



SAM 合成酶基因的克隆及在酿酒酵母中的高效表达

戚 薇, 铁 瑛

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 采用 PCR 技术从 *S.cerevisiae* TCCC 31012 菌株的染色体 DNA 中扩增得到 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶-2 基因 (*sam2*), 将 *sam2* 克隆到酿酒酵母表达载体 pACT2 的强启动子 P_{ADH1} 控制下, 以构建高效表达质粒, 并在酿酒酵母亮氨酸缺陷型菌株 YS58 中表达. 重组质粒经鉴定含有 *sam2* 基因. 工程菌 YS58-2 表达产物经 SDS-PAGE, 结果显示重组菌 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶的分子质量约为 43 ku, 经凝胶电泳扫描, 表达带约占菌体总蛋白的 14%. YS58-2 菌株培养 72 h 的 SAM 合成酶活力为 16.5 U/mg 菌体蛋白, 较出发菌 *S.cerevisiae* TCCC 31012 提高了 40.3 倍, 较受体菌 YS58 提高了 32 倍.

关键词: 酿酒酵母; *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶; 克隆; 高效表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 04-0031-04

Cloning and High Expression of *S*-adenosyl-*L*-methionine Synthetase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

QI Wei, TIE Ying

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The gene (*sam2*) encoding the *S*-adenosyl-*L*-methionine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* was obtained by PCR technique and was inserted into the *Saccharomyces cerevisiae* expression vector pACT2 under the control of alcohol dehydrogenase strong promoter P_{ADH1}. The recombinant plasmid was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* YS58. The subunit molecular weight of *S*-adenosyl-*L*-methionine synthetase is about 43 ku measured by SDS-PAGE. It represents approximately 14% of the total cellular protein. The enzyme activity of the engineering strain YS58-2 at 72 h is 16.5 U/mg cellular protein. It is 40.3 times higher than that of the donor strain *S.cerevisiae* TCCC 31012 and 32 times higher than that of the parental strain YS58.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; *S*-adenosyl-*L*-methionine synthetase; cloning; high expression

S-腺苷-*L*-甲硫氨酸 (*S*-adenosyl-*L*-methionine, 简称 SAM) 是广泛存在于生物体内的一种重要生理活性物质. 生物体内的 SAM 是由 SAM 合成酶 (EC2.5.1.6) 催化 ATP 和 *L*-Met 反应生成的. SAM 在生物体内主要作为甲基供体而参与很多重要反应. SAM 对人体许多疾病关节炎、抑郁症和肝病具有预防和治疗作用. SAM 的制备法有化学合成法、酶促转化法和发酵法. 发酵法是目前工业生产 SAM 的首选途径^[1]. 该法主要利用酵母菌属 (*Saccha-*

romyces), 通过在培养基中加入前体物 *L*-Met 来合成 SAM, 但 SAM 的产量一般都较低. 目前, 国内外研究者通过构建 SAM 合成酶高表达工程菌, 以提高 SAM 的产量^[2,3]. 但目前国内尚无 SAM 规模化生产的报道.

酿酒酵母存在两种 SAM 合成酶同工酶, SAM 合成酶 1 和 SAM 合成酶 2, 分别由基因 *sam1* 和 *sam2* 编码. *sam1* 的表达受过量 *L*-Met 阻遏, 而 *sam2* 的表达受 *L*-Met 诱导, 且 SAM 合成酶 2 不受产物

收稿日期: 2008-01-07; 修回日期: 2008-03-17

作者简介: 戚 薇 (1963—), 女, 天津人, 教授, 博士.

抑制^[4]。本研究采用 PCR 技术,从酿酒酵母 TCCC 31012 菌株中扩增得到目的基因 *sam2*,将该 *sam2* 置于酿酒酵母表达载体 pACT2 强启动子 P_{ADHI} 的调控下,以构建高效表达 *sam2* 的酿酒酵母工程菌,为实现工业化生产 SAM 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

Saccharomyces cerevisiae TCCC 31012,由天津科技大学工业微生物菌种保藏中心保存;*S. cerevisiae* YS58 (MATa⁻,ura⁻,trp⁻,leu⁻,his⁻),由中科院微生物所张博润老师惠赠;*E. coli-Saccharomyces cerevisiae* 穿梭质粒 pACT2 (*Amp^r*,*leu⁻*),由天津市诺奥科技发展有限公司惠赠。

