

蔡金科 刘玉芳 张博润

(中国科学院微生物研究所,北京)

酵母菌做为真核微生物的代表已被广泛应用于分子遗传学研究。酵母菌除具备真核生物所共有的生物学特性外,它又是单核单细胞生物。因此凡是细菌分子遗传学研究所使用的技术。基本上都适用于酵母菌的分子遗传研究。酵母菌质粒的分子遗传学在最近几年取得了重大突破。酵母菌细胞正被做为真核生物的基因库,人们正试图把外源基因引入受体酵母菌细胞内,使之产生有价值的产物。

本文主要介绍酵母菌质粒遗传研究现状及酵母菌运载体的构成与应用。

酵母菌 2 μ m DNA 质粒的遗传研究

啤酒酵母遗传信息的载体,除了染色体 DNA 外,还有线粒体 DNA,质粒 DNA 和 RNA 等三个遗传系统。酵母菌质粒遗传的研究历史不长,若从 Sinclair^[1]等 1967 年发现酵母菌质粒算起,不过十几年。可是在短短的时间里,这方面的研究有很大进展。许多实验室证实了酵母菌质粒的存在,并证明它们能在细胞质中自主复制,对复制机理和运载体构成也作了较深入的研究。至今在啤酒酵母细胞中只发现一种 DNA 质粒因为它的长度在 2 μ m 左右,故称为酵母 2 μ m DNA 质粒。它可作为酵母菌运载体,为真核生物的基因工程提供了重要工具。

一、酵母菌质粒的结构

自 Clark-Walker^[2]将 2 μ m DNA 分子初步纯化,并证明它是一个闭环双链超螺旋结构的分子以来, Gubbins 等^[3]进一步纯化了这种 DNA 分子,发现这种质粒的浮力密度重于线粒体 DNA,而和细胞核 DNA 相同(1.701 克/厘米³)。最近 Livingston 等^[4]用电镜观察发现,啤酒酵母 2 μ m DNA 分子在细胞内聚集成染色小体样式。这种质粒的结构与长度,因所用菌株不同而略有差异。它的总长度为 5.97—6.23kb,相当于 1.9—2.1 微米,占细胞总 DNA 的 2—4%。它们的差异可能是由于 DNA 分子中小的缺失所引起的。该分子中有两个反向重复序列呈非对称性排列,经过变性和复性后,大部分分子呈现哑铃状结构。两个反向重复序列互补形成双链的茎,在其两端各有一个不等长的单链 DNA 环,大环叫 L 环,小环叫 S 环。如图 1 所示。

已知 EcoRI 酶对该质粒有两个切点,但用此酶切

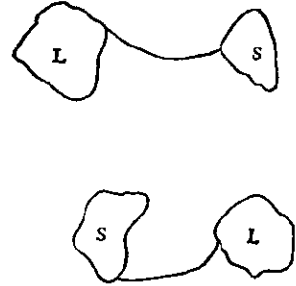


图 1 啤酒酵母 2 μ m DNA 质粒形态示意图

割一群 2 μ m DNA 分子时,用凝胶电泳测定,出现 4 条大小不同的 DNA 片段,电镜观察在 L 环上 EcoRI 切点的位置发生变化,故认为 2 μ m DNA 分子群体内存在两种不同的结构。这是由于两个反向重复序列间的重组而引起 L 环方向颠倒所形成的(见图 2)。这两种构型分别称为 L 型和 R 型。

应当指出,不是所有的啤酒酵母都含有质粒,有无各占一半。在意大利酵母 (*Saccharomyces italicus*) 和粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中也发现了闭环状 2 μ m DNA 质粒,在乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 中亦找到 DNA 质粒。不过是线形的。

