

酵母表达型载体骨架构建的进展

张 明 陈 慎

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

酵母菌作为遗传工程菌的研究近年来发展较快,其中包括酵母菌基因调控研究,结构基因分离和定位,外源基因在酵母中表达等。酵母菌作为遗传工程菌有许多优点。第一,酵母菌本身基因组小,简单,又是真核生物,用它研究真核生物基因表达调控机制是比较理想的。第二,由于遗传上和进化上差异,有的真核生物基因在大肠杆菌中不能很好表达,而在酵母菌中能较好地表达。第三,酵母菌生长快,繁殖周期短,遗传背景清楚,发酵条件的研究比较充分,以它为受体菌克隆表达外源基因可以采用在大肠杆菌等所用的现代生物学技术。另外,外源基因在酵母菌中表达的产物比较安全,比大肠杆菌优越。

使外源基因在酵母中表达首先要考虑构建穿梭载体问题。这种载体既能在大肠杆菌中复制,又能在酵母菌中复制。载体一般由载体骨架和一些其它部分装配而成。近年来这方面工作较多,进展较快。现将酵母菌有关质粒,载体骨架构建进展情况综述如下。

酵母菌中已报道有下面几类载体:

1. 酵母整合型质粒 (yeast integrating plasmids, YIP)

它由细菌质粒和一段不含有自控复制序列 (Autonomously replicating sequence, ARS) 的酵母染色体 DNA 组成。载体中含有一种选择性基因标记,当 YIP 转化入基因缺陷型酵母后,该基因标记能整合进入基因缺陷型酵母染色体同源基因区域,实现缺陷互补。YIP 转化频率较低,约为 1—10 转化体 $\mu\text{g DNA}^{[4]}$,每个细胞中拷贝数只有一个,然表型稳定,在非选择压力

下,分离率 0.1—1%/代^[4]。YIP 常用来研究酵母基因的定位,分离与基因调控。

2. 酵母复制型质粒 (yeast replicating plasmids, YRP)

它由细菌质粒和一段含有 ARS 序列的酵母染色体 DNA 构建而成,内插一段基因标记 DNA。YRP 在酵母中拷贝数高,约为 30—50 拷贝/细胞^[1,2],转化频率高 (10^3 — 10^4 转化体/ $\mu\text{g DNA}^{[1,2]}$),但转化体表型不稳定,在非选择性压力下,每十代 95—99% 表型丢失^[1,2]。

3. 酵母线型质粒 (yeast linear plasmids, YLP)

它是一种线性载体,由两部分经酶切联接而成^[3]。一部分来自既能在大肠杆菌中复制又能在酵母中复制的环状质粒,另一部分是一段能起端粒功能的 DNA 末端序列。如四膜虫 rDNA 末端序列。YLP 可用来克隆酵母的端粒。

4. 酵母着丝粒质粒 (yeast centromere plasmids, YCP)

实际上是一种人工微型染色体,既含有 ARS,又有染色体的着丝粒,具有高转化频率,唯在寄主中拷贝数低;只有一个转化体。转化体表型稳定,分离率低于 1%/代^[1,4]。

5. 酵母附加体质粒 (yeast episomal plasmids, YEP)

由细菌质粒和酵母 $2\mu\text{m}$ 质粒全部或部分片段构成。重组构建的质粒在酵母和大肠杆菌中能很好复制。转化频率 10^4 转化体/细胞^[8],表型分离率较 YRP 类载体低,约为 1—5%/代^[7,9]。YEP 这些特性使它成为构建表达型载

体的很好的骨架系统。因此有必要进一步介绍一下 YEP 类载体骨架的构建基础——酵母 $2\mu\text{m}$ 质粒。

一、表达型载体骨架之构建基础—— $2\mu\text{m}$ 质粒结构和特性

酵母 $2\mu\text{m}$ 质粒的研究基本自 70 年代开始。用电镜观察,发现它有大小两个环区,称为 L 环和 S 环。啤酒酵母中 $2\mu\text{m}$ 质粒约有 60—100 拷贝。 $2\mu\text{m}$ 质粒呈现非孟德尔遗传,减数分裂分离 $4^+ : 0^-$, 且定位于核质中。

1980 年, Hartley 和 Donelson 测定了 $2\mu\text{m}$ 质粒全部顺序, 确定为 6318 bp^[10]。Broach 等对 $2\mu\text{m}$ 质粒的结构和功能做了大量工作。其中包括其复制起点的精确定位^[11,12], FLP 中介重组的特异性位点定位^[13,14], 影响质粒复制的反式作用位点和顺式作用位点的定位^[11,12,15]。 $2\mu\text{m}$ 质粒结构上有两个 599 bp 的反向重复序列^[10], 这两个独特地区把分子分成为一个较大的环 2774 bp 和一个较小的环 2346 bp。分子内和分子间重组发生在这段反向重复顺序上, 重组的结果使 $2\mu\text{m}$ 质粒在啤酒酵母中至少有两种形式: A 型(也称 23, R, XY'), B 型(也称 14, L, XY)^[14]。

