

mel 基因在酿酒酵母菌中的克隆和表达*

王玉洁 黄玉屏 阮丽芳 刘楠 沈萍**

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘要: 构建了含 *mel* 基因的重组质粒 pAJM, 并转化到酿酒酵母菌中, 获得了在平板上产生黑色表型的转化重组子, 为酵母菌的遗传操作提供了一种新的选择标记。由于 *mel* 基因经酪氨酸产生的黑色素无毒、无害, 安全稳定, 无需另外加显色化合物或使用特殊的仪器设备, 直接在平板上观察结果。因此, 是一种便捷、价廉、无污染的新型报告基因。此外, 实验中还发现含 *mel* 基因的酵母菌生长迅速, 这不仅作为报告基因更能显示其优势, 而且也为进一步研究其在酵母菌中的功能提出了新的内容。

关键词: *mel* 基因, 报告基因, 酿酒酵母, 克隆和表达

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0043-05

* 湖北省重点基金资助项目 (No. 204130506)

** 联系人

收稿日期: 2002-07-12, 修回日期: 2002-10-20

CLONE AND EXPRESSION OF THE *mel* GENE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

WANG Yu-Jie HUANG Yu-Ping RUAN Li-Fang LIU Nan SHEN Ping

(College of life science, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: In this work, plasmid pAJM which contains *mel* gene was constructed and transformed into *Saccharomyces cerevisiae*. The transformants producing black pigment on plates have been obtained, providing a new selective marker for yeast genetic manipulation. The fact that *mel* gene produced melanin through tyrosine is innocuous and that does not need any additional pigment detector or special equipment. So this gene is an easy, cheap and safety new reporter gene. Furthermore, in the experiments, we realized that yeast containing *mel* gene grows faster, the character gives us an advantage and a start to a work on the function of *mel* gene in yeast.

Key words: *mel* gene, Reporter gene, *Saccharomyces cerevisiae*, Clone and expression

mel 基因编码的产物是酪氨酸酶 (Tyrosinase), 这是广泛存在于生物体中并参与黑色素 (melanin) 合成的关键酶, 该酶催化底物 L-酪氨酸形成 L-多巴, 并经过一系列复杂的氧化过程形成黑色素^[1]。由于黑色素具有抗紫外线、清除自由基、抗病毒等重要功能, 在医药、农业、化妆品等行业具有广泛的应用前景^[1], 因而引起世界各国广泛的重视, 研究和应用均迅速发展。

近年来, 利用 *mel* 基因表达形成清晰可见的黑色素表型效应, 国际上开始将其用作进行动物胚胎发育^[2]、真核基因表达调控^[3]等相关研究的新的十分有效的报告基因, 形成了新的研究热点^[6]。

我们从嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) 中分离得到一种新的 *mel* 基因, 这是目前已知 *mel* 基因中最小的结构基因 (GenBank Accession No. AF064072), 已经在大肠杆菌中获得高效表达^[4,7], 并已克隆进苏云金芽孢杆菌中^[5]。但在酵母菌中获得克隆和表达目前还未见报道。本研究试图将 *mel* 基因克隆进酵母菌, 期望能成为酵母菌基因表达研究的新的报告基因, 并为进一步研究其在酵母菌中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AY Δ ura), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) HB101, 大肠杆菌-酿酒酵母菌穿梭质粒 pAJ401 (山东大学汪天虹教授惠赠), 质粒 pWSY 由本实验构建。

1.1.2 培养基: LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 5g, pH 7.2, 定容至 1L。酵母基本培养基 YNB: YNB 6.7g, 葡萄糖 20g, 定容至 1L。酵母完全培养基 YPD: 酵母提取物 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g, 定容至 1L。固体培养基另加 15g 琼脂粉。

