

文章编号:1673-1689(2006)03-0037-04

根癌农杆菌介导酿酒酵母的遗传转化

张君胜, 饶志明*, 吴 蕾, 沈 微, 唐雪明, 方慧英, 诸葛健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)可以将它的 Ti 质粒的一段 T-DNA 序列转化到广泛的宿主细胞并能整合到宿主染色体中。作者利用根癌农杆菌转化系统成功地实现了产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)乳清苷酸脱羧酶基因(Ura3)对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A 的 Ura3 缺陷遗传互补转化, 转化率约为 3.2 个转化子/ 10^5 个酵母细胞。通过转化子 PCR 和表型验证说明了 T-DNA 已经整合进入酵母染色体, 并能够稳定地进行遗传表达。

关键词: 根癌农杆菌; 酿酒酵母; 遗传转化

中图分类号: Q 812

文献标识码: A

Research of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Jun-sheng, RAO Zhi-ming*, WU Lei, SHEN Wei,
TANG Xue-ming, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian*

(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens* could transfer part of its Ti plasmid and T-DNA to a wide variety of host cells where they could be integrated into the nuclear genome. Using this transformation system, the transformants were selected from SM (selected medium) plate with an efficiency of 3.2 transformants per 10^5 yeast cells. The PCR and the phenotype results demonstrated the Ura3 gene has been integrated into chromosome of *S. cerevisiae* W303-1A successfully.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; *Saccharomyces cerevisiae*; genetic transformation

转化是酵母基因操作中的重要步骤之一。1978 年 Hinnen^[1] 和 Beggs^[2] 首次报道了应用原生质体法将质粒成功转入酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。目前广泛采用的酵母转化方法主要有原生质体转化法、醋酸锂转化法、电击转化法等, 这些方法在酵母的遗传转化研究上已取得了巨大的

成功。但是它们在转化生产菌株产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)时遇到了很大的困难。根癌农杆菌介导的遗传转化以其操作简单、转化率高、转基因低拷贝、易于得到稳定的转化子等特点, 广泛的应用于植物的基因转化。Bundock^[3] 等(1995 年)和 L. Piers^[4] 等(1996 年)首次成功地实

收稿日期: 2005-06-30; 修回日期: 2005-09-22.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30300027)、江南大学工业生物技术教育部重点实验室开放基金项目(KLIB-KF200507).

作者简介: 张君胜(1980-), 男, 河北平乡人, 发酵工程硕士研究生; * 通讯作者.

现了根癌农杆菌介导酵母菌的遗传转化,且具有上述优点。

产甘油假丝酵母 WL2002-5 是江南大学工业微生物研究中心得到的优良菌株。产甘油假丝酵母的乳清苷酸脱羧酶基因(*Ura3*)由作者所在研究室通过遗传互补的方法克隆得到并测序^[5],测序结果显示产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因的序列与酿酒酵母 *Ura3* 基因序列同源性较低(79%),而产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因可以互补酿酒酵母 *Ura3* 基因的缺陷。

为了进一步研究产甘油假丝酵母的遗传转化,在已建立的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化丝状真菌^[6]的基础上,探讨了根癌农杆菌介导转化产甘油假丝酵母的可行性。作者尝试建立根癌农杆菌介导酿酒酵母的遗传转化方法,利用产甘油假丝酵母的 *Ura3* 基因互补酿酒酵母的 *Ura3* 基因缺陷为筛选标记,并利用根癌农杆菌介导将产甘油假丝酵母的 *Ura3* 基因导入酿酒酵母 W303-1A 中,互补了 W303-1A 的 *Ura3* 基因缺陷。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌 LBA4404 含利福霉素及链霉素抗性,由作者所在研究室保藏;酿酒酵母 *Ura3* 基因缺陷型 W303-1A 由 Dr. Hohmann 馈赠。质粒 pCAMBIA3300,含卡那霉素抗性,由中国水稻研究所馈赠。pMD 18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 工具酶和试剂

