

酿酒酵母 *TRK1* 和 *TRK2* 钾吸收缺陷型菌株的构建

郭兆奎^{1*} 杨 谦¹ 颜培强² 万秀清² 姚泉洪³

(1. 哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

(2. 黑龙江省烟草科学研究所 牡丹江 157011)

(3. 上海市农业科学院生物技术中心 上海 201106)

摘 要: 为更好的进行钾素营养有关基因表达调控和功能性研究, 我们采用同源重组法通过重叠引物扩增分别将 *URA3* 和 *HIS3* 基因替代酿酒酵母的 *TRK1* 和 *TRK2* 基因, 并以酿酒酵母的尿嘧啶合成酶 *URA3* 基因和组氨酸合成酶 *HIS3* 为标记基因, 在不含尿嘧啶和组氨酸的基本培养基筛选转化子获得了钾离子转运蛋白 *TRK1* 和 *TRK2* 基因缺失的酿酒酵母钾素营养缺陷型菌株, 该菌株在低 K^+ 培养基中导入拟南芥 K^+ 转运体基因 *AtKuP1* 可恢复正常生长。

关键词: 酵母, *TRK1*, *TRK2* 吸钾基因缺陷型, 同源重组

The Defective Potassium Uptake by *TRK1* and *TRK2* Mutant of *Saccharomyces cerevisiae* Using Homologous Recombination

GUO Zhao-Kui^{1*} YANG Qian¹ YAN Pei-Qiang² WAN Xiu-Qing² YAO Quan-Hong³

(1. Department of Life Sciences & Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

(2. Heilongjiang Tobacco Research Institute, Mudanjiang 157011)

(3. Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106)

Abstract: In order to perform the regulation and functional study and the screening of potassium uptake genes, the high affinity K^+ uptake genes *TRK1* and *TRK2* in *Saccharomyces cerevisiae* were replaced with *URA3* and *HIS3* alternately using the methods of homologous recombination. *URA3* and *HIS3* of *S. Cerevisiae* were used as marker gene, the defective K^+ uptake *TRK1* and *TRK2* mutant of *S. Cerevisiae* were selected in the basic medium without Histidine and Uracil.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *TRK1* mutant, *TRK2* mutant, Homologous recombination

钾是生物细胞中含量最多的元素, 对于维持细 胞内电化学渗透势平衡和酶活性具有重要作用, 近

基金项目: 国家烟草专卖局科技攻关项目(No. 110200101008)

* 通讯作者: Tel: 0453-6580205; ✉: guozhaokui@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-06-01; 接受日期: 2007-07-20

年来,通过 K^+ 吸收缺陷型酵母突变株系的功能互补、膜片钳技术和基因数据库分析相继分离鉴定了 K^+ 通道蛋白基因^[9]、*TRK/HKT* 基因^[10]、*KUP/HAK/KT*^[11,12]、 $Na^+(K^+)/H^+$ -反向转运体基因^[13]等基因家族,研究发现多数 K^+ 通道蛋白参与低亲和 K^+ 吸收,而 *TRK/HKT* 和 *KUP/HAK/KT* 家族主要参与高亲和 K^+ 吸收。

作为一种单细胞模式生物,酵母具有繁殖速度快、能在基本培养基上生长,易测定细胞生长数量等特点,是分子生物学中进行营养学研究,特别是与细胞营养相关的基因表达极为方便的试验材料。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有很强的吸钾能力,酵母细胞内 K^+ 浓度一般在 100 mmol/L~500 mmol/L, K^+ 饥饿的酵母细胞中 K^+ 浓度可以达到外部环境的 10^5 倍^[1]。酵母中钾的吸收包括多种机制^[2],现已发现 *TRK1*^[3]、*TRK2*^[4]和 *TOK1*^[5] 参与 K^+ 运输, *TRK1*、*TRK2* 编码两种具有同源性的酵母 K^+ 转运蛋白,存在于细胞质膜上,利用跨膜质子电化学势为驱动运输 K^+ 进入细胞^[4], *TRK1* 编码高亲和 K^+ 载体蛋白,使酵母细胞在很低的 K^+ 浓度下(20 μ mol/L ~30 μ mol/L)生长, *TRK2* 虽在结构上与 *TRK1* 相近,但 *TRK2* 的表达量很低^[6]。缺失 *TRK1* 和 *TRK2* 基因的酵母将丧失在 K^+ 浓度为微摩尔环境下的生长能力,在大于 50 mmol/L 的培养液中可以正常生长,在相对较高 K^+ 培养液中 K^+ 的吸收依赖于非特异性吸钾机制^[7]。研究发现 *TOK1* 吸钾能力受外界 K^+ 浓度所调节^[8]。为了更好的进行烟草与钾素营养有关基因表达调控和功能性研究,并进行强吸钾突变基因的筛选,我们应用同源重组法进行了酿酒酵母 *TRK1* 和 *TRK2* 钾吸收缺陷型菌株制备。