1.1.2 主要试剂

SAM 标准品, Sigma 公司; Taq DNA 聚合酶、*Bam*HI、*Hind*III、dNTPs、T4DNA 连接酶和小量 DNA 片段快速回收试剂盒, TaKaRa 公司; 1 000 bp DNA 分子质量标准、蛋白质分子质量标准等购于上海生物工程技术有限公司。

1.1.3 培养基

SD 培养基 (g/L): YNB^[5]1.7, 葡萄糖 20, 硫酸铵 5.0, 琼脂 20, 121 °C 灭菌 15 min。

SD/-Leu 培养基 (无亮氨酸 SD 培养基): 在 SD 培养基中 (灭菌后冷却至 50 °C) 加 10% 缺少亮氨酸的氨基酸混合溶液^[6] (过滤除菌), 混匀后倒平板。

YPD 培养基 (g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, pH5.6。固体培养基加琼脂 20 g。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中酿酒酵母来源的 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶-2 基因 (*sam2*) 的序列 (登录号 M23368) 设计引物。上游引物: 5'-TATGGATCCACCATGGCCAAGAGCAAACACT-3', 下游引物: 5'-AAAGAAATACGATCCGATTCGAACGCCGCGC-3', 划线部分分别为 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点。

1.2.2 PCR 扩增目的基因片段

将从 *S. cerevisiae* TCCC 31012 细胞中提取的染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增反应。扩增条件: 92 °C 预变性 1 min; 92 °C 变性 30 s; 50 °C 复性 2 min; 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72 °C 后延伸反应 15 min。

1.2.3 重组表达载体 pACT2-*sam2* 的构建

质粒 pACT2 和 PCR 产物分别用 *Bam*HI-*Hind*III 双酶切, 用 0.8% 琼脂糖凝胶鉴定, 以 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 割胶纯化。将纯化的 PCR 产物和 pACT2 进行连接。

1.2.4 重组质粒的转化及阳性转化子的检出与鉴定

采用醋酸锂转化法^[7]将上述连接产物转化 *S. cerevisiae* YS58, 然后涂布在无亮氨酸的 SD 平板 (SD/-Leu) 上, 30 °C 培养 3 d。挑取单菌落接入 1.5 mL YPD 培养基中培养过夜, 提取质粒鉴定。

(1) PCR 鉴定: 以提取的质粒 DNA 为模板进行 PCR 筛选鉴定, 同时用 pACT2 空质粒为模板作对照。引物和 PCR 反应体系同 1.2.1 和 1.2.2。出现特异性目的基因条带的质粒为阳性质粒, 进行后续鉴定。

(2) 酶切鉴定: 取 PCR 中出现特异性目的基因条带的重组质粒和 pACT2 空质粒, 分别用 *Bam*HI-*Hind*III 双酶切, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察酶切结果是否正确。

(3) 测序鉴定: 取通过 PCR 筛选和酶切鉴定的重组质粒菌液 0.5 mL, 送上海英俊生物工程公司进行序列测定。

1.2.5 阳性转化子的培养及表达

挑取无亮氨酸 SD 平板上生长的阳性转化子单菌落 (YS58 作对照) 至装有 3 mL YPD 培养基的试管中, 30 °C 振荡培养 16~18 h, 以 1% 接种量接入装 25 mL YPD 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C 振荡培养 72 h。离心收集菌体, 采用液氮法破壁, 然后加少量的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液并加入等体积的 2 × SDS 加样缓冲液, 混匀后沸水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 SDS-PAGE (分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%), 以检测目的基因的表达。

1.2.6 SAM 合成酶活力的测定^[8]

将液氮法破壁后的上清液作为粗酶液, 测定反应后所生成产物 SAM 的量来计算酶活。

反应体系 (1 mL): 0.5 mL 粗酶液, 0.25 mL 20 mmol/L ATP 溶液, 0.25 mL 20 mmol/L *L*-Met (以不加 *L*-Met 的反应为对照), 30 °C 水浴 60 min, 加 20% 高氯酸溶液 0.5 mL, 摇匀后静置 30 min。然后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 微膜过滤, 采用 HPLC 检测 SAM 的量。

HPLC 条件: 岛津 HypersilC₁₈ 色谱柱 5 μm, 4.6 mm × 150 mm; 流动相 0.02 mol/L 甲酸铵溶液,

用甲酸调 pH4.0; 流速 1 mL/min; 紫外检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μ L.

酶的活力单位定义: 在 30 °C, pH3.5、前体物 ATP 的初始浓度为 5 mmol/L 和 *L*-Met 为 5 mmol/L 的条件下, 反应 60 min 所催化形成 1 μ mol SAM 所需要的酶量, 定义为一个活力单位.

