通过同源重组构建酿酒酵母新型表达质粒*

陈向岭 袁汉英 何 炜 胡翔华 吕 红 李育阳**

(复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要 利用同源重组的方法, 构建了具有高拷贝数和高稳定性的新型酿酒酵母表达质粒. 对酵母附加体型载体 pHC11 进行一系列改造, 得到质粒 pHC11R, 并用适当的酶切线性化; 利用 PCR 反应得到人 IFNα2b 表达单元片段, 它的两端和线性化的 pHC11R 的两端具有 50 bp 左右的同源区段. 上述两个片段共转化酿酒酵母, 在酵母体内经同源重组后得到表达质粒 pHC11R-IFNα2b, 该表达质粒与 pHC11-IFNα2b 相比去除了质粒上用于在大肠杆菌中复制和筛选所需的序列, 在宿主菌中的稳定性和拷贝数均有明显提高, 同时外源基因的表达量也获得了一定程度的提高. 在此基础上, 进一步构建了带有不同表达元件的 pHR 系列载体, 使得外源基因能够通过同源重组在酿酒酵母中快速、方便地克隆和表达.

关键词 同源重组 酿酒酵母 表达质粒

酿酒酵母基因工程表达质粒在酵母宿主细胞中的稳定性和拷贝数是影响外源基因表达水平的重要因素[1]. 酿酒酵母附加体型载体由于有天然的酵母2μ质粒的部分或全部序列, 使得其稳定性优于自主复制型载体, 拷贝数也高于整合型载体[2,3], 因此已被广泛用于构建基因工程表达质粒. pHC11 是本实验室先期构建的一种附加体型载体[4], 由于它包括了完整的 2μ质粒序列, 并且在构建时未破坏 2μ质粒的功能区域, 因而具有相当高的稳定性和拷贝数. 本实验室已利用该质粒高效表达了多个外源蛋白[4,5], 以 pHC11 为基础的人α干扰素表达质粒已被用来构建工业化生产用的基因工程菌. 但是, 我们发现当pHC11插入人α干扰素基因表达单元后, 形成的表达质粒在酵母细胞中的拷贝数和稳定性均有较大幅度的下降. 找出表达质粒在酵母细胞中拷贝数和稳定性下降的原因, 掌握酵母质粒在细胞中的复制和分配的规律, 可望进一步提高工程菌外源基因的表达水平.

酿酒酵母用于食品和药物生产已有悠久的历史, 基因工程技术的出现又为酿酒酵母生产食品和药物提供了新的途径. 通过酵母制造的食品通常不经过精细纯化, 使基因工程表达质粒上来源于细菌的抗药性基因给工程食品带来了安全性隐患, 创建一种

2004-03-15 收稿, 2004-10-21 收修改稿
* 国家高技术研究发展计划资助项目(批准号: 863-102-11-02-02)
** 联系人, E-mail: liyuy@online.sh.cn

方法构建不含抗药性标记的酵母表达质粒很有必要.

酿酒酵母一直都被认为是研究同源重组的模式生物, 因为在酿酒酵母中, 存在高效的同源重组修复双链DNA断裂(DSB)机制[6~9]. 一些系统性的实验研究表明 15 bp长的同源区段就有可能取得重组克隆[10], 当同源区段为 30 bp长时, 有效同源重组的频率可接近 80%[11,12]. 这种克隆方法与传统方法相比由于不依赖于限制性核酸酶的识别位点, 因此重组位点精确, 不会引入多余的序列. 另外, 由于这种方法可以使表达质粒的构建和转化在一步操作中同时完成, 因此步骤比较简单[13~17]. 同源重组技术已广泛地被应用于各种遗传操作, 其中包括: 外源DNA片段在染色体的定点整合[18]、染色体基因的中断或置换[19,20]、基因文库的构建[21]和进行定点突变[22,23]等. 本文报道了我们通过体内同源重组构建不含抗药性标记等细菌质粒序列的酿酒酵母新型表达质粒, 以及对这些表达质粒在细胞中的稳定性、拷贝数和外源基因的表达特性的研究结果.