1 实验材料

拟南芥哥伦比亚种(*Arabidopsis thaliana* v. *Columbia*)由上海市农科院生物技术研究所惠赠;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 EGY48(MAT α , his3 trp1 ura3-52 leu::pLeu2-LexAop6 由上海市农科院生物技术中心惠赠,酿酒酵母穿梭酵母表达载体 pPC87 由上海市农科院生物技术中心构建(图 1),带有酿酒酵母的 *ADC1* 基因启动子及其控制的 *Gal4* 激活域 *Gal4(TA)*, *Gal4(TA)* 的下游带有多克隆位点及 *ADC1* 基因终止子)。

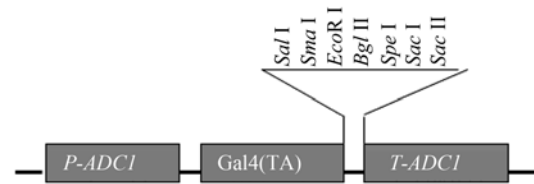


图 1 pPC86 质粒的模式图

Fig. 1 Diagrammatic representation of the pPC86 plasmid.

2 实验方法

2.1 拟南芥 *AtKup1* 基因的克隆

利用 RNAagents total RNA isolation system (Promega)抽提拟南芥幼根总 RNA。以其为模板, Reverse Transcription System (Promega)反转录合成 cDNA 第一链。以反转录产物为模板,拟南芥 K^+ 转运蛋白基因(AF029876)阅读框引物 *AtKup-Z*: 5'-AAAGTCGACAACAATGAACCAATCACCATCTCTTATC-3'(具 *SalI* 酶切位点)和 *AtKup-F*: 5'-AAA-GAGCTCTTAGACGTAATAAACCATTTCCAAC-3'(具 *SacI* 的酶切位点), Ex-taq 耐高温 DNA 聚合酶(TaKaRa)进行 PCR 扩增,将切胶纯化后的 PCR 扩增产物和酿酒酵母穿梭酵母表达载体 pPC87 分别 *SalI* 和 *SacI* 双酶切后, T4 连接酶连接。

2.2 酵母操作技术及转化

酿酒酵母转化采用醋酸锂法^[14], YPD 培养液 5 mL 接菌后 30 下培养至 OD_{600} 0.5, 扩大培养至 50 mL, 同温生长 4 h 后, 5000 r/min 离心 8 min 收集细胞。加 20 ml 无菌水, 离心收集酵母, 以 10 mL 现配的 TE/LiAc(100 mmol/L LiAc in TE)洗 1 次。7000 r/min 离心 8 min, 将酵母悬于 0.5 mL 的 TE/LiAc 中。50 μ L 的酵母悬液中加入质粒 DNA 1 μ g、鲑鱼精 DNA 50 μ g 及含 40%PEG3350 的 TE/LiAc 溶液 300 μ L, 充分混匀后 30 保温 30 min, 42 热激 15 min。离心收集酵母重悬于 TE 溶液中, 并涂于酵母选择培养基(基本培养基 SD)^[15]。酵母 DNA 的快速抽提参照 Robzyk 和 Kassir^[16]的方法。

