

一个从顶头孢霉中筛选具有启动子功能的 DNA 片段的简便方法*

张丕燕 朱春宝** 朱宝泉 赵文杰

(上海医药工业研究院 上海 200040)

摘要: 利用大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pGBT9 构建了一个真菌启动子捕获载体 pGBT14, 用这个捕获载体构建了含顶头孢霉的 0.5 ~ 2.0kb 片段的染色体 DNA 文库, 并从中筛选到顶头孢霉的 24 个 DNA 片段, 这些片段能够在啤酒酵母中启动 *Tp1* 基因的表达。

关键词: 大肠杆菌-酵母穿梭质粒, 启动子捕获载体, 顶头孢霉, DNA 文库, 真菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 025-2654 (2004) 03-0097-04

A Convenient Method to Select DNA Fragments of *Cephalosporium acremonium* with Promoter Function

ZHANG Pi-Yan ZHU Chun-Bao ZHU Bao-Quan ZHAO Wen-Jie

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Shanghai 200040)

Abstract: A promoter-trap vector pGBT14 for selecting promoters of fungus gene was constructed with *E. coli*-yeast shuttling plasmid pGBT9. Using this vector, a 0.5 ~ 2.0kb chromosomal DNA library of *Cephalosporium acremonium* was constructed, and twenty four DNA fragments with promoter function in *Saccharomyces cerevisiae* Y153 were selected from this DNA library. And the promoter function of these DNA fragments was analyzed.

Key words: *E. coli*-yeast shuttle plasmid, Promoter-trap vector, *Cephalosporium acremonium*, Gene library, Fungi

真菌是重要的工业生产菌株, 在酶、抗生素、有机酸等的生产中有着广泛的应用。真菌作为基因工程的受体菌有着不同于原核生物的独特优点——具有很高的蛋白质分泌能力; 能够正确进行各种翻译后加工; 与高等真核生物类似等。众所周知, 启动子在蛋白表达过程中起着至关重要的作用。Lou 曾利用真菌的启动子捕获载体 (promoter-trap vector) 筛选到 3 个黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的启动子^[1], Weltring 和 Aoki 也曾利用相似的策略分别从镰刀霉 (*Fusarium sambucinum*) 和藻青菌 (*Synechocystis* sp.) 菌株 PCC 6803 中筛选到有基因启动功能的 DAN 片段^[2, 3]。

酵母-大肠杆菌穿梭质粒 pGBT9 上的 *tp1* 基因互补了色氨酸营养缺陷型啤酒酵母 Y153 的色氨酸合成能力。我们利用质粒 pGBT9 构建了一个用于筛选具有启动子功能的 DNA 片段的捕获载体 pGBT14。该质粒的 *tp1* 基因上游没有启动子序列, 携带 pGBT14 的啤酒酵母 Y153 不能无色氨酸的完全极限培养基上生长。我们用这个捕获载体建成顶头孢霉的 0.5 ~ 2.0 kb 片段的染色体 DNA 文库, 通过在色氨酸缺陷型宿主 Y153 中表达这个 DNA 文库, 筛选到 24 个顶头孢霉菌的染色体 DNA 片段, 这些片段能够在啤酒酵母中启动 *tp1* 基因的表达。由于这些片段来自顶头孢霉, 有望从中筛选到能够在顶头孢霉中启动外源基因表达的 DNA 片段。

* 国家技术研究发展计划 (No. 2001AA214201)

** 联系人 Tel: 021-62479808-323, E-mail: zhucb@sipi.com.cn

收稿日期: 2003-07-21, 修回日期: 2003-11-21

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 为本实验室保存, 顶头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*) 84-3-87 为一株工业生产菌株, 由我院菌种选育组提供, 培养条件参照文献 [4]; 啤酒酵母 Y153 菌株和质粒 pGBT9 由朱建伟教授惠赠。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、*Bam*HI 接头、T4 连接酶、碱性磷酸酯酶 (CIAP) 均购自大连 TaKaRa 公司; PEG6000 购自上海化学试剂公司; Zymolyase-20T 购自东京生化学工业株式会社; 地高辛标记和检测试剂盒购自罗氏公司。