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α为构建和扩增质粒DNA的受体菌, 酵母宿主菌为*Saccharomyces cerevisiae* DCO4 (cir^0, *MATα*, *leu2*, *ade1*). 质粒pHC11(12.5kb、*Ap*^{r}, fl ori, *LEU2*, 2μplasmid)为本实验室构建. pHC11-IFNα2b(具有 3.2 kb h-IFNα2b基因表达单元)分泌表达质粒为本实验室构建. 各种工具酶均为日本TaKaRa公司或美国Promega公司产品. 寡核苷酸由上海博亚生物技术公司合成. 酵母完全培养基YEPD为每 100 mL含酵母浸膏 1 g, 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 2 g. 酵母选择性培养基 SD-Leu为每 100 mL含葡萄糖 2 g, 酵母氮基 0.67 g, 腺嘌呤 4 mg. 发酵培养基为每 100 mL含腺嘌呤 4 mg的YEPD.

1.2 方法

(1) 构建表达载体: DNA的酶切, 片段分离、末端补平、连接, 大肠杆菌转化等操作, 均按文献[24]中方法进行; 质粒DNA的抽提及DNA片段的回收按博彩公司试剂盒说明操作.

(2) 酿酒酵母的转化: 按Gietz等人[25]的醋酸锂化学转化方法进行.

(3) 重组质粒中人 IFNα2b 基因片段的 PCR 扩增和序列分析: 将重组转化子在 3 mL SD-Leu 液体中30℃培养16~18 h, 抽提酵母质粒, 并以之为模板, 扩增出的 INFα2b 基因片段克隆在 T 载体(TaKaRa 公司 pMD18-T vector)上, 送上海博亚生物技术公司测序, 以验证重组质粒基因片段的正确性.

(4) 重组质粒在酵母中的稳定性分析: 按文献[4]进行.

(5) 酵母质粒DNA和总DNA抽提: 按文献[26]进行.

(6) 实时定量PCR检测质粒拷贝数: 抽提含有质粒的酵母菌株的总 DNA, 测定其中 *TRP1* 基因的浓度及外源的 INFα2b 基因的浓度, *TRP1* 基因仅在基因组中, 且为单拷贝, 而每个质粒上有一个拷贝的 INFα2b 基因, 因此 INFα2b 基因与 *TRP1* 基因的浓度的比值, 可以代表每个细胞中质粒的拷贝数. 实时定量 PCR 的引物序列为: INFα2b 正向引物 5′-CCTCAAACCCACAGCCTGGGTAG-3′, INFα2b 反向引物 5′-CCCCACCCCCTGTATCACACAGG-3′ *TRP1* 正向引物 5′-GGTGACTATTGAGCACGTG-AGTATACGT-3′, *TRP1* 反向引物 5′-CAAGTATTT-CGGAGTGCCTGAACTATT-3′.

定量 PCR 反应采用 SYBR Green PCR 试剂(FINNZYMES F400S), 在 Correbt 定量 PCR 仪(Rotor-Gene 3000)上进行 PCR 反应, 反应条件如下: 50.0℃, 2 min, 95.0℃, 10 min (1 个循环) ; 94.0℃, 10 s, 62.0℃, 20 s, 72.0℃, 30 s (30 个循环) , 反应结束后, 使用 Rotor-Gene 5.0.47 软件分析 PCR 过程中各检测样本的 Ct 值, 并通过标准曲线计算出各检测样本中待测 DNA 序列的浓度.

(7) 发酵表达及产物检测: 将转化菌株接种到已灭菌的 3 mL SD-Leu 中, 30℃振荡培养 16 h. 再将 1 mL 菌液转接到 25 mL 发酵培养基中, 30℃振荡培养 72 h. 取发酵上清液, 过 Sephadex G25 柱, 后加入上样缓冲液, 沸水煮 3 min, 取适量进行 SDS-PAGE 电泳检测.