2.3 同源重组消除酿酒酵母 K^+ 载体基因 *TRK1*

2.3.1 同源重组法在 *URA3* 基因两端引入 40 bp 的 *TRK1* 序列: 依据尿嘧啶合成酶 *URA3* 基因(gi : 172061)和 K^+ 载体 *TRK1* 基因(gi : 116616576)序列, 设计 *TRK1URAF*: 5'-TGCATTTTAGAAGAACGATGAGTAGAGTGCCACATTGGCATGTGCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATC-3'和 *TRK1URAZ*: 5'-TGGGCTTCTGATTAACTTTTCG-

TCTGCAACTGTGTTAGATTAGTTTTGCTGGCCG
CATCTTCTCAAATATGCTTCCCAG-3'引物(分别带有 40bp *TRK1* 尾巴的 *URA3* 基因序列), 以野生型酿酒酵母的总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 切胶纯化扩增产物。

2.3.2 同源重组转化: 培养 EGY48 酿酒酵母细胞至 OD_{600} 为 0.5, 3000 r/min 离心收集酵母细胞, 无菌冰水洗 1 次, 再用 1 mol/L 预冷无菌山梨醇洗 1 次, 然后用 1 mol/L 无菌冰山梨醇悬浮至酵母细胞浓度为 $1-5 \times 10^9$ /mL。在 50 μ L 酵母菌液中加入 200 ng~500 ng 带 40 bp *TRK1* 序列的 *URA3* 基因 PCR 产物 DNA, Gene pulser (Bio-Rad) 仪上电击转化(1.5 kV, 400 ohms, 25 μ F); 立即加 0.9 mL 1 mol/L 预冷无菌山梨醇使菌体悬浮, 涂布 SD+Trp+Ade+氨基酸水解物的培养基上筛选转化子。

2.3.3 *URA3* 基因转化子的功能鉴定: 将转化子对应划线到 K^+ 为 7 mmol/L, pH3 和 K^+ 为 7 mmol/L, pH5.9 的平板上。挑取前者生长不好, 后者生长良好的菌落。抽提各菌落酵母 DNA, 应用 *TRK1Z2*: 5'-TGAGTAGAGTGCCACATTG 3'和 *TRK1F2*: 5'-TGCTGGCCGCATCTTCTCAA 3'引物进行 PCR 鉴定。

2.4 同源重组消除酿酒酵母 K^+ 转运基因 *TRK2*

在上述试验中获得的酿酒酵母 *TRK1* 基因缺陷型菌株 EGY48(*trk1 Δ*)的基础上, 以酿酒酵母的组氨酸合成酶 *HIS3*(gi : 45720041)为标记基因, 经同源重组消除酿酒酵母 *TRK2* 基因(gi : 173032)。以野生型酿酒酵母的总 DNA 为模板, 以 *TRK2HISF*: 5'-TGCCAACAGCTAAGAGGACGTCATCCAGGGC TTCGTTGGCATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTA AAGCGTATTACAAATG-3'和 *TRK2HISZ*: 5'-GTGT CACTGGATTCTCCTTAGAGGAGGAAACATTCA ACGCTACATAAGAACACCATTTGGTGGAGGGAA

CATCGTTGGTA-3'为引物, 获得两端带有 40 bp 左右酿酒酵母 *TRK2* 基因序列的 *HIS3* 基因阅读框序列 DNA。用回收的 PCR 产物转化酿酒酵母 EGY48*trk1 Δ* , 在不含组氨酸的基本培养基 Sc(Sherman, 1991)上筛选转化子, 对获得的菌落进行 *TRK2Z2*(5'-TCATCC AGGGCTTCGTTGGC-3')和 *TRK2F2*(5'-CTACATAA GAACACCATTGG-3')引物的 PCR 扩增验证。

2.5 缺陷型菌株生长状况

以酿酒酵母 EGY48 为对照, 将 K^+ 载体 *TRK1* 缺失的菌株 EGY48 *trk1 Δ* 和两个钾离子载体 *TRK1* 和 *TRK2* 基因均被消除的菌株 EGY48 *trk1 Δ trk2 Δ* 分别转到 100 mmol/L KCl pH3.0 和 7.0 mmol/L KCl pH3.0 的培养基中, 观察菌落生长状况。