1.2 L-多巴含量检测

1.2.1 制作标准曲线: L-多巴标准溶液: 精确称取 L-多巴标准品 10mg 溶于水中, 定容至 100mL 容量瓶, 溶解过程中加入 2mL 0.1mol/L HCL, 将 L-多巴稀释成 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1mg/mL, 测定其 OD_{530} 值, 绘制曲线。L-多巴含量 = $OD_{530} \times (1/k) \times$ 稀释倍数。

1.2.2 培养发酵方法: 从斜面取一环菌, 接种到装有 30mL YNB 培养基的 250mL 三角

瓶中, 28℃摇床培养 72h, 将培养基 pH 调至 5.5, 并加入适量的 L-抗坏血酸溶液, 以后每隔 2h 以间歇法加入 L-酪氨酸, L-抗坏血酸作为抗氧化剂一并加入, 共加 5 次, L-酪氨酸的最终浓度为 8.6mg/mL, L-抗坏血酸的最终浓度为 5.5 mg/mL, 28℃摇床培养 24h, 发酵完毕。

1.2.3 L-多巴含量测定: 将待测溶液适当稀释, 取 1mL 稀释液, 加入 1mL 0.5mol/L HCL 混匀。加入 1mL 亚硝酸钠溶液, 应显黄色, 再加 1mL 1mol/L NaOH 溶液, 应显红色。在 721 型分光光度计上比色, 比色波长为 530nm, 记录所测 OD 值, 查标准曲线, 可得 L-多巴的含量。

1.3 黑色素含量检测

配置 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50mg/mL 黑色素标准溶液, 测定其 OD_{400} 值, 制作黑色素标准曲线。测定发酵黑色素含量时, 将发酵液离心, 取上清用 721 型分光光度计测得 OD_{400} 值, 查标准曲线得黑色素含量。黑色素含量 = $OD_{400} \times (1/k) \times 1/100 \times$ 稀释倍数。

2 结果

2.1 含 *mel* 基因的载体 pAJM 的构建

质粒 pAJ401(Amp^r ura3) 是大肠杆菌-酿酒酵母 (*E. coli*-*S. cerevisiae*) 穿梭表达载体, 具有酿酒酵母组成型 PGK 启动子。质粒 pWSY 为 pUC18 载体的 *Sal*I 位点插入 *mel* 基因的重组质粒。用 *Hind*III 完全酶切 pWSY, 用 T₄ DNA 聚合酶补平, 再用 *Eco*RI 酶切, 回收 0.7kb 的 *mel* 基因片断, pAJ401 载体用 *Xho*I 完全酶切, T₄ DNA 聚合酶补平, 之后用 *Eco*RI 完全酶切, 再与以上 0.7kb 的片断连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在加有氨苄青霉素的抗性平板上(氨苄青霉素浓度为 100 μ g/mL), 挑选 24 个转化子, 提质粒, 酶切鉴定。用 *Sal*I 酶切从转化子中抽提的质粒 DNA 能切出 0.7kb 和 5.3kb 的两个片断, 分别与 *mel* 基因、pAJ401 载体大小相同, 这个重组质粒命名为 pAJM(图 1 和图 2)。