2　结果

2.1　载体 pHC11R 的构建(图 1)

载体质粒pHC11 具有酵母 2μ质粒全序列和来自质粒pEMBL Yi27 大肠杆菌复制起始点、抗药性筛选标记(ori, Ap^r). 在pHC11 的*Sal*Ⅰ位点插入来自质粒YEP13 的 2.2 kb *LEU2* 基因片段, 并筛选出*LEU2*基因片段的插入方向, 得到如图 1 所示的载体pHC11R. 该质粒经*Bgl*Ⅰ和*Sal*Ⅰ酶切后, 可分离获得包含 2μ质粒全序列和酵母营养缺陷型筛选标记*LEU2*, 而去除了包括抗药性标记*Ap*^{r}在内的细菌质粒序列的DNA片段(8.7 kb), 该片段即可用于重组转化.

2.2　人 IFNα2b 表达单元的 PCR 扩增

根据pHC11 和基因表达单元序列合成引物, 正向引物序列如下: 5′-CGAAGAGGCCCGCACCGAT-CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC*GGATCCACAGGACGGGTGTGGTCG*-3′(下划线部分为载体片段*Bgl*Ⅰ端同源的部分(44 nts), 斜体部分为P_{PGK1} 5′端序列(24nts)); 反向引物序列如下: 5′-AAAGTTCCC-TCAAGAATTTTACTCTGTCAGAAACGGCCTTAACGACGTAG*CCGTGTGGAAGAACGATTACAACAGG*-3′(下划线部分为载体片段*Sal*Ⅰ端同源的部分(50 nts), 斜体部分为T_{ADH1}3′ 端序列(26 nts)).

以 pHC11-IFNα2b 质粒 DNA 为 PCR 模板, 通过 PCR 反应, 获得两端各带有与线性化载体片段两端约 50 bp 同源序列的人 IFNα2b 表达单元片段(3.0 kb)(图 2).

2.3　酵母转化与载体的体内重组

将线性化的载体片段 pHC11R(*Bgl*Ⅰ-*Sal*Ⅰ)和PCR 扩增获得的目的基因表达单元片段同时共转化入酿酒酵母DCO4中, 两片段借助两端的同源序列在酵母体内通过同源重组环化, 形成一个新的表达质粒 pHC11R-IFNα2b(11.6 kb)(图 1). 它与原有的pHC11- IFNα2b(15.4 kb)相比, 去除了载体中包括抗药性标记在内的细菌质粒部分, 载体明显变小.

转化实验中, 载体片段用量为 1 μg, 载体片段与PCR片段的摩尔质量比为 1∶6[17]. 随机挑选 6 个转化子对它们进行表达单元存在情况分析, 转化子抽提酵母质粒, PCR检测, 全部都能扩增出 3.0 kb的表达单元片段(结果未出示), 说明各转化子均有干扰素基因表达单元的插入.

2.4　表达质粒中人α2b 干扰素基因序列分析

为了对表达质粒中人α2b干扰素基因序列进行分析, 我们先制备了重组转化子DCO4/pHC11R-IFNα2b 1#~5#的总DNA, 以人α2b干扰素基因两端序列合成PCR引物, 将PCR产物插入T载体, 然后进行了序列分析, 结果发现其中 2#, 3#, 5#重组转化子中的人α2b干扰素基因序列完全正确, 而 1#, 4#的则在不同碱基位置上分别有一个错误碱基引入. 为排除此次PCR引入错误的可能性, 对 1#, 4# 转化子再次进行PCR, 产物克隆至T载体后各挑选一个转化子进行测序, 结果与第一次相同. 说明 1#, 4#重组转化子人α2b干扰素基因中的碱基错误是在对表达单元进行PCR的过程中引入的.

2.5　人 IFNα2b 在酵母中的分泌表达

将经鉴定序列为正确的DCO4/pHC11R-IFNα2b及对照的DCO4/pHC11-IFNα2b各 2 个转化子菌株, 在完全培养基YEPD中培养 72 h, 使得菌体密度达到A_{600}为 18 左右. 取发酵上清液进行SDS-PAGE电泳, 结果如图 3 所示. 经电泳图谱扫描分析可知: 在相同条件下, 借助同源重组建成的工程菌DCO4/pHC11R-IFNα2b的表达量约为用于生产的原工程菌DCO4/pHC11-IFNα2b表达量的 1.9 倍, 达到约 80 mg/L.