3 结果分析

3.1 拟南芥 *AtKUP1* 基因的克隆

拟南芥幼根的总 RNA 提取物经反转录、阅读框引物 R217 和 R219 的 PCR 扩增获得 2100 bp 左右扩增产物, 经 V-GENE DNA 凝胶回收试剂盒回收、纯化、酶切鉴定正确后克隆入 T/A 克隆载体 pMD18-T 中, 测序获得鉴定正确的克隆 YF5501, 其中的插入序列全长 2139 bp, 与 GenBank 上公布的拟南芥 *AtKUP1* 的核苷酸序列一致。

3.2 酿酒酵母的转化

3.2.1 *URA3* 基因异源重组转化: 以野生型酿酒酵母的总 DNA 为模板, 用 *TRK1URAZ* 和 *TRK1URAF* 引物扩增获得片段长度为 880 bp 左右的扩增产物, 测序与预期相符, 扩增产物经切胶纯化后, 电击法转化酿酒酵母 EGY48, 将转化子对应划线到 K^+ 为 7 mmol/L, pH3 和 K^+ 为 7 mmol/L, pH5.9 的 SD 平板上。挑取前者生长不好, 后者生长良好的 16 个菌落

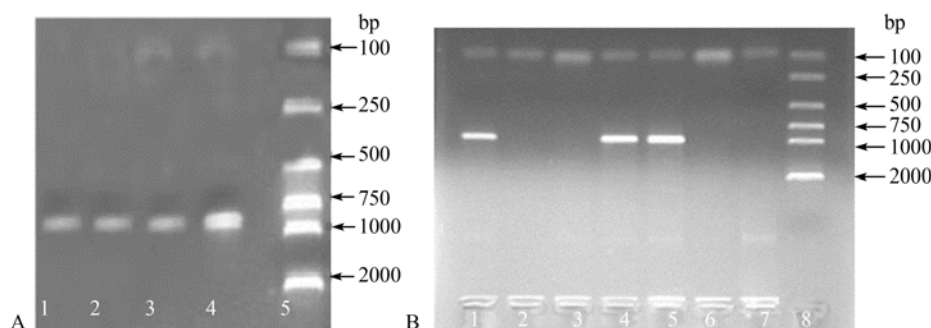


图 2 异源重组转化子的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR amplification of transformants

A: EGY48*trk1 Δ* ; 1-4: PCR product; 5: DL2000 PCR marker; B: EGY48*trk1 Δ trk2 Δ* ; 1-7: PCR product; 8: DL2000 PCR marker

提取DNA, 应用TRK1Z2和TRK1F2进行PCR扩增, 获得片段长度 910 bp 左右的 PCR 扩增阳性菌落 6 个, 与设计长度相符, 定名为 EGY48*trk1Δ*。

3.2.2 HIS3 基因异源重组转化: 将野生型酿酒酵母的总 DNA 为模板, TRK2HISZ 和 TRK2HISF 为引物获得 700 bp 左右的 PCR 扩增产物, 电击法转化 EGY48*trk1Δ*: 将转化子对应划线到 K^+ 为 30 mmol/L, pH3.0 和 K^+ 为 30 mmol/L, pH 5.9 的平板上, 设置一个对照菌株(第二步没有转化的菌株)。挑取前者生长不好, 后者生长良好的 11 个菌落。提取各菌株酵母 DNA 以 TRK2Z2 和 TRK2F2 进行 PCR 扩增, 5 个菌株 PCR 扩增结果呈阳性, PCR 扩增片段为 750 bp 左右与设计长度完全符合。证实得到的酿酒酵母菌株 EGY49 是 *TRK1* 和 *TRK2* 双缺陷(EGY48*trk1Δ trk2Δ*)。

