高产量、高转化率等优点^[1,2]。先前本研究中心已对 *C. glycerinogenes* 的菌株特性、发酵工艺等进行了广泛研究,对耐高渗及过量合成甘油的机理也做了探讨。在分子水平上,从代谢途径入手对 *C. glycerinogenes* 进行研究,阐明代谢机理和改良菌株的有效途径,但由于此菌株对多种药物具有抗性,缺少可作筛选标记的营养缺陷型和源于菌株自身的表达元件,因而制约了其遗传转化系统的建立,从而致使酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 许多成熟的研究方法及技术无法用于产甘油假丝酵母的研究。

为了分离代谢突变株和克隆相关基因,我们尝试利用限制性内切酶介导的整合(restrictionenzyme-mediated integration, REMI)技术转化 *C. glycerinogenes*。1991 年 REMI 技术首次用于 *S. cerevisiae* 的研究^[3],随后用于 *Candida albican* 的研究^[4]。REMI 是通过限制性内切酶的作用,将 DNA 导入真核细胞产生非同源整合的一种方法。其优点是外源 DNA 随机插入染色体产生突变,转化的外源 DNA 标记了突变的基因,通过质粒挽救可分离与突变相关的基因^[3]。酵母转化常用的方法有原生质体法、LiAc 法和电转化法^[6]。其中,电转化法简单且转化率高。本研究基于 REMI 技术和显性选择标记 Zeocin,建立起 REMI 介导电击转化 *C.*

* 江苏省青年科技创新基金资助项目(No. BK2006504),国家自然科学基金资助项目(No. 30570142)

** 通讯作者 E-mail: raozhm@sytu.edu.cn; Tel: 0510-85886642; Fax: 0510-85886642; E-mail: jianzhuge@hotmail.com

收稿日期:2006-09-19,修回日期:2006-10-27

glycerinogenes 的系统,并以 *Hind*III 为例研究了影响转化的条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *C. glycerinogenes*, 为江南大学生物工程学院工业微生物研究中心保藏。培养基为 YPD。*Escherichia coli* DH5 α 用于质粒的构建与增殖。培养基为含 25mg Zeocin/L 的 LB。

1.1.2 酶: *Bam*HI、*Hind*III、*Kpn*I、*Pst*I、*Sac*I、*Sal*I、*Xho*I 购自 Fermentas 公司, Zeocin 购自 Invitrogen 公司, 其它试剂均为国产分析纯。Pyrobest DNA Polymerase、T4 DNA ligase、分子量标准 DL-2000 购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 质粒: pGAPZ B 购自 Invitrogen 公司, pBlueScript(-) 购自 Promega 公司。

1.1.4 主要仪器: Multiporator[®] Electroporation System (Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建与制备: PCR 法扩增 pGAPZ B 的 Zeocin 抗性基因, 然后插入到 pBlueScript(-) 的 *Eco*R V 位点, 得到本实验所用质粒 pBSZ。质粒的制备、纯化和线性化, 参照文献 [7]。

1.2.2 感受态细胞的制备: 感受态细胞的制备方法参考 Thompson 等的方法 [8]。

1.2.3 转化方法: 100 μ L 转化混合液组成为: 50 μ L 感受态细胞, 1 μ g 质粒, 10 U ~ 200 U 限制性内切酶, 10 μ L 缓冲液, 适量 TE (pH8.0)。轻轻混匀后, 移入预冷的 2 mm 电击杯中, 冰上放置 5 min。在设定电阻 200 Ω 、电容 25 μ F 不变条件下, 用不同电压进行电击。迅速加入 0.9 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔悬浮细胞, 移入一无菌试管中, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 1 h。加入 1 mL 液体 YPD, 于 30 $^{\circ}$ C、100 r/min 下培养 1 h。浓缩电击培养液, 将其均匀涂布在含有 150 mg Zeocin/L 和 1 mol/L 山梨醇 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 避光培养。2d ~ 3d 开始统计和挑取转化子。实验重复 2 ~ 3 次, 所得到的数据用 SPSS 10.0 进行分析。

1.2.4 转化子稳定性检测及验证: 转化子接种于不含 Zeocin YPD 固体平板上培养, 连续转接 5 代, 最后转接于含有 150 mg Zeocin /L YPD 固体平板上, 仍能良好生长的转化子确定为稳定转化子。基因组 DNA 的提取参照文献 [9]。根据 Zeocin 抗性基因序

列设计引物, ble-5 (5'-ATGCCCAAGTTGCCACTC-CGTTC-3') 和 ble-3 (5'-GTCAGTCCTGCTCCTCGGCC-ACGAAG-3')。分别以转化子和野生型菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 51 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 6min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 转化质粒的构建