2.6　质粒稳定性测定结果

在 50 世代时, DCO4/pHC11R-IFNα2b 平均保留质粒的比例约为 45%, 高于原工程菌 DCO4/pHC11-IFNα2b 的 10%(图 4), 表明改造后表达质粒在宿主菌中的稳定性有了明显提高.

2.7　质粒拷贝数测定结果

根据实时定量 PCR 测定的结果(表 1), pHC11R-IFNα2b 在宿主菌中的拷贝数比改造前的 pHC11-IFNα2b 提高了约 3 倍.

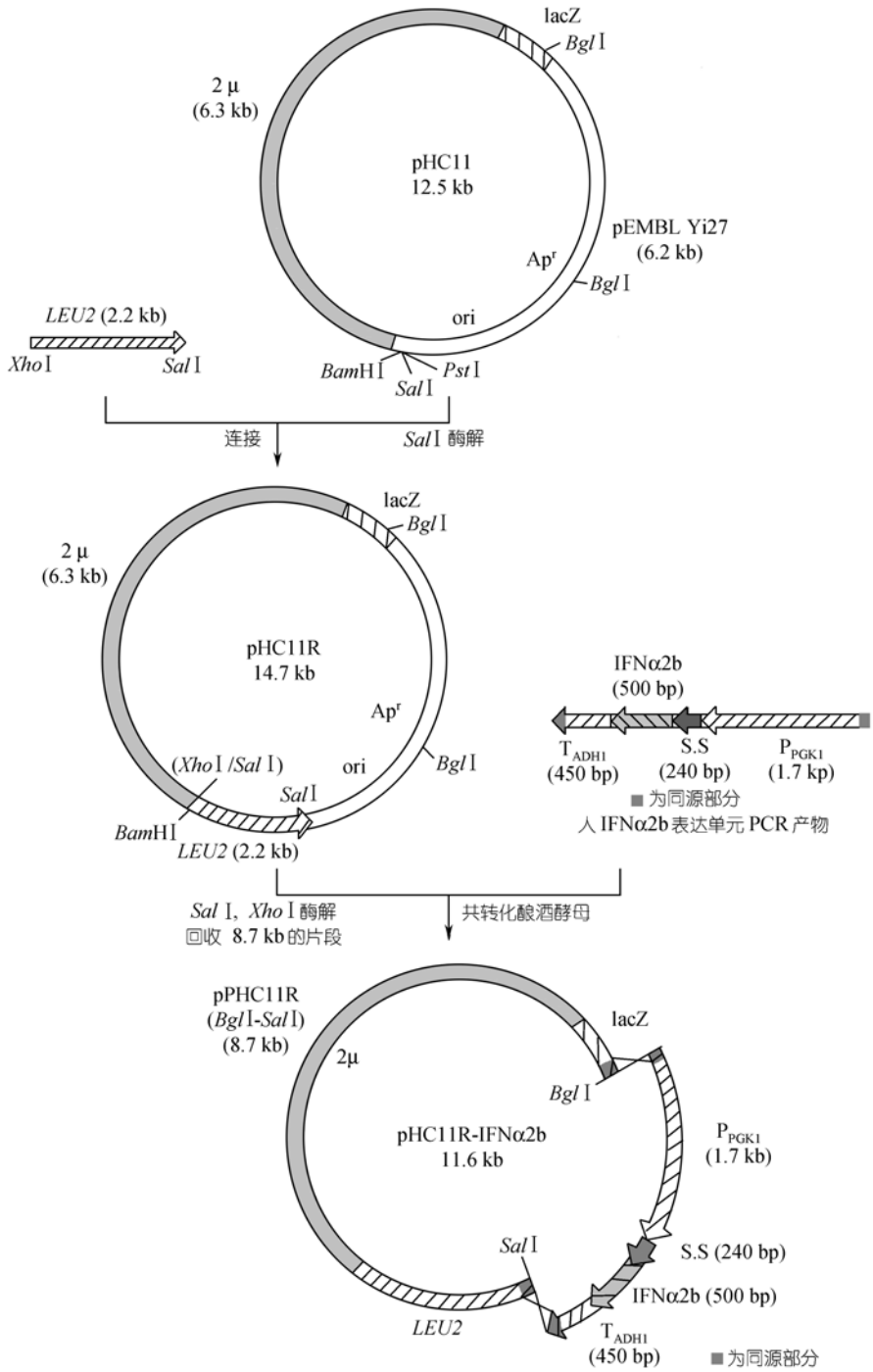

图 1 pHC11R 的构建与 pHC11R-IFNα2b 的体内重组示意图

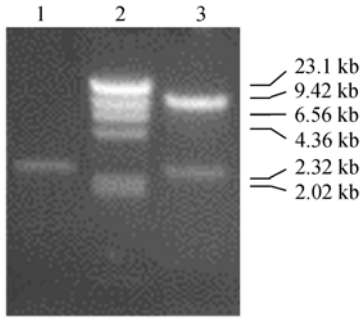

图 2　人 IFNα2b 表达单元 PCR 的电泳鉴定

1 示人 IFNα2b 表达单元 PCR 产物; 2 示*λ-Hin*dβ DNA 分子量标准; 3 示 pHC11-IFNα2b 的 *Bam*H Ⅰ酶切电泳图, 小条带即为人 IFNα2b 表达单元

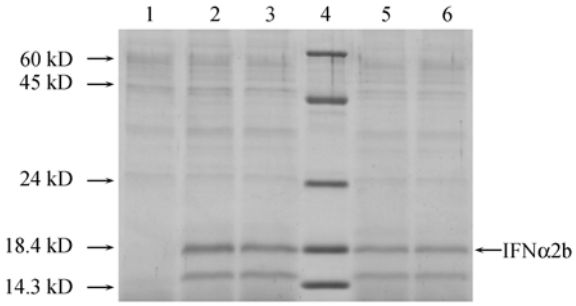

图 3　SDS-PAGE 检测人 IFNα2b 的表达

1 示 DCO4 受体菌对照; 2 和 3 示 DCO4/pHC11R-IFNα2b; 4 示蛋白质分子质量标准; 5 和 6 示 DCO4/pHC11-IFNα2b

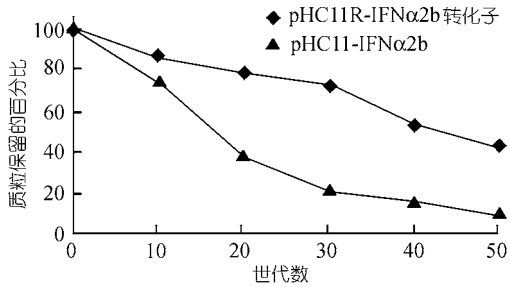