$2\mu\text{m}$ 质粒有三个功能区: (1) ARS (自控复制序列), 它是 $2\mu\text{m}$ 质粒中含有的自控复制序列, 其中含有复制起点, 精确定位于一个小于 75 bp 区域^[12,15]。(2) 复制功能区, 简称 REP, REP 具有控制 $2\mu\text{m}$ 质粒复制能力的作用。REP₁ 和 REP₂ 是编码功能区, 它们编码的蛋白是维持 $2\mu\text{m}$ 质粒拷贝数和其稳定性所必不可少的。此外, 还有 REP₃ 功能区, 它是影响复制的一种顺式作用位点, 序列分析表明该区有 5.5 个 62 bp 重复顺序。REP₃ 并不编码蛋白, 推测其作用可能类似于 SV40 基因 5' 端的增强子之作用。REP₃ 缺失也会影响 $2\mu\text{m}$ 质粒复制拷贝数及稳定性, 并且降低的效果不能在含有 $2\mu\text{m}$ 质粒的菌株 [Cir⁺] 中得到互补^[15,16]。(3) FLP 功能区, FLP 基因编码一个较大的蛋白, 与质粒重组有关。Broach 工作证明 FLP 中介重

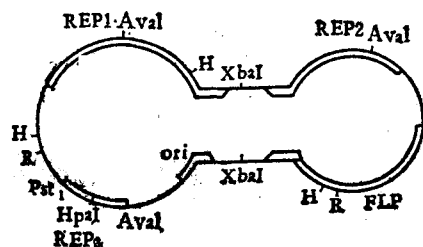


图 1

组有一个特异位点, 位于过反向重复序列中 XbaI 位点, 其长度大约 60 bp 一段顺序^[13], 这段顺序缺失(即使缺失 4bp 以上)或插入, 例如插入易位子 Tn5, $2\mu\text{m}$ 质粒都不能进行任何分子内或分子间重组。

$2\mu\text{m}$ 质粒结构和一般酶切图谱如图 1 所示 (B 型 $2\mu\text{m}$ 质粒)

二、构建 YEP 类表达型载体骨架的一般性原则和所需考虑的问题

YEP 类表达型载体骨架由 $2\mu\text{m}$ 质粒全部或其中一段顺序与细菌质粒 pBR 322, pMB9 等构建而成。另外还有一段酵母 DNA 作为选择性标记基因, 用以互补酵母菌的该基因缺陷型。下面说明构建这些载体的一般性原则。

1. 重组构建的质粒载体含有细菌质粒的复制起始点和抗药性标记, 以保证载体能在大肠杆菌中大量扩增。常用细菌质粒 pBR322, pMB9, pAT153 等。质粒经酶切后选用某一特定片段, 如 pBR 322 的 EcoRI 片段, 或 EcoRI-HindIII 片段, 抗药性标记选用 Tet^R, Amp^R 等。

2. 载体须含有酵母菌株中进行选择的选择性标记, 被转化的酵母受体菌都是某些基因缺陷型, 载体上含有的基因选择性标记能互补这种缺陷型。常用的选择性标记基因分别为酵母菌基因 Leu2, URA3, His3, TRP1, ARG4 等。

3. 载体含有全部或一段 $2\mu\text{m}$ 质粒序列, 该片段能保证载体有效复制和稳定遗传。因此这段 $2\mu\text{m}$ 质粒 DNA 至少要包括 REP₃ 位点和复制之起始点。(但必须转化到 [Cir⁺] 菌株中), 常用片段如 $2\mu\text{m}$ 质粒 B 型之 2240bp 的 EcoRI 片段, 2214 bp Hind III 片段, 1576 bp Sau 3A 片

段^[11]。

4. 选择性标记基因和待表达的插入之外源基因在载体骨架上相对位置最好邻近。因为在 [Cir⁺] 菌株中由于重组发生, 这两种基因如果相距太远, 易发生分离。

5. 一般说载体小, 容易转化入受体细胞。以较小的载体骨架为基础构建的表达型载体也不会显得累赘。因此, 在构建载体骨架时应尽可能去除无功能片段, 使载体尽量短小。