实验中的各种酶、氨基酸营养因子和抗生素(头孢噻肟除外)均购自上海华美生物工程有限公司。头孢噻肟和乙酰丁香酮购自 Sigma 公司。质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自博大泰克。

1.3 培养基

LB 培养基(组分 g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,氯化钠 10。

YPD 培养基(组分 g/L):蛋白胨 20,酵母膏 10,葡萄糖 20。

SM 培养基(选择培养基)(组分 g/L):酵母氮基 6.70,葡萄糖 20,亮氨酸 0.07,色氨酸 0.10,组氨酸 0.08,腺嘌呤 0.07。

MM 培养基(基本培养基)、IM 培养基(诱导培养基)见文献^[6-7]。

1.4 根癌农杆菌的转化

将含有 *Ura3* 基因的质粒 pCAMBIA3300 —

Ura3 通过电击直接转入根癌农杆菌 LBA4404。在卡那霉素抗性平板上挑取抗性转化子,提取质粒酶切验证。根癌农杆菌感受态的制备及转化方法见文献^[6],根癌农杆菌质粒提取方法见文献^[8]。

1.5 根癌农杆菌 Ti 质粒转化酿酒酵母

接种含有质粒 pCAMBIA3300—*Ura3* 的根癌农杆菌 LBA4404 于 LB 培养基(含卡那霉素 50 μg/mL,利富霉素 50 μg/mL,链霉素 30 μg/mL)中,30 ℃,200 r/min 摇床培养 36 h,离心收集菌体,用等体积的 IM 培养基重悬,培养 6 h;接种酿酒酵母 W303-1A 于 YPD 培养基中,30 ℃,200 r/min 摇床培养过夜;酿酒酵母的 YPD 培养液按 1:5 稀释到 YPD 新鲜培养基中,培养 6 h。分别离心收集酿酒酵母和根癌农杆菌菌体,用生理盐水清洗一次,用 IM 培养基重悬菌体,酿酒酵母细胞终浓度达到 10⁹ 个/mL,根癌农杆菌细胞终浓度达到 10¹¹ 个/mL,各取 50 μL 加入 IM 培养基(乙酰丁香酮 200 μmol/L,卡那霉素 50 μg/mL,利富霉素 50 μg/mL)中 30 ℃,200 r/min 培养过夜。取 200 μL 培养液涂布铺有玻璃纸的 IM+AS 培养基平板,并置于 25 ℃ 培养 2 d;将玻璃纸转接到 SM 培养基(头孢噻肟 200 μmol/L,不含有尿嘧啶)上培养 4 d,筛选阳性酵母转化子^[4]。

1.6 酿酒酵母阳性转化子的表型验证

将筛选的阳性转化子和 W303-1A 同时在 MM 培养基(尿嘧啶缺陷)上划线培养 48 h,观察其生长情况。

1.7 酿酒酵母阳性转化子染色体的提取及 PCR 验证

经过初步筛选的酿酒酵母阳性转化子进行染色体提取和 PCR 验证。酿酒酵母染色体的提取参照文献^[9]。

根据产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因的特异性设计两端引物:

引物 R:5'-AATTCGGGGTACCATACGCG GAACAATCAATCG-3';

引物 F:5'-AATTCGGGGTACCATAGCCT CATGAAATCAGCC-3'。

酵母 18S rDNA 两端引物:

引物 R:5'-ACCGGAATTCGCCTGAGAAA CGGCTACCAC-3';

引物 F:5'-ACCGGAATTCGGCAGGGACG TAATCAACGC-3'。

PCR 的反应条件为:95 ℃变性 5 min,94 ℃变性 50 s,56 ℃退火 1.5 min,72 ℃延伸 2 min,经过

30 个循环后,在 72 ℃延伸 10 min。

PCR 扩增产物采用 0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结 果

2.1 含 *Ura3* 基因的质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 的构建及酶切验证

质粒的构建过程见图 1。PCR 扩增 *Ura3* 后连

入 pMT 载体,同时提取质粒 pCAMBIA3300,两者分别经过 *EcoR* I , *Pst* I 双酶切后胶回收 *Ura3* 基因和线性 pCAMBIA3300,在 *T4* 连接酶的作用下连接得到 pCAMBIA3300-*Ura3*。质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 的酶切验证见图 2。质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 经过 *EcoR* I , *Pst* I 双酶切,切下了 1.5 kb 大小的片段,这与预期的 *Ura3* 大小相当,这说明 *Ura3* 已成功的连入了载体 pCAMBIA3300。