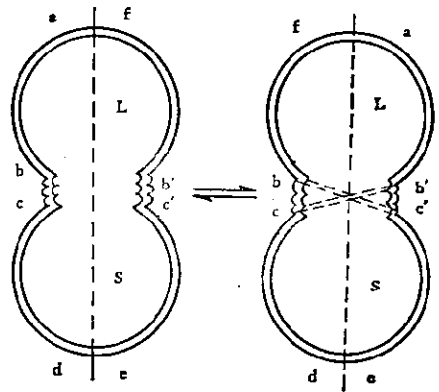


图 2 酵母 2 μ m DNA 质粒群体中的两种构型

二、酵母 2 μ m DNA 质粒的酶切图谱

2 μ m DNA 质粒的酶切图谱是根据不同的限制性内切酶在该质粒上不同切点之间的相关性及切点和重复序列的距离作出的。例如,要确定 EcoRI 切点与

重复序列的距离,就用 *EcoRI* 作用于该质粒,然后经过变性-复性。用电镜观察,会发现在这种 DNA 分子群体中有一些分子呈现一个双链茎的一端连接着一个单链环,而另一端的单链环则被限制酶切开形成不等长的二条线状单链分子。测量两条单链的长度,就可决定 *EcoRI* 在 $2\mu\text{m}$ DNA 分子上的切点位置。Cameron 等^[1]用对 $2\mu\text{m}$ DNA 分子有单切点的限制酶 *PstI* 切割质粒 *Scp1*,用电镜观察和用凝胶电泳检测 DNA 片

段的大小,确定了切点在 L 环上,并可确定在 L 环上的位置。

自然界中啤酒酵母 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒的结构,长度和酶切图谱等方面可能存在差异。但从已报道的实验结果看,酵母 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒都带有 3 个 *HindIII* 切点, 2 个 *HincII* 切点,一个 *PstI* 切点,而 *BamH*, *SalI* 与 *SatI* 则不能切开此质粒,综合上述材料,可绘出啤酒酵母 $2\mu\text{m}$ 质粒的酶切图谱如图 3。

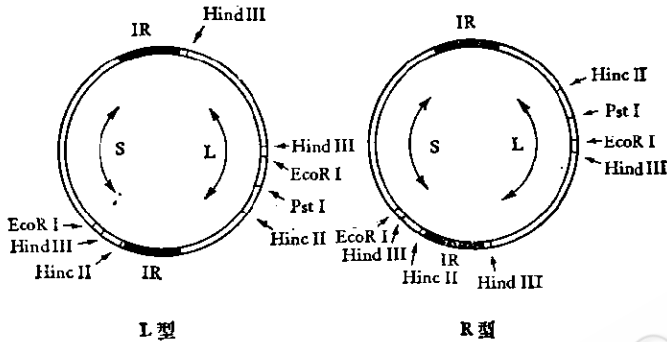


图 3 啤酒酵母 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒的酶切图谱

三、酵母 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒的复制

各种真核生物染色体 DNA 的复制是严格按照特定的时间顺序进行的,否则可能会引起细胞代谢紊乱而死亡。多拷贝的线粒体 DNA 分子复制不同于染色体 DNA,它的复制次数,在每个细胞周期内为一次以上。多拷贝的质粒又是如何复制呢?这方面的研究开始不久,现将已知结果概述如下。

(一) 复制的遗传控制

已知多拷贝的核外 DNA,如酵母菌线粒体 DNA 和单拷贝的核 DNA 复制不同。前者的群体里有些分子在一次细胞周期中复制一次以上,还有些分子则完全不复制。至于分子群体中某一分子复制的机会,则纯属随机事件。

啤酒酵母细胞内含有 50—100 个拷贝的 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒。将带有这种质粒的不同 *cdc* 缺陷菌株置于限制温度条件下, *cdc 4*、*7*、*28* 菌株的质粒复制受到阻遏,其它一些 *cdc* 缺陷中质粒照常进行复制^[2]。已知这些 *cdc* 基因 *28*、*4*、*7* 控制着染色体复制起始。所以 Zakian 等^[3]根据每个 $2\mu\text{m}$ DNA 分子复制只限于细胞周期中的 S 期和在每一细胞周期只复制一次等事实,认为这种质粒的复制是和染色体 DNA 复制起始所受到的遗传控制相同的。