6. 希望所构建的载体或其骨架尽量维持原型, 不发生重组, 或重组频率尽可能低。因此要设法破坏载体中与重组有关的区域, 尽力减少分子间重组。

三、载体骨架的类型与寄主菌株

[Cir⁰] 或 [Cir⁺] 的选择

载体骨架类型是多样的, 它在寄主菌中拷贝数和分离程度与寄主菌株 [Cir⁰] 还是 [Cir⁺] 的选择有关。下面介绍目前常用载体骨架和选择之菌株。

1. [Cir⁺] 菌株中所用的载体

这类载体由 2 μ m 质粒 B 型之 2 kb 左右 EcoRI 片段和 pBR 322 等质粒构建而成。另外还有一段选择性标记基因。代表性载体有 YEP13, YEP24, pCV7, pC4 等。图 2 示 YEP 13 载体的结构。

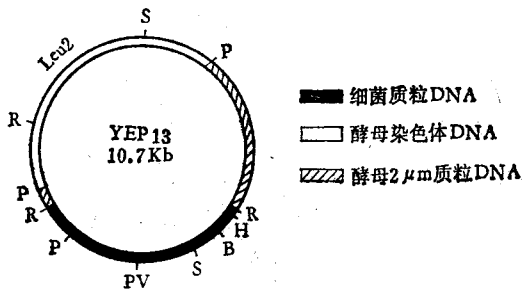


图 2 YEP₁₃ 载体结构示意图

因为载体骨架中不含 REP₁ 和 REP₂ 等功能区, 故一定要在 [Cir⁺] 中才能维持高拷贝数和稳定。拷贝数为 30—40 拷贝/细胞^[11], 有丝分裂稳定, 在非选择性压力下经过 10 代繁殖, 分离程度低于 20%^[11]。这类载体最大特点是

载体骨架较短, 加工后 (指加启动子和终止子后) 也不显庞大累赘, 转化频率和拷贝数都较高, 而且较为稳定。另外 YEP 13 等载体骨架中一段 2 μ m 质粒片段有一部分正好是 FLP 基因 3' 末端, 因此含有转录终止和多聚腺苷化信号。构建表达型载体时, 使外源基因插在 FLP 基因的 3' 末端后面, 可巧妙借用这段 FLP 基因转录终止和加 poly(A) 尾之信号, 这样就省去插入终止子的步骤。如 Hitzeman 构建的 YEP1pt^[2]。

2. [Cir⁰] 菌株中所用的载体

Blanc 等最早使用 [Cir⁰] 菌株作为转化受体菌^[7]。在他构建的重组质粒中含有 URA₃ 基因和全部 2 μ m 质粒 DNA, 转化入 URA⁻ 菌株后发现 URA₃ 基因编码产物活性高出野生型 10 倍, 而且 URA⁺ 特性也显现相对稳定。这种现象可解释为载体在 [Cir⁰] 菌株拷贝数要比 [Cir⁺] 拷贝数高, 以及 FLP 基因在重组构建时被破坏, 减少了分子间重组而使 URA⁺ 特性不易分离。

在同一宿主中, 2 μ m 质粒和构建的载体骨架之间有一种“不相容”特性 (incompatibility)。这表现在构建的载体在 [Cir⁺] 菌株中拷贝数肯定低于 2 μ m 质粒单独在酵母菌中拷贝数, 去除 2 μ m 质粒的菌株 [Cir⁰] 显然有利于构建的载体在其中复制, 而拷贝数高则是表达型载体最必需的。

[Cir⁰] 菌株中所用的载体一般全部由 2 μ m 质粒组成, 必须具有全套 REP 功能区, 否则不能维持稳定和其高拷贝数。如 pCV7 在 [Cir⁰] 中拷贝数低, 且易丢失^[15]。这类载体特点是个体长度较大, 高拷贝数, 稳定性也高。由这类骨架所构建的表达型载体在 [Cir⁰] 中表达外源基因能力一般比其它表达型载体的能力要高^[16]。

[Cir⁰] 菌株所用的载体有 pCV20, pCV21, pMJ5, 等。常用 [Cir⁰] 菌株有 AH22^[17], DC04^[11] 等。获得 [Cir⁰] 菌株办法参阅文献 [17, 18]。