图 4　pHC11R-IFNα2b, pHC11-IFNα2b 在 DCO4 中的质粒稳定性

各点的值为多次试验的平均值

表 1　实时定量 PCR 测定质粒拷贝数结果

表达质粒	pHC11R-IFNα2b		pHC11-IFNα2b	
转化子编号	2#	3#	1#	2#
TRP1 copies • uL^{-1}	2.84×10^{6}	2.21×10^{6}	5.39×10^{6}	2.67×10^{6}
IFNα2b copies • uL^{-1}	2.53×10^{8}	2.12×10^{8}	1.96×10^{8}	8.48×10^{7}
质粒拷贝数	89	96	36	32

2.8　pHR 系列载体的构建

在pHC11R的基础上, 我们构建了pHR1~4 系列载体 (图 5). 如图所示, 它们的共同结构包含: 完整的 2μ质粒片段, 酿酒酵母筛选标记基因*LEU2*, 终止子T_{ADH1}, 大肠杆菌质粒pSP72 的序列, 但是所带的启动子和分泌信号序列不同. 4 种载体按转录调控方式分为组成型和调控型两种, 每种调控方式又都分为带蛋白质分泌信号和不带蛋白质分泌信号两种. pHR 系列载体本身可以在大肠杆菌中复制扩增, 这些载体经*Bgl*Ⅱ, *Xho*Ⅰ酶切后, 在线性化的同时即除去了包括抗药性选择标记在内的细菌质粒序列. 如果用PCR方法在要想表达的基因两侧引入同源重组所必须的30~50 bp同源序列, 就可以将其与上述片段共转化酵母细胞, 在体内通过同源重组获得不含包括抗药性标记等细菌质粒序列的高效表达质粒 (图 5).

