

酵母ENO2上游激活顺序对酵母 LEU2表达的影响

王恩多

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

Michael Holland

(美国加州大学戴维斯分校医学院)

本文将酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中编码烯醇化酶的基因之一 ENO2 的上游激活顺序嵌入穿梭质粒 YEp13 上酵母 LEU2 基因上游 -405 Hpa I 的酶切部位。LEU2 为编码 β -异丙基苹果酸脱氢酶基因。从而研究了酵母 ENO2 的上游激活顺序对酵母 LEU2 表达的影响。

实验结果表明 ENO2 上游激活顺序不论正向或反向嵌入都激活 LEU2 的表达达四倍左右。有亮氨酸存在的条件下, LEU2 的表达受到抑制。ENO2 上游激活顺序在对 LEU2 表达的激活上并不受葡萄糖的诱导。提出了用 ENO2 上游激活顺序组建高表达系统的可能性。

关键词 酵母; 烯醇化酶基因; β -异丙基苹果酸脱氢酶基因; 上游激活顺序

酵母 LEU2 编码 β -异丙基苹果酸脱氢酶 (E.C.1.1.1.85), 该酶催化亮氨酸合成的第三步反应, LEU2 位于染色体 III 上^[1], 在高浓度的亮氨酸存在下其表达受到抑制^[2]。它是第一个在大肠杆菌中表达的真核基因^[3], 含有 LEU2 的 Pst I 片段已重组在 YEp13 上^[4], 其中 2.2 kb 的 Xho I -Sal I 限制性内切酶片段含 LEU2 编码顺序和它的调节顺序。5' 端不编码顺序含 δ -顺序、亮氨酰 tRNA 基因和一个编码 22 个氨基酸组成的前导肽的开放阅读框, 实验证明亮氨酰 tRNA 基因的缺失不影响 LEU2 基因的表达^[5,6]。近年来对酵母基因转录调控的研究指出, 有一个顺式作用调节区称上游激活顺序 (Upstream Activation Sequence 简称 UAS) 激活转录, 并受某些因子的诱导。现已对 GAL1-10 基因组^[7]、His3^[8]、His4^[9]、Cyc1^[10]、HO^[11]、ENO2^[12]、ENO1^[13] 等进行

了鉴定。ENO2 的上游激活顺序位于 -561 至 -352, 它受葡萄糖诱导激活转录。本文研究了这段顺序对 LEU2 表达的影响。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 酶及生化试剂: 限制性内切酶购于 New England Biolabs 公司或 Bethesda Research Laboratories 公司; T4 DNA 连接酶购于 P-L Biochemicals 公司; β -异丙基苹果酸由普度大学生化系 Kohlhaw, G. B. 教授赠送; 其他化学试剂购于 Sigma 试剂公司。

2. 菌株和生长条件: 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S173-6B (α leu2-3, leu2-112, his3- Δ 1, ura3-52, trp1-289) 由 Rochester 大学 Sherman 教授提

本文于 1988 年 6 月 12 日收到。

供。酵母菌在 Yp 培养基 (1% 酵母抽提物, 2% Bacto- 蛋白胨) 30℃ 生长或在含 0.67% 无氨基酸的酵母氮并补充 2μg 尿嘧啶/ml、2μg 色氨酸/ml, 2μg 组氨酸/ml 的培养基中, 30℃ 生长。用 2% 的葡萄糖或 2% 甘油加 2% 乳酸为碳源。

3. 质粒: YEp13, 10.7kb, 含 pBR 322DNA 顺序, 酵母 2μ 质粒复制起点 DNA 顺序和 LEU2 的杂合质粒, 由 Holland 教授实验室提供。HDV R10, 含 ENO2 的 5' 端不编码顺序和 ENO1 编码顺序的融合基因, 在 -561 和 -352 有 Sal I 酶切部位的 pSF 2124, 由 Holland 教授实验室构建^[12]。