1.3 DNA 操作

质粒 DNA 的制备、DNA 酶切、电泳、连接、大肠杆菌的转化以及 DNA 文库的构建均参照文献 [5]。酵母的培养条件及其质粒的提取和转化参照文献 [6]。

1.4 顶头孢霉基因组 DNA 的制备

顶头孢霉基因组 DNA 的制备参照文献 [7] 并略作改动: 将收获的菌丝用水洗 3 次, 用液氮处理后, 冷冻干燥 12 h, 掺入砂粒并在研钵中研碎, 然后重悬于 25 mL 的抽提缓冲液 (100mmol/L LiCl, 10 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, pH8.0, 4% SDS), 重悬液用酚、酚氯仿混合液 (1:1, V/V) 和氯仿各抽提一次, 在水相中加等体积的 6mol/L LiCl, 于 -20℃ 冰箱中冷冻 2 至 3 h, 然后在 4℃ 下 12,000 r/min 离心 20 min (Beckman Avanti J-25, JA17 转子), 将上清液转移至另一离心管中, 加入 2 倍体积的乙醇沉淀 DNA, 1,200 r/min, 4℃ 下离心 15 min, 用 70% 的乙醇洗涤 DNA 1 次, 离心, 干燥后, 用适量 TE 缓冲液溶解 (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.5)。

2 实验结果

2.1 启动子捕获载体 pGBT14 的构建

如图 1, ① 用 *Bam*HI 酶切质粒 pGBT9, 用 Klenow 酶补平切口后连接, 将 pGBT9 上的 *Bam*HI 位点消除, 得到质粒 pGBT9I; ② 用 *Pma*CI 和 *Sma*I 双酶切质粒 pGBT9I, 电泳回收包含 *TrpC* 基因开放阅读框的片段 (不包括启动子序列); ③ 用 *Pma*CI 和 *Pvu*II 双酶切质粒 pGBT9I, 电泳回收大片段, 然后将 *Pma*CI-*Sma*I 片段反向插入到 pGBT9I 的 *Pma*CI-*Pvu*II 位点, 构建成质粒 pGBT92 (酶切鉴定插入方向); ④ 在 pGBT92 的 *Pma*CI 位点插入 *Bam*HI 接头, 构建启动子捕获载体 pGBT14 并进行酶切鉴定 (图 2)。用 pGBT9 和 pGBT14

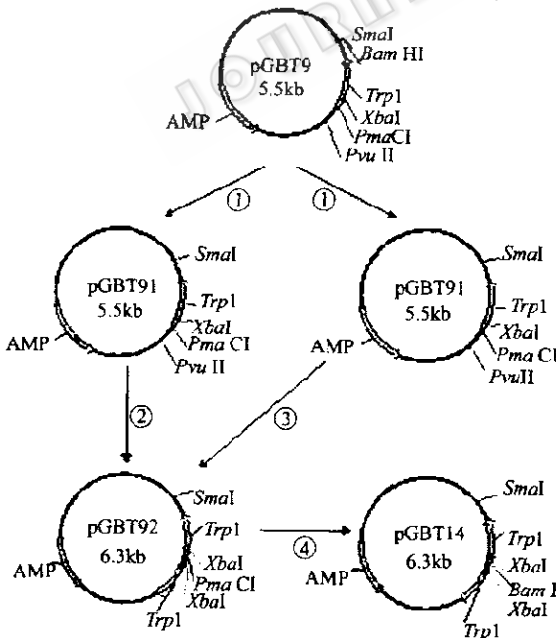


图 1 捕获载体 pGBT14 的构建图

分别转化啤酒酵母 Y153, 发现 pGBT9 转化的啤酒酵母 Y153 能在无色氨酸的完全极限培养基上生长, 而 pGBT14 转化的 Y153 不能生长, 说明缺失启动子的 pGBT14 可以用来筛选具有启动子功能的真菌 DNA 片段。