3. pJDB 219 系列载体的构建

pJDB 219 系列载体也是一类 YEP 类载体, 之所以把它特别列出, 是因为它在寄主中拷贝

数异乎寻常的高。

pJDB 219 是由 *Leu 2* 基因 (1.4kb 片段) 通过 poly (dA:dT) 顺序插入 2 μ m 质粒 *Pst* 1 位点,再和 pMB 9 重组而成,^[7]全长 12.8kb。整个 pJDB 219 系列还包括 pJDB 207, pSI 4 等。pJDB 219 载体太大,显得累赘,其衍生物 pJDB 207 全长仅 6.9 kb,由 pJDB 219 去除一段 4 kb 左右 *EcoRI* 片段,细菌质粒也由 pMB 9 换成 pAT 153。pAT 153 是 pBR 322 衍生物,它在大肠杆菌中复制拷贝数比 pMB 9 和 pBR 322 都要高。整个 pJDB 219 系列载体都具有相当高的转化频率 (高于 10^4 转化体/ μ g DNA),很高的拷贝数,每细胞有 200 拷贝左右^[7,19]。造成特别高拷贝数的原因可能与 1.4kb *Leu2* 基因插入 *Pst* 1 位点和联接方式有关^[19]。

pJDB 207 是构建表达型载体理想的载体骨架,因为它个体小,不臃肿,有利于转化,而且在寄主菌中拷贝数很高。Golf 工作表明

pJD B219 系列为骨架构建的载体比其它 YEP 类骨架构建的载体在表达小牛凝乳酶原 (Prochymosin) 能力上要高出 2—5 倍^[20]。

象所有其它在 [Cir⁺] 菌株中使用的载体 YEP₁₃, pCV 7 等一样, pJDB 207 必须转化入 [Cir⁺] 菌株才能稳定和维持高拷贝。这样不可避免地会发生内源 2 μ m 质粒和 pJDB 207 载体分子间的重组。在非选择压力情况下,分离率可达 15% *Leu*⁻/20 代^[19]。为尽可能使这个理想的载体表型稳定,对 pJDB 207 载体可做进一步修改。根据 Broach 的工作,FLP 中介重组有一个位点特异性的起始点,位于反向重复序列中一段过 *Xba*I 的 60 bp 顺序^[13],这段顺序插入 *Tn* 5 或缺失 4bp 以上就不能进行重组^[13]。这样可以将 pJDB 207 载体用限制性内切酶切去一段自 *Xba*I 到 *Hind*III 的片段(图 3)。虽然去除的片段只有 0.8 kb,但很有意义。它被切除后不影响构建载体稳定性和扩增能力^[19],由此

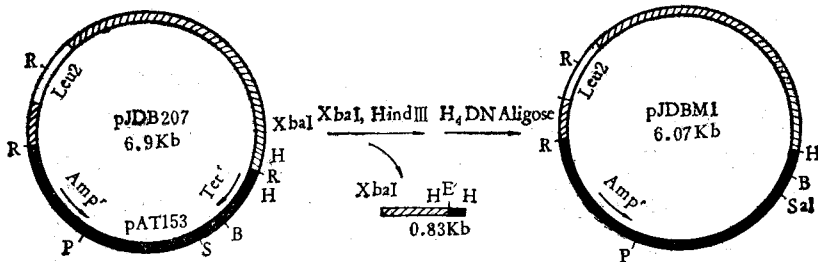


图 3 pJDB 207 载体及其修改示意图

造成的 FLP 中介重组特异性位点被失去,必定使载体在 [Cir⁺] 菌株中也不能有效重组^[12,13,15]。因此,我们可以用 [Cir⁺] 菌株为宿主,以修改后的 pJDB 207 作为载体骨架,就可以构建较高稳定性的高效表达型载体。如图 4 所示为一种以载体 pJDBM1 (Modified pJDB 207) 为骨架,取 PGK 基因的启动子和终止子插入 pJDBM1,组成一个较为理想的夹心表达型载体 pSEV (Sandwich expression Vector)。

4. 还有一类载体是完全去除细菌质粒的。Lusky 工作表明,杂交质粒中存在一定的细菌质粒顺序能抑制其在培养的哺乳动物细胞中的复制能力^[21]。考虑到外源细菌质粒顺序可能对

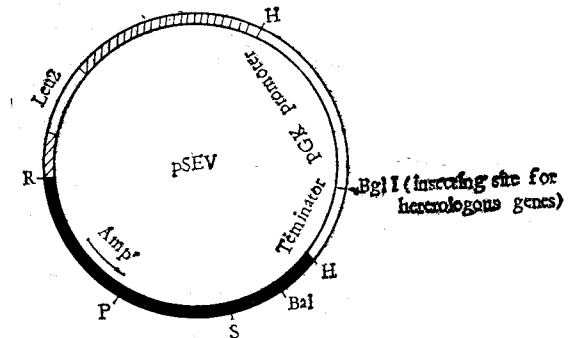


图 4 夹心式表达型载体结构示意图

载体在酵母中复制能力有影响,所以有人尝试将载体中一段细菌质粒顺序去除,然后转化入酵母菌。

例如 Toh-E, A^[22] 构建的 pSLe1 就是一个仅 3.2 kb 的去除 pMB 9 之载体。pSLe1 是由 pJDB 219 衍生而来,由 pJDB 219 经 HindIII 酶切后,产生的片段自连接而成环状载体。pSLe1 具有很高拷贝数,表型十分稳定(分离率 20%/32 代),减数分裂呈现 4⁺:0⁻,只能转化入 [Cir⁺] 菌株。类似的质粒还有 Dobson 构建的 pYX 质粒^[23], Scott 构建的 TRP-R₁ Circle 质粒^[24]等。