(二) 方法

1. ENO2 上游激活顺序 -561 至 -352 片段嵌入 YEp13 的载体构建: 用 Sal I 酶切 HDV R10, 蔗糖密度梯度超离心分离 ENO2 的上游激活顺序 -561 至 -352 片段, 用 DNA 聚合酶 I 修补末端成平头, 用连接酶将该片段嵌入 LEU2-405 的 Hpa I 酶切部位, 该部位位于亮氨酸 tRNA 基因内。因为 YEp13 中酵母 2μ 质粒 DNA 顺序中也含一个 Hpa I 限制性内切酶酶切部位, 它们在 YEp13 的 Sal I 酶切小片段上。为使 ENO2 的上游激活顺序 -561 至 -352 片段专一嵌入 LEU2 Hpa I 的切点上, 需将 YEp13 先用 Sal I 酶切, 分离到 4.0kb 和 6.7kb 两个片段, 后者经连接酶环化再用 Hpa I 酶切, 此时切点仅在 LEU2 的 -405 处。待嵌入 ENO2 上游激活顺序 -561 至 -352 片段后, 将 4.0kb 的 Sal I 酶切片段重新接到原来的位置 (图 1)。

2. 酵母转化: 按 Ito 等方法进行^[14]。S. cerevisiae 菌株 S173-6B 在含 2% 葡萄糖的 Yp 培养基中生长至对数早期 ($A_{600} = 0.6-0.8$)。转化体在补充除亮氨酸外所有氨基酸的氨基氮、以 2% 葡萄糖为碳源、1.5% 琼脂的培养基上生长。

得到的 Leu⁺克隆, 再转到以 2% 甘油加 2% 乳酸为碳源的上述培养基中, 30℃ 培养, 通过选择单克隆并检查基因标记得到转化体。

3. 酵母细胞的破碎及 β-异丙基苹果酸脱氢酶活力的测定: 3000r/min, 离心 5min, 收集 5ml 生长到对数早期 ($A_{600} = 0.5$) 的酵母培养液中的细胞。用玻璃珠在 200μl 细胞破碎缓冲液中破碎酵母细胞。细胞破碎缓冲液含 1.25mol/L 硫酸铵、0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.9, 20% V/V 甘油、0.03% 叠氮化钠, 50μmol/L 硫酸锰、4mmol/L 二硫代苏糖醇。离心后, 取上清测活力。总的测定活性体积 0.2ml, 含 pH8.0 磷酸钾缓冲液 30μmol、氯化钾 10μmol、氯化锰 0.1μmol、NAD⁺ 0.2μmol、异丙基苹果酸 0.2μmol、酵母抽提液 20μl, 30℃ 按 Kohlhaw 方法^[15], 在 340nm 连续测 NADH 的产生以确定 β-异丙基苹果酸脱氢酶的活力。

结果和讨论

经 DNA 重组得到在 LEU2 结构基因上游、亮氨酸 tRNA 基因内 -405 处 Hpa I 酶切点嵌入 ENO2 上游激活顺序 -561 至 -352 片段的重组质粒。将构建好的质粒转化到大肠杆菌中, 得到 100 个以上的克隆。从其中 12 个克隆中, 经扩增、制备 DNA、用 Sal I 酶切, 得到 3 个克隆含分子量比 YEp13 Sal I 酶切大片段大 200bp 的重组质粒, 简称为 YEp-ENO2-1、YEp-ENO2-2、YEp-ENO2-3。为了进一步证实此结果, 将 YEp13、YEp-ENO2-1、YEp-ENO2-2、YEp-ENO2-3 分别用 Xho I 酶切, ³²P 标记末端, 再用 Sal I 酶切后, YEp13 和 3 个克隆中都得到 2 条标记片段, 其中一条在 YEp13 和 3 种重组质粒