2.2 0.5~2.0 kb 的顶头孢霉染色体 DNA 文库的构建

顶头孢霉基因组 DNA 经 *Sau*3AI 的部分消化和蔗糖密度梯度离心后, 分离 0.5~2.0 kb 的 DNA 片段 (电泳结果如图 3, 4)。将适量的 0.5~2.0 kb 的顶头孢霉 DNA 片段分别连接到启动子捕获载体 pGBT14 的 *Bam*HI 位点上, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 获得大约 2,500 个具有氨苄青霉素抗性的克隆, 抽样检查表明, 94% 的克隆含有插入片段。

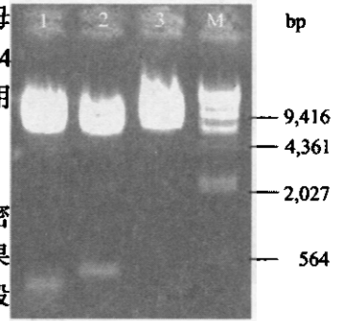


图2 质粒 pGBT14 的酶切鉴定
1 *Bam*HI + *Xba*I, 2 *Xba*I, 3 *Bam*HI, M Marker

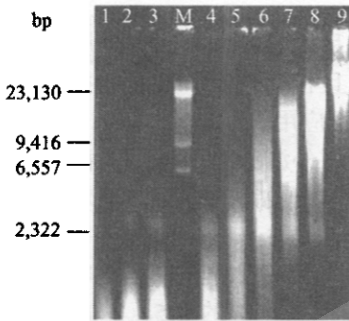


图3 顶头孢霉基因组 DNA 的 *Sau*3AI 的部分消化预电泳结果

M λ DNA/*Hind*III, 1~9 分别用 *Sau*3AI 消化 5 μ g 的顶头孢霉基因组 DNA 60 min 后的电泳结果, *Sau*3AI 的用量从 30U 开始从 1 到 9 分别进行倍比稀释

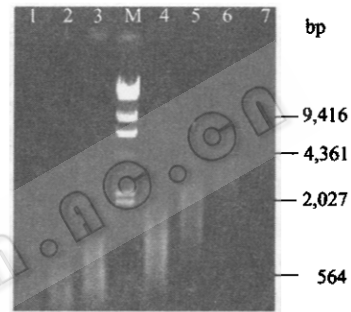


图4 蔗糖梯度离心制备顶头孢霉基因组 DNA 的 0.5~2.0 kb 的片段

M λ DNA/*Hind*III, 1~7 分别为顶头孢霉基因组 DNA 经 *Sau*3AI 消化后, 用 10%~40% 蔗糖梯度离心收集的样品, 每个样品取 50 μ L 进行分析

2.3 用启动子捕获载体 pGBT14 筛选具有启动子功能的顶头孢霉的 DNA 片段

扩大培养用 pGBT14 构建的顶头孢霉的 0.5~2.0 kb DNA 文库, 抽提质粒, 用于 Trp 营养缺陷型宿主 Y153 的转化, 5 次转化共获得 24 个稳定的转化子。由于质粒在啤酒酵母中的拷贝数过低, 无法进行电泳分析, 我们将从啤酒酵母转化子中提取的质粒转化到 DH5 α 扩增后^[4], 再用 *Xba*I 进行酶切, 电泳分析显示, 从 24 个转化子中分离获得的质粒中全部含有插入片段, 如图 5。

2.4 具有基因启动功能的 DNA 片段的分析

将从 1~24 号转化子中获得的质粒重新转化 Y153 后, 仍能得到在不含有色氨酸的完全极限培养基上生长的转化子。1~24 号转化子在 YPD 丰富培养基上生长 5 d 后, 菌落大小基本一致, 而在无色氨酸的完全极限培养基培养 5 d 后, 菌落大小各不相同, 其中形成菌落最大的 3 个转化子是 6 号、15 号和 19 号 (按图 5 中的质粒顺序命名)。上述结果具有很好的可重复性, 表明这些转化子在完全极限省却培养基上的菌落大小差异是由 *trp1* 基因表达的强弱引起的, 从 6 号、15 号和 19 号转化子中所获得的质粒中的插入片段可能具有较强的基因启动功能。