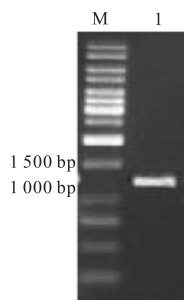
1.2.7 蛋白质含量的测定

采用 Lowry 法测菌体蛋白含量^[9], 以牛血清白蛋白作标准.

2 结果与分析

2.1 目的基因的获得

由酵母菌蛋白质数据库 (Yeast Protein Database) 和酿酒酵母基因组数据库 (Saccharomyces Genome Database) 资料获悉, *S.cerevisiae* 来源的 SAM 合成酶 2 的结构基因 (*sam2*) 中没有内含子, 故实验以提取的 *S.cerevisiae* 染色体 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增目的基因 *sam2*. PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示.



M. DNA 分子质量标准; 1. PCR 产物

图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Analysis of PCR products

从图 1 可见, PCR 扩增产物约为 1 200 bp, 与报道的 *S.cerevisiae* 来源的 *sam2* (1 152 bp) 大小相符.

2.2 重组质粒 pACT2-*sam2* 的构建与转化

pACT2 (*Amp^r*, *leu⁻*) 为 *E. coli-S.cerevisiae* 穿梭质粒, 该质粒既能在 *E. coli* 中复制, 也能在 *S.cerevisiae* 中复制, 其主要包括以下几个部分:

(1) 酵母菌 2 μ m 质粒的部分序列及复制起始区; (2) 来源于 Col E1 的复制起点; (3) 氨苄青霉素抗性基因 (*Amp^r*); (4) *S.cerevisiae* 的 LEU2 基因; (5) *S.cerevisiae* 乙醇脱氢酶 (ADH1) 基因的强启动子 P_{ADH1} 和强终止子 T_{ADH1}; (6) 位于强启动子与强终止子之间的多克隆位点 (MCS) 区段. 此

质粒转化大肠杆菌, 可通过氨苄青霉素抗性标记选择; 转化酿酒酵母亮氨酸缺陷型, 可通过 LEU2 基因互补作用筛选转化子 (图 2).

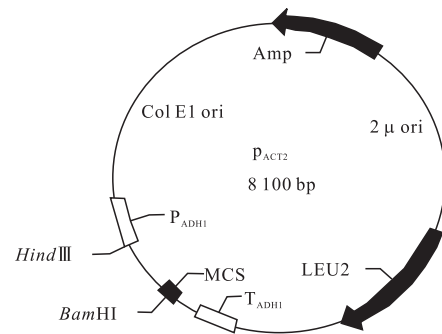


图 2 pACT2 质粒

Fig. 2 Primitive plasmid pACT2

将质粒 pACT2 和 PCR 产物分别用 *Bam*HI-*Hind*III 双酶切, 然后将酶切 PCR 产物和 pACT2 置于连接反应体系中进行连接, 使目的基因 *sam2* 置于强启动子 P_{ADH1} 调控下 (图 3), 并将构建的重组质粒通过醋酸锂法转化 *S.cerevisiae* YS58.

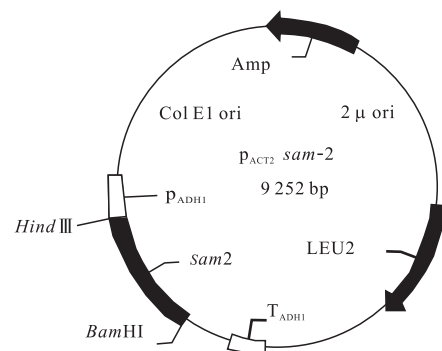


图 3 pACT2-*sam2* 重组质粒

Fig. 3 Recombinant plasmid pACT2-*sam2*

2.3 阳性转化子的检出与鉴定

2.3.1 初筛

能在无亮氨酸的 SD 平板 (SD/-Leu) 上生长的菌落 (表型 Leu⁺) 为可能的阳性转化子, 以进一步鉴定.

2.3.2 PCR 鉴定

从可能的阳性转化子中提取质粒进行 PCR 鉴定, 结果在约 1 200 bp 处出现特异性条带, 与报道的 *S.cerevisiae* 来源的 *sam2* (1 152 bp) 大小相符, 说明重组质粒中含有 *sam2* 基因序列, 而空质粒对照组中没有目的条带出现 (图 4).