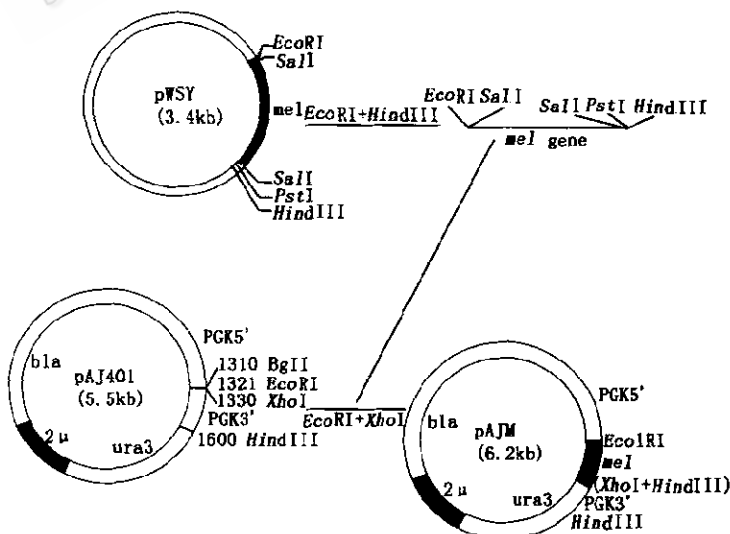


图 1 载体 pAJM 的构建示意图

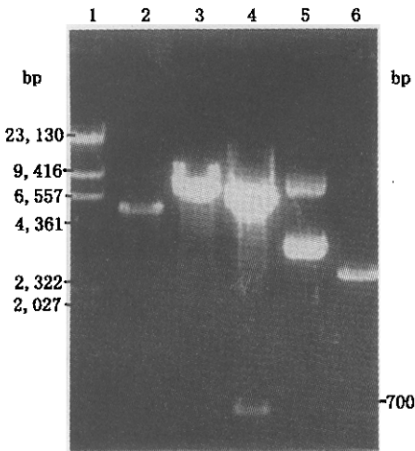


图2 质粒琼脂糖凝胶电泳图

1 λ DNA/*Hind*III, 2 pAJ401/*Eco*RI, 3 pAJM/*Eco*RI, 4 pAJM/*Sal*I, 5 pAJM, 6 pWSY/*Eco*RI

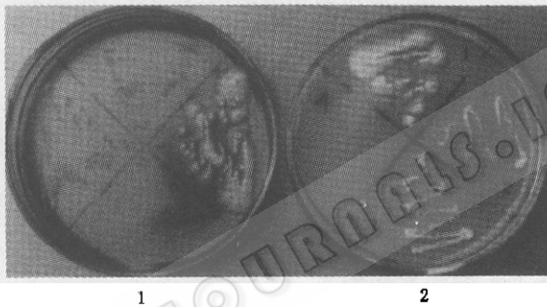


图3 含 *mel* 基因的转化子在固体培养基中所产生的黑色素

1 pH8.0: (1) pAJM 转化子, (2, 3) pAJ 转化子, (4) *S. cerevisiae* AY, 2 pH5.4: (1) pAJM 转化子, (2, 3) pAJ 转化子, (4) *S. cerevisiae* AY

4.9mg/dL。

将 pAJM 转化子产黑菌液离心取上清, 测得 OD_{400} 为 0.58, 从标准曲线上查得黑色素的产量为 38.7mg/mL。

以上的研究表明, *mel* 基因在酿酒酵母中获得了明显的表达, 这是来自原核生物嗜麦芽假单胞菌的 *mel* 基因在酵母中获得表达的首例。

3 讨论

我们构建了一种含 *mel* 基因的重组质粒 pAJM, 并首次将 *mel* 基因克隆进酿酒酵母菌中, 获得了具有明显黑色素表型的转化重组子。这为酵母菌的遗传操作提供了一种

2.2 *mel* 基因在酿酒酵母中的表达

2.2.1 在平板中的检测: 质粒 pAJ401 和重组质粒 pAJM 分别转化酿酒酵母 *S. cerevisiae* AY, 分别获得转化子, 将这两种转化子分别划线在 YNB + Tyr (pH5.4、pH7.0 和 pH8.0) 的平板上, 生长都很好, 并且 pAJM 转化子生长量明显高于 pAJ401 转化子。其中在 YNB + Tyr (pH8.0) 的平板上, pAJM 转化子菌落和菌苔周围都有明显的黑圈 (图3)。阴性对照 *S. cerevisiae* 是尿嘧啶缺陷型, 在酵母基本培养基 YNB 中不生长。