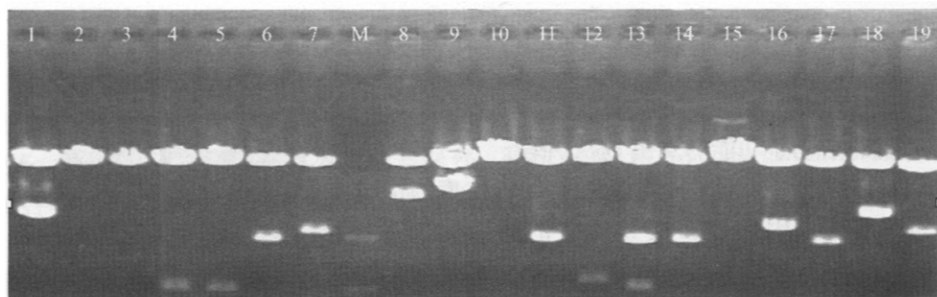


图5 部分 Y153 转化子质粒的 *Xba*I 酶切图谱

M Marker DL2000 (DNA 片段从大到小依次是2,000 bp, 1,000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100bp), 1~19 是用 *Xba*I 酶切的 1~19 号转化子中的质粒

3 讨论

利用启动子捕获载体进行真菌启动子筛选的常用的策略是构建直接用以转化的捕获质粒^[1, 2]。但是一般丝状真菌的转化率很低, 而且在转化后, 质粒的拯救 (rescue) 也较为困难, 因此限制了这种启动子筛选方法的广泛应用。

pGBT14 是酵母的自主复制型质粒, 利用该质粒将外源 DNA 片段导入酵母中, 其转化率远远高于其它丝状真菌的转化率; 另外, pGBT14 上的 *trp1* 基因“头对头”地紧密连锁, 中间插入的有基因启动功能的 DNA 片段可以从两个方向中的任何一个启动该基因的表达, 因此用 pGBT14 进行丝状真菌基因启动子的筛选比单向筛选更容易获得有基因启动功能的 DNA 片段。从我们用 pGBT14 构建的顶头孢霉的 0.5~2.0 kb 的染色体 DNA 文库中, 经过 5 次酵母的转化, 就富集到 24 个稳定的转化子, 从这些转化子回收的质粒全部含有插入片段, 插入片段的大小从 0.5~2.0 kb 不等 (图 5)。

基因启动功能分析显示, 在啤酒酵母中, 来自顶头孢霉的外源 DNA 片段具有不同的基因启动能力。由于它们来源于顶头孢霉染色体 DNA, 因此能够在啤酒酵母中启动 *Trp* 合成基因表达的 DNA 片段理论上也能够在其自身中启动外源基因的表达, 因此, 有望从中筛选到能够在顶头孢霉中启动外源基因表达的启动子。比如通过 PCR 方法将插入片段扩增出来, 再插入到抗性标记基因或者合适的报道基因的前面, 构建顶头孢霉的转化质粒, 通过转化顶头孢霉, 再分析插入片段启动基因的方向和强度。

在丝状真菌表达载体的构建时, 尤其是遗传背景不清楚的丝状真菌表达载体的构建, 获得尽可能多的具有启动功能的 DNA 片段对构建工作是非常有帮助的。用这种方法可以方便快捷地获得多个潜在的有基因启动功能的 DNA 片段, 由于这些 DNA 片段来自丝状真菌自身, 很有可能再从中筛选到具有较强启动功能的 DNA 片段, 用于该丝状真菌的转化系统的构建。

参考文献

- [1] Luo X. Gene, 1995, 163 (1): 127~131.
- [2] Weltring K M. Curr Genet, 1995, 28 (2): 190~196.
- [3] Aoki S, Kondo T, Ishiura M. J Microbiol Methods, 2002, 49 (3): 265~274.
- [4] DeModena J A, Gutiérrez S, Velasco J, et al. BioTechnology, 1993, 11: 926~929.
- [5] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] 胡又佳, 高 枫, 朱春宝, 等. 生物技术, 1998, 8 (5): 22~26.
- [7] Conder M J, Rambosck J A, Mcada P C, et al. Bioprocesses for preparing 7-ACA and 7-ADAC. US: 6017726, 2000-01-25.