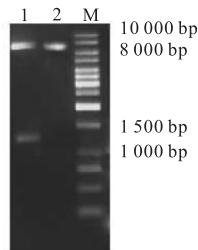
M. DNA 分子质量标准; 1. 空质粒对照; 2. 重组质粒

图4 重组质粒的 PCR 筛选鉴定凝胶电泳图

Fig. 4 Analysis of recombinant plasmid by PCR

2.3.3 酶切鉴定

取 PCR 中出现特异性目的基因条带的重组质粒和 pACT2 空质粒,用 *Bam*HI-*Hind*III 双酶切,结果重组质粒获得约 8 100 bp 和 1 200 bp 两条特异条带,分别与空质粒 pACT2 和目的基因 *sam2* 大小相符,说明目的基因 *sam2* 已插入 pACT2 的多克隆位点. 而空质粒对照组仅出现约 8 100 bp 的载体条带,没有 1 200 bp 的目的条带出现(图5).



M. DNA 分子量标准; 1. pACT2-*sam2*/*Bam*HI-*Hind*III; 2. pACT2/*Bam*HI-*Hind*III

图5 重组质粒 pACT2-*sam2* 的酶切分析

Fig. 5 Analysis of pACT2-*sam2* digested by restriction endonuclease

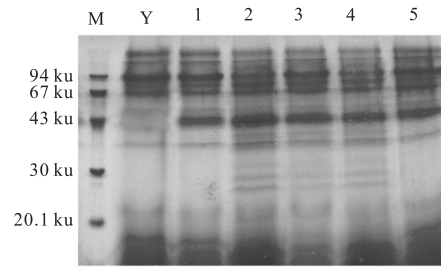
2.3.4 测序结果

将重组质粒上的目的基因进行序列测定,并将测得的序列与 GenBank (登录号 M23368) 中发表的 *Scerevisiae* 来源的 SAM 合成酶的结构基因 (*sam2*) 进行比对,结果显示具有 99% 同源性,说明含目的基因的重组质粒已成功实现了对 *S. ceverisiae* YS58 的转化.

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 检测

阳性转化子摇瓶培养后,离心收集菌体,加入加样缓冲液,沸水浴 5 min,离心后取上清液进行 SDS-PAGE (图6),结果在约 43 ku 处出现一条明显的特异条带,与 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶-2 的分子质量相符. 经凝胶成像扫描分析,目的蛋白约占菌体总蛋白的 14%,说明目的基因 *sam2* 在阳性转化子中得到比

较高的表达.



M. 蛋白质分子质量标准; Y. 宿主菌(YS58); 1—5. 重组菌

图6 重组质粒 pACT2-*sam2* 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE results of recombinant strains

2.5 转化子的 SAM 合成酶活力

采用 HPLC 法测定了阳性转化子 YS58-1、YS58-2、YS58-3、YS58-4 和 YS58-5 发酵 72 h 时胞内 SAM 合成酶的酶活(见表1),发现其 SAM 合成酶活力均比原菌株 YS58 有不同程度的提高,其中阳性转化子 YS58-2 胞内 SAM 合成酶的酶活最高,达到 16.5 U/mg,比出发菌株 *S.cerevisiae* TCCC 31012 提高了 40.3 倍,比受体菌株 YS58 提高了 32 倍.

表1 转化子的 SAM 合成酶活力

Tab. 1 Activity of SAM synthetase

转化子	SAM 合成酶的活力/(U · mg ⁻¹)
YS58-1	10.0
YS58-2	16.5
YS58-3	5.6
YS58-4	5.5
YS58-5	5.9
YS58/pACT2	0.5
TCCC 31012	0.4

3 结 论

(1) 实验克隆的目的基因与 GenBank (登录号 M23368) 中发表的 *S.cerevisiae* 的 SAM 合成酶结构基因 (*sam2*) 具有 99% 同源性,其差异位点有 3 处: 100 bp 处的 C 变为 T,相应氨基酸由 Pro 变为 Ser; 914 bp 处的 T 变为 C,氨基酸由 Leu 变为 Phe; 1141 bp 处的 T 变为 G,氨基酸由 Cys 变为 Gly. 文献报道,酿酒酵母 SAM 合成酶的活性与 His (14)、Lys (165, 245, 265, 269) 和 Asp (16, 118, 238, 271) 有关^[10, 11]. 利用 PROSITE 数据库,确定该酶的活性中心位于第 1193—1206 位氨基酸 (AAATA CTGGATATA). 因此,认为所克隆目的基因的差异位点不在 SAM 合成酶的活性中心. 实验结果也证实了工程菌具有较高的 SAM 合成酶活力.

(下转第 39 页)