(二) 在细胞周期中复制的时间

用检查同步细胞中 DNA 复制的方法,直接测定细

胞周期中 $2\mu\text{m}$ DNA 合成的时间。发现在 S 期出现双倍的 $2\mu\text{m}$ DNA。这说明该质粒按半保留机制复制。

(三) 复制的起始点

Broach 等人^[4]把酵母质粒经内切酶切割之后,然后将不同 DNA 片段插入 *pBR322-LEU2* 杂种质粒中,所构成的新杂种质粒用来转化酵母受体菌细胞 (*Leu 2⁻*),发现转化体中只有含 L 环 DNA 片段上某一区域的片段,才具有复制能力。

(四) 体外复制

Jazwinski 等^[5]用新鲜的酵母细胞提取液,一些必要的小分子辅助因子和前体物加在一起,用 $2\mu\text{m}$ DNA 分子作样板。研究体外复制,证明该质粒确能在体外复制。

不同种的酵母细胞提取物催化质粒复制的速度不同。培养在限制温度下的 *cdc7* 和 *cdc8* 菌株则无此能力。又一次证明 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒复制受到和核 DNA 复制起始一样的遗传控制。

四、酵母 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒的功能

Slonimski 实验室曾证明对寡霉素抗性与此质粒有关。后又证明此质粒带有对杀黑星菌素和 triethyltin 的抗性因子^[10]。但这些发现尚待进一步证实。

Hollenberg 等^[11]把 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒导入大肠杆菌的微细胞内,测定该质粒的功能,发现它可为一些生物学意义尚不明的多肽编码。这说明这种质粒是有功

能。后来他们^[11]分析了该质粒经 EcoRI 与 Hind III 酶切后的 DNA 片段,提出了不同 DNA 片段为这些多肽编码的证据。2 μ m DNA 分子的酶切片段在大肠杆菌微细胞中的功能表达,必是借助于大肠杆菌 RNA 多聚酶转录。因而他们又进一步研究了大肠杆菌 RNA 多聚酶在2 μ m DNA 上的结合部位与 DNA 功能区域的启动子间的相关性。发现酵母菌 HQ/5 菌株的2 μ m DNA 质粒上有 5 个结合位点,HI 菌株有 6 个结合位点。而后一菌株质粒的 5 个位点与前一菌株的 5 个相同,另一个位于一个重复序列之中。这表明 HI 菌株的质粒之两个重复序列间,在 RNA 多聚酶识别序列方面存在着差异。

Broach 等^[12]证明,把含复制区的2 μ m DNA 质粒片段的杂种质粒引入带 2 μ m DNA 质粒的细胞(Cir⁺)中,能正常复制。若把此质粒导入不含质粒的受体细胞(Cir⁻)时,杂种细胞中就不再复制。若在 Cir⁻细胞内导入了 2 μ m DNA 质粒,被导入的 2 μ m DNA 片段又开始复制。这说明原有的 2 μ m DNA 分子所表达的某些功能为促进引入的片段复制所必不可少。同时,带有 2 μ m DNA 复制起始点的片段的杂种,才能提高转化频度。

五、酵母 2 μ m DNA 质粒的遗传分析

此质粒被认为是非染色体遗传物质,因为当把 Cir⁺ 和 Cir⁻ 细胞交配形成杂合二倍体时,呈现细胞质遗传因子的分离现象。即杂种细胞后代都含有质粒(4Cir⁺:0Cir⁻)。这个杂合二倍体在无性繁殖过程中不会出现有丝分离。这一点和线粒体基因在合子形成的最初几个芽细胞会出现有丝分离不同。当杂合二倍体进行减数分裂时,所有分析过的单孢菌株都含有 2 μ m DNA 分子。若把两类构型的 2 μ m DNA 质粒细胞杂交,则二倍体细胞中含有这两类质粒。