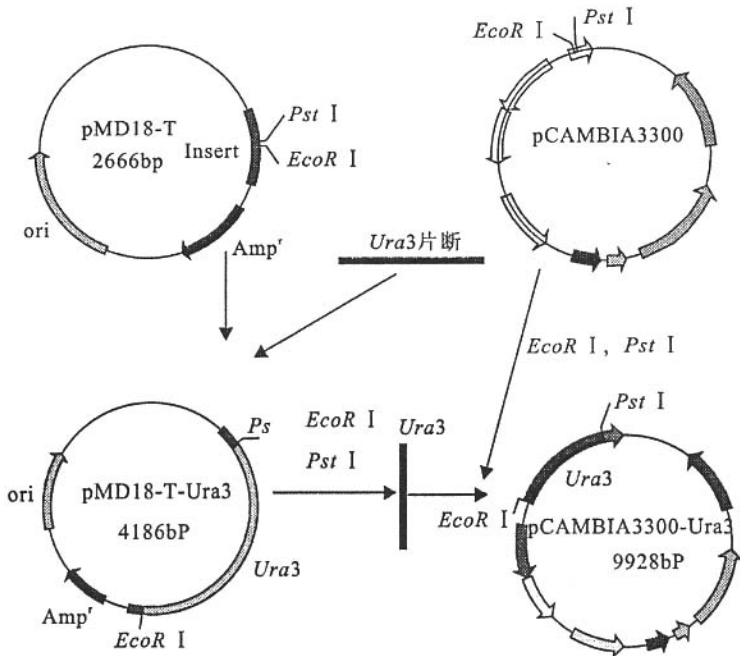


图 1 质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 的构建

Fig. 1 Construction of pCAMBIA3300-*Ura3*

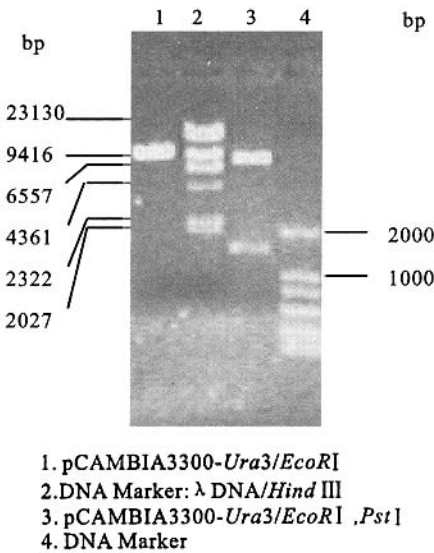


图 2 质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 酶切电泳图

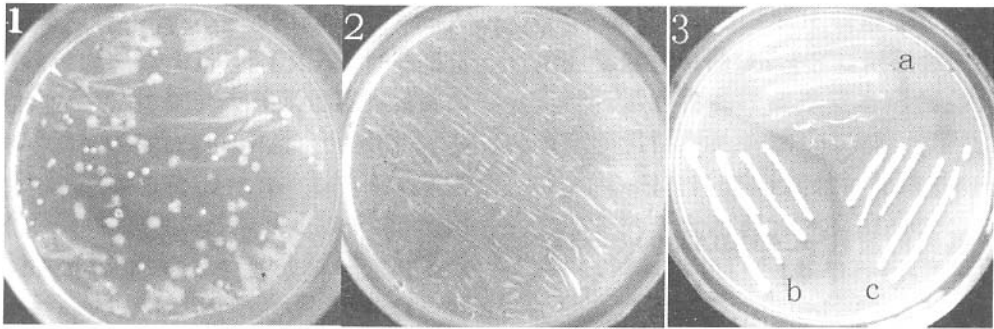
Fig. 2 The electrophoresis map of pCAMBIA3300-*Ura3* with restriction endonuclease