目前 4 种不同表达特性的 pHR 载体均成功通过同源重组构建了表达质粒, 并且都获得了外源蛋白的有效表达(表 2), 研究结果将另文发表.

3　讨论

本实验利用酿酒酵母内的同源重组建成了去除大肠杆菌质粒序列的外源基因表达质粒. 实验结果表明, 包含该表达质粒的工程菌对人α2b 干扰素的表达量有了显著提高, 而质粒在细胞中的稳定性、拷贝数明显提高可能是外源基因表达量提高的原因. 由于大规模发酵生产时细胞扩增的倍数大大增加, 因此表达载体的稳定性对表达水平的影响将更为显著. 可以预计工程菌 DCO4/pHC11R-INFα2b 在大规模发酵条件下提高产物的表达量会有很大的潜力.

由于pHC11R-IFNα2b在构建中去除了一些非必需序列, 载体明显缩小. 较小的质粒DNA在细胞有丝分裂过程中易于扩散和均匀分配, 这可能是pHC11R-IFNα2b的载体稳定性提高的原因[27], 但是这个较小的质粒为什么会在细胞中有较高的拷贝数还不清楚.

总之, 我们利用同源重组构建酿酒酵母表达载体的方法, 不依赖于限制性核酸酶的识别位点, 不会引入多余的序列, 操作步骤简单、快速; 而经重组获得的不含细菌质粒抗药性标记序列的外源基因表达载体, 不但在宿主菌中的稳定性和拷贝数有所提高,

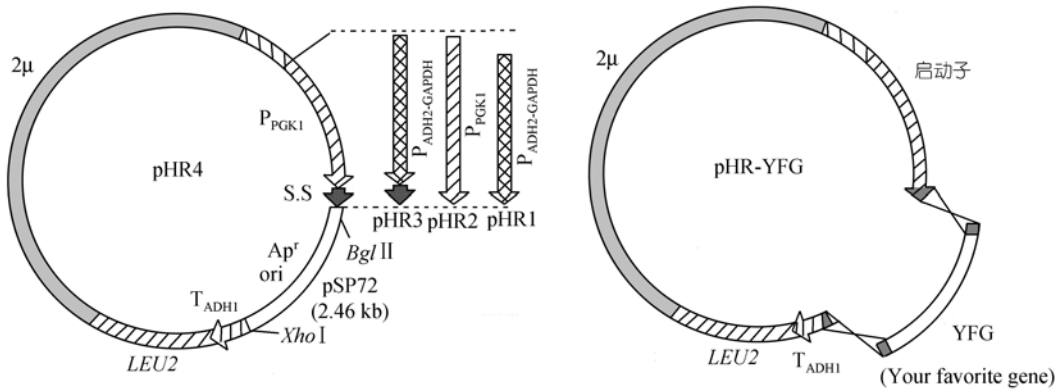

图 5 pHR 系列载体结构示意图及 pHR 系列载体与目的基因同源重组示意图

表 2 pHR 系列载体的结构及表达特性

载体	启动子	分泌信号	表达特性	已成功表达的外源蛋白[a)]
pHR1	$P_{ADH2-GAPDH}$	/	诱导型, 胞内表达	HBsAg, SA-28, hSOD-Thy
pHR2	P_{PGK1}	/	组成型, 胞内表达	HBsAg
pHR3	$P_{ADH2-GAPDH}$	α因子信号肽	诱导型, 分泌表达	IFNα2b
pHR4	P_{PGK1}	α因子信号肽	组成型, 分泌表达	IFNα2b, hLY

a) HbsAg 示乙型肝炎病毒表面抗原; SA-28 示羧端带 preS1 的乙型肝炎病毒表面抗原; hSOD-Thy 示人 SOD 与胸腺肽α1 的融合蛋白; hLY 示人溶菌酶

而且使酿酒酵母表达系统用于食品和药物的生产、应用更符合生物安全的要求; 此外, 在利用pHR系列载体构建外源基因表达载体时, 可以根据所要表达的外源基因的自身特性选择适当的表达方式, 因而具有更好的通用性.