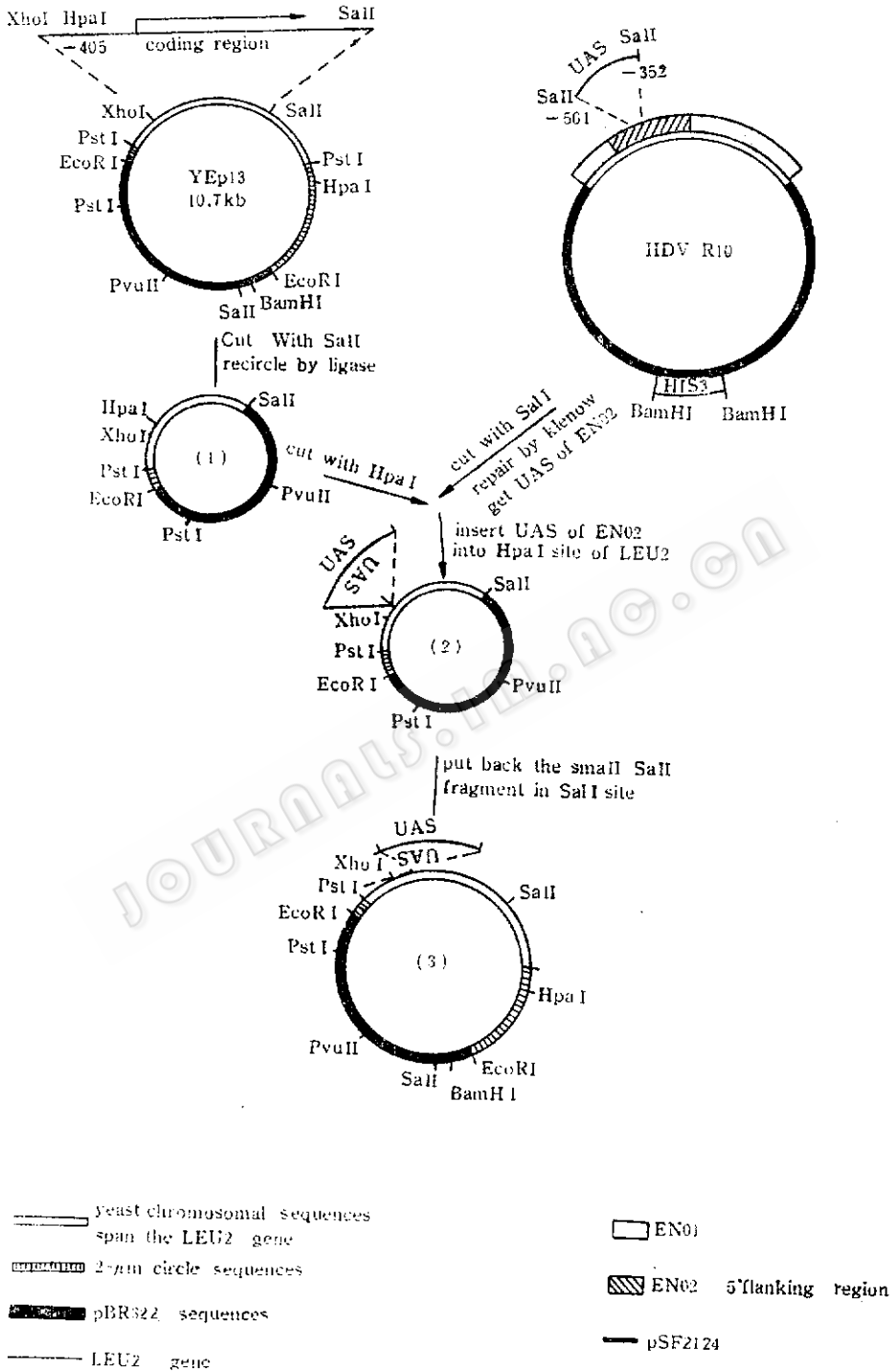


图 1 质粒YEp-ENO₂-1(1), YEp-ENO₂-2(2)和YEp-ENO₂-3 (3) 的构建
 Fig. 1 Construction of plasmid of YEp-ENO₂-1(1), YEp-ENO₂-2(2) and YEp-ENO₂-3(3)

DNA中皆存在;另一条YEp13中的为2.1 kb,其余3个克隆中为2.3kb(图版I-A)。从已知的ENO2上游激活顺序-561至-352片段的顺序来看^[12], -539和-493有一个Xmn I 酶切点。若用Xmn I 酶切YEp13将出现2.8kb、2.0kb、1.45kb、0.44kb 4个较大片段;用Xmn I 和Xho I 双酶切则出现2.0kb、1.45kb、0.44kb、1.35kb、1.30kb 5个片段。ENO2 上游激活顺序-561至-352片段正向嵌入Hpa I 酶切部位,用Xmn I 和Xho I 双酶切将出现0.27kb、一条大于1.35kb或1.30kb的片段和一条等于1.35kb或1.30kb的片段。用Xmn I 和Xho I 双酶切YEp-ENO2-1、YEp-ENO2-2、YEp-ENO2-3后,第二种有0.27kb和1.4kb的片段出现,1.30kb、2.0kb、1.45kb、0.44kb与YEp13相同;第一、三种有0.43kb和1.15、1.1kb的片段出现,1.30kb、2.0kb、1.45kb、0.44kb与YEp13相同。此结果说明,YEp-ENO2-2是由ENO2 上游激活顺序-561至-352正向嵌入LEU2 Hpa I 酶切点得到;YEp-ENO