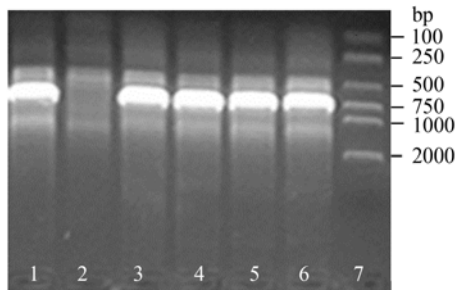


图3 重组转化子 EGY49 PCR 鉴定

Fig. 3 The PCR products of EGY49
1-6: PCR product of transformants; 7: DL2000 PCR marker

3.3 缺陷型菌株的培养特性

将酿酒酵母菌株 EGY49、缺失的 *TRK1* 基因菌株和原始菌株在 100 mmol/L KCl pH3.0 和 5.0 mmol/L KCl pH3 的培养基上培养, 可以看出双基因缺失的菌株在两种培养基中均不能生长, 只缺失 *TRK1* 基因的菌株和原始菌株生长势差异不大, 证明所获得的酿酒酵母菌株 EGY49 钾素吸收基因缺陷型明显, 通过同源重组缺失突变酵母中的钾离子载体基因(*trk1Δ trk2Δ*)为缺失菌株, 可用于钾素基因的功能性研究和吸钾相关基因的筛选。

3.4 缺陷型菌株的遗传稳定性

将缺陷型酿酒酵母菌株 EGY49 在 100 mmol/L KCl pH3.0 液体培养基中培养 5 d, 培养液稀释 10^5 , 取 50 μ L 玻璃珠法涂 100 mmol/L KCl pH3.0 琼脂培养基上, 随机选取 60 个菌落, 提取 DNA 分别采用 TRK1Z2; TRK1F2 和 TRK2Z2; TRK2F2 进行 PCR 扩

增, 其阳性率分别为 89.5% 和 92.2%。证实所获得的缺陷型酵母菌株具有较高的遗传稳定性。

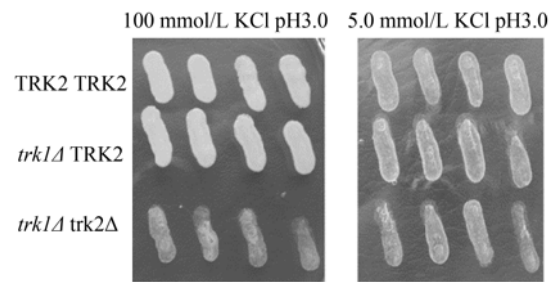


图4 酵母 *trk1Δ trk2Δ* 缺陷型菌株 EGY49 的培养特性

Fig. 4 The growth characterization of EGY49 *trk1Δ trk2Δ* mutant

3.5 功能互补鉴定拟南芥 K^+ 载体基因功能

将 *AtKUP1* 基因插入酿酒酵母表达质粒 pPC87 载体的 ADH1 启动子下游, 构成了 *AtKUP1* 基因的酵母表达载体 pPC87(*AtKUP1*)。并将载体转化入酿酒酵母菌株 EGY49 中, 结果显示转化菌落可互补酿酒酵母 TRK 基因的功能。

先将测序正确的 *AtKUP1* 基因 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切后插入酿酒酵母表达质粒 pPC87 具有相同酶切位点的 ADH1 启动子下游, 构成质粒 pPC87(*AtKUP1*)。再将该质粒转化 EGY48 *trk1Δ trk2Δ* 菌株, 获得带有 pPC87(*AtKUP1*)质粒的 EGY48 *trk1Δ trk2Δ* 菌株, 以 EGY48 *trk1Δ trk2Δ* 为对照。将转化菌株分别划线培养在含 100 mmol/L KCl pH3.0 和 5.0 mmol/L KCl pH3.0 的培养基中, 可以看出菌株在 100 mmol/L KCl pH3.0 培养基中比没有整合的钾离子转运蛋白缺失菌株生长良好, 在低浓度条件下, *trk1Δ trk2Δ* 缺失菌株转化拟南芥 *AtKUP1* 基因后在低盐条件下恢复生长, 但在 5.0 mmol/L KCl 的低浓度条件下转化 *AtKUP1* 菌株 EGY49 的生长较 100 mmol/L KCl 的高浓度培养基上长势弱(图 5)。