六、酵母菌 2 μ m 质粒在酵母菌分子遗传学研究中的应用

2 μ m DNA 分子不带有选择性标记,用作载体时要进一步改造。用大肠杆菌 ColE1 质粒或它的衍生质粒,如 pBR322, pMB, 等作外源基因的载体转化酵母菌获得成功,但频度很低,而且外源基因被整合到寄主基因组中,所得拷贝不多。为克服这个缺点,最好的方法是把酵母菌 2 μ m DNA 分子插到杂种质粒上构成新的载体,这样转化频度就大为提高。杂种质粒上的外源基因在核外自主复制,并且基因拷贝数也大大增加。该基因所编码的酶活性也有所提高^[13]。

最近 Kiclland-Brandt^[13]等人用酵母菌 2 μ m DNA 质粒作为外源基因的载体转化酵母已获成功,但转化频度太低,转化体不太稳定。

目前正在用酵母菌作为真核生物的基因库进行大

量研究。

酵母菌运载体的构成与应用

酵母菌分子遗传学中经常遇到的,也是最关键的问题之一是外源基因的运载系统。它关系到转化实验成败。转化系统(载体与受体)的研究是酵母菌分子遗传学研究中的主要课题。它将为酵母菌基因工程提供优良的转化系统。我们要创造更有效的载体,首先要了解构成各类载体的原则和现有载体的优缺点,以资借鉴。

一、酵母菌运载体的构成原则

酵母菌 2 μ m DNA 质粒不带选择标记,故不宜直接用作外源基因的载体。有人就设想用大肠杆菌的质粒或噬菌体作为酵母菌基因的载体,用它来转化大肠杆菌的相应营养缺陷株。根据互补原理,出现原养型菌株即可初步证明载体携带的特定外源基因已在大肠杆菌中无性繁殖。实验证明,某些酵母菌基因可以在细菌中表达其功能。

Ratzkin 等^[14]和 Struhl 等^[15]设计载体的原则是首先将酵母核 DNA 切成小片段,随机将这些小片段插入带抗药性标记质粒和噬菌体中,构成杂种 DNA。然后用这种杂种 DNA 转化大肠杆菌某种营养缺陷株细胞,根据抗药性及出现的原养型菌落,即可选出带有特定基因的无性繁殖系。但营养缺陷型菌株回复的原因是多种多样的,仅靠原养型的出现尚不足以确定它是由于外源 DNA 片段编码的酶与细菌营养缺陷型菌株互补所引起的。要确定该细菌的酶是由导入的酵母菌 DNA 片段编码,最简单的方法是将原养型的质粒 DNA 再转化相同的酵母菌营养缺陷型,若得到原养型转化体,就可确定^[16]。

要研究真核生物整个基因组的结构与功能,首先要使全部基因无性繁殖。这就需要满足三个条件:(1)最好用流体动力剪切法将真核生物 DNA 随机切成小片段,再用聚(dA·T)接尾,把这些片段与细菌质粒连接。这样可使全部基因组中的基因无性繁殖。若用限制酶切割,则由于每条染色体末端不带粘接末端,不能与质粒连接;(2)无性繁殖的方法要保证转化体里无性繁殖的 DNA 能代表所研究的生物的完整的基因组;(3)快速简便的检测重组 DNA 质粒和细菌突变体互补作用。

在满足上述条件的情况下,Carbon 等^[17]根据下述公式计算足以代表 90-99% 基因组的转化体菌落数(n):

$$P = 1(1 - f)^n \text{ 或 } n = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

其中 P 为概率, f 为核 DNA 被切割成片段的长短 (dalton)。

从表 1 可见,随机切割成 1×10^7 dalton 的酵母菌

表1 各类生物代表在不同概率水平下基因组所需要的转化体菌落数

DNA 来源	DNA 片段平均长度 (dalton)	菌落数目		
		$P=0.90$	$P=0.95$	$P=0.99$
大肠杆菌	8.5×10^4	720	940	1440
酵母菌	1×10^7	2300	3000	4600
果蝇	1×10^7	23000	30000	46000