影响外源基因在酵母中表达的因素很多,包括启动子加工,终止子加工,外源基因加工,表达产物的分泌等。但载体骨架构建好坏是影响基因表达最初一步,也是最重要的一个因素。以一个理想的载体骨架为基础加上一个高效启动子,再考虑对待表达之外源基因加工等细节问题,就能构建一个较为完善的表达型载体。目前在酵母中表达外源基因方面的工作日益增多,构建的表达型载体也日趋完善,本文仅对载体骨架构建基础及一些载体骨架的构建作一些介绍,以供参考。

参 考 文 献

[1] Struhl, K. et al.: *Nature*, 305, (29), 391, 1983.

- [2] Hitzeman, R. A.: *Science*, 219, 620, 1983.
 [3] Murray, A. W. et al.: *Nature*, 305, 189, 1983.
 [4] Scherer & Davis, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4651, 1979.
 [5] Stinchcomb, D. J. et al.: *Nature*, 282, 39, 1979.
 [6] Clarke, L. and Carbon, J. et al.: *Nature*, 287, 504, 1980.
 [7] Beggs, J. D.: *Nature*, 275, 104, 1978.
 [8] Gerbaud, D. et al.: *Gene*, 5, 233, 1979.
 [9] Botstein, D. and Ronald, W. D.: *The Molecular Biology of Yeast Sacchromyces—Metabolism and Gene Expression*, C. S. H., 607, 1982.
 [10] Hartley & Donelson, *Nature*, 285, 5768, 1980.
 [11] Broach, J. R.: *Cell*, 21, 501, 1980.
 [12] Broach, J. R.: *Symp. Quant. Biol.*, C. S. H., 47(2), 1165, 1983.
 [13] Broach, J. R.: *Cell*, 29, 227, 1982.
 [14] Broach, J. R.: *The Molecular Biology of Yeast Sacchromyces—Life Circle and Inheritance*, C. S. H., 445, 1981.
 [15] Jayaram, M. and Broach, J. R.: *Cell*, 34, 95, 1983.
 [16] Grant, A. et al.: *Gene*, 32, 267, 1984.
 [17] Blanc, H. et al.: *MGG*, 176, 335, 1979.
 [18] Toh-e, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 145, 1421, 1981.
 [19] Beggs, J. D.: *The Molecular Genetics in Yeast, Alfred. Benzon. Symp.*, 16, 1981.
 [20] Golf, C. G. et al.: *Gene*, 27, 35, 1984.
 [21] Lusky, M.: *Nature*, 293, 79, 1981.
 [22] Toh-e, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 141, 413, 1980.
 [23] Dobson, M. J. et al.: *Current Genetics*, 2, 201, 1980.
 [24] Hollaender, A.: *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, 75, 1982.

[本文于 1985 年 10 月 30 日收到]

(上接第40页)

切割位点在 A 与 T 之间。

如果在生物体内存在 2', 3'-双脱氧核糖或 2-取代 3'脱氧核糖,则 DNA 的复制就不能正常进行。这种酶的存在,可以识别特异的顺序,切去不正常的核苷酸,使 DNA 的合成得以正常的延续下去。因而,此酶的生理功能是对 DNA 的不正常合成起修复作用。据此分析,它应该是能识别各种顺序的一类修复酶,本文叙述的只是其中的一种。

参 考 文 献

- [1] Maxam, A. M. and Gilbert, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(2), 560, 1977.
 [2] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 94, 441, 1975.
 [3] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (12), 5463, 1977.
 [4] Messing, J. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, 9, 309, 1981.
 [5] Sherman, W. et al.: *Methods of DNA and RNA Sequencing*, SBS Educational and Professional Publishing, New York, p. 68, 1983.

[本文于 1985 年 6 月 25 日收到]

(上接第57页)

[7] Mahler, H. R.: *Methods in Enzymology*, 2, 688, 1955.

- [8] Kadlubowski, M. et al.: *British Journal of Haematology*, 37, 111, 1977.

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]