2.2 根癌农杆菌转化子的获得

挑取的阳性根癌农杆菌转化子并在液体 LB 培养基(卡那霉素 50 μg/L)中培养 24 h,提取质粒,将得到的质粒进行酶切验证,证明已得到了含有质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 的根癌农杆菌。

2.3 酿酒酵母阳性转化子的获得及初步鉴定

在 IM 培养基上培养 2 d 时有极小的酵母菌长出;然后转移到 SM 培养基(氨基葡萄糖 200 μmol/L)上培养 3 d,在 SM 培养基(氨基葡萄糖 200 μmol/L)上再转接一次,培养 3 d 后,已经可以看到大片的根癌农杆菌已死去,中间长出许多的酵母单菌落。挑取长势较好的酵母菌落,在 SM 培养基上划线,30 ℃培养 3 d 后,菌落生长良好的转化子可以初步确认为阳性转化子,转化子初步选择和生长情况见图 3。



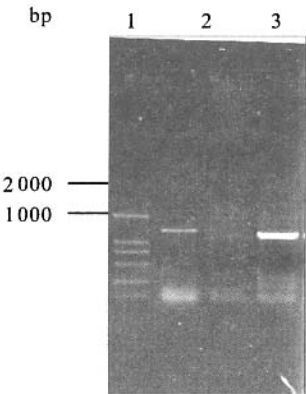
1. 有酿酒酵母阳性转化子长出的 SM 培养基平板;2. 无酿酒酵母阳性转化子长出的 SM 培养基平板;3. W303-1A(a)和阳性转化子(b、c)在 SM 培养基上划线生长对比

图 3 酿酒酵母阳性转化子在 SM 培养基上的生长情况

Fig. 3 The transforments grown on the SM plate

2. 4 酿酒酵母阳性转化子 PCR 鉴定

将初步确认的酿酒酵母阳性转化子接种于 YPD 液体培养基中,于 30 ℃、200 r/min 培养 24 h,提取染色体进行 PCR 鉴定,同时作 W303-1A 阴性对照,琼脂糖凝胶电泳见图 4。可以看出,阳性转化子中可以扩增出产甘油假丝酵母的特异性 *Ura3* 基因,而 W303-1A 中无法扩增出特异性片段,通过扩增得到 W303-1A 的另一段基因 18S rDNA,说明 W303-1A 的染色体是可以用于扩增的。但是由于 W303-1A 内不含有产甘油假丝酵母的 *Ura3* 基因,并且产甘油假丝酵母和酿酒酵母的 *Ura3* 同源性低,根据产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因的特异性设计的引物,W303-1A 染色体无法扩增出产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因,而阳性转化子可以扩增得到 *Ura3* 基因,这说明转化子中已含有了产甘油假丝酵母的 *Ura3* 基因。PCR 鉴定的结果初步表明了通过根癌农杆菌介导转化的方法已实现了产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因对 W303-1A 的遗传互补转化。



1. DNA Marker; 2. 阳性转化子染色体 *Ura3* 基因 PCR 扩增产物;3. W303-1A 染色体 *Ura3* 基因 PCR 扩增产物;4. W303-1A 染色体 18S rDNA PCR 扩增产物

图 4 阳性转化子 PCR 验证

Fig. 4 The PCR determination of transformant
万方数据

2. 5 酿酒酵母阳性转化子稳定性鉴定

将转化子接种在 YPD 培养基平板上,连续转接 10 次以后,再接种于尿嘧啶缺陷的基本培养基上,30 ℃ 培养 3 d。结果显示,转化子可以在尿嘧啶缺陷的培养基上良好生长,表明酿酒酵母阳性转化子特性可以稳定遗传。