参 考 文 献

1 Brunelli J P, Pall M L. A series of yeast vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. Yeast, 1993, 9: 1299~1308

2 Sikorski R S, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989, 122: 19~27

3 Bonneaud N, Ozier-Kalogerogoulos O, Li G, et al. A family of low and high copy replicative, intergrative and single-stranded *S. cerevisiae /E.coli* shuttle vector. Yeast, 1991, 7: 609~615

4 Huo K K, Yu L L, Chen X J, Li Y Y. A stable vector for high-level expression and secretion of human interferon alpha A in yeast. Sci China B, 1993, 36(5): 557~567

5 周则迅, 袁汉英, 何 炜, 等. 乙肝病毒表面抗原 SA-28 融合基因在酵母中的组成型表达. 复旦学报(自然科学版), 2000, 39(3): 264~268

6 Paques F, Haber J E. Multiple pathways of recombination induces by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(2): 349~404

7 Martin K. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research, 2000, 451: 91~105

8 Alira S, Tomoko O. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. TIBS, 1995, 20: 387~391

9 Patrick S, Kelly M T, Stephen V K. Recombination factor of *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research, 2000, 451: 257~275

10 Manivasakam P, Weber S C, McElver J, Schiestl R H. Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1995, 23(14): 2799~2800

11 Baudin A, Lacroute F, Cullin C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1993, 21(14): 3329~3330

12 Hua S B, Qiu M, Chan E, Zhu L, Luo Y. Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. Plasmid, 1997, 38(2): 91~96

13 Hong M, Sam K, Peter J S, et al. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. Gene, 1987, 58: 201~216

14 Prado F, Aguilera A. New *in vivo* cloning methods by homologous recombination in yeast. Curr Genet, 1994, 20: 180~183

15 Jacques D. DNA insertion system for complex yeast shuttle vectors. Curr Genet, 1995, 27: 309~311[DOI]

16 Erik D, Bruno D, Mireille D, et al. *In vivo* cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system. Yeast, 1995, 11: 629~640

17 Kevin R O, Kham T V, Susan M, Chris P. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. Nucleic Acids Res, 1997, 25(2): 451~452[DOI]

18 Falco S C, Li Y Y, James R B, David B. Genetic properties of chromosomally integrated 2μ plasmid DNA in yeast. Cell, 1982, 29: 573~584

19 Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P. New heterologus modules for classical or PCR-based gene disruption in *Saccharomyces cerevisiea*. Yeast, 1994, 10: 1793~1808

20 Lorenz M C, Muir R S, Lim E, et al. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1995, 158: 113~117[DOI]

21 Bhargava J. Direct cloning of genomic DNA by recombinogenic targeting method using a yeast-bacterial shuttle vector, pClasper. Genomics, 1999, 62: 285~288[DOI]

22 Francesca S L, Kevtn L, Michael A R. *In vivo* site-directed mutagenesis using origonucleotides, Nature Biotechnology. 2001, 19: 773~776

23 Chulman J, Hyuck K, Sangmee A J. *In vivo* site-directed mutagenesis of yeast plasmids using a three-fragment homologous recombination system. Biotechniques, 2002, 33(2): 288~294

24 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

25 Gietz R D, Schiestl R H, Williems A R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast, 1995, 11(4): 355~360

26 Durke D, Dawson D, Stearns T. Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2000

27 Broach J R, Volkert F C. Circular DNA plasmids of yeast. In: Broach J R, Pringle J R, Jones E W, eds. The molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. Vol. I, 297~331