与宿主基因组无同源序列的质粒是 REMI 转化的理想载体。为了考察不同限制性内切酶对转化 *C. glycerinogenes* 的影响, 以 pBlueScript(-) 为基本质粒, 在 *Eco*R V 位点插入了 Zeocin 抗性表达基因, 得到转化质粒 pBSZ, 结构见图 1。

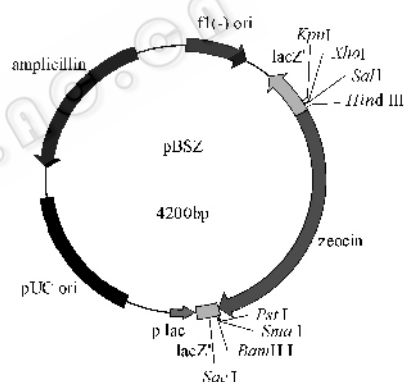


图 1 pBSZ 图谱

2.2 不同限制性内切酶对转化率的影响

不同限制性内切酶介导外源 DNA 整合到核染色体的效率不同, 因而选择合适的限制性内切酶是 REMI 转化的首要因素。为此考察了与 Zeocin 抗性基因相邻的 7 种限制性内切酶 (100 U) 对转化的影响, 其结果见表 1 和表 2 (平均值 \pm 标准偏差, * 为在 5% 水平上显著性差异)。在 REMI 转化中, 质粒的类型、限制性酶的种类对转化都有一定的影响。对于环状质粒, 对照没有获得转化子, 限制性内切酶的加入, 使转化率发生了显著性变化。对于线性化质粒, 对照组所得到的转化率为 9 ± 4 个转化子/ μ g DNA。而在 100U 限制内切酶存在条件下, *C. glycerinogenes* 转化率得到了提高。其中 *Bam*HI、*Hind*III、*Pst*I、*Sac*I 促进作用显著。*Hind*III 效果最为明显, 使线状 pBSZ 转化率提高了约 13 倍。因此, 选择 *Hind*III 来进一步优化转化的条件。

表 1 限制性内切酶对线状质粒转化率的影响

质粒线性化酶	限制酶 (100 U)	转化率 (个/ μg DNA)
	—	9 ± 4
<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I	$57 \pm 9^*$
<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	$114 \pm 10^*$
<i>Sal</i> I	<i>Sal</i> I	20 ± 7
<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	23 ± 6
<i>Kpn</i> I	<i>Kpn</i> I	16 ± 7
<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	$49 \pm 10^*$
<i>Sac</i> I	<i>Sac</i> I	$31 \pm 7^*$

表 2 限制性内切酶对环状质粒转化率的影响

限制酶(100 U)	转化率(个/ μg DNA)
—	0 ± 0
<i>Bam</i> H I	$44 \pm 8^*$
<i>Hind</i> III	$43 \pm 7^*$
<i>Sal</i> I	$21 \pm 4^*$
<i>Xho</i> I	12 ± 4
<i>Kpn</i> I	12 ± 4
<i>Pst</i> I	$22 \pm 7^*$
<i>Sac</i> I	$15 \pm 3^*$

2.3 转化条件的影响

2.3.1 细胞生长时期 :处于指数生长期的酵母细胞同稳定期的相比易于转化。而一般酵母指数生长期较长 ,确定制备感受态细胞的时机是转化的必要条件之一。收集了 7 个处于不同 OD_{600} 的菌体制备感受态细胞 ,调整 1 mol/L 山梨醇的体积悬浮细胞 ,使之具有相同的 OD_{600} ,在 1.5 kV 下进行电击。不同指数生长期细胞对转化率的影响很大 ,结果见图 2。在指数生长前期及中期 ,其转化率呈线性增加 ,在 OD_{600} 为 1.32 时达到最高 ;在指数生长末期 ,即 OD_{600} 大于 1.5 时 ,转化率急剧下降。结果表明在指数生长中后期 ,即 OD_{600} 约为 1.3 时制备感受态细胞可获得最佳转化效果。

2.3.2 电压 选择合适电压是电转化的关键因素。收集 OD_{600} 约为 1.3 的菌体 ,制备感受态细胞。设定电阻 200 Ω 、电容 25 μF 不变 ,用不同电压进行电击 ,结果见图 3 ,在电压为 1.5 kV(电场强度为 7.5 kV/cm)时 ,转化率最高 ,继续加大电压导致转化率的下降 ,在电压为 2.5 kV 时 ,转化率为 0。