DNA 片段, 只要挑出 4600 个转化体, 就足以表示 99% 的酵母菌基因组已被无性繁殖化。

二、酵母菌的转化

Oppenoorth 首次在 1959 年报道了酵母菌的转化

研究, 但未被后人重复证实。1962 年他又发表了这方面的工作。直到 1974 年 Khan 等发表不同种属间酵母菌转化成功的材料、酵母菌的转化实验才逐渐为科学工作者重视。Hinnen 等^[16]的工作才在分子水平上证实了外源 DNA 变为酵母基因组的一部分。

三、酵母菌运载体的构成和外源基因的无性繁殖

实验已经证实, 大肠杆菌质粒和酵母菌核 DNA 片段所构成的重组 DNA 能转化啤酒酵母。还表明外源基因的运载体结构与其转化频度有密切关系。可以讲, 现在已有可能将酵母菌整个基因组进行无性繁殖。

目前酵母分子生物学研究中经常使用的运载体, 按其结构与转化频度, 可分为三大类。

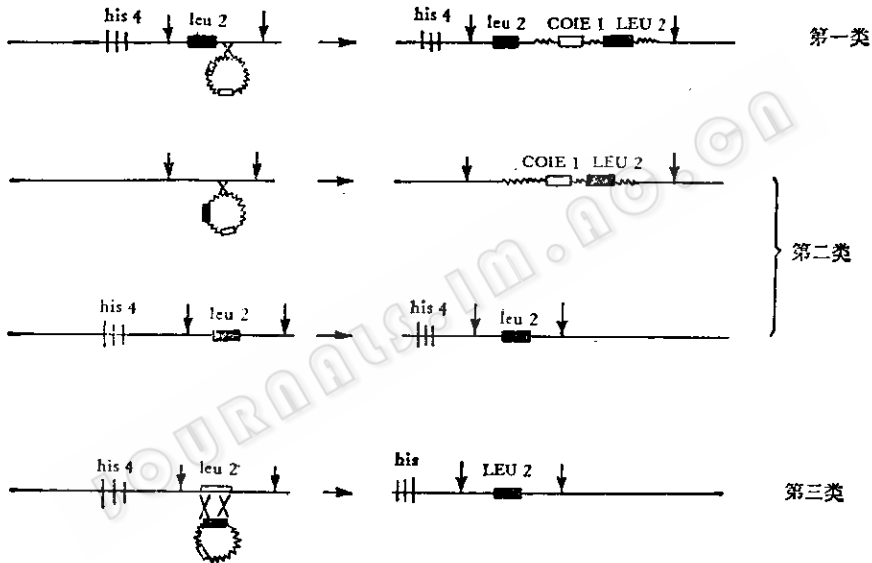


图4 第一类转化体的外源 DNA 片段整合到酵母基因组中的示意图

第一类: *Pycleu 10* 质粒被整合到第 III 染色体的 *leu 2* 区域附近。

第二类: *Pycleu 10* 质粒被整合到其它染色体上, 第 III 染色体结构未变。

第三类: *Pycleu 10* 质粒中 *leu 2* DNA 和 *leu 2* 位点发生同源重组。

第一类是由 Ratzkin 等^[14]构成的, 如 Hinnen^[16]所使用的 *Pycleu 10* 运载体即属此类。这类运载体转化酵母菌营养缺陷型菌株的频度很低, 为 1×10^{-7} 。但低频度转化主要由于同源重组引起, 这类转化体是比较稳定的。其转化机理如图 4 所示。

Szostack 等^[17]基于酵母基因组中有 100—140 个 rDNA 重复序列, 认为把 rDNA 基因插入上述运载体, 会使同源重组的机率增加。实验表明, 将 rDNA 重复序列的二半分别插入此质体, 转化频度分别提高 100—200 倍和 1 万倍, 前一类转化体很稳定, 后一类不稳定。