2-1和YEp-ENO2-3是由ENO2上游激活顺序-561至-352反向嵌入LEU2 Hpa I 酶切点得到的(图版I-B)。

转化YEp13、YEp-ENO2-1 和 YEp-ENO2-2到酿酒酵母S173-6B中,每种都得到300个以上的转化体。经过挑选单菌落,检查基因标记his⁻、ura⁻和leu⁺,每种选择3个转化体进行液体培养。在分别以葡萄糖或甘油加乳酸为碳源,含10mmol/L 或不含亮氨酸的液体培养基中培养酵母,对数期收获酵母细胞破碎、测定抽提液中的β-异丙基苹果酸脱氢酶的活力,结果如表1所示。

由结果可知,ENO2 上游激活顺序-561至-352 片段不论正向或反向嵌入LEU2的-405处亮氨酸tRNA 基因内,都使LEU2 的表达增加四倍左右。在糖酵解(葡萄糖)和糖原合成(乳酸加甘油)的培养基中,LEU2 的表达水平差别不大。在10mmol/L亮氨酸存在下,LEU2 的表达受抑制。

ENO2上游激活顺序对 LEU2 表达的

表 1 酵母ENO2的上游激活顺序对酵母ENO2表达的影响

Table 1 Effect of upstream activation sequence of yeast ENO2 on expression of yeast LEU2

Plasmid	gB-gl-leu		gB-d-leu		gB-d + leu	
	Total activity		Total activity		Total activity	
	Individual	Average value	Individual	Average value	Individual	Average value
YEp13	0.64	0.59	1.60	1.29	0.32	0.32
	0.56		1.13		0.32	
	0.56		1.13		0.32	
YEp-ENO2-2	2.65	2.44	7.70	6.2	0.56	0.69
	2.17		4.80		0.72	
	2.89		6.11		0.80	
YEp-ENO2-3	2.81	2.65	6.36	6.94	0.66	0.85
	2.7		6.75		0.96	
	2.17		7.72		0.94	

Total activity is activity of 20 μl extract of yeast, one unit of activity is defined as the amount of enzyme which catalyzes the formation of 1 nmol of product per min under standard conditions. gl-leu means transformants grow in medium of glycerol plus lactate without leucine, d-leu or +leu mean transformants grow in glucose medium without or with 10mmol/L leucine

影响与该顺序的方位无关,这一结果与 ENO2 上游激活顺序对 ENO1 表达的影响结果一致^[12],也与目前已知的酵母基因上游激活顺序对基因表达的影响结果一致^[7-13]。ENO2 上游激活顺序在 ENO1 结构基因上游 -229 处嵌入对 ENO1 的表达有激活作用;在 LEU2 结构基因上游 -405 处嵌入对 LEU2 的表达有激活作用。这点说明,上游激活顺序并不在结构基因上游固定的位置激活基因表达。LEU2 是编码亮氨酸合成的基因之一的,它的表达受亮氨酸的抑制;ENO2 是糖酵解酶之一烯醇化酶的编码基因,其表达受葡萄糖诱导;编码烯醇化酶的另一基因 ENO1,它的表达则不受葡萄糖诱导^[13]。ENO2 和 ENO1 的这种差别是由于 ENO1 的 5' 端不编码区有一段上游阻遏顺序 (Upstream

Repression Sequence, 简称 URS)。若将 ENO1 的 URS 删除,则 ENO1 的表达被葡萄糖诱导。ENO2 上游激活顺序在 LEU2-405 处的嵌入并不能克服亮氨酸对 LEU2 表达的抑制,是否在 LEU2 的 5' 端不编码区存在一段顺序与亮氨酸抑制基因表达有关还不清楚。另外在 LEU2 的 5' 端不编码区是否存在一段顺序类似 ENO1 的 URS,以便使基因表达不受葡萄糖的诱导,还有待于进一步研究。