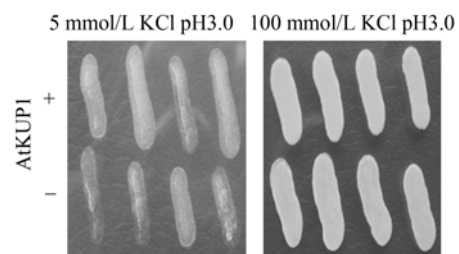


图5 酵母 *trk1Δ trk2Δ* 缺失菌株 EGY49 的 *AtKUP1* 转化子生长特征

Fig. 5 The growth characterization of EGY49 *trk1 trk2* mutants transformed with *AtKUP1*

4 结论与讨论

本实验尝试了通过引物重叠法进行将要敲除基因两端部分序列与一个筛选基因(组氨酸合成酶和尿嘧啶合成酶基因)序列连接, 再用获得扩增产物侵染要敲除基因的菌体, 利用筛选基因的全序列代替要敲除的基因, 获得该基因的缺陷型菌株 EGY49。将 EGY49、缺失的 *TRK1* 基因菌株和原始菌株在 100 mmol/L KCl pH3.0 和 5.0 mmol/L KCl pH3.0 的培养基上培养, 结果发现双基因缺失的菌株在两种培养基中均不能生长, 只缺失的 *TRK1* 基因的菌株和原始菌株生长势差异不大, 证明所获得的酿酒酵母菌株 EGY49 钾素吸收基因缺陷型明显, 可用于钾素基因的功能性研究和吸钾相关基因的筛选。实验的结果也证实对于序列已知的基因这种引物重叠法同源重组基因敲除技术可行、有效、易操作, 为烟草生物技术手段的降害研究提供了新的途径。

参 考 文 献

- [1] Rodriguez-Navarro A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1469** (1): 1–30.
- [2] Ramos J, Alijo R, Haro R, *et al.* *TRK2* is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1994, **176**(1): 249–252.
- [3] Gaber RF, Styles CA, Fink GR. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1988, **8**(7): 2848–2859.
- [4] Ko CH, Gaber RF. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**(8): 4266–4273.
- [5] Bertl A, Bihler H, Reid JD, *et al.* Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, *DUK1 (TOK1)*, in situ. *J Membr Biol*, 1998, **162**(1): 67–80.
- [6] Bihler H, Gaber RF, Slayman CL, *et al.* The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H⁺-dependent, K⁺-independent current. *FEBS Lett*, 1999, **447**(1): 115–120.
- [7] Madrid R, Gomez MJ, Ramos J, *et al.* Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem*, 1998, **273**(24): 14838–14844.
- [8] Loukin SH, Vaillant B, Zhou XL, *et al.* Random mutagenesis reveals a region important for gating of the yeast K⁺ channel Ykc1. *EMBO J*, 1997, **16**(16): 4817–4825.
- [9] Gaymard F, Pilot F, Lacombe B, *et al.* Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 1998, **94**(5): 647–655.
- [10] Wang TB, Gassmann W, Rubio F, *et al.* Rapid Up-Regulation of *HKT1*, a High-Affinity Potassium Transporter Gene, in Roots of Barley and Wheat following Withdrawal of Potassium. *Plant Physiol*, 1998, **118**(2): 651–659.
- [11] Fu HH. *AtKUP1*: A dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 1998, **10** (1): 63–73.
- [12] Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, *et al.* *AtKUP1*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, 1998, **10**(1): 51–62.
- [13] Nass R, Rajini Rao. Novel Localization of a Na⁺/H⁺ Exchanger in a Late Endosomal Compartment of Yeast. *J Bio Chem*, 1998, **273**(33): 21054–21060.
- [14] Gietz D, Jean AS, Woods RA, *et al.* Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(6): 1425.
- [15] Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, 2002, **350**: 3–41.
- [16] Robzyk K, Kassir Y. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucl Acids Res*, 1992, **20**(14): 3790.