3 讨 论

作者通过将含有目的质粒 pCAMBIA3300-*Ura3* 的根癌农杆菌 LBA4404 和酿酒酵母 W303-1A 共培养,利用酿酒酵母 *Ura3* 基因的序列与产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因序列同源性较低(为 79%),但可以互补酿酒酵母的 *Ura3* 基因缺陷为筛选标记,得到了阳性转化子菌株。根据产甘油假丝酵母 *Ura3* 基因序列特异性设计引物,利用该引物进行了 PCR 验证在酿酒酵母染色体中无法扩增出目标产物,而在阳性转化子染色体中可以扩增得到目标产物,初步证明 *Ura3* 基因已经成功地转入了酿酒酵母染色体。表型验证结果也说明,*Ura3* 基因已经转入了酿酒酵母。这些结果表明已初步建立了根癌农杆菌介导转化酿酒酵母的方法。在研究中转化效率达到 3.2 个转化子/10⁵ 个酵母细胞,与 Bundock^[10] 等根癌农杆菌介导转化酿酒酵母的转化率相当。

在研究过程中,对国外普遍采用的在诱导培养基上铺硝酸纤维滤膜的方法进行了改进,采用了在诱导培养基上铺玻璃纸来代替硝酸纤维滤膜直接涂布,实验结果表明该方法可以有效获得转化子,且后续实验操作简单,去除了冲洗菌体的步骤,减少了染菌几率。该法经济实用,大大降低了实验成本。

根癌农杆菌转化酵母系统具有操作简单(不需要制备原生质体)、转化效率高、易于得到转化子、转化子遗传稳定等特点。

(下转第 92 页)

参考文献：

[1] Jun Kayashita. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. **J Nutr**, 1997, 127:139.

[2] Hiroyuki Tomotake. Stronger suppression of plasma cholesterol and enhancement of the fecal excretion of steroids by a buckwheat protein product than by a soy protein isolate in rats fed on a cholesterol-free diet[J]. **Biosci Biotechol Biochem**, 2001, 65 (6): 1412—1414.

[3] Jun Kayashita. Consumption of a buckwheat protein extract retards 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats[J]. **Biosci Biotechol Biochem**, 1999, 63 (10): 1837—1839.

[4] Hiroyuki Tomotake. A buckwheat protein products suppression gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters[J]. **J Nutr**, 2000, 130(7): 1670—1674.

[5] 张政, 苦荞蛋白复合物的营养成分及其抗衰老作用的研究[J]. **营养学报**, 1999, 21(2): 159—162.

[6] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994,216—222.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 40 页)

参考文献：

[1] Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast[J]. **Proc Natl Acad USA**,1978, 75(4):1929—1933.

[2] Beggs J D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid[J]. **Nature**,1978, 275: 104—109.

[3] Bundock P, Amkeden D R, Beijersbergen A G M, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **The EMBO Journal**, 1995, 14(3): 3206—3214.

[4] Piers K L,Heath J D,Liang X Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,1996, 93: 1613—1618.

[5] Li Yanli, Shen Wei, Zhuge Jian. Isolation and sequence analysis of the gene *Ura 3* encoding the orotidione-5'-phosphate decarboxylase from candida glucerinogenes WL2002-5 an industrial glycerol producer[J]. **Yeast**, 2005, 22(6): 423—430.

[6] 匡小婴,饶志明,诸葛健,等. 影响根癌农杆菌电击转化条件的研究[J]. **食品与生物技术学报**,2005,24(4):13—16.

[7] Frank L W Takken,Ringo van Wijk, Caroline B Michielse, et al. A one-step method to convert vectors into binary vectors suited for *Agrobacterium*-mediated transformation curr[J]. **Genet**,2004, 45: 242—248.

[8] 单世华, 李春娟, 张君诚,等. 农杆菌质粒 DNA 提取方法的改良与鉴定[J]. **生物技术**, 2003, 13(4): 19—20.

[9] 周小玲, 沈微, 诸葛健,等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. **微生物学通报**, 2004, 31(4): 89—92.

[10] Bundock P, Hooykaas P J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome gy illegitimate recombination[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1996, 93: 15272—15275.

(责任编辑:李春丽)