酵母的基因工程研究是 80 年代才开始的,上游激活顺序的研究将应用于酵母基因工程的高效表达,提高表达产物的产量。如果我们将 ENO2 上游激活顺序组建到有实际应用价值的蛋白基因的上游也将会提高该基因的表达,上游激活顺序的研究将具有美好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Mortimer, R. K. and Schild, D.: *Microbiol. Rev.*, 44: 519—571, 1980.
- [2] Brown, H. D., et al.: *J. Bacteriol.*, 121: 959—969, 1975.
- [3] Ratzkin, B. and Carbon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 487—491, 1977.
- [4] Struhl, K., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1035—1040, 1979.
- [5] Martinez-Arias, A., et al.: *Nature*, 307: 740—742, 1984.
- [6] Andreadis, G., et al.: *Cell*, 31: 319—325, 1982.
- [7] West, R., et al.: *Mol. Cell Biol.*, 4: 2467—2478, 1984.
- [8] Struhl, K.: *Nature*, 300: 284—286, 1982.
- [9] Hinnebusch, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 498—502, 1985.
- [10] Guarente, L. and Mason, T.: *Cell*, 32: 1279—1286, 1983.
- [11] Nasmyth, K. A.: *Cell*, 42: 213—223, 1985.
- [12] Cohen, R. G., et al.: *Mol. Cell Biol.*, 6: 2287—2297, 1986.
- [13] Cohen, R. G.: *Mol. Cell Biol.*, 7: 2753—2761, 1987.
- [14] Ito, H., et al.: *J. Bacteriol.*, 153: 163—168, 1983.
- [15] Hsu, Y.-P. and Kohlhaw, G. B.: *J. Biol. Chem.*, 255: 7255—7260, 1980.

THE EFFECT OF UPSTREAM ACTIVATION SEQUENCE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ENO2 ON THE EXPRESSION OF YEAST LEU2

Wang Enduo

(Shanghai Institute of Biochemistry Academia Sinica, Shanghai)

Michael Holland

(Department of Medicine of University California, Davis)

The upstream activation sequence of ENO2, one of the two genes coding for yeast enolase, was inserted into the upstream -405 Hpa I site of LEU2, coding for β -isopropylmalate dehydrogenase (E.C.1.1.1.85) in shuttle plasmid YEp13. The effect of upstream activation sequence of ENO2 on the expression of yeast LEU2 was studied.

The results show the upstream activation sequence of ENO2 activates the expression of LEU2 in both orientations by four times. Leucine represses the expression of LEU2. The effect of upstream activation sequence of ENO2 on the expression of LEU2 is not induced by glucose. It is possible to construct a high-level expression system in yeast with upstream activation sequence of ENO2.

Key words

Yeast, gene coding for enolase; gene coding for β -isopropylmalate dehydrogenase, upstream activation sequence

图 版 说 明

Explanation of Plate I

A. ENO2的上游激活顺序嵌入LEU2的Hpa I 部位的限制性酶切片段分析

Restriction fragment analysis of insertion of ENO2UAS into Hpa I site of LEU2.

Lane 2, 4, 6: Xho I Fragment 32 P labelled of YEp-ENO2 -1, YEp-ENO2-2, YEp-ENO2-3 before small Sal I fragment was ligated back with large Sal I fragment respectively.

Lane 1, 3, 5: Xho I fragment in lane 2, 4, 6 cut with Sal I respectively.

Lane 7: Xho I fragment 32 P labelled of YEp13 cut with Sal I

B. YEp 13和重组质粒的Sal I 大片段环化后的限制性内切酶酶解电泳图谱

Restriction endonuclease cleavage electrophoresis pattern of recircled large Sal I fragment of YEp13 and recombination plasmids.

Lane 1, 2, 3, 4, are YEp-ENO2-1, YEp-ENO2-2, YEp-ENO2-3 and YEp 13 were digested with Xmn I and Xho I respectively.

Lane 5 is YEp13 was digested with Xmn I.

王恩多等：酵母ENO2上游激活顺序对酵母LEU2表达的影响

图版 I

Plate I

Wang Enduo et al.: The effect of upstream activation sequence of *Saccharomyces cerevisiae* ENO2 on the expression of yeast LEU2