第二类运载体转化相应的酵母菌营养缺陷型的转化频度非常高。如 Beggs^[12]所使用的即属此类。他将

一部分或整个 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒插入 *pMB9* 质粒中, 再将酵母菌的核 DNA 片段 (*LEU 2* 基因片段) 插入其中, 构成了 *pJDB219* 质粒。用它来转化酵母 *leu 2* 突变体为 *LEU⁺* 转化体的频度为 10^4 — 10^5 转化体/微克 DNA。

Gerbaud 等^[19]用大肠杆菌的 *pCR1* 质粒和部分的或完整的 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒构成杂种, 把带有酵母菌 *URA 3* 基因的 DNA 片段插入其中, 构成的杂种可高频度转化酵母菌 *URA 3* 突变体。转化体里 *URA 3* 编码的乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶的活性比野生型提高 10—30 倍, 这为遗传育种提供了一条新途径。但这些转化体不稳定。最近 Blanc 等^[20]选用不带 $2\mu\text{m}$ DNA 质粒的酵母细胞为受体, 使转化体在无性繁殖条件下,

甚至在非选择性培养基中也是极其稳定的,并且质粒重组的机会也甚少。

第三类运载体的结构不同于上述两类,是由细菌质粒与酵母 *trp1* 基因片段(可能带有染色体着丝粒)所构成。它转化酵母菌 *trp1* 突变体的频度也很高。Struhl 等^[13]报道的 YRp7 即属此类。它转化酵母菌 *trp1* 突变体频度为 500—2000 转化体/微克 DNA。它是一个理想的运载体,它之所以能高频度地转化酵母菌,是由于其中存在着 1.4kb 的染色体 DNA 片段。他们发现 YRp7 质粒在细胞中的行为很象是一个新生的酵母菌小染色体(minichromosome)。

以上三类载体的主要组分是带抗性标记的大肠杆菌 ColE1 质粒或它的衍生质粒,插入酵母菌质粒和核

DNA 片段所构成。进一步利用载体中的核 DNA 所编制的酶能与受体营养缺陷株互补,就可选出有特定基因的无性繁殖系。若不能利用互补作用选出基因时,有时可用交错杂交筛选法(Overlap hybridization screening)来分离。或者从基因库中用 mRNA(或 tRNA)为探针进行 DNA-RNA 杂交选出所需要的基因无性繁殖系。如 rDNA 即可用此法选出。

由于上述三类运载体都要先经过大肠杆菌营养缺陷型菌株的回复,选出特定的基因无性繁殖系,再进一步转化相应的酵母菌营养缺陷型,加以验证,手续繁多。因此有人用酵母菌质粒作为外源基因的运载体,直接转化酵母细胞,并已取得成功^[14]。此法缺点是转化频度低,尚待进一步改善。

表 2 酵母菌运载体的特性

运载体	大小(kb)	表型	无性繁殖的位点	来源
YIP1*	9.8	Amp His3	EcoRI SalI XhoI	斯坦福大学
YEP2	10.4	Tet	PstI BamHI SalI	斯坦福大学
YEP4	10.4	Tet	PstI BamHI SalI	斯坦福大学
YIP5	5.5	Amp Tet ura3	EcoRI BamHI SalI HindIII SmaI	斯坦福大学
YEP6	7.9	Amp His3	EcoRI XhoI SalI	斯坦福大学
YRP7	5.7	Amp Tet <i>trp1</i>	BamHI SalI	斯坦福大学
YEP20	10.4	Amp Leu2	BamHI SalI PstI	CSH
YEP21	8.8	Amp Leu2	BamHI SalI	CSH
YEP24	7.6	Amp Ura3	BamHI SmaI SalI	university of strasbourg
YIF25	11.9	Tet His4	BamHI HindIII	cornell university
YIP26	7.8	Amp Leu2 Ura3	BamHI SalI SmaI	MIT
YIP27	7.8	Amp Leu2 Ura3	BamHI SalI SmaI	MIT
YIP28	7.8	Amp Leu2 Ura3	BamHI SalI SmaI	MIT
YIP29	7.8	Amp Leu2 Ura3	BamHI SalI SmaI	MIT
YIP30	5.5	Amp Ura3	EcoRI BamHI SalI SmaI	MIT
YIP31	5.5	Amp [Tet] ^b Ura3	EcoRI BamHI SalI SmaI	MIT
YIP32	6.7	Amp Leu2	BamHI SalI PstI HindIII	MIT
YIP33	6.7	Amp Leu2	BamHI SalI PstI HindIII	MIT