2.2.2 在液体培养基中检测: YPD 培养基颜色较深, 很难观察出转化子产黑现象, 因此选用颜色很浅且清亮的 YNB 培养基进行检测。在 250mL 的三角瓶中装入 30mL YNB + Tyr 液体培养基, 分别接种 pAJM 转化子和 pAJ401 转化子。培养 2d 后, 用 10mol/L 的 NaOH 调 pH 至 8.0, 每隔 24h 调 pH 一次, 培养到第 5d, pAJM 转化子菌液颜色变黑, pAJ 转化子菌液仍为乳白色 (图4)。

2.2.3 L-多巴和黑色素产量的检测: 酪氨酸酶作用于 L-酪氨酸生成的第一个产物是 L-多巴, L-多巴经过一系列的自身氧化作用生成黑色素。因此检测 L-多巴的含量能够反映黑色素的产量也能够证明所产生的黑色素为多巴黑色素。为了检测 L-多巴的产量, 我们首先制作了 L-多巴标准曲线, 然后按照曲线查得 L-多巴的产量。将发酵液培养至 96h 测得 OD_{530} 为 0.35, 从标准曲线上查得 L-多巴的产量为

新的选择标记。与目前用于酵母菌基因表达和调控研究的报告基因(如 *lacZ*、*cat*、*neo*、*gfp* 等)相比具有明显的优势。首先,由我们所分离的 *mel* 基因只有 0.7kb 大小,便于操作,稳定性好。第二,由 *mel* 基因负责产生的黑色素实际上是一种酪氨酸衍生物,无毒、无害,使用安全。没有抗性基因(如 *cat*、*neo*)所带来的抗性传播的危害。第三,所产生的黑色素不需另加其它化合物(如 X-gal、IPTG)和使用特殊的仪器设备,在平板上就能显示出肉眼可见的黑色表型。所以是一种直观便捷的标记基因,而且无污染、价廉、检测方便,具有很好的应用前景。

此外,在我们的实验过程中还发现含有 *mel* 基因的酵母菌生长旺盛(图 3)。这不仅有利于作为报告基因的易检出性,而且也为进一步研究 *mel* 基因在酵母菌中的功能提出了新的内容,具有重要的理论意义和应用潜力。

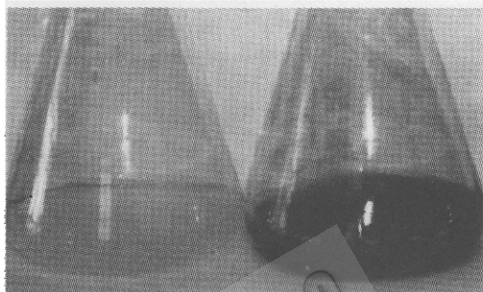


图 4 含 *mel* 基因的转化子在液体培养基中所产生的黑色素

1 pAJ 转化子菌液, 2 pAJM 转化子菌液

参考文献

- [1] RILEY P A. *Ins j Biochem Cell Biol*, 1997, **29** (11): 1235 ~ 1239.
- [2] Esther C, Michael L. *Dev Genes Evol*, 2001, **211**: 150 ~ 153.
- [3] Albanese C, Reutens A T. *FASEB J*, 2000, **14**: 877 ~ 884.
- [4] Wang G, Peng Z, Shen P, *et al.* *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **185**: 23 ~ 27.
- [5] Ruan L, Huang Y, Shen P, *et al.* *Letters in Applied Microbiology*, 2002, **34**: 244 ~ 248.
- [6] Patricia G, Estela G, Lluis M. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 1999, **15**: 175 ~ 178.
- [7] 王戈林, 沈萍, 杨澜, 等. *遗传学报*, 1999, **26** (3): 274 ~ 279.
- [8] 宫明, 李旭. *生命的化学*, 2000, **20** (3): 126 ~ 127.
- [9] 王戈林, 宁华, 沈萍, 等. *中国医药工业杂志*, 1999, **30** (4): 150 ~ 154.