2.3.3 感受态细胞浓度 :用不同体积的 1 mol/L 山

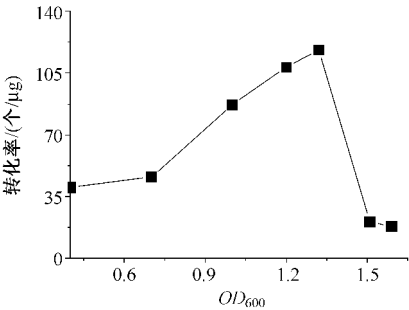


图 2 生长时期对转化率的影响

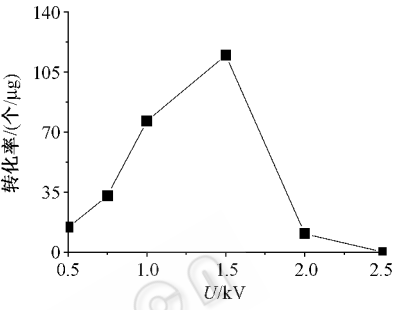


图 3 电压对转化率的影响

梨醇悬浮同一批制备的感受态细胞 ,通过活细胞计数 ,确定细胞浓度。加入 1 μg 线性化 pBSZ 和 100 U *Hind* III ,在 1.5 kV 下进行电击。结果表明 ,感受态细胞浓度在约为 2.0×10^9 个/mL 时 ,转化率最高 ,过高过低都降低转化率。

2.3.4 限制性酶的用量 :在 REMI 转化中 ,获得最高转化率时限制性内切酶的浓度因酶而异。为此 ,在以上最佳条件下 ,考察 *Hind* III 的量对转化的影响 ,结果在 100 U *Hind* III 时获得了较高转化率 ,为 129 个转化子/ μg DNA。继续增加酶量 ,反而降低了转化率。可能高浓度的限制酶增加了整合的几率 ,同时也加大了对核染色体造成了损伤。

2.4 转化子的鉴定

考察了随机挑取的 53 个转化子的稳定性情况。在经过 5 代非选择培养后 ,转接于含 Zeocin 选择性平板上培养 1 代 ,结果 7 个转化子不能生长 ,14 个呈微弱生长 ,其余生长良好。转化子的稳定性为 58.8%。从 32 个转化子中随机选择 5 个转化子 ,提取其基因组 DNA 用于 PCR 反应。电泳结果见图 4 ,阳性转化子基因组的 PCR 产物中有长为 375 bp 的 *Sh ble* 特异条带 ,对照野生型菌株的无此带。

3 讨论

多数不清楚,一般没有营养缺陷型,多为原养型,故此其遗传研究进展较慢。*C. glycerinogenes* 是好氧发酵生产甘油的菌株,具有优良的性状^[1,2]。在缺少营养缺陷型筛选标记和表达元件的条件下,本研究利用 REMI 技术和显性选择标记 Zeocin,成功地将 Zeocin 抗性基因整合到 *C. glycerinogenes* 核染色体上,并优化了 *Hind* III 介导的电转化条件。实验证实约 58% 的转化子稳定,表明 REMI 技术适合于转化 *C. glycerinogenes*。



图 4 转化子的 PCR 鉴定

M 分子量标准 DL-2000, 1 模板来自于未转化的 *C. glycerinogenes*, 2~6 模板来自于转化子

已有的研究表明,当外源 DNA 导入酵母细胞后引发的非同源整合频率,远低于同源整合频率,而丝状真菌正好相反。REMI 介导转化酵母先前已报道过^[3,4],但所得到的转化率较低。本研究获得的

最高转化率为 129 个转化子/ μg DNA, 转化率较高可能与菌株遗传差异有关。REMI 技术除用于构建突变库和克隆致病基因外,还用于启动子捕获、遗传互补分析等。借助于 REMI 技术转化 *C. glycerinogenes* 可获得大量的插入突变株,为研究其代谢机理和克隆相关基因以及菌株改良打下了一定的基础。

参考文献

- [1] ZHUGE J, FANG H Y, WANG Z X, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **55**: 686 ~ 692.
- [2] WANG Z X, ZHUGE J, Prior B A. Biotechnology Advances, 2001, **19**: 201 ~ 223.
- [3] Schiestl R H, Petes T D. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, **88**(17): 7585 ~ 7589.
- [4] Brown D H, Slobodkin I V, Kumamoto C A. Mol Gen Genet, 1996, **251**: 75 ~ 80.
- [5] Guerin N, Laroche D A. Journal of Muscle Research and Cell Motility, 2002, **23**: 597 ~ 604.
- [6] Becker D M, Guarente L. Methods Enzymol, 1991, **194**: 182 ~ 186.
- [7] Sambrook J, Russell D V. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Thompson JR, Register E, Kelley R. Yeast, 1998, **14**: 565 ~ 571.
- [9] Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.