* YIP 是指酵母菌整合质粒 (Yeast Integrating Plasmid);
YEP 是指酵母菌附加体质粒 (Yeast Episomal Plasmid);
YRP 是指酵母菌复制质粒 (Yeast Replicating Plasmid)。

已发表的酵母菌运载体分别列于表 2。

酵母菌质粒遗传的研究,重要性是很明显的,它是除大肠杆菌体系外,一个真核生物基因遗传工程的新体系。利用酵母质粒构成运载体,转化酵母细胞,可以研究外源基因在真核细胞中的表达。也可作为选种的手段。我国这方面的研究工作开展不久,希望予以重视。

参 考 文 献

[1] Sinclair, J. H., B. J. Stevens, P. Sanghavi et al.; *Science*, 156: 1234—1237, 1967.

[2] Clark-Walker, G. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 388—392, 1972.
[3] Gubbins, E. J. C. S. Newion, M. D. Kuhn et al.: *Gene*, 1: 185—207, 1977.
[4] Livingston, D. H. and S. Haken: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3727—3731, 1979.
[5] Cameron, J. R., P. Philippsen and R. W. Davis: *Nucl. Acid Res.*, 4: 1429—1448, 1977.
[6] Livingston, D. M. and D. M. Kupfer: *J. Mol. Biol.*, 116: 249—260, 1978.
[7] Zakian, V. A., J. B. Brewer and W. L. Fangman: *Cell*, 17: 923—934, 1979.
[8] Broach, J. B., J. N. Strathern and J. B. Jicks: *The Molecular Biology and Genetics of Yeast*,

- OSH, New York, 1979, p. 82.
- [9] Jazwinski, S. M. and C. M. Edelman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1223—1227, 1979.
- [10] Hollenberg, C. P.: *Molec. Gen. Genet.*, **162**: 23—24, 1978.
- [11] Hollenberg, C. P., B. Kustermann-Kuhn and H. D. Royer: *Gene*, **1**: 33—47, 1976.
- [12] Beggs, J. D.: *Nature*, **257**: 104—109, 1978.
- [13] Kielland-Brandt, M. C., T. N. Tillgren, S. Holmberg et al.: *Carlsberg Res. Commun.*, **44**: 77—87, 1979.
- [14] Ratzkin, B. and J. Carbon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 487—491, 1977.
- [15] Struhl, K., Cameron, J. R. and R. W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1471—1475, 1976.
- [16] Hinnen, A. J. B. Hicks and G. R. Fink: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 1929—1933, 1978.
- [17] Carbon, J., L. Clarke, C. Ilgen et al.: *Recombinant molecules: Impaction Science and Society*, (ed. by Beers, R. F. et al.), Raven Press, New York, 1977, pp. 355—378.
- [18] Szostak, J. W. and R. Wu: *Plasmid*, **2**: 536—554, 1979.
- [19] Gerbaud, C., P. Fournier, H. Blanc et al.: *Gene*, **5**: 233—253, 1979.
- [20] Blanc, H., C. Gerbaud, P. P. Slonimski et al.: *Molec. Gen. Genet.*, **176**: 335—342, 1979.